

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

LETICIA LEAL DE OLIVEIRA

RECONSTITUIÇÃO VESICAL EM CÃES (*Canis familiaris*):
XENOENXERTO COM TÚNICA ALBUGÍNEA BOVINA CONSERVADA
EM GLICERINA A 98%

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

2008

LETICIA LEAL DE OLIVEIRA

RECONSTITUIÇÃO VESICAL EM CÃES (*Canis familiaris*): XENOENXERTO COM
TÚNICA ALBUGÍNEA BOVINA CONSERVADA EM GLICERINA A 98%

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho

Co-orientador: Prof. Edmundo Jorge Abílio

Campos dos Goytacazes - RJ

2008

LETICIA LEAL DE OLIVEIRA

RECONSTITUIÇÃO VESICAL EM CÃES (*Canis familiaris*): XENOENXERTO COM
TÚNICA ALBUGÍNEA BOVINA CONSERVADA EM GLICERINA A 98%

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Sanidade Animal.

Aprovada em 29 de setembro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Viviane Alexandre Nunes (Doutora, Ciências) – UNIGRANRIO

Prof. Leonardo Serafim da Silveira (Doutor, Produção Animal) – UENF

Prof. Edmundo Jorge Abílio (Doutor, Ciências) - UENF
(Co-orientador)

Prof. Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho (Doutor, Patologia) – UENF
(Orientador)

Dedico aos meus avós Paulo e Gilda, à
minha filha Paula, ao meu marido
Anderson e aos meus pais Leila e Wilson.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal pela disponibilização de espaço e equipamentos necessários para a realização do experimento;

Ao meu orientador professor Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho e ao meu co-orientador professor Edmundo Jorge Abílio pela orientação, ensinamentos, dedicação e amizade, agradeço também a sorte de tê-los como mestres;

A todos os professores do Laboratório de Sanidade Animal, em especial ao professor André Lacerda de Oliveira, Cláudio Baptista e Leonardo Serafim da Silveira pelas contribuições e ensinamentos;

À professora Viviane Nunes pelo auxílio e amizade;

Aos amigos e colegas Gabriela Coelho, Carla Salavessa, Diogo Benchimol, Lio Moreira, Márcia Cruz, Paulo Sérgio de Andrade e Carlos Magno Mariano pelo companheirismo e apoio constantes na implementação do experimento;

A todos do Hospital Veterinário, em especial às amigas Marília Cipriano e Maria Angélica Viestel. E aos colegas da pós-graduação.

A Jovana Campos, por estar sempre disposta a ajudar;

Aos professores do Curso de Veterinária da UFRuralRJ, em especial à professora Gisele Brasiliano de Andrade, pela confiança depositada;

Aos técnicos do Laboratório de Histotécnica Normal e Patológica do Hospital Veterinário da UENF Luciano Grillo de Almeida, Luciana da Silva Lemos, Ricardo Luiz Camara Guerreiro, Bruna Paes Barreto de Oliveira pela grande ajuda e solicitude;

Aos técnicos do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UENF Josias Alves Machado, Orlando Augusto da Melo Júnior e ao colega Anderson Barros Teixeira Pinto pelo apoio laboratorial prestado;

Aos seguranças da UENF, em especial ao Almeida, Luciana e Alan.

Ao Centro de Controle de Zoonose do Estado de Espírito Santo pela doação dos animais;

E a todos que, direta ou indiretamente, participaram deste trabalho;

Em especial, à minha filha Paula por ser o motivo de tudo, e ao meu marido Anderson pela grande dedicação, amor e paciência;

Agradeço ao meu avô Paulo por ser minha inspiração e fundamental na minha vida, mesmo hoje;

À minha mãe Leila e minha avó Gilda, pelo amor dedicado;

Ao meu pai Wilson;

Ao meu padrasto Sérgio, pelo incentivo;

A minha avó Yole e minha Tia Valéria, por estarem sempre presentes e dedicadas;

A Ciléa, Ana Cristina e Pietro pela amizade e aos meus afilhados Luíza e Arthur pelas alegrias;

A Cidnéa, Carla, Alexandre, Fábio e Said por sempre estarem presentes para ajudar e nas dificuldades;

A Vera pelos cuidados com a minha filha nos meus momentos de trabalho;

A todos da minha família e também à minha gatinha Lâmia, e minhas cadelas Belquice e Natasha pelos momentos de alegria e carinho;

E a Deus, pela vida e saúde.

A água humilde abandona o aconchego da fonte, sofre os impositivos do movimento, alcança o grande rio e, partilha a grandeza do mar.

(Emmanuel)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Anatomia e fisiologia da bexiga	14
2.2. Cicatrização e regeneração da bexiga.....	16
2.3. Lesões da bexiga.....	16
2.4. Alternativas para a regeneração vesical	17
2.4.1. Transplante vesical	17
2.4.2. Engenharia tecidual	18
2.4.3. Biomateriais na reconstituição vesical	19
2.4.3.1. “Flap” do músculo reto abdominal.....	20

2.4.3.2.	Enterocistoplastia.....	20
2.4.3.3.	Submucosa intestinal porcina	23
2.4.3.4.	Gastrocistoplastia	23
2.4.3.5.	Esponja Polivinílica	24
2.4.3.6.	Enxerto de matriz acelular de bexiga.....	24
2.5.	Utilização de membranas biológicas preservadas	25
2.5.1.	Meios de Preservação	26
2.5.1.1.	Solução supersaturada de açúcar	26
2.5.1.2.	Solução hipersaturada de sal	27
2.5.1.3.	Glutaraldeído	28
2.5.1.4.	Glicerina.....	29
2.6.	Coleta de membranas.....	32
3.	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1.	Colheita das túnicas albugíneas bovinas.....	33
3.2.	Aquisição e manutenção dos animais anfitriões	33
3.3.	Exames pré e pós-operatórios	34
3.4.	Laparotomia para a colocação do xenoenxerto	34
3.5.	Distribuição de grupos experimentais	37
3.6.	Laparotomia para retirada de amostra para biópsia	37
3.7.	Análise Histopatológica.....	38
3.8.	Confecção de escore para estatística descritiva.....	38

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

OLIVEIRA, Leticia Leal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Setembro de 2008. Reconstituição vesical em cães: enxerto com túnica albugínea conservada. Professor Orientador: Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho. Professor Co-orientador: Edmundo Jorge Abílio.

O comportamento clínico e histológico de um xenoenxerto (túnica albugínea de bovino) conservado em glicerina a 98%, como biomaterial na reconstrução morfofuncional vesical em cães foi o objetivo do experimento. Foram utilizados nove cães adultos, sem raça definida, machos e fêmeas, nos quais realizaram-se defeito vesical de aproximadamente 4 x 3 cm, onde foi fixado um enxerto de túnica albugínea bovina, conservada em glicerina a 98% em temperatura ambiente. Os animais foram avaliados clinicamente, por ultra-sonografia e EAS sendo distribuídos em três grupos, para a retirada de amostra para biópsia da interface do xenoenxerto com a bexiga, aos 35, 56 e 77 dias pós-operatórios. Clinicamente não se observaram sinais de rejeição, nenhum óbito ou complicações pós-operatórias. Havia urotelização no local do xenoenxerto em todos os animais, sendo a túnica incorporada às bexigas aos 77 dias, porém, observou-se mineralização aos 35 dias e metaplasia óssea aos 77, ambas com dimensões microscópicas e que não interferiram na fisiologia do órgão. Concluiu-se que o emprego da túnica albugínea bovina conservada, como um xenoenxerto em bexiga canina, é de fácil aquisição, armazenamento e utilização. Revelando-se uma alternativa com bons resultados, de baixo custo e fácil procedimento. Palavras-chave: cães, xenoenxerto, bexiga, túnica albugínea bovina, glicerina a 98%, preservação tecidual, biocompatibilidade

ABSTRACT

OLIVEIRA, Leticia Leal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. September 2008. Vesical reconstitution in dogs: bovine tunica albuginea graft conserved in 98% glycerin. Advisers: Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho; Edmundo Jorge Abílio.

The objective of this study was to evaluate the clinical and histological graft behaviour (bovine tunica albuginea) conserved in 98% glycerin like a biomaterial in a morfological and functional vesical dogs reconstruction. A vesical defect of approximately 4x3 cm was created in nine males and females adult mongrel dogs and repaired with bovine tunica albuginea graft conserved in 98% glycerin and room temperature. The animals were clinically evaluated by ultrasonography and EAS and divided in three time groups of 35, 56 and 77 days postoperative for histological evaluation of interface between xenograft and bladder. No postoperative complications, signals of clinically rejection, and deaths were observed. All animals presented whole inner surface of the graft covered by urothelium, at 77 days postoperative the tunica was incorporated at the bladder however mineralization was observed at 35 days and metaplasia of bone at the 77 days postoperative. The bovine tunica albuginea conserved presents tiny dimensions and does not disturb the physiology of canine bladder. It can be considered an alternative xenograft for dogs with easy acquisition, storage and use. Key-words: dog, xenograft, bladder, tunica albuginea, glycerin 98%, tissue preservation, biocompatibility.

1. INTRODUÇÃO

Alternativas para reconstituição do aparelho urinário, especialmente no que concerne à reconstrução vesical têm sido pesquisadas. Materiais aloplásticos e biodegradáveis têm sido sugeridos, todavia muitas complicações limitam seus usos. Várias afecções de bexiga como tumores, necroses, rupturas por trauma abdominal contuso ou penetrante, entre outras, podem prejudicar a capacidade de armazenamento da urina.

Os problemas relacionados à função normal da bexiga são muitos e relevantes. Eles, além dos prejuízos fisiopatológicos, interferem de forma efetiva na qualidade de vida do cão, com possibilidade, inclusive, de evoluírem para falência renal.

A reconstituição da bexiga requer um material que aumente a sua complacência e seu volume sem, no entanto, causar intolerâncias imunológicas no receptor do enxerto.

Pesquisas demonstraram que a bexiga urinária tem capacidade natural de auto-reparação e remodelação. Atualmente duas técnicas de regeneração e aumento da capacidade vesical têm sido propostas. A primeira envolve técnicas de engenharia tecidual, usando materiais biodegradáveis que atuam como veículos transportadores celulares. A segunda fundamenta-se no desenvolvimento de materiais biodegradáveis, acelulares, autogênicos ou xenogênicos, constituídos de matriz rica em colágeno.

O objetivo dos estudos deve ir além da melhoria dos materiais utilizados para a reconstrução vesical, assim como o desenvolvimento de novos biomateriais,

mais apropriados e mais adaptados ao longo período em contato com a urina (GLEESON E GRIFFITH, 1992).

No futuro, avanços no conhecimento de fatores químicos e físicos serão responsáveis pelo desenvolvimento de biomaterias “inteligentes”, os quais iniciarão a proliferação, migração, diferenciação e função do urotélio e músculo liso da bexiga (CROSS *et al*, 2003).

O aprofundamento em experimentos neste campo da Medicina Veterinária poderá promover o bem-estar do paciente submetido à reconstrução vesical, não apenas por possibilitar-lhe a oportunidade de micção pela via natural, como também por disponibilizar material e procedimento de baixo custo, sem requerer processamento tecnológico refinado, de forma a que possam ser utilizados de forma rotineira (ABÍLIO, 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento clínico e histológico de um xenoenxerto (túnica albugínea de bovino) conservado em glicerina a 98%, como biomaterial na reconstrução morfofuncional vesical em cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia e fisiologia da bexiga

A urina é formada nos rins e direcionada até a bexiga, onde é armazenada por um período, e posteriormente conduzida ao exterior no momento da micção (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A função da bexiga é estocar urina excretada pelos rins (STAACK *et al*, 2005). Os cálices e pélvis renais, o ureter e a bexiga apresentam a mesma estrutura básica, porém a parede vai gradativamente se tornando mais espessa próximo à bexiga. A mucosa vesical se origina da associação do urotélio, composto pelo epitélio de transição, com a lâmina própria, formada por um tecido conjuntivo que varia de frouxo a denso. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A estrutura da bexiga dos mamíferos apresenta dois elementos extremamente importantes para o seu bom funcionamento. O primeiro é a disposição única da musculatura da parede da bexiga (músculo detrusor), a qual se expande sem aumentar a pressão interna. Isto é alcançado pelo progressivo relaxamento do detrusor. Quando este se contrai, o esfíncter uretral se fecha, quando há simultaneamente o relaxamento do esfíncter interno é permitida a entrada da urina na uretra. O segundo e crucial elemento é o epitélio que reveste a bexiga, conhecido como urotélio, o qual é especializado em formar uma barreira para a urina e se acomodar à expansão e rápida contração do órgão (STAACK *et al*, 2005). As células superficiais do epitélio de transição são as responsáveis por esta barreira osmótica entre a urina e os fluidos teciduais.

Nestas células a membrana plasmática em contato com a urina é especializada, apresentando placas espessas separadas por faixas de membranas mais delgadas. Quando a bexiga se esvazia, a membrana se dobra nas regiões delgadas e as placas espessas se invaginam e enrolam, ao se encher novamente ocorre o processo inverso, aumentando assim a superfície das células (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A porção muscular da bexiga é constituída de três camadas de músculo liso, entrelaçadas, que são separadas apenas na porção do colo vesical. A adventícia da bexiga é formada por tecido conjuntivo denso não modelado contendo grande quantidade de fibras elásticas. Alguns locais da adventícia estão cobertos por uma serosa, uma dobra do peritônio sobre a parede da bexiga, enquanto outros locais podem estar envolvidos por um tecido adiposo (GARTNER e HIATT, 2003).

Fibras autônomas atingem a bexiga através dos nervos hipogástricos simpáticos e pélvicos parassimpáticos. Fibras sensoriais seguem através do nervo pudendo. A principal irrigação sanguínea provém da artéria vaginal ou prostática, que é suplementada pelas reduzidas artérias umbilicais. (DYCE *et al*, 1990).

A túnica albugínea é uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, que envolve o testículo, rico em fibras colágenas (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004) formada por duas camadas. A camada mais externa é formada por feixes de colágenos orientados longitudinalmente e a mais interna por feixes orientados circularmente, sendo um tecido com uma boa resistência (HSU *et al*, 1994).

O uso da túnica albugínea como um biomaterial, é facilitado por ser de fácil obtenção, processamento e utilização (NUNES, 2007; WEFER *et al*, 2002), servindo como alicerce para a regeneração de tecidos (WEFER *et al*, 2002). O enxerto de túnica albugínea autóloga utilizado como reforço da parede abdominal em cães, serviu como excelente substrato e promoveu a precocidade da cicatrização (NUNES, 2007).

