



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

GUILHERME TAVARES DA SILVA MAIA

**UTILIZAÇÃO DA MEMBRANA DE BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇÚCAR
(BPCA) PARA REFORÇO DA ANASTOMOSE URETROVESICAL: um estudo
experimental comparativo em coelhos**

**RECIFE,
2019.**

GUILHERME TAVARES DA SILVA MAIA

**UTILIZAÇÃO DA MEMBRANA DE BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇÚCAR
(BPCA) PARA REFORÇO DA ANASTOMOSE URETROVESICAL: um estudo
experimental comparativo em coelhos**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador:

Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima

Prof^o Titular do Depto. de Cirurgia, CCS-UFPE

Co-orientador:

Prof. Dr. Euclides Dias Martins Filho

Prof^o Adjunto do Depto. de Cirurgia, CCS-UFPE

Co-orientadora:

**Prof^a. Dra. Amanda Vasconcelos de
Albuquerque**

Pesquisadora Colaboradora do Núcleo de Cirurgia
Experimental, CCS-UFPE

**RECIFE,
2019.**

M217u Maia, Guilherme Tavares da Silva.
Utilização da membrana de biopolímero de cana-de-açúcar (BPCA) para reforço da anastomose uretrovesical: um estudo experimental comparativo em coelhos / Guilherme Tavares da Silva Maia. – Recife: o autor, 2019.
56 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Salvador Vilar Correia Lima.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Cirurgia.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Anastomose cirúrgica. 2. Biopolímeros. 3. Prostatectomia. 4. Celulose.
5. Curativo. I. Lima, Salvador Vilar Correia (orientador). II. Título.

617 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 179)

GUILHERME TAVARES DA SILVA MAIA

**UTILIZAÇÃO DA MEMBRANA DE BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇÚCAR
(BPCA) PARA REFORÇO DA ANASTOMOSE URETROVESICAL: um estudo
experimental comparativo em coelhos**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Aprovada em: 17/06/2019

BANCA EXAMINADORA:

Professor Dr. Salvador Vilar Correia Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Professor Dr. Josemberg Marins Campos
Universidade Federal de Pernambuco

Professor Dr. Fábio de Oliveira Vilar
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE,
2019.

Dedico este trabalho aos meus pais Izabel e Manoel por terem feito de um menino tímido e medroso, uma pessoa lutadora e corajosa. À minha esposa e companheira, Carolina, que após tantos momentos difíceis, ainda caminha firme e forte ao meu lado. Aos nossos filhos, Maria Eduarda e João Guilherme, por serem os motivos de todas as nossas conquistas. Aos meus irmãos, Maria Luiza e Manoel Filho, parceiros da vida. Aos meu tio José Aécio e meu avô Luiz por terem sido a minha fonte inspiradora de toda essa jornada. A meu amigo-irmão, Filipe, companheiro fiel e amigo para todas as horas. Aos meus queridos e verdadeiros amigos, por continuarem a serem fieis, mesmo com tanta ausência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Salvador Vilar, grande incentivador da pesquisa e experimento, um exemplo de luta e superação científica brasileira.

Ao meu coorientador, Dr. Euclides Martins, por ter sido um espelho em seriedade e competência desde o início da minha atividade acadêmica-profissional.

A minha coorientadora, Dra Amanda Vasconcelos de Albuquerque, por seu empenho e dedicação a esse projeto, minha gratidão por ter me ensinado o caminho certo a ser percorrido.

A Veridiana e Rodrigo, por terem tornado os dias de nossos experimentos mais alegres e divertidos.

A professora Doutor Mariana Lira, chefe do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas, pela competência em conduzir as análises histopatológicas do projeto.

Ao meu mentor, Professor Bertrand Guillonneau, o maior cirurgião laparoscópico que pude conhecer. Médico completo, exemplo de humildade e mudança constante.

Ao professor, Doutor Rodrigo Lira, exemplo de tranquilidade, organização e disciplina, minha eterna gratidão pelos seus ensinamentos e paciência.

As irmãs Márcia e Mércia, pela editoração cuidadosa desta tese.

A toda a equipe que compõe o NCE e o Mestrado UFPE, que contribuíram direta ou indiretamente para essa minha mais nova etapa de formação profissional.

“Melhorar é mudar, ser perfeito é mudar frequentemente”.
Winston Churchill

RESUMO

A anastomose uretrovesical é considerada a etapa mais complexa de reconstrução do trato urinário após uma prostatectomia radical. Como forma de proporcionar reforço uretral, diferentes materiais vêm sendo testados, como a membrana de biopolímero de cana-de-açúcar (BPCA) ou exopolissacarídeo celulósico (CEM). O presente trabalho avalia a utilização da BPCA como reforço uretral para as anastomoses uretrovesicais em coelho utilizado como modelo animal. Vinte e oito coelhos da linhagem Nova Zelândia, machos e sadios forma submetidos à anastomose uretrovesical controle, ou com reforço de BPCA. Os animais foram divididos igualmente em quatro grupos, de acordo com o procedimento e tempo experimental, a saber: Grupo controle C7: Anastomose e análise pós-operatória de sete semanas; CEM7: Anastomose com BPCA e análise de sete semanas; C14 e CEM14 semanas de avaliação. A integração e biocompatibilidade foi baseada na presença ou não de estenose, fístula, espessura da parede uretral após implante, espessura do epitélio uretral, taxa inflamatória e vascularização. Não foram observados números significativos de estenose ou fístula urinária em ambos os tempos experimentais. A análise morfométrica revelou preservação do lume uretral, BPCA bem aderida, sem extrusão, processo inflamatório controlado e vascularização do implante. Espessura do urotélio manteve-se constante em função do tempo mesmo após o reforço do BPCA. O conjunto parede-membrana apresentou uma maior espessura total com uma tendência estatística entre sete e quatorze semanas. A ausência de extrusão, estenose ou fístula urinária após sete ou quatorze semanas e aumento da espessura da parede com a BPCA, mostrou eficácia no reforço de anastomoses uretrovesicais em coelhos. Estudos clínicos prospectivos no futuro são necessários para confirmar seus resultados.

Palavras-chave: Anastomose cirúrgica. Celulose. Prostatectomia. Biopolímeros.

ABSTRACT

Urethrovesical anastomosis is considered the most complex stage of the reconstruction process of the urinary tract after a radical prostatectomy. Different materials have been tested to provide urethral reinforcement, such as cellulose exopolysaccharide membrane (CEM). So, the present study evaluates the efficacy of CEM as a urethral reinforcement in rabbit urethrovesical anastomosis as an animal model. Twenty-eight rabbits from the New Zealand lineage, male and healthy were submitted to urethrovesical anastomosis control, or with CEM reinforcement. The animals were divided into 4 groups, according to the procedure and experimental time, namely: Group Control C7: Anastomosis+ postoperative analysis of 7 weeks; CEM7: Anastomosis with CEM and 7-week analysis; C14 and CEM for 14-week analysis. The integration and biocompatibility was based on the presence or absence of stenosis, fistula, height of the urethral wall after implantation, thickness of the urethral epithelium, inflammatory rate and vascularization. No significant numbers of stenosis or urinary fistula were observed in both experimental time. The morphometric analysis revealed preservation of the urethral lumen, CEM well adhered, without extrusion, controlled inflammatory process and vascularization of the implant. Urothelium thickness remained constant over time and even after CEM reinforcement. The wall-membrane set presented a higher total thickness with a statistical tendency. The absence of extrusion, stenosis or urinary fistula after 7 or 14 weeks and increased wall-membrane thickness with CEM, showed its effectiveness in reinforcing of urethrovesical anastomosis in rabbits. Prospective clinical trials in the future are needed to confirm these results.

Keywords: Anastomosis, surgical. cellulose. prostatectomy. biopolymer.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPCA	Biopolímero de cana-de-açúcar
C14	Grupo controle após 14 semanas de implante
C7	Grupo controle após 7 semanas de implante
Cc	Corpos cavernosos
CEM	Membrana de expolissacarídeo celulósico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGMN	Célula gigante multinucleada
DPO	Dias pós-operatório
Dx	Dextranômeros
EPM	Erro padrão da média
HE	Hematoxilina e eosina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IUE	Incontinência urinária de esforço
NCE	Núcleo de Cirurgia Experimental
EP	Espessuraa da parede uretral
EP+CEM	Espessura da parede mais espessura da CEM
PR	Prostatectomia radical
PRRA	Prostatectomia radical robô assistida
RTUp	Ressecção transuretral de próstata
SIS	Submucosa intestinal suína
SVD	Sonda vesical de demora
U	Urotélio
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

VS

Vaso sanguíneo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Óbitos em decorrência do procedimento cirúrgico	27
Tabela 2	Aspectos clínicos	27
Tabela 3	Integração da BPCACEM ao tecido hospedeiro	30
Tabela 4	Espessura da parede do urotélio	31
Tabela 5	Quantificação de processo inflamatório e neovascularização	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho experimental	21
Figura 2	Técnica cirúrgica utilizada	23
Figura 3	Aspecto da incisão cirúrgica e da sonda vesical de demora ou SVD intrauretral	23
Figura 4	Dimensões da membrana de exopolissacarídeo celulósico biopolímero de cana-de-açúcar (BPCACEM).	24
Figura 5	Variação de peso ao longo do experimento.	28
Figura 6	Análise histológica de integração e biocompatibilidade.	29
Figura 7	Espessura da parede uretral.	31

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3.	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.3	Anastomose uretrovesical.....	18
2.4	Principais complicações associadas.....	18
2.5	Materiais indicados para anastomose uretrovesical.....	19
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Animais e local de estudo.....	21
3.2	Seleção dos grupos.....	21
3.3	Anestesia.....	22
3.4	Técnica cirúrgica	22
3.5	Confecção das membranas de biopolímero de cana-de-açúcar.....	23
3.6	Cuidado pós-operatório, eutanásia, coleta e fixação da amostra	24
3.7	Análises histológicas.....	25
3.7.1	Medição da espessura da parede da uretra.....	25
3.7.2	Densidade dos vasos sanguíneos e resposta inflamatória.....	25
3.8	Comitê de ética	26
3.9	Análises estatísticas	26
4.	RESULTADOS	27
4.1	Óbitos	27
4.2	Aspectos clínicos	27
4.3	Peso.....	28
4.4	Integração da BPCA ao tecido	28
4.5	Morfometria da espessura da parede uretral.....	30
4.6	Morfometria da espessura do urotélio.....	31
4.7	Resposta inflamatória e densidade dos vasos sanguíneos (%).....	31
5.	DISCUSSÃO	33
6.	CONCLUSÃO.....	38
7.	PERSPECTIVAS	39
	REFERÊNCIAS	40

APÊNDICE A: Manuscrito publicado na Acta Cirúrgica Brasileira.....	45
ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética.....	56

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados do INCA, estima-se para o Brasil, biênio 2017, 600 mil casos novos de câncer, sendo que, destes, 61 mil serão de cânceres de próstata⁽¹⁾. Parte desses casos terão a indicação de uma prostatectomia radical (PR), cujo objetivo é curar o portador do câncer de próstata e concomitantemente manter a continência urinária e função erétil.

Devido ao fato de que o trato urinário precisa ser reconstruído após a PR, a anastomose uretrovesical tornou-se a etapa mais complexa, pois depende diretamente da destreza do cirurgião, do tipo de material utilizado e da técnica empregada. Com o advento de técnicas laparoscópicas robóticas e fios de sutura especiais, as anastomoses estão cada vez melhores, com baixíssimas taxas de estenose ou fístula urinária. No entanto, algumas situações como PR pós radioterapia (resgate) e/ou pós ressecção transuretral de próstata (RTUP) exigem um reforço uretral, para prevenir essas complicações precoces, ou para receber no futuro um esfíncter artificial para controle da continência.

A qualidade e a variedade de materiais para tal finalidade parece ser escassa e por vezes controversas. Nesse cenário, estudos recentes apontam para o bom desempenho da membrana de exopolissacarídeo celulósico (CEM), também conhecida como biopolímero de cana-de-açúcar (BPCA). A CEM BPCA foi recentemente utilizada em reforço uretral em ratas e mostrou-se biocompatível e integrada ao tecido hospedeiro após serem envoltas em torno da uretra. Diante do exposto, o presente projeto propõe avaliar a eficácia da utilização da membrana CEM BPCA como reforço para as anastomoses uretrovesicais totais através de análises histológicas e morfométricas.

Em uma tentativa de diminuir as complicações precoces e tardias da anastomose uretrovesical em cirurgia para o tratamento de câncer de próstata, propomos a utilização de uma membrana confeccionada com exopolissacarídeo celulósico (CEM) de biopolímero de cana-de-açúcar (BPCA). A utilização da membrana implicará em uma menor reação tecidual além de atuar como uma barreira física, tornando a uretra mais resistente. Por se tratar de um produto proveniente de uma matéria prima abundante em nossa região, ao CEM BPCA

apresenta custo menor e de fácil produção, quando comparada aos materiais utilizados no mercado e que promovem reforço uretral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia da utilização da membrana de exopolissacarídeo celulósico (CEM) como reforço para as anastomoses uretrovesicais em coelhos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar em coelhos submetidos à anastomose uretrovesical com e sem reforço da membrana de expolissacarídeo celulósico, biopolímero de cana-de-açúcar (BPCACEM):

- ❖ Complicações associadas ao reforço;
- ❖ Quantificação morfométrica
 1. Espessura da parede uretral;
 2. Espessura do urotélio;
 3. Reação inflamatória/colonização celular após implante;
 4. Taxa de vascularização da CEM.

