

LETICIA LEAL DE OLIVEIRA

**CISTOPLASTIA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) COM TÚNICA
ALBUGÍNEA BOVINA CONSERVADA**

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

Orientador: Prof. Edmundo Jorge Abílio

Co-orientadores: Prof. Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho

Prof^a. Louisiane de Carvalho Nunes

Campos dos Goytacazes

2013

LETICIA LEAL DE OLIVEIRA

**CISTOPLASTIA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) COM TÚNICA
ALBUGÍNEA BOVINA CONSERVADA**

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

Aprovada em 14 de junho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Louisiane de Carvalho Nunes
(Dr^a. Patologia Animal - UFES)

Prof. Diogo Benchimol de Souza
(Dr. Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas - UERJ)

Prof. Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho
(Dr. Anatomia Patológica - UENF)

Prof. Edmundo Jorge Abílio
(Dr. Cirurgia Geral - UENF)
(Orientador)

Dedico aos meus avós Paulo Miranda Leal e Gilda Stiebler Leal, à minha filha Paula Leal de Oliveira Peçanha, ao meu marido Anderson Lopes Peçanha e aos meus pais Leila Stiebler Leal Nisenson e Wilson Russo de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal pela grande oportunidade.

À Universidade Federal do Espírito Santo pela disponibilização de espaço e equipamentos necessários para a realização do experimento.

Ao meu orientador Professor Edmundo Jorge Abílio, antes de tudo, pela amizade e por me servir de inspiração, como professor.

Ao meu co-orientador Professor Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho, por estar sempre disposto a ajudar, pela amizade e por ser um exemplo.

À minha co-orientadora Louisiane de Carvalho Nunes, pela dedicação e orientação indispensável à confecção deste trabalho.

Ao Professor Cláudio Baptista e Ana Bárbara Freitas Rodrigues, pelas contribuições e ensinamentos.

Ao Professor Diogo Benchimol de Souza, pela amizade e por me auxiliar neste trabalho.

À Professora Ana Paula Madureira, pela orientação estatística.

À grande amiga Marília Cipriano, por sempre estar disposta a ajudar e por diminuir a distância entre Campos e Alegre.

À Jovana Campos, pela grande ajuda e compreensão.

Aos amigos Lio Moreira e Paulo Sérgio da Cruz Andrade Júnior, pelo apoio na implementação do experimento.

Ao meu orientado Julielton de Souza Barata, pela amizade e por ser indispensável, na realização de todas as fases deste trabalho.

Ao meu orientado Alexandre Vinícius Pereira da Silva, pela amizade e grande dedicação aos cuidados com os animais e procedimentos cirúrgicos, realizados neste trabalho.

Às minhas orientadas Larissa Flores, Larissa Pandeló e Larissa Pim e aos meus ex-alunos Aguinaldo Junior e Igor Salardani, pela grande ajuda, na realização das cirurgias e ao estudante de farmácia Anderson Barros Archanjo, pela ajuda nas reações imunoistoquímicas.

Aos colegas de pós-graduação Maria Aparecida da Silva, Rachel Bittencourt Ribeiro e Raphael Mansur Medina pelo auxílio prestado.

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

Em especial, à minha filha Paula Leal de Oliveira Peçanha, por ser, sempre, meu grande motivo para tudo.

Ao meu marido Anderson Lopes Peçanha, por estar sempre ao meu lado, com amor, paciência, sendo o meu maior alicerce.

Agradeço ao meu avô Paulo Miranda Leal e à minha avó Gilda Stiebler Leal, por serem, sempre, fundamentais, na minha vida, em todos os momentos e para sempre o serão.

À minha mãe Leila Stiebler Leal Nisenson, pelo amor dedicado.

Ao meu pai Wilson Russo de Oliveira e à minha avó Yole Russo de Oliveira.

Ao meu padrasto Sérgio Dias Nisenson, pelo incentivo e carinho.

À minha tia Maria Valéria de Oliveira Dudkiewicz, pela dedicação.

À minha sogra Ciléa Lopes Peçanha, pelo constante apoio e amizade.

À Ana Cristina Moreira Lima e Pietro Valério, pela amizade e aos meus afilhados Luíza e Arthur pelas alegrias.

À Carla de Sales Pessanha e Fábio Lopes Olivares, por me acolherem em Campos, com tanto carinho.

Ao Alexandre Lopes Peçanha, Said de Sales Pessanha, Lívia de Sales Peçanha e Júlia Alvarenga Peçanha, por sempre estarem presentes.

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

E principalmente a Deus, pela vida e saúde.

RESUMO

Os biomateriais em cirurgias reconstrutivas, tanto de origem natural como sintética, tem sido muito pesquisados. Além de servir de suporte para que células do tecido anfitrião se desenvolvam, podem funcionar como um eficiente alicerce de células tronco para a regeneração de tecidos e órgãos. Os objetivos do presente estudo foi avaliar a túnica albugínea bovina conservada em dois diferentes meios (glicerina 98% e glutaraldeído 0,625%), estudar como se dá o processo de incorporação da túnica albugínea como enxerto utilizado em cistoplastia em coelhos. As túnicas albugíneas foram obtidas de bovinos mestiços adultos, sadios. Após a preparação das túnicas, estas foram divididas em dois grupos: meio de conservação glicerina a 98% e glutaraldeído a 0,625%, ambos por período mínimo de 30 dias. Antes da sua aplicação cirúrgica, as túnicas foram avaliadas quanto à viabilidade e ausência de contaminação por meio de exame histopatológico. Este biomaterial foi testado para reparo da parede vesical em coelhos da linhagem Nova Zelândia. Foram utilizados 24 animais divididos em dois grupos casualizados, sendo um com cistoplastia com biomaterial conservado em glicerina a 98%, e outro em glutaraldeído a 0,625%. Esses foram subdivididos em mais dois grupos referentes aos períodos pós-operatórios de 5 e 10 semanas em que foram realizadas as eutanásias. Momento em que se realizou avaliação macroscópica e colheita de material para avaliação histológica e imunoistoquímica. A análise histopatológica da túnica albugínea revelou a preservação da sua arquitetura tecidual e ausência de proliferação de microrganismos após conservação em ambos os meios utilizados.

Não foram observadas reação de rejeição, necrose, fístula ou formação de neoplasia em nenhum coelho. Além disso, a integridade da parede vesical foi mantida em todos os animais deste experimento. As três camadas da bexiga (mucosa, muscular e serosa) estavam presentes em ambos os momentos de pós-operatório na maioria das amostras. Evidenciou-se neovascularização moderada à acentuada na região em que o xenoenxerto havia sido utilizado. O tecido de granulação assim como os ninhos de Brunn e cistos vesicais estavam presentes em todas as amostras dos dois grupos testados. Resquício do xenoenxerto foi observado nas amostras dos dois grupos. No grupo glutaraldeído não se observou colônia bacteriana em quanto no grupo glicerina uma pequena parcela das amostras apresentava esta contaminação. Por outro lado o infiltrado inflamatório foi encontrado em maior proporção no grupo glicerina, ainda neste grupo observou-se uma expressão significativa em macrófagos a 5% de probabilidade. Por outro lado, o grupo glutaraldeído 10 semanas obteve maior tendência à formação do músculo liso da bexiga. Também no grupo glutaraldeído houve diferença significativa dos fibroblastos de 5 e 10 semanas, onde o primeiro apresentou uma imunomarcacão mais forte. Os dois meios de conservação, utilizados neste experimento, se mostraram eficientes na conservação da túnica albugínea sendo que a glicerina mantém a integridade tecidual de forma mais eficiente enquanto o glutaraldeído acelera o processo reparativo quando utilizado em cistoplastia de coelhos. Como biomaterial, a túnica albugínea bovina se mostrou uma alternativa eficaz para a utilização em cirurgias reconstrutivas.

Palavras-chave: Cistoplastia; túnica albugínea; glicerina 98%; glutaraldeído 0,625%; VEGF; MMP-2; imunohistoquímica.

ABSTRACT

Biomaterials have long been studied in reconstructive surgery, both natural and synthetic origin. It can serve as a support for host tissue cells development and can be used as an efficient scaffold of stem cells for the regeneration of tissues and organs. The objectives of this study was to evaluate the bovine tunica albuginea conserved in glycerin 98% and glutaraldehyde 0.625% and analyze tunica albuginea conserved and the cystoplasty with this biomaterial in rabbits. Tunicas albugineas were obtained from crossbred adults healthy bovine's testicles. After preparation of tunicas albugineas, they were divided into two groups: the conservation medium 98% glycerin and glutaraldehyde 0.625%, both submerged for at least 30 days. Before its surgical application, tunica albuginea were evaluated by histopathology analysis for viability and absence of contamination. This biomaterial was tested for repair of the bladder wall in New Zealand rabbits. Were used 24 animals divided into two randomized groups, one with cystoplasty with biomaterial preserved in 98% glycerin, and the other in 0.625% glutaraldehyde. These were divided into two groups regarding the postoperative periods of 5 and 10 weeks in which they were carried out euthanasia. At this moment, macroscopic evaluation and collect of material for histological and immunohistochemical analyzes were realized. Histopathological analysis of tunica albuginea revealed the preservation of tissue architecture and no proliferation of microorganisms after conservation in both medium used. There were no rejection reaction, necrosis, fistula formation or neoplasia in any rabbit. Furthermore, the integrity of the bladder wall was maintained in all animals in this

experiment. In most samples the three layers of the bladder (mucosa, muscle and serosa) were present in both instances after surgery. It was evident neovascularization moderate to severe in the region in which the xenograft was used. Granulation tissue as well as nests Brunner bladder and cysts were present in all samples in the two groups tested. Xenografts trace was observed in samples from two groups. In glutaraldehyde group was not observed bacterial colony, unlike in the group as glycerin a small portion of the samples showed this contamination. The inflammatory infiltrate was found in greater proportion in the group glycerin, even in this group there was a significant expression in macrophages at 5% probability. On the other hand, the 10 weeks glutaraldehyde group received greater tendency to form muscles. Also in the group glutaraldehyde significant difference fibroblasts 5 and 10 weeks, where the first had a stronger immunostaining. The two methods of conservation of the tunics albugineas used in this experiment were effective in the tissue preservation. The glycerin maintains the integrity tissue more efficiently while the glutaraldehyde accelerates reparative process when used in cystoplasty of rabbits. The bovine tunica albuginea as a biomaterial proved to be an effective alternative for use in reconstructive surgery.

Key-words: Cystoplasty; tunica albugínea; glycerin 98%; 0.625% glutaraldehyde VEGF; MMP-2, immunohistochemical.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	8
SUMÁRIO	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Morfofisiologia da bexiga	14
2.2 A túnica albugínea	15
2.3 Indicações para a cirurgia reconstrutiva de bexiga	16
2.4 Reparação dos tecidos	18
2.4.1 Colágeno.....	18
2.4.2 Fator de crescimento vascular (VEGF)	19
2.4.3 Metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs).....	20
2.5 Biomateriais	21
2.6 Cistoplastia	22
2.7 Meios de preservação	25
2.7.1 Glicerina.....	25

2.7.2 Glutaraldeído	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Aquisição e preparação das túnicas albugíneas bovinas	29
3.2 Local do experimento e animais	31
3.3 Pré-operatório.....	32
3.4 Técnica cirúrgica	32
3.5 Pós-operatório	33
3.6 Eutanásia e avaliação macroscópica	34
3.7 Coleta de bexiga e processamento histológico do local do enxerto.....	35
3.8 Avaliação microscópica.....	36
3.9 Análise estatística dos resultados.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Avaliação da túnica albugínea conservada	38
4.2 Cistoplastia de coelhos com a túnica albugínea bovina	42
4.2.1 Achados clínicos	42
4.2.2 Achados macroscópicos	45
4.2.2.1 Aderências	45
4.2.2.2 Local do enxerto.....	46
4.2.2.3 Presença de urolitíases e incrustações.....	48
4.2.3 Achados microscópicos	52
5 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO	87

1 INTRODUÇÃO

Vários tipos de enxertos, sejam eles aloplásticos ou biodegradáveis, têm sido utilizados em cirurgias reconstrutivas. Entretanto, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos na busca de biomateriais que causem menos complicações no decorrer dos procedimentos e no pós-operatório. O objetivo é que se encontre um enxerto capaz de atuar na reconstituição de órgãos e tecidos e de servir como suporte para os processos de reparo e substituição, a partir de células-tronco e bioengenharia tecidual.

Os meios de preservação associados a membranas biológicas, utilizadas em cirurgias reconstrutivas, são uma importante ferramenta para atenuar dificuldades de manuseio e conservação destas, pois preservam a integridade tecidual, diminuem a ação antigênica e aumentam a resistência à tração e assepsia dos biomateriais. Contudo, ainda há a necessidade de uma avaliação mais completa dos diferentes meios de conservação e sua interação com estes biomateriais, principalmente os que ainda estão na fase inicial de estudo, como a túnica albugínea bovina.

Na medicina veterinária e humana, várias desordens vesicais podem ocorrer. Muitas delas necessitam da técnica cirúrgica de cistoplastia, em que há a substituição da parede da bexiga. Estas desordens incluem anormalidades congênitas (extrofia vesical e bexiga neurogênica), câncer, trauma, infecção, inflamação, defeitos na inervação, lesões iatrogênicas ou condições que levem a sérios danos vesicais. O objetivo da cistoplastia é sempre recuperar o bom funcionamento do órgão.

Para o procedimento de cistoplastia muitos enxertos foram e continuam sendo testados. Alguns deles apresentaram complicações que os inutilizam, entretanto, outros com resultados promissores, têm custo elevado devido à tecnologia necessária. Com isso, estudos seguem em busca de biomateriais que apresentem bons resultados e possam ser usados de forma rotineira.

A túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98%, como biomaterial, por ser um tecido com grande concentração de colágeno, confere boa resistência e excelente comportamento biológico, sem causar sinais de rejeição, além de ser facilmente adquirida e possuir baixo custo.

Como justificativa para a realização do presente experimento, ressalta-se a carência de informações a respeito da túnica albugínea bovina conservada e o seu comportamento biológico como xenoenxerto. Cabe lembrar a importância desses trabalhos, não só para a recuperação vesical em si, como também para vários órgãos e tecidos, já que os enxertos, além de servirem como ponte para a regeneração do tecido anfitrião, servem também como alicerce para o desenvolvimento das células tronco e da bioengenharia tecidual. Ainda, o estudo em questão pode servir como modelo experimental e seus resultados utilizados como base para outras espécies, inclusive humanos.

Este estudo tem por objetivo comparar a preservação tecidual da túnica albugínea bovina, nos dois diferentes meios de conservação: glicerina a 98% e glutaraldeído a 0,625%, além de avaliar e comparar a atuação desta mesma túnica albugínea, como enxerto em cistoplastia de coelhos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfofisiologia 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; CARNEIRO, 2004). A função renal e a continência da urina são extremamente dependentes do bom funcionamento da bexiga, que armazena urina com baixa pressão e a expulsa com uma contração precisamente orquestrada (TU et al., 2012).

O epitélio do cálice, a pélvis dos rins, os ureteres e a bexiga apresentam a mesma estrutura básica em humanos, 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; 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,

havendo, simultaneamente, o relaxamento do esfíncter interno que permite a entrada da urina na uretra (STAACK et al., 2005).

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 à rápida contração do órgão (STAACK 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 se enrolam e, ao se encherem, novamente, ocorre o processo inverso, aumentando assim a superfície das células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A porção muscular da bexiga é constituída por 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 cobertas por uma serosa, uma dobra do peritônio sobre a parede da bexiga, enquanto outros locais podem estar envolvidos por um tecido adiposo (GARTNER; HIATT, 2003).

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

2.2 A túnica albugínea

A túnica albugínea pode ser encontrada em diferentes locais do organismo animal. São eles: os ovários, o pênis e o testículo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Porém, apenas as oriundas do pênis (CRAATZ et al., 2005) e testículo (OLIVEIRA, 2008) são estudadas com resultados encorajadores, como biomateriais (CRAATZ et al., 2005; OLIVEIRA, 2008).

Este tecido é uma malha formada por tecido conjuntivo denso e por fibras elásticas e, por isso, tem boa capacidade de expansão. Ao mesmo tempo em que é maleável, apresenta boa rigidez (CRAATZ et al., 2005). O colágeno e espaçadas fibras elásticas estão entrelaçados. Este tecido apresenta a combinação da

resistência do colágeno com alongamento de até 150% e a sua capacidade de voltar ao tamanho normal da fibra elástica. A elastina e o colágeno, provavelmente, interagem, por uma maneira complexa de ligações cruzadas, as quais contribuem para sua configuração final (BROCK et al., 1997).

A túnica albugínea testicular envolve o testículo com uma espessa cápsula que possui revestimento albugíneo em duas camadas. A superficial é pobremente vascularizada e possui vasos bastante reduzidos. A camada mais profunda da túnica albugínea se localiza muito perto dos túbulos seminíferos e apresenta irrigação que conflui para essa estrutura (POLGUJ et al., 2010).

A túnica albugínea testicular é uma espessa cápsula de tecido conjuntivo denso, que envolve o testículo, rico em fibras colágenas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; GARTNER; HIATT, 2003). Esta é formada por duas camadas, a mais externa é composta 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).

Segundo Wefer et al. (2002), o uso de túnica albugínea homóloga, como enxerto de matriz acelular em coelhos, na área urogenital, apresentou bons resultados, pois mostrou ser um biomaterial de colágeno capaz de prover um suporte para a regeneração do pênis funcional, de fácil processamento e resistência, durante a cirurgia, agindo como um suporte para a regeneração natural e com desempenho satisfatório na reparação de defeitos da túnica albugínea.

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

2.3 Indicações para a cirurgia reconstrutiva de bexiga

O funcionamento ineficiente ou as desordens urinárias ocorrem comumente em humanos e animais. Estas podem ser causadas por inflamação e lesões nervosas que podem influenciar diretamente na fisiologia urinária, na qualidade de vida e em algumas situações podem culminar em insuficiência renal (BRANT et al., 2004). Outras causas de lesões comuns são: infecção e incontinência urinária

(STAACK et al. 2005), rupturas por trauma abdominal contuso ou penetrante (GALLATTI; IWASAKI; HIATT, 2004), rupturas de bexiga causada por urolitíases (BARDELA et al., 2007), necroses (LÉVEILLÉ et al., 1992) e tumores, na maioria malignos, para cães (ROVERE; ALCOBA, 2002; BENIGNI et al., 2006). Todas prejudicam a principal função da bexiga, que é sua capacidade de armazenamento da urina.

A reconstrução vesical é a melhor alternativa em pacientes com disfunção grave de bexiga em que todos os métodos de tratamentos conservadores falharam. A indicação cirúrgica destes casos ocorre para evitar maior deterioração do trato urinário superior ou para conseguir atingir a continência urinária (CASTELLAN et al., 2012).

Desta maneira, as desordens da bexiga urinária que necessitam de substituição da parede da bexiga incluem anormalidades congênitas (extrofia vesical), câncer, trauma, infecção, inflamação, defeitos na inervação, lesões iatrogênicas ou condições que levem a sérios danos vesicais (WONGSETTHACHAI et al., 2011). Exemplos de doenças que acometem humanos e podem necessitar de cistoplastia são: a tuberculose geniturinária, cistite intersticial, fístula vesicovaginal, neoplasias, entre outras (ANTONOPOULOS et al., 2009).

A tuberculose geniturinária em humanos pode causar o encolhimento da bexiga, fazendo com que o órgão perca a sua capacidade morfofisiológica, necessitando de uma substituição ou ampliação vesical (PATWARDHAN et al., 2008; ANTONOPOULOS et al., 2009).

A cistite intersticial é uma condição que resulta em desconforto recorrente ou dor na bexiga e regiões ao redor da pélvis. Uma vez que a cistite intersticial varia muito em sintomas e severidade, a maioria dos pesquisadores acredita que ela não se constitua em apenas uma, mas em várias doenças. Na cistite intersticial, a parede da bexiga pode ser irritada e ficar retesada ou cicatrizada, diminuindo a capacidade do órgão. Esta afecção é muito mais comum em mulheres do que em homens. A causa ainda não está clara e, além disso, pesquisas apontam para uma relação com alteração, também em outros órgãos (ANTONOPOULOS et al., 2009).

Fístula vesicovaginal pode ser causada por histerectomias, tuberculose geniturinária (infecção crônica), morte fetal intrauterina, hemorragia pós-parto e também está associada à redução da capacidade da bexiga (PATWARDHAN et al., 2008).

Nas neoplasias de cólon e reto, que apresentam tanta ocorrência em humanos, há grande incidência de metástase em bexiga, devido a sua íntima relação anatômica. Sendo assim, a única chance de cura é a retirada de todos os nódulos deixando as margens dos órgãos livres da neoplasia. Muitas vezes, se faz necessária uma cistectomia radical ou a retirada do órgão inteiro, havendo a necessidade da reconstrução cirúrgica desta bexiga (DELACROIX; WINTERS, 2010).

2.4 Reparação dos tecidos

Alguns tipos de tecido, como as superfícies epiteliais, regeneram de forma bastante satisfatória depois de uma lesão tecidual. Entretanto, em muitos tipos de tecidos dos mamíferos, esta regeneração não acontece e, ao invés dela, processos de cicatrização preenchem a área lesionada com uma matriz extracelular simples mais elástica, que é a cicatriz de tecido conjuntivo (RINGLER, 2000).

Deste modo, restaura-se a continuidade anatômica do tecido, substituindo células originais, que foram lesadas, por tecido conjuntivo não especializado. Antes da reparação, há sempre um processo inflamatório que é a reação dos tecidos a todas as formas de lesão, envolvendo respostas vasculares, neuro-hormonais, humorais e celulares, no local da lesão. O processo inflamatório destrói, dilui e engloba o agente agressor, abrindo caminho para reparação (MAIA et al., 2006).