No experimento de Wefer *et al* (2002) o enxerto de matriz acelular de túnica albugínea autóloga foi avaliado para reconstrução funcional de pênis de coelho, tendo um bom resultado e não havendo rejeição em nenhum dos animais.

2.2. Cicatrização e regeneração da bexiga

Se a bexiga for totalmente desnudada de sua mucosa, serão necessárias 16 semanas para a sua reepitelização completa. As células do músculo liso regeneram-se em culturas celulares, e foram encontradas fibras de músculo liso em feridas em processo de cicatrização nos vasos sanguíneos, intestino, trato urinário e útero. Contudo, não foi ainda conclusivamente provado que o surgimento do músculo liso nestas feridas é o resultado de regeneração ou hiperplasia desse. A explicação mais provável para as “novas” células do músculo liso é que são o resultado de hipertrofia, migração e diferenciação a partir das células do tecido conjuntivo. (PROBST, 1995).

Tem sido sugerido que o epitélio se regenera na presença de urina, com isso há a formação do epitélio transicional do trato urinário. Entretanto, animais do estudo em questão, nos quais o enxerto não teve contato com urina, desenvolveram um novo epitélio (TORBEY, 1965).

Segundo Gleeson e Griffith (1992), a maioria dos trabalhos com próteses aloplásticas, para a reconstrução total ou parcial da bexiga, tiveram como resultado a regeneração das células do epitélio de transição da superfície luminal, porém a regeneração da função do músculo detrusor foi infrequente.

No experimento de Kropp *et al* (1996), que trabalharam com aumento da capacidade vesical em cães utilizando a submucosa intestinal de porcos, houve evidências de regeneração do músculo liso, porém o que continua obscuro é sua origem.

Em uma abordagem histomorfométrica de anastomose em cólon de coelhos utilizando o método analítico do picrossírius red/luz polarizada, observou-se que o arranjo arquitetural por entrelaçamento das fibras de colágeno na cicatriz confere maior resistência (NETO *et al*, 2007).

2.3. Lesões da bexiga

Várias afecções como tumores, em sua maioria malignos para a espécie canina (BENIGNI *et al*, 2006; ROVERE e ALCOBA *et al*, 2002) necroses (LÉVEILLÉ *et al*, 1992; POZZI *et al*, 2006), rupturas por trauma abdominal contuso

ou penetrante (GALLATTI *et al*, 2004), entre outras, podem prejudicar a capacidade de armazenamento da urina.

O funcionamento deficiente ou as desordens urinárias podem ser causadas ainda por inflamação e lesões nervosas, eles podem influir efetivamente na fisiologia urinária, na qualidade de vida, podendo, algumas vezes, culminar com insuficiência renal (BRANT *et al*, 2004), infecção e incontinência urinária (STAACK *et al*, 2005).

2.4. Alternativas para a regeneração vesical

Uma grande variedade de materiais sintéticos e naturais tem sido utilizada na tentativa de promover a regeneração vesical (PIECHOTA *et al*, 1998a; SANTUCCI e BARBER, 2005).

Projetos de pesquisa direcionados para a regeneração urinária podem ser divididos em três grupos; (i) aumento da capacidade da bexiga ou detrusotomia, mantendo o epitélio intacto e estimulando o crescimento de outra camada dessa; (ii) uso de enxertos aloplásticos e biodegradáveis para induzir a regeneração da bexiga; e (iii) utilização de estratégias de bioengenharia de bexiga utilizando cultura de células e transferência de gens (SHOKEIR, 2002).

Existem também estudos direcionados para o uso de células tronco para repararem ou substituírem tecidos ou órgãos. Estas células podem se diferenciar em qualquer outro tipo celular. Podendo assim, se diferenciar em urotélio, e participando da regeneração vesical. (STAACK *et al*, 2005).

2.4.1. Transplante vesical

Brandt *et al* (2004) e Teixeira *et al* (2007) realizam transplante de bexiga, entre cães mestiços vivos, os quais foram utilizados neste estudo como doadores e receptores do segmento supra-trigonal da bexiga, e não com o órgão inteiro.

A bexiga transplantada se recuperou acompanhada da sua função miccional. Os quatro cães do estudo foram acompanhados até 18 meses após o transplante vesical e permaneceram com as funções vesicais normais e sem uso de imunossupressores (BRANDT, *et al*, 2004). Entretanto no experimento de

Teixeira *et al* (2007) dos dez cães utilizados três apresentaram rejeição à bexiga transplantada, mesmo utilizando imunossupressores por 30 dias.

Ainda assim os autores consideraram o transplante de bexiga em cães um modelo viável fisiológico e simples (BRANDT, *et al*, 2004; TEIXEIRA *et al*, 2007).

2.4.2. Engenharia tecidual

Em certas situações clínicas, como extrofia de bexiga, câncer ou agenesia de bexiga, as células normais não se regeneram no enxerto, sendo situações interessantes para o uso da engenharia celular. Assim as células são desenvolvidas *in vitro* criando linhas celulares viáveis, para a regeneração desejada sem problemas de rejeição, apoptose ou desenvolvimento de neoplasias (ZHANG *et al*, 2005).

O sucesso da engenharia tecidual urológica depende da criação de um enxerto apropriado, que deve ter um arcabouço biodegradável. O biomaterial ideal deve servir de suporte para o crescimento celular e agir como matriz, permitindo o crescimento tridimensional semeando diferentes populações de células (ZHANG *et al*, 2005).

Um estudo comparativo entre enxerto de submucosa intestinal porcina semeada com células uroteliais e musculares, e o mesmo enxerto não semeado e uma cistectomia não houve diferença significativa entre os tratamentos. Este resultado é importante para reavaliar as técnicas de engenharias teciduais na regeneração vesical (ZHANG *et al*, 2006).

A reconstrução da bexiga de minipigs utilizando íleo semeado com queratinócitos e fibroblastos autólogos obteve bons resultados. Não houve complicações com o material implantado. Nesse caso a irrigação sanguínea do íleo manteve a nutrição do enxerto (BREHMER *et al*, 2006).

A engenharia tecidual é um estudo promissor (MERTSCHING *et al*, 2005; SANTUCCI e BARBER, 2005) e, que tem como objetivo a reconstrução de tecidos e órgãos. Foi desenvolvido um arcabouço de matriz acelular oriunda de jejuno porcino com estruturas vasculares criadas *in vitro*. Este arcabouço pode resolver problemas referentes à vascularização de enxertos, tendo importância no futuro desenvolvimento de tecidos e órgãos (MERTSCHING *et al*, 2005).

2.4.3. Biomateriais na reconstituição vesical

Vários tipos de biomateriais têm sido testados, com o objetivo de encontrar um enxerto que seja implantado com técnica cirúrgica simples, resistente ou tolerante a infecções intraluminais, mantenha um bom armazenamento e baixa pressão vesical, e ainda promova um completo esvaziamento da urina (GLEESON e GRIFFITH, 1992).

Os mais utilizados são: o pericárdio, a fáscia lata, o peritônio, a dura máter, a cápsula renal, a submucosa de intestino delgado, o músculo diafragma e bexiga; de diferentes espécies animais, já foram empregados em urologia (FARAMARZIROQUES *et al*, 2004; PIECHOTA *et al*, 1998a; SIEVERT *et al*, 2008; ZHANG *et al*, 2005, 2006), cirurgia geral (BRUN *et al*, 2002, 2004; MAZZANTI *et al*, 2003; NETO *et al*, 1999) e neurocirurgia (PIGOSSI, 1967; PIGOSSI *et al*, 1971).

Os enxertos são transplantes cujas células, sem viabilidade vital no hospedeiro, sejam substituídas ou incorporadas por tecidos no receptor (ALVARENGA, 1992). O transplante feito com tecidos que, migrados para outra área, têm sua integração independente da sua área de origem (PIGOSSI *et al*, 1971).

O biomaterial é denominado retalho quando há dependência da área doadora, também chamado de pedículo (PIGOSSI *et al*, 1971).

Entretanto, o transplante corresponde a materiais, com textura não celular, podendo ser de origem orgânica ou inorgânica e que, incluídos no organismo, permanecem temporária ou permanentemente, sem se integrar ao receptor (ALVARENGA, 1992 e PIGOSSI *et al*, 1971). O autotransplante (transplante autólogo) ocorre quando o receptor do implante é ao mesmo tempo doador. Isotransplante (isogênio/singênio) significa que receptor e doador são gêmeos idênticos ou membros de uma cepa homocigota, tem antígenos idênticos de histocompatibilidade. No halotransplante (homólogo/halogênico) o receptor e doador são membros da mesma espécie animal, sem compartilhar os mesmos antígenos de histocompatibilidade e no xenoenxerto doador e receptor pertencem a espécies animais diferentes (ALVARENGA, 1992).

A reconstrução vesical necessita de um material que aumente a sua complacência e seu volume, sem causar alterações imunológicas no receptor do enxerto (GRECA *et al*, 2004).

Qualquer enxerto não autólogo deve satisfazer a alguns critérios: não ser antigênico ou carcinogênico; ser facilmente incorporado pelo hospedeiro e funcionar por toda a vida do receptor estimulando as propriedades mecânicas do segmento original e ser facilmente armazenado e implantável (RAISER *et al*, 2001).

As próteses aloplásticas são utilizadas em reconstrução parcial ou total da bexiga e aplicadas como implantes temporários, após a regeneração são removidas. Porém, ocorrem numerosos fracassos, como: rejeição do enxerto, extrusão, infecção do trato urinário, formação de cálculos, fístula urinária, peritonites, encolhimento e metaplasia óssea (SHOKEIR, 2002).

Tecido de pericárdio bovino tratado quimicamente é muito utilizado por ser biodegradável e ter uma excelente retenção de sutura. Este é tratado com ácido acético e anidrido ácido acético. A principal desvantagem é o custo (SHOKEIR *et al*, 2002).

Vários são os segmentos do trato gastrointestinal de diversas espécies que podem ser utilizados na cirurgia urológica. Estômago, jejuno, íleo e cólon apresentaram vantagens e desvantagens no seu uso (GRECA *et al*, 2004).

O uso de mucosas gastrointestinais pode resultar em complicações como: desbalanço eletrolítico, formação de cálculos, infecções no trato urinário, produção de muco e neoplasias malignas (STAACK *et al*, 2005).

2.4.3.1. “Flap” do músculo reto abdominal

Utilizou-se um flap do músculo reto abdominal autólogo de coelhos como técnica de aumento da capacidade vesical. Neste tipo de técnica o risco de perfuração na região do enxerto é mínimo, pois o tecido é bem espesso. Entretanto há excessiva fibrose e contração da bexiga, diminuindo assim a sua capacidade significativamente, tornando o método ineficaz (ELICEVIK *et al*, 1998).

2.4.3.2. Enterocistoplastia

Um estudo no qual se utilizou intestino delgado (íleo) autólogo como órgão doador na reconstituição cirúrgica da parede da bexiga canina, comparando duas

técnicas de enxerto intestinal - uma com segmento intestinal íntegro e outra com a mucosa intestinal erodida -, visando o acompanhamento dos fenômenos de contração e urotelização do enxerto. A técnica da erosão da mucosa do auto-enxerto ileal em canino impede a produção de muco, permitindo a uroepitelização do mesmo, a partir do 14º dia. Por outro lado, o enxerto com a mucosa íntegra não favoreceu a uroepitelização no prazo fixado pelo experimento, devido à produção de muco sobre o mesmo (ABÍLIO, 2003). A técnica de erosão da mucosa auto-enxerto ileal foi testada em coelhos apresentando uma baixa intensidade de fibrose e boa revascularização (ELICEVIK *et al*, 1998).

No mesmo estudo de Elicevik *et al* (1998) foi testado como auto-enxerto o flap ileal invertido, que obteve também uma baixa quantidade de fibrose, a técnica de erosão de mucosa foi a que apresentou melhores resultados, principalmente na histopatologia.

A enterocistoplastia porcina utilizando o ceco autólogo desmucolizado é uma opção quando os distúrbios vesicais não são muito extensos (KOCKUM *et al*, 1999).

No trabalho de Gill *et al* (2000) e Lorenzo *et al* (2007) a enterocistoplastia autóloga em humanos foi realizada por meio de laparoscopia, o que é vantajoso por ser uma técnica menos invasiva. Porém, a desvantagem dessa técnica é o risco de extravasamento de conteúdo intestinal no meio intraperitoneal (LORENZO *et al*, 2007).

O cólon descendente autólogo foi testado por se observar nesse maior contratilidade e capacidade de armazenamento, obtendo bons resultados na anastomose cólon-trígono vesical canina. Observou-se inclusive uma adaptação satisfatória de tecido com reepitelização da mucosa do cólon e fácil execução da técnica cirúrgica (PEREIRA *et al*, 2002).

Segundo Torbey e Mozden (1965), se as propriedades de absorção e secreção da mucosa intestinal são anuladas, através da remoção da mucosa da parede intestinal, a seromuscular não altera o metabolismo da bexiga e pode ser um substituto dessa.

Nas duas últimas décadas a enterocistoplastia tem sido muito utilizada para o tratamento de sérias desordens vesicais. Entretanto, pelos benefícios deste procedimento um alto preço é pago e, dentre as complicações mais significantes, podem ser incluídos a produção de muco, formação de cálculos, bacteriúria,

distúrbios metabólicos e complicações intestinais (GRECA *et al*, 2004; GREENWEL *et al*, 2001). Além disso, acredita-se na formação de fatores carcinogênicos derivados da interação entre a urina e bactérias fecais, o que pode favorecer a ocorrência de neoplasias. A dificuldade de se confirmar essa teoria se dá pelo longo período de latência dessa doença (CROSS *et al*, 2003). Outro problema relacionado à enterocistoplastia é o enrugamento do enxerto, diminuindo o seu tamanho, esta alteração é muito prejudicial e pode ocorrer por trauma mecânico (KOCKUM *et al*, 1999).

As complicações relacionadas à enterocistoplastia podem ser atribuídas ao fato de o epitélio intestinal não ser adaptado fisiologicamente para uma exposição prolongada à urina. O biomaterial ideal para a reconstrução urinária deveria combinar propriedades mecânicas da parede do músculo liso com uma estrutura para ter contato com a urina parecida com o urotélio. Várias alternativas além da convencional enterocistoplastia têm sido exploradas (CROSS *et al*, 2003).

