

Artur Eduardo de Oliveira Rangel



**HISTOMORFOMETRIA E ESTEREOLOGIA DO GEL DO
BIOPOLÍMERO DO MELAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR
IMPLANTADO EM BEXIGA DE COELHOS**

RECIFE
2011



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Artur Eduardo de Oliveira Rangel

Histomorfometria e estereologia do gel do biopolímero do melaço da cana-de-açúcar implantado em bexiga de coelhos

Tese 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 Doutor em Cirurgia.

Orientador Interno

Dr. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Adjunto do Depto de Cirurgia, CCS-UFPE

Orientador Externo

Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso

Prof. Adjunto da Unidade de Pesquisa Urogenital
do Departamento de Anatomia, UFRJ

RECIFE
2011

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

R196h Rangel, Artur Eduardo de Oliveira.
 Histomorfometria e estereologia do gel do biopolímero do melaço da
 cana-de-açúcar implantado em bexiga de coelhos / Artur Eduardo de
 Oliveira Rangel. – 2011.
 74 f.: il.; tab.; 30 cm.

 Orientador: Salvador Vilar Correia Lima.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2011.

 Inclui referências e anexos.

 1. Refluxo vesicoureteral. 2. Incontinência urinária de esforço. 3.
 Biocompatibilidade. I. Lima, Salvador Vilar Correia (Orientador). II. Título.

617.91 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-222)

**"HISTOMORFOMETRIA E ESTEREOLOGIA DO GEL DO BIOPOLÍMERO DO MELAÇO DA CANA-
DE-AÇÚCAR IMPLANTADO EM BEXIGA DE COELHOS"**

ARTUR EDUARDO DE OLIVEIRA RANGEL

APROVADA EM: 01/09/2011

ORIENTADOR INTERNO: SALVADOR VILAR CORREIA LIMA

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF. DR. EDMUNDO MACHADO FERRAZ – CCS/UFPE

PROF. DR. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR – CCS/UFPE

PROF. DR. FÁBIO DE OLIVEIRA VILAR – CCS/UFPE

PROF. DR. PAULO ROBERTO COSTA LIMA – UPE

PROF. DR. WALDEMAR SILVA COSTA – UERJ

Universidade Federal de Pernambuco

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Carlos Teixeira Brandt

VICE-COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvia Caldas Neto

Dedico esta tese

A minha esposa *Graça*, pelo amor e dedicação ao longo de nossas vidas.

Aos nossos filhos, meus tesouros, *Artur* e *Janaína*, pelo carinho e felicidade que nos proporcionam.

A meu pai *Waldemar Rangel (in memoriam)*, por seus ensinamentos e exemplo de caráter, honestidade, dignidade e perseverança.

À minha mãe *Maria da Glória*, por seu amor, exemplo de fé, esperança, bondade e caridade, meu eterno porto seguro.

Aos meus irmãos, *Paulo*, *Glória*, *Waldemar*, *Valderez*, *Sílvia* e *Admilson*, pela feliz convivência fraterna por todos estes anos.

Ao meu neto *Luca*, com amor, carinho e esperança na renovação e na corrida de revezamento que é a vida.

Agradecimentos

Ao professor *Salvador Vilar*, chefe do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina, Centro de Ciências da Saúde da UFPE, exemplo de inventividade e criatividade de pesquisador translacional com várias patentes registradas, orientador desta pesquisa, pelas valiosas colaborações, críticas e sugestões na elaboração desta tese.

Ao professor *Lamartine Aguiar*, Líder do Grupo de Pesquisas – Biopolímero da cana-de-açúcar do Programa de Pós-graduação em cirurgia da UFPE, pesquisador translacional levando sua equipe a ultrapassar o nível da publicação científica em revistas de alto impacto, atingindo o elevado patamar de registro de várias patentes pela UFPE, pelas valiosas colaborações, críticas e rigor metodológico na elaboração desta tese.

Ao professor *Luiz Eduardo de Macedo Cardoso*, por suas valiosas orientações e pelas *Análises Histomorfométricas e Estereológicas* realizadas na Unidade de Pesquisa Urogenital - Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, Departamento de Anatomia, UFRJ.

À professora *Helen Jamil Khoury*, Prof. Titular do Departamento de Energia Nuclear - Laboratório de Metrologia da UFPE, por permitir a esterilização do material (biopolímero) em irradiação gama utilizado neste trabalho.

À Dra *Adriana Ferreira Cruz*, médica veterinária responsável pelo Biotério de Pequenos Animais do Núcleo de Pesquisas Experimentais da UFPE, por sua colaboração sempre solícita, na realização dos procedimentos de anestesia e acompanhamento clínico dos animais.

Ao apoio da *Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina* – UFRPE e a *Polisa-Incubatec Rural* – UFRPE, pela produção e fornecimento do gel do biopolímero da cana-de-açúcar usado na pesquisa.

Aos funcionários do Núcleo Experimental de Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, *Maria Auxiliadora, Maria de Lourdes e Paulo Silva*, pela colaboração na execução deste projeto.

À *Márcia e Mércia*, pela cuidadosa editoração da tese.

Resumo

Introdução: Até o presente não existe um produto que seja biocompatível, inabsorvível, de fácil manipulação, com custo benefício satisfatório para o implante endoscópico para tratamento do refluxo vesicoureteral e da incontinência urinária por insuficiência esfíncteriana uretral. **Objetivos:** Analisar a resposta inflamatória, a biocompatibilidade, a estabilidade, quantificar a fibrose tecidual e a neoformação vascular no hospedeiro, do gel de biopolímero da cana-de-açúcar produzido pela *Zooglea sp* (BCA) e do dextranômero e ácido hialurônico Deflux® implantados em bexigas de coelhos. **Método:** Vinte coelhos, divididos em dois grupos de dez animais, receberam implantes na bexiga e foram submetidos à eutanásia após três dias e três meses. Cada animal recebeu dois implantes do Deflux® na metade anterior direita da bexiga, e dois implantes do biopolímero BCA na metade anterior esquerda da bexiga. Após a eutanásia dos animais e remoção da bexiga, um retângulo de tecido, medindo 1 x 1 cm, foi recortado em cada um dos implantes. Foram utilizadas técnicas histoquímicas de coloração Hematoxilina e Eosina para evidenciar infiltrados celulares e vasos sanguíneos, Resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação com oxona (fibras do sistema elástico) e Tricrômico de Masson e Picro Sirius (colágeno). Técnicas imunohistoquímicas de Avidina Biotina e o anti-corpo monoclonal anti-alfa actina para caracterização das células de músculo liso. Para a realização de controles negativos, o anticorpo primário foi substituído por PBS. A revelação da imunomarcação foi feita com solução de 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloreto. **Resultados:** O implante do Deflux® foi envolvido por uma cápsula fibrosa. O gel do Deflux® encontrava-se fragmentado em pequenas áreas, as quais eram homogêneas em sua organização e livres de células e vasos sanguíneos em seu interior. A suposição é que o implante do gel do Deflux® é um material imunologicamente inerte. O implante do gel do biopolímero da cana-de-açúcar, observou-se que o gel foi bem colonizado por matriz celular e vasos sanguíneos, um infiltrado inflamatório é visível em algumas áreas. Ainda, o implante foi envolvido por uma cápsula de fibrose. Diferentes áreas do gel do BCA mostram uma matriz fibrosa extracelular, embora sessões coradas pelo método tricrômico de Masson e Picro-Sirius sob luz polarizada, tenha mostrado uma pequena quantidade de colágeno, ou ausência do mesmo no gel do BCA. O gel foi metabolizado ou estava em metabolização pelas células. Por outro lado, existiam poucas áreas no total do implante, com o gel homogeneamente distribuído, quase toda sua extensão foi invadida por células ou vasos sanguíneos. **Conclusão:** Os achados sugerem que o biopolímero da cana-de-açúcar é biocompatível, integra-se ao tecido hospedeiro, permanecendo no local implantado. Sugerem que o gel induz um processo de remodelação e será substituído por tecido conjuntivo. A análise do terceiro grupo de animais após 12 meses do implante poderá confirmar a remodelação do implante com aumento do tecido residual, permitindo confirmar a estabilidade do implante no longo prazo. Esta pesquisa translacional visa o desenvolvimento de um novo produto para implante endoscópico para o tratamento do refluxo vesicoureteral e da incontinência urinária com custo/benefício favorável, possibilitando acesso às novas técnicas, usuários da rede pública de saúde.

Palavras-chave: Refluxo vesicoureteral. Incontinência urinária de esforço. Biocompatibilidade.



Abstract

Introduction: To date, no single ideal agent fulfills the requisites of being biocompatible, non-absorbable and easy to handle at a satisfactory cost-to-benefit ratio to be employed as an endoscopically injectable implant agent in the treatment of vesicoureteral reflux and urinary incontinence secondary to urethral sphincter insufficiency. **Objectives:** To evaluate the inflammatory response, biocompatibility and stability and to quantify fibrosis and neovascularization in host tissue after treatment with the sugarcane derived biopolymer gel manufactured by Zooglea sp (BCA) in comparison to dextranomers plus hyaluronic acid (Deflux®) as injection agents in rabbit urinary bladder implants. **Methods:** Twenty rabbits, divided into two groups of ten animals each, underwent urinary bladder implant placement and were euthanized at 3 days and 3 months post-implant. Each animal received two Deflux® implants in the right anterior half, and two BCA biopolymer implants in the left anterior half of the bladder. Histochemical staining was performed with hematoxylin and eosin (H&E) to reveal cellular infiltrates and blood vessels, Weigert's resorcin fuchsin with oxon (elastic fibers) and Masson's trichrome and picosirius (collagen). Avidin-biotin Immunohistochemistry was performed with an anti-alpha actin primary antibody to characterize smooth muscle cells. Negative controls were performed with PBS used in place of the primary antibody. The reaction signal was developed with a 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) solution. **Results:** Deflux® implants were clearly involved by a fibrous capsule. The Deflux® gel was found to scatter into small homogeneously organized areas lacking cells and blood vessels. The assumption is that Deflux® gel is an immunologically inert material. BCA biopolymer implants were well colonized by cellular matrix and blood vessels and showed areas of clearly visible inflammatory infiltrates. Furthermore, the implants were completely involved by a fibrous capsule. The BCA gel itself presented two patterns of organization. Several areas showed a fibrous extracellular matrix on H&E stain. Examination of these areas with Masson's trichrome and Picosirius stain under polarized light revealed minimal to absent collagen within the BCA polymer. The gel had been or was in the process of being metabolized by the cells. On the other hand, a few areas within the implant showed homogeneous distribution of the gel which was almost entirely invaded by cells or blood vessels. **Conclusion:** These findings suggest that the BCA polymer has a favorable biocompatibility profile, it integrates into the host tissue and remains at the injection site. The histopathological data suggest that the BCA gel induces a remodeling process and is replaced by connective tissue. Analysis of a third animal group at 12 months post-implant could confirm remodeling with increase of residual tissue and would allow assessment of long term implant stability. This translational research effort aims at developing a novel material to be used in endoscopic implants with a more favorable biocompatibility profile and cost-benefit ratio. Ultimately, such agent would grant access to modern treatment modalities to low income patients and beneficiaries of the "Sistema Unico de Saude".

Keywords: Vesicoureteral reflux. Urinary incontinence. Bulking agent. Biocompatibility.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Avaliação histológica preliminar dos implantes corados em Hematoxilina-Eosina (HE) no grupo G1, 3 dias após implante de Biopolímero da cana-de-açúcar e Deflux®.	47
Tabela 2	Avaliação histológica dos implantes corados em Hematoxilina-Eosina (HE) no grupo G2, 90 dias após implante de Biopolímero da cana-de-açúcar) e (Deflux®).	49
Tabela 3	Avaliação histológica dos implantes corados pela técnica de Resorcina-fucsina de Weigert no grupo G 2, 90 dias após implante de Biopolímero da cana-de-açúcar e Deflux®.	51
Tabela 4	Avaliação histológica dos implantes corados pelas técnicas histológicas de Tricrômico de Masson e Picro Sirius no grupo G 2, 90 dias após implante de Biopolímero da cana-de-açúcar e Deflux®.	52
Tabela 5	Avaliação da reação de contenção dos implantes corados pela técnica histológica de Hematoxilina-Eosina (HE) e segundo o grupo G 2, 90 dias após implante de Biopolímero da cana-de-açúcar e Deflux®.	53

Lista de Ilustrações

Figura 1	Técnica de implante endoscópico para tratamento do refluxo vesicoureteral	18
Figura 2	Técnica de implante endoscópico para tratamento da incontinência urinária.	19
Figura 3	Fórmula química da celulose	26
Figura 4	Fluxograma de coleta de dados	33
Figura 5	Apresentação do Set de (BCA) “A” e do gel do Deflux® “B”, nas respectivas embalagens.	36
Figura 6	Seringas c/ gel de BCA “A”, c/ gel Deflux® “B”.	36
Figura 7	Posicionamento do animal na mesa cirúrgica e do cirurgião durante o procedimento	38
Figura 8	Estudo Anátomotopográfico da Bexiga para definição dos locais dos implantes	38
Figura 9	Realização do implante na bexiga do coelho.	39
Figura 10	Diagrama com a padronização dos locais dos implantes na bexiga dos coelhos	40
Figura 11	Foto implante com pontos marcadores na bexiga	41
Figura 12	Sistema de testes M-42. Este sistema tem 21 linhas curtas com tamanho conhecido (d) e dois pontos-teste em cada extremidade (Pp 42 pontos no total) ⁴⁹	44
Figura 13	Corte histológico de porção da bexiga na área sem implante, corada por hematoxilina-eosina (HE) no grupo G1 três dias após implante	47
Figura 14	Biopolímero de cana-de-açúcar (A) três dias após o implante, corado em Hematoxilina-Eosina. Aumento 400X.	48

Figura 15	Biopolímero de cana-de-açúcar (A) três dias após o implante, corado em Alpha-Actina. Aumento 200X	48
Figura 16	Deflux® (A) três dias após o implante, corado em Hematoxilina-Eosina. Aumento 400X	49
Figura 17	Biopolímero de cana-de-açúcar três meses após o implante, corado em hematoxilina-eosina. Aumento 200 X	50
Figura 18	Biopolímero de cana-de-açúcar três meses após o implante, corado em hematoxilina-eosina. Aumento 200X	50
Figura 19	Deflux® (D) três meses após o implante, corado em Alpha-Actina. Aumento 200X	51
Figura 20	Biopolímero de cana-de-açúcar (B) três meses após o implante, corado em Masson. Aumento 200X	52
Figura 21	Implante do Deflux® (D) após três meses, corado em Masson.	53
Figura 22	Um ano após o implante subfacial em abdome de rato do gel do biopolímero da cana-de açúcar (Cellulosic Exopolysaccharida) “CE”, e de gordura “ Adipous Tissue ”. Observar a redução do volume do implante de gordura em comparação ao implante do biopolímero da cana-de-açúcar ⁴⁵ .	56

Lista de Abreviaturas e Siglas

BCA	Biopolímero da cana-de-açúcar
DPO	Dias de pós-operatório
GEP	Grupo de coelhos que receberam os implantes na bexiga e foram submetidos à eutanásia precoce, após 48 horas do implante
GET	Grupo de coelhos que receberam implantes na bexiga e foram submetidos à eutanásia tardia, após 90 dias do implante
IU	Incontinência urinária
IUE	Incontinência urinária de esforço
ICS	International Continence Society,
NCE	Núcleo de Cirurgia Experimental
RVU	Refluxo vesicouretral
®	marca registrada
U\$	Dólar americano
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Refluxo vésicoureteral	16
1.2	A incontinência urinária feminina	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	LITERATURA	22
3.1	Materiais	22
3.2	Deflux®	25
3.3	Biopolímero	26
3.4	Biopolímero da cana-de açúcar	28
3.5	Estereologia	29
4	MÉTODO	32
4.1	População de estudo	32
4.2	Desenho de estudo	32
4.3	Fluxograma da coleta de dados	33
4.4	Elenco de variáveis	34
4.4.1	Variáveis Independentes	34
4.4.2	Variáveis Dependentes	34
4.5	Procedimentos	35
4.5.1	Preparo do material empregado no estudo	35
4.5.2	Procedimento anestésico	37
4.5.3	Procedimento cirúrgico	37
4.5.4	Padronização dos locais dos implantes na bexiga	39
4.5.5	Eutanásia	41
4.5.6	Preparo do material para histologia	42
4.6	Estudo histomorfométrico	42
4.7	Técnicas histológicas	43

4.7.1	Histoquímica	43
4.7.2	Imunohistoquímica	43
4.8	Estudo estereológico	44
4.9	Densidade vascular	45
4.10	Aspectos éticos	46
5	RESULTADOS	47
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS	67
	Anexo 1. Protocolo para uso de animais experimentais	67
	Anexo 2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	72
	Anexo 3. Resumos publicados advindos da pesquisa	73



Introdução

1.1 Refluxo vésicoureteral

O refluxo vesicoureteral (RVU) é considerado uma das doenças mais importantes em uropediatria, principalmente pelo seu impacto, pois, se não for diagnosticado e tratado adequadamente, pode evoluir com danos renais irreversíveis como a insuficiência renal terminal. É um evento anormal que acontece quando há o retorno da urina da bexiga para o trato urinário superior, por incompetência do sistema valvular da junção ureterovesical devido a uma anomalia isolada e congênita do sistema valvular anti-refluxo, ou secundário a uma anomalia adquirida que afeta este sistema¹.

