

## Avaliação morfofuncional do enxerto de túnica albugínea suína na cistoplastia em ratos

[*Morpho-fuctional evaluation of porcine tunica albuginea as a graft for cystoplasty in rats*]

T.A. Moraes<sup>1</sup>, A.C.C. Canellas<sup>1</sup>, A.F. Rodrigues<sup>1</sup>, C.F.F. Lancetta<sup>2</sup>,  
V.A.N. Degani<sup>2</sup>, M.L.G. Ferreira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aluna de pós-graduação – Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói, RJ

<sup>2</sup>Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói, RJ

### RESUMO

O objetivo deste trabalho é avaliar o uso da túnica albugínea suína na cistoplastia em ratos, avaliando funcionalidade, capacidade de reparação do órgão e possibilidades de complicações. Foram selecionados 30 ratos Wistar, machos, de seis meses de idade, divididos em: um grupo teste (TA), em que os animais receberam o enxerto de túnica albugínea suína após a cistectomia parcial e um grupo controle (C), em que os animais sofreram somente a cistectomia parcial. Os animais pertencentes a ambos os grupos foram divididos igualmente em subgrupos de cinco animais cada, que sofreram eutanásia em sete, 28 e 42 dias de pós-operatório. Foi realizada uma análise macroscópica e, posteriormente, uma análise histopatológica da região da ferida cirúrgica. Aos sete e 28 dias, os animais pertencentes ao grupo C e ao grupo TA apresentaram urotelização, regeneração da lâmina própria e da musculatura, porém o grupo TA apresentou menores sinais inflamatórios e maior organização tecidual, principalmente com relação à formação das fibras musculares. Aos 42 dias de pós-operatório, ambos os grupos já apresentavam características histológicas normais. Concluiu-se que o enxerto de túnica albugínea suína obteve sucesso na regeneração da bexiga de ratos, mantendo a funcionalidade do órgão, sem rejeição, e favorecendo a migração celular.

Palavras-chave: cistectomia parcial, biomateriais, xenoenxerto

### ABSTRACT

*The aim of this study is to evaluate porcine tunica albuginea as a graft for cystoplasty in rats, regarding bladder function, capacity and possible complications. 30 male Wistar rats with six months of age have been selected and separated into two different groups: A test group (TA) in which the animals received a tunica albuginea graft after partial cystectomy and a control group (C) in which partial cystectomy was performed, followed by bladder suture. In each group the animals were euthanized at seven, 28 and 42 days after surgery. Macroscopic and Histological analysis have been performed. At seven and 28 days after surgery the samples from both groups had urothelial lining upon a lamina propria and smooth muscle fibers in regeneration process. However, the TA group showed less inflammatory signs and more organized structure, mainly regarding the smooth muscle formation. At 42 days after surgery all groups showed a bladder wall structure qualitatively identical to the normal tissue. We could conclude that tunica albuginea graft is able to maintain bladder function and support cellular migration without any kind of rejection.*

*Keywords: partial cystectomy, biomaterials, heterologous graft*

### INTRODUÇÃO

Traumatismos, lesões inflamatórias e neoplasias correspondem a parte das possíveis afecções que

provocam importantes danos ao sistema urinário e que requerem intervenções cirúrgicas para sua reconstrução. Bexiga neurogênica e fibrose vesical também são fatores que requerem intervenção cirúrgica para aumentar a capacidade

Recebido em 22 de setembro de 2016

Aceito em 10 de outubro de 2016

E-mail: tatianaam@id.uff.br

do órgão. Algumas técnicas cirúrgicas vêm sendo avaliadas a fim de realizar a reparação do órgão de maneira mais eficaz (Caione *et al.*, 2006).

Para a reconstrução da vesícula urinária, são necessários materiais biocompatíveis que permitam a migração, o crescimento e a diferenciação celular e que mantenham a complacência e o volume do órgão, preferencialmente sem causar reações ou alterações imunológicas ao receptor (Greca *et al.*, 2004; Kung Lin *et al.*, 2015). Biomateriais e polímeros naturais vêm sendo estudados como substitutos da parede da bexiga (Schoeller *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006; Kung Lin *et al.*, 2015).