Considerando estas desvantagens, foi desenvolvido um experimento no qual se utilizou flap seromuscular pré-fabricado como enxerto para aumentar a capacidade vesical. Neste estudo foram utilizados coelhos, cujos cecos foram isolados e a mucosa cecal retirada. Em seguida, uma parte do urotélio da bexiga foi retirado e colocado no local da mucosa do ceco utilizando uma porção de silicone para manter a luz cecal e fixar o urotélio. Após duas semanas este enxerto foi aplicado na bexiga com o objetivo de ampliar a capacidade vesical. A desvantagem da enterocistoplastia pré-fabricada tem relação com a necessidade de haver dois estágios operatórios. Entretanto, este procedimento culminou no aumento da capacidade vesical sem as complicações comuns da enterocistoplastia. Ainda assim, a necessidade de se fazer duas cirurgias em um pequeno período é um risco acentuado (AKTUG *et al*, 2001).

As desvantagens relacionadas com a enterocistoplastia inspiram o desenvolvimento de pesquisas para a obtenção de tecidos alternativos a serem utilizados no aumento da capacidade vesical (GARIBAY *et al*, 1995 e GREENWELL *et al*, 2001).

2.4.3.3. Submucosa intestinal porcina

Quando se utilizou uma biomatriz de base colagenosa oriunda de submucosa intestinal (SIS, COOK[®]) os resultados foram de urotelização e regeneração do músculo liso em coelhos avaliados em vários períodos e até os nove meses. Apesar de se notar consideráveis incrustações no enxerto (NUININGA *et al*, 2003).

Na utilização da submucosa intestinal porcina para aumento da capacidade vesical em cães, esta foi normalizada e houve regeneração do urotélio e do músculo liso, quando avaliados após quinze meses. Os animais estiveram cateterizados (período de 24 às 92h.), porém, em dois dos dezenove cães retiraram as sondas urinárias no período de doze horas após a cirurgia e houve vazamento de urina pela linha de sutura (KROPP *et al*, 1996).

A submucosa de intestino proveniente de suínos mostrou ser um bioenxerto capaz de induzir a neoangiogênese, a neoformação muscular e a deposição de colágeno necessária para aumento e reparo vesical de cães. O crescimento de um novo tecido contrátil sobre molde da submucosa é preferível a uma cicatriz inerte, muitas vezes limitante no que diz respeito à contratilidade (GRECA *et al*, 2004).

2.4.3.4. Gastrocistoplastia

O estômago tem sido utilizado para substituição vesical, com objetivo de ampliação da bexiga. As suas principais vantagens em relação a outros segmentos são: baixa permeabilidade a solutos urinários, acidificação da urina, excreção de cloretos em uma proporção maior que sua absorção, menor produção de muco, baixo índice de aderências e incidências de bacteriúria. O uso do estômago, todavia, poderá acarretar o aparecimento de anemia ferropriva ou megaloblástica, hipoproteinemia, síndrome do estômago curto, esteatorréia e vômitos incoercíveis (GRECA *et al*, 2004).

De acordo com Greenwell *et al* (2001) o aumento da capacidade vesical utilizando porção do estômago autólogo deve ser usada apenas como última alternativa em seres humanos. Isto porque este procedimento está relacionado com uma série de complicações, principalmente com a síndrome da hematúria-disúria.

No experimento de Shiroyanagi *et al* (2004) avaliou-se a regeneração do urotélio que foi obtido por camada de cultura de células uroteliais e aplicado em flap de estômago sem mucosa em modelo canino. Nesses casos, a estabilidade do autotransplante foi incompleta. O urotélio não se regenerou em três dos oito cães, onde ocorreram hematomas como complicação. Nos urotélios em que houve regeneração as células pareciam isoladas umas das outras e não unidas como no urotélio nativo.

2.4.3.5. Esponja Polivinílica

Estudos utilizaram esponjas polivinílicas para a reparação de defeito na parede vesical de cães, na maioria dos casos houve enrugamento, contração e calcificação do enxerto. A regeneração vesical ocorreu em alguns casos, mas o músculo liso não demonstrou atividade fisiológica. (GLEESON e GRIFFITH, 1992).

2.4.3.6. Enxerto de matriz acelular de bexiga

Segundo PIECHOTA *et al* (1998b), foi testado um enxerto homólogo de matriz acelular em ratos. Neste trabalho houve o aumento da capacidade vesical acompanhada da regeneração músculo detrusor e evidências de inervação similar à original. Porém, em alguns animais houve complicações, como morte causada por uremia em consequência ao extravasamento de urina na cavidade abdominal por ruptura da inserção do enxerto com a bexiga, infecção (abcesso) e em alguns animais se formaram cálculos na bexiga, após quatro meses (Piechota *et al*, 1998a).

O estudo de Probst *et al* (2000) mostrou que o enxerto de matriz acelular na bexiga pode ser implantado com segurança em cães sem rejeição ou complicações no trato urinário (dilatação, fístula, formação de cálculos). Este trabalho foi desenvolvido para confirmar o resultado promissor no modelo em rato, e para focar os aspectos funcionais e imunológicos em um modelo mais relevante como o do cão.

A utilização de biomateriais que tenham como principal componente o colágeno, como é o caso do enxerto de matriz acelular de bexiga, é preferível por ter um maior potencial regenerativo e capacidade funcional (PIECHOTA *et al*, 1998b).

O xenotransplante de matriz acelular de bexiga obtida de hamsters, ratos e cães resultou em um verdadeiro aumento na capacidade vesical, servindo como ponte para a regeneração celular vesical de ratos. O fato de não ter havido reação antigênica relevante pode ser atribuído ao enxerto ser acelular. A regeneração do músculo detrusor em um período de quatro meses ocorreu apenas nas margens do enxerto, acompanhado de uma neovascularização (PIECHOTA *et al*, 1998b).

2.5. Utilização de membranas biológicas preservadas

Variados tipos de membranas biológicas preservadas têm sido utilizados na reparação de diversos tecidos e órgãos, exemplos delas são: o cordão umbilical bovino conservado em glicerina a 98% para restauração de traquéia de cão (MAZZANTI *et al*, 2000), peritônio bovino conservado em glicerina a 98% utilizado em reparo de hérnia perineal (DALECK *et al*, 1992), pericárdio canino mantido em solução hipersaturada de sal para correção de músculo reto abdominal de ratos (BRUN *et al*, 2002, 2004), músculo diafragma homólogo conservado em solução supersaturada de açúcar reparando diafragma canino (MAZZANTI *et al*, 2000), cartilagem auricular canina em glicerina a 98% para reconstituição de parede torácica em gatos (RAPPETI *et al*, 2003), pericárdio bovino em solução supersaturada de açúcar em hernioplastia diafragmática (MAZZANTI *et al*, 2003), entre outros.

O acompanhamento pós-operatório dos animais submetidos às diferentes condutas cirúrgicas por meio de implantes foi realizado por período de tempo variável e avaliado mediante exames clínico, radiográfico, necroscópico e histopatológico. Comprovou-se, de modo geral, a excelência destas membranas biológicas preservadas. Sendo implantadas sem sinais de eliminação ou de processo inflamatório digno de nota (ALVARENGA, 1992).

Portanto, as membranas biológicas consistem em implantes de natureza orgânica, livre, inertes, e que têm como principal característica, serem constituídos

quase exclusivamente por colágeno e por isso apresentam baixa toxicidade (ALVARENGA, 1992).

As membranas biológicas mais estudadas como implantes foram: a fásia lata, o pericárdio, o centro frênico, a dura-máter e o peritônio. As suas aplicações são as mais variadas, pois preenchem requisitos de disponibilidade, baixo custo, preparo simples, esterilização viável, facilidade de estocagem e utilização, e mínima reação histológica ou tecidual (ALVARENGA, 1992).

2.5.1. Meios de Preservação

Durante muitos séculos, a procura por métodos de conservação para diversos tecidos vem sendo constante, seja para a preservação de peças anatômicas ou o crescente uso de materiais biológicos nos transplantes homólogos e heterólogos, em cirurgias reconstrutivas e reparadoras de elementos tubulares, valvares e principalmente de sustentação (MOTA *et al*, 2002).

Os biomateriais conservados por longos períodos apresentam diversas vantagens; servem de ponte para que o tecido natural seja restituído, são resistentes a infecções e têm a possibilidade de serem moldados de acordo com o local de aplicação (MAZZANTI *et al*, 2001).

Estudos com membranas conservadas em glicerina a 98% e solução supersaturada de açúcar, revelaram culturas isentas de germes e ótima manutenção da integridade celular, sendo os melhores meios para estocagem de membranas biológicas (MOTA *et al*, 2002, 2003).

2.5.1.1. Solução supersaturada de açúcar

A solução supersaturada de açúcar a 300% foi preparada com 300 gramas de açúcar cristalizado em 100 mililitros de água tridestilada, obtendo-se uma solução na proporção de 3:1 homogenizada. Os biomateriais foram imersos na solução em frascos estéreis e após 48 horas, a solução foi substituída por uma solução igual e os tecidos permaneceram imersos para conservação e armazenamento por 30 dias em temperatura ambiente (MAZZANTI *et al*, 2001, 2003), havendo assim a

conservação da porção muscular do diafragma, que se dá pela ação desidratante exercida pelo açúcar (MAZZANTI *et al*, 2001).

O segmento de músculo diafragma em solução supersaturada de açúcar a 300% manteve a resistência e estruturas morfológicas do tecido (MAZZANTI *et al*, 2001). Após a implantação dos enxertos nos diafragmas caninos não foram percebidos sinais de infecção, por causa da ação antimicrobiana desse meio de conservação (MAZZANTI *et al*, 2001, 2003). Também não houve evidências de rejeição no local do implante (MAZZANTI *et al*, 2003).

O poder bactericida de soluções de açúcar só é atingindo em concentrações iguais ou superiores a 250% por um período mínimo de 45 dias, o que foi constatado por Mota *et al* (2003), em que se verificou a ausência de crescimento de microorganismos em soluções glicosadas a 300%, com ou sem antibiótico.

A análise histológica da camada muscular do intestino delgado submersa nessa solução revelou um pequeno aumento do espaço intersticial, havendo uma pequena degradação de algumas células. No entanto, grande parte da área analisada manteve-se íntegra, sem alterações aparentes da morfologia celular (MOTA *et al*, 2003).

No estudo de Mota *et al* (2002) a análise ultra-estrutural das células musculares dos tecidos preservados na solução supersaturada de açúcar a 300% mostrou alterações nas organelas, desagregação da cromatina e o rompimento da membrana citoplasmática em algumas células. Sendo este tecido mantido no meio por 45 dias à temperatura ambiente.

2.5.1.2. Solução hipersaturada de sal

A solução hipersaturada de sal, na proporção de 1,5g de sal comercial para um ml de água tridestilada demonstrou possuir propriedades anti-sépticas, uma vez que os biomateriais foram coletados de forma não asséptica e não foram empregados antibióticos durante o período pós-operatório e mesmo dessa forma não houve crescimento de microorganismos nos meios (BRUN *et al*, 2002, 2004). A ação antibacteriana e antifúngica da solução hipersaturada de sal também é centralizada na diminuição da atividade de água, contudo, não foi descartada a

possibilidade de que o iodo (presente no sal comercial) atue neste sentido (BRUN *et al*, 2002).

Antes de se implantar uma membrana conservada em soluções desidratante, torna-se necessário realizar a sua hidratação. O protocolo utilizado para este fim, por diferentes autores, apresenta grande variação, na dependência do material conservado. O período mínimo de 15 minutos demonstrou ser adequado para hidratar pericárdio mantido em sal, contudo torna-se necessário que, previamente, se remova o excesso desta substância por meio de irrigação abundante. Quanto à utilização de antibióticos no líquido de hidratação, os autores acreditam que esta seja uma prática desnecessária, uma vez que não foram encontradas bactérias e fungos na análise histológica do implante, e não ocorreu crescimento destes organismos nos meios nutrientes (BRUN *et al*, 2002, 2004).

Os tecidos conservados em sal mantiveram a maleabilidade, mesmo antes do período de hidratação. Tal característica facilitou a manipulação do implante durante o procedimento cirúrgico. Reações do tipo corpo estranho ou eliminação do implante não foram detectadas, isso talvez seja indicativo de que a solução hipersaturada de sal possua função antiimunogênica, como em outros meios de conservação (BRUN *et al*, 2002, 2004). Ao exame histológico, foi constatado que o pericárdio manteve seu arcabouço conjuntivo-fibrilar, porém as células não apresentavam núcleos (BRUN *et al*, 2002).

Este meio permitiu que o implante atuasse como arcabouço para que o centro frênico canino fosse utilizado na reparação de tecido muscular de ratos Wistar. Sendo assim um meio que pode ser utilizado na conservação de biomateriais (BRUN *et al*, 2004).

2.5.1.3. Glutaraldeído

O glutaraldeído é uma excelente opção no tratamento de membranas biológicas por ser facilmente encontrado, econômico e que trata o tecido em um curto período. Este meio é muito utilizado em biopróteses comerciais, as válvulas cardíacas fabricadas oriundas de válvulas aórticas porcinas são normalmente tratadas em baixas concentrações de solução de glutaraldeído (normalmente 0,5%) (KHOR, 1997). Entretanto, a calcificação do tecido é a principal causa de fracasso

dos materiais mantidos nesse meio (BAUCIA *et al*, 2006; KHOR, 1997), indicando que o glutaraldeído possui núcleos de ancoragem de cálcio, iniciando esse processo (KHOR, 1997).

Esse meio de conservação a 4% quando utilizado na conservação de cartilagem auricular homóloga de bovino para reparo de hérnia umbilical recidivante, mostrou eficiente ação bactericida (SILVA *et al*, 2005).

Segundo Rabelo *et al* (2004), o centro tendíneo diafragmático bovino conservado em glutaraldeído a 4% durante 30 dias apresentou incremento em sua resistência quando à comparado ao material *in natura*. Este meio também se mostrou eficiente quanto a sua ação anti-séptica sobre formas vegetativas bacterianas observadas neste estudo.

2.5.1.4. Glicerina

A glicerina, glicerol ou propanotriol é dotado de propriedade anti-séptica que a levou a ser utilizada na conservação de produtos (vacinas) e instrumentos de borracha sem alterar as características originais (ALVARENGA, 1992). As membranas biológicas conservadas em glicerina à temperatura ambiente são muito utilizadas por serem facilmente manuseadas, ter baixo custo e bons resultados (ALVARENGA, 1992; PIGOSSI, 1967; VICENTI *et al*, 2002). Quando utilizadas dessa forma devem ficar por um período mínimo de 30 dias, antes do procedimento cirúrgico (ALVARENGA, 1992; DALECK *et al*, 1988; MAZZANTI *et al*, 2004; NETO *et al*, 1999; OLIVEIRA *et al*, 2003; RABELO *et al*, 2004; RAPPETI *et al*, 2003). O tempo mínimo de conservação do biomaterial na glicerina garante a atenuação imunogênica assim como o seu efeito antimicrobiano (MAZZANTI *et al*, 2004).