O refluxo vesicoureteral é uma das doenças mais comuns da urologia pediátrica, apresentando alta incidência em crianças portadoras de infecção urinária².

Em estudo sobre a evolução do refluxo vesicoureteral em crianças no primeiro ano de vida, foram avaliados, retrospectivamente, os prontuários de 814 portadores de RVU, dos quais 363 apresentavam idade menor que 12 meses no momento do diagnóstico. Os autores concluem que a taxa de resolução espontânea do RVU é alta, justificando o tratamento clínico como conduta inicial desse grupo. As indicações de cirurgia devem ser individualizadas³.

Em estudo avaliando a taxa de resolução espontânea do refluxo vesicoureteral nas crianças brasileiras, numa experiência de trinta anos, os autores concluem que apesar do uso da ultrassonografia como *screening* pré-natal, muitas crianças no Brasil, ainda tem o diagnóstico do RVU, após a ocorrência da infecção do trato urinário. O dano renal pode estar associado a algum grau de refluxo e pode ser inicialmente diagnosticado em qualquer idade, porém, mais da metade das lesões, são observadas em refluxo de alto grau (IV e V). A incidência da morbidade relatada pelo refluxo nas crianças tem diminuído significativamente nas últimas três décadas⁴.



As consequências do RVU são múltiplas, principalmente a infecção. O refluxo não é ocasionado pela infecção, mas esta sim, pela estase ureterovesical. O risco é levar a infecção até o parênquima renal causando lesões graves com cicatrizes no parênquima denominadas nefropatia do refluxo².

A infecção urinária recidivante é o quadro clínico mais frequente encontrado em crianças portadoras de refluxo vésico ureteral (90% dos casos). Os outros 10% são crianças nas quais deve-se pesquisar de outras doenças como estenose da JUP e litíase. A infecção urinária é fator freqüente que leva à descoberta do RVU; estima-se que 35% de todas as crianças com infecção urinária sintomática apresentam o RVU. Em crianças assintomáticas o RVU é diagnosticado em 0,5% a 1% dos pacientes. A frequência com que se diagnostica o RVU na criança varia inversamente com a idade. O refluxo associado à infecção urinária é comum em crianças jovens; foi observado em 70% de crianças menores de um ano, 25% das menores de quatro anos, 15% das menores de 12 anos e 5% dos adultos¹.

O diagnóstico do RVU habitualmente é feito com o uso de ultrassom ou urografia excretora para avaliação do trato urinário alto e uretrocistografia ou cistografia para avaliar a bexiga, ureteres e uretra.

O tratamento pode ser clínico, endoscópico ou cirúrgico. O tratamento endoscópico consiste na injeção submucosa de uma substância que funcionará como um agente de preenchimento “bulking agent”, que promoverá um alongamento do trajeto ureteral submucoso, melhorando o mecanismo valvular antirefluxo.

Técnica endoscópica – Por meio de uma agulha endoscópica introduzida através do cistoscópio, dirigida para o óstio ureteral, perfura-se a mucosa em sua porção posterior. A seguir injeta-se a substância em quantidade suficiente para ocluir a visão do meato, re-estabelecendo o mecanismo valvular anti-refluxo.



Figura 1: Técnica de implante endoscópico para tratamento do refluxo vésico ureteral. (Observar o implante do agente de preenchimento “bulking”, refazendo o mecanismo valvular anti-refluxo).

O tratamento cirúrgico está indicado quando ocorre anomalias orificiais importantes, quando há doenças associadas ou quando não se controla a infecção. O princípio de todas as técnicas cirúrgicas é o de recriar um trajeto submucoso mais longo, para restabelecer um sistema valvular competente.

1.2 A incontinência urinária feminina

A incontinência urinária feminina atinge milhões de mulheres e tem alta prevalência no mundo, chegando a 28% em alguns países da Europa. A prevalência global da incontinência urinária de esforço feminina varia de 10 a 15% das mulheres adultas⁵.

Trata-se, portanto, de um problema de saúde pública que afeta a autoestima, levando ao isolamento social e repercutindo sobre a qualidade de vida das mulheres.

A incontinência urinária de esforço (IUE) é a perda involuntária de urina resultante de qualquer atividade ou esforço como tossir, espirrar ou até mesmo sorrir, é uma situação bastante comum na população feminina e traz repercussões físicas, psicológicas e sociais às mulheres por ela acometidas. Deve-se ao aumento da pressão intra-abdominal, que transmitida à bexiga, excede a pressão de fechamento (coaptação) da uretra, ocasionando a perda urinária⁶.

A IUE ocorre por perda do suporte anatômico ao nível da uretra e da bexiga o que ocasiona a hipermobilidade uretral, causa mais freqüente de IUE, atingindo 90% dos casos. Outra causa menos freqüente de IUE é a insuficiência intrínseca do esfíncter uretral (10% dos casos), devido à perda de coaptação da mucosa, decorrente do baixo nível estrogênico, na menopausa. Cirurgias prévias para correção da IUE, mielodisplasia e lesão neurológica, também estão associadas à insuficiência intrínseca do esfíncter uretral.

O padrão ouro para a correção da incontinência urinária de esforço, é a cirurgia de *Sling* suburetral, tanto por hipermobilidade do colo vesical quanto por insuficiência esfíncteriana uretral. Entretanto a cirurgia de *Sling* apresenta um índice de falha em torno de 5% a 7%⁷. Nestes casos uma boa alternativa é a aplicação de um agente de preenchimento (implante) através da injeção periuretral, por tratar-se de um procedimento minimamente invasivo com bons índices de cura.

O tratamento endoscópico da incontinência urinária por insuficiência esfíncteriana é feito com implante de um agente de preenchimento *bulking*, através de injeções peri-uretrais. Utiliza-se uma substância que fará o preenchimento da submucosa uretral, produzindo a coaptação da uretra, aumentando a resistência uretral e corrigindo a insuficiência esfíncteriana uretral, e conseguinte a incontinência urinária de esforço.

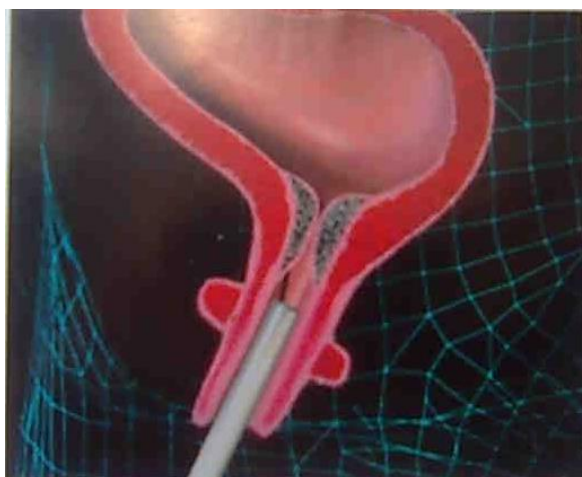


Figura 2: Técnica de implante endoscópico para tratamento da incontinência urinária⁷. (Observar a coaptação da uretra pelo implante com agente de preenchimento “bulking”).



As técnicas de injeção periuretral foram desenvolvidas objetivando simplificar ainda mais o tratamento da incontinência urinária por insuficiência esfinteriana uretral, e diferentes substâncias tem sido utilizadas na injeção periuretral com custos e resultados variáveis. Melhor seleção, durabilidade e efetividade do tratamento no longo prazo podem determinar no futuro próximo o agente ideal.

A substância ideal para funcionar como um agente de preenchimento (implante expensor), tanto para produzir o mecanismo antirefluxo como no tratamento do refluxo vesicoureteral, quanto como expensor para a correção da incontinência urinária pela coaptação uretral, deve ser biocompatível, não estimular reação do tipo corpo estranho, não causar alergias, não ser carcinogênico, não ser degradável, de fácil manipulação, e apresentar relação custo-benefício satisfatória.

Até o presente não existe um agente ideal que preencha os requisitos acima descritos, tanto para o tratamento endoscópico do refluxo vesicoureteral, quanto para o tratamento da incontinência urinária por insuficiência esfinteriana uretral⁸.

Pesquisas com novas substâncias, melhor seleção de pacientes, podem determinar num futuro próximo o agente ideal com durabilidade e efetividade do tratamento no longo prazo.



2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta histológica do implante do gel do biopolímero de melão de cana de açúcar injetados na submucosa da bexiga de coelhos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a resposta inflamatória tecidual do hospedeiro ao gel do BCA e Deflux®, implantados na bexiga de coelhos.
- b) Avaliar a biocompatibilidade por meio de técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas do gel do BCA e do dextranômero e ácido hialurônico Deflux®, implantados na bexiga de coelhos;
- c) Avaliar a estabilidade por meio de análise histomorfométrica do gel do BCA e do Deflux®, implantados na bexiga de coelhos.



3 Literatura

3.1 Materiais

Vários materiais têm sido utilizados para injeção periureteral no tratamento do refluxo vésicoureteral RVU e tratamento da incontinência urinária de esforço (IUE) por insuficiência esfinteriana uretral.

O polytetrafluoroethylene (Teflon) foi utilizado pela primeira vez por Berg⁹ em 1973 e popularizado por Politano et al¹⁰ em 1974, com resultados que variaram de 33 a 86% de cura ou melhora.

Autores injetando teflon nos tecidos periuretrais de cadelas e macacas, encontraram migração de partículas para linfonodos pélvicos, pulmão, rim, cérebro e para o baço¹¹. Granuloma de teflon foi encontrado no pulmão de um paciente que se submeteu a três injeções de teflon, e, posteriormente, à autópsia, após suicídio¹². O teflon não foi aprovado para utilização pelo FDA nos EUA, pela possibilidade de migração à distância.

Pesquisadores injetaram gordura autóloga próxima ao colo vesical, em pacientes com incontinência urinária de esforço, tendo como vantagem a biodisponibilidade, ausência de custos e a fácil administração. Esse procedimento é realizado por lipoaspiração da parede abdominal. Segundos eles referiram excelente resultado inicial após quatro meses de seguimento, porém mostrou desalento com o método, pois somente 23% das pacientes encontravam-se continentes após um ano de segmento (1)¹³.

A injeção de gordura autóloga tem sido realizada com resultados que variam de 42 a 65% de cura ou melhora da incontinência urinária. Porém os resultados no longo prazo não são mantidos, devido à reabsorção da gordura pelo organismo, o que ocasiona a perda dos benefícios do tratamento inicial. Em um estudo na Unicamp, trinta mulheres incontinentes, foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo recebeu uma única injeção de gordura autóloga e, o segundo grupo, injeções a



cada três meses. Após um ano de seguimento obtiveram taxa de cura de 64% no segundo grupo, contra 31% no primeiro⁷.

Na Escola Paulista de Medicina foi empregado o lisado de colágeno bovino, principalmente em pacientes idosas, naquelas sem condições clínico-cirúrgicas ou que não desejavam ser operadas, e os resultados demonstraram uma melhora na qualidade de vida com diminuição do uso de protetores higiênicos, perdas com volumes urinários menores. Os resultados foram decrescendo com o passar do tempo¹⁴.

A injeção de colágeno peri-uretral é uma opção terapêutica com resultados entre 82 a 94% de melhora e cura. Porém a reabsorção do colágeno tem ocasionado resultados menos duradouros no seguimento de longo prazo, e conseqüentemente há necessidade de novas aplicações, elevando o custo do tratamento¹⁵.

Mioblastos injetados na uretra e na bexiga de ratas, desencadeam uma menor reação inflamatória e permanência superior, comparativamente ao colágeno bovino. Estes autores acreditam que injeções de mioblastos possam aumentar a coaptação e a pressão do fechamento uretral melhorando a incontinência urinária⁸.

O carbono pirolítico é usado há muito tempo no meio médico especialmente em cirurgia cardíaca. Sua apresentação para uso injetável contém esferas com aproximadamente 200 a 500µm de diâmetro, isso significa que as partículas são suficientemente grandes para não serem fagocitadas e também impede sua migração a distância.

Em um estudo prospectivo, foram avaliados 52 pacientes, com incontinência urinaria. Foram divididas em dois grupos. Metade recebeu implantes de carbono pirolítico Durasphere®, e o outro grupo implantes de Contingen® (colágeno bovino). Após um segmento médio de 2.8 anos, 80% das pacientes com Durasphere® e 62% das pacientes com Contingen® apresentaram melhora da incontinência. No longo prazo 40% das pacientes implantadas com Durasphere® permaneciam secas, contra apenas 14% das que receberam o implante do contigen¹⁶.



Durasphere® foi utilizado em pacientes que apresentaram pielonefrites por refluxo vesicoureteral, após transplante renal. Oito pacientes foram tratados com injeção subureteral, e destes seis 75% ficaram livres das infecções após um segmento médio de vinte e quatro meses. Os autores concluíram que o tratamento é seguro, minimamente invasivo, e pode ser a primeira opção de tratamento nestes pacientes transplantados¹⁷.

O Durasphere® é uma opção terapêutica com resultados de melhora e cura, o implante não migra e não é fagocitado pelos macrófagos, porém o elevadíssimo custo torna o seu uso proibitivo em pacientes com poucos recursos, ou do sistema público de saúde.

A aplicação de microesferas de dextrananômeros, medindo 80 a 120µm em solução fisiológica de cloreto de sódio, e ácido hialurônico estabelecido a 1% (DiHA) foi realizado por autores que advogam que a substância não é imunogênica. É biologicamente compatível, pois é produzida pela fermentação de bactérias, não sendo observada migração. Obtiveram cura objetiva ou melhora em 17 pacientes das vinte tratadas¹⁸. Após vários ensaios clínicos este produto foi colocado comercialmente no mercado com nome de Deflux®.

O dextranômero e ácido hialurônico Deflux®, o mais utilizado no presente, apresenta resultados de melhora e cura no médio prazo, porém seu custo também é elevado o que limita o seu uso, principalmente pelos pacientes com menos recursos financeiros e usuários do sistema público de saúde.

Chertin et al¹⁹, publicaram recentemente uma revisão de suas experiências, e uma revisão da literatura, do tratamento endoscópico do refluxo vésicoureteral com uso de diferentes substâncias como agentes de preenchimento “bulking”, nos últimos vinte anos. Encontraram resultados semelhantes no tratamento do RVU no curto prazo, com varias substâncias, similar ao sucesso relatado com a cirurgia aberta. Recentemente, face à notificação de alta recorrência do RVU no longo prazo, especificamente com uso do Deflux®, os autores indicam a necessidade de futuras pesquisas com substâncias alternativas. Concluem neste trabalho que infelizmente, há uma escassez significativa de evidências na literatura em relação ao segmento no



longo prazo dos resultados do tratamento do RVU com varias substâncias. Afirmam que não há duvidas da alta recorrência com uso do implante do Deflux®, e há provavelmente a falta de avaliação apropriada, considerando a eficácia no longo prazo de outros materiais/substâncias de preenchimento “bulking”¹⁹.

Diferentes substâncias tem sido utilizadas na injeção peri-uretral com custos e resultados variáveis. Melhor seleção, durabilidade e efetividade do tratamento no longo prazo podem determinar no futuro próximo o agente ideal.

3.2 Deflux®

O Deflux® é um gel estéril e altamente viscoso, composto por 50mg de microesferas de dextranômero e 15mg de ácido hialurônico, não animal, estabilizado em solução fisiológica de cloreto de sódio q.s., constituindo um implante biocompatível e biodegradável para o tratamento do refluxo vésico-ureteral e da incontinência urinária de esforço por insuficiência esfínteriana uretral. O ácido hialurônico estabilizado atua predominantemente como transportador deixando as microesferas de dextranômeros no local do implante. Essas são gradualmente envolvidas pelo tecido conjuntivo do hospedeiro. O Deflux® encontra-se disponível em seringas contendo 1mL do gel. Fabricado pelo Laboratório Q-Med AB, Seminariegatan em Uppsala Suécia e importado pela Q-Med Brasil, com um custo aproximado de U\$ 1.000,00 (mil dólares) por cada ampola de 1mL do gel. Utiliza-se pelo menos três ampolas para cada tratamento do refluxo ureterovesical ou da incontinência urinária de esforço. O Deflux® tem sido utilizado largamente nestes tratamentos, sendo considerada atualmente a substância padrão-ouro para implantes^{17,19}.

3.3 Biopolímero

Os biopolímeros são moléculas de alto peso molecular constituídas pela repetição de unidades fundamentais organizadas numa seqüência e produzidas por várias espécies de sistemas biológicos²⁰.

A celulose constitui um dos polímeros mais encontrados na natureza, presente em 40% a 50% em quase todas as plantas. Outras fontes de celulose em menor proporção, são as bactérias, algas marinhas, fibras de frutos, como algodão e gramíneas como bagaço de cana, bambu. Ainda podem existir na forma de celulose artificial como a *viscose* e o *rayon*²¹.

A estrutura e as propriedades mecânicas da celulose bacteriana diferem da celulose produzida a partir das plantas, apesar de ambas possuírem a mesma composição química básica, caracterizada por ser um polímero constituído de um grande número de unidades repetidas constituídas da polimerização da D-glicose (um açúcar simples monossacarídeo – hexose). A designação D refere-se à posição do grupo hidroxila (OH) localizada à direita do átomo de carbono (C), assimétrico, mais distante do grupo aldeído (figura 3). Esses polímeros podem ser classificados em homopolímeros, quando as unidades são idênticas, e heteropolímeros quando as unidades são compostas por dois ou mais tipos de monômeros²².