Durante a regeneração da bexiga, é necessária uma repopulação funcional de suas células na região do enxerto. A proliferação dos vasos sanguíneos é importante para enviar nutrientes e oxigênio, além de remover as células danificadas. A regeneração da musculatura lisa faz-se essencial para recuperar a complacência e a contratilidade da bexiga (Siefert e Tanagho, 2000).

Alguns biomateriais vêm sendo utilizados na reparação da bexiga, como: pericárdio, peritônio, túnica vaginal, íleo e submucosa intestinal suína (Abílio, 2003; Greca *et al.*, 2004; Ayyıldız *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008; Wongsetthachai *et al.*, 2011; Souza, 2014).

A túnica albugínea é a camada média e mais espessa da cápsula testicular. É constituída principalmente por colágeno, fibras elásticas e muitos fibroblastos, conferindo a ela característica de um tecido conjuntivo denso. Por ser um tecido conjuntivo não modelado, suas fibras colágenas se apresentam entrelaçadas, permitindo, desta forma, a tração tanto em sentido longitudinal quanto transversal, o que demonstra sua resistência (Hsu *et al.*, 1994; Gartner e Hiatt, 2003).

A aplicação da túnica albugínea autóloga na correção de alterações penianas vem sendo descrita com sucesso (Schwarzer *et al.*, 2003; Da Ros *et al.*, 2012). Gadja *et al.* (2006) utilizaram retalhos de túnica albugínea na reconstrução do ureter de cães e observaram bons resultados na substituição de parte do órgão. O uso da túnica albugínea como biomaterial mostrou-se

vantajoso por ser um tecido de fácil obtenção, processamento e aplicação (Nunes, 2007).

O objetivo do presente trabalho é avaliar o comportamento da túnica albugínea suína na cistoplastia em ratos com relação à regeneração tecidual, à funcionalidade do órgão e à possibilidade de complicações como: rejeição, inflamação e formação de urólitos, além de propor a túnica albugínea suína como um novo biomaterial nos procedimentos de reparação da bexiga.

## MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Fluminense, com o protocolo de número 534/14.

A enxertia foi obtida por meio de orquiectomia, pela técnica de testículo descoberto, cordão descoberto, de um suíno filhote. A túnica albugínea foi conservada em solução de glicerina 98% com neomicina a 10% durante 60 dias. Para a realização do experimento, foram utilizados 30 ratos Wistar, machos, de seis meses de idade, provenientes do Núcleo de Animais de Laboratório (NAL) da Universidade Federal Fluminense. Os animais foram acondicionados em gaiolas, sob temperatura e luminosidade naturais, recebendo água potável e ração e foram divididos em dois grupos: um grupo teste (TA), cujos animais sofreram uma cistectomia parcial com aplicação do enxerto de túnica albugínea suína, e um grupo controle (C), em que os animais sofreram somente a cistectomia parcial.

A indução anestésica foi realizada com a associação de cetamina, midazolam e tramadol, nas doses de 75mg/kg, 10mg/kg e 15mg/kg, respectivamente, via intraperitoneal.

A técnica cirúrgica utilizada foi semelhante em ambos os grupos: os ratos foram colocados em decúbito dorsal e, após tricotomia e antisepsia do campo operatório, foram submetidos à laparotomia longitudinal mediana retroumbilical, com incisão de aproximadamente dois centímetros de extensão. Após a exposição da bexiga, realizou-se seu esvaziamento por meio de cistocentese com seringa e agulha de insulina. Em seguida, removeu-se 1/3 da área da bexiga. No grupo C, a sutura foi realizada em padrão

contínuo, com ácido poliglicólico 5-0, unindo os bordos da parede da bexiga. O grupo TA recebeu o mesmo padrão de sutura, porém unindo o enxerto aos bordos da parede vesical. A omentalização da bexiga foi realizada em ambos os grupos. A rafia da parede abdominal foi realizada com fio inabsorvível monofilamentar 3-0, em padrão contínuo, bem como a pele. Foi respeitado o mesmo tempo cirúrgico entre os grupos C e TA, com duração de oito minutos.