O tempo de preservação da cartilagem em glicerina no estudo de Rappeti *et al* (2003) foi adequado, pois os gatos que receberam o implante de cartilagem auricular canina na parede torácica não apresentaram sinais clínicos de rejeição ou infecção. Ao serem removidas dos frascos, apresentavam aspecto rígido, porém, com arquitetura tecidual macroscópica preservada. O tempo de 25 minutos em que houve a reidratação foi eficaz, tornando a cartilagem maleável.

Quando se avaliou o peritônio bovino conservado em glicerina, observou-se ausência de microorganismos (MOTA *et al*, 2003 e RODASKI *et al*, 2000).

Os tendões calcâneos de cães foram conservados em glicerina a 98% por 45 dias a 6 meses, este período foi adequado para prevenir reação de rejeição, quando implantados onde tinham sofrido tenectomia do tendão calcâneo esquerdo (RAISER *et al*, 2001).

As camadas musculares dos segmentos intestinais preservados em glicerina mantiveram microscopicamente suas características biológicas. Porém, se tornaram mais acidófillas e retraídas quando mantidas por 45 dias (MOTA *et al*, 2003).

A glicerina a 98% causou algumas rupturas na membrana plasmática do músculo liso intestinal nela preservado. Os componentes citoplasmáticos ficaram levemente afastados entre si, não sendo possível observar organelas íntegras, porém foi possível a identificação de corpos densos. Os núcleos apresentavam-se dilatados com desagregação da cromatina. Encontrando-se também a presença de figuras mielínicas (MOTA *et al*, 2002).

O peritônio bovino conservado em glicerina a 98%, manteve a sua elasticidade e aparente resistência (DALECK *et al*, 1988 e RODASKI *et al*, 2000), assim como o centro frênico canino, também conservado nesse meio (BRUN *et al*, 2004). A histologia revelou que o peritônio bovino em glicerina por 60 dias praticamente não sofre alterações. Somente as fibras musculares apresentavam-se mais acidófilas, retraídas e com núcleos condensados. Esses aspectos histológicos seriam compatíveis com a ação desidratante da glicerina (DALECK *et al*, 1988).

Esta ação propicia seu poder antisséptico e ocorre por causa da sua acentuada hidrofília. Havendo assim uma ligação covalente com as moléculas de hidrogênio presentes na água, ou seja, uma ligação eletrostática entre os átomos. Acredita-se que a glicerina tenha contato com a água das células quando ela penetra nessas através dos poros existentes nas suas membranas, isto ocorreria porque as moléculas da glicerina têm tamanho muito pequeno (PIGOSSI, 1967; PIGOSSI *et al*, 1971).

As características físicas de consistência e maleabilidade do tendão conservado em glicerina, após reidratação, não se igualaram a do tendão receptor, mesmo após o período de 24 h. Deduz-se que a conservação prolongada de tendões cause um grau de desidratação que não pode ser compensado completamente em 24h. Essa variação não causou, no entanto, reação tecidual

diferenciada quando comparada aos preservados por menor tempo (RAISER *et al*, 2001).

No estudo com artéria carótida homóloga conservada em glicerina e implantada em uretra canina, verificou-se invasão linfoplasmocitária, indicativa de processos em que existe reação local hiperimune, porém foi muito discreta e não se difundiu ao redor do implante. Assim, o aspecto histopatológico apresentado foi representativo de processo inflamatório agudo. Por outro lado, a glicerina foi capaz de preservar a arquitetura do tecido conservado, não havendo degeneração das suas fibras (PAULO *et al*, 2000).

O centro tendíneo diafragmático bovino conservado em glicerina a 98% durante 30 dias não apresentou diferenças significativas quanto à resistência, quando comparado ao material *in natura*. A glicerina a 98% após 30 dias de conservação do tecido foi eficiente contra formas bacterianas vegetativas (RABELO *et al*, 2004).

Outra vantagem da glicerina, que foi evidenciada no trabalho de GIOSO *et al* (2002), é servir para o armazenamento do material em temperatura ambiente. Isto porque, armazenando-se à temperatura ambiente não há formação de cristais intra e extracelulares, além de, alterações eletrolíticas deletérias às células e à matriz extracelular.

Pigossi *et al* (1971) em seu estudo, concluíram que a conservação da dura-máter canina em glicerina na temperatura ambiente, não altera suas características fundamentais de textura e evita contaminação. O implante de dura-máter homogênea em cães conservada em glicerina não provoca reações do tipo corpo estranho nem inflamatória aguda. O método de conservação desse tecido em glicerina é fácil e pouco dispendioso.

A conservação em glicerina pode reduzir a antigenicidade dos tecidos (BRUN *et al*, 2004; MAZZANTI *et al*, 2000; PIGOSSI, 1967; PIGOSSI *et al*, 1971), o que evita o uso de drogas imunossupressoras durante os períodos trans e pós-operatórios (RAISER *et al*, 2001). Além disso, é capaz de preservar a textura dos biomateriais, atuando também como fixador e desidratante de atuação rápida (PIGOSSI, 1967; PIGOSSI *et al*, 1971).

O centro frênico canino em glicerina a 98% utilizado na reparação de defeito da parede abdominal de ratos foi sendo substituído progressivamente pelo tecido do hospedeiro, o que comprovou que o centro frênico conservado nesse meio

serve como um arcabouço para o desenvolvimento do tecido vivo (BRUN *et al*, 2004). Ocorreu da mesma maneira a substituição progressiva do cordão umbilical bovino conservado em glicerina a 98% por tecido de granulação regenerando lesão traqueal de cães (MAZZANTI *et al*, 2000).

A glicerina também aumenta a resistência da dura-máter à tração, sem alterar apreciavelmente o seu grau de elasticidade. Ainda age como poderoso antisséptico e com amplo espectro de ação, excetuando-se formas bacterianas esporuladas e vírus. Entretanto, sabe-se que temperaturas altas destroem a maioria dos vírus e que as baixas podem exaltar sua virulência, mas, por outro lado os vírus não resistem à temperatura ambiente por períodos prolongados e variáveis. Sendo assim, como a conservação de tecidos pela glicerina é feita em temperatura ambiente e este biomaterial é conservado por longos períodos, este método pode evitar a transmissão de doenças com etiologia viral em material inadvertidamente contaminado (PIGOSSI, 1967 e PIGOSSI *et al*, 1971).

2.6. Colheita de membranas

Procura-se limpar eventuais resquícios de sangue em água corrente e remover tecidos indesejáveis que permanecem junto a elas. Depois, são colocadas em frascos de vidro de boca larga, esterilizados e recobertas com solução esterilizante (glicerina 98%) onde recebem identificação e data de coleta. São assim estocadas em temperatura ambiente por período nunca inferior a 30 dias, quando estão consideradas em condições de ser utilizadas (ALVARENGA, 1992).

Eventuais alterações de características do líquido notadas com a glicerina, como turvação ou formação de grumos, fazem com que o material seja descartado. Antes de serem utilizadas, as membranas são removidas do meio de conservação, lavadas em solução fisiológica e mantidas submersas nestas por período de cerca de 20 a 30 minutos. De modo geral, as membranas reidratadas tornam-se mais maleáveis e de fácil manipulação (ALVARENGA, 1992).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Colheita das túnicas albugíneas bovinas

As túnicas albugíneas foram obtidas de bovinos sadios, pesando em média 120 kg, mestiços, criados no Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, na cidade de Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro, após orquiectomia através do acesso escrotal.

Os testículos hípidos, passaram por uma toailete para eliminação de anexos. Em seguida, as túnicas albugíneas foram destacadas por completo e lavadas rigorosamente em solução fisiológica e imersas em solução de glicerina a 98% contidas em recipientes esterilizados, em temperatura ambiente, por um período de dois anos até sua utilização como xenoenxerto.

3.2. Aquisição e manutenção dos animais anfitriões

Foram submetidos ao experimento segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2000) nove cães mestiços, machos e fêmeas, com idade média estimada em um ano e meio, pesando entre 7 a 22 kg, provenientes do Centro de Controle de Zoonose (CCZ) das cidades de Vitória e Cachoeiro do Itapemirim, ambas no Estado do Espírito Santo.

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em canis duplos, sob temperatura e

luminosidade naturais, recebendo água potável “ad lib” e ração padrão comercial na quantidade ideal necessária para seu peso. Os cães ficaram 30 dias, período necessário para adaptação, sendo assistidos clinicamente, everminados e vacinados contra as principais doenças infectocontagiosas.

3.3. Exames pré e pós-operatórios

Os exames pré-operatórios foram procedidos no Hospital Veterinário do LSA/CCTA/UENF. Os do Laboratório de Patologia Clínica, compreenderam: hemograma, pesquisa de hematozoário, uréia, creatinina e alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) e urinálise e, o de ultra-sonografia de abdome total, com vista a avaliação do trato genito-urinário, se deu no Setor de Clínica de Pequenos Animais.

No pós-operatório estes animais foram avaliados pela ultrassonografia a cada sete dias, com objetivo de se observar a integridade da parede, bem como a sua espessura, o aspecto urina e presença de debris celulares indicativos de infecção.

A urinálise se deu a cada 15 dias até a segunda laparotomia. A par da avaliação clínica diária dos cães, estes, nos sete dias subseqüentes à laparotomia, tiveram suas temperaturas retal aferidas, frequência da micção e aspecto da urina avaliadas, a cada 12 hs.

3.4. Laparotomia para a colocação do xenoenxerto

As cirurgias aconteceram no Setor de Cirurgia do Hospital Veterinário/UENF. O jejum alimentar pré-cirúrgico foi de 12 horas e o hídrico de duas. A medicação pré-anestésica foi a acepromazina (0,01mg/kg.), por via intramuscular. Em seguida, a veia cefálica foi cateterizada e instituída a fluidoterapia intravenosa com solução Ringer com lactato (10ml/kg por hora) até a recuperação anestésica. A indução anestésica se deu com propofol (5 mg/kg) intravenosa. O Isoflurano foi utilizado para a manutenção da anestesia inalatória. Para a anti-sepsia na região abdominal foi aplicada a polivinilpirrolidona na concentração de 1% e

adotados os métodos rotineiros de assepsia para a manutenção de um ambiente cirúrgico asséptico.

Os nove animais foram submetidos à laparotomia mediana retroumbilical, de 10 cm de extensão. Após o acesso e exteriorização da bexiga, esta foi apresentada por tração com fio categute cromado nº 3-0 e, entre eles, esta foi puncionada para seu esvaziamento (Figura 1). Uma incisão mediana de 4 cm na sua face crânio-dorsal até atingir-se a luz do órgão e, em seguida, uma incisão de 2 cm, transversalmente, resultaram no defeito cirúrgico de 4 x 2 cm (Figura 2).

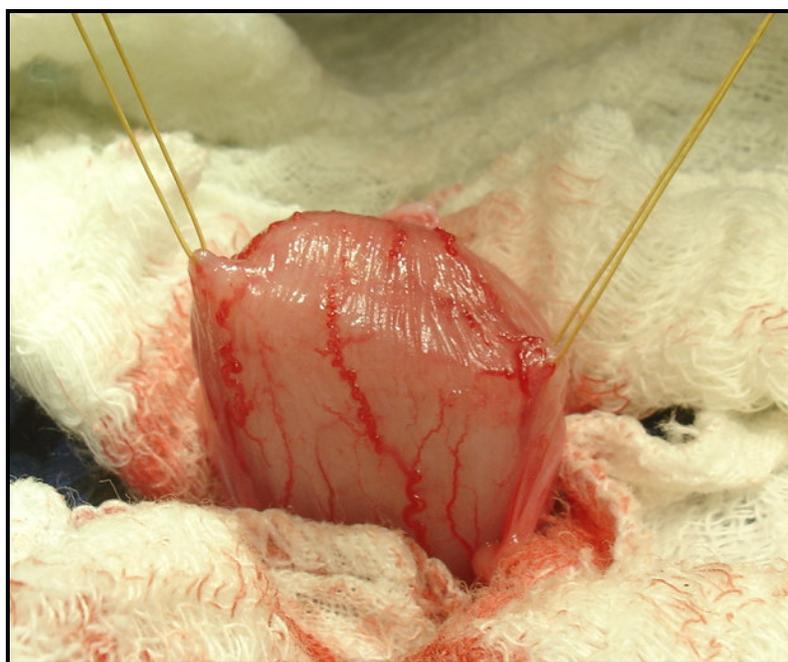


Figura 1: Cão. Bexiga vazia (puncionada). Momento cirúrgico da apresentação para cistoplastia com túnica albugínea bovina em glicerina a 98%.

O xenoenxerto foi imerso em solução fisiológica por dez minutos antes de sua implantação. Este media aproximadamente 4x3 cm (Figura 3). Sua fixação foi por sutura contínua simples, em plano único, transpassando todos os planos anatômicos do órgão, inclusive o urotélio, com fio poliglactina 910 nº 4.0 (Figura 4). Em seguida, procedeu-se a omentalização no local do enxerto, sendo fixado com dois pontos simples que não alcançaram o urotélio

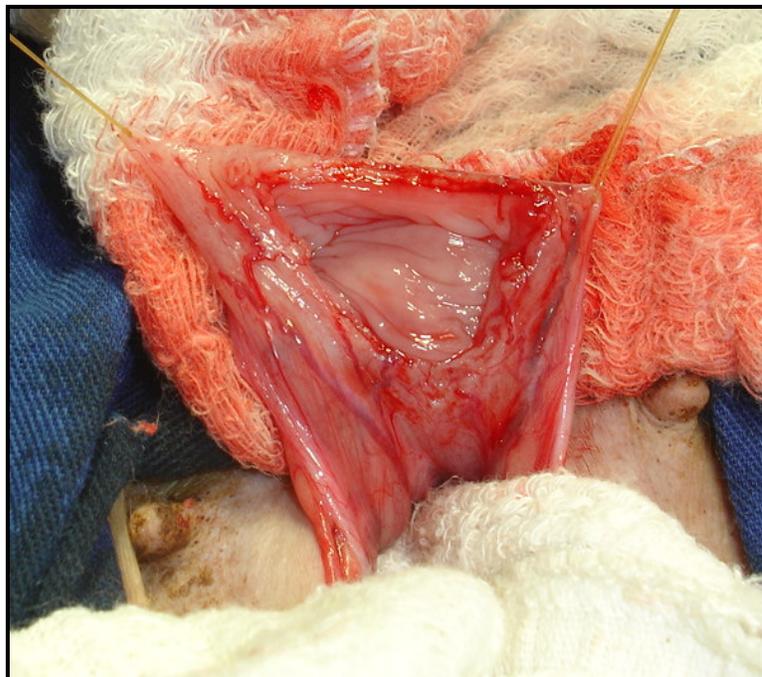


Figura 2: Cão. Cistoplastia. Momento do defeito cirúrgico já provocado para síntese com albugínea bovina em glicerina a 98%.

