

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

VETERINÁRIA

PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

DISSERTAÇÃO

CISTOPLASTIA EXPERIMENTAL EM COELHOS

(*Oryctolagus cuniculus*) COM PERICÁRDIO OVINO

TRATADO COM GLUTARALDEÍDO A 1% E

CONSERVADO EM GLICERINA 98%

ALESSANDRA SANTOS FEIJÓ DA SILVA SOUZA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CISTOPLASTIA EXPERIMENTAL EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) COM PERICÁRDIO OVINO TRATADO COM GLUTARALDEÍDO A 1% E CONSERVADO EM GLICERINA 98%

ALESSANDRA SANTOS FEIJÓ DA SILVA SOUZA

Sob a orientação da Professora

Marta Fernanda Albuquerque da Silva

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ

Janeiro de 2014

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S729c Souza, Alessandra Santos Feijó da Silva, 1980-
Cistoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com pericárdio ovino tratado com glutaraldeído a 1% e conservado em glicerina 98% / Alessandra Santos Feijó da Silva Souza. - 2014. 50 f. : il.

Orientadora: MARTA FERNANDA ALBUQUERQUE DA SILVA. Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, PPGMV, 2014.

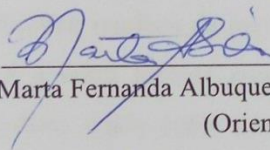
1. Bioprótese. 2. Membrana Biológica. 3. Glicerina. 4. Glutaraldeído. I. SILVA, MARTA FERNANDA ALBUQUERQUE DA, 1962-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. PPGMV III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

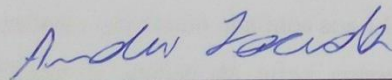
ALESSANDRA SANTOS FEIJÓ DA SILVA SOUZA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas.

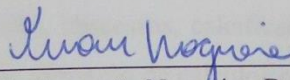
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/01/ 2014



Marta Fernanda Albuquerque da Silva. Dr. UFRRJ
(Orientadora)



André Lacerda Abreu de Oliveira. Dr. UENF



Vivian de Assunção Nogueira. Dr. UFRRJ

RESUMO

SOUZA, Alessandra Santos Feijó da Silva. **Cistoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com pericárdio ovino tratado com glutaraldeído a 1% e conservado em glicerina 98%**. 2014. 42p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014

O objetivo deste estudo foi verificar se o pericárdio ovino tratado com glutaraldeído a 1% e conservado em glicerina 98% fornece arcabouço para orientação e desenvolvimento dos tecidos vesicais, mediante processos de reparação, restabelecendo totalmente os tecidos que compõem a bexiga, além de avaliar a biocompatibilidade desta bioprótese, comparando-a com a mesma membrana conservada em glicerina 98%. Foram utilizados 36 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*, Lagomorfa, Mammalia) da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas adultos com média de peso entre 2 e 3 quilos, nos quais foram produzidos defeitos cirúrgicos na parede de bexiga de 1,5cm x 1,5cm, substituídos por retalho de pericárdio ovino, de mesma dimensão. Metade dos animais recebeu retalhos de pericárdio ovino conservados em glicerina a 98% a pelo menos 30 dias e a outra metade recebeu retalhos de pericárdio ovino tratados em glutaraldeído por 18 dias, sendo então transferidos para frascos contendo glicerina, onde foram mantidos por um período mínimo de 30 dias. Os animais foram divididos em 6 grupos, cada um constituído por 6 animais que foram abatidos aos 14, 30 e 60 dias após a implantação dos enxertos. Foram realizadas a análise da urina coletada durante o trans-cirúrgico e imediatamente após o abate pelo exame de Elementos Anormais e Sedimentoscopia (EAS), avaliações macroscópicas quanto a ocorrência de possíveis complicações da enxertia tais como: seromas, hematomas, fístulas, abscessos, calcificações, aderências, não incorporação do enxerto ou deiscência da sutura, formação de cálculos na luz do órgão e presença de muco. Através de análise histopatológica foram quantificados e qualificados os processos inflamatório e de reparação. O exame de urina revelou presença constante de bactérias, apesar do método asséptico de coleta, além de cristalúria, proteína e sangue oculto, dentre outras alterações. Não foram observadas complicações associadas à enxertia. Cálculos estavam presentes em 35 dos 36 animais. A avaliação microscópica mostrou características do processo inflamatório e de reparação semelhantes nos dois tipos de tratamento das membranas, com evolução favorável em todos os períodos de observação e total incorporação do enxerto aos 60 dias pós-implante. Conclui-se que o pericárdio ovino tratado com solução

de glutaraldeído a 1% e conservado em glicerina 98%, assim como aquele somente conservado em glicerina 98%, é capaz de promover a reconstituição da parede vesical apresentando ótimo nível de biocompatibilidade.

PALAVRAS CHAVE: Bioprótese, Membrana Biológica, Glicerina, Glutaraldeído.

ABSTRACT

SOUZA, Alessandra Santos Feijó da Silva. **Experimental cystoplasty in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with ovine pericardium treated with 1% glutaraldehyde and preserved in 98% glycerin.** 2014. 42p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The aim of this study was to verify if the ovine pericardium treated with 1% glutaraldehyde provides a framework for guidance and development of bladder tissue, by means of repair processes, fully restoring the tissues that make up the bladder, and to evaluate the biocompatibility of this bioprosthesis comparing with the same membrane preserved in 98% glycerol. Thirty six rabbits (*Oryctolagus cuniculus*, Lagomorfa, Mammalia) New Zealand, adult males and females, weighing on average between 2 and 3 kilograms were used, in which surgical defects of 1.5 cm x 1.5 cm were produced in the bladder wall, which were then replaced by ovine pericardial patches of the same dimension. Half of the animals received patches of ovine pericardium preserved at least for 30 days in 98% glycerin. The other half received patches of ovine pericardium treated in glutaraldehyde for 18 days and then transferred to vials containing glycerin, where they were kept for a minimum period of 30 days. The animals were divided into 6 groups, each consisting of 6 animals, which were slaughtered at 14, 30 and 60 days after implantation of the grafts. Analysis of urine collected during the trans-surgical and immediately after slaughter through Abnormal Elements and Sedimentoscopy Test were performed, as well as macroscopic evaluations regarding the occurrence of possible complications of grafting such as seromas, hematomas, fistulas, abscesses, calcifications, adhesions, no incorporation of the graft or suture dehiscence, urinary calculus and mucus. Inflammatory and repair processes were quantified by histopathological analysis. Urinalysis revealed the constant presence of bacteria, despite the aseptic collection method, as well as crystalluria, protein and occult blood, among other changes. No complications associated with graft were observed. Calculi were present in 35 of 36 animals. Microscopic examination showed features of inflammation and repair processes similar in the two types of membranes treatment, a favorable outcome in all periods of observation and full incorporation of the graft at 60 days post- implant. The conclusion is that the ovine pericardium treated with a solution of 1% glutaraldehyde and preserved in glycerol 98%, as

well as only preserved in glycerol 98%, is able to promote the recovery of bladder wall showing optimal level of biocompatibility.

KEY WORDS: Bioprosthesis, Biological Membrane, Glycerol, Glutaraldehyde.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Conservação de membranas biológicas	3
3.2 Características do pericárdio	4
3.3 Pericárdio tratado com glutaraldeído	6
3.4 Reconstrução vesical	7
3.5 Membranas biológicas implantadas na bexiga	8
4. METODOLOGIA	11
4.1 Obtenção e limpeza da membrana biológica	11
4.2 Preparação das soluções de glutaraldeído e glicerina	11
4.3 Tratamento e conservação dos pericárdios ovinos	11
4.4 Amostragem dos animais	12
4.5 Procedimentos pré, trans e pós-cirúrgicos	12
4.6 Avaliações	14
4.6.1 Avaliação clínica	14
4.6.2 Análise da urina	14
4.6.3 Coleta das amostras e avaliação macroscópica	14
4.6.4 Processamento e análise microscópica das amostras teciduais	15
5. RESULTADOS	17
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÃO	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

Quando há comprometimento da capacidade de armazenamento da bexiga, os transtornos funcionais muitas vezes são graves e incapacitantes. Há casos onde é imprescindível a realização de cirurgias reconstrutivas para a correção da baixa capacidade de contenção e alta pressão intravesical. As principais indicações para este tipo de cirurgia são os traumas graves, neoplasias e cistites intersticiais recorrentes.

Tradicionalmente tem se tentado a reconstrução da vesícula urinária após cistectomia parcial, por meio da transposição de segmento autólogo de intestino ou estômago, conhecida como anastomose do trígono vesical, utilizada sobretudo no homem; apresenta inconvenientes, principalmente pela diferença histológica entre o enxerto e a bexiga, tempo prolongado de cirurgia, bem como pelo alto risco de contaminação. As complicações mais observadas são urolitíases, fístulas, contração do enxerto e produção de muco.

Grande variedade de materiais tem sido usada na reconstrução da bexiga. O pericárdio bovino vem sendo amplamente utilizado para fornecer arcabouço e orientar a cicatrização mediante processos de reparação que restabelecem a estrutura e a função dos tecidos lesados. O pericárdio de outras espécies tem demonstrado características diferenciadas, principalmente quanto à espessura e maleabilidade, que podem facilitar sua utilização na parede vesical.

Para a utilização de qualquer biomaterial é necessário submetê-lo a tratamento químico. O agente químico para tratamento e conservação de materiais biológicos mais conhecido e utilizado na medicina veterinária no Brasil é a glicerina a 98%, porém há uma grande preocupação com o fato da ação antimicrobiana da glicerina ser restrita a bactérias não esporuladas e fungos, permitindo a transmissão de agentes virais e bactérias esporuladas ao animal receptor de enxertos homólogos ou heterólogos.

Desde 1969 utiliza-se o glutaraldeído na conservação de materiais biológicos, sendo eficiente contra formas vegetativas bacterianas. A concentração usual do glutaraldeído para este fim varia de 0,5% a 0,625% considerada como esterilizante e não prejudicial à incorporação do implante. Todavia, sabe-se que na concentração de 0,625% o glutaraldeído é incapaz de inativar o vírus rábico e, por este motivo, concentrações mais altas devem ser testadas.

2 OBJETIVO

Verificar se a solução de glutaraldeído a 1% para tratamento do pericárdio ovino, associado à conservação em glicerina 98%, permite que esta bioprótese forneça arcabouço para orientação e desenvolvimento dos tecidos vesicais, mediante processos de reparação, restabelecendo totalmente os tecidos que compõem a bexiga, além de avaliar a biocompatibilidade desta bioprótese, comparando-a com a mesma membrana conservada em glicerina 98%.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Conservação de Membranas Biológicas

A utilização de membranas biológicas, no Brasil, teve início a partir da implantação experimental de dura-máter homóloga, conservada em glicerina, na substituição de segmento dural de cães (PIGOSSI, 1967).