3 . REVISÃO DA LITERATURA

2.3 Anastomose uretrovesical

O câncer de próstata, segundo o Ministério da Saúde, é a segunda neoplasia maligna mais comum no homem, tendo uma incidência estimada para 2017 de 61 mil casos⁽¹⁾. Dentre suas diversas formas de tratamento, destaca-se a prostatectomia radical retropúbica, desenvolvida por Millin em 1945 e refinada por Walsh em 1982^(2,3) sendo considerada o tratamento padrão-ouro para esta patologia desde então⁽³⁾. O procedimento cirúrgico consiste na retirada do complexo próstata-vesículas seminais e na reconstrução do trato urinário através da anastomose entre o colo vesical e o coto uretral proximal. A anastomose uretrovesical é considerada a etapa mais complexa de todo o procedimento⁽³⁾. É um passo crítico na prostatectomia radical e fonte de diversas complicações (extravasamento urinário, estenose de colo vesical, incontinência urinária e tempo de sondagem vesical de demora prolongado)⁽⁴⁾ que afetam o resultado funcional e a qualidade de vida pós-operatória, pontos chave para o sucesso do tratamento.

2.4 Principais complicações associadas

Destacam-se duas principais complicações oriundas da anastomose vesicouretral: a sua estenose e a presença de vazamento no pós-operatório imediato. A prostatectomia radical é uma cirurgia desafiante que exige um cirurgião habilidoso e experiente⁽⁵⁾. O extravasamento urinário precoce é uma das complicações de curto prazo mais comuns, alcançando índices entre 0.3% e 15.4%^(6,7). A gênese desse vazamento perianastomose baseia-se principalmente na má técnica cirúrgica e/ou no tipo de material utilizado na sua confecção. Cirurgias provenientes de serviços de grande volume podem atingir níveis baixos desta complicação, porém nunca desprezíveis, o que leva a crer que o material utilizado exerce papel fundamental no processo de cicatrização. Em uma série recente de 2.500 pacientes submetidos a Prostatectomia Radical Robô Assistida (PRRA), operados por um único cirurgião, evidenciou-se uma taxa de 1.4% de extravasamento⁽⁸⁾. Já a estenose do colo vesical, após a prostatectomia radical, é uma das complicações mais devastadoras e de difícil tratamento. Esse estreitamento da anastomose vesicouretral, tem uma incidência aproximada de

10%⁽⁹⁾ e uma etiologia ainda incerta. É causa de infecção urinária de repetição e, se não tratada oportunamente, pode levar à perda completa da função renal. Radioterapia externa e Ressecção Transuretral de Próstata (RTUp) são fatores de risco envolvidos em sua formação⁽¹⁰⁾. O tipo de fio utilizado na confecção da anastomose ainda é foco de alguns estudos e teorias envolvendo estenose vesicouretral a médio e longo prazo⁽¹¹⁾.

2.5 Materiais indicados para anastomose uretrovesical

Alguns polímeros, como o cianocrilato e o BioGlue® (albumina e glutaraldeído), já foram estudados na tentativa de amenizar esta complicação, porém ambos sem sucesso^(11,12). Desde 2013 as cirurgias laparoscópicas, ou assistidas por robôs e o uso de fios especiais de sutura absorvíveis e sintéticos como V-loc®, Quill® e Stratafix® diminuíram em muito a incidência de complicações associadas à anastomose⁽¹³⁾. No entanto, a necessidade de um reforço uretral em alguns casos cujos pacientes tem indicação de receber esfíncter, por exemplo, se mantém.

2.6 Membrana de biopolímero de cana-de-açúcar (BPCA)

Dentro desse contexto, vem aumentando, nos últimos anos, o interesse pela celulose produzida por via microbiológica, em virtude das numerosas aplicações comerciais desse biopolímero, como alternativa à fabricação de pele artificial, diafragmas acústicos, membranas de filtros e na cicatrização de feridas⁽¹⁴⁾. Na indústria farmacêutica e médica, esse material vem sendo testado como substituto de tecidos vasculares, arcabouço de tecidos cartilagosos, substrato para cultura de células, curativos biológicos para queimaduras e na fabricação de próteses⁽¹⁵⁾, substituindo órgãos ocos como: ureter, traqueia, tubo digestivo e ainda na reconstrução de bainhas de nervos, substituto da dura-máter e reparo de hérnias^(16,17).

A celulose bacteriana pode ser descrita como uma membrana semitransparente, constituída por uma rede de fibrilas de celulose, de dimensões nanométricas, produzida por bactérias, particularmente as Gram(-), cujo representante mais importante é o *Acetobacter xylinus*^(17,18). Os testes de

biocompatibilidade *in vivo* demonstraram que a celulose produzida pelo *Acetobacter xylinus* não produziu sinais macroscópicos inflamatórios nem histológicos compatíveis com inflamação crônica e reação a corpo estranho. Observou-se também uma integração satisfatória da membrana de celulose ao tecido hospedeiro⁽¹⁹⁾. Diante dessas características favoráveis à aplicabilidade em medicina, passou-se a utilizá-la em inúmeras pesquisas na área de engenharia de tecidos, como arcabouço de próteses vasculares e tecidos cartilagosos^(20,21).

Em 1990 foi identificada, na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina da Universidade Federal Rural de Pernambuco, a síntese microbiológica de um biopolímero a partir do melaço de cana-de-açúcar⁽¹⁴⁾. O estudo sistemático da síntese do biopolímero levou à produção de membranas com características físicas como flexibilidade e resistência à ruptura. A composição química do biopolímero - constituído apenas de açúcares e ácido glicurônico, componentes orgânicos biocompatíveis - direcionou pesquisas com o objetivo de sua aplicação biológica.

O estudo do biopolímero "in vitro" definiu uma baixa citotoxicidade, permitindo a sua aplicação experimental⁽²²⁾. Foi demonstrado que a purificação deste biopolímero produzia tecido homogêneo, estável e de elevada histocompatibilidade em estudos de determinação da citotoxicidade realizados "in vitro". Em diferentes ensaios, foram definidas as aplicações experimentais do biopolímero da cana-de-açúcar como substituto de enxerto na miringoplastia⁽²³⁾, como enxerto vascular⁽²⁰⁾, no tratamento da incontinência urinária através do uso de reforço⁽²⁴⁾ e tratamento do refluxo vésico-uretral⁽²⁵⁾.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e local de estudo

Nesta investigação, foram estudados 28 coelhos de linhagem Nova Zelândia, machos, adultos sadios, procedentes do Sítio Cabanha Coelho, 225, Zona Rural, Lagoa de Itaenga - Km 7, CEP 55840-000 sob os cuidados do veterinário Dr. Márcio André Silva, CRMV-PE 3138, procedentes e aclimatadas por 15 dias no Núcleo de Cirurgia Experimental do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Todos receberam alimentação padrão com ração para coelhos tipo Purina® e água *ad libitum*, durante todo o experimento.

3.2 Seleção dos grupos

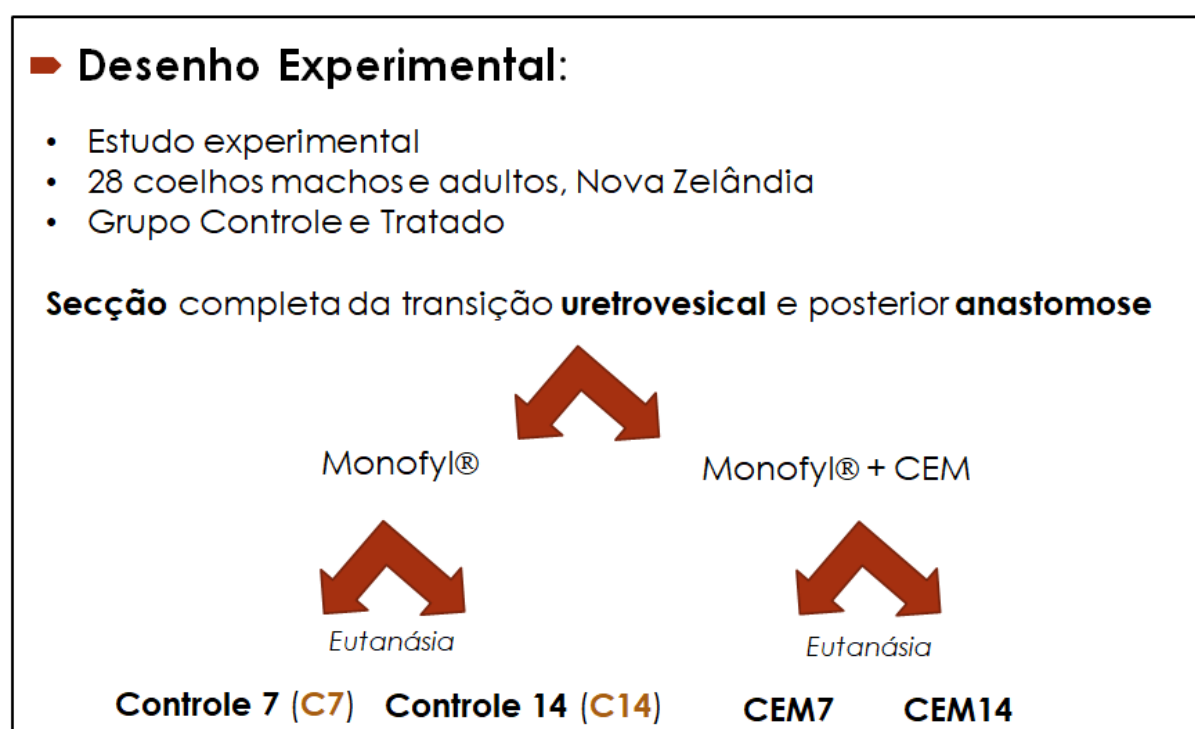


Figura 1. Desenho experimental. N = 7/grupo.

3.3 Anestesia

O preparo pré-operatório foi realizado através da suspensão da dieta imediatamente antes do procedimento cirúrgico, e tricotomia abdominal, após a indução anestésica.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de Xilazina (5mg/kg IM) e Ketamina (20mg/kg IM), conforme protocolo do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE. O nível de anestesia foi determinado pela observação dos reflexos palpebrais, movimentos respiratórios e estímulos cutâneos. Foi considerado anestesiado o animal com respiração regular e com ausência de reflexos a estímulos.

3.4 Técnica cirúrgica

A cirurgia foi realizada na sala de microcirurgia do Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE) da UFPE. Após anestesia, foi realizada tricotomia abdominal ampla e fixação do animal à mesa cirúrgica por meio de fitas elásticas, com os membros em extensão, procedendo-se, a seguir, antissepsia adequada da parede abdominal do coelho com solução de polivinilpirrolidona (PVP a 1% de iodo ativo) e colocação de campo cirúrgico estéril, com incisão de 05 cm na linha média infraumbilical. Fez-se a abertura da aponeurose e do peritônio com hemostasia, utilizando-se eletrocautério.

Utilizando-se técnica de microcirurgia com lupa de aumento ocular 2,5 vezes, com tesoura de *Metzenbaum*, criou-se um espaço de aproximadamente 0,5 cm posterior à uretra, imediatamente abaixo do colo vesical. Após apreensão da uretra e da bexiga com clipe estabilizador, foi realizada uma secção completa da transição uretrovesical e posterior anastomose contínua com Monofyl® Poly(glicolida-e-caprolactone) do tipo 5-0. Esta região de sutura foi então recoberta ou não com uma membrana de expolissacarídeo celulósico (CEM), biopolímero de cana-de-açúcar BPCA, medindo 0,6 x 4 cm de comprimento, livre de tensão e de acordo com os grupos pré-selecionados (Figura 2 a-d). No período pós-operatório, os animais foram mantidos com a mesma alimentação e com livre movimentação na gaiola.

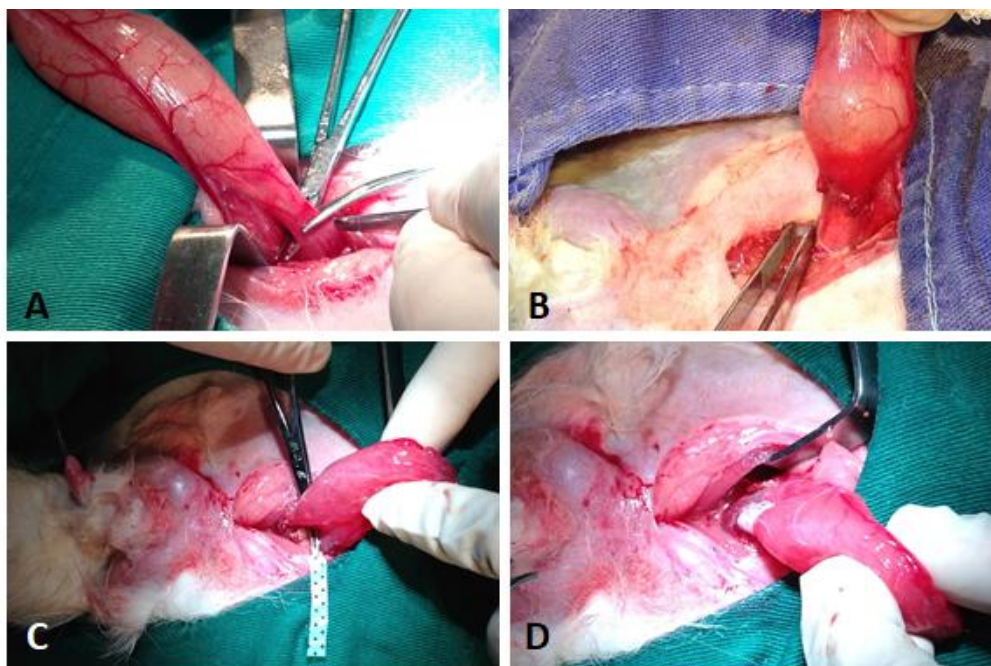


Figura 2. Técnica cirúrgica utilizada. A: Secção uretral completa, logo distal ao colo vesical até identificação da SVD; B: sutura contínua com Monofyl® nos grupos C7 e C14, realizada a anastomose sem a BPCACEM, C e D: áreas de anastomose nos grupos CEM7 e CEM14 foram recobertas com a membrana contendo auto adesividade.