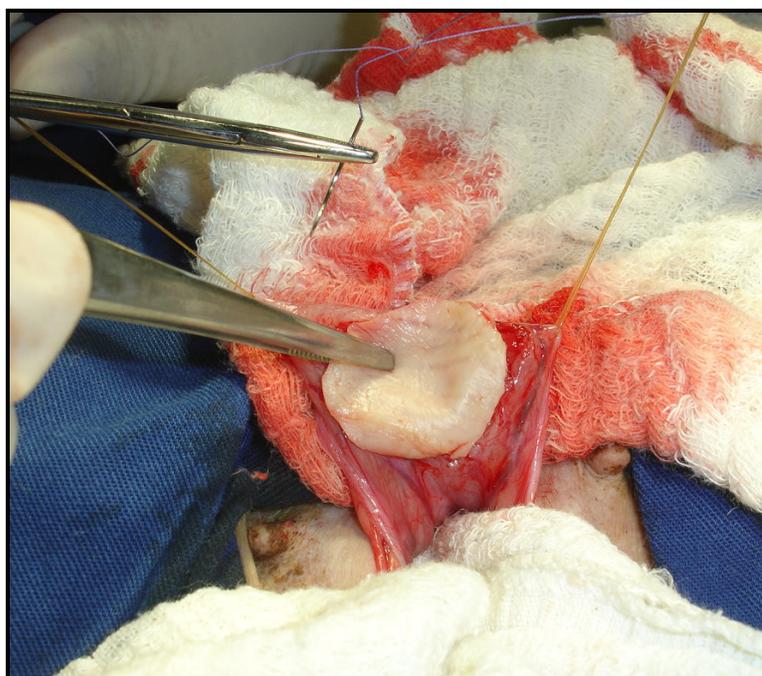


Figura 3: Cão. Cistoplastia. Momento cirúrgico (pré-sutura) da colocação da albugínea bovina em glicerina a 98%.

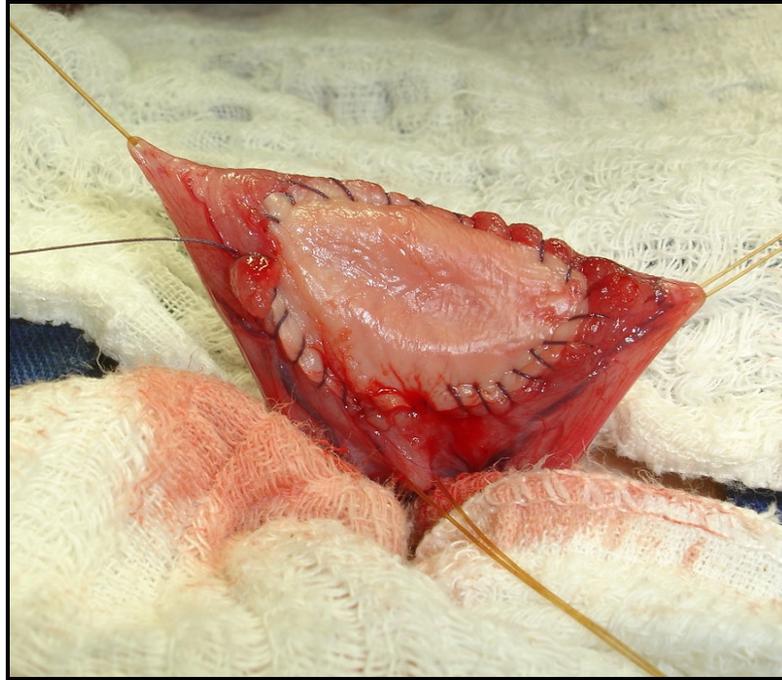


Figura 4: Cão. Bexiga. Cistoplastia. Túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98% suturada ao defeito vesical.

3.5. Distribuição de grupos experimentais

Após a aplicação dos enxertos nos 9 animais, estes foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de três animais cada, para as avaliações anátomo-clínicas aos 35, 56 e 77 dias de períodos pós-operatório nos quais uma nova laparotomia seria realizada para a obtenção de uma amostra da interface da túnica albugínea bovina implantada com a bexiga canina.

3.6. Laparotomia para retirada de amostra para biópsia

Nos períodos pós-operatórios para cada grupo, foi realizada uma nova laparotomia, utilizando-se os mesmos cuidados anestésicos, anti-sépticos e pós-operatórios da primeira cirurgia. Nesta, foram obtidas amostras do tecido vesical enxertado para biópsia, fixadas em formalina neutra tamponada a 10%.

Após a retirada de fragmento vesical, a bexiga foi suturada com pontos contínuos simples, transpassando toda a espessura da parede, com fio poliglactina 910. Com omentalização imediata da ferida cirúrgica. Neste momento cirúrgico foi efetuada a castração dos animais e, após sua recuperação completa, todos foram adotados.

3.7. Análise Histopatológica

As amostras fixadas na solução de formalina foram encaminhadas ao Setor de Morfologia e Anatomia Patológica da UENF e mantidas por um período mínimo de 48 horas. Sendo em seguida, processadas segundo técnicas histológicas por inclusão em parafina e coradas pela hematoxilina-eosina, tricromático de Gomori, e picrossírius red (sob luz polarizada) para a análise microscópica.

3.8. Confecção de escore para estatística descritiva

Para avaliação microscópica foi utilizado um escore, para os três grupos, conforme a evolução da integração do xenoenxerto. Para tanto, os campos mais representativos foram previamente selecionados com a objetiva de 10x e logo em seguida com a de 40x, sendo examinados 10 campos, aplicando-se então um escore de 0 a 3, onde 0 representava a ausência de integração até 3, com a total incorporação da túnica albugínea.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos sobre expansão vesical, há inúmeros trabalhos sobre enxertos, sejam homólogos (PROBST *et al*, 2000), autólogos (ABÍLIO, 2003; NUNES, 2007; PEREIRA *et al*, 2002) ou xenoenxertos (NUININGA *et al*, 2003; RABAH *et al*, 2002). A xenoenxertia com túnica albugínea bovina, conservada em glicerina a 98%, foi empregada neste estudo, mantida em temperatura ambiente por dois anos. Segundo Brun *et al* (2002), sua capacidade de preservação de membranas biológicas em temperatura ambiente é garantida por até 11 anos. Para a sua rehidratação utilizou-se apenas solução fisiológica, por 10 minutos antes da implantação. Entretanto, Raiser *et al* (2001) e Rappeti *et al*, (2003) adicionaram ao soro fisiológico, polivinilpirrolidona e Daleck *et al*, (1988) neomicina.

O xenoenxerto foi suturado à bexiga com poliglactina 910 não se observando litíases, conforme Baiotto (2001), ao contrário de Zhang *et al* (2005). A sutura foi em plano único transpassando todas as camadas, inclusive o urotélio, técnica que resultou em excelente vedação, impedindo o extravasamento da urina para a cavidade abdominal. Esta técnica diferiu de autores, que utilizaram dois (BAIOTTO, 2001; PROBST *et al*, 2000) ou três (NUININHGA *et al*, 2004) planos de sutura, para obter a vedação necessária.

Para prevenir a contaminação no ato cirúrgico utilizou-se apenas antibiótico sistêmico, a exemplo de Rodaski *et al*, (2000) e Oliveira *et al*, (2003). Nenhum dos cães apresentou sinais e/ou sintomas clínicos, senão hematúria e polaciúria nas primeiras 24 horas pós-operatórias. Após este período a urina exibia-se dentro da normalidade, achados que diferem dos de Teixeira *et al* (2007), quando testaram

alotransplantes vesicais em cães que apresentaram a alteração entre 5 a 30 dias. O restabelecimento da micção fisiológica em todos os indivíduos, ao primeiro dia, pode ter sido facilitado pela não utilização de sonda vesical no pós-operatório. Entretanto, em um estudo sobre anastomose cólon-trígono vesical, sem a sonda, os cães apresentaram polaciúria nos primeiros 15 dias após (PEREIRA *et al*, 2002).

Nenhum dos cães, trabalhados, foi a óbito, como registrado por Probst *et al*, (2000); Greca *et al*. (2004). Também não foram notados sinais de rejeição do xenoenxerto, possivelmente, pela ação antigênica e anti-séptica da glicerina (PIGOSSI,1967; PIGOSSI *et al*, 1971; BRUN *et al*, 2002, 2004), o que, pode ter tornado dispensável o uso de imunossupressores, mesmo em se tratando de um xenoenxerto (BRUN *et al*, 2004).

O conteúdo, integridade e espessura das paredes vesicais foram avaliados semanalmente pela ultra-sonografia. Na primeira semana pós-operatória as bexigas já apresentavam repleção de líquido própria, de um conteúdo anecogênico e homogêneo. Entretanto, observou-se um espessamento nos locais dos enxertos sem prejuízo da integridade das paredes, após 30 dias, conforme os estudos de Teixeira *et al*, (2007).

Na avaliação de oito dos nove animais por ultra-sonografia, a partir da sexta semana, as bexigas apresentaram a parede homogênea e normoespessa em toda a sua extensão, achado compatível com o de uma bexiga normal. Em um único animal havia um pequeno espessamento, focal na região dorsal (local do enxerto), oito semanas após a primeira laparotomia (Figuras 5 e 6).

A omentalização é favorável em cirurgias reconstrutivas, pois proporciona neovascularização e minimiza a formação de aderências (BAIOTTO, 2001; NUININGA *et al*, 2003), o que foi provado neste trabalho, quando o omento foi fixado na área do enxerto, prevenindo as aderências às vísceras contíguas e, ainda, proporcionou suprimento sanguíneo do xenoenxerto por artérias tributárias do omento. Macroscopicamente, em todos os grupos, a bexiga apresentava um discreto espessamento e aderência leve e localizada na área do enxerto (Figuras 7 e 8), assim como no estudo de Abílio (2003).

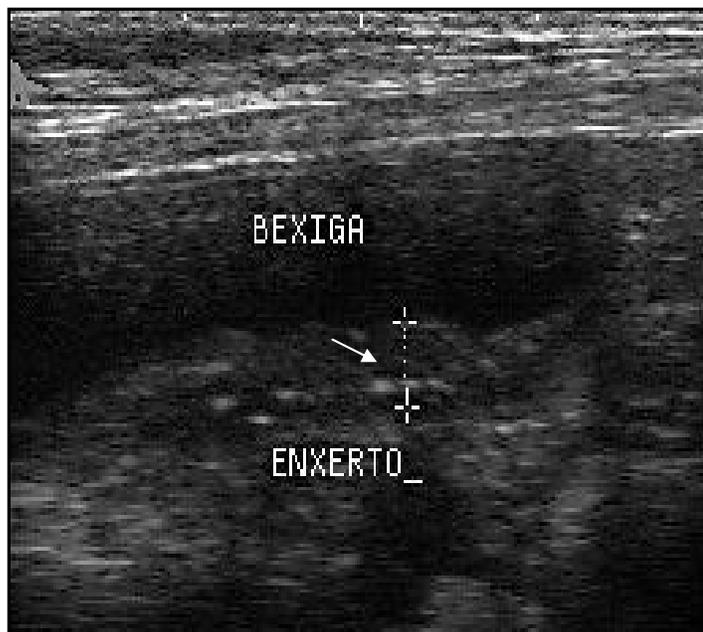


Figura 5: Cão. Cistoplastia com albugínea bovina conservada em glicerina a 98%. Ultra-sonografia aos 21 dias. Detalhe (seta) do fio de sutura poliglactina 910 (pontos hipereecóicos/esbranquiçados) ao redor do enxerto.

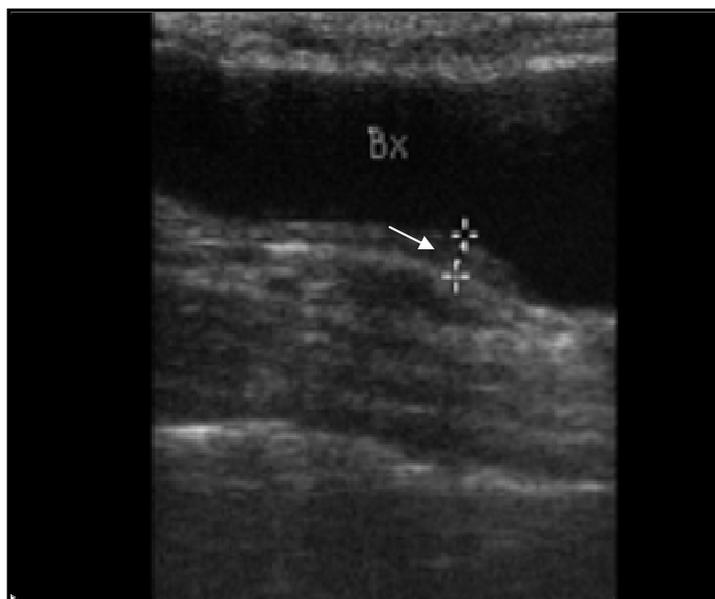


Figura 6: Cão. Cistoplastia com albugínea bovina conservada em glicerina a 98%. Ultras-onografia aos 30 dias. Achado detalhado (seta) do espessamento focal no local do enxerto.

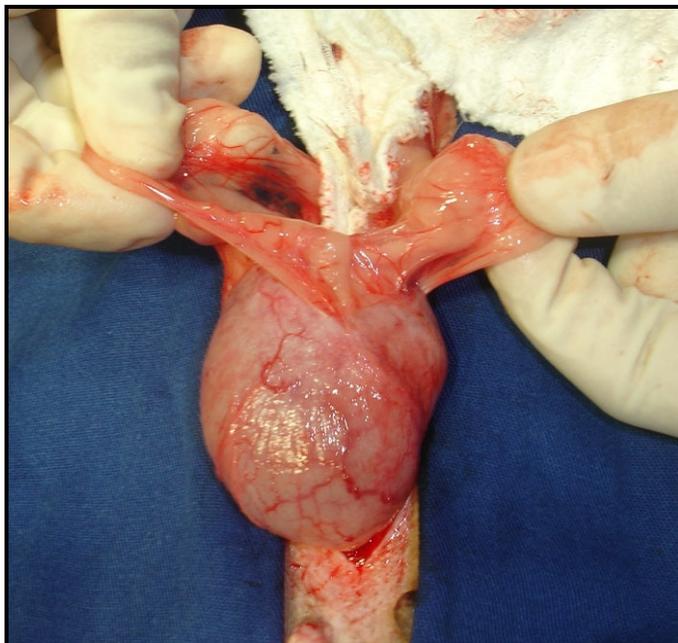


Figura 7: Cão. Bexiga. Cistoplastia com albugínea bovina conservada em glicerina a 98%, passados 77 dias. Aderência discreta do omento (decorrente da omentalização) do xenoenxerto.