O processo de reparação é caracterizado pela síntese e deposição do colágeno, o qual é responsável pela força e integridade de todos os tecidos. Este processo dependerá do tipo de fibra colágena e da quantidade de ligações cruzadas (MAIA et al., 2006; MACHADO et al., 2007).

2.4.1 Colágeno

O colágeno é a molécula mais abundante da matriz extracelular e compõe aproximadamente 33% do total da massa protéica corporal. Depois de secretado para o espaço extracelular, as moléculas de colágeno se agrupam em polímeros denominados fibrilas, que agrupadas, são chamadas de fibras de colágeno, podendo ser visualizadas ao microscópio óptico. Diferentes tipos de colágeno têm sido

identificados, causando variações na composição das cadeias de tripla hélice e em distribuição tecidual (SICKLE et al., 1993; SLAUSON, 2005).

A molécula do colágeno apresenta uma estrutura longa e rígida com fita-tripla helicoidal, formada por três cadeias polipeptídicas chamadas α enroladas umas às outras. Aproximadamente 25 tipos de cadeia α já foram identificados com 15 tipos de moléculas encontradas. O colágeno mais comum nos tecidos é o do tipo I, sendo que, além deste, existem os tipos II, III, V e XI. Possuem estrutura semelhante a uma corda, já que depois de sintetizados e secretados para o espaço extracelular, suas moléculas se agrupam em fibrilas colágenas as quais se agrupam em fibras colágenas maiores e mais espessas (STEEN et al., 2002).

Os colágenos IX e XII são chamados de colágenos associados às fibrilas porque se localizam na superfície das fibrilas, ligando-as entre si a outros componentes da matriz extracelular. Há ainda os colágenos formadores de rede, dos tipos IV e VII. O do tipo IV agrupa-se em uma camada como um feltro, formando a parte principal da lâmina basal e o do tipo VII forma um dímero que se agrupa em estruturas chamadas fibras ancoradoras, que fazem a ligação da lâmina basal ao conjuntivo subjacente (STEEN et al., 2002). O tipo I está amplamente distribuído na pele, tendões e ossos, enquanto que o tipo IV é o principal constituinte da membrana basal (SICKLER et al., 1993; SLAUSON, 2002).

O fibroblasto é uma célula presente, no tecido conjuntivo, responsável pela deposição de colágeno no local em que há uma lesão. Na bexiga, observa-se uma deposição de colágeno, que é fundamental nos processos de reparação. Logo após este órgão sofrer uma lesão, a deposição desta molécula aumenta gradativamente e atinge seu nível máximo, após sete dias (MACHADO et al., 2007).

Inicialmente, na reparação vesical, há a predominância do colágeno tipo III, mas, gradualmente, ele vai sendo substituído por aquele do tipo I, conferindo uma maior força ao tecido (MACHADO et al., 2007).

2.4.2 Fator de crescimento vascular (VEGF)

Durante processos fisiológicos e patológicos no organismo, ocorre a formação de vasos sanguíneos oriundos de vasos preexistentes (DAMICO, 2007; DOMINGOS et al., 2012) ou formados pela migração de células endoteliais precursoras (DOMINGOS et al., 2012). Este fenômeno é chamado de angiogênese.

Para isto, é necessária a participação de várias moléculas, atuando de forma complexa, estimulando e inibindo a formação dos novos vasos (DAMICO, 2007). Existe uma variedade de fatores de crescimento que podem participar em várias de suas fases, porém o VEGF é um dos mais importantes deles em tecidos maduros submetidos à angiogênese fisiológica, no caso do endométrio proliferativo, e na angiogênese patológica, que ocorre durante a inflamação, cicatrização e reparo tecidual (DOMINGOS et al., 2012).

O VEGF estimula a angiogênese direta e indiretamente. A expressão endógena de VEGF, durante o reparo tecidual, provavelmente, possui um importante papel ao recrutar células progenitoras endoteliais, o que serve como um potente mitógeno destas células e inibe sua apoptose. Além disto, este fator de crescimento é capaz de aumentar a permeabilidade celular durante o processo de regeneração, facilitando a chegada de células inflamatórias (GALIANO et al., 2004; DAMICO, 2007).

Outra importante função do VEGF é sua capacidade de aumentar a expressão celular de metaloproteinases, o que degrada a matriz extracelular e facilita a penetração dos novos vasos no tecido, ao mesmo tempo em que diminui a expressão endotelial dos inibidores de metaloproteinases. O VEGF também possui efeito pró-inflamatório, neuroprotetor (STORKEBAUM; CARMELIET, 2004) e é um fator importante na estabilização e remodelação vasculares (DAMICO, 2007; SAKURAI et al., 2003).

2.4.3 Metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs)

A família das MMPs agrupa por volta de 25 enzimas proteolíticas, classificadas em quatro classes: as colagenases; gelatinases, estromolisinas (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; BOCHSLER; SLAUSON, 2002; CURRY; OSTEEEN, 2003) e “*membrane type enzymes*” (MT-MMPs) (CURRY; OSTEEEN, 2003). As MMPs são enzimas dependentes de Zn^{2+} e Ca^{2+} para a sua plena atividade, sendo especializadas em degradar os componentes da matriz extracelular (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; BOCHSLER; SLAUSON, 2002; CURRY; OSTEEEN, 2003).

As collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) clivam os colágenos fibrilares (tipo I, II, III, V e XI), bem como, os não fibrilares (tipos IX, XII e XIV). A clivagem das moléculas de colágeno de tripla hélice, pelas MMPs, muda sua estabilidade e solubilidade, resultando na desnaturação em moléculas de gelatina, que são susceptíveis a proteinases teciduais, incluindo as gelatinases e estromolisinas (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; BOCHSLER; SLAUSON, 2002; CURRY; OSTEEEN, 2003).

As gelatinases (MMP-2 e 9), contêm uma sequência semelhante à fibronectina, dentro do seu domínio catalítico, o que se traduz em uma potente habilidade de se ligar e clivar a gelatina. As estromolisinas (MMP-3, 7, 10 e 11), clivam a fibronectina, os proteoglicanos e as regiões não helicoidais do colágeno tipo IV. A principal função da MT-MMP é a ativação da MMP-2 (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; CURRY; OSTEEEN, 2003).

Além de sua ação proteolítica, as MMPs, especialmente as estromolisinas, exibem atividade em direção a outras MMPs, fatores de crescimento e citocinas, o que inclui essa classe como moduladoras do crescimento celular, inclusive em processos patológicos (CURRY; OSTEEEN, 2003).

Os macrófagos, bem como os neutrófilos, contêm collagenases (MMP-1), gelatinases (MMP-2), estromolisinas (MMP-3, 10 e 11), matrilisinas (MMP-7) e outros tipos de elastases (metaloelastase, a MMP-12). Todas as MMPs são secretadas por leucócitos, algumas células epiteliais, endoteliócitos e fibroblastos, como pró-enzimas (zimogênios) e requerem ativação extracelular por meio de outras proteinases (CURRY; OSTEEEN, 2003).

Tais enzimas são importantes na atividade inflamatória, pela degradação e subsequente remodelação tecidual durante os processos de inflamação e reparo (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; CURRY; OSTEEEN, 2003).

A atividade proteolítica das MMPs é inibida por TIMPs, as quais são secretadas pelos próprios leucócitos e por outras células que compõem o tecido conjuntivo (BOCHSLER; SLAUSON, 2002; CURRY; OSTEEEN, 2003).

2.5 Biomateriais

A cirurgia reconstrutiva lida com o reparo de defeitos e malformações de natureza congênita ou adquirida. Os enxertos vêm ganhando um papel fundamental

nesses reparos, pois possuem um baixo risco de causar rejeição por parte dos tecidos. No caso dos xenoenxertos (heteroenxertos), o receptor e o doador são animais de espécies diferentes (PIGOSSI et al., 1971).

Os enxertos são constituídos de células que não apresentam viabilidade no tecido anfitrião e que servem como ponte para a regeneração dos tecidos. Este material não deve ser antigênico ou carcinogênico, e sim facilmente incorporado pelo hospedeiro, funcionar por toda a sua vida, estimular as propriedades mecânicas do segmento original e ser facilmente armazenado e implantável (RAISER et al., 2001).

2.6 Cistoplastia

A cistoplastia com biomateriais é uma cirurgia reconstrutiva vital para a preservação do trato urinário, pois culmina na ampliação vesical, após a cistectomia, o que evita complicações. O objetivo da bexiga nativa é armazenar a urina, manter complacência vesical, ser um reservatório de baixa pressão interna e contrair de forma a alcançar o completo esvaziamento. Com grandes ressecções vesicais, há uma diminuição de complacência e, com isso, a bexiga irá armazenar urina com alta pressão interna. As altas pressões internas, na bexiga, podem desenvolver efeitos nocivos e crônicos na função renal, bem como hiperatividade no músculo detrusor (DELACROIX; WINTERS, 2010).

Segmentos do trato gastrointestinal, como o estômago, jejuno, íleo e cólon de diversas espécies têm sido testados principalmente no reparo vesical e apresentam vantagens e desvantagens no seu uso (GRECA et al., 2004). Estudos recentes buscam encontrar um enxerto ideal que seja implantado com uma técnica cirúrgica simples (RAISER et al., 2001). O objetivo da substituição é manter a parede da bexiga íntegra, aumentar a capacidade vesical e conservar baixa a pressão interna da bexiga baixa. O biomaterial de substituição deve ser compatível e servir como uma ponte para a regeneração das três camadas da bexiga. Uma variedade de tecidos auto-, homo-, heterólogos e artificiais (aloplásticos) têm sido testados experimentalmente e clinicamente para a substituição da parede vesical, tanto em humanos, como em animais (WONGSETTHACHAI et al., 2011).

A busca por um biomaterial capaz de servir como suporte excelente, que facilite o desenvolvimento de cultura de células nativas da bexiga, induzindo a

regeneração de suas camadas, é constante. O biomaterial utilizado na engenharia tecidual deve ser biocompatível, uma vez que a formação do novo tecido depende totalmente da sua interação com as células transplantadas (SHARIFIAGHDAS et al., 2009).

A matriz acelular de colágeno e a membrana amniótica humana foram avaliadas em cistoplastias e ambas obtiveram excelentes resultados. Estas foram utilizadas em outras cirurgias reconstrutivas e não causaram reações imunológicas. Entretanto a matriz acelular de colágeno possui custo proibitivo para ser utilizada rotineiramente e a membrana amniótica humana ainda necessita de mais estudos (SHARIFIAGHDAS et al., 2009).

Estes materiais devem ser biocompatíveis, promover a interação celular, o desenvolvimento dos tecidos e possuir propriedades mecânicas apropriadas, proporcionando a regulação do comportamento celular (adesão, proliferação, migração e diferenciação). Além disso, deve promover o desenvolvimento funcional do novo tecido e fornecer suporte mecânico até que o novo tecido tenha integridade suficiente para suportar a si próprio (BORGES et al., 2007).

Diferentes biomateriais têm sido usados, mas os que parecem mais promissores são as matrizes de tecido acelular, ricas em colágeno, as quais são semeadas por células uroteliais e musculares, previamente colhidas e submetidas à reprodução e à multiplicação, por meio de técnicas de engenharia genética. Este novo tecido possui complacência e organização celular normal (confirmada por estudos imunocitoquímicos) semelhante ao tecido vesical. Estudos demonstraram que este novo tecido vesical é anatomicamente e funcionalmente normal, porém, estes trabalhos são ainda experimentais e possuem um custo muito elevado, devido à alta tecnologia usada (BORGES et al., 2007).

A enterocistoplastia é, atualmente, a técnica mais utilizada, na rotina clínica. No entanto, uma série de complicações como infecções, vazamento urinário, acidose metabólica e refluxo urinário costumam ocorrer (OMAYA; NASSAR, 2010), além de enrugamento do enxerto, o que causa diminuição do seu tamanho (KOCKUM et al., 1999). Acredita-se ainda que exista a formação de fatores carcinogênicos derivados da interação entre a urina e bactérias fecais, o que favorece a ocorrência de neoplasias (CROSS et al., 2003).

Supõe-se que a produção de muco oriunda do segmento ileal, nas cistoplastias, possa proteger o epitélio do intestino dos componentes urinários

carcinogênicos (UCHÔA et al., 2011), entretanto há dificuldades em confirmar essa teoria, devido ao longo período de latência dessa doença (CROSS et al., 2003). Por outro lado, o muco acumulado na luz vesical pode ser um fator que estimule a formação de urólitos (UCHÔA et al., 2011). Por estes motivos, a busca por alternativas se faz necessária (OMAYA; NASSAR, 2010).

No estudo em que se realizou cistoplastia em coelhos com uma biomatriz, à base de colágeno e oriunda de submucosa intestinal suína (SIS, COOK[®]), avaliações foram realizadas, em vários momentos, por um período de nove meses. Como resultado, obteve-se a regeneração do urotélio e do músculo liso. Porém, como complicação, notaram-se consideráveis incrustações no enxerto (NUININGA et al., 2003). Esta submucosa intestinal, proveniente de suínos, demonstrou ser um bioenxerto capaz de induzir a angiogênese, a neoformação muscular e a deposição de colágeno necessária para aumento e reparo vesical em cães (GRECA et al., 2004).

O estômago tem sido, também, testado e utilizado, em cirurgias vesicais, com o objetivo de ampliação da bexiga. As principais vantagens deste biomaterial, em relação a outros segmentos, são: baixa permeabilidade a solutos urinários, acidificação da urina, excreção de cloretos numa proporção maior que sua absorção, menor produção de muco, baixo índice de aderências e incidências de bacteriúria. O uso do estômago, todavia, pode acarretar o aparecimento de anemia ferropriva, hipoproteinemia, síndrome do estômago curto, esteatorréia e vômitos incoercíveis (GRECA et al., 2004). A neoplasia foi outra grave complicação observada no estudo clínico de Castellan et al. (2012), que acompanharam 29 pacientes submetidos a gastrocistoplastia. Foi observado que entre 11 e 14 anos, após a cirurgia, três desses pacientes morreram, por ocorrência de adenocarcinoma.

Em suma, muitos biomateriais têm sido testados, mas ainda apresentam altos índices de complicações que podem culminar em falha do implante e necessidade de procedimento cirúrgico secundário. Além disso, a restauração das características do esvaziamento vesical normal ainda não foi atingida. Portanto, novas membranas devem continuar sendo testadas, para que se consiga chegar a alguma que cumpra este papel (TU et al., 2012).

A túnica albugínea bovina foi pesquisada como xenoenxerto em cistoplastias experimentais em cães, após ter sido conservada em glicerina a 98%. Observou-se uma recuperação precoce, nenhum episódio de rejeição e bons resultados de

reparação vesical na totalidade dos animais estudados. No entanto, este biomaterial requer ainda mais estudos para que possa ser utilizado na prática clínica (OLIVEIRA, 2008).

2.7 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 para o crescente uso de materiais biológicos, nos transplantes homólogos e heterólogos, ou ainda, 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).

Variados tipos de membranas biológicas, preservadas, têm sido utilizados na reparação de diversos tecidos e órgãos e 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; BRUN et al., 2004), músculo diafragma homólogo, conservado em solução supersaturada de açúcar, para reparo de diafragma canino (MAZZANTI et al., 2000), cartilagem auricular canina em glicerina a 98%, para reconstituição de parede torácica em gatos (RAPPETI et al., 2003) e pericárdio bovino, em solução supersaturada de açúcar, utilizado em hernioplastia diafragmática (MAZZANTI et al., 2003), entre outros.

2.7.1 Glicerina

A glicerina é um meio de conservação amplamente utilizado e estudado por preservar membranas biológicas mantidas à temperatura ambiente, sendo facilmente manuseadas, com baixo custo e bons resultados (VICENTI et al., 2002; VERSEN-HOEYNCK et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009). Além dessas vantagens, segundo Gioso et al. (2002), o armazenamento em temperatura ambiente, propicia

uma melhor conservação, pois não há formação de cristais intra e extracelulares, além de evitar alterações eletrolíticas deletérias às células e à matriz extracelular.

Quando este meio de preservação é utilizado dessa forma, devem ficar por um período mínimo de 30 dias, antes do procedimento cirúrgico (RAPPEI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2003; RABELO et al., 2004, MAZZANTI et al., 2004; FILHO et al., 2008). O tempo mínimo de conservação do biomaterial na glicerina garante a atenuação imunogênica, assim como o seu efeito antimicrobiano (BRUN et al., 2004; MAZZANTI et al., 2004).

A ação antigênica deste conservante evita o uso de drogas imunossupressoras, durante os períodos trans e pós-operatórios (RAISER et al., 2001; RODASKI et al., 2000; MOTA et al., 2003; AMENDOLA et al., 2008; BOLSON et al., 2008; VULCANI et al., 2008).

A glicerina, devido a sua acentuada hidrofília (forma ligações covalentes com as moléculas de hidrogênio presentes na água), possibilita a desidratação do tecido nela conservado, o que proporciona uma ação antimicrobiana. A molécula de glicerina, apesar de polar, penetra na célula, por meio dos poros das membranas plasmáticas, devido ao seu pequeno diâmetro entra em contato com a água intracelular, exercendo uma ação desidratante. Acredita-se que o efeito conservante da glicerina, também, esteja relacionado pela desnaturação de enzimas autolíticas celulares, sem haver alteração das características fundamentais da textura do tecido (PIGOSSI et al., 1971).

A microscopia eletrônica do músculo liso intestinal, conservado em glicerina a 98%, revelou algumas rupturas na membrana plasmática das células musculares. Os componentes citoplasmáticos ficaram, levemente, afastados entre si, o que não possibilitou observar organelas íntegras, porém, foram identificados corpos densos. Os núcleos apresentavam-se dilatados, com desagregação da cromatina e figuras mielínicas (MOTA et al., 2002).

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

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* e, após esse período, o conservante apresentou-se eficiente contra formas bacterianas vegetativas (RABELO et al., 2004).

O centro frênico canino, em glicerina a 98%, utilizado na reparação de defeito da parede abdominal de ratos, foi 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; OLIVEIRA et al., 2008). Da mesma maneira, ocorreu a substituição progressiva do cordão umbilical bovino, conservado em glicerina a 98%, por tecido de granulação, o que regenerou lesão traqueal em cães (MAZZANTI et al., 2000).

2.7.2 Glutaraldeído

O glutaraldeído é uma excelente opção no tratamento de membranas biológica, por ser facilmente encontrado, ser econômico e agir rapidamente no tecido a ser preservado, sendo muito utilizado, em biopróteses comerciais (OLIVEIRA et al., 2009). As válvulas cardíacas fabricadas, oriundas de válvulas aórticas porcinas, normalmente, são tratadas, em baixas concentrações de solução de glutaraldeído (KHOR, 1997). Este conservante é capaz de melhorar a estabilidade bioquímica de biomateriais, o que desencadeia mudanças em suas características mecânicas, tornando-os mais resistentes e permitindo uma melhor incorporação biológica no tecido anfitrião (RABELO et al., 2004). Além disso, possui uma excelente ação bactericida (OLIVEIRA et al., 2009).

Entretanto, a calcificação do tecido é a principal causa de insucesso dos materiais mantidos nesse meio (KHOR, 1997; BAUCIA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009), indicando que o glutaraldeído possui núcleos de ancoragem de cálcio, o que inicia esse processo (KHOR, 1997).

O glutaraldeído mostrou eficiente ação bactericida, quando utilizado na concentração de 4%, para conservação de cartilagem auricular homóloga de bovino, em hérnia umbilical recidivante (SILVA et al., 2005).

O enxerto vascular homólogo de equinos, fixado em glutaraldeído, apresentou boa manipulação cirúrgica, com a possibilidade de utilização do

implante, com as suturas anastomóticas. O conservante, também, reduziu a antigenicidade do enxerto, permitindo boa preservação histológica da estrutura vascular (DORNBUSCH et al., 2007).

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

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aquisição e preparação das túnicas albugíneas bovinas

As túnicas albugíneas foram obtidas de bovinos mestiços, sadios e adultos, abatidos em frigorífico, no município de Atílio Vivácqua, ES. Foram coletados testículos de seis animais, imediatamente após o abate, totalizando 12 túnicas albugíneas, transportadas, sob refrigeração, até o Setor de Cirurgia do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). As túnicas foram obtidas por meio de uma abertura do testículo, em seu eixo longitudinal, seguida da retirada do parênquima testicular, com a borda não cortante do bisturi e, imediatamente, lavadas com solução salina fisiológica. Logo em seguida, acondicionadas em recipientes previamente esterilizados, em que metade destes continha solução de glicerina a 98% e a outra metade dos recipientes continha glutaraldeído a 0,625%.

As túnicas albugíneas permaneceram submersas nas soluções preservadoras, em frascos fechados e à temperatura ambiente, durante um período mínimo de 30 dias, antes de sua avaliação e uso como xenoenxerto (Figura 1).