Após a passagem da sonda uretrovesical (Figura 3), uma amostra da urina foi coletada para se avaliar a turbidez no momento da cirurgia. A mesma coleta foi realizada durante a eutanásia.

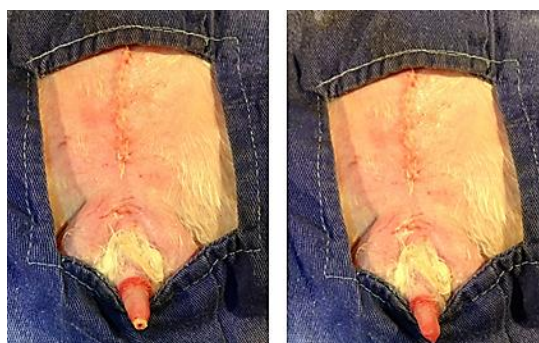


Figura 3. Aspecto da incisão cirúrgica e da sonda vesical de demora ou SVD intrauretral.

3.5 Confeção das membranas de biopolímero de cana-de-açúcar

As membranas de exopolissacarídeo celulósico⁽¹⁴⁾ fenestradas foram produzidas e cedidas pela microempresa POLISA Biopolímeros para a Saúde Ltda. A POLISA é incubada pela Incubatec Rural, Incubadora da UFRPE e possui parceria com o Grupo de Pesquisa Biopolímero de Cana de Açúcar [CNPq/UFPE],

Universidade Federal de Pernambuco UFPE por meio do Núcleo de Cirurgia Experimental.

As membranas foram embaladas individualmente em grau cirúrgico na própria POLISA e esterilizadas com irradiação gama (25K Gy), no Laboratório de Metrologia do Departamento de Energia Nuclear da UFPE, visando atender conceitos pré-estabelecidos de assepsia cirúrgica.

Para uniformização das membranas de biopolímero, todas as amostras foram obtidas de um único lote. As membranas foram cortadas em diversos fragmentos de 0,6 x 4 cm, obtendo-se 40 amostras fenestradas (Figura 4).



Figura 4. Dimensões da membrana de biopolímero de cana-de-açúcar BPCACEM.

3.6 Cuidado pós-operatório, eutanásia, coleta e fixação da amostra

No período pós-operatório, os animais foram mantidos no biotério, nas mesmas condições anteriores, permitindo-se livre movimentação. Os animais foram pesados em três tempos distintos, T1: peso no dia da cirurgia; T2: uma semana pós-cirúrgica e T3: no momento da eutanásia.

Os animais dos grupos C7 e CEM7 foram "eutanasiados" 7 semanas após o procedimento e os dos grupos C14 e CEM14 com 14 semanas, conforme protocolo e preconizado pelo Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE. Após a eutanásia, os aspectos clínicos como peso do animal, turbidez da urina após passagem da sonda vesical e presença de aderência foram avaliados. A urina dos animais foi avaliada quanto à turbidez no momento da cirurgia e na hora da eutanásia e classificadas em: (+) clara; (++) turva e (+++) opaca. Para tal, após passagem da sonda vesical uma amostra de urina foi coletada com uma seringa de 10ml e classificada de acordo com o padrão acima.

A coleta da amostra foi realizada através de uma incisão abdominal ampla, com a retirada, em bloco, da parede abdominal com a bexiga. As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% e, após a fixação, incluídas em parafina, cortadas com 5µm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina e enviadas para análise histológica e morfométrica.

3.7 Análises histológicas

O material de estudo foi enviado ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFPE. Foram realizados cortes percorrendo toda extensão da uretra e em pontos principais de observação na circunferência da anastomose.

A avaliação das lâminas e a captura das imagens foi feita com o microscópio de campo claro e imunofluorescência Axio Imager M2m/Zeiss, conectado à câmera digital AxioCam HRc/Zeiss, responsável pela transferência das imagens para um computador. A captura das imagens foi feita por meio do software ZEN-2012/Zeiss. As medidas foram feitas por meio do programa Image J –versão1,45(*National Institute of Health, Bethesda, MD, USA*).

3.7.1 Medição da espessura da parede da uretra

Para efetuar as medidas da parede uretral, esta foi dividida em 4 quadrantes, obtendo-se a média de 20 mensurações em cada animal, efetuando-se 5 medições em cada um dos quadrantes. As imagens foram capturadas em aumento panorâmico, em lâminas coradas pela HE. Para os diferentes grupos estudados, a medida da espessura da parede uretral foi feita partindo-se da lâmina própria, da zona em contato íntimo com o urotélio, até a última camada muscular mais externa.

3.7.2 Densidade dos vasos sanguíneos e resposta inflamatória

A densidade vascular, a taxa de colonização celular da CEM BPCA e a resposta inflamatória foram calculadas através de 15 imagens aleatórias por animal/peça. Posteriormente uma grade com 42 pontos foi lançada sob cada imagem, onde contou-se apenas os vasos sanguíneos e as células atingidas pelos pontos, tais como fibroblastos, células gigantes multinucleadas, macrófagos, mononucleares, polimorfonucleares e as regiões da CEMBPCA.

3.8 Comitê de ética

O projeto e o protocolo de pesquisa foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE (N. 23076.009626/20113-26).

3.9 Análises estatísticas

As variáveis contínuas paramétricas (espessura do urotélio e da parede uretral em função do tempo e do tratamento) foram comparadas usando o Teste t. A variável de peso foi calculada utilizando-se o one-way ANOVA. Em ambos os testes, a significância estatística foi considerada quando $p \leq 0.05$. Os testes estatísticos foram realizados usando-se o *GraphPad Prism 5.0 program®* (GraphPad Software Inc., USA).

4. RESULTADOS

4.1 Óbitos

Foram registrados 5 óbitos, 3 pertencentes ao grupo CEM (com a BPCA) e 2 pertencentes ao grupo controle, de um total de 28 animais operados.

Tabela 1. Óbitos em decorrência do procedimento cirúrgico

ÓBITO	DPO	BPCACEM
BEXIGOMA (N=2)	6	+/-
SVD NÃO PASSOU	0	+
SEM CAUSA APARENTE*	3	+
LIQUIDO CAVIDADE	7	-

* Necrópsia sem sucesso

4.2 Aspectos clínicos

O tempo cirúrgico em média foi de 51,56 minutos por animal. No momento da cirurgia, todas as anastomoses foram consideradas boas ou excelentes e a passagem SVD ocorreu sem resistência, das quais a maioria foi retirada no 7º DPO, algumas caíram espontaneamente entre o 2º e 4º DPO.

Todos os animais foram avaliados no momento da eutanásia e classificados de acordo com o aspecto da bexiga em bexigoma ou normal; aspecto da urina quanto a sua turbidez; presença ou não de estenose e outras observações. Na tabela 2 abaixo pode-se observar o resumo dos principais achados.

Tabela 2. Aspectos clínicos

GRUPO S	BEXIGA	TURBIDEZ DA URINA	ESTENOSE	OBSERVAÇÕES
C7	normal	2+/3+	não	Pouca aderência
C14	normal*	1+/3+	não	Pouca aderência
CEM7	normal	1+/3+	não	CEM BPCA integrada e com poucas aderências
CEM14	normal	2+/3+	não	BPCACEM integrada e com poucas aderências

Controle, n = 5; CEM, n = 4. C: Controle; CENBPCA: Membrana de expolissacarídeo celulósico, biopolímero de cana-de-açúcar. Um animal apresentou bexiga espessada. Não foi encontrado nenhum caso de fístula urinária.

4.3 Peso

O peso dos animais foi comparado em três momentos distintos: T1: no dia da cirurgia; T2: 1 semana após a cirurgia e 3: no momento da eutanásia. Pode-se observar que na figura 5 não há ganho ou perda de peso entre os grupos ou entre os três tempos comparados. Após análise estatística, foram obtidos valores de P iguais a 0,289; 0,435 e 0,539, respectivamente para os pesos nos tempos 1, 2 e 3.

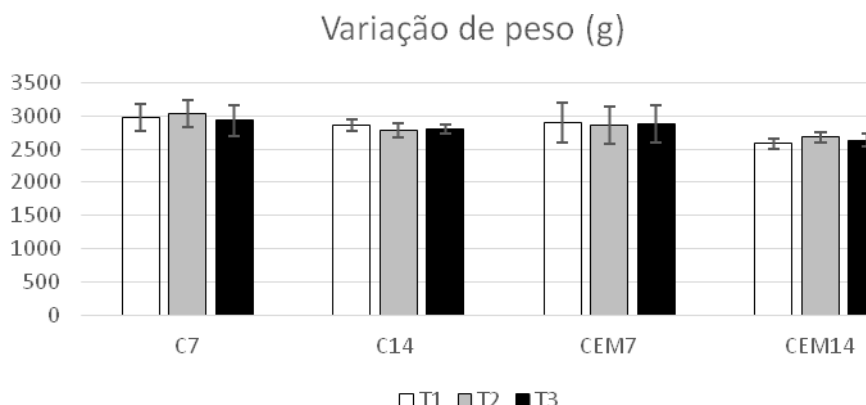


Figura 5. Variação de peso ao longo do experimento. Valores apresentados como média \pm EPM. Variação do peso (g) ao longo do experimento. T1 = média de peso do grupo no momento da cirurgia; T2 = média de peso do grupo após 1 semana de pós-operatório; T3 = média de peso do grupo no momento da eutanásia. C: Controle; CEM = membrana de exopolissacarídeo celulósico. Teste estatístico utilizado: One-way ANOVA.

4.4 Integração da BPCA ao tecido

Para as análises histológicas, dos 23 animais, apenas 3 ou 4 animais foram utilizados em cada grupo. Infelizmente, uma parte das amostras estava calcificada no momento do processamento histológico e não foi possível a obtenção de cortes com qualidade mínima suficiente para análise.

Cortes histológicos panorâmicos foram realizados para identificar a disposição da CEM BPCA e o impacto de sua integração ao tecido adjacente. Observou-se a uretra íntegra, com preservação de luz e porções da CEM BPCA envolvendo a mesma (Figura 6A e B). Em maior aumento é possível observar a CEMBPCA distribuída ao redor da uretra, com intensa quantidade de CGMN (célula gigante multinucleada), distribuídas homogeneamente em todas as porções da CEMBPCA; moderada quantidade de células inflamatórias distribuídas na região da CEMBPCA após 7 semanas (Figura 6C) e leve quantidade após 14 semanas (Figura 6D).

CEM BPCA circundada por tecido conjuntivo em ambos os tempos experimentais. Moderada formação de vasos de pequeno calibre na CEMBPCA (região próxima à parede) e na interface parede CEM BPCA após 7 semanas e intensa neovascularização após 14 semanas. Nota-se ainda uma aparente colonização celular mais acentuada após 14 semanas.