Pigossi, em 1967, frente à necessidade de utilizar membranas biológicas para reparação cirúrgica, realizou um estudo experimental em cães. Ele analisou no período de 19 a 105 dias a dura-máter canina, que após lavagem em água corrente para retirada de sujidades, foi acondicionada em frasco de tubo de ensaio com glicerina pura à temperatura ambiente e conservada durante este período. Em períodos variáveis, exames histológicos das peças de dura-máter foram realizados para a verificação de alteração em sua textura e uma discretíssima delaminação do colágeno foi notada e, posteriormente, atribuída à desidratação.

Estas membranas foram implantadas em dura-máter de cães sem realização de testes bacteriológicos prévios. Os animais foram acompanhados e mortos em períodos de 10 a 360 dias, sendo um animal por mês, e à necropsia apresentavam ausência de reação inflamatória aguda. De acordo com o autor, este fato indicou a esterilidade e baixa antigenicidade do material implantado, uma vez que os animais não receberam antibioticoterapia. Posteriormente houve substituição da dura-máter com a reabsorção e incorporação do material implantado nos casos de período de evolução mais longo (PIGOSSI, 1967; PIGOSSI et al., 1971).

O primeiro agente químico utilizado no tratamento de membranas biológicas foi a solução de glicerina e durante muitos anos foi o único produto usado na medicina veterinária. Esta solução, em altas concentrações, atua desidratando o tecido e removendo a maior parte da água intracelular sem, contudo, alterar as concentrações iônicas das células, sendo por isso eficaz fixador e protetor da integridade tecidual (PIGOSSI, 1967; PIGOSSI et al., 1971; LEITE et al., 1979; BRAILE, 1990).

Muitos experimentos foram e vêm sendo realizados com membranas biológicas conservadas com glicerina (PIGOSSI, 1967; PIGOSSI et al., 1971; ALVARENGA, 1992;

LEITE et al., 1979; BRAILE, 1990; BARROS et al., 1994; ALMEIDA et al., 1998; BRANDÃO et al., 2001; GURGEL & CORTEZ FILHO, 2001; QUITZAN et al., 2003; BRUN et al., 2004; BRAGA & PIPPI, 2011) e os resultados obtidos sempre foram satisfatórios tanto em relação à reação inflamatória quanto ao processo regenerativo. De acordo com Leite et al. (1979) este agente químico proporciona ausência de reações inflamatórias agudas dos implantes, o que indica a baixa antigenicidade do transplante mantido neste meio de conservação, e para Mota et al. (2002) a solução de glicerina 98% é a que melhor mantém a integridade celular. No entanto, esta solução possui ação antimicrobiana restrita e de acordo com Rodas et al. (2008) a glicerina possui ação citotóxica em concentrações acima de 78% - de acordo com os autores, o extrato de pericárdio bovino tratado com glicerina 78%, ao ser implantado em uma cultura de células ovarianas de hamster eliminou 50% da população celular indicando, portanto, atividade citotóxica.

Pigossi et al. (1971), relataram a impossibilidade de investigação da transmissão de partículas virais por meio de membranas biológicas tratadas com glicerina 98% por motivos técnicos, no entanto consideram esta solução de tratamento, embora seja utilizada em concentrações menores para manutenção viral na rotina de laboratórios, capaz de inativar partículas e evitar a transmissão de doenças causadas por vírus quando em conservação prolongada e à temperatura ambiente. Porém, Trani (2006) demonstrou que, mesmo à temperatura ambiente e por período de 30 dias, o vírus rábico foi mantido em pelo menos 50% das amostras tratadas.

O glutaraldeído (C₅H₈O₂), também conhecido como pentanedial, é uma solução química, biocida e desinfetante, utilizada no tratamento químico, conservação e fixação de biomateriais (U.S.DHHS, 2011). A sua utilização teve início na medicina humana no final dos anos 60. A aplicação desta solução de tratamento e conservação abrange membranas biológicas como cartilagens (ADLINGTON et al., 1992), por exemplo, além de implantes de pele (ZHENG, 1991), colágeno (OLIVER et al., 1975; OLIVER e GRANT, 1980) e pericárdios autólogos ou heterólogos, tendo então se mostrado eficiente em muitos estudos.

3.2 Características do Pericárdio

O pericárdio é uma membrana que forma um saco fibroso, grosso, translúcido, de duas capas. É composto por uma folha fibrosa externa que se adere ao esterno, aos grandes vasos e

ao diafragma, e por uma membrana serosa interna. Sua capa fibrosa está coberta por uma lâmina serosa de células cubóides, que junto com a membrana serosa formam o pericárdio parietal. A membrana serosa, por sua vez, se reflete na superfície epicárdica formando o pericárdio visceral. O maior constituinte do pericárdio parietal é o tecido fibroso, cujos principais componentes são as fibras compactas de colágeno dispostas entre três capas orientadas em ângulos iguais entre si. As fibras de elastina também formam parte do pericárdio, no entanto são menos numerosas, não formam fibras densas e tendem a estar orientadas em ângulo reto com relação às fibras colágenas adjacentes. A predominância de colágeno e sua configuração anatômica são muito importantes para as propriedades viscoelásticas do pericárdio (COVARRUBIAS et al., 2005).

O pericárdio ovino a fresco é constituído de epitélio simples pavimentoso (mesotélio), repousando sobre camada de tecido conjuntivo frouxo, seguida por outra camada fibrocolágena compacta denominada de tecido conjuntivo denso não modelado, com fibras pouco acidófilas dispostas irregularmente, próximas entre si, e com núcleos de células (fibrócitos) acentuadamente basófilos; pode-se observar também vasos sanguíneos muitas vezes circundados por tecido adiposo e a substância fundamental amorfa. Nas amostras de pericárdio parietal conservadas em glicerina a 98%, nos dias 15, 30, 60 e 90, foi verificada uma desorganização tecidual, mais acentuada aos 15 dias (BARBOSA et al., 2012).

O pericárdio é um material de origem biológica altamente resistente, de fácil manejo cirúrgico, maleável e sem problemas de reação como corpo estranho. Além disso, é um tecido de fácil obtenção. O tratamento do pericárdio com glutaraldeído proporciona propriedades mecânicas e imunogênicas, flexibilidade, reduz a trombogenicidade e controla a degradação tecidual (MAIZATO et al., 2008). Após o tratamento, com remoção de restos celulares, proteínas degradáveis e lipídeos, ele consiste de uma malha de fibras colágenas, um material fácil de suturar, com boa força, mínima elasticidade, e ausência de irritações no contato com outros materiais (ANSON & MARCHAND, 1996 apud YAMATOOGI et al., 2005).

Com base nessas qualidades adquiridas, o pericárdio recebe indicações para cirurgia cardiovascular (fechamento de defeitos intercavitários, ampliação da via de saída do ventrículo direito, alargamento do anel aórtico em trocas valvares, tratamento de aneurismas de aorta e ventrículo esquerdo, reconstruções atriais e ventriculares), torácica (fechamento de coto brônquico, fechamento de hérnias diafragmáticas, tratamento de defeitos congênitos e

traumáticos da parede torácica), geral (tratamento cirúrgico de hérnias e eventrações), urológica (cistoplastias, ureteroplastias) e neurocirurgia (substituição de dura-máter) (FONTE: BRAILE BIOMÉDICA - INDÚSTRIA DE PRODUTOS CARDIOVASCULARES, 2011).

3.3 Pericárdio Conservado com Glutaraldeído

O material utilizado em implantes somente é ideal para aplicações “in vivo” se for biocompatível e causar a menor toxicidade ou injúria ao tecido, e não deve ser carcinogênico ou imunogênico (TANG et al. 1995). Ao longo dos anos, o pericárdio tem se mostrado um eficiente biomaterial com bons resultados, além de ser de fácil obtenção e de baixo custo. Outras vantagens observadas no pericárdio, quando tratado com o glutaraldeído, além da resistência é a ausência de rejeição como corpo estranho (SANTILLAN-DOHERTY et al., 1995), é de fácil manipulação cirúrgica e atua como uma base adequada sobre a qual proliferam fibroblastos com depósito de colágeno e formação de cicatriz em forma satisfatória (SANTILLAN-DOHERTY et al., 1996). Portanto, uma vez que a resposta tecidual local ao biomaterial é o critério mais importante para a determinação da biocompatibilidade, pode-se considerar o pericárdio conservado com glutaraldeído um material biocompatível. O aspecto inerente à compatibilidade sanguínea implica uma série de características intrínsecas ao material de implante, ou seja, não destruir ou sensibilizar os elementos celulares do sangue, não alterar as proteínas plasmáticas, não causar respostas imunes diversas, não induzir à carcinogenicidade ou mutagenicidade, não produzir reações tóxicas ou alérgicas, não depletar eletrólitos, não ser adversamente afetado pela esterilização, apresentar estabilidade no ambiente fisiológico e não provocar calcificação (PINTO et al., 1993).

A eficácia dos aldeídos como esterilizantes para bactérias, fungos e enterovírus depende da concentração, temperatura, pH e tempo de exposição. As baixas concentrações de glutaraldeído, usualmente utilizadas no tratamento de tecidos biológicos não são muito eficazes contra micobactérias, esporos de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*), fungos (*Chaetomium globosum*), e *slow viruses* (vírus com um longo período de incubação entre a infecção e o desenvolvimento de doenças degenerativas como a doença de Creutzfeldt-Jakob) (HILBERT et al., 1988 apud MAIZATO, 2003). Trani (2006), também demonstrou a ineficácia de baixas concentrações de glutaraldeído (0,625%) no tratamento e controle do vírus rábico em pericárdios bovinos tratados. Isto demonstra a necessidade de

aumento das concentrações utilizadas para este tipo de tratamento, entretanto, concentrações maiores são extremamente tóxicas (WERLEY et al., 1996), embora sejam mais rigorosamente desinfetantes.

Devido à toxicidade do glutaraldeído, a lavagem abundante com solução salina antes de a membrana biológica ser implantada se torna uma questão importante (PINTO et al., 1993). Além disso, já foi considerado que qualquer variação no modo de preparação pode influenciar no balanço (equilíbrio) entre a reabsorção do implante e a deposição de fibrose no local do implante (ADLIGTON et al., 1992). Dessa forma, tornam-se necessárias novas pesquisas para se determinar concentração ideal de glutaraldeído que não interfira bruscamente na reação inflamatória, que não provoque intensa calcificação do implante, que não gere uma toxicidade local e que seja capaz de controlar de forma eficaz o crescimento microbiano.