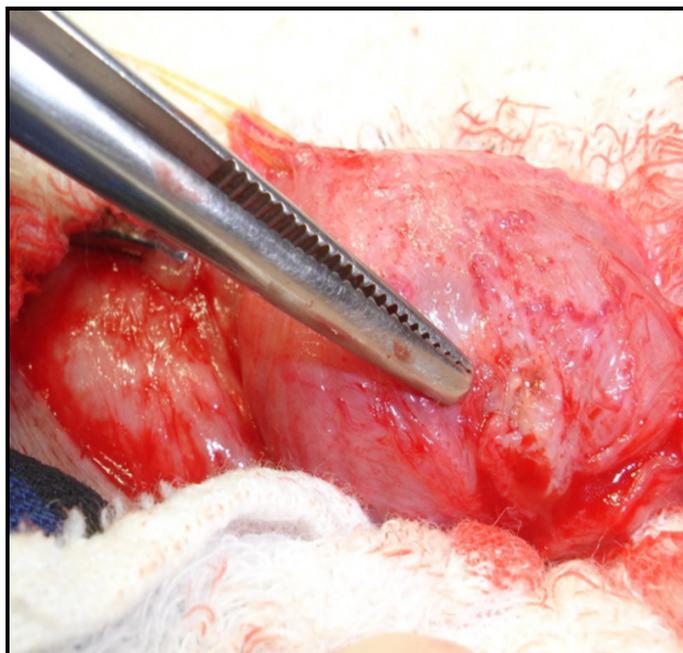


Figura 8: Cão. Bexiga. Cistoplastia com albugínea bovina em glicerina a 98%, aos 77 dias, após a divulsão da brida formada pela omentalização.

À microscopia das secções do enxerto com 35 dias impressionava, na área de interseção, a distinção entre o enxerto, eosinofílico, levemente fibrilar e sem núcleos viáveis com a reação fibrocelular do anfitrião, representada por granulação e, algumas vezes, fibrose com colagenização variada. Esta distinção foi possível se considerar que o enxerto (albugínea) conservado em glicerina, é um material desvitalizado com comprometimento, notadamente dos núcleos, achados ausentes na proliferação fibrocelular reacional do receptor. Em outros campos o enxerto se apresentava em bandas dispersas, o que significaria sua dissolução e incorporação, representada por granuloma imerso por finas bandas de colágeno coradas em verde pelo tricromático de Gomori. A urotelização (Figura 9) estava presente nas faces luminiais dos enxertos, de todos os espécimes (PROBST *et al*, 2000). Estas estavam, algumas vezes, hiperplásicas (BAIOTTO, 200; TEIXEIRA *et al*, 2007). Havia também leucócitos e eosinófilos no local da túnica albugínea. Notou-se em um campo contíguo sinais de atividade colagenolítica da túnica albugínea. Era evidente nos animais com 35 dias a precipitação de sais de cálcio dispostos em duas placas de dimensões discretas em nível da lâmina própria (KROPP *et al*, 1996; ZHANG *et al*, 2005).

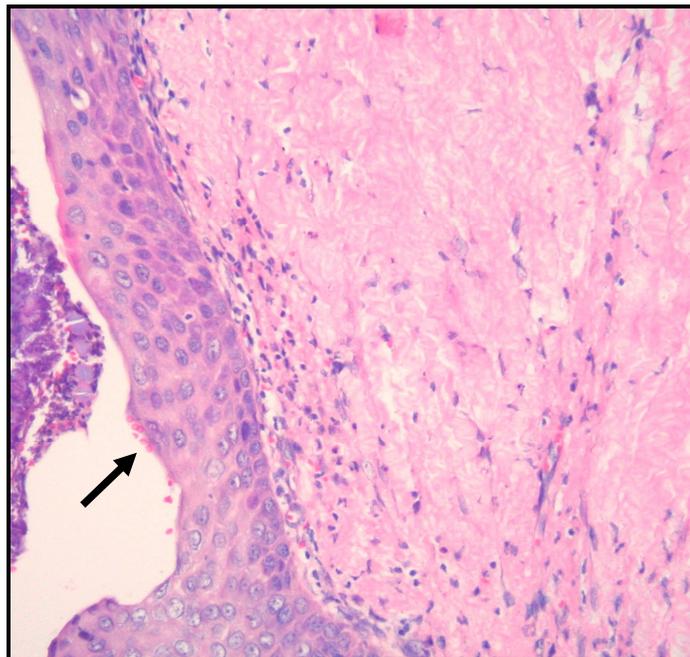


Figura 9: Cão. Cistoplastia. Urotelização suprajacente (seta) a túnica albugínea bovina em glicerina a 98%, implantada, aos 35 dias, HE, Obj. 20x.

Pesquisa sobre expansão vesical em coelhos, utilizando-se segmentos não-epitelizados de intestinal, estômago e dura-máter liofilizada de humanos, impressionou na quase totalidade dos animais que receberam a dura-máter por 4 a 6 semanas, a intensa calcificação e formação de urólitos, embora o urotélio estivesse preservado, no lado luminal do retalho (CRANIDIS *et al*, 1998). Esta condição mimetiza à do presente trabalho no que tange ao achado (calcificação), ao tempo (35 dias) e à integridade do urotélio. Quanto aos urólitos pode ter sido uma condição ligada às características dos coelhos, espécie que excreta uratos, excessivamente (NUININGA *et al*, 2003), embora ZHANG *et al*, (2006) tenha descrito o achado em doze cães tratados com submucosa intestinal de suíno.

O processo de integração do enxerto era mais acentuado no grupo de 54 dias em relação ao de 35 (Gráfico 1). Também associado à resposta granulomatosa (Figura 10). Notou-se uma absorção acentuada da túnica com reação fibrocelular com deposição acentuada de colágeno. Houve resposta inflamatória de caráter crônico por mononucleares e raros polimorfos.

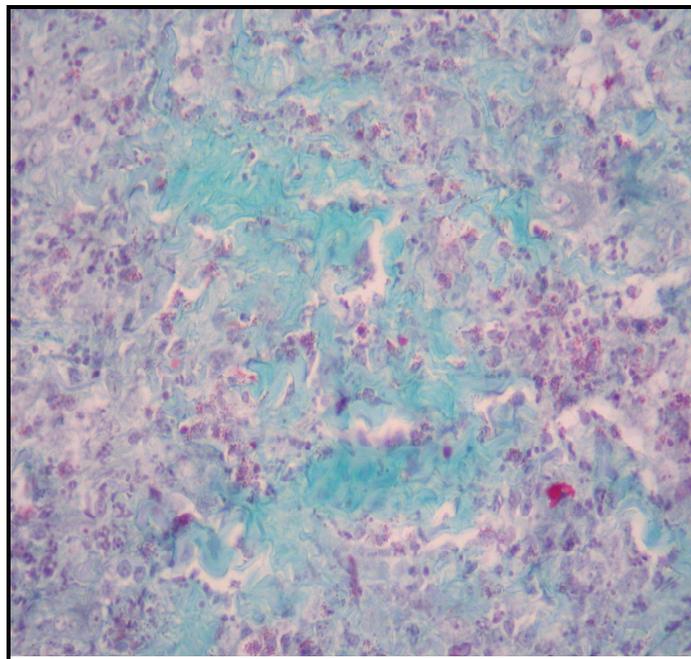


Figura 10: Cão. Cistoplastia. Colágeno (em verde) da túnica albugínea bovina em dissolução, permeado por macrófagos epitelióides, aos 56 dias. Tricromático de Gomori. Obj. 40x.

A poliglactina 910 estava íntegra, mas já com migração celular acentuada, de caráter misto, incluindo leucócitos e raríssimos gigantócitos (uma única célula aparente). Esta alteração remete a um experimento com leitões visando expansão vesical com diferentes tipos de enxertos, quando foi utilizada o fio de sutura poliglactina que, aos 2 meses estava cortejado por reação gigantocitária do tipo corpo estranho (KOCKUM *et al*, 1999). A documentação que expressa fielmente a migração de células inflamatórias permeando os microfilamentos do fio, é de um acervo de uma vertente desta investigação que busca a imunomarcagem de Metaloproteinases da matriz, mas que se revelou, sobremaneira, para representar o processo (Figura 11).

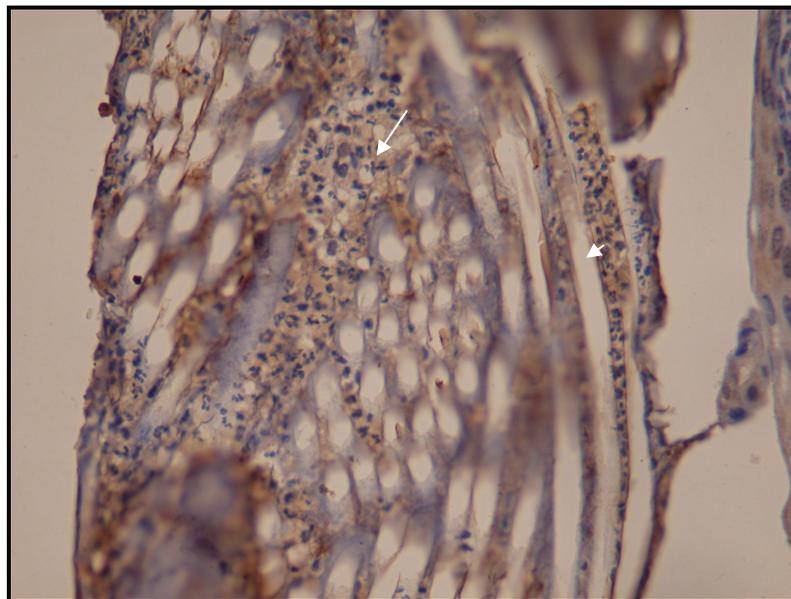


Figura 11: Cão. Cistoplastia com albugínea bovina conservada em glicerina a 98%. Fio de poliglactina 910 (cabeça de seta) com microfilamentos permeados por células migratórias (seta). IHQ/MMP-2.Obj. 40x.

Havia na lâmina própria abundantes e dispersas células linfoplasmocitárias (KOCKUM *et al*, 1999). Que poderiam ser a expressão dos folículos linfocitários que foi registrado em alguns do presente trabalho: dois folículos no grupo de 35 dias, um no de 56 e dois no de 77.

À microscopia, aos 77 dias, não se percebia sinais do enxerto em dois espécimes e em um este estava em dissolução (Gráfico 1), o que se justificaria pela

evolução tumultuada demonstrada pela piúria. Neste grupo somente neste animal havia infiltrado de mononucleares associados a polimorfos, notadamente, eosinófilos. A presença destes últimos poderia ser explicada pela reativação (reagudização) do processo crônico. Com relação ao fio, já havia neste grupo um com absorção total, contra dois em que havia apenas resquícios. Em um caso impressionava a neovascularização no local do enxerto. Foram observados também, associados colateralmente à área do enxerto, sinais de edema e congestão notadamente na lâmina própria em todos os espécimes de todos os grupos, alteração que poderia ser atribuída à manipulação cirúrgica durante as colheitas. Em 2 cães com 77 dias, havia metaplasia óssea em nível da lâmina própria (Figura 12), o que pode significar uma evolução da calcificação, como vista nos animais com 35 dias, se entender que esta (calcificação) pode ter servido de substrato para a ossificação heterotópica (ZHANG *et al*, 2006).

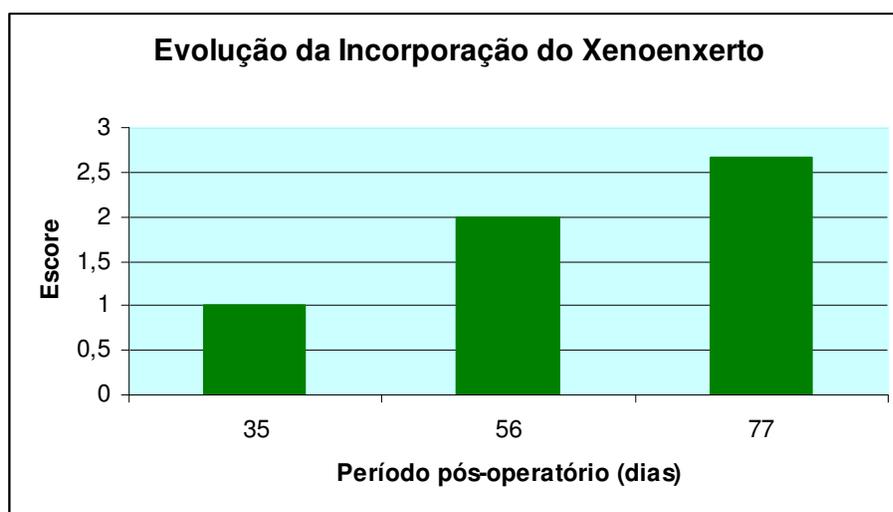


Gráfico 1. Cão. Cistoplastia com albugínea bovina em glicerina a 98%. Evolução da incorporação do xenoenxerto, incipiente aos 35 e completa aos 77 dias.

Na Figura 13 impressionavam na totalidade dos indivíduos trabalhados, na área da reparação, feixes musculares com sinais de vacuolização citoplasmática, corroborando com os achados de Abílio (2003).

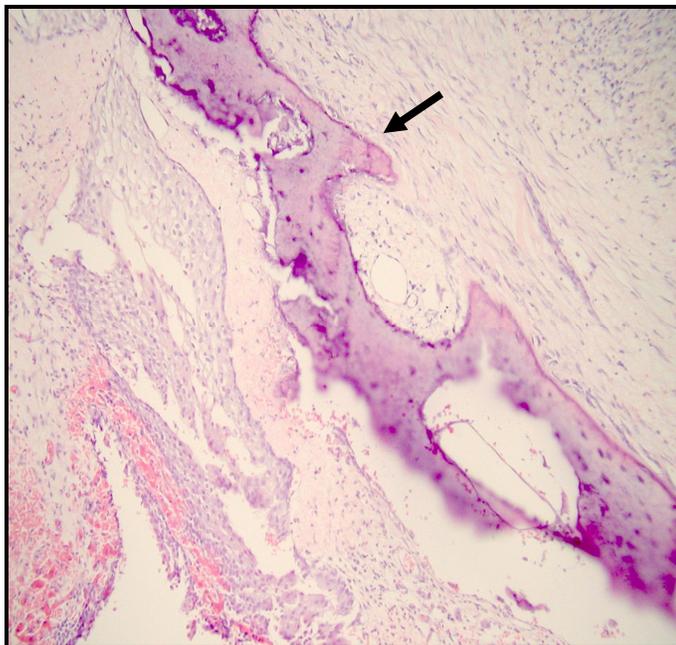


Figura 12: Cão. Cistoplastia com túnica albugínea bovina em glicerina a 98%. Metaplasia óssea (seta) na lâmina própria da bexiga aos 77 dias, HE, Obj. 20x.