No pós-operatório, os animais foram acondicionados em caixas isoladas, durante sete dias, para melhor observação deles. Foram avaliados aspectos clínicos como: estado geral do animal, apetite, grau de atividade, aspecto da ferida cirúrgica e características da urina. A terapia pós-operatória incluiu enrofloxacino (5mg/kg) a cada 24 horas, cetoprofeno (10mg/kg) a cada 24 horas e dipirona sódica (100mg/kg) a cada 12 horas, via subcutânea, durante cinco dias.

Cada grupo foi dividido em três subgrupos, com cinco animais cada, os quais sofreram eutanásia mediante inalação de sobredose isoflurano, em sete, 28 e 42 dias de pós-operatório.

Durante a necropsia, a bexiga foi extraída, esvaziada e, em seguida, fixada em formalina tamponada a 10%, durante quatro semanas. Foram avaliados sinais de inflamação intra-abdominal e reação, como deiscência de sutura, presença de líquido livre e aderências. Após a fixação, as amostras foram clivadas e processadas histologicamente, para obtenção de cortes histológicos de 5µm de espessura. Os fragmentos foram depositados em lâminas de vidro e corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Gomori.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um animal pertencente a cada grupo (C e TA) apresentou quadro de ascite e óbito no terceiro dia de pós-operatório, por deiscência de sutura ou não adesão do enxerto. Três animais de cada grupo apresentaram quadro de hematúria dentro dos três primeiros dias de pós-operatório, com resolução espontânea nos dias subsequentes.

As alterações macroscópicas observadas na necropsia foram: urolitíase, muco e coágulo no interior bexiga. A urolitíase foi presente em sete

dos 15 animais pertencentes ao grupo C e em quatro dos 15 animais do grupo TA. Piechota *et al.* (1999) realizaram a implantação de matriz acelular de bexiga em ratos e observaram a formação de urolitíase em três dos 10 animais do grupo controle e em 16 dos 20 animais do grupo teste. Wefer *et al.* (2001) observaram 78% de formação de cálculos urinários nos ratos que receberam o enxerto de matriz extracelular de bexiga.

Outros relatos sugerem que qualquer tipo de cistoplastia em ratos predisponha à formação de urolitíase (Guan *et al.*, 1990; Khoury *et al.*, 1992), entretanto a túnica albugínea suína se mostrou menos litogênica (30% dos animais) quando comparada ao grupo controle do presente trabalho e aos trabalhos de Piechota *et al.* (1999) e Wefer *et al.* (2001), que se aproximaram de 80% de casos de urolitíase entre os animais que receberam o enxerto de matriz acelular de bexiga.

Um animal do grupo C apresentou coágulo e outro animal apresentou muco, enquanto no grupo TA, dois animais apresentaram muco.

No presente trabalho, não foram observadas aderências, diferentemente do que relatam Oliveira *et al.* (2008) e Souza (2014), em que todos os animais submetidos ao procedimento apresentaram algum tipo de aderência, seja ao omento, ao reto, ao intestino delgado, seja ao peritônio. Esse fato pode ser explicado pela realização de omentalização da bexiga durante o procedimento cirúrgico para evitar aderências de demais tecidos.

Na avaliação histopatológica após sete dias de pós-operatório, observou-se, no grupo TA, inflamação moderada com neovascularização, urotelização da área enxertada e integridade das camadas da bexiga, em processo de franca regeneração. O enxerto apresentava-se íntegro, com infiltrado inflamatório incipiente, disperso junto ao colágeno da lâmina própria (Fig. 1A). O grupo C apresentou sinais de inflamação mais intensa, com presença de muitos polimorfonucleares, além de neovascularização intensa e urotelização da área acessada. Apesar de haver a integridade das camadas, estas se apresentavam desorganizadas, demonstrando um retardo no processo de regeneração (Fig. 1B).