Para Kim et al. (2000), o biomaterial, além da biocompatibilidade, deve promover interação celular e desenvolvimento tecidual, e possuir propriedades mecânicas e físicas como maleabilidade e resistência. Ele deve ser biodegradável e bioabsorvível para suportar a reconstrução de um tecido completamente normal sem inflamação; tal comportamento do biomaterial evitaria o risco de respostas inflamatórias e de corpo estranho que podem estar associadas com a presença permanente do material estranho (KIM et al., 1998).

Biomateriais facilitam a localização e chegada das células e/ou fatores bioativos (peptídeos de adesão celular e fatores de crescimento) aos locais pretendidos no corpo, definem um espaço tridimensional para a formação de novos tecidos com estruturas apropriadas e guiam o desenvolvimento destes novos tecidos com sua apropriada função (KIM & MOONEY, 1998).

3.4 Reconstrução vesical

Alternativas para reconstituição do aparelho urinário, especialmente no que concerne à reconstrução vesical, tem sido pesquisadas (GRECA et al., 2004).

As técnicas de substituição parcial ou total da parede da bexiga por segmentos do trato digestivo são relatadas desde 1888, quando Tizzoni e Foggi aumentaram a bexiga de um cão com uma alça ileal fixada no colo vesical (SONTOULIDES et al., 2009). Vários são os segmentos do trato gastrintestinal que podem ser utilizados na cirurgia urológica, como o

estômago, jejuno, íleo e o colon, sendo o íleo o segmento mais amplamente utilizado (GRECA et al., 2004). Entretanto, complicações inerentes a estes procedimentos não são limitadas àquelas comuns a qualquer cirurgia abdominal, mas também àquelas que resultam da secção do trato gastrointestinal e da interposição de diferentes segmentos digestivos no trato urinário (SONTOULIDES et al., 2009). Em trabalho envolvendo 19 pacientes humanos com acompanhamento pós-cirúrgico médio de 14 anos, Gurung et al. (2012) observaram complicações em 57,9% dos casos, entre elas cálculos, urosepsis, refluxo vesico-ureteral, reimplantação ureteral devido ao refluxo e laparotomia para correção de obstrução intestinal. A ileocistoplastia apresenta um risco baixo porém significativo de malignidade, com tumores agressivos e associados a alta mortalidade; a maioria destes tumores são adenocarcinomas de intestino ou bexiga e carcinomas de células escamosas, embora casos de carcinomas de células de transição também sejam relatados (SONTOULIDES et al., 2009). Higuchi et al. (2001) e Quinta et al. (2013) relatam a necessidade de acompanhamento periódico dos pacientes com exames laboratoriais e de imagem, com objetivo da detecção precoce de alterações neoplásicas.

Técnicas de engenharia tecidual, usando materiais biodegradáveis que atuam como veículos transportadores celulares, envolvem cultivo e cultura *in vitro* de células epiteliais (GRECA et al., 2004). Estas alternativas emergentes, incluindo os avanços na engenharia genética e tecidual e pesquisas com células tronco, são consideradas como a nova fronteira na cirurgia reconstrutiva de bexiga, porém os relatos de resultados a longo prazo ainda são escassos (JOHNSON e SINGH, 2013).

3.5 Membranas biológicas implantadas na bexiga

Complicações locais adversas podem ocorrer na presença de qualquer implante, mas estudos (HENCH, 1998) mostram que os materiais biológicos adaptam-se mais facilmente como implantes e funcionam não só como arcabouços para migração de fibroblastos, mas também como sinalizadores celulares, proporcionando, muitas vezes, não o crescimento de tecido cicatricial e sim de tecido regenerado, apresentando assim uma grande vantagem sobre os implantes não biológicos.

As principais características de uma prótese a ser implantada na bexiga são: biocompatibilidade, capacidade de distensão, não propiciar a formação de cálculos,

impermeabilidade, não ser carcinogênica, se estéril e capaz de manter as propriedades urodinâmicas do órgão em questão (PENTERMANN et al., 1985).

No trabalho de Oliveira et al., (2008), em todos os períodos de observação, havia aderências da região do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdômen . Aos sete e aos 14 dias de pós-operatório, os testículos estavam aderidos ao local da cistoplastia e aos 60 dias notou-se aderência de ceco e de segmento de jejuno ao sítio do implante (OLIVEIRA et al., 2008). Estes achados corroboram os de Daleck et al. (1989), ao verificarem aderências do intestino delgado, reto e epiplon, após cistoplastia dorsal, em cães, com membrana peritoneal bovina, e os de Sutherland et al. (1996), que encontraram aderências da uretra, ovário, tuba uterina e omento à região de reparo vesical, em ratos, com membrana composta por matriz de tecido acelular derivada da parede gástrica e vesical, oriundas desta mesma espécie.

As aderências pós-cirúrgicas que ocorrem na cavidade peritoneal são decorrentes de baixa atividade fibrinolítica no local da lesão cirúrgica, favorecendo o acúmulo de matriz de fibrina e, conseqüentemente, uma fibroproliferação, que se caracteriza por adesão (LIAKAKOS et al., 2001).

É importante resaltar que os implantes em bexiga propiciam a formação de cálculos (PENTERMANN et al., 1985; SUTHERLAND et al., 1996; ELBAHNASY et al., 1998; KROPP, 1998; YOO et al., 1998; YAMATAKA et al., 2003; NUININGA et al., 2004), constituídos por carbonato de cálcio, e não por estruvita, oxalato de cálcio e fosfato de cálcio, conforme constataram Sutherland et al., (1996) e Nuininga et al., (2004).

Alterações urinárias constatadas por Oliveira et al., (2008) em todas as amostras coletadas, como cristalúria composta por carbonato de cálcio e traços de proteína, aspecto turvo, densidade média de 1,030, pH 8 a 9, devem-se tanto ao emprego do implante, quanto ao do fio de sutura, materiais estranhos ao tecido vesical, que, além de ocasionarem alterações na parede da bexiga, serviram de base para a agregação e formação de cálculos (MORRIS et al., 1986). Outro possível fator para essa ocorrência relaciona-se ao tipo de dieta oferecida aos animais, pois as rações comerciais para coelhos são alcalinas, elevando o pH urinário e favorecendo a cristalúria (KIWULL-SCHÖNE et al., 2005).

Aos 60 dias de pós-operatório, OLIVEIRA, et al., (2008) observaram, sob microscopia de luz, que a parede vesical apresentava-se totalmente reconstituída. Foi possível verificar completa reepitelização, presença de lâmina própria, fibras colágenas organizadas, algumas fibras musculares e escassas células inflamatórias mononucleares, corroborando as descrições de DALECK et al. (1987), DALECK et al. (1988) e de COSTA NETO et al. (1999). Em todas as amostras avaliadas aos 60 dias, notou-se a ausência da membrana de peritônio bovino. Logo, pode-se concluir que o peritônio bovino forneceu arcabouço para orientação e desenvolvimento dos tecidos vesicais, restabelecendo, aos 60 dias de pós-operatório, os tecidos que compõem o órgão.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção e Limpeza da Membrana Biológica

Os pericárdios ovinos foram obtidos de animais abatidos em matadouro de Fiscalização Estadual na cidade de Três Rios – RJ. O material coletado foi transportado e conservado em uma embalagem plástica limpa e não estéril, em recipiente térmico com gelo, que manteve os pericárdios em temperatura média de 10°C, aferida com termômetro até a chegada ao laboratório. Em seguida, foi realizada a limpeza pericárdica, retirando-se a gordura para que o tratamento e conservação fossem iniciados.

4.2 Preparação das Soluções de Glutaraldeído e Glicerina

As soluções de glutaraldeído e glicerina foram preparadas no laboratório do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária da UFRRJ. Preparou-se uma solução PBS, composta por fosfato monopotássico, fosfato dissódico, cloreto de sódio e água destilada, que foi utilizada para o tamponamento da solução de glutaraldeído 1%. Obteve-se a concentração da solução através de volume por volume e o pH final 7,2, aferido por pHmetro (TRANI, 2006). Utilizou-se solução de glicerina comercializada na concentração 98%, que, assim como a solução de glutaraldeído, foi armazenada em frascos estéreis com 70ml das soluções cada.

4.3 Tratamento e Conservação dos Pericárdios Ovinos

Os pericárdios ovinos, após a limpeza, foram fracionados em partes com áreas equivalentes a 1,5 x 1,5cm, medidos por paquímetro e, em seguida, cada frasco de solução recebeu um fragmento para que o processo de tratamento fosse iniciado. Os fragmentos em glicerina permaneceram nestes frascos por no mínimo 30 dias (DALECK et al., 1988); em glutaraldeído permaneceram por 18 dias (GOISSIS, 1999), sendo então transferidos para frascos contendo glicerina, onde foram mantidos por um período mínimo de 30 dias. Todos permaneceram armazenados em temperatura ambiente, sob proteção da luz em caixa escura vedada.

4.4 Amostragem dos Animais

Foram utilizados 36 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*, Lagomorfa, Mammalia) da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas adultos com média de peso entre 2 e 3 quilos, procedentes do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais suspensas com dimensões de 80x50x35cm em galpão telado com piso e ventilação adequados, onde receberam água e ração seca sem restrições.

Foram formados seis grupos, sendo que cada grupo foi constituído por seis coelhos.

Grupo 1: coelhos que receberam implantes conservados com glicerina a 98% e foram mortos após 14 dias;

Grupo 2: coelhos que receberam implantes conservados com glicerina a 98% e foram mortos após 30 dias;

Grupo 3: coelhos que receberam implantes conservados com glicerina a 98% e foram mortos após 60 dias;

Grupo 4: coelhos que receberam implantes tratados com glutaraldeído a 1%, posteriormente conservados na glicerina a 98% e foram mortos após 14 dias;

Grupo 5: coelhos que receberam implantes tratados com glutaraldeído a 1%, posteriormente conservados na glicerina a 98% e foram mortos após 30 dias;

Grupo 6: coelhos que receberam implantes tratados com glutaraldeído a 1%, posteriormente conservados na glicerina a 98% e foram mortos após 60 dias;

4.5 Procedimentos Pré, Trans e Pós-Cirúrgicos

Os pericárdios foram retirados dos frascos e lavados com solução salina estéril (cloreto de sódio a 0,9%) para a retirada do máximo de solução presente na superfície (PINTO et al., 1993). Foram efetuadas quatro lavagens nos fragmentos tratados com glicerina (PINTO et al., 1993) e oito lavagens nos que foram tratados com glutaraldeído (PINTO et al., 1993; HADDAD FILHO et al., 2004). Cada lavagem foi realizada com 10 ml da solução salina. Após a última lavagem, os fragmentos permaneceram nesta solução por 30 minutos.