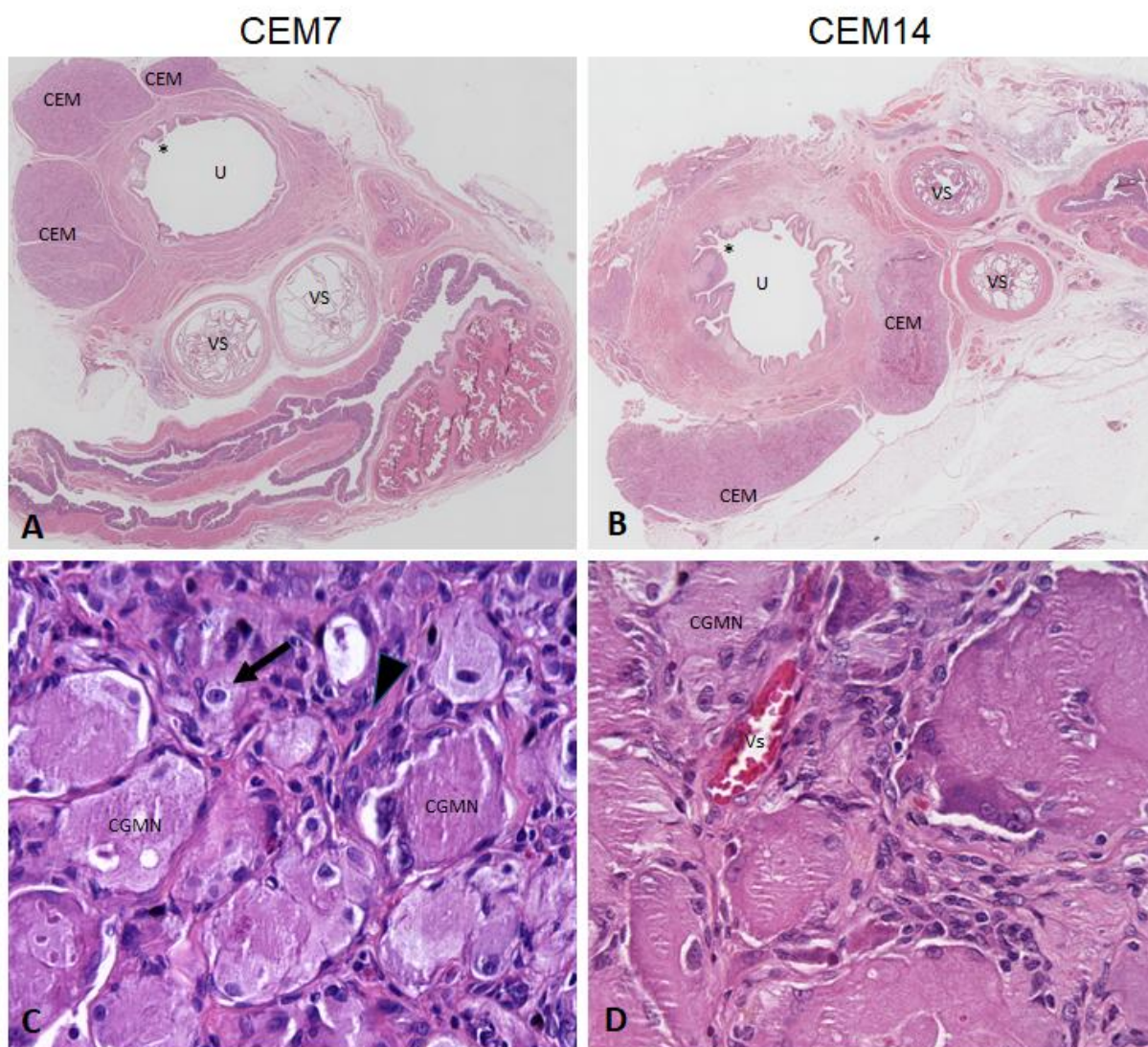


Figura 6: Análise histológica de integração e biocompatibilidade. A e B = cortes panorâmicos (40x), corados com HE para visualização da integração da BPCACEM ao tecido hospedeiro, respectivamente após 7 e 14 semanas de implante. C e D aumento de 400x para quantificação da angiogênese e da densidade celular. CEM = membrana de exopolissacarídeo celulósico; Vs = vaso sanguíneo; CGMN = células gigantes multinucleares; U = uretra; VS = vesícula seminal; * = urotélio; seta preta = macrófagos, cabeça de seta preta = fibroblastos, cabeça de seta branca = mononucleares.

Os padrões de integração foram então rearranjados quantitativamente para expressar em grau leve, moderado e intenso e são apresentados na tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Integração da BPCACEM ao tecido hospedeiro

TEMPO	COLONIZ AÇÃO CELULAR	CGMN	INFILTRAD O INFLAMAT ÓRIO	INTEGRA ÇÃO TECIDUA L	ANGIOGÊN ESE
7 SEMANAS	++	+++	++	*	++
14 SEMANAS	+++	+++	+	*	+++

BPCACEM: n = 3/grupo. CGMN: Células gigantes multinucleadas; +leve; ++ moderada; +++ intensa. * Presença de tecido conjuntivo envolvendo toda a prótese.

4.5 Morfometria da espessura da parede uretral

A parede uretral, medida da lâmina própria ao limite externo da camada muscular, apresentou comportamento similar no grupo C7 e C14 ($P = 0,713$); assim como CEM7 e CEM 14 ($P = 0,287$). Ou seja, o fator tempo não influenciou na espessura da parede. No entanto, foi observada uma maior espessura com tendência estatística para o conjunto membrana-parede (EP14 x EP+CEM14). Provavelmente houve uma integração entre a membrana e a parede, resultando em uma maior espessura total do conjunto membrana-parede com uma tendência estatística ($P = 0,077$).

Não foram observadas diferenças estatísticas quanto à espessura da parede mais a espessura da CEM BPCA entre 7 e 14 semanas ($P = 0,152$) ou diferença na espessura da CEMBPCA, também entre os tempos ($P = 0,856$).

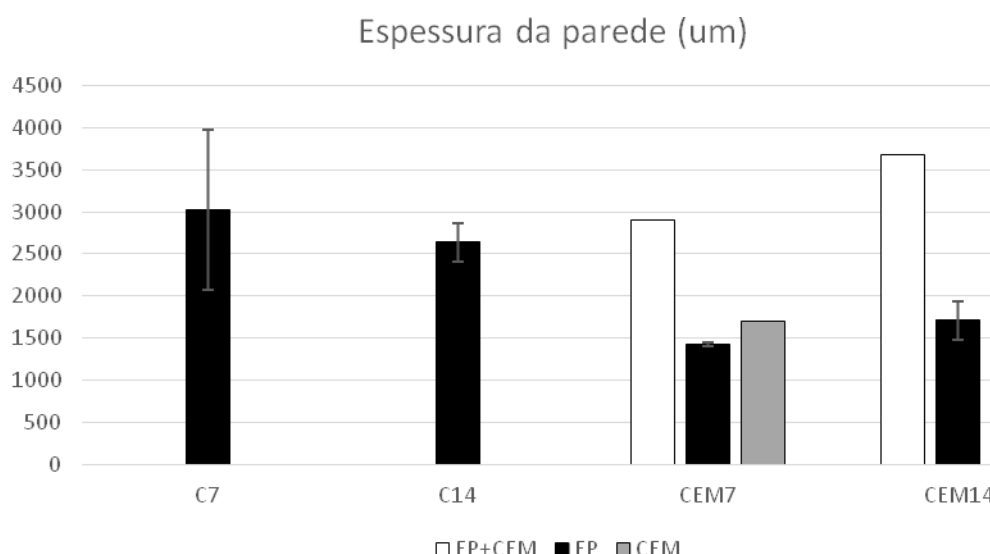


Figura 7. Espessura da parede uretral. Valores apresentados como média \pm EPM. EP = Espessura da parede uretral; C: Controle; CEM = membrana de exopolissacarídeo celulósico. C14 (n=3/grupo) e CEM14 (n=3/grupo).

4.6 Morfometria da espessura do urotélio

O epitélio uretral não sofreu qualquer alteração após o implante da BPCACEM, visto que a sua espessura não foi estatisticamente diferente entre os grupos.

Tabela 4. Espessura da parede do urotélio

ESPESSURA DA PAREDE (μ M)	CONTROLE		CEM	
	7 semanas	14 semanas	7 semanas	14 semanas
UROTÉLIAL	64,37 \pm 4,44	41,70 \pm 5,15	70,90 \pm 11,23	57,38 \pm 10,64

CEM: Membrana de exopolissacarídeo celulósico. Valores expressos em média \pm EPM. One-way ANOVA, valor de P = 0,152. CEM7 e CEM 14: (n=3/grupo).

4.7 Resposta inflamatória e densidade dos vasos sanguíneos (%)

A densidade celular após colonização da CEM BPCA foi calculada através da quantificação morfométrica dos diferentes tipos celulares pertencentes ao processo inflamatório, bem como a de vasos sanguíneos, ambos em função do tempo. Não foram observadas quaisquer diferenças estatísticas quanto à população de células presentes na CEM BPCA ou quanto à intensidade de vasos sanguíneos neoformados, quando os dois tempos experimentais foram comparados entre si ($P \leq 0,05$). Os dados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Quantificação de processo inflamatório e neovascularização

TEMPO	VS	FIBRO B.	CGM N	MA C.	MONONU C.	POLIMORFON UC.	OUTR O
7 SEMANA S	0,75	1,23	31,31	27,46	6,03	0,04	33,17
14 SEMANA S	1,53	0,37	33,65	24,81	4,50	0,00	35,13
VALOR DE P	0,05	0,343	0,844	0,808	0,685	0,629	1,000
7							

Valor de P após teste t student entre os tempos 7 e 14 semanas. VS: vaso sanguíneo, Fibrob: fibroblastos, CGMN: célula gigante multinucleada, Mac: macrófago, Mononuc: monoculares (linfócitos e plasmócitos), Polimorfonuc: polimorfonucleares, Outro: CEM/colágeno. CEM7 e CEM 14: (n=3/grupo).

5. DISCUSSÃO

A estimativa para o Brasil em 2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer⁽¹⁾. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes (INCA, 2016). A cirurgia indicada com o intuito de tratar o paciente que tenha câncer de próstata localizado, quando a doença está confinada na próstata e dentro dos limites da cápsula prostática chama-se prostatectomia radical (PR). Ou seja, a PR tem por objetivo curar o portador do câncer, manter a continência urinária e a função erétil. No entanto, a PR possui diversas complicações (fístulas urinárias, estenose de colo vesical, incontinência urinária e tempo de sondagem vesical de demora prolongado). A cirurgia em si causa dano ou perda parcial da musculatura lisa responsável pela continência urinária involuntária, localizada entre o colo vesical e a uretra prostática proximal, e esfíncter uretral externo. Estes pacientes são mais dependentes do esfíncter estriado para tornarem-se continentes no pós-operatório, e, portanto, a sua preservação durante a cirurgia é fundamental para o sucesso da continência urinária. Por outro lado, a estenose de colo vesical também é uma complicação recorrente, caracterizada pelo estreitamento da luz uretral com consequências devastadoras e tratamento complexo. A estenose ocorre geralmente de maneira centrípeta, dificultando o esvaziamento da bexiga e a passagem de urina.

Para que a continência urinária após PR seja mantida através da preservação de sua luz e do esfíncter externo, é necessário um cirurgião habilidoso e experiente. Além disso, o material utilizado na técnica cirúrgica da anastomose uretro-vesical (neourethroplastia posterior) também influencia diretamente na taxa de sucesso no pós-operatório. Segundo Sano e col (2011) a análise univariada de dois grupos de anastomose com diferentes fios revelou que apenas o tipo de sutura e a idade foram parâmetros significativos para a estenose⁽¹⁰⁾.

Nesse contexto, diferentes materiais vêm sendo empregados com o objetivo de diminuir a incidência dessas complicações após PR. Cola de fibrina e alguns polímeros, como o cianocrilato e o BioGlue® (albumina e glutaraldeído), já foram estudados. Segundo Flury e col (2008) a presença da cola de fibrina no sítio da

anastomose parece facilitar a vedação, permitindo assim a remoção do dreno cavitário JP (Jackson Pratt) após mais cedo 0,8 dias e do cateter de Foley, após 2,35 dias antes do grupo controle na de PR⁽²⁶⁾. Outro material testado por Hruby e col (2006) em modelo animal suíno foi o BioGlue®, uma combinação de glutaraldeído e albumina bovina purificada⁽¹²⁾. De acordo com Fürst & Banerjee (2005) a mistura desses componentes cria ligações cruzadas de albumina-albumina e, quando aplicado a tecido, criará ligações cruzadas de albumina-tecido⁽²⁷⁾. O resultado é um adesivo que pode selar o tecido dentro de um curto período de tempo. No entanto Hruby não confirmou as vantagens da utilização do Bioglue®. Segundo ele, o tempo cirúrgico aumentou e não houve melhora na qualidade da sutura, seja na avaliação imediata pós-operatória ou após 1 semana. Na avaliação histológica observou-se ainda que a cicatrização e processo inflamatório na região da anastomose foi a mesma, com ou sem BioGlue®. Finalmente outro material testado é o cianoacrilato, um adesivo disponível em diferentes formas químicas que variam de cianoacrilato de etilo (Superglue®) a isobutilcianoacrilato e octilcianoacrilato (Dermabond®), que estão em uso clínico. A anastomose com cianoacrilato requer a aplicação de suturas de permanência, um *stent* luminal e a posterior aplicação do adesivo⁽²⁸⁾. No entanto, segundo Grummet e col (2002), utilizando modelo animal canino, o cianoacrilato parece não ser adequado para o uso na anastomose vesicouretral de grande diâmetro, ou seja, aquela necessária na prostatectomia radical⁽¹¹⁾.

Recentemente, dois trabalhos utilizaram o exopolissacarídeo celulósico, também conhecido como biopolímero de cana-de-açúcar, como possível tratamento para o refluxo vesico-uretral e a incontinência urinária utilizando modelo animal coelho e rato, respectivamente^(24,25). O biopolímero foi injetado na bexiga dos coelhos adultos usando uma pequena incisão abdominal e comparado com a injeção de microesferas de dextranômeros (Dx) juntamente com ácido hialurônico. De acordo com os autores, o biopolímero apresentou baixa resposta inflamatória e melhor integração com o tecido hospedeiro do que o Dx após longo período de observação. Recentemente, Lima e col utilizaram a membrana de exopolissacarídeo celulósico como envoltório de reforço uretral em ratas, avaliando sua integração e remodelação ao tecido receptor⁽²⁴⁾. De acordo com os autores, a membrana aderiu ao tecido periuretral, integrando-se a este e induzindo o processo de remodelação

tecidual, necessário ao fortalecimento uretral, em modelo animal. Diante do exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a eficácia da utilização da membrana de biopolímero de cana-de-açúcar BPCA, expolissacarídeo de cana-de-açúcar BPCA como reforço para as anastomoses uretrovesicais.