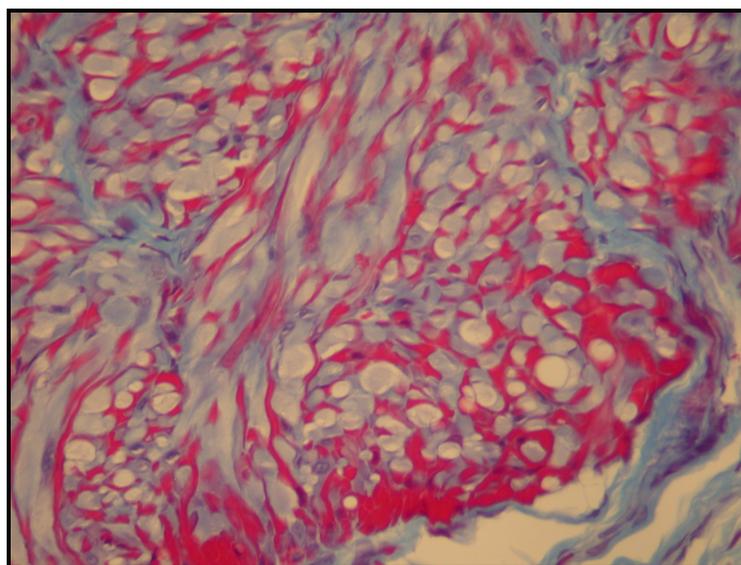


Figura 13: Cão. Cistoplastia com albugínea bovina conservada em glicerina a 98%. Músculo liso na zona de intersecção mostrando sinais de vacuolização. Tricomático de Gomori. Obj. 40x.

Em estudo comparativo, pela técnica do picrossírius red, com luz polarizada, sobre tipos de colágeno em retalhos obtidos de bexigas de rato, porco e homem, foi demonstrada a predominância do colágeno do tipo I, como fibras espessas, fortemente birrefringente em amarelo ou vermelho, na matriz de bexiga de ratos e, o do tipo III, como fibras delgadas esverdeadas e fracamente birrefringentes nos materiais de homem e porco (DAHMS *et al*, 1998). As fibras do tipo III parecem estar envolvidas com a capacidade de expansão de órgãos com esta função, como a bexiga (MONTES, 1996). Nos achados do presente trabalho, sob a óptica do picrossírius red com luz polarizada, eram predominantes as fibras de colágeno do tipo I (vermelhas / maduras), contra fibras esverdeadas (imaturas), do tipo III. (Figura 14). Essa condição pode ser entendida pelo fato das amostras não serem de origem vesical, mas da albugínea e da reação reparativa na interface desta com o tecido do anfitrião. No entanto, não houve nesta investigação um objetivo de quantificar estas fibras.

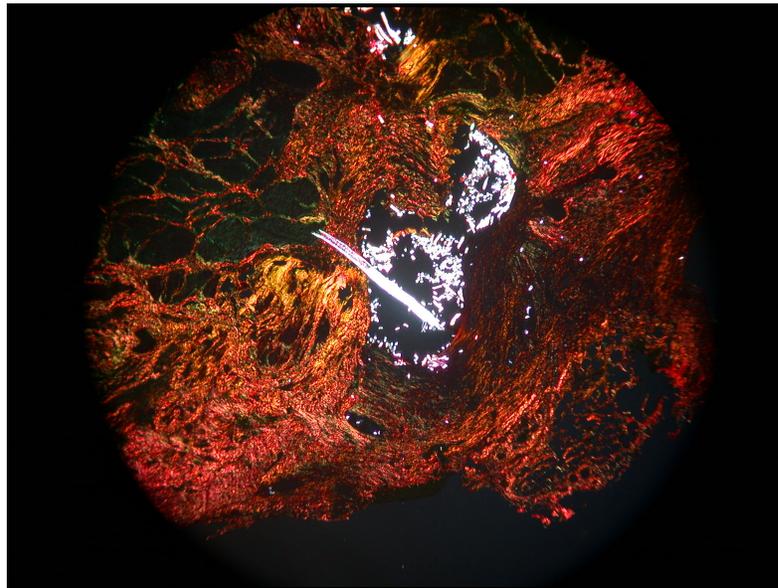


Figura 14: Cão. Cistoplastia com albugínea bovina conservada em glicerina a 98%. Fibras colagênicas com predominância das de tipo 1 (vermelho-amarelado) enfeixadas e com sinais de entrelaçamento incipiente aos 56 dias, envolvendo microfilamentos desorganizados do fio de sutura poliglactina 910, destacado por refrigência branca. Picrossírius red/luz polarizada. Obj. 20x.

Ainda, sob a óptica/polarizada do picrossírius red, impressionava um arranjo entrelaçado das fibras colagênicas em todos os indivíduos, enfeixadas e com entrelaçamento incipiente nas amostras com 35 e 56 dias de pós-operatório. Este achado (entrelaçamento) era notável no material dos animais do grupo de 77 dias, o que, para NETO *et al* (2007), representaria uma condição estrutural capaz de conferir maior resistência cicatricial (Figura15).

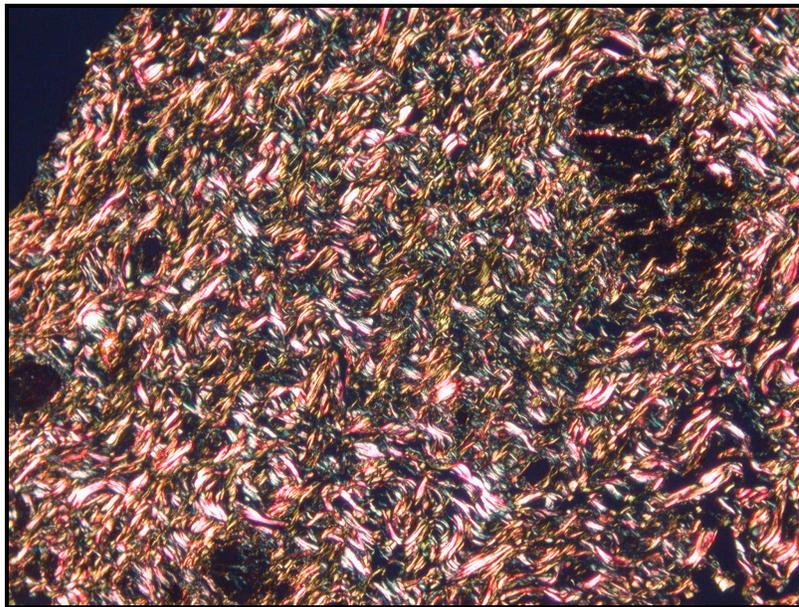


Figura 15: Cão. Cistoplastia com albugínea bovina conservada em glicerina a 98%. Fibras colagênicas dos tipo I (vermelho-amarelado) e III (esverdeada) com padrão arquitetural de entrelaçamento, aos 77 dias. Picrossírius red/luz polarizada. Obj. 40x.

5. CONCLUSÕES

- 1) Há uma evolução gradativa de dissolução do xenoenxerto (túnica albugínea bovina em glicerina a 98%) na cistoplastia em caninos a partir dos 35 e 56 dias pós-operatório e, aos 77 dias, estava totalmente integrado ao anfitrião.
- 2) A túnica albugínea bovina em glicerina a 98%, revelou-se um excelente suporte para urotelização nas cistoplastias em todos os caninos dos 3 grupos (35, 56 e 77 dias pós-operatório) do experimento.
- 3) A disposição arquitetural de entrelaçamento das fibras colagênicas foi mais pronunciado no grupo de 77 dias, correspondendo a uma reparação cicatricial mais resistente.
- 4) O emprego da túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98%, testada como enxerto vesical, em cães, serviu como substrato para o desenvolvimento do tecido anfitrião.
- 5) A túnica albugínea bovina em glicerina a 98%, é uma alternativa de baixo custo, conservação e técnica cirúrgica fáceis, respeitando as características adequadas para um xenoenxerto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍLIO E.J. **Ileoplastia em Cães- Estudo Experimental**. Tese (Doutorado em Ciências) - Rio de Janeiro – RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 38p, 2003.

AKTUG, T.; OZDEMIR, T.; AGARTAN, C.; OZER, E.; OLGUNER, M.; AKGÜR, F.M. Experimentally Prefabricated Bladder. **American Urological Association**, v.145, p.2055-2058, 2001.

ALVARENGA, J. Possibilidades e Limitações da Utilização de Membranas Biológicas Preservadas em Cirurgia. *In*: Daleck C.R., Baptista L.C., Mukai L.S.(eds.) **Tópicos em Cirurgia de Cães e Gatos**. Jaboticabal, FUNEP-UNESP, p.113, 1992.

BAIOTTO, G.C. **Reconstrução vesical em cães após cistectomia supratrigonal utilizando cólon descendente ou bexiga homóloga conservada em glicerina**. Tese (Mestrado)- Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 54 f, 2001.

BAUCIA, J.A.; LEAL NETO, R.M.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído: Comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. **Brazilian Journal Cardiovascular Surgery**, v.21, n.2, p.180-187, 2006.

BENIGNI, L.; LAMB, C.R.; CORZO-MENENDEZ, N.; HOLLOWAY, A.; EASTWOOD, J.M. Lymphoma affecting the urinary bladder in three dogs and a cat. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.47, n.6, p.592-596, 2006.

BRANDT, F.T.; LORENZATO, F.R.; ALBUQUERQUE C.D.C. Transplante de Bexiga. Estudo Piloto. **Acta de Cirurgia Brasileiro** (serial on line), v.19, n.4, p.448-454, 2004.

BREHMER, B; ROHRMANN, D; RAU, G; JAKSE, G. Bladder Wall Replecement by Tissue Engineering and Autologous Keratinocytes in Minipigs. **International Brazilian Journal of Urology**, 97, p. 829-836, 2006.

BRUN, M.V.; PIPPI, N.L.; DREIMEIER, D.; CONTESINI, E.A.; BECK, C.A.C.; CUNHA, O.; FILHO, S.T.L.; ROEHSIG, C.; STEDILE R. Solução Hipersaturada de Sal como Conservante de Pericárdio Canino Utilizado na Reparação do Músculo Reto Abdominal de Ratos Winstar. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.1019-1025, 2002.

BRUN, M.V.; PIPPI, N.L.; DREIMEIER, D.; CONTESINI, E.A.; BECK, C.A.C.; CUNHA, O.; FILHO, S.T.L.; ROEHSIG, C.; STEDILE, R.; SILVA, T.F. Solução Hipersaturada de Sal ou de Glicerina a 98% como Conservante de Centros Frênicos Caninos Utilizados na Reparação de Defeitos Musculares em Ratos Wistar. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.147-153, 2004.

CRANIDIS, A.; NESTORIDIS, G; DELAKAS, D.; LUMBAKIS, P.; KANAVARDS, P. Bladder autoaugmentation in the rabbit using de-epithelialized segments of small intestine, stomach and lyophilized human dura mater. **British Journal of Urology**, v.81, p.62-67, 1998.

CROSS, W.R.; THOMAS, D.F.M.; SOUTHGATE, J. Tissue Engigineering and Stem Cell Research in Urology. **International Brazilian Journal of Urology** , v.92, p.165-171, 2003.

DAHMS, S.E.; PIECHOTA, H.J.; DAHIYA, R.; LUE, T.F.; TANAGHO, E.A. Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human. **British Journal of Urology**, v.82, p.411-419, 1998.

DALECK, C.R.; ALESSI, A.C.; COSTA NETO, J.M.; DALECK, C.L.M.; PADILHA FILHO, J.G. Substituição de um Retalho Diafragmático de Cão por Peritônio de Bovino Conservado em Glicerina: Estudo Experimental. **Ars Veterinária**, v.4, n.1, p.53-61, 1988.

DALECK, C.R.; PADILHA FILHO, J.G.; DALECK, C.L.M.; COSTA NETO, J.M. Reparação de Hérnia Perineal em Cães com peritônio de Bovino Conservado em Glicerina. **Ciência Rural**, v.22, n.2, p.179-183, 1992.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; Wensing, C.J.G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara, 567p, 1990.

ELIÇEVİK, M.; CELAYIR, S.; DERVISOĞLU, S.; BÜYÜKÜNAL, S.N.C. Comparison of Different Bladder Autoaugmentation Techniques in a Rabbit Model. **British Journal of Urology**, v.81, p.49-54, 1998.

FARAMARZI-ROQUES, R.; MALGAT, M.; DESGRANDCHAMPS, F.; BALLANGER, P.; MAZAT, J.P. Mitochondrial Metabolism in the Rat During Bladder Regeneration Induced by Small Intestinal Submucosa. **International Brazilian Journal of Urology**, v.94, p.419-423, 2004.

GALLATI, L.B.; IWASAKI, M. Estudo comparativo entre as técnicas de ultrasonografia e cistografia positiva para detecção de alterações vesicais em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.40-46, 2004.

GARIBAY, J.T.; MANIVEL, J.C.; GONZÁLES, R. Effect of Seromuscular Colocystoplasty Lined with Urotelium and Partial Detrusorectomy on a New Canine Model of Reduced Bladder Capacity. **The Journal of Urology**, v.154, p.903-906, 1995.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em Cores**. Rio de Janeiro, segunda edição: Guanabara Koogan S.A., 536p., 2003.

GILL I.S., RACKLEY R.R., MERANEY A.M., MARCELLO P.W., SUNG G.T. Laparoscopy Enterocystoplasty. **Urology** (rapid communication), v.55, n.2, p.178-181, 2000.

GIOSO, M. A.; BENITES, N.R.; KÄMPF G. Análise Microbiológica de Ossos de Cães Conservados por Longo período de Tempo na Glicerina a 98% à Temperatura Ambiente, Objetivando a Enxertia Óssea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.4, p.242-246, 2002.

GLEESON, M.J.; GRIFFITH, D.P. The Use of Alloplastic Biomaterials in Bladder Substitution. **The Journal of Urology**, v.149, p.1377-1382, 1992.