Dessa forma, sugere-se que a túnica albugínea suína apresentou pouca antigenicidade, diferindo também dos achados de Nuininga *et al.* (2004), que observaram intenso infiltrado inflamatório aos 14 dias de pós-operatório, e de Oliveira *et al.* (2008), que verificaram intenso infiltrado inflamatório misto aos sete dias de pós-operatório ao enxertarem, respectivamente, submucosa intestinal suína e peritônio bovino para a cistoplastia em coelhos.

De acordo com Sievert e Tanagho (2000), a repopulação do urotélio é essencial para formar a barreira impermeável à urina e evitar reações inflamatórias na região da adesão do enxerto. No presente trabalho, após sete dias de cirurgia, houve urotelização completa da região do enxerto, o que garantiu a integridade do tecido subjacente, diferindo dos resultados de Oliveira *et al.* (2008), que só observaram regeneração do epitélio e da lâmina própria após o uso do enxerto de peritônio bovino em coelhos aos 60 dias de pós-operatório.

Nuininga *et al.* (2004) não observaram proliferação celular sobre o enxerto aos 14 dias de pós-operatório em coelhos. O urotélio só foi visível sobre o enxerto aos 30 dias de pós-operatório, e após três meses ainda se podia diferenciar a área enxertada da parede normal da bexiga. Já Yang *et al.* (2005) observaram urotelização e presença de fibras musculares aos sete dias de pós-operatório de cistectomia parcial com enxerto de matriz extracelular de bexiga em coelhos.

Após 28 dias de pós-operatório, o grupo TA apresentou urotelização completa e musculatura bem desenvolvida (Fig. 1C). Foi possível observar ainda resquícios do enxerto na região da lâmina própria e entremeado às fibras musculares. O grupo controle apresentou as mesmas características, porém com musculatura menos desenvolvida próxima à região da ferida (Fig. 1D).

O processo de regeneração mais lento do grupo controle, principalmente relacionado à organização da musculatura, quando comparado ao grupo que recebeu a túnica albugínea suína, pode ser explicado pelo fato de o enxerto exercer o papel de arcabouço para a migração celular, permitindo um processo mais rápido e organizado de regeneração da bexiga. Após 42 dias de pós-operatório, ambos os grupos

apresentaram processo de regeneração concluído (Fig. 1E e 1F) e, no grupo TA, o enxerto já tinha sido completamente absorvido.

Wefer *et al.* (2001) avaliaram a regeneração do músculo liso em ratos submetidos à cistectomia parcial com enxerto de matriz acelular de bexiga e relataram que, aos seis dias de pós-operatório, já havia fibroblastos próximos ao bordo do enxerto. Aos 10 dias, a maioria das células do enxerto era formada por fibroblastos e, em três semanas, os fibroblastos já mudavam suas características para células de músculo liso.

No presente trabalho, pôde-se observar a presença de fibras musculares desorganizadas já em sete dias de pós-operatório e, aos 42 dias, a musculatura lisa da bexiga já apresentava características histológicas normais. Piechota *et al.* (1999) observaram que, após quatro meses de pós-operatório, todas as camadas da bexiga estavam presentes e que a superfície interna do enxerto era coberta por uma camada de urotélio com uma muscular da mucosa diferenciada, o que já foi observado aos 28 dias de pós-operatório neste trabalho.

Não foi avaliada a inervação da bexiga neste trabalho devido ao curto período de pós-operatório. Piechota *et al.* (1999) relatam que a inervação se restabeleceu em três meses de pós-operatório e que a pressão de micção foi menor nos animais enxertados, preservando o funcionamento normal dos rins. Os animais avaliados no presente trabalho apresentavam, aos 42 dias de pós-operatório, padrão de micção normal e perfeito estado de saúde e atividade, o que não sugere o comprometimento da função do sistema urinário.