Logo optou-se por analisar o efeito da CEMBPCA após PR, uma vez que tais complicações podem estar associadas à má técnica cirúrgica e/ou ao material utilizado. O monofil utilizado nesse projeto para as anastomoses foi de escolha do cirurgião, no entanto desde 2013 as cirurgias laparoscópicas, ou assistidas por robôs e o uso de fios especiais de sutura absorvíveis e sintéticos barbeados de poligliconato ou polidioxona como V-loc®, Quill® e Stratafix® diminuíram em muito a incidência de complicações associadas à anastomose⁽¹³⁾.

Para aferir o reforço ou não, proporcionado pela CEMBPCA foram aferidas a espessura da parede uretral e do urotélio. A verificação da biointegração da foi mensurada de acordo com a densidade da angiogênese e a reação inflamatória. Observou-se que a espessura da parede não foi alterada ao longo do tempo no grupo controle (7 ou 14 semanas) ou após 7 semanas comparando-se grupo C e CEM. No entanto, foi observada uma maior espessura com tendência estatística para o conjunto membrana-parede (EP14 x EP+CEM14).

Segundo Lima e *col* (2016) não houve alteração entre a espessura da parede após o implante com CEMBPCA, mesmo após 8 meses de reforço⁽²⁴⁾. Já o trabalho de Margreiter e *col* (2013), relata ganho estrutural significativo, ao utilizarem o SIS (submucosa intestinal suína) como envoltório uretral, simultaneamente à colocação do esfíncter artificial⁽²⁹⁾. A análise histológica desse material periuretral após três meses do implante mostrou tecido conectivo remodelado e baixa reação inflamatória, fortalecendo a ideia de que essa matriz serviria de suporte para crescimento de um novo tecido. Logo, o resultado adverso aqui encontrado para a espessura da parede provavelmente ocorreu devido ao baixo número de animais analisados para o grupo. A alta incidência de calcificação devido à urina do modelo experimental encontrada nas amostras inviabilizou o processamento histológico das mesmas. No entanto, acreditamos que esse fato não seja representativo.

Pouco tempo depois Futyma e *col* (2016) em estudo clínico, acompanhou 66 pacientes com incontinência urinária de esforço (IUE) e submetidas a injeções de Urolastic® durante diferentes períodos de acompanhamento⁽¹⁶⁾. O Urolastic® é um agente de preenchimento uretral indicado para o tratamento da IUE (incontinência

urinária de esforço), com taxa de sucesso de até 68% após um ano de acompanhamento e 30% das pequenas complicações relacionadas à injeção do agente^(30,31). Os autores observaram que apenas 30% dos pacientes foram beneficiados a longo prazo após a injeção de Urolastic®, no entanto a análise de microscopia de luz revelou que não houve diferença estatística significativa na taxa de inflamação⁽³²⁾. As principais complicações associadas à injeção encontradas pelos autores foram: 6,1% dos pacientes com obstrução uretral e 4,5% com migração do material sob a uretra para dentro da bexiga. No presente estudo não foi observado nenhum caso de extrusão da membrana após implante. Recentemente, Ogaya-Pinies e *col* (2016) afirmaram que utilizando um suporte de matriz extracelular da bexiga urinária incorporada à anastomose uretrovesical e à porção distal da bexiga durante PRRA (Prostatectomia Radical Robô Assistida) de resgate pós radioterapia obtiveram uma taxa de vazamento anastomótico de 6,66% dos pacientes que receberam o suporte e de 35,5% encontrado no grupo controle que não recebeu a membrana⁽³³⁾.

O urotélio também não sofreu quaisquer alterações após implante da CEMBPCA, independentemente do tempo analisado. Esse mesmo resultado foi encontrado por Lima e *col* (2015) após injetar exopolissacarídeo celulósico dentro da bexiga de coelhos⁽²⁵⁾. O epitélio da bexiga apresentou-se íntegro, especialmente em sua camada basal e com preservação de lúmen. No entanto, Lima e *col* (2016) encontrou uma redução da espessura epitelial nos animais que receberam reforço de CEMBPCA + fita de silicone, após 8 meses de implante⁽²⁴⁾. Segundo o autor, a diminuição pode ter sido devido à posição da CEMBPCA (colocada entre a uretra e a fita de silicone), criando assim uma barreira física e minimizando a reação inflamatória do hospedeiro ao silicone.

Finalmente, a biocompatibilidade e a biointegração da CEMBPCA foi avaliada de acordo com a resposta inflamatória e a taxa de vascularização após o implante da CEM BPCA^(34–36). Em análise histológica a CEM BPCA apresentou-se bem aderida à parede uretral com preservação do seu lúmen, vascularização da membrana e colonização celular e principalmente de células gigantes multinucleadas (CGMN), fibroblastos, macrófagos, mononucleares e polimorfonucleares. A biocompatibilidade começa quando as células inflamatórias são recrutadas para o local do implante, seguido da formação de neovasos capazes de fornecer o aporte de nutrientes para a integração do material implantado. Em

seguida as células inflamatórias vão sendo paulatinamente substituídas por fibroblastos, consequentemente com deposição de colágeno, mas sem formação de cápsula fibrosa^(37,38). Essa biocompatibilidade associada à ausência de toxicidade do exopolissacarídeo celulósico também foi confirmada recentemente através de ensaios “in vitro” por Pinto e col (2016)⁽²²⁾; experimentais^(39,40) e clínicos^(41–43).

Diante do exposto, a CEM BPCA apresentou-se biocompatível e de fácil integração ao tecido hospedeiro, principalmente devido à formação de vasos sanguíneos e com a presença de colonização celular. A ausência de estenose de colo vesical, mesmo após implante da CEM BPCA reforça ainda mais o seu potencial de aplicação. No entanto, não nos é possível afirmar que a promove de fato reforço uretral, uma vez que foram observadas diminuição na espessura da parede uretral após 14 semanas de implante. Estudos futuros são necessários utilizando o mesmo modelo animal e com diferentes testes de eficácia para afirmar ou descartar a hipótese de reforço uretral após o implante da CEM BPCA.

6. CONCLUSÃO

A ausência de extrusão, estenose ou fístula urinária após 7 ou 14 semanas e o aumento da espessura da parede com a BPCA, mostrou sua eficácia no reforço das anastomoses uretrovesicais em coelhos. Estudos clínicos prospectivos no futuro são necessários para confirmar esses resultados. Os resultados aqui encontrados foram considerados promissores. Acreditamos que a ausência de extrusão, estenose ou fístula urinária reafirmam a biocompatibilidade, biointegração e uma tendência a uma parede mais espessa no conjunto final demonstram um potencial de aplicação na área urológica da membrana de expolissacarídeo celulósico como reforço uretrovesical.

7. PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados aqui encontrados, acredita-se que a membrana de exopolissacarídeo celulósico pode ser utilizada para a recuperação do tecido vascular e nervoso prostático, além do reforço da uretra posterior após trauma uretral ou radioterapia⁽⁴⁴⁾. Suas propriedades de neovascularização e de não causar reação inflamatória intensa são promissoras. Logo, estudos futuros fazem-se necessários utilizando-se a mesma técnica cirúrgica, a fim de garantir a eficácia do produto e sua segurança para aplicação clínica futura.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016 [Internet]. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. 2016. 124 p. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>
2. Millin T, Dubl MC. Retropubic prostatectomy: A new extravesical technique report on 20 cases. *J Urol*. 2002;167(2):976–9.
3. Walsh PC, Donker PJ. Impotence Following Radical Prostatectomy: Insight into Etiology and Prevention. In: *Journal of Urology*. 2017. p. S165–70.
4. Manganiello M, Kenney P, Canes D, Sorcini A, Moinzadeh A. Unidirectional barbed suture versus standard monofilament for urethrovesical anastomosis during robotic assisted laparoscopic radical prostatectomy. *Int Braz J Urol*. 2012;38(1):89–96.
5. Tyritzis SI, Katafigiotis I, Constantinides CA. All you need to know about urethrovesical anastomotic urinary leakage following radical prostatectomy. *J Urol*. 2012;188(2):369–76.
6. Rebuck DA, Haywood S, McDermott K, Perry KT, Nadler RB. What is the long-term relevance of clinically detected postoperative anastomotic urine leakage after robotic-assisted laparoscopic prostatectomy? *BJU Int*. 2011;108(5):733–8.
7. Coelho RF, Palmer KJ, Rocco B, Moniz RR, Chauhan S, Orvieto MA, et al. Early Complication Rates in a Single-Surgeon Series of 2500 Robotic-Assisted Radical Prostatectomies: Report Applying a Standardized Grading System. *Eur Urol*. 2010;57(6):945–52.
8. Park R, Martin S, Goldberg JD, Lepor H. Anastomotic strictures following radical prostatectomy: Insights into incidence, effectiveness of intervention, effect on continence, and factors predisposing to occurrence. *Urology*. 2001;57(4):742–6.
9. Ouzaid I, Xylinas E, Ploussard G, Hoznek A, Vordos D, Abbou C-C, et al. Anastomotic Stricture After Minimally Invasive Radical Prostatectomy: What Should Be Expected from the Van Velthoven Single-Knot Running Suture? *J Endourol* [Internet]. 2012;26(8):1020–5. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/end.2011.0650>
10. Sano A, Tsuyoshishi S, Iguchi A, Urologia OD De. Exame de relevância sutura e anastomose estenose cirurgia de prostatectomia radical O texto do contrato de licença publicada em 2011-03-01 tipo Papel Boletim departamental Textversion editor Estudo da relevância da sutura RELAÇÃO ENTRE TIPO DE sutura e an. 2011;56(2010):95–8.

11. Grummet JP, Costello AJ, Swanson DA, Stephens LC, Cromeens DM. Vesicourethral anastomosis with 2-octyl cyanoacrylate adhesive in an in vivo canine model. *Urology*. 2002;60(5):935–8.
12. Hruby G, Marruffo F, Durak E, Collins S, Herron A, Landman J. Comparison of BioGlue reinforced and standard running sutured vesicourethral anastomoses. *Urology*. 2006;68(6):1355–9.
13. Greenberg JA, Goldman RH. Barbed suture: a review of the technology and clinical uses in obstetrics and gynecology. *Rev Obstet Gynecol* [Internet]. 2013;6(3–4):107–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24920976> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4002186> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24920976> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4002186>
14. Paterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL, Medeiros V. Cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydr Polym*. 2000;42(4):375–83.
15. Putra A, Kakugo A, Furukawa H, Gong JP, Osada Y. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface. *Polymer (Guildf)*. 2008;49(7):1885–91.
16. Futyma K, Nowakowski Ł, Gałczyński K, Miotła P, Rechberger T. Nonabsorbable urethral bulking agent — clinical effectiveness and late complications rates in the treatment of recurrent stress urinary incontinence after 2 years of follow-up. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016;207:68–72.
17. Yamanaka S, Ono E, Watanabe K. Hollow microbial cellulose, process for preparation thereof, and artificial blood vessel formed of said cellulose [Internet]. European patent. 1990. p. 7. Available from: <http://www.freepatentsonline.com/EP0396344A2.html>
18. Klemm D, Kramer F, Moritz S, Lindström T, Ankerfors M, Gray D, et al. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. Vol. 50, *Angewandte Chemie - International Edition*. 2011. p. 5438–66.
19. Rambo CR, Recouvreux DOS, Carminatti CA, Pitlovanciv AK, Antônio R V., Porto LM. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2008;28(4):549–54.
20. De Barros-Marques SR, Marques-Lins E, De Albuquerque MCS, De Andrade-Aguiar JL. Sugarcane biopolymer patch in femoral vein angioplasty on dogs. *J Vasc Surg*. 2012;55(2):517–21.
21. Pita PC de C, Pinto FCM, Lira MM de M, Dutra F de A, Melo, Ferreira LM, et al. Biocompatibility of the bacterial cellulose hydrogel in subcutaneous tissue of rabbits 1. *Acta Crúrgica Bras*. 2015;30(4):296–300.

22. Pinto FCM, De-oliveira ACAX, De-carvalho RR, Gomes-carneiro MR, Coelho DR, Vilar S, et al. Acute toxicity , cytotoxicity , genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. *Carbohydr Polym.* Elsevier Ltd.; 2016;137:556–60.
23. Db S, Jla A, Marques a, Arb C, Filho R. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero da cana-de-açúcar e fásia autóloga em Chinchila laniger. *AnFacMedUnivFedPernamb.* 2006;51(1):45–51.
24. Lima SVC, Machado MR, Pinto FCM, Lira MM de M, de Albuquerque AV, Lustosa ES, et al. A new material to prevent urethral damage after implantation of artificial devices: An experimental study. *Int Braz J Urol.* 2017;43(2):335–44.
25. Lima SV ilar C, de Oliveira Rangel AE duardo, de Melo Lira MM ontenegro, Pinto FCM orone, Campos Júnior O, Sampaio FJ osé B, et al. The Biocompatibility of a Cellulose Exopolysaccharide Implant in the Rabbit Bladder When Compared With Dextranomer Microspheres Plus Hyaluronic Acid. *Urology.* 2015;85(6):1–6.
26. Flury SC, Starnes DN, Steers WD. Application of fibrin sealant at the urethrovesical anastomosis in robotic assisted radical prostatectomy: Does it enable earlier Foley catheter and Jackson-Pratt drain removal? *J Robot Surg.* 2008;1(4):303–6.
27. Fürst W, Banerjee A. Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(5):1522–8.
28. Bot G, Bot K, Ogunranti J, Onah J, Sule A, Hassan I, et al. The use of cyanoacrylate in surgical anastomosis: An alternative to microsurgery. *J Surg Tech Case Rep* [Internet]. 2010;2(1):44. Available from: <http://www.jstcr.org/text.asp?2010/2/1/44/63727>
29. Margreiter M, Farr A, Sharma V, Schauer I, Klingler HC. Urethral buttressing in patients undergoing artificial urinary sphincter surgery. *J Urol.* 2013;189(5):1777–81.
30. Zajda J, Farag F. Urolastic-a new bulking agent for the treatment of women with stress urinary incontinence: outcome of 12 months follow up. *Adv Urol* [Internet]. 2013;2013:724082. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3881341&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>
31. Futyma K, Miotła P, Gałczyński K, Baranowski W, Doniec J, Wodzisławska A, et al. An Open Multicenter Study of Clinical Efficacy and Safety of Urolastic, an Injectable Implant for the Treatment of Stress Urinary Incontinence: One-Year Observation. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:1–5. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/851823/>
32. Assafa A, Abdinb F, Elkady A, Alaziz AA, Alhady MA. Histopathological effects of silicone rubber “ Ovabloc ” on the human fallopian tube. 1993;181–9.