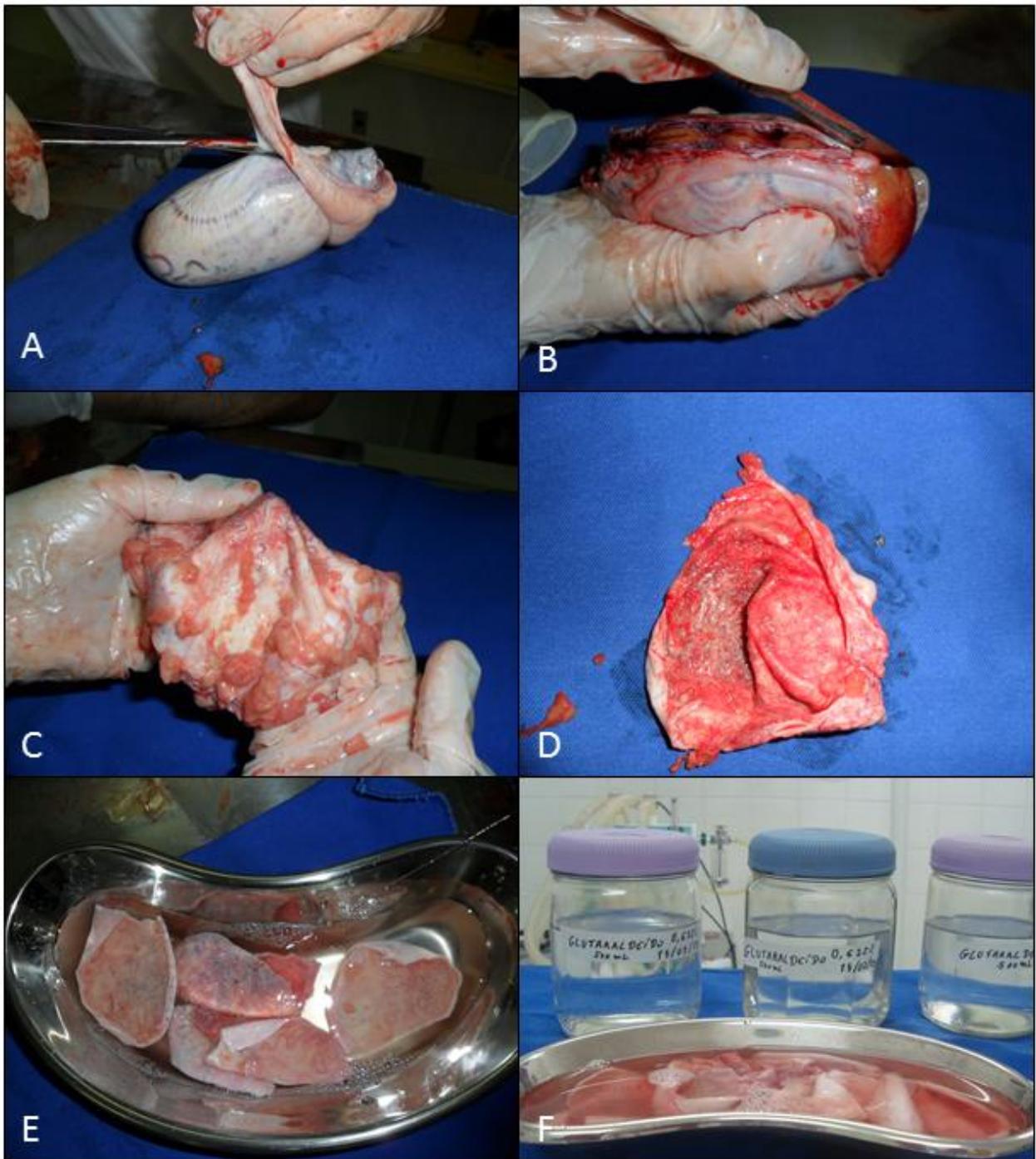


Figura 1. Preparo e armazenamento das túnicas albugíneas bovina. A) Retirada do epidídimo com tesoura, B) abertura da túnica albugínea com o bisturi, C) retirada do parênquima testicular, D) túnica após o toailete completo, E) lavagem em solução fisiológica (NaCl 0,9%), F) frascos previamente esterilizado contendo meios de preservação.

Após este período, uma amostra tecidual, de cada túnica, foi fixada em formol a 10%, onde permaneceu por um período de 48 horas e, posteriormente, foram analisadas, por meio de exame histopatológico, no Laboratório de Patologia Animal da UFES e da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, (UENF) para verificação da viabilidade tecidual e ausência de contaminações.

As amostras fixadas foram clivadas e submetidas a processamento tecidual, para inclusão em parafina. Seções histológicas de cinco micrômetros foram obtidas, em micrótomo manual, coradas pelos métodos de hematoxilina/eosina, tricrômico de Masson e picrosirius red – polarização, conforme descrito no Anexo I. O material foi avaliado sob microscopia óptica.

3.2 Local do experimento e animais

O trabalho foi realizado nas dependências do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), em Alegre ES. Foram submetidos, ao experimento, 24 coelhos, da raça Nova Zelândia, pesando em média 2,5 kg, não castrados, adultos jovens, de ambos os sexos, adquiridos de criador comercial, na cidade de Alegre-ES, após aprovação do comitê de ética da UFES (protocolo número 049/2011), segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Ao serem admitidos, no setor de cirurgia, os coelhos foram pesados e examinados, clinicamente, para serem avaliadas as suas condições de saúde. Estes animais foram alojados em gaiolas individuais, sendo alimentados com ração padrão comercial e água, fornecidas *ad libitum*. Nestas condições, permaneceram por duas semanas, período considerado como de adaptação ao ambiente, manejo e tratamento de alterações observadas ao exame, antes de iniciar-se a fase experimental propriamente dita.

3.3 Pré-operatório

Antes do procedimento cirúrgico, foi instituído jejum alimentar de 4 horas e hídrico de 2 horas, com o objetivo de contribuir com o protocolo anestesiológico. Realizou-se aferição da temperatura corporal dos coelhos e tricotomia ampla na região abdominal e orelhas para acesso venoso.

3.4 Técnica cirúrgica

Para medicação pré-anestésica, foi utilizada acepromazina 1%, na dose de 1 mg kg^{-1} por via intramuscular, seguida da cateterização da veia auricular lateral, para instituição da fluidoterapia, com solução Ringer com Lactato (10 ml/kg por hora), até a recuperação anestésica. Em seguida, a indução anestésica foi conduzida, utilizando-se quetamina com diazepam, na dose de $30 \text{ mg kg}^{-1} + 5 \text{ mg kg}^{-1}$, via intramuscular e mantida, mediante emprego do anestésico intravenoso, quetamina, para manutenção do plano anestésico.

Com o animal posicionado em decúbito dorsal, foi executada a antisepsia do campo operatório, utilizando-se álcool 70%, seguida de polivinilpirrolidona a 1% e novamente álcool 70%, seguida de proteção com panos cirúrgicos, fixados à derme com pinças de Backaus, para realização da laparotomia longitudinal mediana retroumbilical, visando acesso à bexiga do coelho.

Com a bexiga vazia, após punção vesical com seringa de 10 ml e, protegida por compressa estéril, aplicou-se, na face ventral, pontos seromusculares com categute-cromado nº 3-0, que serviram de reparo, possibilitando a cistectomia parcial de 2 cm^2 em todos os animais.

As túnicas albugíneas bovinas, conservadas nos meios especificados, que foram utilizadas como xenoenxerto, tinham aproximadamente 2 cm^2 , com formato arredondado e, antes da implantação nos coelhos, foram imersas em solução fisiológica, por dez minutos, para a sua reidratação. A síntese do xenoenxerto com a bexiga ocorreu, em plano único contínuo, transpassando todas as paredes do órgão, para atingir um bom afrontamento, entre as mucosas, as camadas internas e as serosas, com fio absorvível sintético multifilamentar (Poliglactina 910) nº 4-0 (Figura 2). Em seguida, realizou-se a lavagem da região com soro fisiológico estéril, retirada do ponto de reparo e reintrodução da bexiga, na cavidade abdominal, sem omentalização.

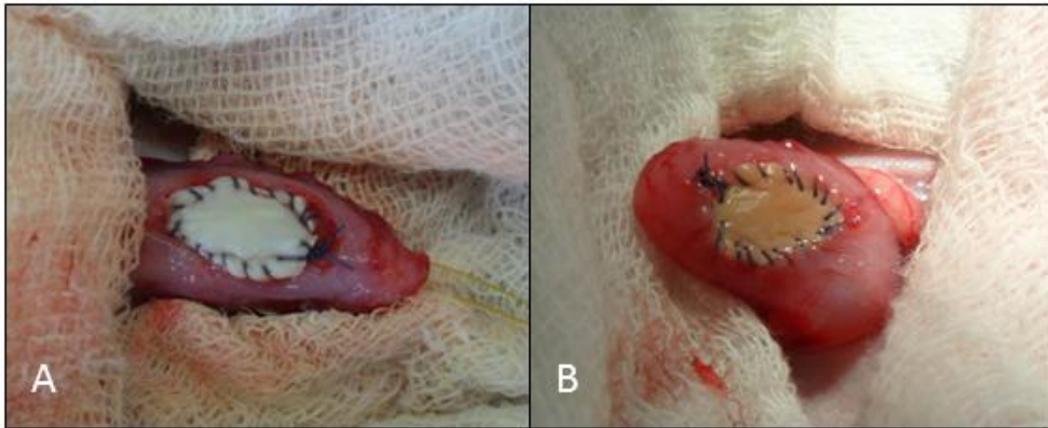


Figura 2. Fragmento de túnica albugínea bovina conservada. A) glicerina a 98% e B) glutaraldeído 0,625%, implantados em bexigas de coelho em plano único contínuo, com fio absorvível sintético (Poliglactina 910) nº 4-0.

O fechamento da parede abdominal ocorreu com pontos em X e seguida de sutura de subcutâneo, empregando-se, em ambos os planos, o fio poliglactina 910 nº 4-0 e a derme foi reconstituída com fio de náilon nº 4-0, em sutura de pontos separados em U.

Após o despertar anestésico, os animais foram encaminhados às gaiolas de pós-operatório.

3.5 Pós-operatório

A alimentação seguiu a rotina instituída, na fase de adaptação e foi oferecida, logo depois da total recuperação anestésica. Após a cirurgia, foi administrado meloxicam na dose de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, via intramuscular, a cada 24 horas, por quatro dias e 5 mg kg^{-1} de enrofloxacin, via intramuscular, a cada 12 horas, durante sete dias, até a retirada dos pontos, no décimo dia. Aplicou-se *spray* de clorexidine, na ferida cirúrgica, duas vezes ao dia, durante dez dias, até a retirada dos pontos.

Nos períodos pós-operatórios, os animais foram diariamente avaliados clinicamente quanto ao aspecto da ferida cirúrgica, ao estado geral e ao aspecto da urina.

Os dois grupos de doze animais cada (grupos A e B) foram subdivididos, obedecendo aos períodos pós-operatórios, em que se praticou a eutanásia, para a avaliação macroscópica, histológica e imunohistoquímica do local, no qual o enxerto

havia sido previamente implantado. Cada um deles foi dividido em dois grupos iguais (A1, B1 e A2 e B2). Nos grupos A1 e B1, foram realizadas as eutanásias em 5 semanas e nos grupos A2 e B2, estas foram realizadas, em 10 semanas de pós-operatório (Quadro 1).

Quadro 1. Distribuição dos grupos experimentais, de acordo com cada tratamento do xenoenxerto, utilizado em cistoplastia de coelho.

Grupo/Subgrupo	Procedimento Cirúrgico	Eutanásia
A (n=12)	A1 (n=6) Cistoplastia com túnica albugínea conservada em Glicerina 98%	Após 35 dias (5 semanas)
	A2 (n=6) Cistoplastia com túnica albugínea conservada em Glicerina 98%	Após 70 dias (10 Semanas)
B (n=12)	B1 (n=6) Cistoplastia com túnica albugínea conservada em Glutaraldeído 0,625%	Após 35 dias (5 semanas)
	B2 (n=6) Cistoplastia com túnica albugínea conservada em Glutaraldeído 0,625%	Após 70 dias (10 Semanas)

3.6 Eutanásia e avaliação macroscópica

Na eutanásia, conforme os tempos de pós-operatório indicados para cada animal do experimento, utilizou-se acepromazina 1%, na dose de 1 mg/kg, por via intramuscular, tiopental na dose de 75 mg/kg, via intravenosa e, em seguida, foi utilizado cloreto de potássio, seguindo as normas da resolução nº 1000 do CFMV, de 11 de maio de 2012, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais.

Logo após a eutanásia, houve a abertura cuidadosa da cavidade abdominal dos animais para avaliações macroscópicas conforme os critérios adotados no Quadro 2.

Quadro 2. Critérios de avaliação macroscópica, utilizados nos coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) submetidos à cistoplastia, com túnica albugínea bovina conservada (modificado de ANDRADE et al., 2011).

Quadro 2 – Critérios de avaliação macroscópica	
Grupo: ___ Coelho: ___ Eutanásia: ___ Sexo: ___	
1. Aderência de vísceras à parede abdominal:	() leve/ + () moderada/++ () intensa/+++
2. Aderência de vísceras no local do enxerto:	() leve/ + () moderada/++ () intensa/+++
3. Aderência da bexiga à musculatura dorsal abdominal:	() leve/ + () moderada/++ () intensa/+++
6. Integridade da parede vesical:	() Presente () Ausente
7. Rejeição do enxerto:	() Presente () Ausente
8. Presença de urólitos:	() Presente () Ausente
9. Presença de necrose:	() Presente () Ausente
10. Neoplasia:	() Presente () Ausente

3.7 Coleta de bexiga e processamento histológico do local do enxerto

Após a avaliação macroscópica, as bexigas foram seccionadas na região da base, com auxílio de tesoura de Metzenbaum, e lavadas com formol a 10%, para retirada completa da urina, seguida da imersão, na mesma solução, por 48 horas.

Após a fixação, as peças foram clivadas, com atenção para o enxerto e seus limites, e submetidas a processamento tecidual por inclusão em parafina.

Seções histológicas de cinco micrômetros foram obtidas, em micrótomo rotativo manual, coradas pela hematoxilina/eosina e colorações especiais tricrômico de Masson e picrossirius red (Anexo A), para visualização em microscópio óptico de luz branca e luz polarizada, respectivamente.

Cortes do mesmo material foram utilizados para a técnica de imunistoquímica. Foram utilizados os anticorpos anti-VEGF e anti-MMP-2. As lâminas foram, inicialmente, mergulhadas em álcool a 70% e, depois de secas, imergidas, em cola líquida à base de poli-L-lisina. Cortes histológicos, com três micrômetros de espessura, foram feitos, em micrótomo rotativo e as lâminas, em seguida, permaneceram na estufa, a 60°C, por 24 horas, para fixação do tecido à

lâmina. As lâminas foram submetidas à desparafinização e hidratação dos cortes e, em seguida, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando-se solução 1:9 de água oxigenada em metanol, durante 10 minutos.

Para a recuperação antigênica do material, foi utilizada a solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,0, em autoclave na potência máxima, permanecendo 20 segundos após atingir a pressão de 1 atm. O material foi então resfriado, até atingir a temperatura ambiente. Após este procedimento, foi realizada lavagem com Tris (TRIZMA base, D5637 Sigma Chemical C.O., St. Louis, E.U.A.) pH 7,4, seguida do bloqueio de proteínas inespecíficas, com leite em pó Molico® a 3%, em Tris, por uma hora. A incubação, com os anticorpos primários, foi realizada, após a diluição dos mesmos, em solução a 1% de albumina sérica bovina, em solução tampão de Tris, utilizando-se a diluição de 1:100 para o anticorpo anti-VEGF e 1:200 para o anticorpo anti-MMP-2, em câmara úmida por 18 horas a 4°C.

Após este período, as lâminas foram lavadas com solução de Tris e incubadas, com o anticorpo secundário, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em solução de Tris e incubadas com o Kit Novolink, conforme recomendações do fabricante. Após nova lavagem em Tris, para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3'-diaminobenzidina (Liquid DAB – K3466 DakoCytomation), durante três minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram, então, contracolorados com hematoxilina de Harris, por 15 minutos e, em seguida, as lâminas foram lavadas, em água corrente, por 10 minutos e submetidas aos processos de desidratação e montagem, em resina sintética.

3.8 Avaliação microscópica

As lâminas, coradas pelo método de HE, foram utilizadas, para observação da presença ou ausência das seguintes variáveis: infiltrado inflamatório, tecido de granulação, neovascularização, formação de músculo, ninhos de Brunn, formação de cistos vesicais, reconstituição de serosa, reepitelização do urotélio, crosta, colônia bacteriana e presença de resquícios da túnica.

Para as variáveis neovascularização e formação de músculo, utilizou-se análise semi-quantitativa, baseada em escore de intensidade, sendo atribuído os valores 0 (ausente), 1 (discreto), 2 (moderado) e 3 (acentuado). As lâminas coradas

pelo Tricrômico de Masson foram analisadas, quanto à presença e intensidade do tecido conjuntivo e serviram para dar suporte à classificação das lesões observadas, pela técnica de HE.

A avaliação do material corado pelo método de Picrosirius red foi feita em microscópio de luz polarizada (OLYMPUS modelo - DX 41 TS), do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da UENF, Setor de Patologia Animal. A análise deste material foi feita, com base na refringência das fibras colágenas e considerou-se a predominância das fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes, coradas em vermelho-alaranjado (colágeno I) e as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes com coloração esverdeada (colágeno III).

Para a avaliação da marcação imunoistoquímica, foi verificada a distribuição dos biomarcadores, em diferentes tipos celulares, bem como a intensidade da marcação positiva. Para o anticorpo anti-VEGF, os tipos celulares avaliados foram macrófagos e células endoteliais e, para o anticorpo anti-MMP-2, foram avaliados macrófagos, células endoteliais e fibroblastos.

Para a avaliação de intensidade da marcação positiva, para cada anticorpo, foi feita análise semi-quantitativa, baseada em escores, sendo atribuído os valores 0 (ausente), 1 (discreto), 2 (moderado) e 3 (acentuado).

3.9 Análise estatística dos resultados

A análise estatística para as variáveis avaliadas como dicotômicas (presença ou ausência): cistos, bactéria, crosta, ninhos de Brunn, presença de túnica albugínea, reconstituição da serosa, reepitelização, infiltrado inflamatório, tecido de granulação e formação de músculo utilizou o teste de qui quadrado ou o teste de Fisher, conforme a necessidade. Entretanto, para a avaliação da expressão de VEGF e MMP-2, para os diferentes tipos celulares, estudados como variáveis contínuas e que não apresentaram normalidade, na distribuição de seus erros amostrais, mediante o teste “D’Agostinp & Pearson”, utilizou-se o teste de Mann Whitney. Em todo o trabalho foi utilizado 5% de probabilidade de erro como nível de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da túnica albugínea conservada

Todas as túnicas albugíneas revelaram diferença macroscópica, em relação à coloração e à textura das amostras, em cada conservante.

Neste estudo, observou-se que a túnica albugínea bovina, conservada em glicerina a 98%, apresentava consistência firme e coloração vermelho escura. Notou-se, ainda, que a arquitetura vascular foi preservada e que houve redução da maleabilidade, devido ao processo de desidratação. A desidratação, ocasionada pela glicerina a 98%, está relacionada com sua ação antimicrobiana (PIGOSSI et al., 1971) e é totalmente revertida, após poucos minutos, em solução fisiológica. Neste estudo, a reidratação, em solução fisiológica, da túnica albugínea, foi realizada previamente à cistoplastia em coelhos.

As túnicas albugíneas, conservadas em glutaraldeído a 0,625%, revelaram coloração brancacenta, consistência mais firme e espessamento. Este fato pode estar relacionado com o aumento da resistência à tração de biomateriais tratados por este meio (BATISTA et al., 1996). Neste conservante, não foi possível delimitar o mapeamento vascular, tão evidente como aquele observado nas túnicas conservadas em glicerina.

As Figuras 3 a 4 ilustram as características macroscópicas, observadas nas túnicas preservadas em glicerina a 98% (A) e glutaraldeído a 0,625% (B).

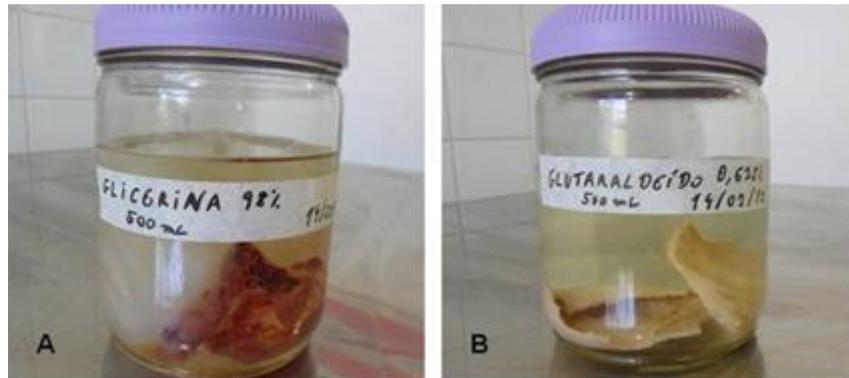


Figura 3. Recipientes contendo as túnicas albugíneas de bovinos, conservadas em meios distintos. A) Túnica albugínea conservada em glicerina a 98%, B) túnica albugínea conservada em glutaraldeído 0,625%.

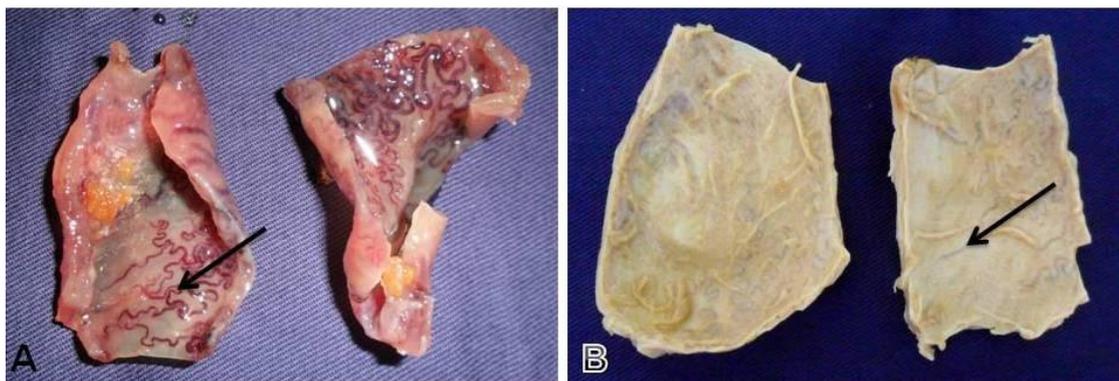


Figura 4. Comparação entre as túnicas preservadas em meios distintos. A) Túnicas albugíneas conservadas em glicerina a 98%: reparar a evidenciação de vasos sanguíneos (seta). B) Túnicas albugíneas conservadas em glutaraldeído a 0,625%, com vasos sanguíneos menos evidentes (seta).