A presença de infiltrado inflamatório, bem como a neovascularização nos primeiros dias dos grupos TA e C, demonstra o início do processo de reparação tecidual, em que ocorre a fase inflamatória seguida da fase de reparação, como exposto por Probst (1998). A vascularização foi maior no grupo TA, podendo sugerir a presença de fatores de crescimento vascular estimulados pelo enxerto, porém esses fatores não foram pesquisados no presente trabalho. A urotelização ocorreu em ambos os grupos, no entanto o grupo controle apresentou um urotélio mais desorganizado, provavelmente pela ausência de uma base para a migração celular.

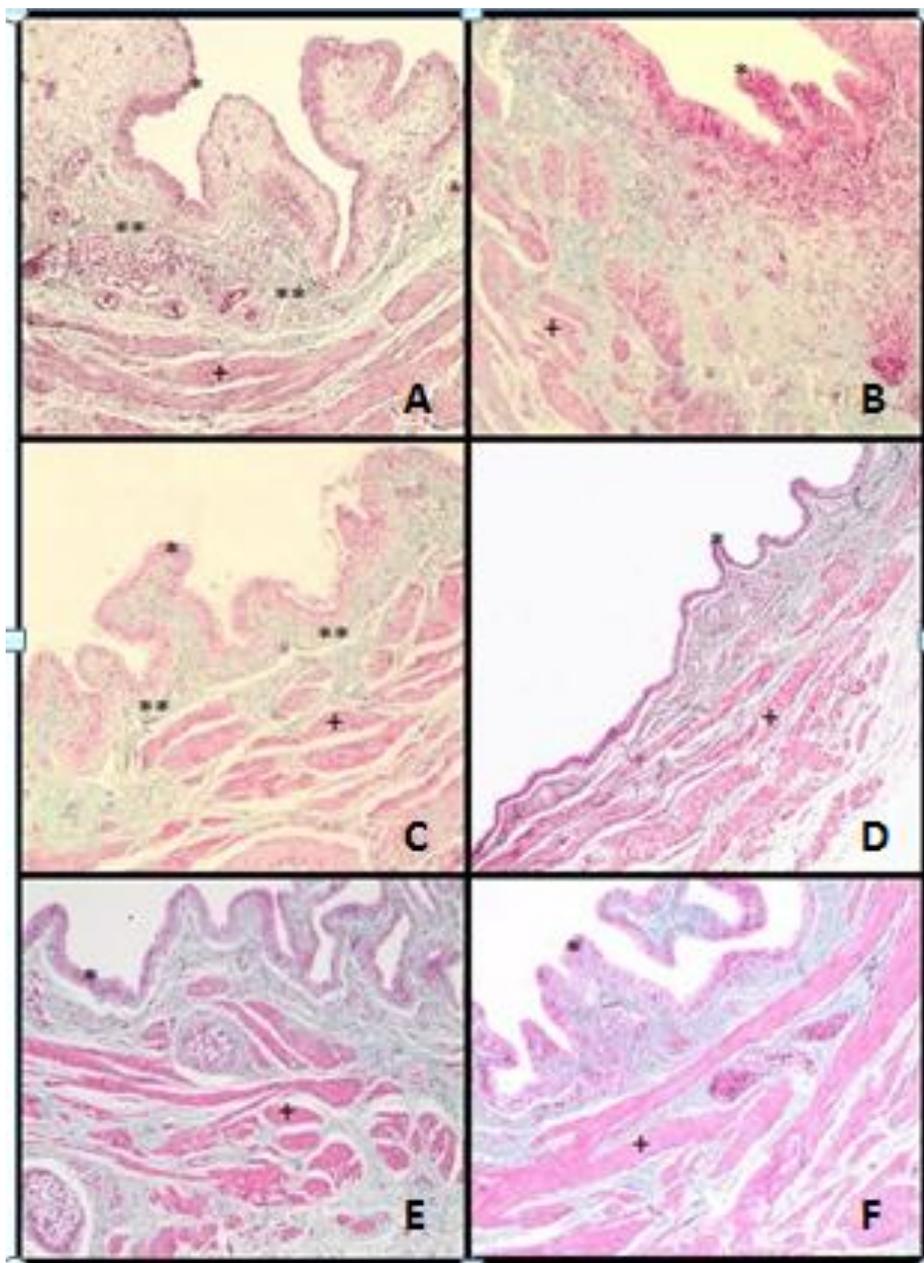


Figura 1. Fotomicrografia da bexiga de rato após cistectomia parcial. A. Grupo TA, sete dias apresentando urotelização contínua (\*), neovascularização intensa e desenvolvimento da camada muscular (+) e enxerto de túnica albugínea representada por colágeno mais denso e área de maior vascularização (\*\*). B. Grupo C, sete dias, em que se observa o urotélio contínuo, mas desorganizado (\*), bem como a musculatura menos desenvolvida na área da ferida (+). Pouca vascularização e intenso infiltrado inflamatório. C. Grupo TA, 28 dias de pós-operatório apresentando urotelização completada (\*) e regeneração da camada muscular (+), além de resquícios do enxerto entremeados às