33. Ogaya-Pinies G, Kadakia Y, Palayapalayam-Ganapathi H, Woodlief T, Jenson C, Patel V. Use of Scaffolding Tissue Biografts To Bolster Vesicourethral Anastomosis During Salvage Robot-assisted Prostatectomy Reduces Leak Rates and Catheter Times. *European Urology*. 2016;
34. Anderson JM. Biological Responses To Materials. *Annu Rev Mater Res*. 2001;31:81–110.
35. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. Vol. 20, *Seminars in Immunology*. 2008. p. 86–100.
36. Anderson JM. Exploiting the inflammatory response on biomaterials research and development. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(3).
37. Trost L, Elliott D. Small intestinal submucosa urethral wrap at the time of artificial urinary sphincter placement as a salvage treatment option for patients with persistent/recurrent incontinence following multiple prior sphincter failures and erosions. *Urology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;79(4):933–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2011.09.003>
38. Santucci RA, Barber TD. Resorbable extra cellular matrix grafts in urologic reconstruction. *Int Braz J Urol*. 2005;31(3):192–203.
39. Silveira RK, Coelho ARB, Pinto FCM, de Albuquerque AV, de Melo Filho DA, de Andrade Aguiar JL. Bioprosthetic mesh of bacterial cellulose for treatment of abdominal muscle aponeurotic defect in rat model. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(8).
40. Abreu TC de, Lima RP de, Souza VSB De, Júnior OC, Albuquerque AV de, Aguiar JL de A, et al. The biopolymer sugarcane as filling material of critical defects in rats 1. *Acta Cirúrgica Bras*. 2016;31(1):53–8.
41. Vilar F de O, Pinto FCM, Albuquerque AV, Martins AGS, de Araújo LAP, Aguiar JL de A, et al. A wet dressing for male genital surgery: A phase II clinical trial. *Int Braz J Urol*. 2016;42(6):1220–7.
42. CAVALCANTI LM, PINTO FCM, OLIVEIRA GM DE, LIMA SVC, AGUIAR JLDA, LINS EM. Efficacy of bacterial cellulose membrane for the treatment of lower limbs chronic varicose ulcers: a randomized and controlled trial. *Rev Col Bras Cir* [Internet]. 2017;44(1):72–80. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912017000100072&lng=en&tlng=en
43. Silveira FCA, Pinto FCM, Caldas Neto S da S, Leal M de C, Cesário J, Aguiar JL de A. Treatment of tympanic membrane perforation using bacterial cellulose: a randomized controlled trial. *Braz J Otorhinolaryngol* [Internet]. 2016 Mar;82(2):203–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1808869415001366>

44. Ogaya-Pinies G, Palayapalam-Ganapathi H, Rogers T, Hernandez-Cardona E, Rocco B, Coelho RF, et al. Can dehydrated human amnion/chorion membrane accelerate the return to potency after a nerve-sparing robotic-assisted radical prostatectomy? Propensity score-matched analysis. *J Robot Surg* [Internet]. Springer London; 2017; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11701-017-0719-8>

APÊNDICE A: Manuscrito publicado na Acta Cirúrgica Brasileira



3-Experimental Surgery

Bacterial cellulose to reinforce urethrovesical anastomosis. A translational study¹

Guilherme Tavares da Silva Maia¹, Amanda Vasconcelos de Albuquerque², Euclides Dias Martins Filho³, Filipe Tenório de Lira Neto⁴, Veridiana Sales Barbosa de Souza⁵, Anderson Arnaldo da Silva⁶, Mariana Montenegro de Melo Lira⁷, Salvador Vilar Correia Lima⁸

¹Master, Urology Service, Clinical Hospital, Department of Surgery, Center for Health Sciences, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil. Acquisition of data, technical procedures, manuscript preparation.

²PhD, Nucleus of Experimental Surgery, Postgraduate Program in Surgery, Department of Surgery, Center for Health Sciences, UFPE, Recife-PE, Brazil. Manuscript preparation, critical revision.

³PhD, Abdominal Surgery, Clinical Hospital, Department of Surgery, Center for Health Sciences, UFPE, Recife-PE, Brazil. Critical revision.

⁴Master, Urology Service, Clinical Hospital, Department of Surgery, Center for Health Sciences, UFPE, Recife-PE, Brazil. Technical procedures, critical revision.

⁵Master, Nucleus of Experimental Surgery, Postgraduate Program in Surgery, Department of Surgery, Center for Health Sciences, UFPE, Recife-PE, Brazil. Technical procedures, manuscript preparation.

⁶Master, Nucleus of Experimental Surgery, Postgraduate Program in Surgery, Department of Surgery, Center for Health Sciences, UFPE, Recife-PE, Brazil. Macroscopic and histopathological examinations

⁷PhD, Department of Pathology, Center for Health Sciences, UFPE, Recife-PE, Brazil. Macroscopic and histopathological examinations

⁸Master, Urology Service, Clinical Hospital, Department of Surgery, Center for Health Sciences, UFPE, Recife-PE, Brazil. Critical revision.

Abstract

Purpose: To evaluate the efficacy of the cellulosic exopolysaccharide membrane (CEM) as a urethral reinforcement for urethrovesical anastomosis.

Methods: Twenty eight rabbits were submitted to urethrovesical anastomosis with or without CEM reinforcement. The animals were divided into 4 groups: C7, CEM7, C14 and CEM14: (C= only anastomosis or CEM = anastomosis + CEM), evaluated after 7 weeks, and 14 weeks. The biointegration and biocompatibility of CEM were evaluated according to stenosis, fistula, urethral wall thickness, urethral epithelium, rate of inflammation and vascularization.

Results: Between the two experimental groups, the difference in the number of stenosis or urinary fistula was not statistically significant. The morphometric analysis revealed preservation of urethral lumen, well adhered CEM without extrusion, a controlled inflammatory process and implant vascularization. The urothelium height remained constant over time after CEM reinforcement and the membrane wall was thicker, statistically, after 14 weeks.

Conclusion: The absence of extrusion, stenosis or urinary fistula after 14 weeks of urethrovesical anastomosis demonstrates cellulosic exopolysaccharide membrane biocompatibility and biointegration with tendency to a thicker wall.

Key words: Anastomosis, Surgical. Prostatectomy. Biopolymers. Rabbits.

■ Introduction

According to international data, it is estimated that about 600.000 new cases of cancer occurred in Brazil in 2017; of which about 61.000 were of prostatic origin¹. Part of these cases will have had, as the main treatment, a radical prostatectomy (RP), which aims to cure the cancer and concomitantly maintain urinary continence and erectile function.

Since the urinary tract needs to be reconstructed after RP, urethrovesical anastomosis has become the most complex stage because it depends directly on the surgeon's skills, the type of material available and the technique used². With the advent of robotic laparoscopic techniques and special sutures, anastomosis is increasingly successful, with extremely low rates of stenosis or urinary fistula. However, some situations such as RP after transurethral resection of prostate (TURP) or radiotherapy require previous urethral reinforcement to prevent these complications and/or the use of an artificial sphincter to restore urinary continence in the future³ with poor overall outcomes. We assess another treatment option. Methods: A retrospective analysis was performed of 8 patients presenting with severe, recurrent incontinence after multiple prior failed AUS procedures. All patients were treated with small intestinal submucosa (SIS).

The quality and variety of materials for this purpose seem to be scarce and sometimes controversial. In this scenario, recent experimental and clinical studies have registered the successful performance of the cellulosic exopolysaccharide membrane (CEM), also known as sugarcane biopolymer⁴⁻⁷. CEM has recently been used in urethral reinforcement in rats and demonstrated to be biocompatible and integrated into the host tissue after adhering to the urethra⁸. We believe that this membrane could be used to

reinforce urethrovesical anastomosis, since it results in minor tissue reaction and acts as a physical barrier, making the urethra more resistant. Because it is a product from an abundant raw material grown in our region, CEM presents lower cost and easier production when compared to the materials used on the market to promote urethral reinforcement. This project aims to evaluate the efficacy of the use of the CEM as a reinforcement in urethrovesical anastomosis, through histological and morphometric analysis.

■ Methods

This study followed the principles governing the Code of Experimental Ethics and Laws for Protection of Animals, according to the standards in Brazil, receiving full approval from the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Center for Biosciences, UFPE (process No 23076.009626/20113-26). The study was conducted by The Nucleus for Experimental Surgery of Federal University of Pernambuco - UFPE. Twenty-eight male rabbits were submitted to urethrovesical anastomosis. The animals were divided into 4 groups: Group C7: Anastomosis + 7-week postoperative analysis; CEM7: Anastomosis + CEM and 7-week analysis; C14 and CEM14 for 14-week analysis (Figure 1).

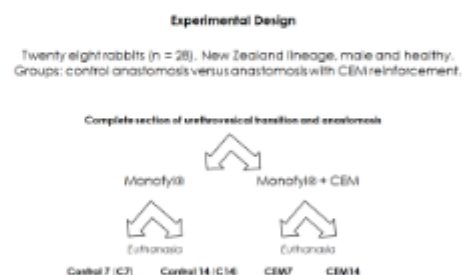


Figure 1 - Experimental design.

Surgical technique and cellulosic exopolysaccharide membrane (CEM)

The animals were placed on the operating table in the supine position. Antisepsis of the abdominal wall was performed with chlorhexidine solution. A 6FR urethral catheter was used to facilitate urethral dissection, section and anastomosis. An abdominal midline incision of ± 5 cm was made. Access to that abdominal cavity was performed by the sequential dissection of anatomical planes. The bladder and urethra were then exposed. Using dissecting scissors, a small sub-urethral space (± 6 mm) was created just below the bladder neck to facilitate passage through the urethrovesical junction.

The urethra was sectioned at this point. The anastomosis was performed with Monofyl® Poly (Control group). In the CEM group, the anastomosis was coated with a self-adhesive of cellulosic exopolysaccharide membrane (CEM) (Figure 2 A-D).

The CEM used in our study is a bacterial exopolysaccharide made by bacterial synthesis from sugarcane molasses. It was produced in a project developed at one of the institutions involved in the project (UFRPE)⁹. Each CEM implant was 4 x 0.6 cm x 0.04 mm thick and with 1.0 mm diameter holes separated by 1.0 mm. These had been stored in a polyester acetate envelope filled with 80% isopropyl alcohol and sterilized using 25kGy of gamma irradiation (Figure 2 E-F).

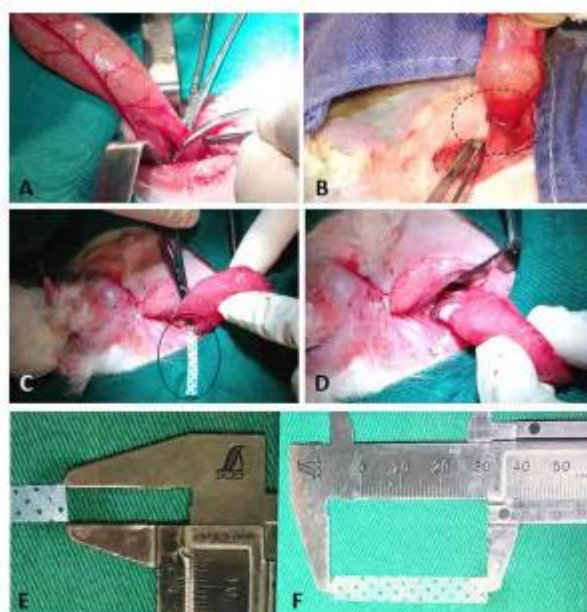


Figure 2 - Surgical technique and cellulosic exopolysaccharide membrane (CEM) measurements. **A:** Complete section of the urethrovesical transition - urethra (below scissors) and urinary bladder (above); **B:** Rocco's anastomosis with Monofyl® Poly – Control group (glycolide-and-caprolactone); **C:** Rocco's anastomosis with Monofyl® Poly with cellulosic exopolysaccharide membrane (CEM group); **D:** Final anastomosis aspect; **E-F:** CEM's dimensions: 4 x 0.6cm.

Postoperative care, euthanasia and tissue sample processing

The animals were weighed on the day of surgery (T1), again 7 days after surgery (T2) and before euthanasia (T3). Lethal doses of sodium thiopental were administered for euthanasia, which occurred 7 and 14 weeks after surgery. During euthanasia all animals were evaluated and classified with respect to the bladder's aspect (normal or bladder distention); turbidity urine level (at surgery and euthanasia), stenosis and adherence presence.