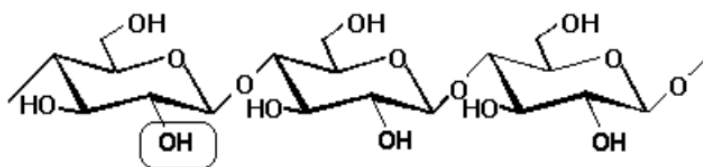


Figura 3: Fórmula química da celulose²²

Quando comparada a celulose extraída das plantas, a celulose bacteriana possui propriedades mecânicas mais fortes no que diz respeito à resistência, melhor capacidade de retenção hídrica, tornando possível moldá-la durante a sua síntese, além da alta biocompatibilidade e cristalinidade. Diferente da primeira, a celulose bacteriana é altamente pura e livre de componentes biogênicos (lignina, pectina entre outros). Outra característica importante dos biopolímeros de origem bacteriana é seu



alto grau de regularidade, estando isento de flutuações de ordem climática ou sazonal²³.

Nos últimos anos o interesse pela celulose produzida por via microbiológica vem aumentando em virtude das numerosas aplicações comerciais desse biopolímero, como alternativa a fabricação de pele artificial, diafragmas acústicos, membranas de filtros e na cicatrização de feridas^{23,24}. 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 próteses²⁵, substituindo órgãos ociosos como: ureter, traqueia, tubo digestivo e ainda na reconstrução de bainhas de nervos, substituto da duramater e reparo de hérnias²⁶⁻³².

Na Ásia, a celulose bacteriana em sua forma desintegrada tem sido usada na alimentação, como agente espessante, e na dieta, sob forma de fibras suplementares³³.

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-negativas, cujo representante mais importante é o *Acetobacter xylinus*^{25,34}.

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 hospedeiro³⁵. 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 cartilagosos³⁶.



3.4 Biopolímero da cana-de açúcar

Na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina – UFRPE foi isolado uma bactéria produtora de polímero à partir do melaço. No Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) foi classificada como *Zooglea sp*, capaz de produzir um exopolissacarídeo em meio constituído por melaço de cana-de-açúcar, identificado como “Biopolímero da Cana-de-Açúcar” (BCA). A estrutura química desse biopolímero é constituída por diferentes monossacarídeos: glicose 87,57%, xilose 8,58%, ribose 1,68%, ácido glicurônico 0,83%, manose 0,82%, arabinose 0,37%, galactose 0,13%, ramnose 0,01%, fucose 0,01%^{23,24}.

Coelho et al³⁷ foram os primeiros a testar na área de saúde, o biopolímero da cana-de-açúcar, em seu estado bruto, envolvido em meio de cultura desidratado (melaço da cana-de-açúcar) para cicatrização de feridas cutâneas em animais, demonstrando um aumento do tecido de granulação, controle da infecção e diminuição do tempo de cicatrização. O biopolímero “*in natura*”, constituído de açúcares, forma uma película estável que, em contato com as secreções da ferida, libera uma quantidade de açúcar capaz de aumentar a concentração do meio e torná-lo hiperosmolar. Essa liberação se processa de forma gradual, de acordo com a presença do exudato da ferida, por conta da estabilidade da membrana, diferente do que acontece quando se usa açúcar nas feridas infectadas, quando este é rapidamente diluído em consequência da ação higroscópica, o que explica a necessidade de várias aplicações ao dia para o efeito ser mantido.

Em seu estado de pureza, o biopolímero, apresenta baixa citotoxicidade, boa biocompatibilidade, elasticidade, resistência à tração, flexibilidade e ainda pode ser moldado em diferentes formas, preenchendo assim as condições necessárias para manufatura de produtos para implantes biológicos^{38,39}.

O grupo de pesquisas interdisciplinar, Biopolímero da Cana-de-Açúcar, foi criado com o objetivo de desenvolver estudos sobre as características físico-químicas dessa membrana celulósica e sua utilização na área de saúde.



Na área de cirurgia experimental no Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE) da UFPE, as membranas do biopolímero foram utilizadas como remendos em lesões de estômago e bexiga induzida em animais^{40,41}.

Em 2005 o biopolímero de melão foi identificado como substitutos de produtos biológicos com boa tolerabilidade, produzindo pequeno grau de reação inflamatória⁴².

Em diferentes ensaios foram definidas a aplicação experimental do biopolímero da cana-de-açúcar como substituto de enxerto na miringoplastia⁴³, como enxerto vascular^{44,45}, no tratamento da incontinência urinária através de *sling*⁴⁶, realização de uretroplastia⁴⁷, reconstituição de túnica albugínea⁴⁸, tratamento do refluxo vésico-uretral⁴⁹ e o curativo após cirurgia de hipospádia⁴².

3.5 Estereologia

Estereologia é um termo utilizado para descrever métodos que permitem o acesso a informações tridimensionais baseadas em estruturas seccionais bidimensionais nas quais, são utilizados, como princípios básicos, procedimentos da geometria e da teoria das probabilidades⁴³.

A morfometria trabalha com estruturas bidimensionais e determina comprimentos, perímetros e áreas, enquanto que a estereologia estima densidades.

Entre as medidas mais empregadas estão densidade volumétrica (VV), densidade por comprimento (Lv - length density), densidade de superfície (Sv) e densidade numérica (Nv). Todos estes cálculos são estimados por modelos que utilizam o conhecimento estatístico, incluindo o tamanho das amostras, a randomização e a isotropia[♦].

[♦]Isotropia: Qualidade de algum meio ou material que consiste em terem as mesmas propriedades físicas em todas as direções



O objetivo da amostragem na estereologia é obter a eficiência, ou seja, a maior quantidade de informação estrutural com o menor esforço e baixo custo: “fazer mais por menos”⁴³.

A natureza da estrutura estudada não interfere no método, uma vez que o método se utiliza da quantificação da mesma para descrevê-la e compará-la entre si.

Na estereologia a estrutura a ser quantificada é apresentada sob a forma bidimensional como uma lâmina proveniente de uma amostra de tecido, cortado à partir de um bloco de parafina ou de uma estrutura anatômica macroscópica disposta em cortes sargitais ou longitudinais, realizado por tomógrafo computadorizado ou ressonância nuclear magnética. Essa abordagem produz cortes de espessura variadas a depender do tamanho da estrutura e do objetivo do estudo. Os cortes podem variar de centímetros a nanômetros⁴³.

O maior desafio da estereologia consiste na perda da dimensão. Uma estrutura tridimensional (3D) se torna uma área bidimensional (superfície 2D), que, por sua vez, se torna uma linha (1D). Esta linha (1D) se transforma em um ponto (0D) e um número de pontos é perdido gerando a perda na dimensão estrutural. Contudo, o progresso e sofisticação dos métodos estatísticos permitiram uma solução para esse problema^{50,51}.

A estereologia, quando utilizada para estudo da interação implante/prótese-hospedeiro, permite o estudo quantitativo das seguintes fases: processo inflamatório agudo, persistência deste processo ao longo do tempo processo inflamatório crônico e, por fim, a degradação ou não da prótese pelo hospedeiro⁵¹.

Modificações no volume (densidade volumétrica) original da implante/prótese implantada podem prover informações sobre a degradação da mesma e o método simples de contagem de pontos permite o acesso a essa informação⁵¹.

A densidade por comprimento é utilizada na estereologia para avaliar quantitativamente a extensão da angiogênese, o que é muito útil ao estudo da resposta de cicatrização entre o hospedeiro e o implante/prótese⁵¹. A densidade



numérica é a medida utilizada pela estereologia para quantificação das células inflamatórias em termos de presença/ausência e frequência das mesmas. Este parâmetro avalia a natureza da inflamação e a integração hospedeiro-prótese, tanto na fase aguda (neutrófilos e monócitos) como na fase crônica (macrófagos)^{50,51}.

A resposta da cicatrização também ativa a migração de fibroblastos a deposição colágeno e a neoformação capilar. A análise da espessura e qualidade dessa camada revela a reação implante/prótese-hospedeiro)^{50,51}.

O estudo estereológico necessita de linhas testes, pontos e moldura que compõem um sistema-teste que, usualmente, tem uma linha – comprimento conhecida (Lt), pontos totais (Pt) e área-teste (At)⁵⁰.

Qualquer sistema teste precisa ser superposto a uma imagem e isso pode ser montado dentro de uma ótica do microscópio ou pelo desenho em acetato que se sobreponha ao monitor para receber imagens do vídeo-microscópio. É preciso contar as linhas e pontos que toquem a estrutura tecidual ou os números de objetos dentro da moldura para conseguir informação suficiente para as fórmulas estereológicas^{50,51}.



4 Método

4.1 População de estudo

A população de estudo foi composta de coelhos adultos da raça (linhagem) Califórnia com idade média de seis meses, adquiridos de criador particular. Após exame clínico médico veterinário, foram colocados em quarentena no biotério no Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE) da UFPE.

Os coelhos foram mantidos no biotério do NCE, em gaiolas apropriadas, individuais e conjuntas, permitindo a socialização dos animais ocupantes das diversas estantes, em ambiente climatizado, com temperatura mantida em torno de 23° C, e exaustão forçada. Foram alimentados com ração apropriada*, e mantidos em ambiente livre de ruídos e estresse, com foto-período de 12 horas, controlado por temporizador, respeitando-se os ciclos diurnos e noturnos, conforme os princípios que regem o Código de Ética Experimental e as leis de proteção aos animais de acordo com as normas vigentes no Brasil, e os princípios éticos da Experimentação Animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 Desenho de estudo

O desenho do estudo enquadrrou-se na tipologia de ensaio biológico ou dos estudos de intervenção ou experimentais, que constituem um tipo especial de estudo de coorte⁵². Neste estudo 20 animais foram alocados, mediante randomização, em dois grupos:

G1 : 10 coelhos que receberam implantes na bexiga do Deflux® e do BCA e foram submetidos à eutanásia precoce, após três dias após implante;

* Ração industrial especial para coelhos marca Labina®



G2 : 10 coelhos que receberam implantes na bexiga do Deflux® e do BCA e foram submetidos à eutanásia tardia, 90 dias após implante.

4.3 Fluxograma da coleta de dados

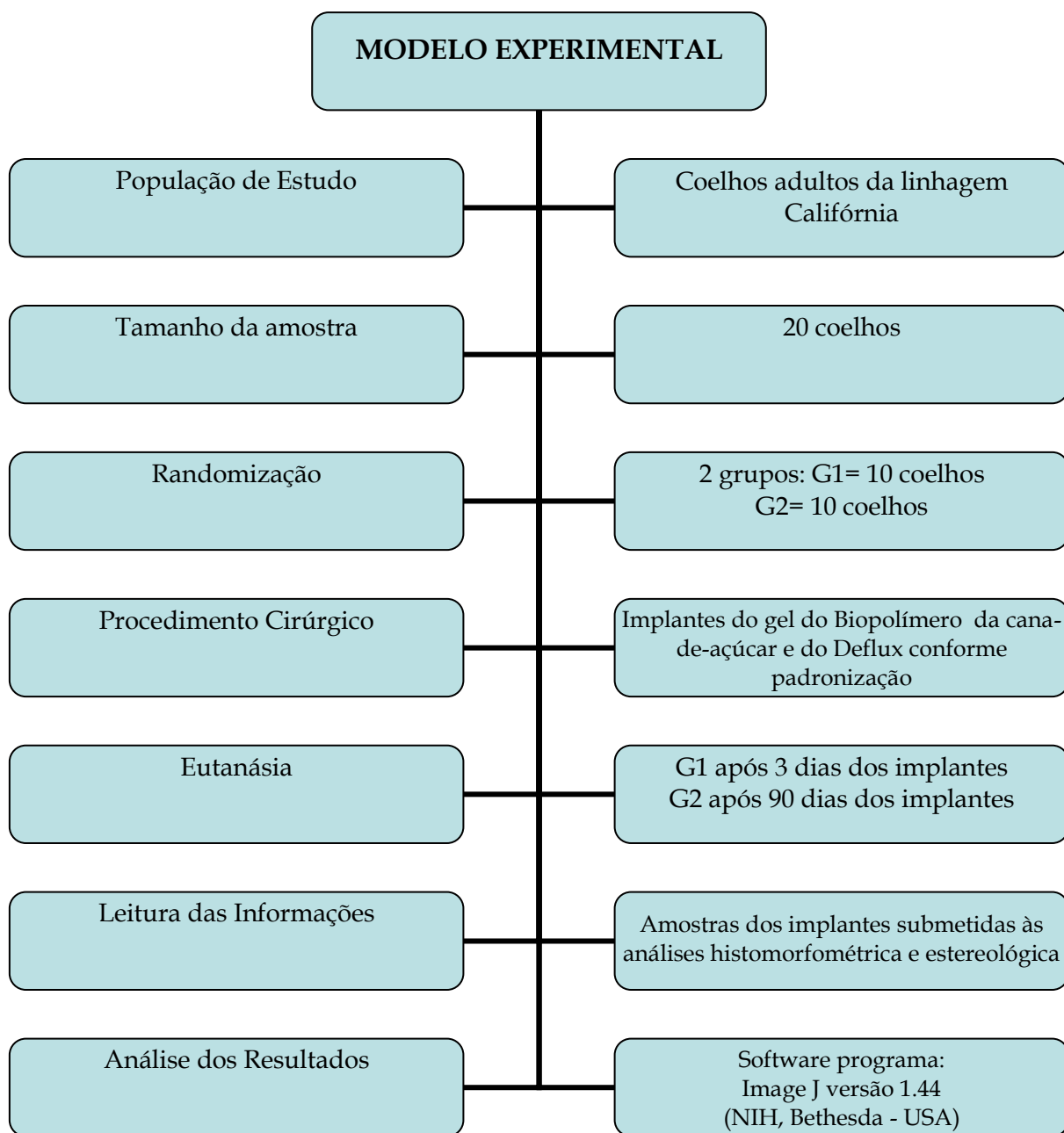


Figura 4: Fluxograma de coleta de dados



4.4 Elenco de variáveis

4.4.1 Variáveis independentes

Nome da variável	Definição / categorização
Implante	Gel do biopolímero da cana-de-açúcar
	Deflux® - dextranômero em ácido hialurônico

4.4.2 Variáveis dependentes

Nome da variável	Definição / categorização
Histológicas Quantitativas	
Densidade volumétrica do colágeno	Densidade por volume médio de fibra visualizada em campo de microscopia com aumento 10x expressa em percentagem (%) calculada através da técnica estereológica.
Número de células gigantes por campo	Quantidade de células gigantes por campo em aumento de 400x.
Número de neovasos por campo	Quantidade de neovasos por campo em aumento de 400x.
Histológicas Qualitativas	
Incorporação	Processo caracterizado pela infiltração de fibras de colágeno e células inflamatórias no implante em toda sua extensão (Sim/Não).
Encapsulação	Processo caracterizado pela formação de um invólucro inflamatório em torno do implante (Sim/Não).



4.5 Procedimentos

O experimento foi executado pelo autor, com o apoio do orientador e do líder do grupo de pesquisa, e com assistência da médica veterinária, no Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE, no período de abril a setembro de 2010.

4.5.1 Preparo do material empregado no estudo

O gel do biopolímero da cana-de açúcar foi desenvolvido e produzido pelo Grupo de Pesquisa Biopolímero da cana-de-açúcar no Laboratório de Biopolímeros da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O gel foi processado a partir de um exopolissacarídeo, obtido por síntese a partir de melaço de cana-de-açúcar através de um processo de fermentação pela bactéria *Zooglea SP*. Após tratamento e hidratação do exopolissacarídeo, o gel foi obtido, analisado e disponibilizado para pesquisas.

O gel é apresentado em seringas plásticas de 1mL e 5 mL, estas seringas foram devidamente acondicionadas em envelopes grau cirúrgico, que foram selados e esterilizados por irradiação gama.

O gel do Deflux® foi adquirido do representante comercial da Q-MED no Brasil. O gel do Deflux®, vem acondicionado em seringa estéril em envelope lacrado.



Figura 5: Apresentação do Set de BCA "A" e do gel do Deflux® "B", nas respectivas embalagens.

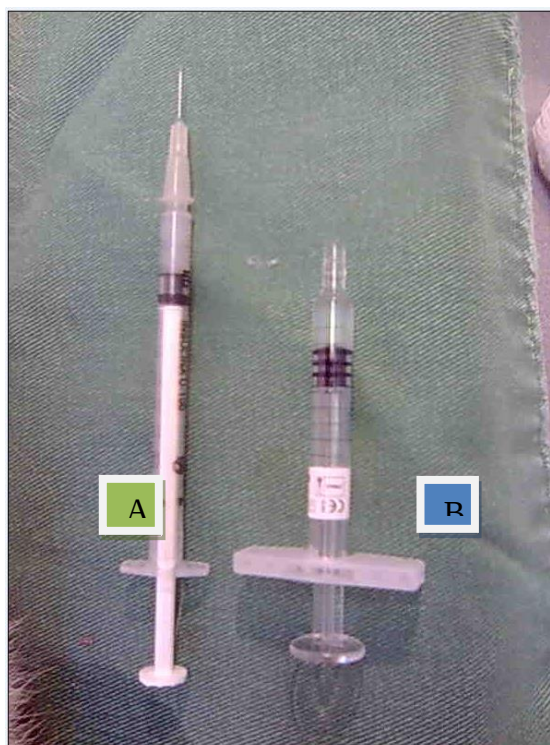


Figura 6: Seringas com gel de BCA "A", com gel Deflux® "B".