Assim como descrito por König e Liebich (2007), a túnica albugínea mostrou-se um espesso envoltório do parênquima testicular, rico em fibras colágenas e bastante vascularizado. Polguy et al. (2010), também, verificaram intensa vascularização neste tecido e afirmaram que parte dessa rica vascularização se dá, pela presença de ramos acessórios da artéria testicular, originada na margem posterior do testículo. Neste estudo, pôde-se confirmar, pela avaliação microscópica, que a túnica albugínea manteve sua arquitetura preservada, após 30 dias, nos diferentes meios de conservação e que a presença de vasos foi evidenciada com o uso de diferentes técnicas histoquímicas.

Craatz et al. (2005) descreveram, histologicamente, a túnica albugínea, como uma malha formada por tecido conjuntivo denso e rico em fibras elásticas, tendo, conseqüentemente, uma boa capacidade de expansão. Ao mesmo tempo em que é maleável, apresenta boa rigidez. Conforme Staut et al. (2007), este tecido conjuntivo denso é classificado como não-modelado ou levemente modelado, uma vez que possui feixes de fibras de colágeno, grosseiros, entrelaçados e dispostos ao acaso, formando uma rede, que resiste a trações de todas as direções. Há predominância de colágeno tipo I, um tipo mais maduro e, por isso, com maior resistência, o que representa excelente vantagem, quando utilizado como enxerto.

Neste estudo, essas estruturas foram observadas, mesmo após 30 dias de conservação da túnica albugínea, em meios de glicerina 98% e glutaraldeído 0,625%. Desta forma, comprova-se a eficácia destes meios, na preservação tecidual da túnica (Figura 5).

A arquitetura básica da túnica albugínea bovina foi mantida, após 30 dias, nos meios em questão, porém, observou-se diferença, entre os meios, em sua capacidade de preservar a integridade das células. Neste caso, a glicerina a 98% promoveu a preservação celular, conforme descrevem Oliveira et al. (2009). Além disso, Gioso et al. (2002) afirmaram que o armazenamento da túnica albugínea, em temperatura ambiente, propicia uma melhor conservação, pois não há formação de cristais intra e extracelulares e nem surgimento de alterações eletrolíticas, deletérias às células e à matriz extracelular. Com isso, a arquitetura tecidual do material tratado, neste meio, é mantida.

O tempo mínimo de conservação do biomaterial, na glicerina, garante a atenuação imunogênica, assim como o seu efeito antimicrobiano, segundo Brun et al. (2004) e Mazzanti et al. (2004). Este efeito antimicrobiano foi comprovado, na avaliação microscópica, em que não se observou presença de colônias bacterianas.

Ao contrário das túnicas conservadas em glicerina, no grupo de túnicas preservadas em glutaraldeído, observou-se certo grau de condensação e de degradação de fibras colágenas, mostrando maior espaçamento entre estas (Figura 5). Estas fibras se apresentaram mais fragmentadas e havia sinais de perda estrutural do tecido, com a ausência de células, como os fibroblastos ou fibrócitos.

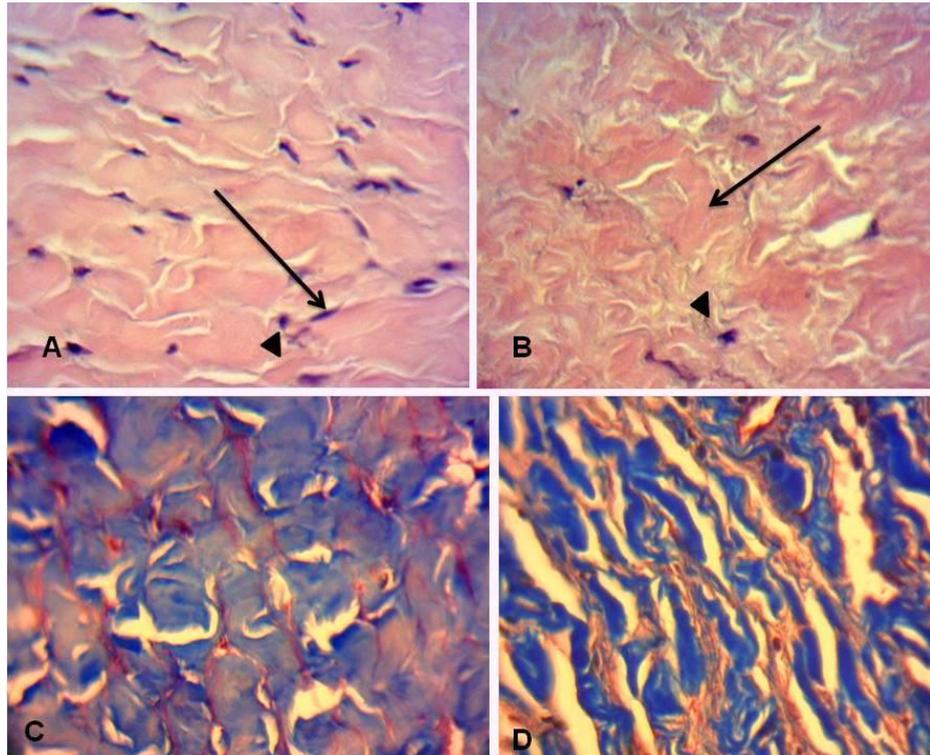


Figura 5. Fotomicrografia de túnica albugínea bovina. A) Túnica albugínea conservada em glicerina 98%, presença de fibrócito (seta) e fibras colágenas (cabeça de seta), coloração de HE, objetiva de 40x. B) Túnica albugínea conservada em glutaraldeído a 0,625% revelando fibras colágenas íntegras (seta) e perda da estrutura normal do tecido (cabeça de seta), coloração de HE, objetiva de 40x. C) Túnica albugínea conservada em glicerina 98%, fibras colágenas íntegras destacadas em azul, coloração de tricrômico de Masson, objetiva de 40x. D) Túnica albugínea conservada em glutaraldeído a 0,625%, fibras colágenas condensadas destacadas em azul, coloração de tricrômico de Masson, objetiva de 40x.

Na parede dos vasos das túnicas albugíneas, tratadas com glutaraldeído, foram observadas áreas de pouca afinidade tintorial, indicativas de autólise, fato que pode estar relacionado com a menor capacidade de preservação deste meio. O mesmo não ocorreu quando o biomaterial foi tratado com glicerina, pois a parede vascular e as células se mostravam íntegras. Isto demonstra a característica de preservação da arquitetura tecidual deste meio, como citado por Alvarenga (1992).

O material corado pelo método de picrossirius red polarização revelou que, tanto nas amostras conservadas em glicerina, quanto em glutaraldeído, houve predomínio do colágeno tipo I. Notou-se que a refringência das fibras colágenas, entre os dois meios, foi diferente. As amostras conservadas em glicerina mostraram forte refringência à luz polarizada, evidenciando a coloração amarelo-alaranjada. Por

outro lado, nas amostras conservadas em glutaraldeído, a refringência das fibras foi mais fraca. Acredita-se que a intensidade de coloração das fibras colágenas foi mais evidente nas túnicas conservadas em glicerina devido à melhor preservação da integridade celular evidenciada neste meio.

A Figura 6 ilustra a diferença de refringência das fibras colágenas observadas, à luz polarizada.

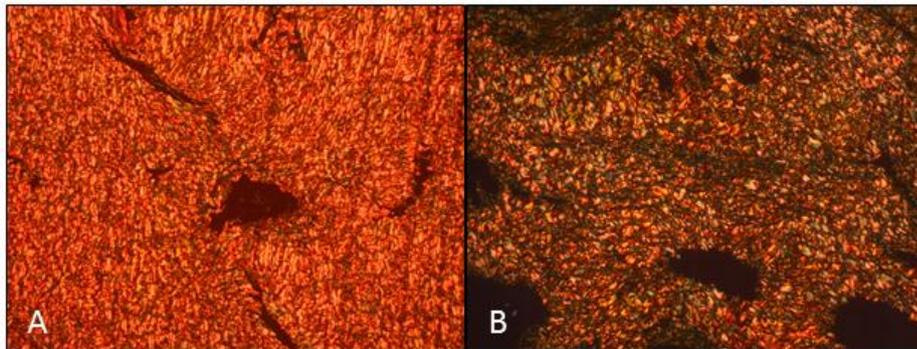


Figura 6. Fotomicrografia de túnica albugínea bovina coloração de picosirius red polarização. A) Túnica albugínea bovina conservada em glicerina 98%: notar forte refringência das fibras colágenas, objetiva de 10x. B) Túnica albugínea bovina conservada em glutaraldeído a 0,625%: notar fraca refringência das fibras colágenas, objetiva de 10x.

4.2 Cistoplastia de coelhos com a túnica albugínea bovina

4.2.1 Achados clínicos

Segundo Raiser et al. (2001), no que se refere aos biomateriais, uma importante característica é a sua capacidade de serem implantados, por meio de técnica cirúrgica simples. A cistoplastia, em coelhos, utilizando-se a túnica albugínea conservada, mostrou-se de fácil realização, não havendo nenhum tipo de complicação, no transoperatório. Entretanto, observou-se diferença no procedimento de sutura da bexiga com a túnica albugínea quando conservada nos dois diferentes meios. A túnica, conservada em glutaraldeído, apresentou-se mais espessa, oferecendo maior resistência e maior rigidez, no momento da passagem da agulha, conforme citado por Oliveira et al. (2009). Ao contrário, o biomaterial previamente conservado em glicerina, mostrou-se mais delgado e maleável e com maior facilidade no momento da sutura.

Corroborando com este achado, Rabelo et al. (2004) testaram a resistência do centro tendíneo diafragmático bovino, após conservação em glutaraldeído e em

glicerina e observaram que as amostras, mantidas em glutaraldeído, apresentavam incremento de sua resistência, enquanto que aquelas, conservadas em glicerina, não apresentavam alteração significativa. No estudo, em que se testou implante jugular homólogo, fixado em glutaraldeído, nos equinos, observou-se também que, após a conservação neste meio, os biomateriais se apresentavam mais resistentes. No entanto, ao contrário da técnica de cistoplastia, os autores notaram, neste evento, maior facilidade na manipulação cirúrgica (DORNBUSCH et al., 2007).

Neste experimento observou-se que em 100% dos coelhos, não houve sinais de rejeição à túnica albugínea bovina, utilizada como xenoenxerto nas cistoplastias, em ambos os meios estudados. Desta forma, é possível reafirmar a capacidade de atenuação da ação imunogênica, tanto do glutaraldeído (DORNBUSCH et al., 2007), quanto da glicerina a 98% (BRUN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009). Nenhum dos animais morreu no procedimento cirúrgico e todos se recuperaram rapidamente. Logo após a cirurgia, mantiveram a continência e micção espontânea, sem necessidade de cateterização vesical e a urina apresentou-se normal, sem hematúria.

Estes achados foram semelhantes aos do estudo de Dapena et al. (2012), que realizaram histerocistoplastia, em ratos, e de Uchôa et al. (2011) que realizaram ileocistoplastia, em cães. Por outro lado, Castellan et al. (2012) observaram resultados diferentes, quando constataram hematúria, em pacientes humanos, submetidos à gastrocistoplastia. Em alguns casos, a hematúria foi tão intensa, que houve necessidade de transfusão sanguínea.

Em humanos, o escape de urina, na cavidade abdominal, causada por perfuração espontânea vesical, tem prevalência estimada, entre 6 e 13%. Etiologicamente, tem sido associada à isquemia e inflamação crônica causada pela autocateterização e pelo mau esvaziamento da bexiga (ESCUADERO et al., 2011). Quando realizada a cistoplastia, em coelhos, com túnica albugínea bovina conservada, não houve extravasamento de urina pela linha de sutura, em nenhum dos animais, do presente experimento. Transcorrido o período de 24 horas do procedimento cirúrgico, não foram observadas alterações fisiológicas referentes à defecação e à micção dos coelhos. Em nenhum dos animais ocorreu rejeição, necrose, fístula ou formação de neoplasia, da mesma maneira que nos achados de Oliveira et al., (2008). Entretanto, outros autores registraram a presença de muco e

sinais de necrose ou de fístula, durante a cistoplastia com outros biomateriais (YAMATAKA et al., 2003; NUININGA et al., 2004).

A formação de neoplasia não pôde ser plenamente avaliada neste estudo, pois é uma complicação bastante tardia, conforme citado por Burgu et al. (2011). No estudo em que pacientes humanos foram acompanhados por um longo período pós-operatório, após o procedimento de gastrocistoplastia, detectou-se neoplasia vesical, muitos anos (11 a 14 anos) após a cirurgia (CASTELLAMET et al., 2012). Corroborando com esta afirmação, Kispal et al. (2012) realizaram cistoplastia, utilizando, conjuntamente, segmentos gástricos e colônicos e afirmaram que não seria possível avaliar a ocorrência de formação neoplásica, oriunda destas cistoplastias, porque o modelo canino apresentava expectativa de vida muito inferior ao dos humanos e, provavelmente, um prazo muito curto para um possível desenvolvimento de tumores malignos, resultantes destas cirurgias.

Os coelhos foram avaliados, constantemente e observou-se que a cicatrização da ferida cirúrgica, a partir do 10º dia, estava completa. Não ocorreu nenhum tipo de complicação, como deiscência ou de infecção da ferida cirúrgica. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira et al. (2008), em cistoplastia de coelhos, com utilização do peritônio bovino, conservado em glicerina e por Kwon et al. (2008) que realizaram cistoplastia, com enxerto aloplástico, semeado com células vesicais cultivadas. No entanto, Daleck et al. (1992) verificaram complicações, em dois dos 13 cães, quando utilizaram membrana peritoneal bovina, para reparo de hérnia perineal. Gurgel e Cortez Filho (2001) também verificaram complicação, em 42,86% dos gatos, que receberam implante vesical de membrana de pericárdio caprino.

Nos últimos anos, a submucosa intestinal bovina (SIS) e o enxerto de matriz acelular (BAMG) têm sido frequentemente pesquisados. Estes agem como materiais biodegradáveis que permitem a regeneração do urotélio e do músculo liso. Entretanto, ambos são xenoenxertos que necessitam de técnicas avançadas de preparo (DOMINGOS et al., 2012). A túnica albugínea conservada, utilizada neste estudo, como xenoenxerto na cistoplastia de coelhos, é capaz de estimular estas propriedades regenerativas do tecido anfitrião, sem ser um biomaterial que necessite de técnicas avançadas, para ser preparado e, por isso, torna-se um enxerto mais acessível e de menor custo.

4.2.2 Achados macroscópicos

4.2.2.1 Aderências

A aderência pós-cirúrgica surge, devido a uma complexa desordem inflamatória que une órgãos, os quais, normalmente, estariam separados. A incidência de aderência abdominal é elevada, com até 75% dos pacientes humanos, submetidos à cirurgia abdominal, exigindo, muitas vezes, cirurgia para reparação (ZAWANEH et al., 2008). Divergindo deste resultado, apenas 58,33% dos coelhos, que sofreram cistoplastia, apresentaram aderências e dentre essas, 12,5% foram leves, 25% moderadas e 20,83% intensas. No entanto, as aderências não causaram nenhum quadro clínico.

O principal órgão envolvido, nas aderências, foi o útero, sendo que todas as fêmeas do experimento apresentaram esta complicação, possivelmente, pela íntima relação anatômica com a bexiga. Outros órgãos envolvidos foram ceco e mesentério, além de ocorrer, em 20,84% dos animais, aderência à musculatura dorsal e, em algumas situações, as aderências incluíram, também, aorta abdominal e veia cava. O percentual de animais, sem qualquer tipo de aderência, foi de 41,67. Neste grupo, a maioria era de machos. Estes achados revelaram-se contrários ao estudo de Oliveira et al. (2008), que realizaram cistoplastia com peritônio bovino, em coelhos machos, em que a totalidade dos animais apresentou aderências da região do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdômen.

Na área do enxerto, foi possível observar irrigação sanguínea oriunda das aderências para a região de cistoplastia em 100% dos animais do experimento, nos dois períodos pós-operatórios estudados. Isso pode estar relacionado à ocorrência de hipóxia na região de implantação do enxerto, o que estimula esta nova vascularização. Corroborando com este achado, observou-se em cistoplastias com biomembrana de látex, em coelhos, a ocorrência de irrigação ao redor do enxerto desde os 15 dias de pós-operatório (DOMINGOS et al., 2012). Este fato ocorreu, possivelmente, porque a túnica albugínea bovina conservada é um biomaterial avascular e, apenas, serviu de ponte para a regeneração do tecido anfitrião, favorecendo assim a neovascularização e consequente nutrição desta área.

4.2.2.2 Local do enxerto

A bexiga de todos os animais apresentou-se totalmente íntegra, na área da cirurgia e, em alguns casos, foi muito difícil a localização da área do enxerto, pois houve uma excelente incorporação deste pelo tecido anfitrião. Esses achados assemelham-se aos de Nuinga et al. (2004), que realizaram uma cistoplastia, utilizando submucosa de intestino delgado e enxerto de matriz colágena quimicamente tratada. O implante de cartilagem auricular bovina, conservada em glutaraldeído a 4%, na hernioplastia experimental, em coelhos, também apresentou evidências de boa integração tecidual e cicatrização, além de, a exemplo da cistoplastia, não ter havido eliminação de material implantado (SILVA et al., 2009), evento esse que não pôde ser observado na pesquisa de Paulo et al. (2005), onde houve extrusão da membrana de látex de seringueira, em média 13,8 dias, após a herniorrafia da parede abdominal de ratos.

Macroscopicamente, a área do enxerto, em ambos os períodos pós-operatórios (5 e 10 semanas) das cistoplastias, apresentou o mesmo aspecto. O local mostrou-se discretamente esbranquiçado e delgado, quando comparado às demais áreas da bexiga, resultados similares aos encontrados por Nuinga et al. (2004). Na pesquisa de Domingos et al. (2012), com cistoplastias utilizando biomembrana de látex em coelhos, pode-se identificar, facilmente, o enxerto aos 15 dias do pós-operatório. Aos 45 dias, o biomaterial foi, quase totalmente, integrado ao tecido anfitrião. Porém, noventa dias depois, não se pode distinguir o enxerto do tecido receptor. No presente estudo, em 25% dos animais, com 5 e 10 semanas pós-operatórias, a área em que o biomaterial havia sido implantado foi, macroscopicamente, indistinguível. A Figura 7 ilustra os achados macroscópicos das bexigas, após a cirurgia.

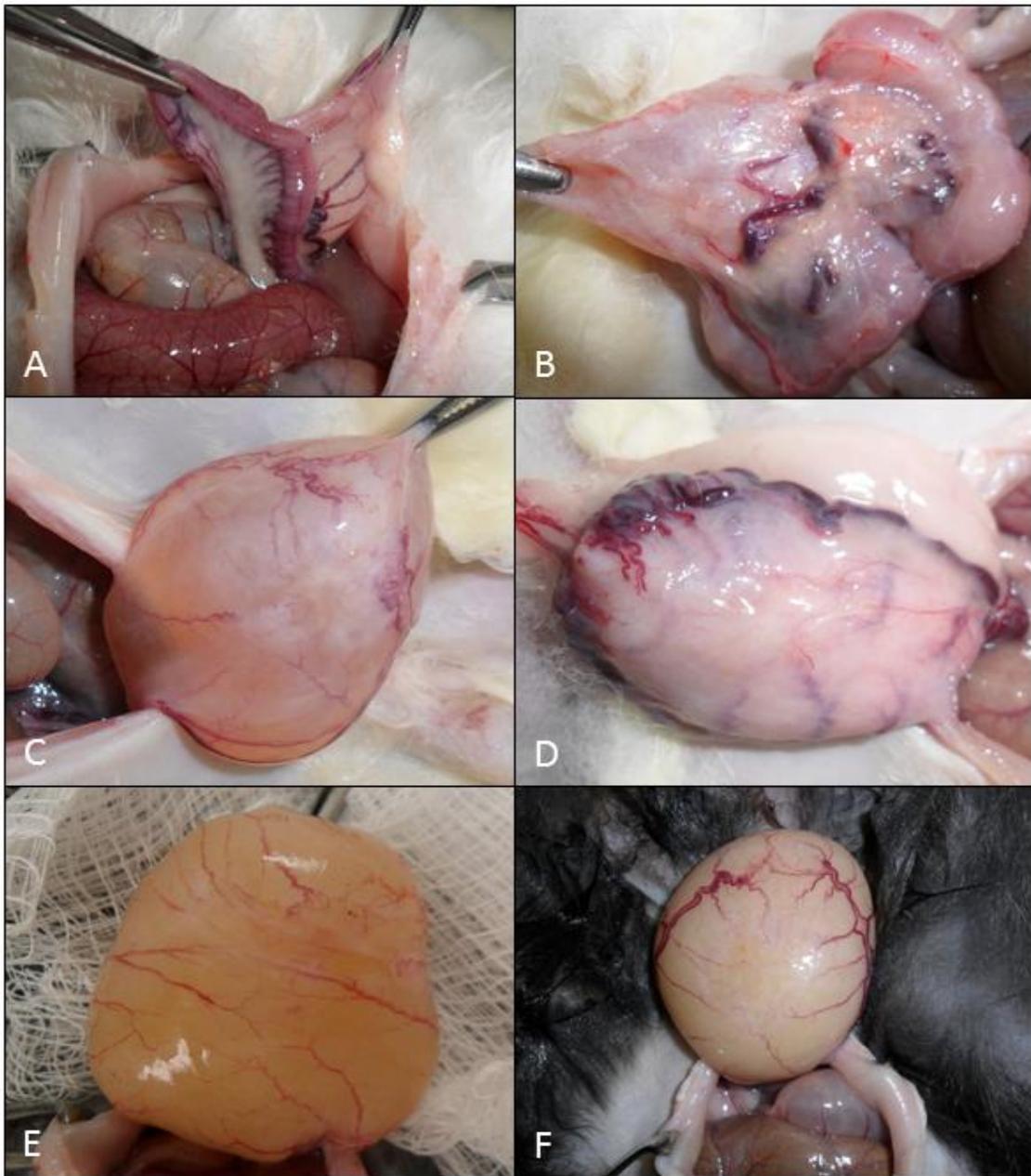


Figura 7. Fotomacrografia de bexiga de coelho, após cirurgia, durante a necropsia. A) Aderência ao mesentério grupo glicerina 10 semanas pós-operatório. B) Aderência ao útero grupo glicerina 10 semanas pós-operatório. C) Local do enxerto no grupo glicerina 5 semanas. D) Local do enxerto no grupo glicerina 10 semanas. E) Local do enxerto no grupo glutaraldeído 5 semanas. F) Local do enxerto no grupo glutaraldeído 10 semanas.