GRECA, F.H.; FILHO, Z.A.S.; SILVA, A.P.G.; LEONEL, I.S.; SOCCOL, A.T.; FERES, A.N.; Longhi. Utilização da Submucosa de Intestino Delgado Porcino como Retalho para Aumento da Capacidade Vesical em Cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.6, p.670-676, 2004.

GREENWELL, T.J.; VENN, S.N.; MUNDY, A.R. Augmentation Cystoplasty. **International Brazilian Journal of Urology**, v.88, p.511-525, 2001.

HSU, G.L.; BROCK, G.; MARTINEZ-PINHEIRO, L.; HEYDEN, B.; LUE, T.F.; TANAGHO, E.A. Anatomy and Strength of the Tunica Albuginea: Its Relevance to Penile Prosthesis Extrusion. **The Journal of Urology**, v.151, p.1205-1208, 1994.

JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro, décima edição: Guanabara Koogan,, 433p., 2004.

KOCKUM, C.C.; WILLÉN, R.; MALMFORS, G. Bladder Augmentation with Different Forms of Intestinal Graft: an Experimental Study in the Pig. **International Brazilian Journal of Urology**, v.83, p.305-311, 1999.

KHOR, E.; Methods for the treatments of collagenous tissues for bioprotheses. **Biomaterials**, v.18, p.95-105, 1997.

KROPP, B.P.; RIPPY, M.K.; BADYLAK, S.F.; ADAMS, M.C.; KEATING, M.A.; RINK, R.C.; THOR, K.B. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal

submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations. **The Journal of Urology**, v.155, p.2098-2104, 1996.

LÉVEILLÉ, R.; BILLER, D.S.; PARTINGTON, B.P.; MIYABAYASHI, T. Sonographic investigation of transicional cell carcinoma of the urinary bladder in small animals. **Ultrasound**, v.33, n.2, p. 103-107, 1992.

LORENZO, A.J.; CERVEIRA, J.; FARHAT, W.A. Pediatric Laparoscopic Ileal Cystoplasty: Complete Intracorporeal Surgical Technique. **Surgical Techniques in Urology**, v.69, n.5, p.977-981, 2007.

MAZZANTI A., PIPPI N., RAISER A.G., GRAÇA D.L., SILVEIRA A.F., EURIDES D., FARIA R.X., ALVES A.S., GONÇALVES G.F., STIDILE R., BRAGA F.A. Músculo Diafragma Homólogo Conservado em Solução Supersaturada de Açúcar para a Reparação de Grande Defeito na Diafragma de Cão. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.277-283, 2001.

MAZZANTI A., RAISER A.G., PIPPI N., ALVES A.S., FARIA R.X., ALIEVE M.M., BRAGA F.A., SALBEGO F.Z. Hernioplastia Diafragmática em Cão com Pericárdio Bovino Conservado em Solução Supersaturada de Açúcar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.6, p.677-684, 2003.

MAZZANTI, A.; PIPPI, N.; RAISER, A.G.; GRAÇA, D.L.; SILVEIRA, A.F.; EURIDES, D.; FARIA, R.X.; GONÇALVES, G.F.; GUEDES, A.G.P.; RIOS M.V. Restauração da Traquéia de Cães com Membrana do Cordão umbilical de Bovino Conservada em Glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.4, 2000.

MAZZANTI, A.; RAISER, A.G.; PIPPI, N.; BARROS, C.S.L.; BRONDANI, J.T.; MARIN, A.; SILVA, T.R.; HILLE, R.; SALBEGO, F.Z.; STIEVEN, D.; ROHDE, R.; DALMOLIN, F. Homoimplante Ortotópico Conservado, Associado à Terapia “Soft Laser” na Reparação Tenopateler em Cão. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.429-437, 2004.

MERTSCHING, H.; WALLEES, T.; HOFMANN, M.; SCHANZ, J.; KNAPP, W.H. Engineering of a Vascularized Scaffold for Artificial Tissue and Organ Generation. **Biomaterials**, v.26, p.6610-6617, 2005.

MONTES, G.S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v.20, n.1, p.15-27, 1996.

MOTA F.C.D., EURIDES D., FREITAS P.M., BELLETTI M.E., MASTRONTONIO E.C., SHIMIZU B.J., SILVA L.A.F., CARDOSO J.R., MARTINS A.K. **Ciência Animal Brasileira**, v.4, n.2, p.117-123, 2003.

MOTA, F.C.D.; EURIDES, D.; BELLETTI, M.E.; FREITAS, P.M.; MASTRONTONIO, E.C.; SHIMIZU, B.J.; CARDOSO, J.R.; MARTINS, A.K. Análise Ultra-estrutural da Túnica Muscular do Intestino Delgado de Cães Preservado em Diferentes Meios. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.1, p.13-17, 2002.

NETO, J.M.C.; DALECK, C.R.; ALESSI, A.C.; BRACCIALLI, C.S. Tenoplastia Experimental do Calcâneo em Cães com Peritônio Bovino Conservado em Glicerina. **Ciência Rural**, v.29, n.4, p.697-703, 1999.

NETO, J.T.S.; FAKHOURI, R.; MENEZES, M.V.A.; SANTOS, J.S.; PRUDENTE, A.C.L.; MONTEIRO, J.T.S.; FEITOSA, V.L.C. Estudo Histomorfométrico de Anastomose Primárias de Cólon em Coelhos com e sem Preparo Intestinal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, n. 4, p. 384-390, 2007.

NUININGA, J.E.; MOERKERK, H.; HANSSSEN, A.; HULSBERGEN, CC.A.; OOSTERWIJK-WAKKA, J.; OOSTERWIJK, E.; GIER, R.P.E.; SCHALKEN, J.A.; KUPPEVELT, T.H.; FEITZ, W.F.J. A Rabbit Model to Tissue Engineer the Bladder. **Biomaterials**, v.25, p.1657-1661, 2003.

NUNES, V.A. **Enxerto de Túnica Albugínea como Reforço de Parede Abdominal em Cães**. Tese (Doutorado em Ciências) - Rio de Janeiro – RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 55p, 2007.

OLIVEIRA, S.T.; REISER, A.G.; GUEDES, A.G.P.; ALVES, S.D.L.; GONÇALVES, G.F.; MAZZANTI, A.; BELETTI, M.E.; STEDILE, R.; SILVA, T.R. Reparação do Ligamento Cruzado Cranial de Cães por Tendão Homólogo Conservado em Glicerina e Associado a Fio de Náilon. **Ciência Rural**, v.33, n.4, p.717-723, 2003.

PAULO, N.M.; FISCHER, P.; MATOS, M.P.C.; CONCEIÇÃO, M.; FREITAS, J.S.; FILHO, W.A.S.; BRITO, W.C.R.; AMARAL, A.V.C. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, n.1, p.65-71, 2000.

PEREIRA, L.C.; ARAÚJO, R.B.; GHELLER, V.A.; CANDIAN, L.S.; LAVALLE, G.E.; MALTA, M.C.C.; OLIVEIRA, P.P. Anastomose Cólon-trígono Vesical em Cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, 2002.

PIECHOTA, H.J.; DAHMS, S.E.; NUNES, L.S.; DAHIYA, R.; LUE, T.F.; TANAGHO, E.A. In Vitro Functional Properties of the Rat Bladder Regenerated by the Bladder Acellular Matrix Graft. **The Journal of Urology**, v.159, p.1717-1724, 1998a.

PIECHOTA, H.J.; DAHMS, S.E.; PROBST, M.; GLEASON, C.A.; NUNES, L.S.; DAHIYA, R. Functional Rat Bladder Regeneration through Xenotransplantation of the Bladder Acellular Matrix Graft. **British Journal of Urology**, v.81, p.548-559, 1998b.

PIGOSSI, N. **A Glicerina na Conservação de Dura-Máter. Estudo Experimental.** Tese (Livre-Docência) São Paulo - SP - Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo-USP, 36p, 1967.

PIGOSSI, N.; RAI, A.; GAMA, A.H.; SIMONSEN, O.; HADDAD, J.; STOLF, N.A.G.; ZERBINI, E.J.; MINITI, A.; TENUTO, R. Estudo Experimental e Clínico sobre o Emprego, como implante, da Dura-Máter Homógena Conservada em Glicerina à Temperatura Ambiente. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v.17, n.8, p.263-278, 1971.

POZZI, A.; SMEAK, D.D.; APER, R. Colonic seromuscular augmentation cystoplasty following subtotal cystectomy for treatment of bladder necrosis caused by bladder torsion in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.229, n.2, p.235-239, 2006.

PROBST, C.W. Cicatrização das Feridas e Regeneração de Tecidos Específicos. In: Slatter D., **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Manole Ltda., p.2830, 1995.

PROBST, M.; PIECHOTA, H.J.; DAHIYA, R.; TANAGHO, E.A. Homologous Bladder Augmentation in Dog with the Bladder Acellular Matriz Graft. **International Brazilian Journal of Urology**, v.85, p.362-371, 2000.

RABAH, D.M.; SPIESS, P.E.; BENGIN, L.R.; CORCOS, J. Tissue reaction of the rebbit urinary bladder to tension-free vaginal tape and porcine small intestinal submucosa. **International Brazilian Journal of Urology**, v.90, p.601-606, 2002.

RABELO, R.E.; TAVARES, G.A.; PAULO, N.M.; SILVA, L.A.F.; DAMASCENO, A.D.; ANDRADE, M.A.; MARTINS, F.G.; ROMANI, A.F.; SILVA, O.C.; TRINDADE, B.R. Características Físicas e Microbiológicas do Centro Tendíneo Diafragmático Bovino Conservado em Glicerina a 98% e no Glutaraldeído a 4%. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.4, p.229-238, 2004.

RAISER, A.G.; GRAÇA, D.L.; PIPPI, N.L.; ZINN, L.L.; SILVEIRA, D.S.; BORDIN, A.I.; BALOTTO, G.C.; RIOS, M.V.; SILVEIRA, A.F. Homoimplante Ortotópico de Tendão Calcâneo em Cães Conservação, Assepsia e Implantação. **Ciência Rural**, v.31, n.1, p.89-94, 2001.

RAPPETI, J.C.S.; PIPPI, N.L.; CONTESINI, E.A.; FILHO, S.T.L.P.; ALVES, S.D.L.; STIGGER, A.L.; WANDER, A.W.; SILVA, M.F.E.; DALMOLIN, F.; THOMAZ, J. Reconstituição Experimental da Parede torácica de Gatos com Implante Heterógeno de Cartilagem Auricular Conservada em Glicerina a 98%. **Ciência Rural**, v.33, n.6 p.1089-1094, 2003.

RODASKI, S.; GUÉRIOS, S.D.; PERRONI, M.A.; NARDI, A.B.; SILVA, C.A.M. Esfincteroplastia Anal Externa Experimental com Membrana de Peritônio Bovino Preservada em Glicerina a 98% em Cães. **Archieves of Veterinary Science**, v.5, p.55-60, 2000.

ROVERE, R.L.; ALCOBA, A. Alternativas terapêuticas em las neoplasias vesicales caninas. **Archivos de medicina veterinaria**, Valdivia, v.31, n.1, 2002.

SANTUCCI, R.A.; BARBER, T.D. Resorbable Extracelular Matrix Grafts in Urologic Reconstruction. **International Brazilian Journal of Urology**, v.31, n.3, p.192-203, 2005.

SHIROYANAGI Y., YAMATO M., YAMAZAKI Y., TOMA H., OKANO T. Urothelium Regeneration Using Viable Cultured Urothelial Cell Sheets Grafted on Demucosalized Gastric Flaps. **International Brazilian Journal of Urology**, v.93, p.1069-1075, 2004.

SHOKEIR, A.A. Bladder Regeneration: Between the Idea and Reality. **International Brazilian Journal of Urology**, v.89, p.186-193, 2002.

SIEVERT, K.D. et al. Collagen I:III ratio in canine heterologous bladder acellular matrix graft. **World Journal of Urology**, v.24, v.1, p.101-109, 2008.

SILVA, L.A.F., SILVA, O.C., EURIDES, D., SOUSA, V.R., SILVA, M.A.M., FRANCO, L.G., ALCÂNTARA, A.S., RABELO, R.E., DAMASCENO, A.D., JÚNIOR, H.G. Hernioplastia umbilical em bovino: Emprego de implante de cartilagem auricular homóloga e avaliação clínica dos resultados. **Acta Scientia Veterinariae**, v.33, n.1, p.57-62, 2005.

STAACK, A.; HAYWARD, S.W.; BASKIN, L.S.; CUNHA, G.R. Molecular, Cellular and Developmental Biology of Urothelium as a Basis of Bladder Regeneration. **International Society of Differentiation**, v.73, p.121-133, 2005.

TEIXEIRA, M.W.; REZENDE, C.M.F.; JÚNIOR, V.A.S.; TEIXEIRA, M.J.D.; SILVA, E.C.; BARBOSA D.G. Avaliação Clínica e Histopatológica de Alo-transplante de Bexiga em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.350-357, 2007.

TORBAY, P.K.; MOZDEN, P.J. Experimental use of seromuscular segment of ileum as urinary bladder substitution: Technic, histologic change and absorptive capacity. **American Cancer Society**, v.163, n.4, p.2552-2557, 1965.

VICENTI, F.A.M.; LAUS, J.L.; NETO, J.M.C.; TAGLIERI, I.C.; CAMPOS, C.F.; JORGE, A.T.; FERREIRA, A.L.; FANTINATTI, A.P. Use of an Allogeneous Tunica Vaginalis Conserved in 98% Glycerine for Keratoplasty in Dogs. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, V.9, N.3, P.182-187, 2002.

WEFER, J.; SCHLOTE, N.; SEKIDO, N.; SIEVERT, K.D.; WEFER, A.E.; NUNES, L.; BAKIRCIOGLU, M.E.; DAHIYA, R.; TANAGHO, E.A. Tunica Albugínea Acellular

Matrix Graft for Penile Reconstruction in the Rabbit: a Model for Treating Peyronie s Disease. **International Brazilian Journal of Urology**, v.90, p.326-331, 2002.

ZHANG, Y.; FRIMBERGER, D.; CHENG, E.Y.; LIN, H.; KROPP, B.P. Challenges in a Larger Bladder Replecement with Cell-Seeded and Unseeded Small Intestinal Submucosa Grafts in a Subtotal Cystectomy Model. **International Brazilian Journal of Urology**, v.98, p.1100-1105, 2006.

ZHANG, Y.; LIN, H; FRIMBERGER, D.; EPSTEIN, R.B.; KROPP, B.P. Growth of Bone Marrow Stromal Intestinal Submucasa: an Alternativa Cell Source for Tissue Engineered Bladder. **International Brazilian Journal of Urology**, v.96, p.1120-1125, 2005.