4.5.2 Procedimento anestésico

O procedimento anestésico foi realizado pela médica veterinária do NCE da UFPE, que utilizou como drogas pré-anestésicas a atropina 0,25% (0,44mg/Kg por via IM), aplicada 10 minutos antes da cirurgia. Para anestesia, foi utilizado uma solução de drogas composta de: 1ml de ketamina 25% 50mg + 1ml de xilazina a 2%. Foi administrado por via intramuscular (IM) 0,2 mL dessa solução por 100g de peso corporal do animal⁵². Durante o procedimento cirúrgico-anestésico, foi administrado oxigênio (0,5ml/minuto) através de máscara. Esse procedimento permitiu uma anestesia satisfatória para o tempo cirúrgico necessário. No pós-operatório, como analgesia foi utilizado dipirona sódica, três gotas por via oral.

4.5.3 Procedimento cirúrgico

Após a administração da anestesia e a tricotomia da região abdominal, os animais foram levados à sala de cirurgia, e devidamente posicionados na mesa operatória, com fixação dos membros com fita cardíaca e colocação de máscara de oxigênio. Em seguida realizou-se a antissepsia com polivinilpirrolidona e aposição dos campos cirúrgicos. Em todos os animais repetiu-se os mesmos procedimentos.

Procedeu-se a incisão abdominal mediana longitudinal, com aproximadamente 10 centímetros de comprimento, observando-se os planos anatômicos, realizou-se a abertura da cavidade abdominal.

Foi realizado o procedimento de exteriorização da bexiga com observação de sua anatomia e identificado o vaso do plexo venoso central que faz o delineamento anatômico virtual da bexiga em dois segmentos, direito e esquerdo, desse modo, facilitando bastante a localização topográfica para a realização sistematizada dos implantes na bexiga.



Figura 7: Posicionamento do animal na mesa cirúrgica e do cirurgião durante o procedimento.



Figura 8: Estudo Anátomotopográfico da Bexiga para definição dos locais dos implantes

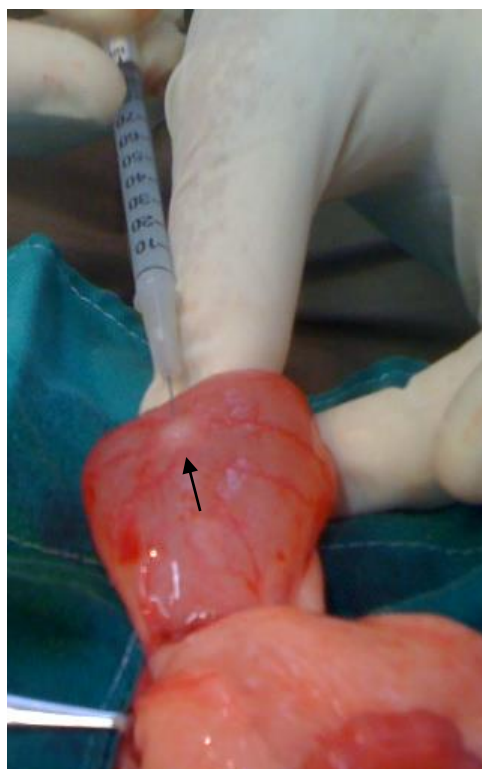


Figura 9: Realização do implante na bexiga do coelho. Observar uma dilatação (formação de uma pápula) na extremidade da agulha

4.5.4 Padronização dos locais dos implantes na bexiga

Para sistematizar a realização dos implantes, e facilitar a sua localização, por ocasião da eutanásia, e ainda, para não haver confusão ou troca de amostras. Tomando-se como referência o plexo venoso central (*linha vermelha do diagrama, fig.10*), que divide anatomicamente a bexiga em duas partes iguais, ficou estabelecido que os implantes do gel do biopolímero da cana-de-açúcar seriam feitos no lado esquerdo da bexiga, (*círculos amarelos à esquerda, no diagrama*), e que os implantes do Deflux® seriam feitos do lado direito da bexiga (*círculos amarelos à direita no diagrama*).

Ficou sistematizado que os implantes seriam colocados paralelamente, e no sentido longitudinal, ao plexo venoso central da bexiga, sendo colocados pontos com

fios de prolene 4-0, como marcadores, entre os implantes, e nos extremos de uma linha imaginária passando pelos mesmos, paralela ao plexo venoso central.

Deste modo, cada coelho recebeu um total de quatro implantes, dois do biopolímero à esquerda, e dois do Deflux® à direita. Assim, cada coelho tornou-se controle dele próprio, haja vista, que o mesmo coelho, recebeu implantes como (caso estudo), do biopolímero (BCA), e recebeu implantes do Deflux® como (caso controle), dele próprio.

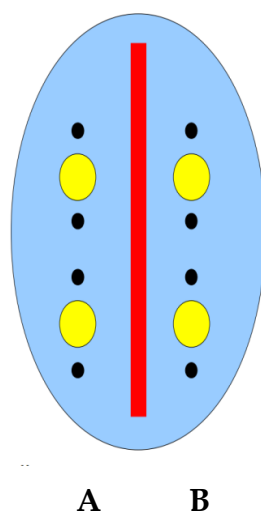


Figura 10: Diagrama com a padronização dos locais dos implantes na bexiga o diagrama mostra um esquema da face anterior da bexiga de coelho, que apresenta o plexo venoso central (linha vermelha). São mostrados os implantes (círculos amarelos) de biopolímero da cana-de-açúcar (à esquerda do plexo) **A**, e Deflux® (à direita do plexo) **B**. Os pontos negros representam segmentos de fios de sutura, deixados como marcadores definindo a posição dos implantes.

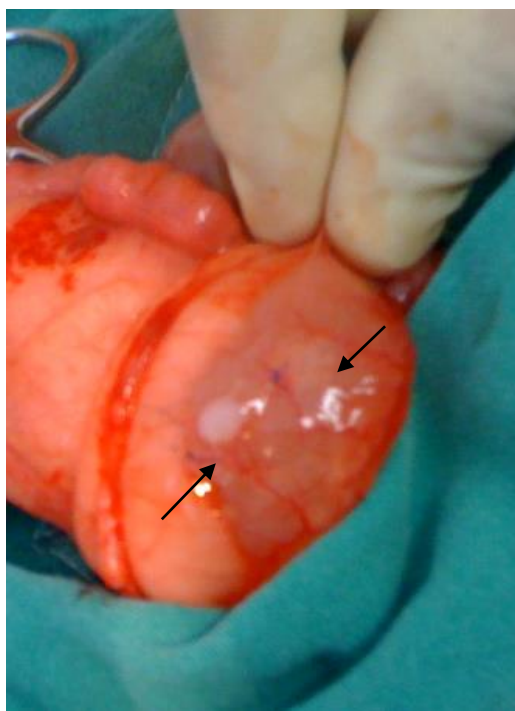


Figura 11: Foto implante com pontos marcadores na bexiga

4.5.5 Eutanásia

A eutanásia do grupo G1, ocorreu três dias após a realização dos implantes do gel do BCA e do Deflux® nas bexigas dos coelhos, grupo de eutanásia precoce (GEP), e no grupo G2, ocorreu após 90 dias após a realização dos implantes do gel do BCA e do Deflux® nas bexigas, grupo de eutanásia tardia (GET).

Os animais foram anestesiados, segundo o mesmo protocolo, descrito no procedimento anestésico, e, posteriormente, foi administrado por via intracardíaca, dose letal de Thiopentax® sódico*.

* Thiopentax, Laboratório Cristália-BR



4.5.6 Preparo do material para histologia

Após a eutanásia dos animais e remoção da bexiga, um quadrado de tecido, medindo aproximadamente 1 x 1cm, interessando todos os planos da paraede da bexiga, foi recortado para cada um dos implantes. De um grupo controle com animais com idade e peso semelhantes aos animais implantados, foi coletado amostras do tecido da bexiga em semelhança aos obtidos dos grupos experimentais.

As amostras foram aplicadas sobre um papel e fixadas em formaldeído a 5% tamponado com 1% de glicerina. Após a fixação as amostras foram clivadas no meio de modo a dividir a área do implante em duas metades iguais. Cada uma dessas metades foi incluída em parafina com a face clivada voltada para baixo mostrando toda extensão da parede da bexiga, do urotélio à serosa. Foram confeccionadas lâminas e coradas pelas técnicas de Hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e Picro-Sirius para estudo histológico

4.6 Estudo histomorfométrico

Os estudos histomorfométrico e estereológico foram realizados na Unidade de Pesquisa Urogenital, no Departamento de Anatomia da Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ.



4.7 Técnicas histológicas

Os blocos de parafina contendo fragmentos de bexiga foram seccionados em cortes com a espessura de 5 μm , os quais foram corados por técnicas para estudo histoquímico e imunohistoquímico. Fotografias digitais foram obtidas a partir desses cortes utilizando uma câmara fotográfica (DP71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX51, Olympus). Todas as fotos foram originalmente capturadas no formato TIFF, e convertidas para JPEG a fim de diminuir o tamanho dos arquivos. A perda de qualidade, no entanto, não prejudicou a análise.

4.7.1 Histoquímica

Foram utilizadas técnicas de coloração: (a) Hematoxilina e Eosina (HE) para evidenciar infiltrados celulares e vasos sanguíneos; (b) Resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação com oxona para estudar fibras elásticas; e (c) Tricrômico de Masson e Picro Sirius para avaliar o colágeno.

4.7.2 Imunohistoquímica

Células de músculo liso foram caracterizadas utilizando-se a técnica de Avidina Biotina e o anti-corpo monoclonal anti-alfa actina (Zymed Laboratories, 08-0106 predilute antibody, Carlsbad, CA, USA). Para a obtenção de controles negativos, o anticorpo primário foi substituído por PBS. A revelação da imunomarcagem foi feita com solução de 3,3-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) (Zymed Laboratórios, 002014) a 0,1% em H_2O_2 . Os cortes foram então lavados em água destilada, desidratados em uma série crescente de etanol, diafanizados em xilol, e montados com Ethelan.

4.8 Estudo estereológico

A estereologia foi utilizada para estudo da interação implante/hospedeiro, permitindo o estudo quantitativo das fases do processo inflamatório agudo, persistência deste processo ao longo do tempo (processo inflamatório crônico) e, por fim, a incorporação ou não dos implantes pelo hospedeiro.

As modificações no volume (densidade volumétrica) original dos implantes do biopolímero BCA e do Deflux[®] nos dará informações sobre a degradação ou não, dos mesmos, ao longo do tempo. Será feito estudo comparativo no futuro, do grupo G2 (com três meses de implante) com o grupo G3 (após um ano dos implantes).

Qualquer sistema teste precisa ser superposto a uma imagem e isso pode ser montado dentro de uma ótica do microscópio ou pelo desenho em acetato que se sobreponhe ao monitor para receber imagens do vídeo-microscópio. É preciso contar as linhas e pontos que toquem a estrutura tecidual ou os números de objetos dentro da moldura para conseguir informação suficiente para as fórmulas estereológicas^{49,50}.

A figura 3 mostra um clássico sistema-teste chamado “multipurpose” ou M-42.

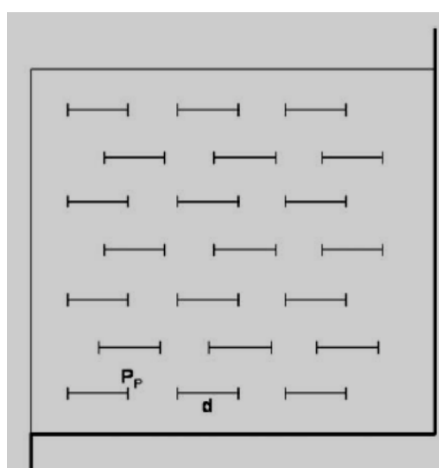


Figura 12: Sistema de testes M-42. Este sistema tem 21 linhas curtas com tamanho conhecido (d) e dois pontos-teste em cada extremidade (P_p 42 pontos no total)⁴⁹



A densidade por comprimento foi utilizada na estereologia para avaliar quantitativamente a extensão da angiogênese, o que será muito útil ao estudo da resposta de cicatrização entre o hospedeiro e os implantes do biopolímero BCA e do Deflux® e compará-los ao longo do tempo após três meses e um ano da realização dos implantes.

A densidade numérica foi utilizada na estereologia para quantificação das células inflamatórias em termos de presença/ausência e frequência das mesmas. Este parâmetro foi usado para estabelecer uma comparação da natureza da inflamação e a integração implante-hospedeiro, tanto na fase aguda neutrófilos e monócitos, como na fase crônica, macrófagos.

A análise estereológica foi utilizada para avaliar a resposta à cicatrização ativa, a deposição de fibroblastos, colágeno e capilares. A análise da espessura e qualidade dessa camada revelando a reação implante/hospedeiro (banco de dados para futura comparação com grupo G3, após um ano dos implantes).

4.9 Densidade vascular

A quantificação dos vasos foi feita em imagens digitais de cortes corados pelo HE e observados com aumento de 200X. Após carregar a imagem no programa ImageJ versão 1.44 (NIH, Bethesda, USA), uma região contígua do implante foi manualmente delimitada e sua área foi medida. Quando o implante ocupava todo o campo, a área da imagem era utilizada. Em seguida, o número de vasos dentro dessa região foi contado usando o plugin "Cell Counter" do ImageJ. O resultado final foi então expresso como densidade, ou seja, número de vasos por unidade de área, milímetros quadrados. Cinco regiões aleatórias e de tamanho semelhante foram analisadas por corte, e cinco cortes foram examinados por animal.



4.10 Aspectos éticos

Esta pesquisa obedeceu aos princípios que regem o Código de Ética Experimental e as leis de proteção aos animais de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e o Decreto nº 3.179 – Art. 17 de 21/09/1999, que trata da questão e normas para prática científica de vivisseção de animais, e o princípios éticos da Experimentação Animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Esta pesquisa foi aprovada em 22/10/2008 pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE) processo nº 23076. 012767 / 2008-69 (anexo 2).

5 Resultados

Tabela 1. Avaliação histológica preliminar dos implantes corados em Hematoxilina-Eosina (HE) no grupo G1, 3 dias após implante de Biopolímero da cana-de-açúcar e Deflux®.

Grupo G1	Imagem amorfa	Invasão celular
Biopolímero	Sim	Não
Deflux®	Sim	Não

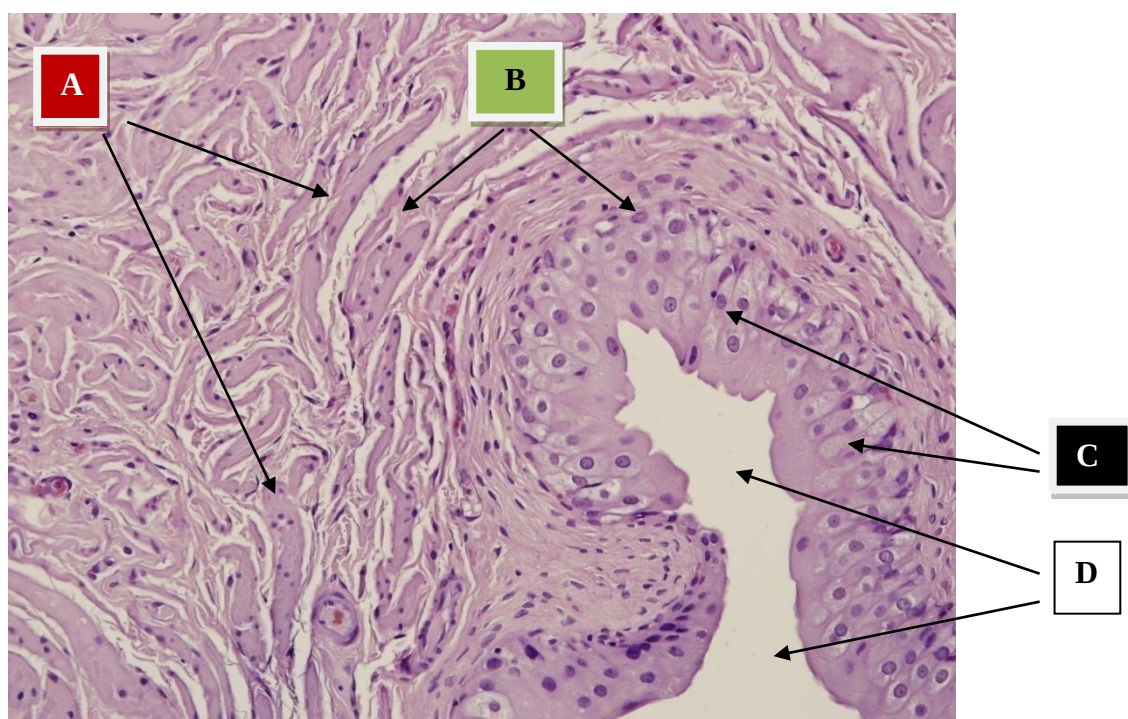


Figura 13: Corte histológico de porção da bexiga na área sem implante, corada por hematoxilina-eosina (HE) no grupo G1 três dias após implante, para mostrar as camadas da parede da bexiga. Observa-se: (A) camada muscular, (B) submucosa, (C) mucosa, (D) luz da bexiga

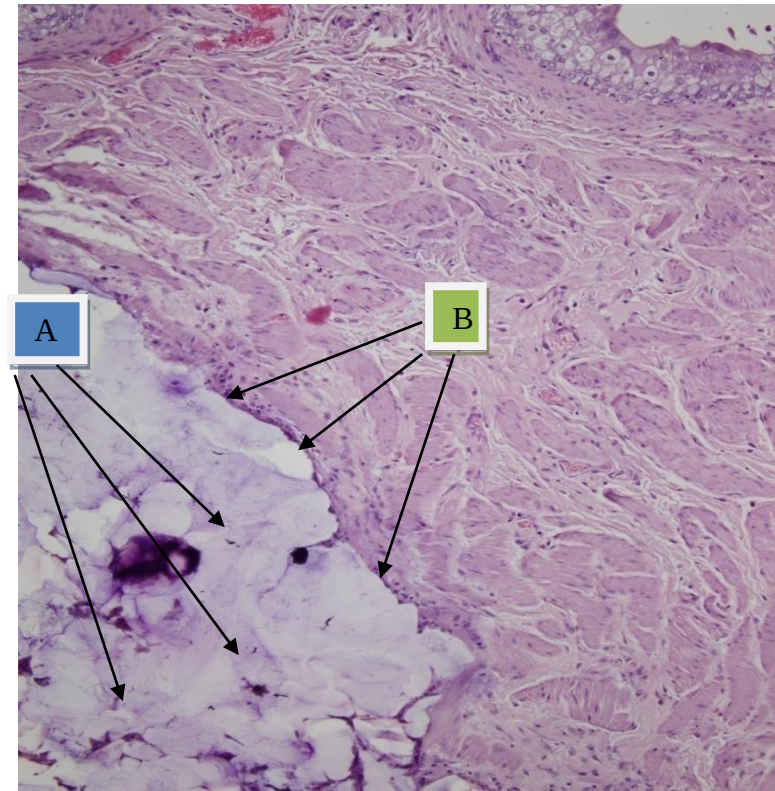


Figura 14: Biopolímero de cana-de-açúcar (A) três dias após o implante, corado em Hematoxilina-Eosina. Observar o aspecto amorfo do implante, e nítido contorno entre o tecido e o material implantado (B) Aumento 400X.