4.2.2.3 Presença de urolitíases e incrustações

Aos 35 dias (5 semanas) de pós-operatório, três coelhos (50%) revelaram cálculos vesicais, quando utilizada a glicerina a 98%. Entretanto, aos 70 dias (10 semanas) de pós-operatório, os seis coelhos apresentaram-se livres de urólitos. Nos animais que receberam enxertos, previamente conservados por glutaraldeído a 0,625%, pode-se notar a ocorrência de apenas um urólito, em cada um dos grupos pós-operatórios.

Aos 45 dias pós-operatório, no experimento de Domingos et al. (2009), um cálculo vesical (1.5 x 2.0 cm) foi observado em um coelho (6,6%). Por outro lado, no experimento de cistoplastia em coelhos de Nuinga et al. (2004), observaram-se apenas cinco (8,9%) casos de animais com urólitos, num total de 56. Entretanto, 21 (23,8%) casos de incrustações foram observados, em ambos os tipos de biomatrizes, ao contrário do presente estudo, em que não se observou nenhum caso de inscrustação.

Acredita-se que a formação de cálculos esteja relacionada à implantação do enxerto, que serviria como ninho para o desenvolvimento do cálculo vesical (OLIVEIRA et al., 2008; YAMATAKA et al., 2003; NUININGA et al., 2004). Contudo, Yang et al. (2005) não observaram a presença de cálculos, depois do implante de membrana derivada de tecido vesical homólogo, na bexiga de coelhos. Porém, a urina, em todas as amostras coletadas, apresentou aspecto turvo e presença de cristalúria.

Nuininga et al. (2004) citaram que a urina dos coelhos, que receberam o implante de submucosa intestinal suína, apresentou pH entre 7,5 e 8,5 e altos níveis de urato. Acredita-se que estas ocorrências estejam relacionadas ao tipo de dieta oferecida, pois as rações comerciais para coelhos são alcalinas, elevam o pH da urina e favorecem o aparecimento da cristalúria, aumentando o risco de desenvolvimento de urólitos, nesses animais (KIWULL-SCHÖNE et al. 2005). Provavelmente, no estudo em questão, as alterações urinárias encontradas devem-se à associação desta particularidade da espécie com o emprego do xenoenxerto de túnica albugínea conservada e, também, ao fio de sutura, que são materiais estranhos ao tecido vesical. Estes últimos, além de ocasionarem alterações na parede da bexiga, servem de base para a agregação e formação de cálculos (MORRIS et al., 1986).

Grover e Ryall (1994) afirmaram que existem evidências de uma ligação entre a alta taxa de ácido úrico excretado e oxalato de cálcio (CaOx), culminando em cálculos urinários. A adesão de microcristais de urato/CaOx, no local da cistoplastia, poderia ser um ponto crítico, na formação de cálculos e incrustações. Desta maneira, o nível elevado de urato de urina poderia ser uma contraindicação, para o uso de coelhos, neste tipo de experimento.

Entretanto, no estudo de Escudero et al. (2011), houve acompanhamento, por 13 anos, de pacientes humanos que passaram por enterocistoplastia. Pode-se observar que 25% apresentaram cálculo vesical, com necessidade de cirurgia para a sua retirada, porém, sem ocorrência de recidiva. Por outro lado, quando se compara a totalidade dos coelhos que realizaram a cistoplastia com túnica albugínea, pode-se notar que 20% dos animais apresentavam urólitos, corroborando com os achados de Zhu et al., (2011), os quais realizaram a cistoplastia de coelhos, com enxerto de matriz acelular e obtiveram a mesma porcentagem, na formação de urólitos. Ainda, segundo os autores, estes achados não influenciariam, em nada, a avaliação do processo regenerativo da bexiga, tanto em aspectos fisiológicos, como morfológicos, confirmando, assim, que a utilização de coelhos torna-se um excelente modelo experimental, para pesquisar biomateriais que, posteriormente, podem servir para o uso clínico, em humanos. Segundo Nuinga et al. (2004), este modelo animal é de grande valor para melhorar e avaliar os enxertos, prevenindo a formação de urólitos e incrustações. A Figura 8 mostra a presença de urólitos, nas bexigas dos animais avaliados. O Quadro 3 e 4 evidencia os resultados macroscópicos das cistoplastias.



Figura 8. Urólito encontrado na avaliação macroscópica após a cistoplastia do grupo glicerina 10 semanas.

4.2.3 Achados microscópicos

O reparo de tecidos lesados por ressecções cirúrgicas, seja causado por feridas ou por outras desordens, pode ser dividido em dois processos: a regeneração e a cicatrização. O primeiro resulta na reconstituição dos tecidos, recuperando a sua arquitetura original e o segundo diz respeito à substituição deste por tecido cicatricial (DOMINGOS et al., 2012). No presente estudo, pode-se observar predominância do processo de regeneração, utilizando a túnica albugínea bovina como biomaterial, uma vez que esta serviu de suporte para o desenvolvimento das células do tecido anfitrião.

Observou-se que a parede da bexiga, no local do implante, apresentava-se contínua e a maior parte das amostras revelava todas as camadas da parede vesical (camada mucosa, submucosa, muscular e serosa), desde o grupo de 5 semanas de avaliação pós-operatória, embora não tão bem definidas em algumas amostras. Wongsetthachai et al., (2011), relataram, em seu estudo, que todas as camadas da parede normal da bexiga estavam presentes, histologicamente, nas áreas da cistoplastia de cães, utilizando túnica vaginal autóloga, 10 semanas após a cirurgia.

A avaliação histológica mostrou que a túnica albugínea bovina, como biomaterial, mostrou-se capaz de suportar a formação e maturação do urotélio por toda a região do defeito. Na avaliação histológica, nas 5 semanas pós-operatórias, no grupo do glutaraldeído como conservante, todos os animais apresentaram a reepitelização do urotélio. Porém, no grupo de glicerina, esta regeneração não foi observada em 33,33% dos coelhos. Às 10 semanas, em 100% dos animais do experimento, notou-se epitélio vesical reconstituído.

Biomateriais utilizados, na reconstrução do trato urinário, devem estimular a proliferação de células oriundas deste sistema. A proliferação do urotélio é essencial, porque este é capaz de suportar a alta toxicidade da urina, impedindo o seu contato com o enxerto. Desta forma, desempenha um papel crucial, pois protege este enxerto e mantém a sua integridade, evitando o extravasamento urinário e infecções (WEN-BIAO et al., 2013). No presente estudo, o urotélio apresentou-se hiperplásico, com aspecto papilífero, da mesma forma que nos achados de Zhu et al. (2011), que realizaram cistoplastia, em coelhos, com matriz acelular e, também, naqueles de Mauney et al. (2011), quando estudaram o processo de regeneração de cistoplastia, em ratos, utilizando enxerto de matriz de seda.

O tecido de granulação é composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados (VULCANI et al., 2009). O enxerto pode ser reconhecido, como um corpo estranho, pelo organismo e essa reação leva ao desenvolvimento do tecido de granulação. Neste caso, as células gigantes, também, podem compor a reação (VASCONCELOS, 2006). Neste estudo, o tecido de granulação foi observado em 95,84% das amostras e não havia evidências de reações inflamatórias com células gigantes, o que indica que a resposta cicatricial não foi do tipo corpo estranho. A ausência deste tipo de reação pode sugerir que ambos os meios conservantes estudados foram eficientes, na capacidade de promover a atenuação imunogênica do xenoenxerto e que esta é uma importante função para um meio de preservação (RAISER et al., 2001).

Ayyildiz et al. (2008) estudaram a submucosa intestinal suína, em cistoplastia de coelhos, avaliando microscopicamente o local do enxerto 12 meses após a cirurgia. Assim como no estudo em questão, mesmo utilizando um biomaterial que não recebeu células previamente cultivadas por bioengenharia tecidual, estes enxertos permitiram a migração e regeneração das células oriundas do tecido anfitrião, com sucesso, não havendo sinais de rejeição ou infecção.

Os colágenos tipo I e III são os componentes centrais da matriz extracelular. No entanto, a produção colagênica pode se tornar problemática; se, por um lado, é necessário o reparo do tecido, por outro lado, o excesso de deposição de colágeno pode resultar na perda da sua função. Por conseguinte, a apropriada quantidade de colágeno no tecido é imprescindível, para que ocorra a sua completa regeneração. A maior parte dos componentes da matriz extracelular são sintetizados, secretados e mesmo degradados por fibroblastos e suas enzimas e esta é a chave para a regulação dos componentes da matriz extracelular (XIE et al., 2008).

Desta forma, a quantidade de fibras colágenas é um componente essencial, para garantir as propriedades mecânicas do enxerto utilizado, nas cistoplastias, pois confere resistência e expansibilidade ao órgão (DOMINGOS et al., 2012). Além da quantificação do colágeno, a técnica do picrossirius red permite analisar, pela luz polarizada, o padrão de disposição das fibras colágenas, ou seja, avalia seu arranjo arquitetural (entrelaçamento de fibras colágenas) (TORRES NETO et al., 2007).

Os achados do presente estudo, nas 5 semanas pós-operatórias, revelaram predominância das fibras colágenas delgadas e dispersas, coradas em verde (colágeno III), em relação às fibras espessas, coradas em vermelho (colágeno I).

Este achado foi esperado, devido ao tempo de avaliação pós-operatória, pois, nesse momento, o tecido cicatricial, ainda é imaturo, encontrando-se em desenvolvimento. Entretanto, nos achados das 10 semanas pós-operatórias, notou-se maior quantidade de fibras colágenas do tipo espesso, apontando para ocorrência de maturação, no local da cistoplastia.

O glutaraldeído reage com a fibra de colágeno que compõe o biomaterial. Durante este processo ele o conserva e forma ligações cruzadas estáveis, durante a formação de polímero de glutaraldeído, sobre a superfície. No entanto, acredita-se que a calcificação ocorre principalmente, devido à formação de vínculo, entre o aldeído livre do glutaraldeído e os íons de cálcio (CONNOLLY et al., 2004). Wongsetthachai et al. (2011) relataram a presença de metaplasia óssea e calcificação distrófica, nas áreas da cistoplastia de cães, utilizando túnica vaginal autóloga, 10 semanas após a cirurgia. Estes achados diferem dos resultados obtidos, no presente estudo, pois não foram observadas alterações semelhantes, em nenhum dos grupos estudados.

Existem diversos trabalhos apontando o glutaraldeído, como meio de preservação de biomembranas, inclusive em biopróteses comerciais, como facilitador do problema de calcificação e posterior metaplasia óssea pós-operatória. Além disto, estas pesquisas buscam alternativas para este problema, como a associação de outras substâncias ou concentrações, com o objetivo de reduzir esta complicação (KIM et al., 2011; LEE et al., 2000; SINHA et al., 2012; JORGE-HERRERO et al., 2010).

A avaliação microscópica revelou que nos dois grupos havia alterações como: cistos, bactérias, crostas, ninhos de Brunn, presença de túnica albugínea, reconstituição da serosa e reepitelização. Em nenhuma das variáveis avaliadas foram detectadas diferenças significativas (Tabela 1), exceto em relação à presença de cistos, que foram observados, em quantidade significativa, nos grupos preservados em glutaraldeído, quando comparados aos grupos da glicerina.

Tabela 1. Avaliação microscópica, quanto à presença ou ausência de cistos, bactérias, crostas, ninhos de Brunn (NB), presença de túnica albugínea (PTA), reconstituição da serosa (RS) e reepitelização (RE) comparando o grupo glicerina (5 e 10 semanas) com o grupo glutaraldeído (5 e 10 semanas). Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado com teste Fisher a 5% de probabilidade.

	Cistos	Bactérias	Crostas	NB	PTA	RS	RE
Glicerina	6 ^{a*}	1 ^a	2 ^a	8 ^a	4 ^a	12 ^a	11 ^a
Glutaraldeído	11 ^b	0 ^a	0 ^a	11 ^a	2 ^a	12 ^a	12 ^a

Este fato pode ter relação com a citotoxicidade mais evidente do glutaraldeído, quando comparada a glicerina (COSTA, 2009). O efeito da citotoxicidade do glutaraldeído é expresso pela inibição do crescimento celular e alteração da morfologia das células (LUYN et al., 1992). Hang-Lee et al. (1990) observaram um leve efeito tóxico do glutaraldeído, pela morte de fibroblastos, em torno do biomaterial reticulado pelo glutaraldeído, mesmo após ter sido excessivamente lavado. Estes estudos químicos e biológicos indicam que a citotoxicidade do glutaraldeído, em biopróteses reticuladas, pode ser devido aos polímeros instáveis de glutaraldeído que persistem, nos interstícios destes tecidos e vão sendo, gradativamente, liberados. Isto seria possível pelo processo de hidrólise, no momento da incorporação do biomaterial pelo tecido anfitrião. Neste estudo, a presença de cistos pode estar relacionada com a reação atípica do epitélio à toxicidade do meio de preservação, conforme descrito por Silva et al. (2012).

Os ninhos de Brunn representam invaginações do urotélio que se aprofundam na submucosa e que podem resultar em cistite glandular, quando há metaplasia do epitélio e aparecimento de células calciformes (metaplasia intestinal) (GODOY, 2006). Ocorrem quando há proliferação, em conjunto, de células basais e intermediárias do urotélio, proliferadas na lâmina própria ou sem conexão com o urotélio. Esta alteração pode evoluir para cistite glandular, quando há o revestimento interno das células colunares da mucosa por mucina (DIAS, 2010). Apesar de ser um achado que pode estar presente na microscopia de tecidos neoplásicos (GABRIEL et al., 2009; FALBO et al., 2005), Silva et al. (2012) referem-se aos ninhos de Brunn e à cistite cística (cistos vesicais) como sendo alterações não

neoplásicas da bexiga. Estas, conforme dito anteriormente, foram observadas neste estudo. Em ambos os grupos, não houve qualquer evidência de formação neoplásica, indicando, segundo Raiser et al., (2001), uma característica fundamental dos biomateriais, a de não serem carcinogênicos.

No grupo glutaraldeído, não foi evidenciada a presença de colônias bacterianas ou formação de crosta, enquanto que as amostras do grupo glicerina revelaram 16,66% de colônia bacteriana e 33,33% de formação de crosta. Este fato pode estar relacionado à ação antisséptica do glutaraldeído, sobre formas bacterianas vegetativas (RABELO et al., 2004), mostrando ser mais poderoso que a glicerina a 98%, sendo esta última considerada uma solução com ação antimicrobiana mais restrita (MOTA et al., 2002).

A análise da intensidade do infiltrado inflamatório, da neovascularização, do tecido de granulação e da formação de músculo demonstrou uma maior tendência de inflamação e neovascularização, no grupo glicerina, com 5 semanas de pós-operatório, quando comparado ao de 10 semanas e ao grupo glutaraldeído, nos dois momentos. Além disto, notou-se também uma maior tendência à formação de músculo, no grupo de 10 semanas, do glutaraldeído, em relação ao de 5 semanas e aos grupos glicerina. Entretanto, não houve resultado significativo, quando se realizou o teste de Mann Whitney, a 5 % de probabilidade (Anexo D).

Corroborando com os achados relativos à formação do músculo detrusor, com o estudo de Probst et al. (2000), em que foi testado o enxerto de matriz acelular em cistoplastia de cães, observou-se que o maior desenvolvimento do músculo liso estava, diretamente, relacionado ao maior tempo pós-operatório. Ainda, segundo estes autores, três mecanismos foram propostos, como responsáveis pela regeneração do músculo detrusor no enxerto. São eles: (i) o processo de migração de células maduras vizinhas para o local; (ii) des-diferenciação, migração e rediferenciação de células maduras; e (iii) infiltração de miofibroblastos, com subsequente diferenciação, em células do músculo liso. Provavelmente, isto não ocorreu com o grupo glicerina, porque este meio de conservação despertou uma reação inflamatória mais exuberante que pode ter retardado o processo regenerativo.

Na pesquisa de Zhu et al. (2011), com cistoplastia, em coelhos, utilizando matriz acelular, observou-se, em 4 semanas de pós-operatório, formação de pequenos feixes musculares que invadiam a região do enxerto, a partir da zona de

fronteira com o tecido nativo. Às 24 semanas de pós-operatório, o músculo liso apresentava-se mais pronunciado, entretanto, na região central, em que o enxerto havia sido implantado, a quantidade de feixes do detrusor mostrava-se rareada, confirmando o desenvolvimento progressivo do músculo detrusor.

Durante a pesquisa de Mauney et al. (2011), a cistoplastia com matriz de seda em ratos foi avaliada em 10 semanas pós-operatório, mesmo período de avaliação da cistoplastia em coelhos com túnica albugínea. Pôde-se, ali, observar, tal como no presente experimento, que bandas de músculo liso atravessavam completamente a região em que o enxerto havia sido utilizado. No momento em que se comparou este período pós-operatório, com os outros estudados, em ambos os experimentos, o local da cistoplastia, com matriz de seda, aos 21 dias de pós-operatório e no experimento da cistoplastia, com túnica albugínea, às 5 semanas pós-operatórias, observou-se que houve um incremento do desenvolvimento do músculo detrusor. Este acontecimento, provavelmente, refletiu uma continuidade da maturação do tecido regenerado e esse fato foi ainda mais exuberante, no grupo em que a túnica albugínea estava, previamente, conservada em glutaraldeído.

No presente estudo, às 5 semanas de pós-operatório, foram observadas tiras de tecido muscular liso, viáveis, permeadas por colágeno, oriundo do tecido anfitrião que substituíra, completamente, o xenoenxerto de túnica albugínea conservada em 66,67% das amostras, não havendo diferenças entre os grupos dos dois meios conservantes. Esses achados assemelham-se aos de Daleck et al. (1988) e Costa Neto et al. (1999), onde, aos 30 dias de pós-operatório, o biomaterial constituído por peritônio bovino, também, pôde ser evidenciado nas amostras. Isto pode estar relacionado ao curto prazo pós-operatório, em que as bexigas submetidas à cistoplastia foram analisadas, pois estas ainda se encontravam em meio ao processo de incorporação do biomaterial pelo tecido anfitrião. Neste momento, o enxerto ainda desempenhava sua principal função, que é a de servir de suporte, para o desenvolvimento das células vesicais, mantendo suas propriedades mecânicas.

Após 10 semanas pós-operatórias, no grupo da glicerina, em 28,57% das amostras, ainda se pode notar resquícios da túnica albugínea. Porém, no grupo glutaraldeído, a incorporação do xenoenxerto pelo tecido anfitrião aconteceu em todas as amostras. Mauney et al. (2011) encontraram resultados diferentes, pois a maior parte da matriz de seda utilizada ainda estava intacta dentro do defeito criado,

mesmo após 10 semanas de implantação. No entanto, pontos focais de infiltrado de macrófagos e fragmentação do enxerto foram notados. Observou-se que o glutaraldeído parece estimular de forma mais eficiente a incorporação do biomaterial ao tecido nativo. Isto poderia ser explicado pela menor tendência à inflamação que este grupo demonstra. Entretanto, segundo Mauney et al. (2011), a matriz de seda também despertou mínima reação inflamatória.

Mauney et al. (2011) afirmaram que a rápida taxa de degradação poderia contribuir para um estado relativamente imaturo de reparação, devido ao suporte mecânico insuficiente, durante o crescimento interno da parede da bexiga. Entretanto, no experimento em questão, a rápida incorporação da túnica albugínea na bexiga nativa não resultou em um tecido imaturo, ao contrário. Esta característica é uma excelente qualidade da túnica albugínea conservada, principalmente em glutaraldeído, pois conforme Su et al. (2009), a lenta reabsorção do enxerto pode, inclusive, aumentar o risco de formação de cálculos urinários, ao longo do tempo.

Após a implantação do biomaterial no tecido vivo, é necessário que as propriedades mecânicas sejam mantidas e que este seja utilizado como suporte, para o repovoamento, pelos diferentes tipos celulares, do tecido anfitrião. Posteriormente ao bem sucedido crescimento destas células, como por exemplo, fibroblastos e células musculares, o processo de remodelação da biomembrana poderá ocorrer de acordo com o novo ambiente biológico. Este enxerto não deve ter uma taxa de degradação tão rápida, que não dê tempo para esse processo se desenvolver. Este tecido deve regular negativamente a inflamação e aumentar a taxa de infiltração celular. Estes mecanismos dependem, fortemente, das propriedades biológicas do enxerto.

Uma maneira bastante utilizada para aumentar a resistência, inibir processos inflamatórios, e diminuir a taxa de degradação das biopróteses é a utilização de agentes químicos de ligação cruzada, como o glutaraldeído (KOCH et al., 2012). Um aspecto importante a ser considerado no tratamento químico de ligações cruzadas é a capacidade do tecido, a ser utilizado como biomaterial, para reter materiais citotóxicos (JORGE-HERRERO et al., 2010). Entretanto, a preservação com glicerina leva à perda de componentes celulares do biomaterial, mantendo preservada a resistência e a estrutura da matriz extracelular formada pelo colágeno (CUNHA et al., 2013). A Figura 9 ilustra os achados microscópicos das bexigas.