Collection of the urethrovesical anastomosis specimens was performed by means of a large abdominal incision, with the removal, in block, of the abdominal wall with the bladder. Samples were fixed in 10% buffered formalin and, after fixation, embedded in paraffin, sliced 5 µm thick, stained with hematoxylin and eosin and sent for histological and morphometric analysis.

Histological analyzes

Morphometry of the urethra and urothelium wall thickness

The methodology to measure the urethra and urothelium wall thickness, was the same used by Lima *et al.*⁸. Briefly, the area was divided into four quadrants to obtain an average of 20 measurements per quadrant. The images were then captured with optical magnification of 4x or 400x. The measurements were made using the program Image J45 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). For both, treated (CEM7 and CEM14) and control groups (C7 and C14), measurement of the thickness of the urethral wall was made starting from the lamina propria, the area in close contact with the urothelium, until the outer muscle layer. The urothelium wall thickness was measured using the above-described methodology from

lamina propria to the urothelium-lumen limit.

CEM's integration and host tissue response

Panoramic histological sections were performed to identify the disposition of CEM and the impact of its integration into the host tissue and around it. Each slide was then classified as follow: (+) mild; (++) moderate; (+++) intense for CEM's cell colonization, amount of GMC, inflammatory infiltrate and angiogenesis.

Angiogenesis density and inflammatory response

Point counting of 630 intersections was used in 15 randomly selected fields for each animal (four to five fields per histological section), for new blood vessels, fibroblasts, giant multinucleated cells (GMCs), macrophages, mononuclear cells (counted as one: lymphocytes and plasma cells), polymorphonuclears, and areas of CEM plus collagen fibers to determine the volume densities of angiogenesis, CEM's cell colonization and inflammatory response.

Statistical analysis

All variables measured were tested for normality prior to analysis, using the univariate procedure of SigmaPlot 13. The Student t-test was used to compare continuous variables between the control and CEM group, and comparisons between the time groups were made by one-way ANOVA. $P \leq 0.05$ was considered significant. Data were reported as means and SEM (standard error of the mean) using tables and graphs.

■ Results

Deaths and clinical outcomes

The average surgery time was 51.56

minutes per animal. By the end of the surgery, all anastomoses were considered good or excellent, and the bladder catheter passage had occurred without resistance. Some catheters were spontaneously expelled between the 2nd and 4th POD (post-operative day), and most were removed on the 7th POD. Five deaths occurred among the 28 operated

animals, 3 from the CEM group and 2 from the Control group.

All animals had the aspect of the bladder classified as normal, without stenosis, no change in urine turbidity levels or adherence level (Table 1). Animals' weight was not altered as a result of the surgical procedure.

Table 1 - Clinical aspects.

Groups	Bladder	Stenosis	Turbidity urine level	Adherence level
C7	normal	No	2+/3+	Mild adherence
C14	normal	No	1+/3+	Mild adherence
CEM7	normal	No	1+/3+	CEM well integrated and light adherence
CEM14	normal	No	2+/3+	CEM well integrated and light adherence

C: Control, n = 5; CEM, n = 4. CEM: Cellulose exopolysaccharide membrane. No case of urinary fistula was found.

Histological analysis

CEM's integration and host tissue response

The integration patterns were rearranged quantitatively to express mild, moderate and intense levels and are presented in Table 2. The intact urethra was observed, with preservation of its lumen and portions of the CEM encircling it (Figure 3 A-B). Using a higher magnification, it is possible to observe that the CEM is well distributed around the urethra, with an intense number of GMCs

(multinucleated giant cells), distributed homogeneously in the area of the CEM; a moderate number of inflammatory cells after 7 weeks (Figure 3C) and a slight amount after 14 weeks (Figure 3D). The CEM was surrounded by connective tissue at both experimental times. Moderate angiogenesis was found in the CEM (close to urethral wall) and in the wall-CEM interface after 7 weeks and intense angiogenesis after 14 weeks. An apparent more pronounced cell colonization was also observed after 14 weeks.

Table 2 - CEM's integration and host tissue response.

Time	Cell colonization	GMCs	Inflammatory infiltrate	Tecidual integration	Angiogenesis
7 weeks	++	+++	++	*	++
14 weeks	+++	+++	+	*	+++

CEM: Cellulose exopolysaccharide membrane. n = 3 / group. GMCs: Multinucleated giant cells; + mild; ++ moderate; +++ intense. * Presence of connective tissue involving the entire prosthesis without fibrous capsule formation.

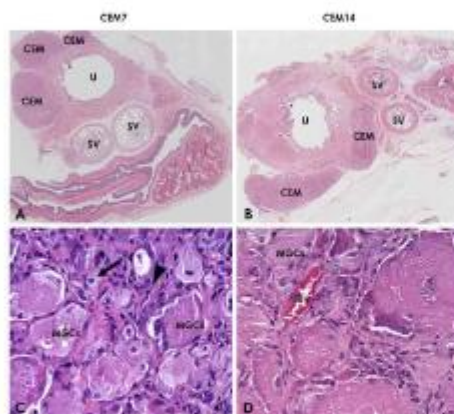


Figure 3 - Histological analysis of CEM's integration and biocompatibility. **A** and **B** = panoramic cuts (x50), stained with HE to visualize the host tissue response, respectively, after 7 and 14 weeks of CEM's implantation. **C** and **D**: x400 magnifications to quantify the angiogenesis and cell density. CEM = cellulosic exopolysaccharide membrane; Bs = blood vessel; GMCs = multinuclear giant cells; U = urethra; SV = seminal vesicle; * = urothelium; black arrow = macrophages, black arrowhead = fibroblasts.

Morphometry of urethral and urothelial wall thickness

The thickness of the urethral wall (Figure 4), measured from lamina propria up to the outer edge of the muscular layer, was similar in both groups, C7 and C14 ($P=0.713$); as well as CEM7 and CEM14 ($P=0.287$). That is, the level of tissue integration after CEM's implant at 7 or 14 weeks was the same. However, a greater thickness with a statistical tendency was observed for the membrane-wall set (WC+CEM14 x C14), probably an integration between the membrane and

Table 3 - Angiogenesis density and inflammatory response (%).

Time	BV	Fibrob.	GMCs	Mac.	Mono	Poly	CEM/cf
7 weeks	0.75	1.23	31.31	27.46	6.03	0.04	33.17
14 weeks	1.53	0.37	33.65	24.81	4.50	0.00	35.13
P-value	0.057	0.343	0.844	0.808	0.685	0.629	1.000

P-value after student t-test between 7 and 14 weeks. BV: blood vessels; Fibrob: fibroblasts; GMCs: multinucleated giant cells; Mac: macrophage; Mono: lymphocytes and plasmocyte cells; Poly: polymorphonuclear; CEM/CF: CEM plus collagen fibers. CEM7 and CEM 14: (n = 3 /group).

the urethral wall ($P = 0.077$). There were no statistical differences in urethral wall thickness plus CEM between 7 and 14 weeks ($P = 0.152$) or differences in CEM's thickness, also between times ($P = 0.856$).

The urethral epithelium, measured from the lamina propria up to the urothelium-light border, did not change after CEM implantation, since its thickness was not statistically different between the groups.

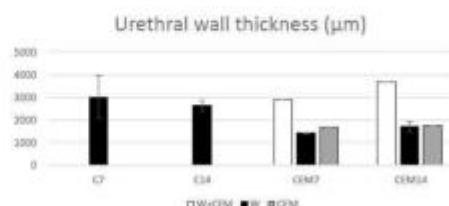


Figure 4 - Urethral wall thickness. Values presented as mean \pm SEM. W + CEM = urethral wall plus CEM thickness; W: wall; CEM = cellulosic exopolysaccharide membrane. P-value after t-student test between UW + CEM values at 14 weeks and C14. There were no statistical differences in urethral wall thickness plus CEM between 7 and 14 weeks ($P = 0.152$) or difference in CEM's thickness, also between times ($P = 0.856$).

Angiogenesis density and inflammatory response (%)

Angiogenesis, cell density after CEM integration and inflammatory response were calculated by morphometric quantification of different cell types as well as the presence of new blood vessels. No statistical differences were observed as none of the above parameters had been compared when the two experimental times were compared ($P \leq 0.05$). The data are summarized in Table 3.

■ Discussion

The estimate for cancer in Brazil in 2017 indicates the occurrence of about 600.000 new cases. Excluding non-melanoma skin cancer (approximately 180,000 new cases), approximately 420.000 new cases of cancer probably occurred¹. The epidemiological profile observed resembles that of Latin America and the Caribbean, where prostate cancer (61.000) in men and breast cancer (58.000) in women are the most frequent¹. The surgery indicated to treat a patient who has detected prostate cancer, when the disease is confined to the prostate and within the limits of the prostate capsule is called radical prostatectomy (RP). That is, RP aims to cure the cancer patient, maintain urinary continence and erectile function. However, RP has several complications (urinary fistulas, bladder neck stenosis, urinary incontinence and prolonged urinary catheter time). The surgery itself causes damage or partial loss of the smooth muscle responsible for involuntary urinary continence, located between the bladder neck the proximal prostatic urethra and external urethral sphincter. These patients are more dependent on the striated sphincter to recover urinary continence in the postoperative period, and therefore its preservation during surgery is critical in this process. On the other hand, bladder neck stenosis is also a recurrent complication, characterized by the narrowing of urethral lumen with devastating consequences and complex treatment. Stenosis usually occurs centripetally, making it difficult to empty the bladder and to pass urine.

For urinary continence after RP to be maintained through preservation of the lumen and external sphincter, a skillful and experienced surgeon is needed. In addition, the material used in the surgical technique of urethrovesical anastomosis (posterior neo-urethroplasty) also directly influences the success rate in the postoperative period. According to Sano *et al.*², the univariate analysis of two anastomosis

groups with different suture devices revealed that only the type of suture and the patient's age were significant parameters for stenosis.

Given this, different materials have been used to reduce the incidence of these complications after RP. Fibrin glue and some polymers, such as cyanoacrylate and BioGlue[®] (albumin and glutaraldehyde) have already been studied. According to Flury *et al.*¹⁰, the presence of fibrin glue at the anastomosis site seems to facilitate the sealing of the surgical site, thus allowing removal of the JP (Jackson Pratt) cavity drain after 0.8 days and the Foley catheter after 2.35 days of PR. Another material tested by Hruby *et al.*¹¹ in a pig animal model was BioGlue[®], a combination of glutaraldehyde and purified bovine albumin. According to Fürst and Banerjee¹², the mixture of these components creates cross-links of albumin-albumin and when applied to the tissue, it will create tissue-albumin cross-links. The result is an adhesion that can seal the tissue within a short period of time. However, Hruby *et al.* did not confirm the advantages of using BioGlue[®]. According to them, the surgical time increased and there was no improvement in suture quality, either at the immediate postoperative evaluation or after 1 week. In the histological evaluation the healing and inflammatory process in the region of the anastomosis was the same, with or without BioGlue[®]. Finally, another tested material is cyanoacrylate, an adhesive available in different chemical forms ranging from ethyl cyanoacrylate (Superglue[®]) to isobutyl cyanoacrylate and octyl cyanoacrylate (Dermabond[®]), which is in clinical use. Cyanoacrylate anastomosis requires the application of permanent sutures, a luminal stent and the subsequent application of the adhesive¹³ simple, fast, and available technique for anastomosis in urological, vascular, gynecological, and general surgical procedures. This method may in the future be a good alternative to microsurgery, particularly in centers where facilities are unavailable and the financial implication is unbearable for the

patient. Cyanoacrylate is an adhesive or glue that is available in different chemical forms ranging from ethylcyanoacrylate (superglue). However, according to Grummet *et al.*¹⁴, using a canine animal model, cyanoacrylate seems not to be suitable to be used in large-diameter vesicourethral anastomosis, that is, what is required for radical prostatectomy.

Recently, two studies have used the cellulosic exopolysaccharide, also known as sugarcane biopolymer, as a possible treatment for vesico-urethral reflux and urinary incontinence using rabbit and rat animal models, respectively^{8,15}. The biopolymer was injected into the bladders of adult rabbits using a small abdominal incision and compared to the injection of dextran (Dx) microspheres along with hyaluronic acid. According to these researchers, the biopolymer presented a low inflammatory response and better integration with the host tissue than the Dx after long period of observation. Recently, Lima *et al.*⁸ used an cellulosic exopolysaccharide membrane as a urethral reinforcement in rats, evaluating their integration and remodeling into the receptor tissue. According to the authors, the membrane adhered to the periurethral tissue, integrating with it and inducing the process of tissue remodeling, necessary for urethral strengthening in an animal model. In view of the research cited above, the present work was developed with the objective of evaluating the efficacy of the cellulosic exopolysaccharide membrane (CEM) as a reinforcement for urethrovesical anastomosis.

We therefore opted to analyze the effect of CEM after RP, since complications may be associated with poor surgical technique and/or the material used. The monofilament suture material used in this project for anastomosis was the surgeon's choice, since laparoscopic or robot-assisted surgeries and the use of special absorbable and synthetic suture materials treated with polyglyconate or polydioxane such as V-loc®, Quill® and Stratafix® would

greatly reduce the incidence of complications associated with anastomosis¹⁶.