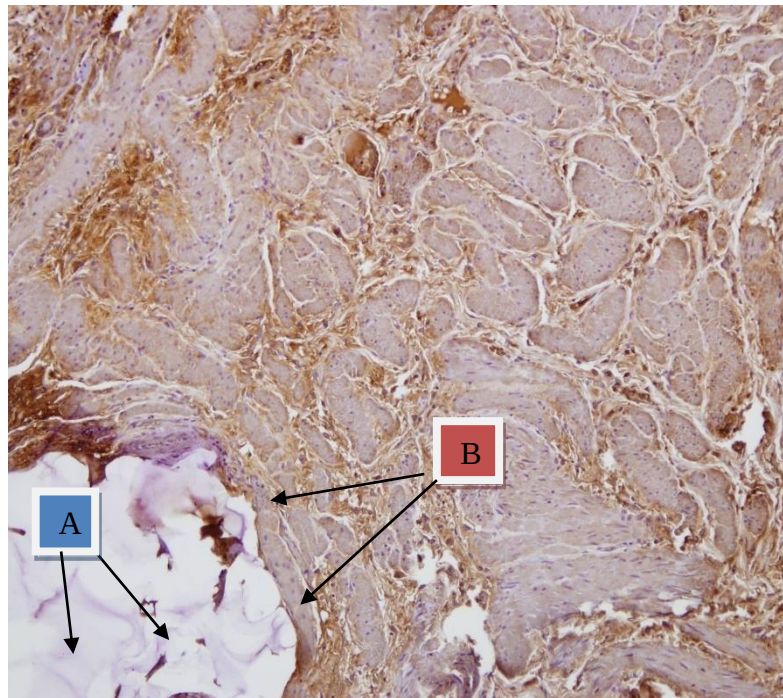


Figura 15: Biopolímero de cana-de-açúcar (A) três dias após o implante, corado em Alpha-Actina. Observar nítido contorno entre o tecido e o material implantado (B) Aumento 200X.

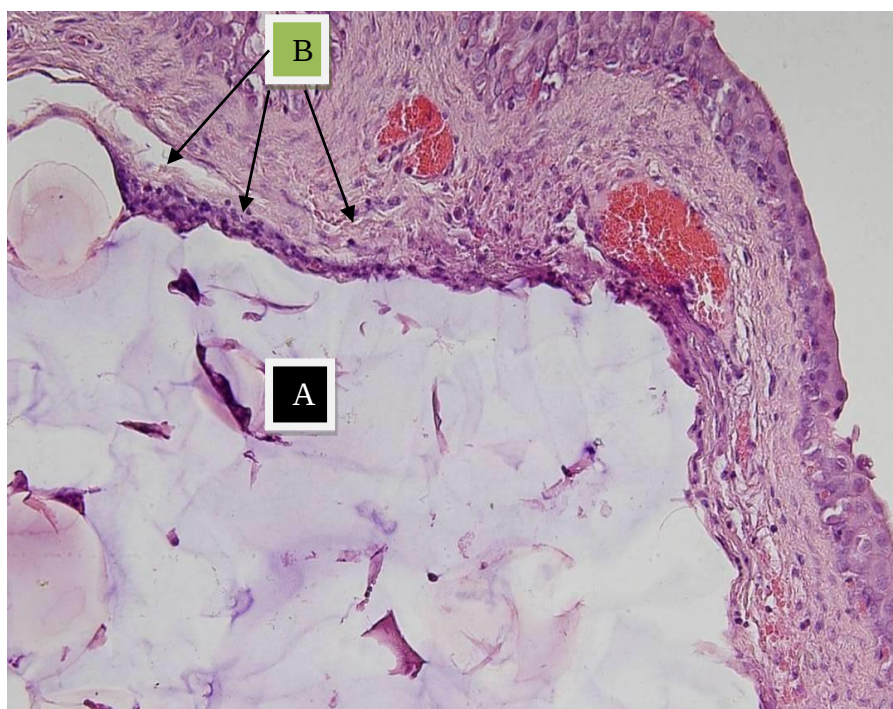


Figura 16: Deflux® (A) três dias após o implante, corado em Hematoxilina-Eosina. Observar em maior aumento 400X o nítido contorno entre o tecido e o material implantado (B).

Tabela 2. Avaliação histológica dos implantes corados em Hematoxilina-Eosina (HE) no grupo G2, 90 dias após implante de Biopolímero da cana-de-açúcar) e (Deflux®).

Grupo G2	Matriz celular	Neoformação vascular
Biopolímero	Sim	Sim
Deflux®	Não	Não

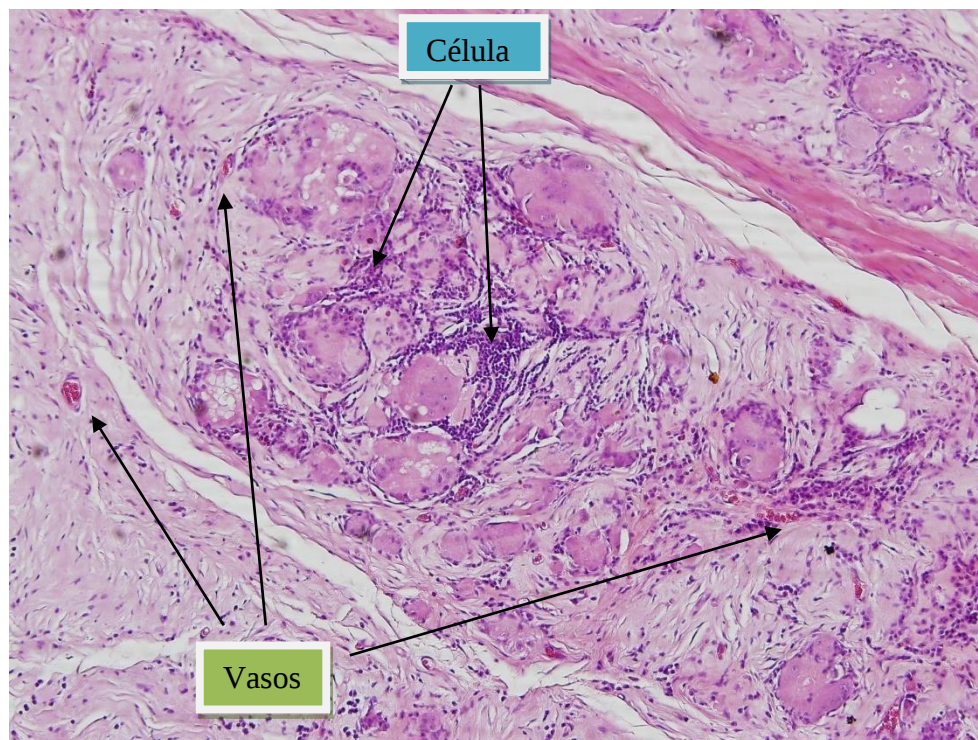


Figura 17 Biopolímero de cana-de-açúcar três meses após o implante, corado em Hematoxilina-Eosina. Observar invasão de células e vasos. Aumento 200 X

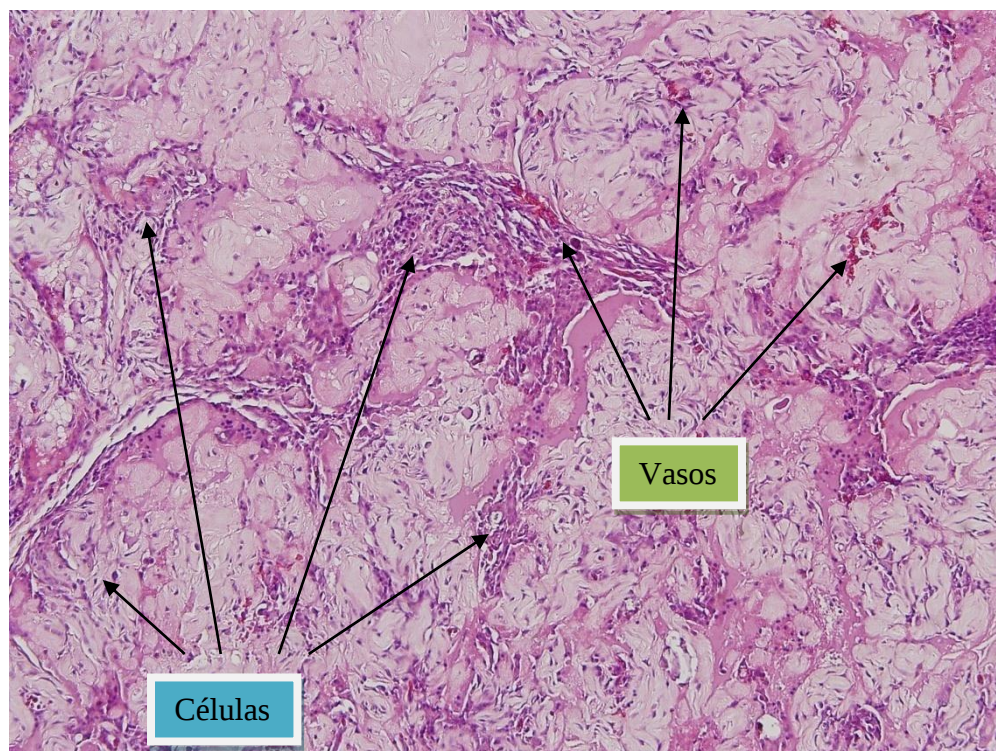


Figura 18 Biopolímero de cana-de-açúcar três meses após o implante, corado em Hematoxilina-Eosina. Observar o arranjo histológico com invasão de células e vasos. Integração ao hospedeiro. Aumento 200 X

Tabela 3. Avaliação histológica dos implantes corados pela técnica de Resorcina-fucsina de Weigert no grupo G 2, 90 dias após implante de Biopolímero da cana-de-açúcar e Deflux®.

Grupo G2	Presença de fibras elásticas
Biopolímero	Não
Deflux®	Não

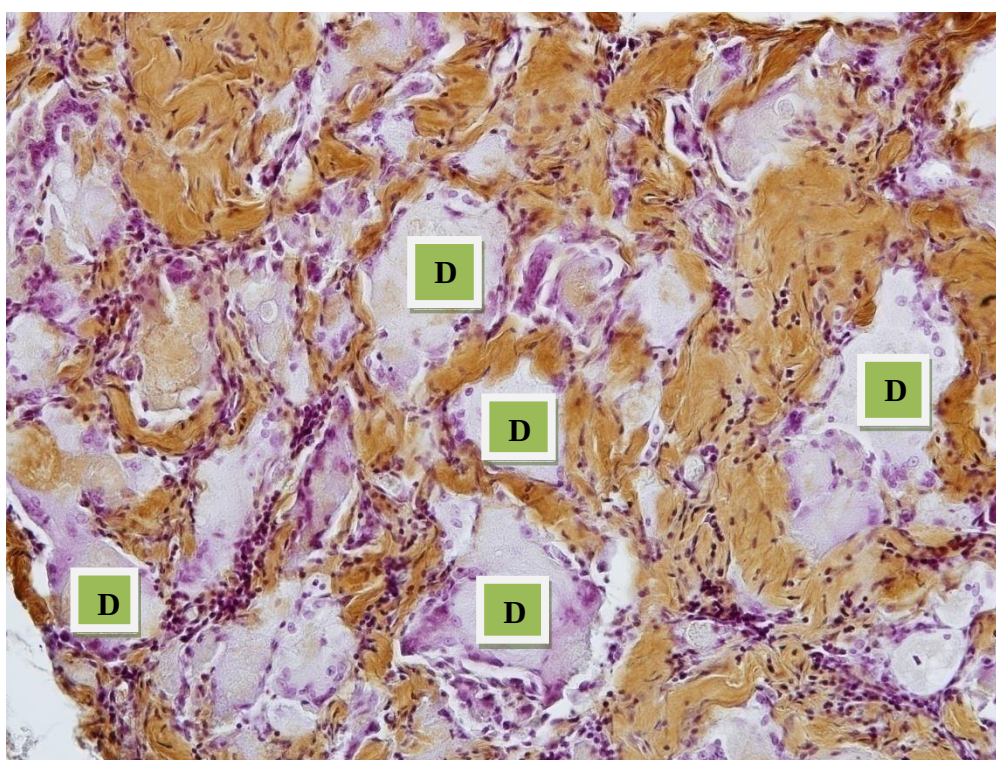


Figura 19: Deflux® (D) três meses após o implante, corado em Alpha-Actina. Observar ausência de células e vasos nos implantes e dispersão da massa polimérica em núcleos amorfos em forma de ilhas, entrecortada por tecido mesenquimal. Aumento 200X.

Tabela 4. Avaliação histológica dos implantes corados pelas técnicas histológicas de Tricrômico de Masson e Picro Sirius no grupo G 2, 90 dias após implante de Biopolímero da cana-de-açúcar e Deflux®.

Grupo G2	Presença de colágeno
Biopolímero	Sim
Deflux®	Não

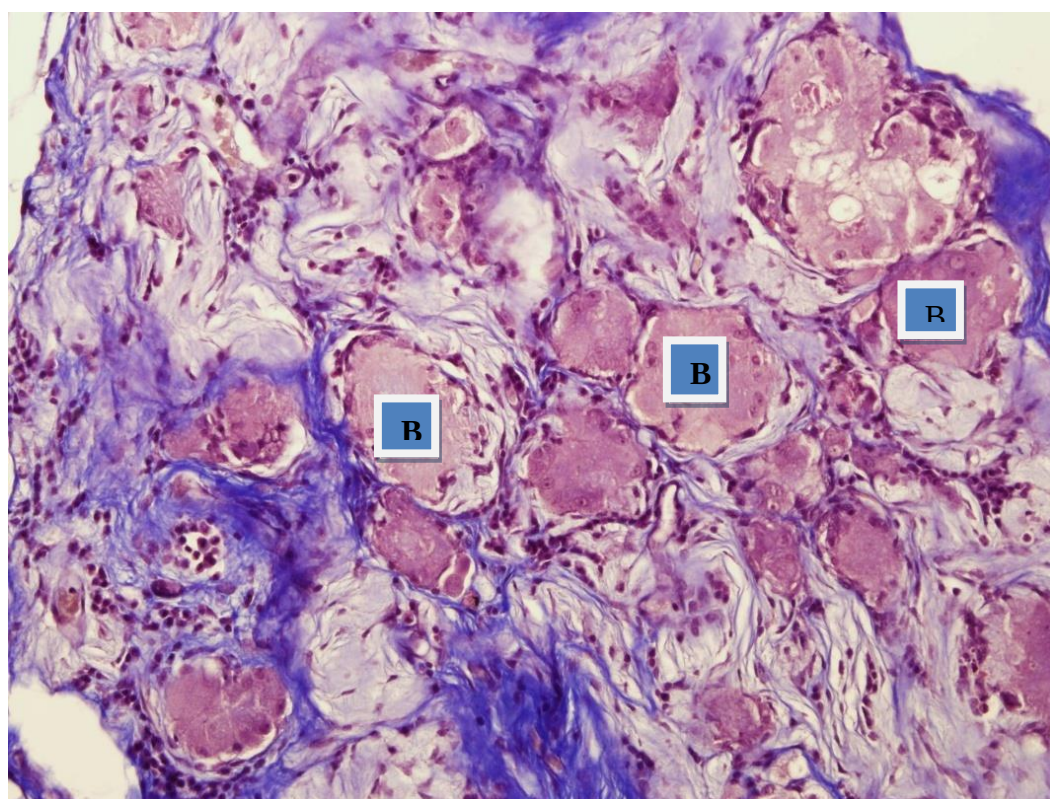


Figura 20: Biopolímero de Cana-de-Açúcar (**B**) três meses após o implante, corado em Masson. Observar invasão de células, colágeno e vasos. Aumento 200X.