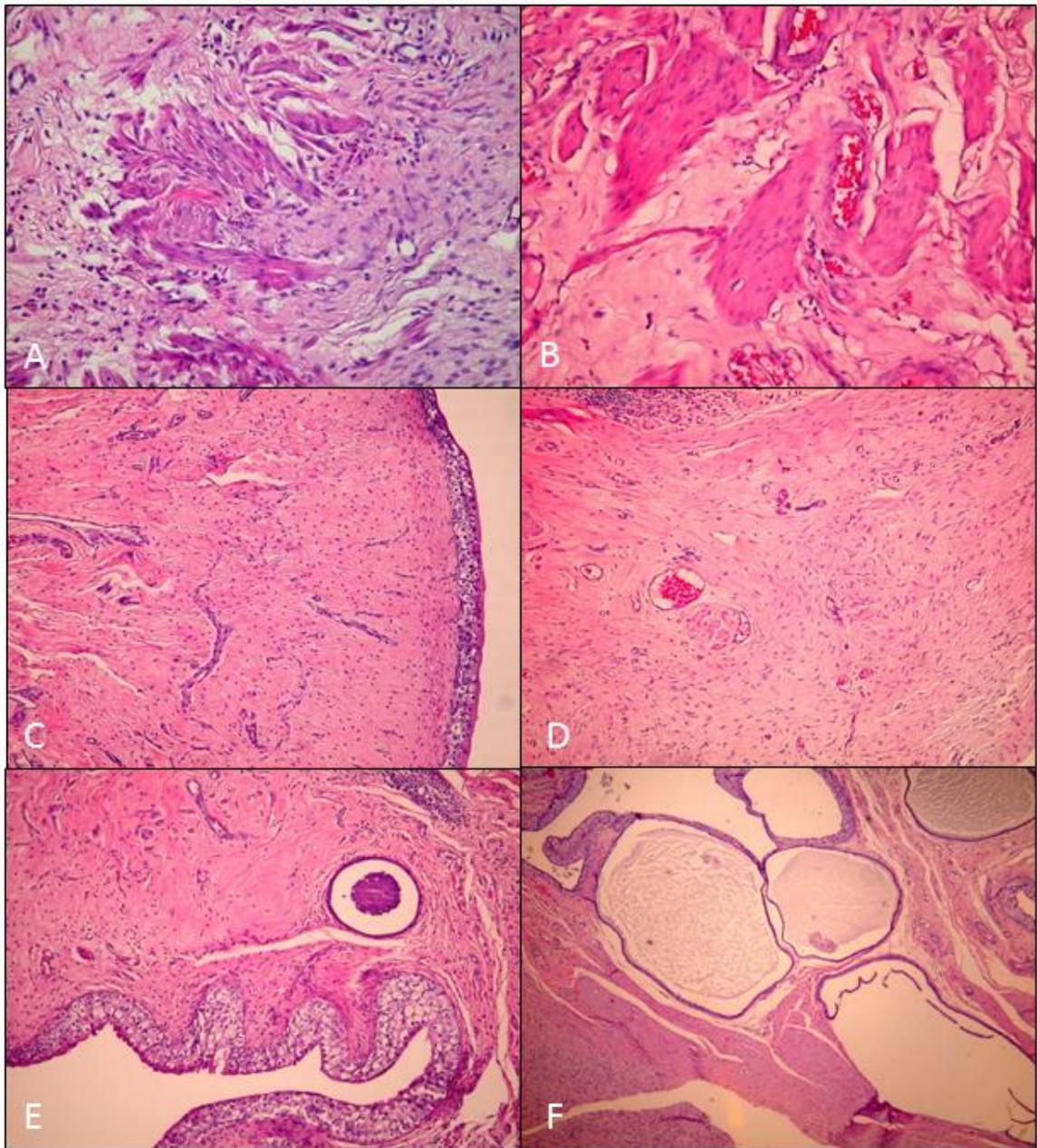


Figura 9. Fotomicrografia de bexiga de coelho nos pós-operatórios das cistoplastias. A) e B) Grupo glicerina 5 semanas. Tiras musculares regeneradas na região do enxerto. Objetiva de 20x. C) Grupo glutaraldeído 10 semanas. Reepitelização completa com urotélio hiperplásico. D) Grupo glicerina 10 semanas. Área com tecido cicatricial maduro. Objetiva de 10x. E) Glicerina 10 semanas. Urotélio revestindo totalmente a local da cistoplastia e cisto na região submucosa. Objetiva de 10x. F) Glutaraldeído 10 semanas. Grande quantidade de cistos na submucosa. Objetiva de 40x. Coloração HE.

Assim como no estudo de Seth et al. (2013), que testaram matriz porosa de seda, em cistoplastia de ratos, não há evidência de eventos fibróticos graves, em nenhum dos grupos estudados, além da ausência de eventos inflamatórios crônicos substanciais.

Em relação à expressão do biomarcador VEGF, observou-se marcação deste anticorpo nos macrófagos e células endoteliais de todas as amostras. Houve diferença significativa ($p=5\%$), mediante o teste Mann Whitney, na quantidade de macrófagos imunomarcados pelo VEGF, no grupo de 5 semanas da glicerina, indicando maior estímulo à angiogênese, quando comparado ao grupo de 10 semanas e a ambos os grupos do glutaraldeído. Por outro lado, não houve diferença na expressão do VEGF, nas células endoteliais, nos grupos estudados (Anexo B).

O VEGF estimula a angiogênese direta e indiretamente. A expressão endógena de VEGF, durante o reparo tecidual, provavelmente, possui um importante papel, recrutando células progenitoras endoteliais, servindo como um potente mitógeno destas células e inibindo a apoptose. Além disto, este fator de crescimento é capaz de aumentar a permeabilidade celular, durante o processo de regeneração, facilitando a chegada de células inflamatórias (GALIANO et al., 2004; DAMICO, 2007).

Segundo Zhou et al. (2013), após a realização de uma cistoplastia, o VEGF tem o poder de estimular as células endoteliais, adjacentes ao enxerto, a migrarem em direção a este e a se proliferarem, no local, dando origem a novos vasos. Na pesquisa em questão, o VEGF, possivelmente, ainda desempenhava este papel inicial do processo regenerativo, no grupo glicerina 5 semanas, no qual se podia encontrar forte expressão do imunomarcador VEGF. Entretanto, os outros grupos não apresentaram expressão deste anticorpo tão evidente.

O grupo da glicerina, às 5 semanas pós operatórias, apresentou maior tendência à intensidade do infiltrado inflamatório e consequentemente, maior expressão de VEGF nos macrófagos. Confirmando esta hipótese, Brown et al. (1992), afirmaram que, durante o processo de reparo, o VEGF regula vários processos, incluindo a permeabilidade vascular, o influxo de células inflamatórias, no local da lesão, migração e proliferação das células endoteliais existentes e recrutamento de células precursoras, para o local a ser reparado. Esses são fatores indispensáveis à etapa inflamatória do processo regenerativo.

Corroborando com estes dados, Domingos et al. (2012), realizaram cistoplastia de coelhos, com biomembrana de látex e encontraram, no grupo de 15 dias do pós-operatório maior expressão de VEGF, enquanto que, no grupo de 90 dias, após a cistoplastia, houve significativo decréscimo na imunomarcação. Segundo estes mesmos autores, o potencial angiogênico do local do enxerto é temporário e acompanha a redução do processo inflamatório.

No grupo glutaraldeído, às 5 semanas, entretanto, o processo inflamatório foi reduzido de forma gradativa, assim como a expressão do imunomarcador VEGF, da mesma forma que no estudo de Domingos et al. (2012). Estes dados sugerem que a resposta inflamatória mais curta poderia acelerar o processo de remodelamento. Esta hipótese foi reafirmada, pela maior tendência à formação de músculo detrusor, em 10 semanas, após a cirurgia, no grupo glutaraldeído, quando comparado ao grupo da glicerina, no mesmo período, ou seja, o processo regenerativo, do grupo do glutaraldeído, desenvolveu-se, mais precocemente.

Uma explicação para tal fenômeno poderia ser a intensa atividade dos macrófagos, durante as fases iniciais da cicatrização (DOMINGOS et al., 2012), indicando que estas células desempenham um importante papel de controlar a proliferação e migração de fibroblastos, na formação da matriz e angiogênese (ASHELEY et al., 2010). Corroborando com estes achados, haveria a suposição, no experimento em questão, de que o fato de ter encontrado um aumento significativo na expressão do VEGF, nos macrófagos e não nas células endoteliais, indicaria que os primeiros seriam as células capazes de orquestrar as etapas iniciais do processo reparativo.

De acordo com Brown et al. (1992), estudos com animais mostraram que o VEGF é expresso por macrófagos e queratinócitos, mas, não pelas células endoteliais, embora os vasos adjacentes, ao local em que este fator foi presente, apresentassem evidências dos seus efeitos. Da mesma maneira, na pesquisa em questão, o macrófago revelou uma maior expressão de VEGF. Entretanto, ao contrário do que afirmaram Brown et al. (1992), pode-se notar a imunomarcação em células endoteliais, mesmo que não tão significativa, como no caso dos macrófagos. Dados semelhantes foram descritos por Kumar et al. (2009) que identificaram, em feridas de humanos, aumento significativo na expressão de VEGF, em células endoteliais, além da expressão em fibroblastos e macrófagos.

Segundo Jones et al. (2007), a química da superfície do biomaterial desempenha forte papel na ativação de macrófagos e isto pode determinar a resposta biológica aos enxertos. No presente estudo, provavelmente, o biomaterial tratado com glicerina demorou mais a instigar a resposta dos macrófagos ao processo de incorporação, retardando assim o início da fase inflamatória, possivelmente marcada pela maior expressão de VEGF.

A presença do VEGF no processo regenerativo da cistoplastia vai além da angiogênese, este fator de crescimento, conforme Zhou et al. (2013), pode promover o início do processo regenerativo, também, com a elevação da atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9). No presente estudo, o aumento da expressão do VEGF parecia indicar o início do processo reparativo. O grupo em que o VEGF se apresentava, aumentado a MMP-2, obteve, igualmente, forte expressão e, possivelmente, este fator de crescimento serviu como desencadeador do início da regeneração.

Youssif et al. (2005), testaram a incubação de VEGF, em enxerto de matriz acelular para cistoplastia de ratos, além de aplicação deste fator de crescimento, na bexiga nativa, em que se realizaram as cirurgias. Estes autores concluíram que o VEGF é capaz de acelerar a regeneração das bexigas que sofreram cistoplastia, com o enxerto de matriz acelular. Ressaltaram, ainda, que este fator de crescimento pode estimular a regeneração do músculo detrusor.

Contudo, no estudo em questão, embora não tenha havido tratamento com o VEGF, observou-se que o grupo glutaraldeído 10 semanas pós-operatório apresentou maior tendência ao desenvolvimento de músculo, mas, não se pode notar uma expressão muito acentuada do imunomarcador VEGF. Talvez, o estímulo oriundo deste fator de crescimento tenha ocorrido em algum momento mais precoce da regeneração e esse estímulo, mesmo não estando presente no momento da avaliação, levou ao processo de regeneração do músculo detrusor com maior rapidez que no grupo glicerina 10 semanas.

Kumar et al. (2009) analisaram biópsias de feridas cirúrgicas, na pele de humanos, em vários estágios de cicatrização e os estudos revelaram que a expressão máxima do VEGF ocorreu em duas semanas e diminuiu até 24 semanas após a cirurgia. Na presente pesquisa, o grupo glicerina 5 semanas apresentou uma forte expressão do imunomarcador VEGF, entretanto o grupo glutaraldeído 5 semanas exibiu uma marcação de menor intensidade. Embora as regiões da

cistoplastia dos coelhos não tenham sido analisadas, com apenas duas semanas de pós-operatório, é possível que no grupo do glutaraldeído, a expressão do VEGF estivesse em níveis elevados nesta fase, corroborando com o trabalho subjacente. Também se pode observar que, com o decorrer das semanas, a expressão deste fator de crescimento foi decrescendo, conforme já descrito por Kumar et al. (2009).

As MMPs são importantes, em muitos processos biológicos e patológicos, por terem a capacidade de degradar componentes da matriz extracelular (VISSE; NIGAGE, 2003). A MMP-2 é expressa por vários tipos celulares, incluindo fibroblastos, queratinócitos, condrócitos, osteoblastos e monócitos e degrada, principalmente, o colágeno I e IV (HASHIZUME, 2007). Esta metaloproteinase, também, possui efeito sinérgico com a angiogênese (AMĂLINEI et al., 2007).

Neste estudo, houve expressão do biomarcador MMP-2, nos macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, em todas as amostras. A expressão de MMP-2 foi elevada, em ambos os grupos glicerina, não havendo diferença significativa ($p=5\%$), entre os momentos pós-operatórios. Entretanto, houve diferença significativa, a 5% de probabilidade, de acordo com o Teste de Mann Witney, na quantidade de fibroblastos imunomarcados pelo MMP-2, no grupo de 5 semanas do glutaraldeído, quando comparado ao grupo de 10 semanas (Anexo C).

A MMP-2 desempenha um papel crucial, na cicatrização das feridas e na resposta inflamatória, além de ser a chave reguladora destes processos e de comandar a remodelação dos tecidos (JANSEN et al., 2007). Desta forma, os fibroblastos são as células mais importantes envolvidas na produção e remodelagem da matriz extracelular durante a reparação de feridas (XIE et al., 2008). Estes dados poderiam sugerir o início da fase de remodelamento, no grupo glutaraldeído, em 5 semanas, devido à maior expressão da MMP-2, encontrada nos fibroblastos, neste grupo.

De acordo com Jansen et al. (2007) os fibroblastos que rodeiam o enxerto apresentam uma forte expressão de MMP-2, entretanto aqueles que não estão mais em contato com o biomaterial, possuem fraca expressão. Poderia se supor que houve diferença significativa na quantidade de fibroblastos imunomarcados pelo MMP-2, no grupo de 5 semanas do glutaraldeído, quando comparado ao grupo de 10 semanas, porque, com o passar do tempo, não havia mais nenhum resquício do xenoenxerto. Desta maneira, os fibroblastos perderam o estímulo para sintetizar esta metaloproteinase.

Em relação à expressão da MMP-2, entre os grupos glicerina e glutaraldeído, observou-se que houve acentuada imunomarcagem, nas células endoteliais, em 5 semanas de pós-operatório, entretanto, não foram verificadas diferenças significativas na expressão de MMP-2, entre os grupos glicerina e glutaraldeído. Também não foram encontradas diferenças significativas ($p=5\%$), nos demais tipos celulares avaliados com este biomarcador e os diferentes meios de conservação, nos dois períodos estudados.

A invasão e migração de células endoteliais, pela matriz extracelular, durante a angiogênese, são moduladas pelas integrinas, uma família de moléculas de adesão celular. As integrinas facilitam a migração, por meio da interação com moléculas da matriz extracelular. Esse processo é potencializado pela secreção das metaloproteinases e é modulado por inibidores tissulares das MMPs (“tissue inhibitors of metalloproteinases”, TIMPs) (DAMICO, 2007, MAKOS; BODE, 2003). A MMP-2 é responsável por clivar moléculas e, desta forma, ativa receptores, induzindo a migração de células epiteliais (RODRÍGUEZ et al., 2010).

Diante disto, acredita-se que a acentuada expressão de MMP-2, nas células endoteliais, possa estar relacionada à migração destas durante o processo de angiogênese, mais evidente em 5 semanas de pós-operatório, bem como pela secreção de MMP-2, por estas células, atuando no processo de remodelamento tecidual. Além disto, pode-se supor que a secreção de MMP-2, pelo endotélio, auxilie na neovascularização e na deposição de matriz extracelular, no processo de reparo tecidual.

Estes dados comprovam que a matriz extracelular é uma complexa malha de moléculas estruturais e de sinalização, que fornece suporte dinâmico para as células e tecidos, bem como abriga e incorpora informações que modulam o comportamento celular, conforme citado por Nagage e Woessner (1999).

No presente estudo, o grupo glicerina, com 5 semanas, obteve um aumento tanto de VEGF quanto de MMP2. Segundo Kvanta et al. (2000), MMP-2, MMP-9 e VEGF, estão todos envolvidos no processo de neovascularização e, neste momento, a MMP-2 se mantém aumentada simultaneamente ao VEGF. Confirmando este fato, no presente estudo, em todo o grupo em que o VEGF foi fortemente expressado, também se pode notar forte presença da MMP-2. Isto poderia ter relação, conforme Storkebaum e Carmeliet (2004), com a capacidade que o VEGF possui de aumentar a expressão celular de metaloproteinases, degradando a matriz extracelular e

facilitando a penetração dos novos vasos no tecido, ao mesmo tempo em que diminui a expressão endotelial dos inibidores de metaloproteinases. Ainda, segundo os autores, o VEGF possui efeito pró-inflamatório. De acordo com Damico (2007) e Sakurai et al. (2003), este efeito pró-inflamatório é um importante fator na estabilização e remodelação vascular.

Segundo Storkebaum e Carmeliet (2004), os achados de expressão marcante de VEGF e MMP-2, do grupo glicerina, em 5 semanas, podem estar relacionados à ocorrência de uma fase inflamatória e de angiogênese tecidual. Corroborando com estes achados, Junge et al. (2012) relataram que as MMPs desencadeiam a liberação das citocinas da matriz extracelular, estando estas, então, envolvidas na quimiotaxia das células inflamatórias. Níveis fisiológicos de MMPs são essenciais para uma regeneração adequada da ferida, porém, quando expressados excessivamente, podem desencadear uma reação tipo corpo estranho, pela ativação de macrófagos. Por isto, no futuro, a modulação da expressão do MMP-2 pode representar uma nova abordagem para a reorganização de interações célula-célula, com o objetivo de aperfeiçoar a incorporação do enxerto ao tecido anfitrião.

O grupo de 10 semanas pós-operatórias, da glicerina, apresentou uma diminuição de VEGF, entretanto a MMP-2 se manteve elevada. Esta diminuição do VEGF apontaria para uma diminuição da angiogênese, o que poderia ter relação com o fim da etapa inflamatória. A MMP-2 é classificada como uma gelatinase e possui uma importante função no processo de degradação e remodelagem da matriz extracelular, em vários estados fisiológicos, como na cicatrização de feridas (HASHIZUME, 2007). Provavelmente, a MMP-2 se manteve elevada, neste estudo, com o objetivo de dar prosseguimento ao remodelamento do tecido, com a reorganização das fibras colágenas, o que não poderia ocorrer sem a presença do MMP-2. Ainda, conforme Hashizume (2007), esta metaloproteinase é capaz de finalizar a degradação do colágeno I e a presença deste tipo de colágeno, mais denso, indica a presença de um tecido mais maduro, em etapa de remodelamento.

No estudo em questão, a MMP-2 se manteve elevada, tanto no período inflamatório, como após este período, porque, conforme Luttkhuizen et al. (2006), as metaloproteinases são capazes de estimular a inflamação, assim como inibi-las. Na explicação para tal fenômeno, ainda segundo os autores, inicialmente as MMPs ativam mediadores pró-inflamatórios, com o transcorrer do processo de degradação

da matriz extracelular e estas adquirem, em seguida, a capacidade de estimular outros mediadores, os anti-inflamatórios. Com isto, as fases da regeneração tecidual se adiantam, dando origem a um tecido mais maduro, de forma mais rápida.

No grupo de glutaraldeído, em 5 semanas, pode-se notar as mesmas alterações que, no grupo de 10 semanas da glicerina, ou seja, a expressão de VEGF estava baixa e da MMP-2 elevada. Isto pode significar que, como no grupo citado, a resposta inflamatória havia finalizado e o processo de remodelamento estaria ocorrendo. Estes dados indicam a precocidade para o remodelamento tecidual do grupo glutaraldeído em relação à glicerina.

As metaloproteinases, conforme descrito por Rodríguez et al. (2010), são capazes de regular a proliferação e a migração celular, programar a morte, a angiogênese, a inflamação, a resposta imunogênica e vários outros processos, interferindo, diretamente, na homeostase dos tecidos. Provavelmente, o MMP-2, neste estudo, só reduziu sua expressão a partir do momento em que o tecido conseguiu alcançar uma maturidade, onde sua homeostase foi predominante, evento que ocorreu, primariamente, no grupo glutaraldeído.

Em 10 semanas pós-operatórias, o grupo do glutaraldeído apresentava pouca expressão de VEGF e de MMP-2, podendo-se supor, por isso, que o remodelamento tecidual estaria em fase final e que os inibidores de metaloproteinases estariam com a sua expressão aumentada, pois podem ser inativadas pelas TIMPs (AMĂLINEI et al., 2007). Entretanto, estes inibidores não foram avaliados, no presente estudo. Corroborando com esta hipótese, Kerkvliet et al. (1999) afirmaram que o MMP-2 é uma metaloproteinase, com papel crucial, na degradação de fibras colágenas delgadas, presentes em um tecido imaturo. Isto foi comprovado, no estudo destes autores, quando observaram que, com o tempo, o nível de MMP-2 aumentava e esse evento tinha uma correlação direta com a maior quantidade de colágeno degradado no tecido conjuntivo imaturo. Pode-se supor com isto, que, em 10 semanas, o MMP-2 apresentava níveis mais baixos por ter predominantemente tecido maduro.

Os MMPs têm sido considerados como os principais facilitadores da migração celular, pela quebra de barreiras da matriz extracelular. No entanto, mesmo quando esta função de degradar o tecido conjuntivo está presente, ela assume uma importância secundária, frente a processos mais complexos, tais como a clivagem de um receptor ou a exposição de receptores específicos, que induzem a

motilidade e invasão celular. (RODRÍGUEZ et al., 2010). No presente estudo, o MMP-2 se manteve em alto nível, em ambos os grupos glicerina, entretanto, no grupo glutaraldeído, este nível só esteve alto até 5 semanas pós-operatórias. O grupo glicerina também foi o que demorou mais a ter o biomaterial incorporado e este fato poderia ter relação com a manutenção do MMP-2, fortemente expressado, neste grupo. A ação desta metaloproteinase, ainda se fazia necessária, pois as células do tecido anfitrião ainda não haviam dominado, totalmente, toda a região do enxerto.