Para realização da técnica de cistoplastia, cada coelho foi contido manualmente e os pêlos que recobrem as orelhas foram tricotomizados, aplicado 1ml da mistura de lidocaína-prilocaína a 5% (creme EMLA[®]) sobre a pele para posteriores punções venosa e arterial livres de dor (FLECKNEL, 1990). Como medicação pré-anestésica foram administrados, pela via subcutânea (SC), meloxicam 1,5 mg/kg (TURNER,2006) e morfina 2,5 mg/kg (LIPMAN, 2008; MURAI & OGURA, 1978). A anestesia foi induzida com propofol 8mg/kg via intravenosa (IV) (MARTIN-CANCHO, 2006) e mantida com isoflurano por meio de máscara conectada a um circuito semifechado (BATEMAN, 2005).

Com o animal posicionado em decúbito dorsal, foi realizada a tricotomia da região abdominal caudal, seguida de anti sepsia. Após celiotomia mediana, isolamento da bexiga com compressas úmidas e cistocentese, foram aplicados dois pontos de reparo na extremidade cranial e dois na extremidade caudal do plano a ser incisado, para auxiliar e facilitar a manipulação do órgão; da face dorsal da vesícula urinária, após incisão em estocada, retirou-se um fragmento de 1,5 x 1,5cm, o qual foi substituído por retalho de pericárdio ovino, de mesma dimensão, de acordo com OLIVEIRA et al. (2008). O implante foi fixado através de sutura contínua simples com fio absorvível sintético multifilamentar (Poliglactina 910) 5-0 em único plano. Quatro pontos simples separados sero-musculares foram aplicados nos vértices da interface implante-hospedeiro, com fio inabsorvível sintético (náilon)3-0, para a identificação futura da região do implante (OLIVEIRA et al., 2008). (Figura 1)

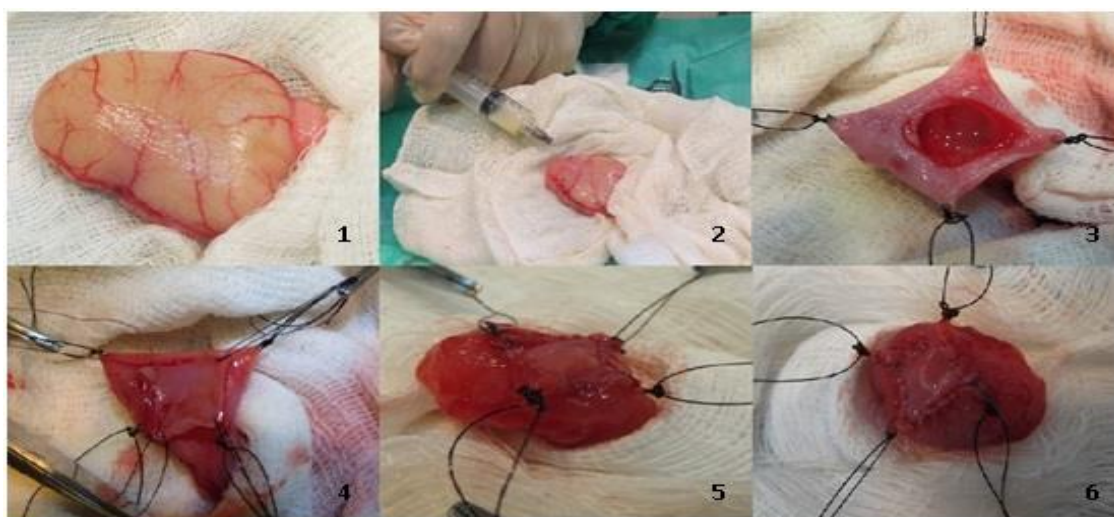


FIGURA 1 – 1. Vesícula urinária de coelho isolada com compressas úmidas; 2. cistocentese; 3. pontos de reparo nas extremidades cranial e caudal do plano incisado, para auxiliar e facilitar a manipulação do órgão; 4. substituição do defeito cirúrgico por retalho de pericárdio ovino, de mesma dimensão; 5. fixação do enxerto através de sutura contínua simples com fio absorvível sintético multifilamentar (Poliglactina 910) 5-0 em único plano; 6. quatro pontos simples separados sero-musculares aplicados nos vértices da interface implante-hospedeiro, com fio inabsorvível sintético (náilon)3-0.

Foram instituídas as terapias antimicrobiana com enrofloxacina (5mg/kg), via (SC), a cada 24 horas, durante cinco dias consecutivos e antiinflamatória com meloxicam (0,1mg/kg), via (SC), a cada 12 horas durante três dias, bem como a limpeza da ferida cirúrgica com clorexidina, a cada 24 horas, por sete dias. Todos os animais receberam colares protetores para evitar deiscência de sutura decorrente de auto-mutilação.

4.6 Avaliações

4.6.1 Avaliação clínica

Os animais eram observados a cada 12 horas nos três primeiros dias e então diariamente até o abate, quanto à ingestão de alimento e água e aspecto da ferida cirúrgica quanto a formação de seromas, hematomas, fístulas e abscessos.

4.6.2 Análise da urina

A urina coletada durante o trans-cirúrgico e imediatamente após o abate, por cistocentese, foi analisada pelo exame de Elementos Anormais e Sedimentoscopia (EAS).

4.6.3 Coleta das amostras e avaliação macroscópica

Cada grupo foi avaliado em períodos pós-operatórios diferentes correspondentes a 14, 30 e 60 dias, após abate com tiopental sódico (200mg kg^{-1}) por via IV. Foi observada a ocorrência de possíveis complicações da enxertia tais como: seromas, hematomas, fístulas, abscessos, calcificações, aderências, peritonite, não incorporação do enxerto ou deiscência da sutura, formação de cálculos na luz do órgão, presença de muco e aspecto da bexiga.

A força das aderências foi avaliada de acordo com o sistema de escore utilizado por Jenkins (1983):

- (-) – Sem aderências;
- (+) – Frouxamente aderido, sendo facilmente rompida a adesão;
- (++) – Moderadamente aderido, sendo liberado através de dissecação romba;
- (+++) – Firmemente aderido, sendo liberado somente com o uso de material cortante.

As necropsias dos animais foram realizadas imediatamente após o óbito. Fragmentos do pericárdio e parte do tecido circunjacente foram coletados, fixados em formol a 10%, devidamente identificados e encaminhados ao laboratório para análise histopatológica. Quando a bexiga estava repleta após o abate, a urina foi colhida para posterior análise laboratorial (urinálise e sedimentoscopia), bem como possíveis cálculos.

Todas as carcaças foram encaminhadas para cremação.

4.6.4 Processamento e análise microscópica das amostras teciduais

Após a fixação, os fragmentos foram desidratados em álcool absoluto, tratados com xilol e incluídos em parafina, cortados na espessura de 5µ e corados pela hematoxilina-eosina (HE) para análise microscópica. Dividiu-se o estudo em análise subjetiva e em objetiva.

Na análise subjetiva foi realizada avaliação das lâminas coradas com hematoxilina-eosina quanto à presença ou a ausência de urotelização, fibrose, presença de células gigantes, calcificação distrófica, necrose, rejeição e regeneração.

A análise objetiva com coloração HE consistiu na quantificação do processo inflamatório e reparador utilizando-se os seguintes parâmetros: infiltração heterofílica, infiltração macrofágica, grau de inflamação, neovascularização e fibroplasia. Os dados foram classificados utilizando-se uma tabela objetiva de escores, adaptada daquela proposta por BATISTA et al. (1996), descrita a seguir:

TABELA 1. Conversão de graduação em escore.

	GRAU DE INFLAMAÇÃO	INFILTRAÇÃO HETEROFÍLICA	INFILTRAÇÃO MACROFAGICA	NEOVASCULA RIZAÇÃO	FIBROPLASIA
Ausente	0	0	0	0	0
Discreta	1	1	1	1	1
Leve	2	2	2	2	2
Leve a moderada	3	3	3	3	3
Moderada	4	4	4	4	4
Moderada a acentuada	5	5	5	5	5
Acentuada	6	6	6	6	6

Os valores obtidos da conversão em escores receberam tratamento estatístico pelo Teste de Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

A urina foi coletada por cistocentese no período trans cirúrgico em 24 dos 36 animais, que foram aqueles que apresentaram coleção do líquido na bexiga. Em poucos coelhos (5 dos 36) pode-se observar urina no pós-abate imediato. Os resultados do exame de E.A.S. estão listados no Quadro 1.

QUADRO 1 – Alterações de E.A.S. observadas na urina coletada por cistocentese no período pré-cirúrgico e após o abate de coelhos submetidos a cistoplastia experimental com pericárdio ovino tratado pela Glicerina 98% ou Glutaraldeído 1% e Glicerina 98%.

ANIMAL	SEXO	GRUPO	EXAME FÍSICO	EXAME QUÍMICO	SEDIMENTOSCOPIA	
1	M	1		sg oculto +	bact+	
2	M			sg oculto ++	hem 0 a 8	
4	M				bact +	
5	M			pH 7; ***	hem 5 a 8; bacts raras;	
6	M				bacts++; cels vesicais +	
7	M	2	vol 3ml; **	pH 7	bact; oxalato de Ca; cels vesicais	
7 pós	M			pH 7; sg oculto++		
8 pós	M			pH7; sg oculto +++	hem 20 a 22; leuc 8 a 10; bact+	
9	M				hem 20 a 22; leuc incont; bact+++; estruvita +; oxalato de Ca+	
9 pós	M			sg oculto ++	hem 10 a 12; bact raras;	
10	M				bact+++; muco+	
10 pós	M			sg oculto +++	hem 16 a 18; bact raras	
11	F			dens 1050	bacts +++; leuc 4 a 6; estruvita raros; oxalato Ca raros; muco+	
12	M			dens 1044	hem 8 a 12; estruvita +	
12 pós	M			ptn++(100); sg oculto +	hem 5 a 6; bact raras	
13	M	3		ptn ++(100)	sptz; bact+; *	
14	F				bact+; *	
18	M			vol 3ml; **	ptn+++ (500); sg oculto+++	sptz; bact; oxalato de Ca; céls vesicais
19	M	4	vol 2ml; **		bacts+; muco+	
20	M				bact+	
21	M				pH 7	bacts raras
22	M				pH 6,5; sg oculto +++	hem 18 a 20; bacts raras; oxalato de Ca raro
23	M				sg oculto +++	hem 13 a 14; bacts raras
24	M				sg oculto +++	hem 10 a 18; bacts raras
31	F	6		ptn++(100)	bact+++; cels vesicais+; *	
32	F				bact+;*	
33	F			vol 3ml; **	ptn+++ (500);	bact incont; *; cels vesicais
34	M				sg oculto+	bact+++; *
35	M			vol 1ml; **; dens 1038	sg oculto+; bil++	bact; cels vesicais

Na avaliação macroscópica após o abate não foi observada a formação de seromas, hematomas, fístulas, abscessos ou calcificações. O enxerto estava incorporado em todos os espécimes e podia ser fracamente identificado somente nos Grupos 1 e 4 (animais abatidos aos 14 dias de pós-operatório), apesar de que as superfícies internas da parede vesical de todos os animais apresentavam aspecto brilhante e contínuo, parecendo estarem todos recobertos pela mucosa conforme observado na Figura 2.