Tabela 5. Avaliação da reação de contenção dos implantes corados pela técnica histológica de Hematoxilina-Eosina (HE) e segundo o grupo G 2, 90 dias após implante de Biopolímero da cana-de-açúcar e Deflux®.

Grupo G2	Encapsulamento (fibrose)
Biopolímero	Não
Deflux®	Sim

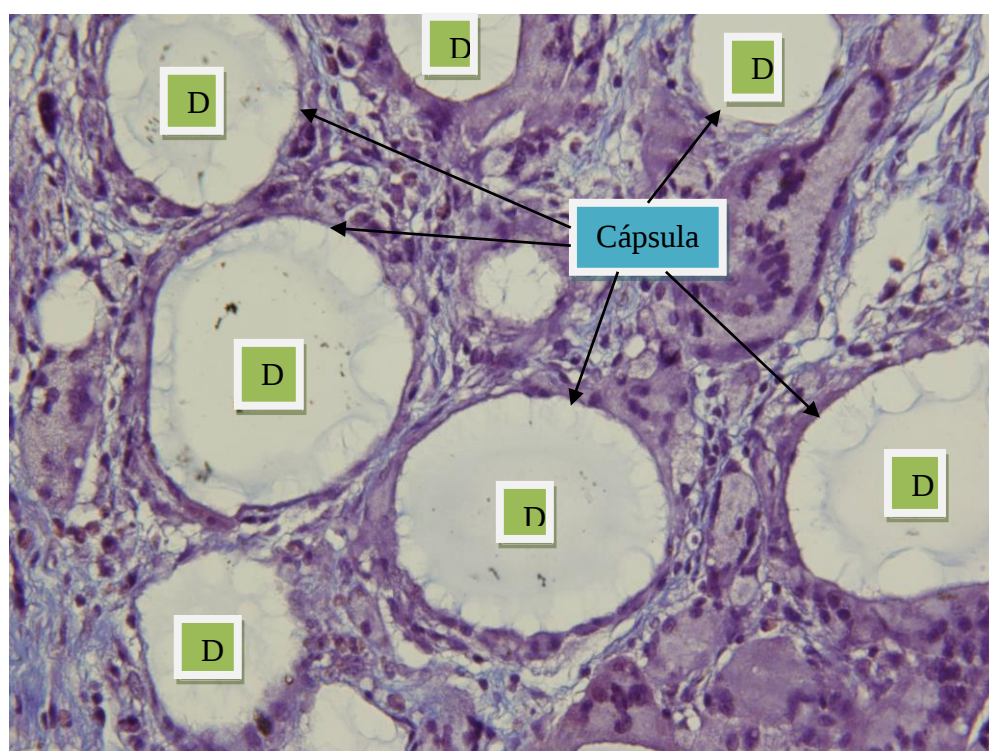


Figura 21: Implante do Deflux® (D) após três meses, corado em Masson. Observar organização estrutural homogênea, não apresentando infiltrado de células, vasos ou matriz extracelular e isolado por uma cápsula fibrosa.



6 Discussão

A análise histológica das lâminas coradas em HE do grupo G1 (após três dias dos implantes) revela uma imagem amorfa semelhante, tanto para os implantes do gel do biopolímero da cana-de-açúcar como para os implantes do Deflux®.

O grupo G2 (após três meses dos implantes), mostrou um arranjo histológico muito diferente entre os dois materiais. No caso dos implantes do gel do biopolímero da cana-de-açúcar, toda a estrutura foi invadida por células e vasos, o mesmo não ocorre nos implantes do gel do Deflux® que se apresentou isolado por uma cápsula fibrosa.

O Deflux® no G2 (três meses dos implantes) permanece praticamente inalterado, consistindo de um material com organização estrutural homogênea e apresentando pouco ou nenhum infiltrado de células, vasos, e matriz extracelular.

A análise das imagens dos implantes do Deflux® mostradas nas figuras 19 e 22 mostra a dispersão da massa polimérica com núcleos amorfos em forma de ilhas, entrecortadas por tecido mesenquimal com vasos e células. Ocorre uma expansão. A função de agente de preenchimento "*bulking*" é função decorrente da permanência no local do material aplicado ou de expansão.

Os dois materiais estudados pela técnica histoquímica de Weigert, específica para corar fibras elásticas, os resultados foram negativos. Pode-se assim dizer que não foi detectada a presença de fibras elásticas nos implantes do biopolímero da cana-de-açúcar, e nos implantes de Deflux®.

À análise histológica observa-se que os implantes do Deflux® no G2 (três meses de implante) permaneceram praticamente inalterados consistindo de um material com organização estrutural homogênea e apresentando pouco ou nenhum infiltrado de células, vasos, e matriz extracelular caracterizando um material essencialmente inerte, sendo assim eficiente como um agente de preenchimento "*bulking agent*". Consequentemente não há variáveis no implante de Deflux que permitisse avaliar e quantificar, com vistas a compará-las com o biopolímero da



cana-de-açúcar. Por esse motivo, a investigação foi direcionando para a análise das alterações qualitativas e quantitativas que ocorreram no biopolímero durante sua integração no tecido. A identificação segura dos componentes teciduais dentro do implante, a neoformação vascular com os marcadores de endotélio, é, portanto, fundamental. Com esse tipo de análise é possível determinar se o biopolímero da cana-de-açúcar é de fato adequado como um agente de preenchimento "bulking agent".

Nessa avaliação temporal do biopolímero, foi importante um "time point" inicial, que foi constituído pelo grupo G1 (3 dias de implante), assim pode-se identificar como foi a conformação original do material. Por outro lado, observou-se que no grupo G2 (3 meses de implante), que o biopolímero sofre uma integração no tecido, mas não se sabe, se isso representa um estágio estável, ou se é apenas um "instantâneo" de um processo que irá continuar. Para responder a esta pergunta, foi constituído um grupo com um ano de implante (G3), que esclarecerá essa questão, mostrando o comportamento dessas alterações ao longo do tempo.

Em experimento anterior, realizado pelo Grupo de Pesquisas - Biopolímero da cana-de-açúcar Departamento de Cirurgia da UFPE, com implante do gel do biopolímero no tecido celular subcutâneo do rato, e em diferentes áreas, não ocorreu redução de volume do implante, após a sua aplicação, mesmo ocorrendo substituição por tecido mesenquimatoso. Já no controle com implante contra lateral de gordura autóloga, implantado no mesmo animal (rato) e no mesmo momento, o material (gordura) foi reabsorvido. Nesse ensaio observamos a preservação do volume de biopolímero da cana-de-açúcar injetado no tecido celular subcutâneo, mesmo ocorrendo processos de biotransformação e remodelação⁴⁵.

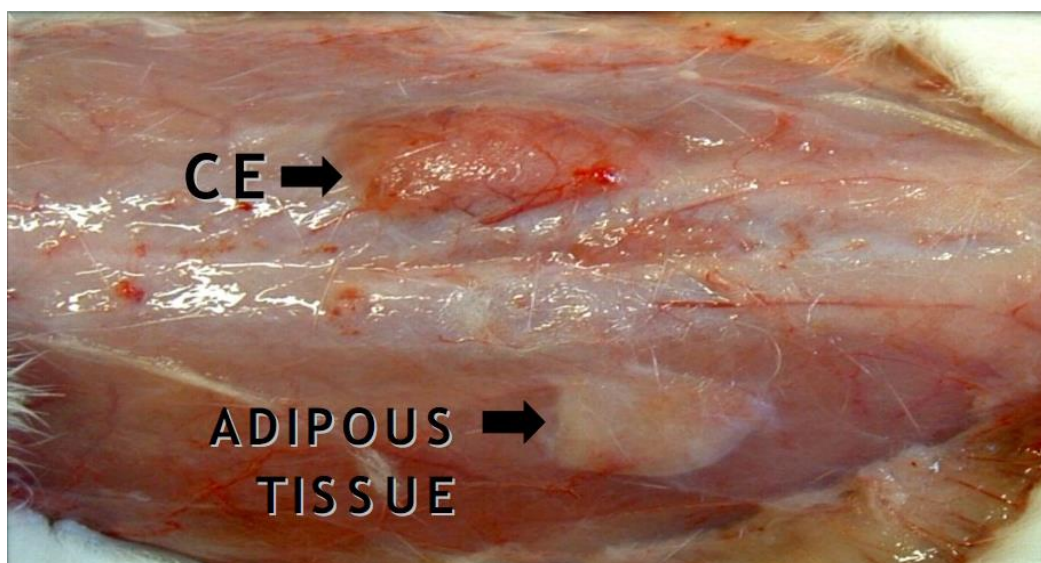


Figura 22: Um ano após o implante subfacial em abdome de rato do gel do biopolímero da cana-de açúcar (Cellulosic Exopolysaccharida) “CE”, e de gordura “Adipous Tissue”. Observar a redução do volume do implante de gordura em comparação ao implante do biopolímero da cana-de-açúcar⁴⁵.

Pela experiência acima relatada e pela revisão da literatura, os implantes de gordura autóloga são reabsorvidos e não funcionam no longo prazo, tem-se então, a perspectiva do biopolímero da cana-de-açúcar⁵⁴.

A injeção de colágeno peri-uretral é uma boa opção terapêutica com resultados entre 82 a 94% de melhora e cura. Porém a reabsorção do colágeno tem ocasionado resultados menos duradouros no seguimento de longo prazo, e conseqüentemente há necessidade de novas aplicações, elevando o custo e a morbidade do tratamento¹⁵.

Em 2010 foi concluída uma revisão da literatura dos últimos vinte anos, com uso dos diferentes substâncias utilizadas com agentes de preenchimento “bulking agent”, no tratamento do refluxo vésico-ureteral (RVU)¹⁹. Os autores revisaram sua própria experiência e da literatura, e observaram que os resultados foram semelhantes tanto tratamento endoscópico quanto na cirurgia aberta no curto prazo. Recentemente, face à notificação da alta recorrência do RVU, especialmente com o uso do Deflux®, faz-se necessário a pesquisa de substâncias alternativas como agentes de preenchimento. Infelizmente não existem evidências na literatura com seguimento de longo prazo após a correção do RVU com várias substâncias. A alta



recorrência do RVU com uso do Deflux®, se deve provavelmente a falta de avaliação a respeito da eficácia de outros agentes de preenchimento no longo prazo. Este fato demanda estudos de longo prazo, além de protocolos de seguimento de tratamentos endoscópicos do RVU e um correto aconselhamento dos familiares a respeito da correção endoscópica¹⁹.

A opção de comparar o implante do biopolímero da cana-de-açúcar (BAC), produzido pela fermentação do melaço da cana pela bactéria *Zooglea sp* com o Deflux®, porque Deflux® é o produto mais utilizado no presente como “bulking agent” no tratamento do refluxo vésico ureteral e incontinência urinária de esforço. O Deflux® segundo Stenberg et al¹⁸ é biologicamente compatível e não é imunogênico, pois é composto por microesferas de dextrananômeros medindo de 80 a 120µm em solução de ácido hialurônico produzido por bactérias. O ácido hialurônico é um biopolímero formado pelo ácido glucurônico e a N-acetilglicosamina, uma substância presente no organismo de todos os animais, e encontra-se em todos os órgãos do nosso corpo, em diferentes proporções, sendo que a pele contém 56 % do total. No nosso organismo, esta substância é responsável pelo volume da pele, forma dos olhos e lubrificação das articulações, sendo normalmente produzido e degradado¹⁸. O biopolímero da cana-de-açúcar contém naturalmente em sua composição ácido glicurônico²⁴. Como método terapêutico, pode ser obtido a partir de animais ou a partir da fermentação de bactérias. Este último tem grandes vantagens, uma vez que permite a sua produção em escala industrial e, por não possuir proteínas animais, não provoca reações alérgicas, sendo muito utilizado como agente de preenchimento em procedimentos estéticos para a eliminação de rugas e no preenchimento dos lábios pelos esteticistas e cirurgiões plásticos.

A análise do processo de encapsulamento, caracterizado pela formação de um invólucro inflamatório com fibroblastos em torno dos implantes, observou-se uma reação mais intensa com deposição de uma maior quantidade de fibroblastos no entorno dos implantes do Deflux®, evidenciando um processo de maior encapsulação destes implantes. Ao contrário, no entorno dos implantes do gel do biopolímero da cana-de-açúcar (BAC), observa-se uma reação menos intensa com menor migração de



fibroblastos (fibrose). Tal fato parece sugerir uma maior integração implante/hospedeiro.

Observou-se até o presente que no processo de remodelação por que passou os implantes do gel do biopolímero (BCA), após três meses, a presença de matriz celular e neoformação vascular, o que sugere uma melhor integração e incorporação do implante ao hospedeiro. Acredita-se que tal fato, irá contribuir para uma melhor estabilização do implante, no sítio de aplicação do gel, diminuindo consideravelmente o risco de migração ou embolia para outros órgãos. Entretanto, tem-se na realidade uma “fotografia”, um “instantâneo” após os três meses do implante. Se esse processo continuar, e se houver a formação de um tecido de substituição no local implantado, mantendo o seu volume, estaremos então, frente a uma substância ideal com a função de preenchimento, de “bulkig agent” estável, procurada pelos pesquisadores.

Manhes em 1966 na França, apresentava os “Novos conceitos da Biocirurgia” e postulava: “Devemos abandonar as concepções simplesmente anatômicas e mecânicas das cirurgias, vez que trabalhamos com tecidos vivos, que obedecem a suas próprias leis de cicatrização e reconstituição”⁵⁵.

Segundo este autor, “A biocirurgia agrega os conhecimentos da cirurgia clássica, ao reforço tecidual induzido por bio-materiais, que obedecem princípios de respeito à engenharia tecidual com soluções próprias que estimulam e canalizam as reações do organismo, onde elas são necessárias, sem pontos de fixação diminuindo a necrose e infecção, com resultados anatômicos e funcionais imediatos”⁵⁵.

O biomaterial ideal, para um implante, segundo os princípios da engenharia tecidual, deveria após reações de remodelação, que ocorrem no organismo hospedeiro, induzir a formação um novo tecido com matriz celular, neovascularização estabilizando-se no local implantado. Nesse sentido, o gel do biopolímero da cana-de-açúcar parece seguir este princípio.

Espera-se que, assim como nos experimentos anteriores realizados, os resultados desta pesquisa sejam semelhantes, ou seja, que o gel do biopolímero da



cana-de-açúcar permaneça no local do implante, mantendo o seu volume original, ocupando um espaço como agente de preenchimento apesar dos processos de remodelação e biotransformação ocorridos.

Caso esta hipótese se comprove, espera-se que em um futuro, se possa desenvolver novas pesquisas e ensaios clínicos visando à produção de um produto nacional de baixo custo, portanto acessível à população de baixa renda e do Sistema único de saúde SUS para tratamento do refluxo vésico ureteral e da incontinência urinária de esforço.

Pesquisas translacionais podem ser desenvolvidas no futuro que está próximo a acontecer, com o gel do biopolímero da cana-de-açúcar, acrescido de nutrientes específicos, como meio de cultura para células tronco, visando não apenas a função de agente de preenchimento “bulking”, como também o implante de células cultivadas em laboratório, para correção de defeitos sitio específicos, de várias doenças em pesquisas experimentais *in vitro* e *in vivo* que estão acontecendo.



7 Conclusões

Nas condições de desenvolvimento dos experimentos a biocompatibilidade do gel do biopolímero de melaço da cana-de-açúcar (BCA) foi comparada com a do Deflux[®], implantados na bexiga de coelhos pode-se constatar que:

- A) O gel do biopolímero de melaço da cana-de-açúcar apresentou infiltrado inflamatório e foi bem colonizado por matriz celular e vasos sanguíneos, enquanto que o Deflux[®] encontrou-se fragmentado livres de células e vasos sanguíneos;
- B) O gel do biopolímero do melaço da cana-de-açúcar, três meses após o implante como agente modelador, apresentou BCA biocompatibilidade com bio integração ao tecido do hospedeiro demonstrado por celularidade e neoformação vascular;
- C) O gel do biopolímero do melaço da cana-de-açúcar e o gel de Deflux[®] injetados na submucosa da bexiga de coelhos apresentou boa estabilidade permanecendo no local após o implante, caracterizando-se como agentes modeladores, “bulking agents”.