A Figura 10 ilustra os achados imunoistoquímicos das bexigas, após a cirurgia.

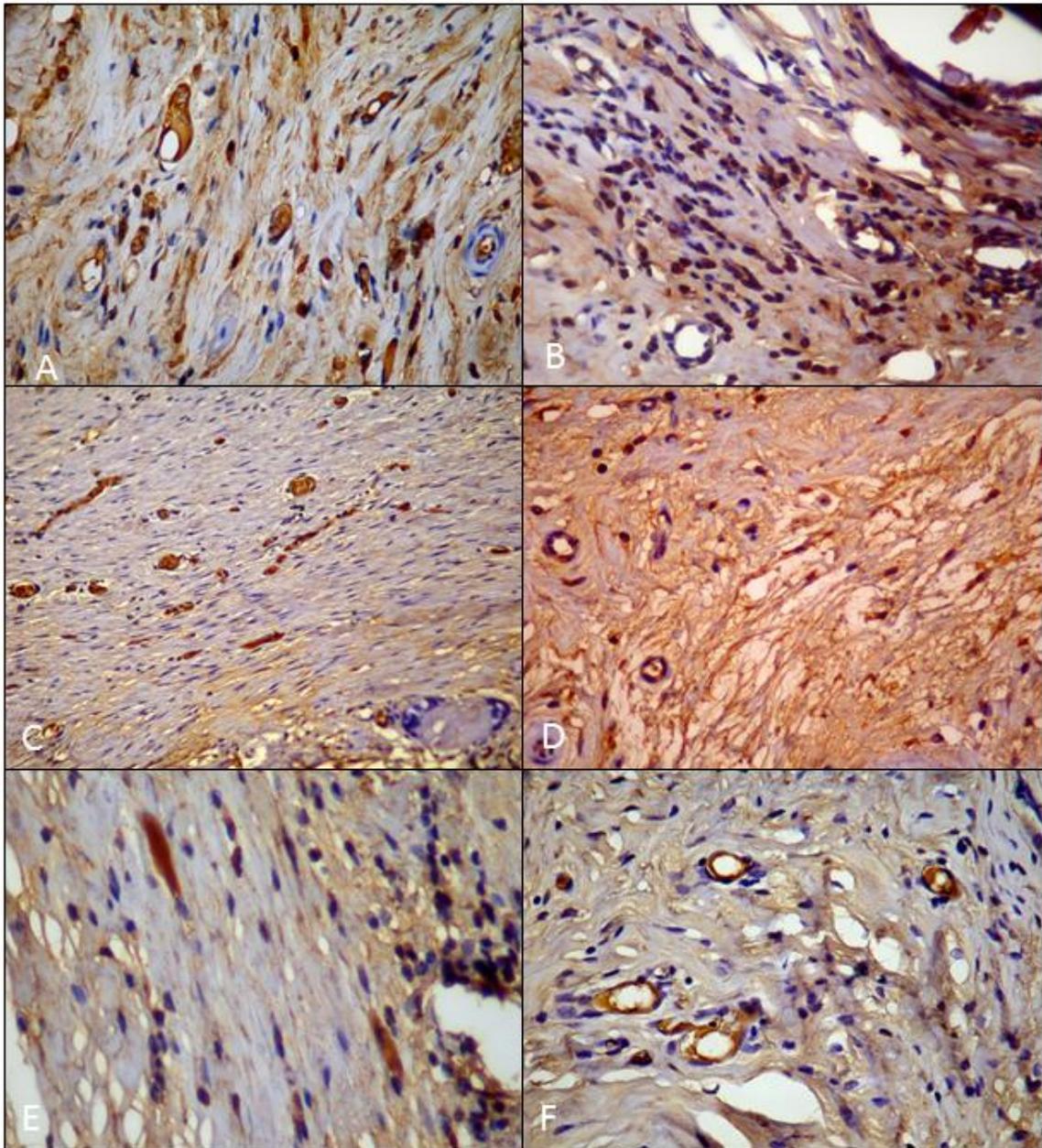


Figura 10. Fotomicrografia de bexiga de coelho, nos pós-operatórios das cistoplastias. Coloração imunohistoquímica para VEGF e MMP-2. A) Grupo glicerina 5 semanas. Notar células endoteliais expressando VEGF. B) Grupo glutaraldeído 5 semanas. Expressiva imunomarcção de de VEGF em macrófagos. C) Grupo glicerina 5 semanas. Macrófagos e células endoteliais imunomarcados com VEGF. D) Grupo glutaraldeído 5 semanas. Macrófagos, células enditeliais e fibroblastos imunomarcados com MMP-2. E) Glicerina 5 semanas. Fibroblastos fortemente marcados com MMP-2. F) Glicerina 10 semanas. Marcação de endotélio com MMP-2. Objetiva de 40x.

5 CONCLUSÃO

- A arquitetura tecidual da túnica albugínea bovina foi mantida em ambos os meios;
- A túnica albugínea, quando utilizada como xenoinxerto, serve de alicerce e estímulo para o desenvolvimento dos tecidos vesicais;
- Ambos os meios conservantes estudados possuem as características adequadas, para utilização em cirurgias reconstrutivas;
- A glicerina mantém a integridade tecidual de forma mais eficiente que o glutaraldeído;
- O glutaraldeído a 0,625% demonstrou ser mais eficaz, para a utilização, como biomaterial, em cistoplastias de coelhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, 1992, p.113-115.

AMÂLINEI, C.; CÂRUNTU, I.; BÂLAN, R.A. Biology of metalloproteinases, **Romanian Journal of Morphological and Embryology**, v. 48, n. 4, p. 323-334, 2007.

AMENDOLA, G.F.; RAISER, A.G.; SOARES, J.M.D.; BECKMANN, D.V. Aspectos biomecânicos compressivos de diáfises femurais caninas conservadas em glicerina a 98% ou mel. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1341-1345, 2008.

ANDRADE, F.A.G.; CAVALCANTI, C.E.O.; MOTA, R.P.; FERREIRA, L.M. Hemicelulose em reconstrução da parede abdominal em ratos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**., v.26, n.1, p. 104-115, 2011.

ANTONOPOULOS, I.M.; PIOVESAN, A.C.; FALCI, R.; KANASHIRO, H.; SAITO, F.J.; NAHAS, W.C. Contribuições à técnica cirúrgica em transplante renal – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Revista de Medicina**, v. 88, n. 3, p. 163-167, 2009.

ASHLEY, R.A.; ROTH, C.C.; PALMER, B.W.; KIBAR, Y.; ROUTH, J.C.; FUNG, K.; FRIMBERGER, D.; LIN, H.; KROPP, B. Regional variations in small intestinal submucosa evoke differences in inflammation with subsequent impact on tissue regeneration in the rat bladder augmentation model. **BJU International**, v. 105, p. 1462-1468, 2009.

AYYILDIZ, A; AKGÜL, K.T.; HURI, E.; NUHOGLU, B.; KILIÇOĞLU, B.; ÜSTÜN, H.; GÜRDAL, M.; GERMIYANOĞLU, C. Use of porcine small intestinal submucosa in bladder augmentation in rabbit: Long-term histological outcome. **ANZ Journal of Surgery**, v. 78, n. 1, p. 82-86, 2008.

BARDELA, G. T; COSTA, I. L. O; SANTOS, C. E. M; CREMONINI, D. N; Ruptura de bexiga ocasionada por urolitíase: Relato de Caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IV, n.8, 2007.

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.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G.; BODDEN, M.K.; WINDSOR, L.J. Matrix meteloproteinases: a review. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology Med** 4:197-250, 1993.

BOCHSLER, P.N.; SLAUSON, D.O. Inflammation and repairs of tissue. In: SLAUSON, D.O.; COOPER, B.J. (Eds). **Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology**. 3. ed. Philadelphia: Mosby Inc., 2002, 445-447p.

BOLSON, J.; SCHOSSLER, J.E.W.; MACHADO, G., ZEMBRZUSKI, F. B. Pino ósseo hómologo conservado em glicerina a 98% e hemicerclagem com fio poliglactina 910 na osteossíntese umeral de pombos domésticos. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1925-1931, 2008.

BORGES, R.P.; RAMOS, M.S.; MARCELO, F. Ampliações vesicais. **Acta Urológica**. v. 24, n. 3, p. 87-93, 2007.

BROCK, G.; HSU, G.; NUNES, L. VON HEYDEN, B.; LUE, T. The anatomy of tunica albuginea in the normal penis and peyronie's disease. **The Journal of Urology**, v. 157, p. 276-281, 1997.

BROWN, L.F.; YEO, K.; BERSE, B.; YEO, T.; SENGER, D.R.; DVORAK, H.F.; VAN DE WATER, L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 1, p. 1375-1379, 1992.

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.

BURGU, B.; GÖKCE, M.İ.; AYDOĞDU, Ö; SÜER, E.; KANKAYA, D.; SOYGÜR, T. Combining gastric and ileal segments, does it overcome segment-related complications? An experimental study in rats. **Urological Research**, v. 39, n.1, p. 39-44, 2011.

CASTELLAN, M.; GOSALBEZ, R.; BAR-YOSEF, Y.; LABBIE, A. Complications after use of gastric segments for lower urinary tract reconstruction. **The Journal of Urology**, v. 187, p. 1823-1827, 2012.

CONNOLLY, J. M.; ALFERIEV, I.; KRONSTEINER, A.; LU, Z.; LEVY, R. Ethanol inhibition of porcine bioprosthetic heart valve cusp calcification is enhanced by reduction with sodium borohydride. **The Journal of Heart Valve Disease**, v. 13, n. 3, p. 487-493, 2004.

COSTA, C.B. **Anatomohistopatologia de implantes de pericárdio bovino conservado em diferentes concentrações de glutaraldeído em parede abdominal de camundongos**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado (Medicina Veterinária), 87 p., 2009.

CRAATZ, S. et al. The dorsal lamina of rectus sheath: a suitable grafting material for the penile tunica albuginea in Peyronie's disease? **Brazilian Journal of Urology**, v. 97, p. 134-137, 2006.

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

CUNHA, A.S.; COSTA, M.P.; SILVA, C.F. Peroneal nerve reconstruction by using glycerol-preserved veins. Histological and functional assessment in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 94-101, 2013.

CURRY, T; OSTEEEN, K. The matrix metalloproteinases system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. **Endocrine reviews**, v. 24, n.4, p. 428-65, 2003.

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.

DAMICO, F.M. Angiogênese e doenças da retina. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 70, n. 3, p. 547-553, 2007.

DAPENA, L.; DAPENA, I.; REGADERA, J.; GASPAR, M.J.; PARAMATO, P.G. Histerocystoplasty: A novel surgical procedure in the rat. **Journal of Surgical Research**, v. 175, n. 1, p. 157-162, 2012.

DELACROIX, S.E. E WINTERS, J.C. Bladder reconstruction and diversion during colorectal surgery. **Clinical in Colon and Rectal Surgery**, v.23, n.23, p. 113-118, 2010.

DOMINGOS, A.L.A.; GARCIA, S.B.; BESSA JR, J.; CASSINI, M.F.; MOLINA, C.A.F.; TUCCI JUNIOR, S. Expression of VEGF and collagen using a látex biomembrane as bladder replacement in rabbits. **International Braz J Urol**, n. 38, v.4, p. 536-543, 2012.

DORNBUCH, P.T.; HUSSINI, C.A.; YOSHIDA, W.B.; SEQUEIRA, J.L.; VULCANO, L.C.; CILO, G.P. Implante jugular homólogo fixado em glutaraldeído, nos eqüinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, v. 102, n.561, p. 81-86, 2007.

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

ESCUADERO, R.M.; PATIÑO, G.E.; FERNÁNDEZ, E.R.; CANCHO GIL, M.J.; GARCÍA, E.L.; ALONSO, A.H.; PINIÉS, G.O.; SÁNCHEZ, J.P.; FERNÁNDEZ, C.H. Bladder augmentation using the gastrointestinal tract. Indication, follow up and complications. **General Urology**, v. 64, n. 10, p. 953-959, 2011.

FALBO, M.K.; REIS, A.C.F.; BALARIN, M.R.S.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; ARAÚJO JR, J.P.; OKANO, W.; SANDINI, I.E. Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural em bovinos pela samambaia *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 547-558, 2005.

FILHO, J.G.P.; PENHA, L.H.C.; SOUZA, S.F. Uso do enxerto ósseo cortical bovino conservado em glicerina a 98 % na osteotomia femural em gatos. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.4, p.1071-1078, 2008.

GABRIEL, A.L.; KOMMERS, G.D.; MASUDA, E.K.; FIGHERA, R.A.; PIAZER, J.V.M.; BARROS, C.S.L.; MARTINS, T.B.; ROSA, F.B. Aspectos clinico-hematológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 515-525, 2009.

GALIANO, R.D.; TEPPER, O.M.; PELO, C.R.; BHATT, K.A.; CALLAGHAN, M.; BASTIDAS, N.; BUNTING, S.; STEINMETZ, H.G.; GURTNER, G.C. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 6, p. 1935-1947, 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.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em Cores**. Rio de Janeiro, 2ª: Guanabara Koogan S.A., 2003, 536p.

GIOSSO, 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.

GODOY, P. Sistema Urinário. In: BRASILEIRO-FILHO, G. In: BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 16, p.488-553.

GURGEL, S.; CORTEZ FILHO, J.J. Uso do pericárdio caprino conservado em glicerina no reparo de bexiga de *Felis catus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 22., 2001, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza: Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará, p. 169., 2001.

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.

GROVER, P.K.; RYALL, R.L. Urate and calcium oxalate stones from repute to rethoric to reality. *Miner Electrolyte Metab.*, v. 20, n. 6, p. 361-370, 1994.

GURGEL, S.; CORTEZ FILHO, J. J. Uso do Pericárdio Caprino Conservado em HASHIZUME, K. Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 1, p. 1-11, 2007.

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.

HUANG-LEE, L.H.; CHEUNG, D.T., NIMNI, M.E. Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 24, n. 9, p. 1185-1201, 1990.

HULBOY, D.L.; RUDOLPH, L.A.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p.27-45, 1997.

JANSEN, P.L.; KEVER, M.; ROSCH, R.; KROTT, E.; JANSEN, M.; ALFONSO-JAUME, A.; DOOLEY, S.; KLINGE, U.; DLOVETT, D.H.; MERTENS, P.R. Polymeric meshes induce zonal regulation of matrix metalloproteinase-2 gene expression by macrophages and fibroblasts. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 1, p. 1047-1057, 2007.

JONES, J.A.; CHANG, D.T.; MEYERSON, H.; COLTON, E.; KWON, I.K.; MATSUDA, T.; ANDERSON, J.M. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, p. 585-596, 2007.

JORGE-HERRERO, E.; FONSECA, C.; BARGE, A.P.; TURNAY, J.; OLMO, N.; FERNÁNDEZ, P.; LIZARBE, M.A.; PÁEZ, J.M.G. Biocompatibility na calcification of bovine pericardium employed for the construction of cardiac crosslink methods. **Artificial Organs**, v. 34, n. 5, p. 168-176, 2010.

JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro, 10^a: Guanabara Koogan, 2004, 433p.

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

KIM, K.; KIM, S.; KIM, Y. Detoxification of glutaraldehyde treated porcine pericardium using L-arginine & NABH₄. **The Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 44, p. 99-107, 2011.

KISPAL, Z.F.; VAJDA, P.; KERESKAI, L.; JAKAB, C.S.; VASTYAN, A.M.; JUHASZ, Z.; PINTER, A.B. Composite urinary reservoir in dogs: Histological findings. **The Journal of Urology**, v. 187, n. 1, p. 1110-1115, 2012.

KIWULL-SCHÖNE, H. et al. Food mineral composition and acid-base balance in rabbits. **European Journal of Nutrition**, Steinkopff, v.44, n.8, p.499-508, 2005.

KOCH, H.; GRANEIST, C.; EMMRICH, F.; TILL, H.; METZGER, R.; AUPPERLE, H.; SCHIERLE, K.; SACK, U.; BOLDT, A. Xenogenic esophagus scaffolds fixed with several agents: comparative *in vivo* study of rejection and inflammation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

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

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.

KUMAR, I.; STATON, C.A.; CROSS, S.S.; REED, M.W.R.; BROWN, N.J. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and its receptors in human surgical wounds. **British Journal of Surgery**, v. 96, n.1, p. 1484-1491, 2009.

KVANTA, A.; SARMAN, S.; FAGERHOLM, P.; SEREGARD, S.; STEEN, B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. **Experimental Eye Research**, v. 70, n. 1, p. 419-428, 2000.

KWON, T.G.; YOO, J.J.; ATALA, A. Local and systemic effects of a tissue engineered neobladder in a canine cytoplasty model. **The Journal of Urology**, v. 179, n. 1, p. 2035-2041, 2008.

LEE, W.K.; PARK, K.D.; KIM, Y.H.; SUH, H.; PARK, H.S.; LEE, J.E.; SUN, K.; BAEK, M.J.; KIM, H.; KIM, S. H. Improved calcification resistance and biocompatibility of tissue patch grafted with sulfonated PEO or heparina after glutaraldehyde fixation. **Journal of Biomedical Materials Research (Appl. Biomater.)**, v. 58, p. 27-35, 2001.

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.

LUYN, M.J.A.; VAN WACHEM, L.H.H.; DAMIK, O.; DIJKSTRA, P.J.; FEIJEN, J.; NIEUWENHUIS, P. Secondary cytotoxicity of cross-linked dermal sheep colagens during repeated exposure to human fibroblastos. **Biomaterials**, v. 13, n. 4, p. 1017-1024, 1992.

MACHADO, C.; CHIN, E.W.K.; IOSHII, S.O.; FILHO, R.T.; BATHEN, A.V. Influence of nicotine on healing of vesical sutures in rabbits. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.22, n.6, p. 479-484, 2007.

MAIA, J.M.A.; CZECKO, N.G.; FILHO, J.M.R.F.; DIETZ, U.A.; DUCK, D.; RIBAS, C.A.M.; SANTOS, E.A.; BAPTISTELLA, E.; WALLBACH, T.Z.; VALE, J.R.; YAGUSHITA, N. Estudo da cicatrização de suturas na bexiga urinária de ratos com e sem a utilização de extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. intraperitonal. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, Suplemento 2, p. 23-30, 2006.

MASKOS, K.; BODE, W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. **Molecular Biotechnology**, v. 25, n.1, p. 241-266, 2003.

MAUNEY, J.R.; CANNON, G.M.; LOVETT, M.L.; GONG, E.M.; DI VIZIO, D.; GOMEZ III, P.; KAPLAN, D.L.; ADAM, R.M.; ESTRADA JR, C. Evaluation of gel spun silk-based biomaterials in a murine model of bladder augmentation. **Biomaterials**, v. 32, n. 1, p. 808-818, 2011.

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.

MORRIS, M.C.; BAQUERO, A.; REDOVAN, E.; MAHONEY, E.; BANNETT, A.D. Urolithiasis on absorbable and non-absorbable suture materials in the rabbit bladder. **Journal of Urology**, Baltimore, v. 135, p. 602-603, 1986.

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 . Análise Morfológica Utilizando-se Diferentes Métodos de Preservação sobre a Camada Muscular do Intestino Delgado de Cães. **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.

NAGASE, H.; WOESSNER JR., F. Matrix metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 31, p. 2191-21494, 1999.

NUININGA, J.E.; MOERKERK, H.; HANSEN, 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, 2004.

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

OLIVEIRA, L.L. **Reconstituição vesical em cães (*Canis familiares*): xenoenxerto com túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98%**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, 59p, 2008.

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.

OLIVEIRA, L.L.; SOUZA, D.B.; ABÍLIO, E.J.; CARVALHO, E.C. Métodos de preservação de membranas biológicas para uso cirúrgico. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.2, n.3, p. 175-188, 2009.

OLIVEIRA, TC; SCAVONE, A.R.F.; MACHADO, M.R.F.; MAZZUCATTO, B.C. Cistoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com peritônio bovino conservado em glicerol. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p. 2218-2224, 2008.

OMAYA, A.H. E NASSAR, M.D. Modified Le Bag Pouch after radical cystectomy: continence, urodynamic results and morbidity. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v.22, n.1, p. 29-39, 2010.

PATWARDHAN, S.K. et al. Simultaneous bladder and vaginal reconstruction using ileum in complicated vesicovaginal fistula. **Indian Journal of Urology**, v.24, n. 3, p. 348-351, 2008.

PAULO, N.M.; LIMA, F.G.; SIQUEIRA JR., J.T.; FLEURY, L.F.F.; SANT'ANA, F.J.F.; BORGES, A.C.; TELLES, T.C. M. Membrana de latex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), com e sem polilisina a 0,1% e tela de marlex na reconstrução de defeitos iatrogênicos da parede abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 305-310, 2005.

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, 1998.

PIGOSSI, N.; RAIÁ, 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 Homóloga Conservada em Glicerina à Temperatura Ambiente. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v.17, n.8, p.263-278, 1971.

POULGUJ, M. et al. Angioarchitecture of the bovine tunica albuginea vascular complex – A correlative and histological study. **Research in Veterinary Science**, doi:10.1016/j.rvsc.2010.12.002, 2010.

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, 2006.

PROBST, M. et al. Homologous Bladder Augmentation in Dog with the Bladder Acellular Matrix Graft. **Brazilian Journal of Urology**, v.85, p.362-371, 2000.

RABELO, R. E. et al. 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.

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.

RINGLER, D.J. Inflamação e Reparo In: JONES, T. C.; HUNT, D.R.; KING, N.W. Patologia Veterinária. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. Cap. 5. p.119-165.

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. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.55-60, 2000.

RODGERS, W.H.; MATRISIAN, L.M.; GIUDICE, L.C. Patterns of matrix metalloproteinases expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. **American Society Clinical Investigation**, v. 94, p. 946-53, 1994.

RODRÍGUEZ, D.; MORRISON, C.J.; OVERALL, C.M. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, n. 1, p. 39-54, 2010.