FIGURA 2 – Aparência da mucosa vesical dos coelhos que receberam implante de pericárdio ovino conservado em glicerina 98% e abatidos aos 60 dias de pós-operatório.

O Quadro 2 mostra as alterações macroscópicas observadas em cada animal do experimento. As aderências estão classificadas de acordo com o sistema de escore utilizado por Jenkins (1983) para descrever sua força de resistência e encontra-se também descrita sua localização. Cálculos foram anotados conforme presença (s) ou ausência (-) e outras observações também foram anotadas.

QUADRO 2 – Alterações macroscópicas observadas após o abate de coelhos submetidos a cistoplastia experimental com pericárdio ovino tratado pela Glicerina 98% ou Glutaraldeído 1% e Glicerina 98%.

ANIMAL	GRUPO	SEXO	ADERÊNCIA	CÁLC.	OUTRAS OBSERVAÇÕES
1	Grupo 1	M	+++ reto e omento	s	
2		M	+++ reto; ++ omento	s	
3		M	+++ int delg e peritônio parietal ventral	s	deiscência sutura de pele; peritonite; massa caseosa na cavidade peritoneal
4		M	++ omento	s	
5		M	++ omento	s	
6		M	++ omento	s	
7	Grupo 2	M	+ omento	s	
8		M	+++ int delg	s	
9		M	+ omento	s	
10		M	+ omento	s	
11		F	+ omento	s	
12		M	+ omento	s	
13	Grupo 3	M	+ omento	s	
14		F	++ omento	-	
15		F	+ omento	s	
16		M	+ omento	s	
17		M	+ omento	s	
18		M	+ reto	s	
19	Grupo 4	M	+++ reto	s	
20		M	++ peritônio parietal ventral	s	
21		M	++ omento	s	
22		M	+ omento	s	
23		M	++ omento	s	
24		M	+++ peritônio parietal ventral e int delg	s	Eventração
25	Grupo 5	M	++ omento	s	
26		M	++ omento	s	
27		M	-	s	
28		M	++ ceco	s	
29		M	+ reto	s	
30		M	++ int delg	s	
31	Grupo 6	F	++ omento	s	
32		F	++ omento	s	mucosa da bexiga hiperêmica
33		F	+ omento	s	
34		M	+ omento e peritônio parietal ventral	s	
35		M	++ omento	s	
36		M	+ omento	s	

(-) – Sem aderências; (+) – Frouxamente aderido, sendo facilmente rompida a adesão; (++) – Moderadamente aderido, sendo liberado através de dissecação romba; (+++) – Firmemente aderido, sendo liberado somente com o uso de material cortante.

As litíases apresentavam coloração de amarelo acinzentado a amarelo âmbar, a maioria com formato e superfície irregular, variando grandemente quanto ao seu tamanho e aparência (Figura 1). Apenas um dos cálculos não estava aderido ao implante, apresentando-se livre na luz da vesícula urinária.

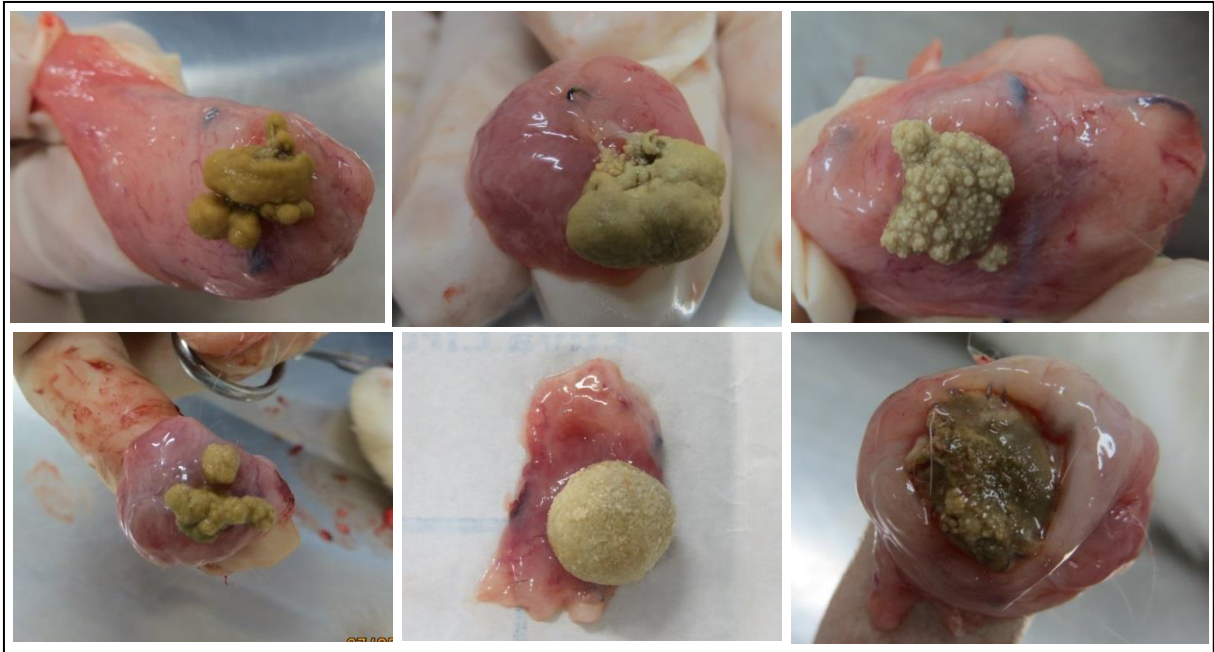


FIGURA 3 – Amostras de litíases vesicais obtidas de bexigas de coelhos submetidos a cistoplastia experimental com pericárdio ovino tratado pela Glicerina 98% ou Glutaraldeído 1% e Glicerina 98%.

Apresenta-se a seguir a descrição da avaliação microscópica dos grupos experimentais nos quais as vesículas urinárias dos coelhos foram implantados com pericárdio bovino conservado com glicerina 98%.

Nos animais do Grupo 1 (abatidos aos 14 dias), observou-se reação inflamatória moderada com presença de heterófilos, macrófagos e linfócitos. Um animal apresentava células gigantes. Em relação ao processo de reparação, havia neovascularização e fibroplasia moderadas. A fibrose estava presente nas lâminas de três animais, em uma delas de forma intensa. Foi observada necrose em quatro animais e degeneração muscular em três. Pôde-se observar regeneração muscular em um animal avaliado. Somente dois apresentaram calcificação distrófica. Um dos animais apresentava lâmina própria e urotelização e em dois havia incorporação do enxerto.

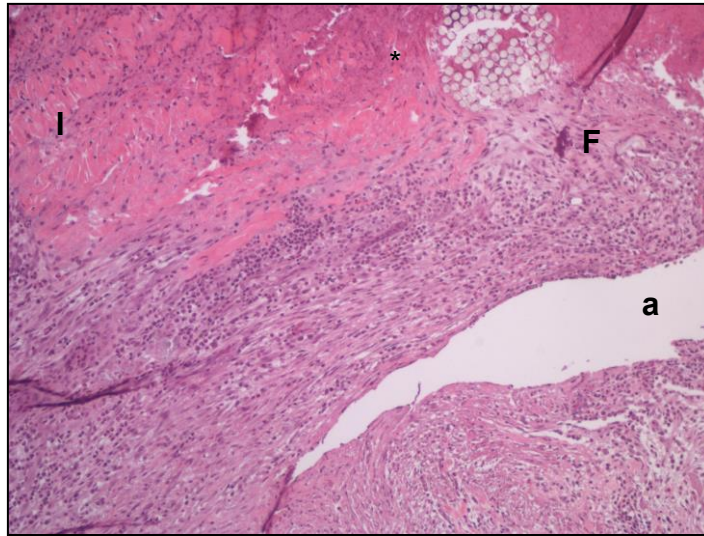


FIGURA 4: Avaliação histológica com objetiva de 10x de parede vesical de coelho implantada com pericárdio ovino conservado em glicerina 98%, obtida após 14 dias da implantação (Grupo 1). Observar o infiltrado inflamatório misto ao redor do implante (I), infiltrativo às fibras musculares e a reação de fibroblastos (F) ao redor do fio de sutura (*). a- artefato de técnica.

No Grupo 2 (animais abatidos 30 dias após o implante) ocorreu reação inflamatória moderada com heterófilos, macrófagos e linfócitos; células gigantes apareceram em dois animais do grupo e em quatro deles havia edema. Observou-se neovascularização leve a moderada e fibroplasia moderada; fibrose estava presente em três animais. Necrose e degeneração muscular apareceram em cinco animais do grupo. Não foi observada regeneração muscular. Somente um animal apresentou calcificação distrófica e em quatro havia incorporação do enxerto.