Referências

1. Ikari O. Refluxo vesicoureteral. In: Neto Jr NR, editor. Urologia Pediátrica. São Paulo: Ed. Roca; 2008.
2. Barroso Junior U, Macedo Junior A (editores). Refluxo vesicoureteral. Urologia Pediátrica. São Paulo: Ed. Roca; 2004. p.119-43.
3. Zerati Filho M, Barroso Júnior U, Calado AA, Müller EM, Ambrogini A. Evolução do refluxo vesicoureteral no primeiro ano de vida. Rev Paul Pediatr. 2001; 19: 122-26.
4. Zerati Filho M, Calado AA, Barroso JR U. Spontaneous resolution rates of vesicouretral reflux in brazilian children: a 30-year experience. Inter Braz J Urol. 2007; 33: 204-15.
5. Praun Jr. OH, Bussato Jr WFS, Praun LH. Epidemiologia da incontinência urinária. Incontinência urinária na mulher. Clínicas Brasileiras de Urologia SBU. Rio de Janeiro: Ed Ahteneu; 2001. p.59-63.
6. International Continence Society. Committee of Standardization. The standardization of terminology of lower urinary tract function. In: Ostegard DR, Bent AE, editors. Urogynecology and Urodynamics. 3th Baltimore: Williams & Wilkins; 1991.
7. Palma PCR, Ricetto CL, Herrmann V. Repetead lipoinjections for stress urinary incontinence. J Endourol. 1997; 11: 67-70.
8. Chancellor MB, Yokoyama T, Tirney S. Preliminary results of myoblast injection into the urethra and bladder wall: a possible method for the treatment of stress urinary incontinence and impaired detrusor contractility. Neurolol Urodyn. 2007; 19: 279-87.
9. Berg S. Politef augmentatation urethroplasty: correction of surgically incurable urinary incontinence by injection technique. Arch Surg. 1973; 107: 379-81.
10. Politano VA, Small MP, Harper JM. Periurethral Teflon injection for urinary incontinence. J Urol. 1974; 111:180-3.



11. Malizia AA, Reiman HM, Myers RP. Migration and granulomatus reaction after periurethral injection of politef (Teflon). *Jama*. 1984; 251: 3277-81.
12. Kiilholma PJ, Chancellor MB, Makinen J. Complication of Teflon injection for stress urinary incontinence. *Neurolol Urodyn*. 1993; 12: 131-7.
13. Gonzales de Garibay AMS, Morrondo JC, Jimeno JMC. Inyección endoscópica de tejido graso autólogo en el tratamiento de La incontinência femenina. *Arch Esp Urol*. 1989; 42: 143-6.
14. Martins SB, Oliveira E, Castro RA, Sartori MGF, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Girão MJBC. Clinical and urodynamic evaluation in women with stress urinary incontinence treated by periurethral collagen injection. *Inter Braz J Urol*. 2007; 33: 695-702.
15. Winters JC, Chiverton A, Scarpero HM. Collagen injection therapy in elderly women: Long-term results and patients satisfaction. *Urol*. 2000; 55: 856-61.
16. Andersen RC. Long-term follow-up comparison of duraspHERE and contigen in the treatment of stress urinary incontinence. *J Low Genit Tract Dis*. 2002; 6: 239-43.
17. Antonopoulos IM, Piovesan AC, Falci Jr R, Kanashiro H, Saito FJ, Nahas WC. Transurethral injection therapy with carbon-coated beads (Durasphere®) for treatment of recurrent pyelonephritis in kidney transplant patients with vesico-ureteral reflux to the allograft. *Clin Transplant*. 2011; 25: 329-33.
18. Stenberg A, Larson G, Johnson P. DiHA dextran copolymer, anew biocompatible material for endoscopic treatament of stress incontinent women. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1999; 78: 436-42.
19. Chertin B, Leonid C, Farkas A, Shenfeld O, Halachmi S. Endoscopic Bulking materials for the treatment of vesicoureteral reflux: a review of our 20 years of experience and review of the literature. *Advances in Urology*. Article ID 309626, 2011.
20. Khachatoorian R, Petrisor IG, Kwan CC, Yen TF. Biopolymer plugging effect: laboratory pressurized pumping flow studies. *J Petrol Sci Engi*. 2003; 38: 13-21.



21. Klock U, Muniz GIB. Química da Madeira. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná: Fuper; 1998.
22. Walton AE, Blackwell J. The quarterly of biology. Biopolymers. 1973; 50: 305-7.
23. Melo FAD. Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeo extracelular por *Zooglea sp* em melaço de cana-de-açúcar. 2003. [Tese Doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Tecnologia e Geociências; 2003.
24. Peterson-Beedle M, Kenney JF, Melo FAD. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by *Zoogloea sp*. Carbohydrate Polymers. 2000; 42: 375-83.
25. Putra A, Kakugo A, Furukawa H, Gong JP, Osada Y. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface. Polymer. 2008; 49: 1885-91.
26. Ono E, Watabe O, Yamanaka S, inventors; Ajinomoto Co. Inc., assignee. Substitution material for living body texture. Japanese patent JP03165774A2, 1989 27 Nov. Available from: <http://www.delphion.com>. Acesso 10 jan 2010.
27. Yamanada S, Ono E, Wantanabe K, Kusakabe M, Suzuki Y. Hollow microbial cellulose, process for preparation thereof, and artificial blood vessel formed of said cellulose. Europ Patent. 1990; 1:1-7.
28. Klemm D, Schamann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. Prog Polim Sci. 2001; 26: 1561-603.
29. Klemm D, Udhardt U, Marsch S, Shumann J. Method and device for producing shaped microbial cellulose for use as a biomaterial, especially for microsurgery. United State patent US2003/0013163, 2003 16 Jan. Available from: <http://www.delphion.com>.
30. Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. Angew Chem Int Ed. 2005; 44: 3358-93.
31. Oster GA, Lentz Y, Koehler K, Hoon R, Serafica G, Mormino R, inventor; Xylus Corporation, assignee. Solvent dehydrated microbially-derived cellulose for in vivo implantation. United State Patent US6599518, 2003 29 Jul. Available from: <http://www.delphion.com>.



32. Damien C, Heather AB, Oster GA, Wright ES, Serafica G, inventor; Xylos Corporation, assignee. Dura substitute and a process for producing the same. United State patent US20050042263A1, 2005 24 Feb. Available from: <http://www.delphion.com>.
33. Yamanaka S, Watanabe K. Applications of bacterial cellulose. In: Rezende G, editor. Cellulosic polymers. Cincinnati: Hanser Publishers Inc; 1994. p. 290.
34. Rambo CR, Recouvreur DOS, Carminatti CA, Pittlovanciv AK, Antonio RV, Porto LM. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. *Mat Sci Eng C*. 2007; 28:549-54.
35. Helenius G, Bäckdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. *In vivo* biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res*. 2005; 76: 431-8.
36. Bäckdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BB, Risberg B, Gatenholm P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*. 2006; 27: 1679-2170.
37. Coelho MCOC, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FAD, Mota RA, Tenório Filho F. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cir Bras*. 2002; 17: 11-3.
38. Castro CMMB, Aguiar JLA, Melo FAD, Silva WTF, Marques E, Silva DB. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. *An Fac Med Univ Fed Pernamb*. 2004;49:119-23.
39. Falcão SC, Evêcio Neto J, Coelho AR. Incorporation by host tissue of two biomaterials used as repair of defects produced in abdominal wall of rats. *Acta Cir Bras*. 2008; 23: 78-83.
40. Ribeiro LM, Câmara Neto RD. Biomaterial extraído do melaço da cana-de-açúcar por ação microbiana, aplicado em lesões agudas no estômago de cães. Estudo da sobrevida e achados de necropsia. In: X Congresso de Iniciação Científica (CINIC/CNPQ/UFPE), outubro de 2002. Recife. Anais do X Congresso de Iniciação Científica (CONIC/CNPQ/ UFPE), Recife. 2002. [CD-ROM].



41. Lucena RG, Vasconcelos GB, Lima SV, Lima RFB, Vilar FO, Aguiar JLA. Um novo material para o tratamento da incontinência urinária: estudo experimental. In: Brasília. Inter Braz J Urol. 2005; 30: 105.
42. Lima FR, Lima JRA, Hirakava P, Medeiros Jr.MD, Lima FMT, Aguiar JLA. Resposta inflamatória a biomembranas de polímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. An Fac Med Univ Fed Pernamb. 2005;50:37-9.
43. Silva DB, Aguiar JLA, Marques A, Coelho ARB, Rolin Filho EL. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de polímero da cana-de-açúcar e fásia autóloga em *Chinchilla laniger*. An Fac Med Univ Fed Pernamb. 2006;51:45-51.
44. Marques SRB, Lins EM, Aguiar JLA, Albuquerque MCS, Rossiter RO, Motenegro LT, Vieira RJ. Um novo substituto vascular: arterioplastia femural em cães com remendo de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar - avaliação hemodinâmica e histopatológica. J Vasc Bras. 2007; 6:309-15.
45. Aguiar JLA, Lins EM, Marques SRB, Coelho ARB, Rossiter RO, Melo RJV. Surgarcane biopolymer patch in femoral artery angioplasty on dogs. Acta Cir Bras. 2007; 22: 77-81.
46. Gonçalves R, Rangel A, Duarte JA, Andrade R, Vilar FO, Aguiar JL. Bio-Sling no tratamento da incontinência urinária de esforço: estudo experimental e primeiros ensaios clínicos. In: XXVIII Congreso de la Confederación Americana de Urologia-CAU, Recife, Jun. 17th -22th ,2006. Int Braz J Urol. 2006;32(Suppl. 2):41.
47. Chagas HM, Aguiar JL, Montoro M, Vilar F, Pires JA, Pereira LA. Uretroplastia com biopolímero da cana-de-açúcar em cão. In: XXVIII Congreso de la Confederación Americana de Urologia-CAU, Recife, Jun. 17th -22th ,2006. Int Braz J Urol. 2006;32(Suppl. 2):65.
48. Vilar F, Aguiar JL, Vilar S, Machado M, Pontes F, Lima R. Doença de Peyronie: estudo de um novo material com perspectiva de aplicação clínica. In: XXVIII Congreso de la Confederación Americana de Urologia-CAU, Recife, Jun. 17th - 22th ,2006. Int Braz J Urol. 2006;32(Suppl. 2):167.



49. Rangel AEO, Aguiar JLA, Lima SVC, Araújo FC, Vilar FO, Pires JAC et al. A new biomaterial for the treatment of vesicouretral reflux: experimental study In: XXVIII Congreso de la Confederación Americana de Urologia-CAU, Recife, Jun. 17th -22th ,2006. Int Braz J Urol. 2006;32(Suppl. 2):184.
50. Mandarin-de-Lacerda C. Stereological tools in biomedical research. An Acad Bras Cien. 2003; 75: 469-86.
51. Garcia Y, Breen A, Burugapalli K. Dockery P, Pandit A. Sterological methods to assess tissue response for tissue-engineered Scaffolds. Biomaterials. 2007; 28: 175-86.
52. Hennekens CH, Buring JE. Epidemiology in Medicine. Boston: Little Brown; 1987. 383p.
53. Massone F, editor. Anestesiologia Veterinária. Farmacologia e técnica, 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
54. Trockman BA, Leach GE. Surgical treatment of intrinsic urethral dysfunction: injectables (FAT). Urol Clin N Amer. 1995; 22: 665-71.
55. Manhes H. Laparoscopic retzio-plasty. A new surgical approach to stress incontinence. Int Surg. 1966; 81: 371-3.



Anexos

Anexo 1: Protocolo para uso de animais experimentais

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

Protocolo para uso de animais experimentais

Título: Implante do gel do biopolímero da cana-de-açúcar em bexiga de coelhos: análise histomorfométrica e estereológica.

1.1. Projeto Definitivo ☒ Piloto ()

1.2. Período previsto para utilização dos animais:

Início 04/08/2008 Término 22/12/2008

2. Finalidade: () Ensino ☒ Pesquisa

3. Responsável:

Nome: Artur Eduardo de Oliveira Rangel - 01

Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Pernambuco - FCM/UPE. Departamento:
Materno Infantil - Fone: (81) 3427.3911, Residência: 3222.8111
Cel: 9964.6135 - email: artureor@yahoo.com.br

4. Colaboradores: Salvador Vilar Corrêa Lima - 02
Jose Lamartine de Andrade Aguiar - 03

5. Qualificação da Equipe: (Especificar a experiência prévia e o treinamento dos membros da equipe com os animais)

01: Professor Assistente da UPE, Mestre em Medicina - FCM / UPE, 1996.

Experiência prévia: Implante do gel do biopolímero em bexigas de cães e ratos.

02: Professor Adjunto da UFPE, Doutor em Medicina, com extensa experiência em cirurgia experimental com animais.

03: Professor Adjunto da UFPE, Doutor em Medicina, Líder do Grupo de Pesquisas com Biopolímero da cana de açúcar, com extensa experiência com cirurgia experimental com animais.

5.1. Existe acompanhamento de técnico especializado? ☒ SIM () NÃO

Nome: Dra. Adriana Ferreira Cruz

Qualificação: Médica Veterinária com Residência em Cirurgia de Pequenos Animais.



6. Informações sobre a origem do animal: Biotério (X)

Especificar:

Animal silvestre* () Exótico () Outros (X)

*Anexar solicitação de autorização ao IBAMA.

Outro: Especificar: Animais adquiridos em criadouro sob vigilância sanitária e por solicitação escrita da Médica Veterinária responsável pelo projeto.

7 Descrição dos animais:

() Camundongo () Rato () Cobaia () Hamster () Coelho (X) Cão () Gato

() Gerbil () Primata não humano .

Se for trabalhar com mais de um tipo de animal colocar em anexo o que se refere à idade e sexo.

Outro (especificar): não se aplica

Linhagem: Raça Califórnia

Se houver mais de um tipo de animal descrever em anexo. (não se aplica)

Sexo: (X) M (X) F Idade: adulto jovem (120 dias) Peso: entre 2,0 e 2,5 Kg

7.1.1 Padrão sanitário (especificar os controles sanitários de manutenção dos animais no biotério)

- Animais ingressos são considerados sadios, após exame clínico e laboratorial, atestado pela médica veterinária responsável.
- Biotério de alvenaria, paredes revestidas de azulejo e piso de epóxi.
- Animais mantidos em confinamento em gaiolas dispostas em estantes.
- Limpeza periódica de paredes, piso, estantes e gaiolas.
- Remoção periódica dos resíduos dos animais e desinfecção das superfícies.

7.1.2 Climatização, fotoperíodo, exaustão de ar, posição da gaiola na estante.

- Temperatura mantida em torno de 25° C, por 12 horas diurnas.
- Exaustão forçada mantida por 12 horas noturnas.
- Foto-período de 12 horas controlado por temporizador.
- Gaiolas localizadas nas três posições da estante, permitindo a socialização dos animais ocupantes das diversas estantes.

7.1.3 Tipo de alimentação: (X) ração industrial da marca *Purina/Coelhos*®
() suplementação () dieta específica

Especificar: dieta esteatogênica (hiperlipídica).

7.1.4 Qualidade da água: () filtrada () autoclavada () clorada () Compesa (X) Mineral
() Poço

7.1.5 Tipo da cama: () esterilizada () não esterilizada papel () maravalha () outros (X)

8 Existe planejamento estatístico para a definição do número de animais?
(X) SIM () NÃO



8.1 N° de grupo experimental : **2**

8.1.2 N° de animais por grupo experimental: **3 + 12** N° de animais previsto no projeto: **15**

8.1.3 N° de animais por gaiola: **1** Tipo e tamanho de gaiola: **GTGC - 120 Beiramar ®**

9 Informações sobre os procedimentos experimentais do projeto de pesquisa ou da aula:

9.1 Será usado algum tipo de contenção no animal. () SIM (X) NÃO
Qual? Justifique. (não se aplica)

9.2 Serão usadas drogas analgésicas e/ou anestésicas? (X) SIM () NÃO

9.2.1 Droga(s): Ketamina 50mg - Xilazina 2% (20mg) – Atropina 0,25% (0,44mg/Kg por via IM) – Dipirona Sódica 3 gotas no pós-operatório, se necessário.

9.2.2 Dosagem: Drogas Anestésicas: 1 ml de Ketamina 50mg + 1ml de Xilazina a 2% (0,2ml da mistura / 100g de coelho).
Drogas pré-anestésicas: Atropina 0,25% (0,44mg/Kg por via IM).
Drogas analgésicas: Dipirona Sódica 3 gotas V.O. diariamente, se necessário.

9.2.3 Via de administração: As drogas pré-anestésicas e anestésicas serão feitas por via Intramuscular (IM). A droga analgésica, se necessário, será feita por via oral (V.O).

9.2.4 Volume: Será utilizada a fórmula: $\text{Peso} \times \text{dose} / 100 = \text{dose em ml da mistura anestésica}$.

9.3 Envolverá dor nos animais? () SIM (X) NÃO

Em qualquer condição, justifique a resposta, e faça uma breve descrição de como será avaliada a presença de dor durante o período de experimentação.

Os procedimentos propostos, sob anestesia geral, são executados correntemente em humanos. São aprovados pelas comissões de ética de todos os hospitais e previstos nas tabelas de procedimentos médicos, como procedimento indolor quando realizado sob sedação ou anestesia geral. Neste experimento os procedimentos que foram propostos aos animais, há muitos anos foram aprovados em humanos. O implante de substâncias na sub-mucosa da bexiga e da uretra são utilizados em humanos para o tratamento do refluxo vésico ureteral e da incontinência urinária na insuficiência esfíncteriana uretral.

Os animais, durante o período de manutenção em cativeiro, não serão submetidos a qualquer manipulação dolorosa.

Durante o período de manutenção em cativeiro a avaliação de qualquer ocorrência, acidental, de dor, será feita mediante observação de mudanças no comportamento, nos hábitos e na postura do animal. Existindo qualquer suspeita de DOR será administrado Dipirona Sódica líquida (3 gotas) V.O. para um animal entre 2,0 a 2,5 Kg.