fibras musculares (\*\*). D. Grupo C, 28 dias, em que se observa a continuidade do urotélio (\*) e diminuição da quantidade de fibras musculares próximas à área da ferida (+). E. Grupo TA, 42 dias pós-operatório apresentando regeneração completada e absorção completa do enxerto. F. Grupo C, 42 dias pós-operatório demonstrando a regeneração completada. Tricrômio de Gomori – Objetiva de 4x (UFF, 2015).

Ao se comparar a túnica albugínea suína com o enxerto de matriz acelular de bexiga em ratos e com a submucosa intestinal suína e o peritônio bovino em coelhos, observou-se que ela demonstrou ser um bom biomaterial na reconstrução da vesícula urinária. Entretanto, ainda faltam estudos envolvendo o uso desse biopolímero com relação à capacidade vesical, à inervação e à produção de fatores de crescimento.

### CONCLUSÃO

A túnica albugínea suína favoreceu a migração celular e a regeneração da bexiga em ratos, obtendo melhores resultados quando comparada ao grupo controle e a outros biomateriais, como: matriz extracelular de bexiga, submucosa intestinal suína e peritônio bovino, em relação ao grau de inflamação, à formação de urólitos e à regeneração tecidual. Dessa forma, a túnica albugínea suína mostrou-se uma nova e satisfatória opção de biomaterial na cistectomia parcial, garantindo a complacência e a funcionalidade da bexiga.

### REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, E.J. *Ileocistoplastia em cães – estudo experimental*. 2003. 42f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- AYYLDIZ, A.; AKGÜL, K.T.; HURI, E. *et al.* Use of porcine small intestinal submucosa in bladder augmentation in rabbit: long-term histological outcome. *ANZ J. Surg.* v.78, p.82-86, 2008.
- CAIONE, P.; CAPOZZA N.; ZAVAGLIA, D. *et al.* In vivo bladder regeneration using small intestinal submucosa: experimental study. *Pediatr. Surg. Int.*, v.22, p.593-599, 2006.
- DA ROS, C.T.; GRAZIOTTIN, T.M.; RIBEIRO, E.; AVERBECK, M.A. *et al.* Long-term follow-up of penile curvature correction utilizing autologous albugineal crural graft. *Int. Braz. J. Urol.*, v.38, p.242-249, 2012.
- GADJA, M.; TYLOCH, J.; TYLOCH, F. *et al.* Morphologic changes in the canine urinary tract after ureteral reconstruction with the tunica albuginea. *Int. Urol. Nephrol.*, v.38, p.215-224, 2006.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. *Tratado de histologia em cores*. 2.ed. Rio de Janeiro: 2003. 237p.
- GRECA, F.H.; SOUSA FILHO, Z.A.; SILVA, A.P.G. *et al.* Utilização da submucosa de intestino delgado porcino como retalho para aumento da capacidade vesical em cães. *Acta Cir. Bras.*, v.19, p.670-676, 2004.
- GUAN, Z.C.; RICARD, G.; CHAREST-BOULÉ, L. *et al.* Augmentation cystoplasty in rats: development of an animal model. *J. Urol.*, v.144, p.461, 1990.
- HSU, G.L.; BROCK, G.; MARTÍNEZ-PIÑEIRO, N. *et al.* Anatomy and strength of the tunica albuginea: its relevance to penile prosthesis extrusion. *J. Urol.*, v.151, p.1205-1208, 1994.
- KHOURY, J.M.; TIMMONS, S.L.; LUC, C.; WEBSTER, G.D. *et al.* Complications of enterocystoplasty. *Urology*, v.40, p.9, 1992.
- KUNG LIN, H.; MADIHALLY, V.; PALMER, B. *et al.* Biomatrices for bladder reconstruction. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v.82-83, p.47-63, 2015.
- NUININGA, J.E.; MOERKERK, A.; HASSEN, C.A. *et al.* A rabbit model to tissue engineer the bladder. *Biomaterials*, v.25, p.1657-1661, 2004
- NUNES, V.A. *Enxerto de túnica albugínea como reforço de parede abdominal em cães*. 2007. 28f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- OLIVEIRA, T.C.; SCAVONE, A.R.F.; MACHADO, M.R.F.; MAZUCATTO, B.C. *et al.* Cistoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com peritônio bovino conservado em glicerol 98%. *Ciênc. Rural*, v.38, p.2218-2224, 2008.
- PIECHOTA, H.J.; GLEASON C.A.; DAHMS, S.E. *et al.* Bladder acellular matrix graft: in vivo functional properties of the regenerated rat bladder. *Urol. Res.*, v.27, p.206-203, 1999.
- PROBST, C.W. Cicatrização das feridas e regeneração de tecidos específicos. In: SLATER, D. *Manual de cirurgia de pequenos animais*. 2.ed. Philadelphia: Saunders. Company, 1998. v.1, p.66-78.

*Avaliação morfofuncional...*

SCHOELLER, T.; LILLE, S.; STENZI A. *et al.* Bladder reconstruction using a prevascularized capsular tissue seeded with urothelial cells. *J. Urol.*, v.165, p.980-985, 2001.

SCHWARZER, U.; MÜHLEN, B.; SCHUKAI, O. Penile corporoplasty using tunica albuginea free graft from proximal corpus cavernosum: a new technique for treatment os penile curvature in peyronie´s disease. *Eur. Urol. J.*, v.44, p.720-723, 2003.

SIEVERT, K.D.; TANAGHO, E.A. Organ-specific acellular matrix for reconstruction of the urinary tract. *World J. Urol.*, v.18, p.19-25, 2000.

SOUZA, A.S.F. *Cistoplastia experimental em coelhos (oryctolagus cuniculus) com pericárdio ovino conservado em glutaaraldeído 1% e glicerina 98%*. 2014. 21f. Dissertação (Mestrado em Patologia e Ciências Clínicas) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

WEFER, J.; SIEVERT, K.D.; SCHLOTE, N. *et al.* The dependent smooth muscle regeneration and maturation in a bladder acellular matrix graft: histological studies and in vivo functional evaluation. *J.Urol.*, v.165, p.1755-1759, 2001.

WONGSETTHACHAI, P.; PRAMATWINAI, C.; BANLUNARA, W.; KALPRAVIDH, M. *et al.* Urinary bladder substitution using autologus tunica vaginalis in male dogs. *Res. Vet. Sci.*, v.90, p.156-159, 2011.

YANG, S.; SHEN, F.; HU, Y. *et al.* Experimental bladder defect in rabbit repaired with homologous bladder extracellular matrix graft. *Chin. Med. J.*, v.118, p.957-960, 2005.

ZHANG, Y.; FRIMBERGER, D.; CHENG E.Y. *et al.* Challenges in a larger bladder replacement with cell-seeded and unseeded small intestinal submucosa grafts in a subtotal cystectomy model. *BJU Int.*, v.98, p.1100-1105, 2006.