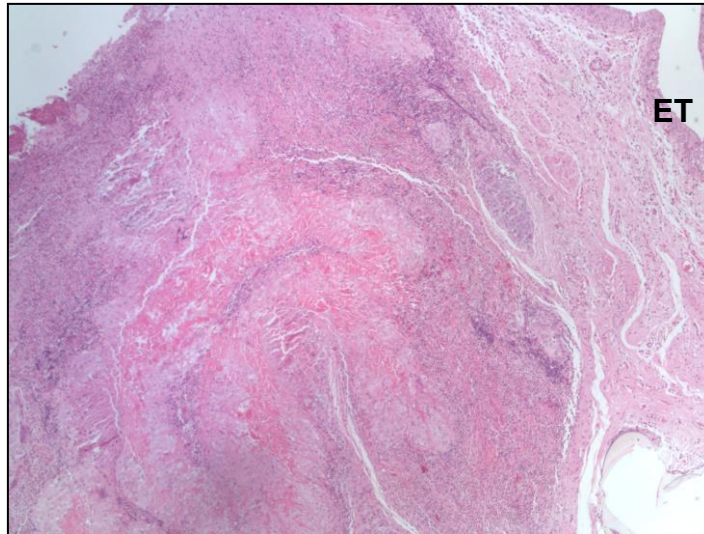


FIGURA 5: Avaliação histológica com objetiva de 4x de parede vesical de coelho implantada com pericárdio ovino conservado em glicerina 98%, obtida após 30 dias da implantação (Grupo 2). Observar acentuado infiltrado inflamatório misto, ao redor do implante e da musculatura da bexiga promovendo desestruturação na arquitetura tissular. No bordo superior direito há presença do epitélio de transição sem alterações (ET) e moderado infiltrado inflamatório em lâmina própria. Grupo glicerina 30 dias

Os animais avaliados aos 60 dias (Grupo 3) apresentaram reação inflamatória leve a moderada, com presença de poucos heterófilos e predominância de células mononucleares (linfócitos e plasmócitos); células gigantes não foram observadas neste grupo. Quanto ao processo de reparação, observou-se neovascularização moderada a acentuada e fibroplasia moderada. Todos os animais apresentaram fibrose; a necrose muscular foi observada em um animal, não ocorrendo degeneração muscular tampouco calcificação distrófica. Urotelização estava presente em todos os animais avaliados, além de regeneração muscular e incorporação do enxerto.

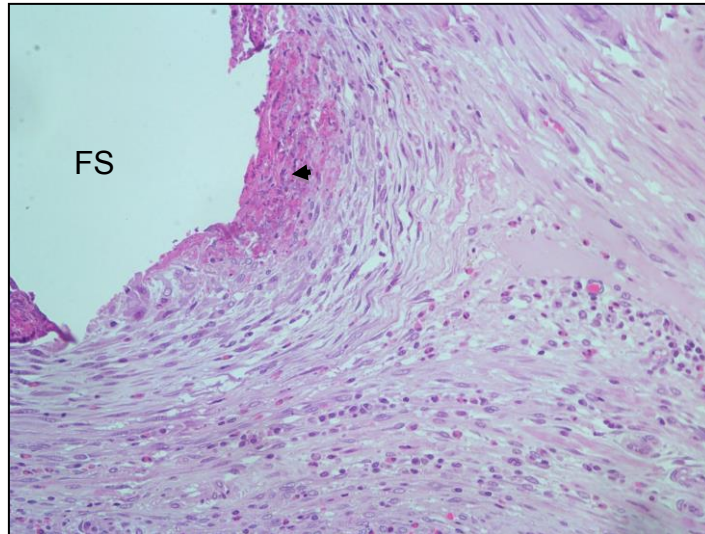


Figura 6: Avaliação histológica com objetiva de 10x de parede vesical de coelho implantada com pericárdio ovino conservado em glicerina 98%, obtida após 60 dias da implantação (Grupo 3). Observar área de necrose (seta) associado a moderado infiltrado inflamatório misto e fibroplasia ao redor do fio de sutura (FS) de inserção do implante. Grupo glicerina 60 dias.

Os coelhos que receberam implantes vesicais tratados com glutaraldeído 1% e conservados em glicerina 98%, distribuídos nos grupos 4 a 6, tem sua avaliação microscópica descrita abaixo.

Nos animais do Grupo 4 (abatidos aos 14 dias), observou-se reação inflamatória de moderada a acentuada com presença de heterófilos, macrófagos e linfócitos. Nenhum animal apresentava células gigantes. Em relação ao processo de reparação, havia neovascularização e fibroplasia leves. Um dos animais apresentou edema. Discreta fibrose em quatro animais. Foi observada necrose em dois animais. Não foram visualizados calcificação distrófica, células gigantes, degeneração, regeneração e lâmina própria. O enxerto estava incorporado em dois animais.

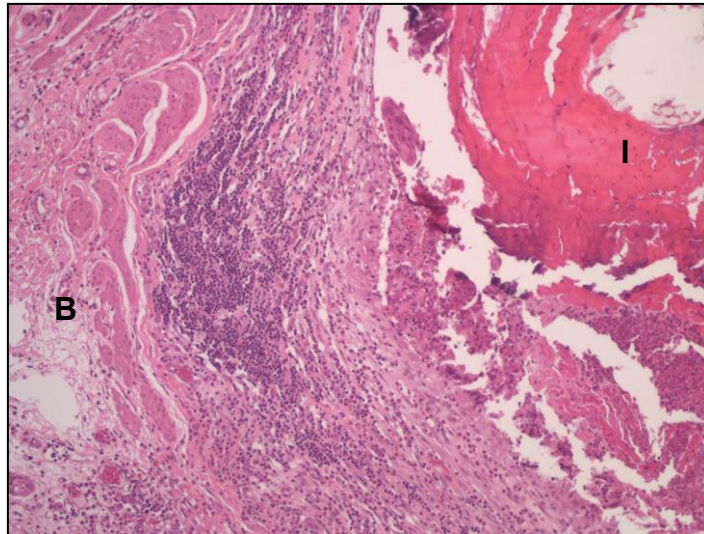


FIGURA 7: Avaliação histológica com objetiva 10x de parede vesical de coelho implantada com pericárdio ovino tratado com glutaraldeído 1% e conservado em glicerina 98%, obtida após 14 dias da implantação (Grupo 4). Observar o infiltrado inflamatório misto entre o implante (I) e o tecido muscular da bexiga (B).

No Grupo 5 (animais abatidos 30 dias após o implante) ocorreu reação inflamatória moderada com heterófilos, macrófagos e linfócitos; células gigantes apareceram em um animal do grupo e em cinco deles havia edema. Observou-se neovascularização e fibroplasia moderadas; fibrose estava presente em dois animais. Necrose e degeneração muscular apareceram em dois e quatro animais do grupo, respectivamente. Não foi observada regeneração muscular. Somente um animal apresentou calcificação distrófica. Lâmina própria e urotelização foram visualizadas em quatro coelhos. Em três havia incorporação do enxerto.

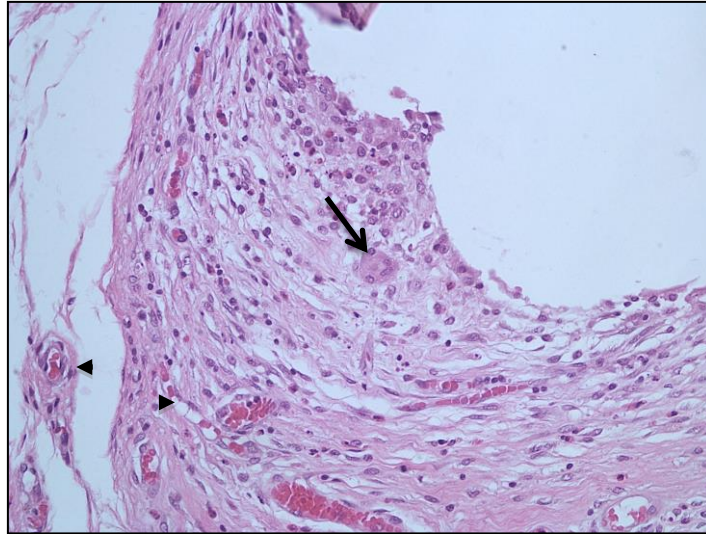


FIGURA 8– Avaliação histológica com objetiva de 20x de parede vesical de coelho implantada com pericárdio ovino tratado com glutaraldeído 1% e conservado em glicerina 98%, obtida após 30 dias da implantação (Grupo 5). Observar infiltrado inflamatório misto com presença de célula gigante (seta), atividade fibroblástica e vasos sanguíneos (pontas de seta) ao redor do ponto de inserção do implante.

Os animais avaliados aos 60 dias (Grupo 6) apresentaram reação inflamatória leve, com presença de poucos heterófilos e predominância de células mononucleares (linfócitos e plasmócitos); células gigantes não foram observadas neste grupo. Quanto ao processo de reparação, observou-se neovascularização e fibroplasia leves a moderadas. Fibrose ocorreu em cinco animais; degeneração foi observada em três animais, não ocorrendo necrose muscular tampouco calcificação distrófica. Foi observada lâmina própria e urotelização em todos os animais, assim como a regeneração muscular e, portanto, em todos se pode observar a incorporação do enxerto.

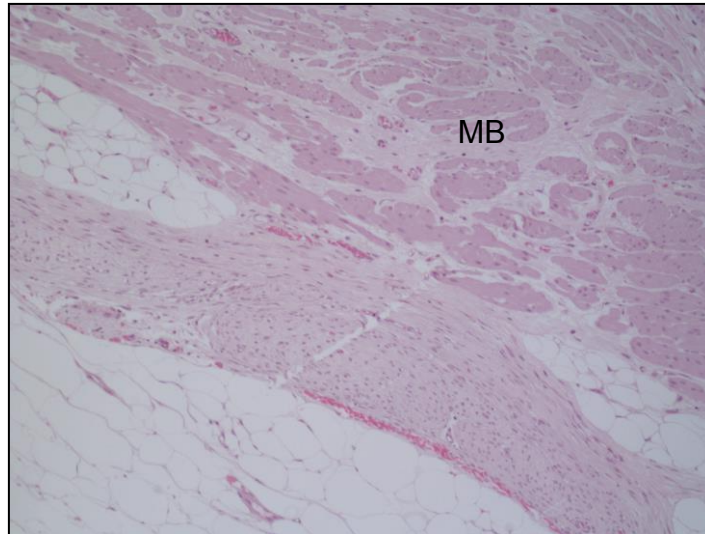


FIGURA 9: Avaliação histológica com objetiva de 10x de parede vesical de coelho implantada com pericárdio ovino tratado com glutaraldeído 1% e conservado em glicerina 98%, obtida após 60 dias da implantação (Grupo 6). Observar arquitetura muscular da bexiga (MB) reorganizado com área de fibrose e ausência de infiltrado inflamatório.

A avaliação subjetiva da ocorrência das características do processo inflamatório e de reparação encontra-se quantificada na Tabela 2, quanto à presença ou ausência de edema, neovascularização, calcificação distrófica, células gigantes, fibrose, degeneração, regeneração, lâmina própria e urotelização e incorporação do enxerto.

TABELA 2 - Frequência de observações na avaliação microscópica subjetiva de bexigas de coelhos submetidos a cistoplastia experimental com pericárdio ovino tratado pela glicerina 98% ou glutaraldeído 1% e glicerina 98%.