To measure the reinforcement provided by the CEM, the thickness of the urethral wall and the urothelium were measured. The biointegration check of CEM was measured according to angiogenesis density and inflammatory reaction. The wall thickness did not alter over time in the control group (7 or 14 weeks) or after 7 weeks comparing groups C with CEM. However, a greater thickness, with statistical tendency, was observed for the membrane-wall group (EP14 x EP + CEM14). According to Lima *et al.*⁸ there was no change in wall thickness after CEM implantation, even after 8 months of reinforcement. On the other hand, a different study reports a significant structural gain when using SIS (porcine intestinal submucosa) as a urethral coating, simultaneously with artificial sphincter placement¹⁷. The histological analysis of this periurethral material after three months of implantation showed remnant connective tissue and low inflammatory reaction, strengthening the idea that this matrix would support the growth of new tissue. However, the adverse result found in that study for wall thickness probably occurred due to the low number of animals analyzed for the group. The high incidence of calcification found in the urine of the experimental animal model made this histological analysis unviable. However, we believe that this fact is not particularly relevant. A short time later, Futyma *et al.*¹⁸ followed 66 patients with stress urinary incontinence (SUI) and who had undergone Urolastic® injections during different follow-up periods. Urolastic® is a urethral filling agent indicated for the treatment of SUI (stress urinary incontinence) with a success rate of up to 68% after one year of follow-up and only 30% the small complications related to the injection of the agent^{19,20}. Urolastic®, in women with stress urinary incontinence (SUI). The authors observed that only 30% of the patients

benefited in the long term after the injection of Urolastic[®], however the microscopic analysis of the lumen revealed that there was no significant statistical difference in the rate of inflammation²¹. The main complications associated with the injection found by the authors were: 6.1% of patients with urethral obstruction and 4.5% with migration of the material under the urethra into the bladder. In that study, no case of membrane extrusion after implantation was observed. Recently, Ogaya-Pinies *et al.*²² stated that using a porcine urinary bladder extracellular matrix scaffold (UB-ECM) incorporated into the urethrovesical anastomosis and the distal portion of the bladder during sRRP (Salvage Robot-Assisted Radical Prostatectomy) resulted in an anastomotic leakage rate of 6.66% of the patients who received the UB-ECM support and 35.5% in the control group that did not receive the membrane.

The urothelium also did not undergo any changes after CEM implantation, regardless of the time analyzed. This same result was found by Lima *et al.*¹⁵ after injecting cellulosic exopolysaccharide into rabbit bladder. The bladder epithelium was intact, especially in its basal layer and with preservation of the lumen. However, Lima *et al.*⁸ found a reduction in epithelial thickness in animals that received CEM + silicone tape after 8 months of implantation. According to the author, the decrease may have occurred due to the CEM position (placed between the urethra and the silicone tape), thereby creating a physical barrier and minimizing the inflammatory reaction of host tissue to the silicone.

Finally, the biocompatibility and the biointegration of CEM was evaluated according to the inflammatory response and the rate of vascularization after CEM implantation²³⁻²⁶. In the histological analysis, the CEM adhered well to the urethral wall with preservation of its lumen, membrane vascularization and cell colonization, mainly because the presence of multinucleated giant cells (MNGC),

fibroblasts, macrophages, mononuclear and polymorphonuclear cells. Biocompatibility begins when inflammatory cells are recruited to the implantation site, followed by the formation of new vessels capable of delivering nutrients for the integration of the implanted material. Afterwards, the inflammatory cells are gradually replaced by fibroblasts, consequently with collagen deposition, but without fibrous capsule formation^{8,15,27}. This biocompatibility associated with the absence of toxicity of the cellulosic exopolysaccharide has also recently been confirmed with *in vitro* tests by Pinto *et al.*²⁸; both experimental^{4,5} and clinical^{6,7,29}.

In view of what has been related above, the CEM is established as biocompatible and easy to integrate into the host tissue, mainly due to the formation of blood vessels and the presence of cell colonization. The absence of bladder neck stenosis, even after CEM implantation, further strengthens its application potential. However, it is not possible to conclude that CEM promotes urethral reinforcement, since a decrease in urethral wall thickness was observed after 14 weeks of implantation. Future studies are needed using the same animal model and with different efficacy tests to affirm or rule out the hypothesis of urethral reinforcement after CEM implantation.

■ Conclusion

The absence of extrusion, stenosis or urinary fistula after 14 weeks of urethrovesical anastomosis demonstrates CEM biocompatibility and biointegration with tendency to a thicker wall.

■ References

1. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. INCA. Estimativa 2016. doi: 978-85-7318-283-5.
2. Raza SJ, Field E, Jay C, Eun D, Fumo M, Hu JC, Guru KA. Surgical competency

- for urethrovessical anastomosis during robot-assisted radical prostatectomy: development and validation of the robotic anastomosis competency evaluation. *Urology*. 2015;85(1):27-32. doi: 10.1016/j.urology.2014.09.017.
3. Trost L, Elliott D. Small intestinal submucosa urethral wrap at the time of artificial urinary sphincter placement as a salvage treatment option for patients with persistent/recurrent incontinence following multiple prior sphincter failures and erosions. *Urology*. 2012;79(4):933-8. doi: 10.1016/j.urology.2011.09.003.
 4. Silveira RK, Coelho ARB, Pinto FCM, de Albuquerque AV, de Melo Filho DA, de Andrade Aguiar JL. Bioprosthetic mesh of bacterial cellulose for treatment of abdominal muscle aponeurotic defect in rat model. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(8):129. doi: 10.1007/s10856-016-5744-z.
 5. Abreu TC, Lima RP, Souza VSB, Campos Júnior O, Albuquerque AV, Aguiar JL, Andrade ES, Vasconcelos BC. The biopolymer sugarcane as filling material of critical defects in rats. *Acta Cir Bras*. 2016;31(1):53-8. doi: 10.1590/S0102-8650201600100000008.
 6. Vilar FO, Pinto FCM, Albuquerque AV, Martins AG, Araújo LA, Aguiar JL, Lima SV. A wet dressing for male genital surgery: a phase II clinical trial. *Int Braz J Urol*. 2016;42(6):1220-7. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0109.
 7. Silveira FCA, Pinto FCM, Caldas Neto SS, Leal MC, Cesário J, Aguiar JLA. Treatment of tympanic membrane perforation using bacterial cellulose: a randomized controlled trial. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2016;82(2):203-8. doi: 10.1016/j.bjorl.2015.03.015.
 8. Lima SVC, Machado MR, Pinto FCM, Lira MM, Albuquerque AV, Lustosa ES, Silva JG, Campos O Jr. A new material to prevent urethral damage after implantation of artificial devices: an experimental study. *Int Braz J Urol*. 2017;43(2):335-44. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0271.
 9. Paterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL, Medeiros V. Cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydr Polym*. 2000;42(4):375-83. doi: 10.1016/S0144-8617(99)00179-4.
 10. Flury SC, Starnes DN, Steers WD. Application of fibrin sealant at the urethrovessical anastomosis in robotic assisted radical prostatectomy: does it enable earlier Foley catheter and Jackson-Pratt drain removal? *J Robot Surg*. 2008;1(4):303-6. doi: 10.1007/s11701-007-0061-7.
 11. Hruby G, Marruffo F, Durak E, Collins S, Herron A, Landman J. Comparison of BioGlue reinforced and standard running sutured vesicourethral anastomoses. *Urology*. 2006;68(6):1355-9. doi: 10.1016/j.urology.2006.09.032.
 12. Fürst W, Banerjee A. Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity. *Ann Thorac Surg*. 2005;79(5):1522-8. doi: 10.1016/j.athoracsur.2004.11.054.
 13. Bot G, Bot K, Ogunranti J, Onah JA, Sule AZ, Hassan I, Dung ED. The use of cyanoacrylate in surgical anastomosis: an alternative to microsurgery. *J Surg Tech Case Rep*. 2010;2(1):44-8. doi: 10.4103/2006-8808.63727.
 14. Grummet JP, Costello AJ, Swanson DA, Stephens LC, Cromeens DM. Vesicourethral anastomosis with 2-octyl cyanoacrylate adhesive in an in vivo canine model. *Urology*. 2002;60(5):935-8. doi: 10.1016/S0090-4295(02)01887-3.
 15. Lima SV, de Oliveira Rangel AE, de Melo Lira MM, Pinto FC, Campos Júnior O, Sampaio FJ, de Andrade Aguiar JL. The biocompatibility of a cellulose exopolysaccharide implant in the rabbit bladder when compared with dextranomer microspheres plus hyaluronic acid. *Urology*. 2015;85(6):1-6. doi: 10.1016/j.urology.2015.02.028.
 16. Greenberg JA, Goldman RH. Barbed suture: a review of the technology and clinical uses in obstetrics and gynecology. *Rev Obstet Gynecol*. 2013;6(3-4):107-15. doi: 10.3909/riog0231.
 17. Margreiter M, Farr A, Sharma V, Schauer I, Klingler HC. Urethral buttressing in patients undergoing artificial urinary sphincter surgery. *J Urol*. 2013;189(5):1777-81. doi: 10.1016/j.juro.2012.11.152.
 18. Futyma K, Nowakowski Ł, Gałczyński K, Miotła P, Rechberger T. Nonabsorbable urethral bulking agent — clinical effectiveness and late complications rates in the treatment of recurrent stress urinary

- incontinence after 2 years of follow-up. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;207:68-72. doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.10.011.
19. Zajda J, Farag F. Urolastic-a new bulking agent for the treatment of women with stress urinary incontinence: outcome of 12 months follow up. *Adv Urol.* 2013;2013:724082. doi: 10.1155/2013/724082.
 20. Futyma K, Miotła P, Gałczyński K, Baranowski W, Doniec J, Wodzisławska A, Jóźwik M, Oniszczyk M, Rechberger T. An open multicenter study of clinical efficacy and safety of urolastic, an injectable implant for the treatment of stress urinary incontinence: one-year observation. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1-5. doi: 10.1155/2015/851823.
 21. Assaf A, Abdin F, Elkady A, Gohar M, Abd AlAziz A, Abd Alhady M. Histopathological effects of silicone rubber 'Ovabloc' on the human fallopian tube. *Int J Gynaecol Obstet.* 1993 Nov;43(2):181-9. PMID: 7905435.
 22. Ogaya-Pinies G, Kadakia Y, Palayapalayam-Ganapathi H, Woodlief T, Jenson C, Syed J, Patel V. Use of scaffolding tissue biografts to bolster vesicourethral anastomosis during salvage robot-assisted prostatectomy reduces leak rates and catheter times. *Eur Urol.* 2018 Jul;74(1):92-8. doi: 10.1016/j.eururo.2016.10.004.
 23. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res.* 2001;31:81-110. doi: 10.1146/annurev.matsci.31.1.81.
 24. Anderson JM, McNally AK. Biocompatibility of implants: Lymphocyte/macrophage interactions. *Semin Immunopathol.* 2011;33(3):221-33. doi: 10.1007/s00281-011-0244-1.
 25. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):86-100. doi: 10.1016/j.smim.2007.11.004.
 26. Anderson JM. Future challenges in the in vitro and in vivo evaluation of biomaterial biocompatibility. *Regen Biomater.* 2016;3(2):73-7. doi: 10.1093/rb/rbw001.
 27. Silva DB, Aguiar JLA, Marques A, Coelho AR, Rolim Filho EL. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero da cana-de-açúcar e fásia autóloga em Chinchilla laniger. *An Fac Med Univ Fed Pernamb.* 2006;51(1):45-51.
 28. Pinto FCM, De-Oliveira ACAX, De-Carvalho RR, Gomes-Carneiro MR, Coelho DR, Lima SVC, Paumgartten FJR, Aguiar JLA. Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. *Carbohydr Polym.* 2016;137:556-60. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.10.071.
 29. Cavalcanti LM, Pinto FCM, Oliveira GM, Lima SVC, Aguiar JLA, Lins EM. Efficacy of bacterial cellulose membrane for the treatment of lower limbs chronic varicose ulcers: a randomized and controlled trial. *Rev Col Bras Cir.* 2017;44(1):72-80. doi: 10.1590/0100-69912017001011.

Acknowledgement

To Sidney Pratt by English version.

Correspondence:

Salvador Vilar Correia Lima
Departamento de Cirurgia, Centro de Ciências da Saúde, UFPE
Avenida Professor Moraes Rego, 1235
50670-901 Recife - PE Brasil
Tel.: (55 81)2126-3649
urology@salvador.net

Received: Apr 02, 2018

Review: June 05, 2018

Accepted: July 04, 2018

Conflict of interest: none

Financial sources: MCTI, FINEP, FACEPE, and CNPq

¹Research performed at Center of Experimental Surgery, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), and Department of Nuclear Energy (DEN), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.



ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 31 de julho de 2013.

Ofício nº 602/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof Salvador Vilar Correia Lima**

Núcleo de Cirurgia Experimental - CCS

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.009626/2013-26

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Utilização da membrana de biopolímero de cana-de-açúcar (BCA) para proteção da anastomose uretrovesical: um estudo experimental comparativo em ratos.**"

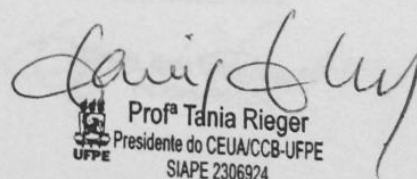
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Fazenda Sítio Cabanha Coelho - Lagoa de Itaenga-PE; Animais: coelhos; Linhagem: Nova Zelândia; Idade: 4 meses; Peso: 4 kg; Sexo: machos e fêmeas; Nº total de animais: 40.

Atenciosamente,


Profª Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306924