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

SAKURAI, E.; ANAND, A.; AMBATI, B.K.; VAN ROOIJEN, N.; AMBATI, J. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 8, p. 357-358, 2003.

SAKURAI, E.; ANAND, A.; AMBATI, B.K.; VAN ROOIJEN, N.; AMBATI, J. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 8, p. 3578-3585, 2003.

SETH, A.; CHUNG, Y.G.; GIL, E.S.; TU, D.; FRANCK, D.; VIZIO, D.; ADAM, R.M.; KAPLAN, D.L.; ESTRADA JR, C.R.; MAUNEY, J.R. The performance of silk scaffolds in a rat model of augmentation cystoplasty. **Biomaterials**, v. 34, p. 4758-4765, 2013.

SHARIFIAGHDAS, F.; MOGHADASALI, R.; BAHARVAND, H.; HOSSEINI-MOGHADDAM, S.M.; MAHMOUDNEJAD, N. Special characteristics of culturing mature human bladder smooth muscle cells on human amniotic membrane as a suitable matrix. **Urology Journal**, v. 6, n. 4, p. 283-288, 2009.

SICKLER, D.C.; DELLMANN, H.D. E BROWN, E. Connective and supportive tissues. *In: DELLMANN, H.D. Text book veterinary histology*, 4^a. Philadelphia: Lea & Febiger, p.29-32, 1993.

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.

SILVA, L.A.F.; FRANCO, L.G.; MENEZES, L.B.; MOURA, V.M.B.D.; BERNARDES, K.M.; SOUZA, M.A. Hernioplastia experimental em coelhos por meio de cartilagem auricular bovina conservada em glutaraldeído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.3, p. 606-612, 2009.

SILVA, M.A.; SOUZA, D.R.; MADUREIRA, A.P.; NUNES, L.C. Caracterização histopatológica de bexigas associadas à hematúria enzoótica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 4, p. 319-326, 2012.

SINHA, P.; ZURAKOWSKI, D.; KUMAR, T.K.S.; HE, D.;ROSSI, C.; JONAS, R. Effects of glutaraldehyde concentration, pretreatment time, and type of tissue (porcine versus bovine) on postimplantation calcification. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 143, n. 1, p. 224-227, 2012.

SLAUSON, D.O. Disturbances of blood flow and circulation. *In: Slauson, D.O.; Cooper, B.J. (eds) Mechanisms of disease*. 3 ed., Local Editora, p.125-126, 2002.

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

STAUT, J.L.; ASSEF, M.L.M.; CIRIO, S.M. Estudo histoquímico da matrix extracelular de neoplasias testiculares em cães (*Canis familiares* Linnaeus, 1758). **Estudos de Biologia**, v. 29 n. 68/69, p. 243-247.

STEEN, P.E.V.D.; DUBOIS B.; NELISSEN, I.; RUDD, P.M.; DWEK, R.A.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase b or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, n.6, p. 375-536, 2002.

STORKEBAUM, E.; CARMELIET, P. VEGF: A critical player in neurodegeneration. **Journal Clinical Investigation**, v. 113, n.1, p. 14-18, 2004.

SU, S.; HUANG, H.; CHANG, S. Encrusted bladder stone on non-absorbable sutures after a cesarean section: a case report. **Journal of Taiwan Urological Association**, v. 20, p. 143-145, 2009.

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.

TORRES NETO, J.R.; FAKHOURI, R.; MENEZES, M.V.A.; SANTOS, J.S.; PRUDENTE, A.C.L.; MONTEIRO, J.T.S.; FEITOSA, V.L.C. Estudo histomorfométrico de anastomoses primárias de cólon em coelhos, com e sem preparo intestinal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, n. 4, p. 384-390, 2007.

TSUBOI, R.; SATO, Y.; RIFIKIN, D.B. Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. **The Journal of cell biology**, v. 110, p. 511-7, 1990.

TU, D.D.; SETH, A.; GIL, E.S.; KAPLAN, D.L.; MAUNEY, J.R.; ESTRADA Jr. Evaluation of biomaterials for bladder augmentation using cystometric analyses in various rodent models. **Journal of Visualized Experiments**, v. 66, n. e3981 p. 1-12. 2012.

UCHÔA, G.S.; RODRIGUES, D.F.; ABREU, S.C.; BORGES, N.C.; VIEIRA, D.; GAMA FILHO, J.B.; PAULO, N.M. Sutures using polyglatin 910 and titanium Staples: urinary and urolithogenic aspects in experimental ileocystoplasties in dogs. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 4, p.733-741, 2011.

VASCONCELOS, 2006 VASCONCELOS, A. C. Processo inflamatório relacionado com a presença de biomateriais. In: ORÉFICE, R. L. et al. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: **Cultura Médica**, 2006. p. 267-281.

VERSEN-HOEYNCK, F.V.; STEINFELD, A.P.; BECKER, J.; HERMEL, M.; RATH, W.; HESSELBARTH, U. Sterilization and preservation influence the biophysical properties of human amnion grafts. **Biologicals**, v.36, n.4, p.248-255, 2008.

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 the Allogeneous Tunica Vaginalis Conserved in 98% Glycerine for Keratoplasty in Dogs. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.9, n.3, p.182-187, 2002.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 1, p. 827-839, 2003.

VULCANI, V.A.S.; MACORIS, D.G.; PLEPIS, A.M.G. Biomateriais para reparação cirúrgica da parede abdominal em animais domésticos revisão. **Arquivo de Ciências Veterinária e Zoologia**, v. 12, n. 2, p. 141-147, 2009.

VULCANI, V.A.S.; MASCORIS, D.G.; PLEPIS, A.M.G.; MARTINS, V.C.A.; LAPENA, M.H. Obtenção, caracterização e aplicação cirúrgica de matrizes de colágeno na parede abdominal de equínos. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p. 778-785, 2008.

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. **Brazilian Journal of Urology International**, v.90, p.326-331, 2002.

WEN-BIAO, L.; SONG, C. LI, Y.; YANG, S.; MENG, L.; LI, X. Tissue-engineered conduit using bladder acellular matrix and bladder epithelial cells for urinary diversion in rabbits. **Chinese Medical Journal**, v. 126, n. 2, p. 335-339, 2013.

WONGSETTHACHAI, P. et al. Urinary bladder wall substitution using autologous tunica vaginalis in male dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 156-159, 2011.

XIE, J.; BIAN, H.; QI, S.; XU, Y.; TANG, J.; LI, T.; LIU, X. Effects of basic fibroblast growth factor on expression of extracellular matrix and matrix metalloproteinase-1 in wound healing. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 176-182, 2008.

YAMATAKA, A.; WANG, K.; OKADA, Y.; KOBAYASHI, H.; LANE, G. J.; YANAI, T.; MIYANO, T. Living-related partial bladder transplantation for bladder augmentation in rats: an experimental study. **Journal of Pediatric Surgery**, Philadelphia, v. 38, n. 6, p. 913-915, 2003.

YANG, S. et al. Experimental bladder defect in rabbit repaired with homologous bladder extracellular matrix graft. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v.118, n.11, p. 957-960, 2005.

YOUSSEF, M.; SHIINA, H.; URAKAMI, S.; GLEASON, C.; NUNES, L.; IGAWA, M.; ENOKIDA, H.; TANAGHIO, E.A.; DAHIYA, R. Effect of vascular endothelial growth factor on regeneration of bladder acellular matrix graft: Histologic and functional evaluation. **Urology**, v. 66, n. 1, p. 201-207, 2005.

ZAWANEH, P.N.; PUTNAM, D. Material in surgery: A review of biomaterials in postsurgical tissue adhesion and seroma prevention. **Tissue Engineering Part B.**, v. 14, n. 4, p. 377-391, 2008.

ZHOU, L.; YANG, B.; SUN, C.; QIU, X.; SUN, Z.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.; DAI, Y. Coadministration of platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor with bladder acellular matrix enhances smooth muscle regeneration and vascularization for bladder augmentation in a rabbit model. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 1, p. 264-276, 2013.

ZHU, W.-D.; XU, Y.-M.; FENG, C.; FU, Q.; SONG, L.-J. Different bladder defects reconstructed with bladder acellular matrix grafts in a rabbit model. **Urology**, v.50, n.1, p. 1420-1425, 2011.

ANEXO

A- TÉCNICAS DE COLORAÇÃO HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS

A1- Coloração hematoxilina/eosina

Após o processo de aquecimento em estufa, as lâminas passaram pela desparafinização em solução de xilol, em ordem crescente de pureza, durante 10 minutos e cinco minutos, respectivamente. Em seguida, foi realizada hidratação em álcool absoluto, em duas passagens, de três minutos, cada. Após este processo, as lâminas foram acondicionadas, em um recipiente de vidro e lavadas em água corrente, por cinco minutos, seguidas da passagem em água destilada por 30 segundos.

A bateria de coloração deu continuidade, com o acondicionamento das lâminas, em uma cuba, contendo hematoxilina de Harris, por um período de sete minutos e, em seguida, foram lavadas em passagem de água corrente, por 10 minutos, seguidos de passagem em álcool. Em estágio seguinte, as lâminas foram submersas, no corante eosina, por um minuto, seguido de três passagens de três minutos cada, em álcool para desidratação, posteriormente seguiram para o xilol por três minutos para desidratação e, por fim, a montagem das lâminas.

A2- Tricrômico de Masson

Após o processo de desparafinização, hidratação e passagem em água destilada, as lâminas foram acomodadas, em uma cuba de vidro, contendo a solução de Bouin, onde permaneceram, por uma hora, em estufa a 60°C. Após este período, as lâminas foram retiradas da solução e colocadas sobre uma bandeja de metal e, com uma pipeta, a solução de Weigth foi estalada, sobre os cortes, onde permaneceu, por cinco minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas, em água corrente, por cinco minutos e em água destilada, por 30 segundos.

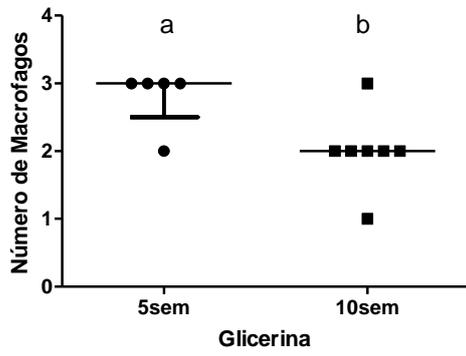
Em seguida, foi preparado o corante fuccina e ponceau na proporção de 1/1 e este permaneceu, por 10 minutos, sobre os cortes. Posteriormente, as lâminas seguiram para a lavagem, em água corrente, por um minuto. Estas foram, então, submersas, na solução de ácido fosfomolibdico a 1%, por cinco minutos, seguidas de lavagem, em água corrente e água destilada. Adicionou-se azul de alinina, por sete minutos, seguidos de lavagem, em água corrente, para retirar o excesso.

As lâminas foram submersas, em ácido acético 1%, por um minuto, seguido dos processos de desidratação e montagem.

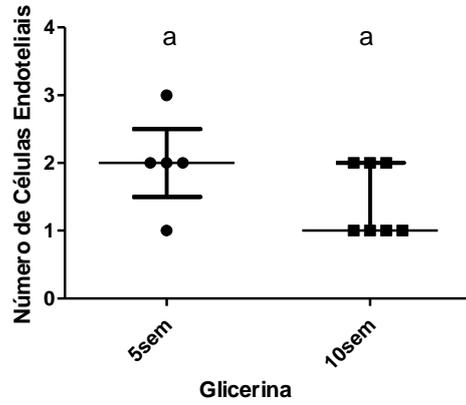
A3- Picrosirius Red

Após o protocolo padrão de desparafinização, hidratação e passagem, em água destilada, as lâminas permaneceram submersas, em ácido fosfomolibdico a 0,2%, por dois minutos; logo em seguida, foram lavadas, em água destilada, por 30 segundos e acomodadas em uma recipiente, contendo o corante picrosirius red, onde permaneceram, por 110 minutos. Após este processo, as lâminas seguiram para o ácido clorídrico 0,01%, por um minuto, passaram por uma solução de álcool 70% por 45 minutos e, por fim, sofreram o processo de desidratação e montagem.

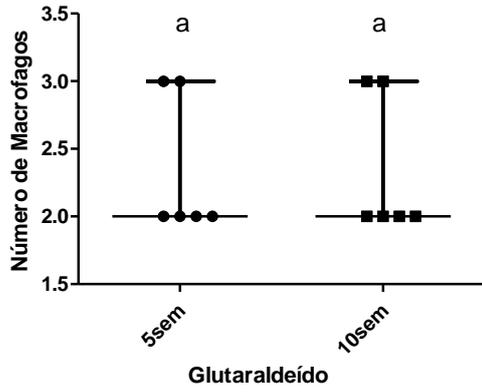
B- ANÁLISE ESTATÍSTICA: VEGF



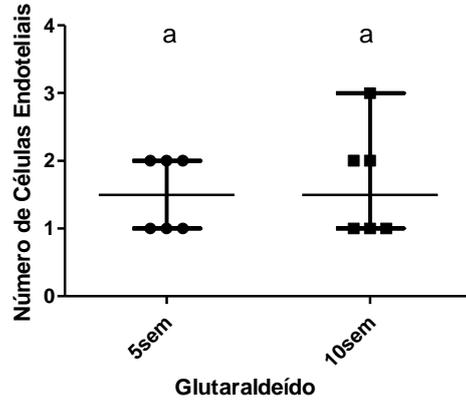
Mann Whitney test	
P value	0.0377



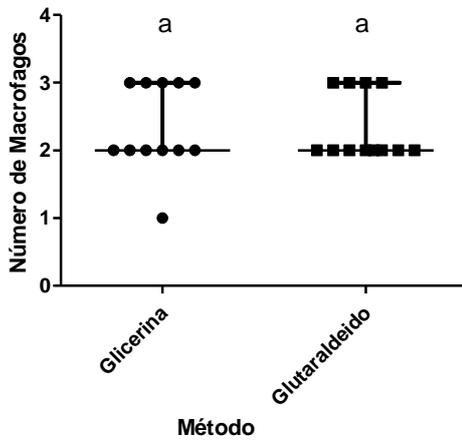
Mann Whitney test	
P value	0.1753



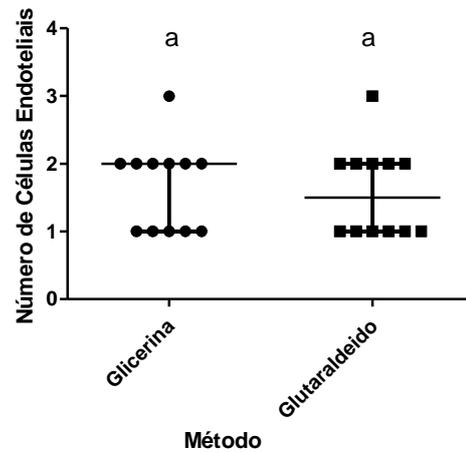
Mann Whitney test	
P value	0.9222



Mann Whitney test	
P value	0.8586

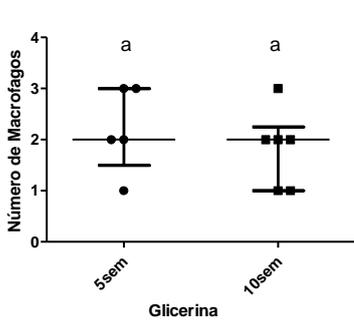


Mann Whitney test	
P value	0.9203

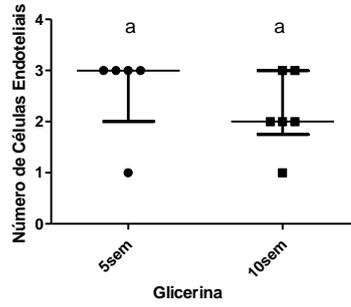


Mann Whitney test	
P value	0.7481

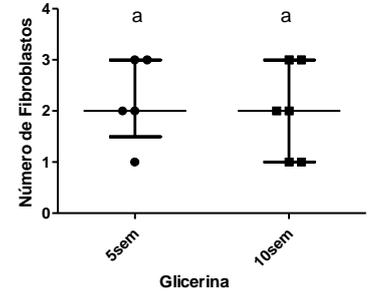
C- ANÁLISE ESTATÍSTICA: MMP-2



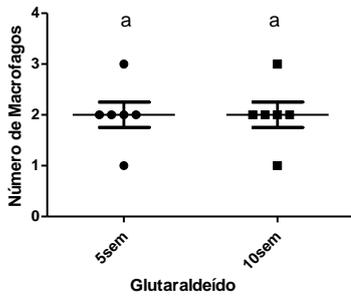
Mann Whitney test	
P value	0.4940



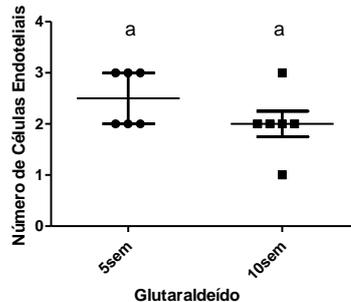
Mann Whitney test	
P value	0.3182



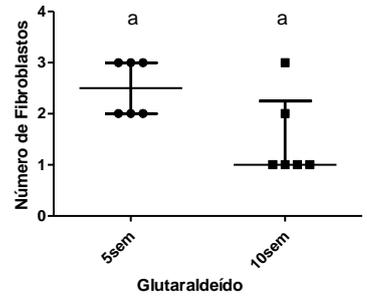
Mann Whitney test	
P value	0.7717



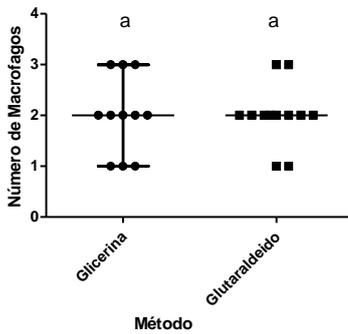
Mann Whitney test	
P value	0.9237



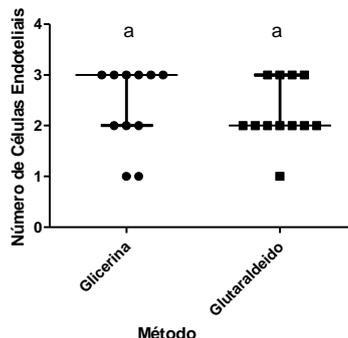
Mann Whitney test	
P value	0.2012



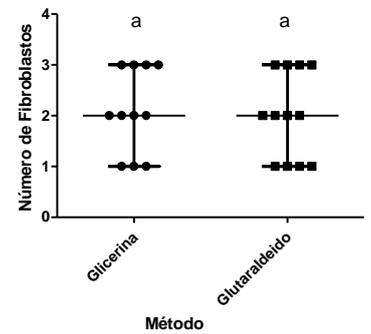
Mann Whitney test	
P value	0.0562



Mann Whitney test	
P value	0.9726

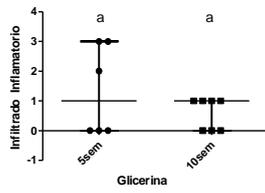


Mann Whitney test	
P value	0.5900

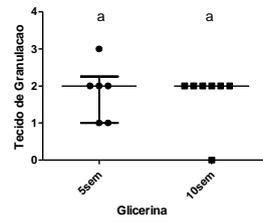


Mann Whitney test	
P value	0.8193

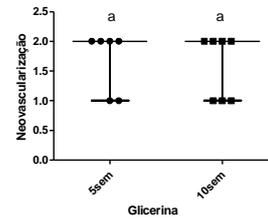
D- ANÁLISE ESTATÍSTICA: HE INTENSIDADE



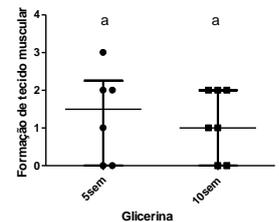
Mann Whitney test	
P value	0.5472



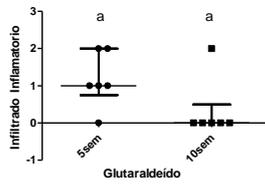
Mann Whitney test	
P value	0.9303



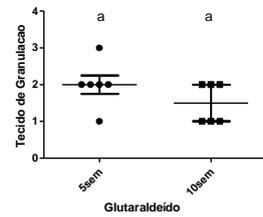
Mann Whitney test	
P value	0.7998



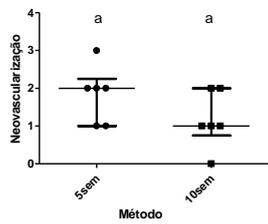
Mann Whitney test	
P value	0.8219



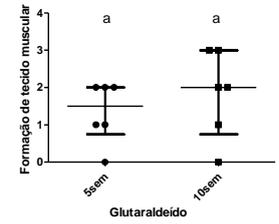
Mann Whitney test	
P value	0.0824



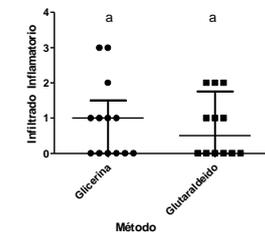
Mann Whitney test	
P value	0.2012



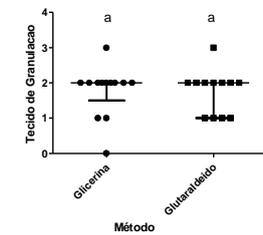
Mann Whitney test	
P value	0.1954



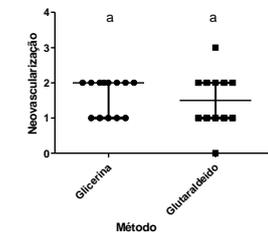
Mann Whitney test	
P value	0.4020



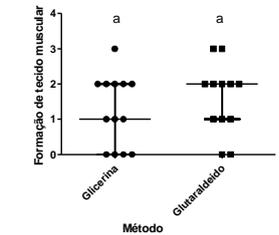
Mann Whitney test	
P value	0.8150



Mann Whitney test	
P value	0.7737



Mann Whitney test	
P value	0.6697



Mann Whitney test	
P value	0.4079