	Grupo 1		Grupo 4		Grupo 2		Grupo 5		Grupo 3		Grupo 6	
	(glic 14 dias)		(glut 14 dias)		(glic 30 dias)		(glut 30 dias)		(glic 60 dias)		(glut 60 dias)	
	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N
Edema	0	6	1	5	4	2	5	1	0	6	1	5
Necrose	4	2	2	4	5	1	2	4	1	5	0	6
Calcificação distrófica	1	5	0	6	1	5	1	5	0	6	0	6
Células gigantes	1	5	0	6	2	4	1	5	0	6	0	6
Fibrose	3	3	4	2	3	3	2	4	6	0	5	1
Degeneração	3	3	0	6	5	1	4	2	0	6	3	3
Regeneração muscular	1	5	0	6	0	6	0	6	6	0	6	0
Lâmina própria e urotelização	1	5	0	6	0	6	4	2	6	0	6	0
Incorporação do enxerto	2	4	2	4	4	2	3	3	6	0	6	0

LEGENDA: S – número de animais nos quais estava presente a característica; N – número de animais nos quais a característica não foi visualizada; glic – grupos com pericárdio conservado em glicerina; glut – grupos com pericárdio tratado pelo glutaraldeído e conservado na glicerina.

A reação inflamatória e o processo de reparação foram quantificados pelos parâmetros infiltração heterofílica, infiltração macrófaga, grau de inflamação, neovascularização e fibroplasia, convertidas as observações microscópicas em escore, em adaptação da proposta de BATISTA et al. (1996), com os dados expostos na Tabela 3.

TABELA 3 – Graduação em escore de características microscópicas de bexigas de coelhos submetidos a cistoplastia experimental com pericárdio ovino tratado pela glicerina 98% ou glutaraldeído 1% e glicerina 98%.

ANIMAL	GRUPO	INFLAMAÇÃO	INFILTRAÇÃO HETEROFÍLICA	INFILTRAÇÃO MONONUCLEAR	NEOVASCULARIZAÇÃO	FIBROPLASIA
1	Grupo 1	5	6	6	4	2
2		2	2	2	6	4
3		2	2	2	4	2
4		6	6	6	4	6
5		6	6	6	4	4
6		4	4	4	4	4
7	Grupo 2	2	5	2	2	4
8		4	4	4	4	4
9		2	2	2	2	4
10		6	6	6	4	4
11		6	6	6	4	5
12		5	5	5	2	4
13	Grupo 3	2	0	1	5	2
14		2	0	1	5	4
15		2	1	1	4	4
16		2	0	1	5	5
17		4	0	4	4	5
18		5	4	1	6	5
19	Grupo 4	6	6	6	2	3
20		5	6	6	4	0
21		5	6	6	2	2
22		5	6	6	2	0
23		6	6	6	2	2
24		6	6	6	2	2
25	Grupo 5	2	0	5	4	4
26		5	6	6	2	4
27		2	2	2	4	4
28		3	4	4	2	4
29		6	6	6	6	4
30		5	6	6	4	2
31	Grupo 6	2	2	2	4	3
32		2	2	2	4	5
33		1	2	2	2	2
34		2	0	2	3	4
35		1	0	0	2	2
36		2	1	1	2	4

Na Tabela 4 encontram-se os resultados da avaliação estatística, comparando-se os escores da análise histopatológica objetiva dos dois tratamentos aplicados às biopróteses (glicerina 98% ou glutaraldeído 1% associado à glicerina 98%) nas diferentes fases de evolução do processo de implantação do pericárdio ovino.

TABELA 4 – Resultados da avaliação estatística pelo Teste de Mann-Whitney de comparação entre características microscópicas de bexigas de coelhos submetidos a cistoplastia experimental com pericárdio ovino tratado pela glicerina 98% ou glutaraldeído 1% e glicerina 98%.

	INFLAMAÇÃO		INFILTRAÇÃO HETEROFÍLICA		INFILTRAÇÃO MONONUCLEAR		NEOVASCULARIZAÇÃO		FIBROPLASIA	
	GLICER media 4,2 DP 1,835	GLUTAR Media 5,5 DP 0,547	GLICER media 4,3 DP 1,966	GLUTAR media 6 DP 0	GLICER media 4,3 DP 1,966	GLUTAR media 6 DP 0	GLICER media 4,3 DP 0,816	GLUTAR media 2,3 DP 0,816	GLICER media 3,67 DP 1,506	GLUTAR media 1,5 DP 1,225
14 dias	p=0,2403 ns		-		-		p=0,0087 **		p=0,0411 *	
	GLICER media 4,2 DP 1,835	GLUTAR Media 3,8 DP 1,722	GLICER media 4,66 DP 1,506	GLUTAR media 4 DP 2,53	GLICER media 4,16 DP 1,835	GLUTAR media 4,83 DP 1,602	GLICER media 3 DP 1,095	GLUTAR media 3,6 DP 1,506	GLICER media 4,17 DP 0,408	GLUTAR media 3,67 DP 0,816
30 dias	p=0,8182 ns		p=0,9372 ns		p=0,5887 ns		p=0,4848 ns		p=0,3939 ns	
	GLICER media 2,83 DP 1,329	GLUTAR media 1,7 DP 0,516	GLICER media 0,83 DP 1,602	GLUTAR media 1,16 DP 0,983	GLICER media 1,5 DP 1,225	GLUTAR media 1,5 DP 0,836	GLICER media 4,8 DP 0,752	GLUTAR media 2,8 DP 0,983	GLICER media 4,17 DP 1,169	GLUTAR media 3,33 DP 1,211
60 dias	p=0,1320 ns		p=0,3939 ns		p=0,4848 ns		p=0,0087 **		p=0,2403 ns	

Legenda: GLICER – conservação das biopróteses com glicerina 98%; GLUTAR – tratamento das biopróteses com glutaraldeído 1% e conservação em glicerina 98%; DP – desvio padrão; ns – não significativo; * um nível de significância; ** dois níveis de significância.

Diferenças estatisticamente significantes entre os dois tratamentos foram observadas em relação ao processo de neovascularização, tanto aos 14 quanto aos 60 dias após o implante, com valores mais elevados no grupo conservado em glicerina 98%. A fibroplasia mostrou-se mais acentuada nos animais que receberam implantes submetidos ao mesmo tipo de tratamento, no primeiro momento de avaliação microscópica (14 dias).

6 DISCUSSÃO

A membrana testada apresentou características físicas de maleabilidade, facilidade de manuseio e resistência bastante satisfatórias para a implantação na bexiga do coelho, víscera que apresenta parede relativamente delgada e delicada. Havia diferença notável na aparência das membranas tratadas somente pela glicerina (Grupos 1, 2 e 3) em relação àquelas que receberam tratamento pelo glutaraldeído e posterior conservação na glicerina (Grupos 4, 5 e 6), estas últimas tornando-se mais resistentes à manipulação e passagens da agulha de sutura; entretanto, estas alterações não causaram nenhum prejuízo à execução da técnica cirúrgica.

Não foram encontrados na literatura relatos sobre o uso do pericárdio ovino na cistoplastia vesical, enquanto o peritônio bovino conservado em glicerina 98% foi utilizado para este fim por Oliveira et al. (2005). Esta solução é amplamente utilizada na medicina veterinária (PIGOSSI, 1967; PIGOSSI et al., 1971; ALVARENGA, 1977; LEITE et al., 1979; BRAILE, 1990; BARROS et al., 1994; ALMEIDA et al., 1998; BRANDÃO et al., 2001; GURGEL & CORTEZ FILHO, 2001; QUITZAN et al., 2003; BRUN et al., 2004; BRAGA & PIPPI, 2009) e os resultados obtidos sempre foram satisfatórios tanto em relação à reação inflamatória quanto ao processo regenerativo. A adição do glutaraldeído no tratamento de membranas biológicas tem sido indicada como tentativa de controlar possíveis infecções por microrganismos, como os vírus, porém as concentrações utilizadas (entre 0,5% e 0,625%) não são muito eficazes contra micobactérias, esporos de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*), fungos (*Chaetomium globosum*), e *slow viruses* (HILBERT et al., 1988 apud MAIZATO, 2003). Trani (2006) também demonstrou a ineficácia de baixas concentrações de glutaraldeído (0,625%) no tratamento e controle do vírus rábico em pericárdios bovinos tratados.

A escolha da solução de glutaraldeído utilizada no presente trabalho segue os resultados de Costa (2009), que demonstrou boa biocompatibilidade da concentração de 1% para tratamento de pericárdios bovinos implantados em parede abdominal de camundongos. A associação do tratamento com glutaraldeído à posterior conservação em glicerina 98% buscou aproximar o método escolhido à realidade de utilização de biopróteses na prática cirúrgica veterinária, fornecendo uma condição prática de manutenção da membrana a longo prazo.

Houve dificuldade nas avaliações urinárias devido à micção pré-cirúrgica em alguns animais e ao extravasamento em praticamente todos eles após o abate, tornando-se

incompatível o método de coleta proposto no delineamento experimental (cistocentese) com a execução prática.

As alterações mais relevantes no E.A.S. referem-se a: presença de bactérias em quase todas as amostras, mesmo tendo sido coletadas por cistocentese; sangue oculto e hemácias, provavelmente devido à punção de pequenos vasos; cristalúria por oxalato de Cálcio (cinco animais) e estruvita (tres animais). Oliveira et al. (2008) consideraram a cristalúria composta por carbonato de cálcio como alteração urinária decorrente da implantação de peritônio bovino nas bexigas de coelhos, e que provavelmente seria um dos fatores responsáveis pela formação de cálculos; entretanto verificou-se, no presente trabalho, que estes cristais são achado normal na urina da espécie. Outras alterações ocasionais encontradas, como redução no pH, proteinúria e presença de cristais de oxalato de cálcio e estruvita, também não parecem ter sido determinantes na formação dos cálculos, uma vez que estes ocorreram mesmo na ausência das alterações. A causa da formação de cálculos em vesículas urinárias que recebem biopróteses preservadas não está clara na literatura, apesar de ser achado constante em cistoplastias com implantes (PENTERMANN et al., 1985; SUTHERLAND et al., 1996; NUININGA et al., 2004).