Na fase de implantação do biopolímero na bexiga, o animal será submetido a intervenção cirúrgica sob anestesia geral. Nessa ocasião os animais serão poupados de qualquer sensação de stress ou dor, pela ação das drogas anestésicas.

No curso da cirurgia o nível de anestesia será monitorado mediante a pesquisa do reflexo podal de sensibilidade. Por ocasião do procedimento de coleta dos tecidos da bexiga com o implante do biopolímero, para o estudo histomorfométrico e estereológico, o animal será inicialmente anestesiado e em seguida sacrificado, com uma “overdose” de Propofol (Diprivan®).

9.4. Os experimentos propostos são específicos para:



Dor () SIM **(X)** NÃO Estresse () SIM **(X)** NÃO Anorexia () SIM **(X)** NÃO

Outros especificar: Avaliar o comportamento do implante do gel biopolímero da cana-de-açúcar na submucosa da bexiga de coelhos.

9.5. O procedimento levará a alguma restrição hídrica ou alimentar? () SIM **(X)** NÃO

9.6. Realizará cirurgia? **(X)** Sim () Não **(X)** Única () Múltiplas

Está previsto algum tipo de suporte (analgésicos, anti-inflamatórios etc.) durante a

Recuperação: sim, Dipirona Sódica líquida (3 gotas V.O.) se necessário.

9.7. Haverá exposição/inoculação/administração de algum agente químico ou biológico?

(X) SIM () NÃO. Se for sim especificar.

Dosagem dos implantes: 0,1ml do Deflux, e 0,1 ml do gel do Biopolímero da cana-de-açúcar. Via de administração: Implante na submucosa da bexiga

Frequência: Serão realizados 4 (quatro) implantes: 2 implantes do Deflux no lado esquerdo da bexiga e 2 implantes do biopolímero da cana-de-açúcar no lado direito da bexiga, a céu aberto, após a laparotomia.

9.8. Haverá extração de fluidos? () SIM **(X)** NÃO

Se sim, especificar: (não se aplica)

Quantidade da amostra: 15 Bexigas dos coelhos

Método de coleta: Cistectomia após eutanásia.

9.9 Haverá reposição de fluidos? () SIM **(X)** NÃO

Se sim, especificar (não se aplica)

Via de administração (não se aplica) Volume (não se aplica) 0

9.10. EUTANÁSIA: () Deslocamento cervical () Decapitação () CO₂

() Perfusão sob anestesia **(X)** Dose excessiva de anestésico (10mg de Propofol / Diprivan®)

() Dessangramento com anestesia Outro:

9.11 Como será realizado o descarte dos animais?

Após a eutanásia, serão considerados lixo biológico. Serão acondicionados em sacos plásticos específicos, mantidos em freezer até a coleta especializada do lixo biológico, do Núcleo de Cirurgia Experimental do Núcleo de Ciências da Saúde da UFPE.

9.12. Os animais poderão ser usados para outro experimento de pesquisa ou ensino?

(X) SIM () NÃO

9.13. Os animais serão usados para retirada de órgãos? **(X)** SIM () NÃO

10. Resumo do Procedimento experimental.



Estudo Experimental pré-clínico (fase 1) em animais, com o procedimento de implante do gel do biopolímero da cana-de-açúcar em bexiga de coelhos para análise histomorfométrica e estereológica.

Com o objetivo geral de avaliar o comportamento do implante do gel biopolímero da cana-de-açúcar na submucosa da bexiga de coelhos. E especificamente de: Definir a estabilidade do gel do biopolímero no local implantado. Avaliar a migração (embolização) para órgãos; Identificar reações teciduais agudas, como formação de abscessos e fístulas do implante de gel de biopolímero; Estudar a resposta inflamatória tecidual do hospedeiro ao gel do biopolímero; Quantificar a formação de fibrose tecidual no hospedeiro após os implantes do gel do biopolímero.

A realização desta pesquisa poderá trazer informações importantes em relação a este novo tipo de material (biopolímero da cana-de-açúcar), que poderão redundar em projetos clínicos de abrangência bastante significativa por se tratar de uma área onde há uma grande procura por um novo tipo de material que preencha os requisitos principais de biocompatibilidade, segurança, efetividade e baixo custo tanto para o tratamento de mulheres com incontinência urinária por insuficiência esfinteriana uretral, quanto para o tratamento endoscópico das crianças com refluxo vésico uretral.

11. TERMO DE RESPONSABILIDADE

Eu certifico que:

Li os princípios éticos da Experimentação Animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e concordo plenamente com suas exigências durante a duração deste experimento/aula. Esse estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e não pode ser realizado por metodologias alternativas.

A equipe que participa do projeto foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos nesse protocolo. Me comprometo a solicitar nova aprovação deste protocolo sempre que ocorra alteração significativa dos experimentos aqui descritos.

Tudo o que foi declarado neste protocolo é absoluta expressão da verdade. Estou ciente que o não cumprimento das condições aqui especificadas é de minha total responsabilidade (pesquisador principal) e que estarei sujeito às condições previstas na lei em vigor.

Lei de Crimes Ambientais No. 9605 – de 12/02/1998 – Art. 32 Praticar ato de abuso, maus tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos; Pena – detenção de três meses a um ano e multa. Parágrafo 1º. Incorre nas mesmas penas quem realiza experiência dolosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos. Parágrafo 2o. – A pena é aumentada de um sexto a um terço se ocorre morte do animal. Regulamentação da lei de Crimes Ambientais – Decreto 3.179 de 21/09/1999 – Art. 17 Praticar ato de abuso, maus tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos; Multa de R\$ 500,00 a R\$ 2.000,00, com acréscimo por exemplar excedente; I - R\$ 200,00 por unidade; II - R\$ 10.000,00 por unidade de espécie constante na Lista Oficial de Fauna Brasileira ameaçada de extinção e do Anexo I da CITES; e III - R\$5.000,00 por unidade de espécie constante na Lista Oficial de Fauna Brasileira ameaçada de extinção e do Anexo II da CITES. Parágrafo 1o. Incorre nas mesmas multas, quem realiza experiência dolosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existem recursos alternativos

DATA: 30 de maio de 2008.

Artur Eduardo de Oliveira Rangel
ASSINATURA PESQUISADOR

Jose Lamartine de Andrade Aguiar
VISTO DO CHEFE DO DEPARTAMENTO



Anexo 2. Comitê de Ética do Centro de Ciências Biológicas da UFPE

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, 22 de outubro de 2008

Ofício nº 77/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
Para: **Artur Eduardo de Oliveira Rangel**
Aluno de Pós-Graduação em Cirurgia - CCS
Professor orientador: Dr. Salvador Vilar Correa Lima
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 012767 / 2008 - 69

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado *"Implante do gel do Biopolímero da cana-de-açúcar em bexiga de coelhos: análise histomorfométrica e estereológica"*.

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 CEEAA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

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

Atenciosamente,



Profa. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

Observação:
Origem dos animais: Criadouro; Coelhos; Califórnia;
Sexo: Machos; Idade: 120 dias; Número de animais
previsto no protocolo: 12 animais.



Anexo 3. Resumos publicados advindos da pesquisa

Clinical Urology

International Braz J Urol

Volume 32 (Suppl. 2): June, 2006

INDEXED BY
PubMed

ISSN 1677-5538

TL-74

International

Braz J Urol

Official Journal of the Brazilian Society of Urology
Official Journal of the Confederación Americana de Urologia
Volume 32, Suppl.2, June, 2006



Papers presented at

XXVIII Congreso de la Confederación Americana de Urologia-CAU 2006

VII Congresso Norte - Nordeste de Urologia

XV Congreso de la Sociedad Ibero Americana de Urologia
Pediátrica - SIUP

Recife - June 17th- 22nd
2006

Full Text Online Access Available
www.brazjurol.com.br

Bio-Sling no tratamento da incontinência urinária de esforço: estudo experimental e primeiros ensaios clínicos

Roberto Gonçalves, Artur Rangel, João Aleixo Duarte, Rogerson Andrade, Fábio Oliveira Vilar, José Lamartine Aguiar, Luiz Alberto Araújo, Salvador Vilar Lima

Introdução/Objetivos: Testar um novo material heterólogo utilizado como sling no tratamento da incontinência urinária e apresentar os primeiros resultados clínicos.

Métodos: Estudo experimental: Foram estudados 3 grupos: 1-Foram utilizados 30 ratas com peso aproximado de 250 G as quais foram anestesiadas com hidrato de cloral intra-peritoneal de acordo com protocolo do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE Uma faixa de biopolímero multiperfurada de 3mm de largura foi colocada no espaço sub-uretral. As extremidades foram fixadas de cada lado á aponeurose do músculo reto abdominal. 2- Foram utilizados também 30 animais com peso semelhante ao grupo do experimento 1 e seguindo o mesmo protocolo. Utilizamos uma faixa de aponeurose dos músculos retos abdominais com 3mm de largura e 5cm de comprimento nas mesmas localizações utilizadas no experimento 1. 3- Foram utilizados 30 animais seguindo-se o mesmo protocolo. Uma faixa de polipropileno, com 3mm de largura e 5cm de comprimento nas mesmas localizações utilizadas no experimento 1. Grupos de 10 animais em cada experimento foram sacrificados com 4, 8 e 12 semanas. Todas as faixas foram retiradas e analisadas da seguinte forma: 1. Análise macroscópica para verificar aderência às estruturas vizinhas. 2. Avaliar erosão uretral 3. Avaliação histológica após coloração com HE e tricromo de Masson. Estudo Clínico: Após aprovação pelo comitê de ética, 20 pacientes foram selecionadas para utilização deste novo material. Até o momento 03 pacientes foram submetidas a cirurgia utilizando o sling de biopolímero

Resultados: A avaliação macroscópica dos 3 materiais foi semelhante não sendo observadas aderências a órgãos vizinhos ou erosão uretral. Microscopicamente foi encontrada reação inflamatória tipo corpo estranho semelhantes nos 2 grupos de materiais heterólogos. A avaliação inicial dos primeiros pacientes operados mostrou boa tolerabilidade e ausência de reação.

Conclusão: O material testado apresentou características adequadas de tolerabilidade e compatibilidade. Os resultados preliminares dos primeiros ensaios clínicos apontam na direção de que poderá representar uma nova opção no tratamento da incontinência de esforço.

Key words: sling; incontinência urinária



THE JOURNAL OF UROLOGY

e106 THE JOURNAL OF UROLOGY®

Vol. 185, No. 4S, Supplement, Sunday, May 15, 2011

mean bladder capacity, voided volume and frequency were similar between all silk groups ($p > 0.05$) while average compliance increased in all augmented animals relative to the control group.

CONCLUSIONS: Manipulation of structural and mechanical properties of silk scaffolds by adjusting gel-spinning fabrication parameters to include high ASR coupled with LYO PW treatment produces matrices that support functional bladder tissue regeneration in rodents while maximizing the rate of scaffold degradation.

Source of Funding: Tissue Engineering Resource Center, NIBIB P41 EB002520 (Kaplan); Children's Hospital Boston Office of Sponsored Programs Support for Pilot Studies (Estrada); Harvard Catalyst/The Harvard Clinical and Translational Science Center NIH UL1 RR 025758 (Estrada)

263 URINARY NEUTROPHIL GELATINASE-ASSOCIATED LIPOCALIN (NGAL) IS A POTENTIAL NON-INVASIVE MARKER FOR RENAL SCARRING IN PATIENTS WITH VESICOURETERAL REFLUX

Manabu Ichino, Mamoru Kusaka*, Hitomi Sasaki, Takahiro Maruyama, Kiyohito Ishikawa, Ryoichi Shirotaki, Kiyotaka Hoshinaga, Toyooka Aichi, Japan

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Renal scarring is a serious complication that often occurs after chronic pyelonephritis in the presence of vesicoureteral reflux (VUR). In our recent study, we established a rat model of renal scar formation after bacterial infection. Using this model system, we performed global analysis of gene expression by microarray and identified NGAL as one of the most up-regulated genes following renal injury. The high levels of NGAL expression were subsequently confirmed at both the RNA and protein levels. In our present study, we investigated the urinary NGAL levels in patients with childhood VUR and evaluated its potential usefulness as a biomarker of renal scarring.

METHODS: A total of 34 patients diagnosed with VUR without the evidence of current urinary tract infection and 28 normal healthy children were enrolled in this study. Renal scars were evaluated by a 99mTc-DMSA renal scan in 24 of the VUR cases. Urinary NGAL levels were monitored by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

RESULTS: In our initial analyses, the NGAL levels were measured in urine samples from normal healthy children. These levels were found to be much higher in infant donors of less than 1 year of age than the reported normal levels (0.7–9.8 ng/ml). Even after the values were normalized with the urinary concentration of creatinine, the ratios were still high in samples from infants. We next evaluated the urinary NGAL concentration in 34 VUR cases and compared these levels with those of normal controls. We further normalized the NGAL/creatinine values to the age-specific average. The urinary NGAL levels were found to be significantly high in the VUR group ($p < 0.01$). We further compared the urinary NGAL levels in patients with and without renal scarring as demonstrated by a 99mTc-DMSA renal scan. The presence of renal scarring was observed to be significantly associated with high NGAL values ($p < 0.005$). We applied a cut-off value of 1 and this allowed for both high sensitivity (89.5%) and high specificity (100%) and suggested that high urinary NGAL values are diagnostic for the presence of renal scarring (AUC of ROC curve, 0.947). Assays for serum creatinine, urinary BMG and NAG are routine tests for evaluating renal function but do not predict the presence of renal scarring.

CONCLUSIONS: Urinary NGAL levels are significantly higher than normal in VUR patients with renal scarring without the evidence of UTI. The estimation of urinary NGAL may thus be useful as a non-invasive diagnostic or prognostic biomarker of renal scarring.

Source of Funding: None

264 A NEW BULKING AGENT TO TREAT VESICOURETERAL REFLUX: AN EXPERIMENTAL STUDY

Salvador Lima*, Artur Rangel, Lamartine Aguiar, Recife, Brazil; Francisco Sampaio, Luiz Cardoso, Henrique Gomes, Rio de Janeiro, Brazil

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: The use of bulking agents in Urology became very popular especially after the approval of new agents such as Deflux. We present the experimental results of a new agent a cellulosic exopolysaccharide (CE), synthesized from sugar molasses by Zooglea sp [Paterson-Beeble. Carbohydr Polymers. 2000; 42:375–383] with specific characteristics that can represent a new option in the treatment of VUR.

METHODS: Ten adult rabbits had the new agent injected into the bladder (submucosa) using a small abdominal incision. Three points in each half of the bladder were injected with 0.2ml of Deflux and the same amount of CE. The animals were sacrificed after 3 and 90 days. Collagen and elastic fibers were evidenced using the Sirius red and Weigert's resorcin fuchsin staining methods, respectively. Smooth muscle cells were identified by immunolabeling with smooth muscle alpha-actin. The density of blood vessels was assessed in outlined areas of injected material or normal bladder wall using the ImageJ software and HE-stained sections, and was expressed as $\text{mean} \pm \text{SD}$ number of blood vessels per mm^2 .

RESULTS: In 3-day samples, injected CE and Deflux were located mostly under the lamina propria and were structurally homogeneous and free from inflammatory cells or blood vessels. However, in 3-month samples, with the exception of a few small areas, CE was organized as short bundles, although the material stained weakly for collagen and was negative for elastic fibers, in contrast to the adjacent tissue. CE areas were populated by fibroblast-like cells, which were negative for smooth muscle immunolabeling. Newly formed blood vessels were also present in these areas, with a density 45.0 ± 8.4 , whereas in normal bladders the value was 35.2 ± 2.9 . A few small inflammatory infiltrates were observed in the CE areas, especially around blood vessels. Deflux areas in 3-month samples were fragmented but still homogeneous and free from cells or blood vessels.

CONCLUSIONS: The results obtained thus far indicate that this biomaterial exhibits little immunogenicity and integrates better in the host tissue as compared with Deflux. Therefore, CE should be an efficient material when incorporation is desired, for example as a supportive scaffold in reconstructive surgery. CE may still be an effective bulking agent if its metabolization in the longer term does not involve reduction in volume.

Source of Funding: Source of Funding: FAPERJ, CNPq

265 DAMAGED MATRIX INCREASES NUCLEAR DNA METHYLTRANSFERASE EXPRESSION IN BLADDER SMOOTH MUSCLE CELLS

Jiaxin Jiang, Karen Aitken*, Tyler Kirwan, Cornelia Tolg, Darius Bagli, Toronto, Canada

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Previously, damaged matrix (heat-denatured collagen) induced growth of bladder smooth muscle cells (BSMC) (Herz et al, Journal of Urology 2003). We suspected that BSMCs undergo epigenetic change, as BSMC phenotype does not always revert back to normal upon return to normal matrix in vitro or after removal of obstruction in vivo. We hypothesize that obstructive stimuli (matrix and mechanical strain) induce epigenetic change, e.g. DNA methylation. Our objective was to see if: DNA methylation machinery (DNA methyltransferases or DNMTs) is induced by obstructive stimuli; and if DNA methylation affects growth in these models.

METHODS: Primary BSMC (passage 1–2) were cultured on denatured or native collagen for 24 hours in low serum. Mechanical strain of serum-starved BSMC was performed on Flexcell 4000 Ten-