A aderência foi observada em todos, exceto em um dos animais implantados, que são achados semelhantes aos de Daleck et al. (1989), Sutherland et al. (1996), Greca et al. (2004) e Oliveira et al. (2008). As aderências pós-cirúrgicas que ocorrem na cavidade peritoneal são decorrentes de baixa atividade fibrinolítica no local da lesão, favorecendo o acúmulo de matriz de fibrina e, conseqüentemente, uma fibroproliferação, que se caracteriza por adesão (LIAKAKOS et al., 2001). Nos grupos com avaliação aos 14 e 30 dias de pós-operatório, as aderências apresentavam maior força de resistência e ligavam a bexiga a estruturas como peritônio, intestino delgado, reto e ceco, além do omento. Na observação aos 60 dias, a força de resistência era menor e parece que as aderências estavam mais limitadas ao omento. Não houve diferença entre os tipos de tratamento e conservação da bioprótese e, portanto, pode-se considerar que a adição do glutaraldeído como método de tratamento não influenciou no processo de formação de aderências.

O processo de reparação, avaliado através da análise microscópica, mostrou pequenas diferenças entre os dois tipos de tratamento e conservação dos pericárdios ovinos.

A evolução do processo inflamatório se fez de forma semelhante entre os dois tipos de tratamento e conservação, podendo ser caracterizado como inflamação crônica, pela ocorrência simultânea da inflamação ativa, destruição tecidual e tentativas de reparação, conforme descrito por Collins (2000). Observaram-se heterófilos e células mononucleares aos 14 e 30 dias, o que era esperado tanto pelo trauma cirúrgico, nas fases mais precoces, quanto pelo processo de incorporação do implante, na fase mais avançada (30 dias). As mesmas observações estão presentes em outros trabalhos com implantação de membranas biológicas em vesícula urinária, como os de Daleck (1989), Nuininga et al. (2004) e Oliveira et al. (2008), que observaram intenso infiltrado inflamatório misto além de acentuada neovascularização aos 14 e 30 dias de avaliação. Aos 60 dias havia predominância de células mononucleares, igualmente descritas por Daleck (1989), Costa Neto et al. (1999) e Oliveira et al. (2008). Segundo Haddad Filho et al. (2004), com o decorrer do processo inflamatório-reparacional o número de heterófilos tende a diminuir, destacando-se outros componentes que caracterizam mais a fase crônica ou reparadora; portanto, pode-se considerar que a reparação estava em franco desenvolvimento no último momento de avaliação (60 dias), o que é corroborado pelo achado de incorporação do enxerto em todos os animais.

Apesar do resultado final (incorporação do implante aos 60 dias) apresentar-se de forma idêntica nos dois tipos de tratamento da membrana, algumas características diferiram ao longo do processo, tanto na avaliação subjetiva quanto objetiva da reparação.

A neovascularização mostrou-se moderada e moderada a acentuada aos 14 e 60 dias, respectivamente, nos grupos cuja bioprótese implantada foi somente conservada em glicerina 98%, contra um padrão considerado leve e leve a moderado, nos mesmos momentos, no grupo cuja membrana biológica recebeu tratamento prévio com o glutaraldeído. Na avaliação estatística esta diferença foi significativa ($p < 0,001$). Oliveira et al. (2008) observaram neovascularização intensa nesta fase, quando utilizaram peritônio bovino conservado em glicerina 98%, o que pode indicar um efeito deletério da solução de glutaraldeído sobre o processo da neoformação vascular, possivelmente por suas características conhecidas de citotoxicidade.

Outra característica que se apresentou de forma diferenciada, inclusive com significância estatística, entre os grupos dos diferentes tratamentos do pericárdio ovino, foi a

fibroplasia, que mostrou-se mais acentuada no grupo somente conservado em glicerina, aos 14 dias. Pode-se supor, associando-se às informações sobre a neovascularização, que a solução de glutaraldeído tenha influenciado negativamente a proliferação celular, tanto de fibroblastos quanto de células endoteliais. Somada a estas observações, a regeneração de fibras musculares mostrou-se presente aos 60 dias em somente um animal no grupo cuja bioprótese foi tratada com glutaraldeído, enquanto, nas vesículas urinárias implantadas com pericárdio conservado em glicerina, todos os seis animais apresentavam sinais desta regeneração.

A presença de lâmina própria e epitelização, características de processo avançado de incorporação de enxertos, foi detectada desde o primeiro momento de avaliação (14 dias), embora de forma incipiente (apenas 1 animal), no grupo com conservação da membrana em glicerina. No momento seguinte de avaliação (30 dias), a lâmina própria e o urotélio foram observados em quatro coelhos do grupo do glutaraldeído com glicerina, contra nenhum no grupo glicerina e, aos 60 dias, em todos os animais estavam presentes essas estruturas. Em outros trabalhos sobre implante de membranas biológicas em parede vesical, a observação destas estruturas foi contraditória, com 100% de presença aos 30 dias de observação em bexigas de cães implantadas com submucosa intestinal suína (GRECA et al., 2004), e nenhuma observação aos 14 e 30 dias após enxertia de peritônio bovino em vesículas urinárias de coelhos (OLIVEIRA et al., 2009). Pode-se considerar que o período de observação de 30 dias não é conclusivo para este tipo de análise, ponderando-se que a reparação tecidual após substituição total com uso de implantes requer um período mais longo para a conclusão do processo reparativo.

A dificuldade em se diferenciar macroscopicamente a região do implante do restante da parede vesical aos 60 dias de pós-operatório obteve respaldo na avaliação microscópica, quando se observou a incorporação da bioprótese em todos os animais. Portanto, o período máximo de avaliação de 60 dias, que também foi utilizado por Oliveira et al. (2008), mostrou-se adequado para a análise microscópica da implantação de membranas biológicas em parede vesical de coelhos. Os autores citados verificaram, sob microscopia de luz, que a parede da bexiga apresentava-se totalmente reconstituída após implantação de bioprótese constituída de peritônio bovino, com completa reepitelização, presença de lâmina própria, fibras colágenas organizadas, algumas fibras musculares e escassas células inflamatórias mononucleares.

Apesar das pequenas diferenças observadas entre os dois tipos de tratamento e conservação do pericárdio ovino, com relação à evolução do processo de reparação na bexiga de coelhos, em todos os casos a incorporação do implante foi bem sucedida, sem distinção quanto aos aspectos clínicos, laboratoriais, macro e microscópicos. As características físicas desta membrana, como maleabilidade e pequena espessura, distinguem-na para implantação em estruturas com aspectos semelhantes, como é o caso da vesícula urinária. Além disso, a facilidade de obtenção e preparo, e seu baixo custo, facilitam sobremaneira sua utilização na rotina cirúrgica.

Outras técnicas tradicionais de cistoplastia para expansão vesical, como a substituição por segmentos do trato gastrointestinal, têm sido associadas a complicações de curto, médio e longo prazo (SONTOULIDES et al., 2009; HIGUCHI et al. 2001; GURUNG et al., 2012; QUINTA et al., 2013). A necessidade de intervenção com secção do tubo digestivo é uma grande desvantagem destas técnicas em relação à utilização de tecidos preservados, com risco de complicações diminuído. Não foram encontrados relatos sobre carcinogênese associada à implantação de biopróteses em bexiga, o que vem sendo observado, em baixa escala, na substituição por segmentos intestinais (SONTOULIDES et al., 2009); entretanto, esta possibilidade não pode ser descartada, merecendo estudos específicos.

Alternativas emergentes que abrangem técnicas de engenharia genética e tecidual (GRECA et al., 2004; JOHNSON e SINGH, 2013) podem vir a apresentar vantagens na rapidez de incorporação e diminuição de complicações. Atualmente, estes métodos ainda são restritos a centros de pesquisa e a sua efetividade ainda precisa ser melhor apurada.

7 CONCLUSÃO

O modelo experimental utilizado no presente trabalho, baseado no artigo de Oliveira et al. (2008), mostrou-se apropriado para a investigação proposta, apesar da mudança no tipo de material, de peritônio bovino para pericárdio ovino.

O pericárdio ovino tratado com solução de glutaraldeído a 1% e conservado em glicerina 98%, assim como aquele somente conservado em glicerina 98%, é capaz de promover a reconstituição da parede vesical, com total incorporação da bioprótese após 60 dias do seu implante.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLINGTON, P.; ANSCOMBE, A.J.; PHILLIPS, J.J. Influence of the mode of preparation on the long-term efficacy of homologous costal cartilage implants. *Journal of Laryngology Otolology*. v. 106, n. 6, p.511-7, 1992.

ALMEIDA, E. L.; ALVARENGA, J.; SILVA, J. V. *Reconstrução* do esôfago cervical de cães com pericárdio de caprino conservado em glicerina a 98% ou refrigerado em solução fisiológica a 0,9%: estudo experimental. In: *III Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária*. Belo Horizonte, MG, p. 93. 1998.

ALVARENGA J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: Daleck CR. *Tópicos em cirurgia de cães e gatos*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p 33-42. 1992.

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

BARBOSA, R.R.; LEAL, L.M.; MARTINS, L.L.; GARCIA FILHO, S.P.; BOSSO, A.C.S.; MACHADO, M.R.F. Estrutura e ultra-estrutura de membranas biológicas de ovinos da raça Santa Inês (*Ovis aries*, L., 1758) a fresco e conservadas em glicerina. *Revista Biotemas*, v.25, n. 2, junho 2012.

BARROS, P. S. M.; GARCIA, J. A.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; GOMES, T. L. S. Aspectos clínicos do uso de membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina nas ceratoplastias penetrantes da córnea de cães. In: *Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária*. Curitiba, PR, p. 84. 1994.

BATEMAN, L. et al. Comparison between facemask and laryngeal mask airway in rabbits during isoflurane anesthesia. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, v. 32, p. 280-288, 2005.

BRAGA, F. A.; PIPPI, N. L. *Uso* de pericárdio heterólogo conservado em glicerina na reparação de hérnia abdominal traumática em cão. *Redevet*. 2009. site acessado em junho de 2011.

BRAILE BIOMÉDICA - *INDÚSTRIA DE PRODUTOS CARDIOVASCULARES*. www.braile.com.br acessado no dia 20/06/11 às 20:15.

BRAILE, D. M. Prótese valvular de pericárdio bovino: desenvolvimento e aplicação clínica em posição mitral. São Paulo, *Tese – (Doutorado)* – Escola Paulista de Medicina, 1990.

BRANDÃO, C. V. S.; PEREIRA, G.J.C.; MOTTA, T.; MAMPRIM, M. J.; RANZANI, J.J.T. Reconstrução da cápsula articular com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% para o tratamento da luxação coxofemural em cães. *Ciência Animal*, v. 11, suplemento 1. p. 248. 2001.

CONTESINI, E.A.; SALLES, M.S.; PIGATTO, J.A.T.; PIPPI, N.L.; RAISER, A.G. Reparação traqueal em cães: transplante autógeno vs implante homogêneo conservado em glicerina a 98% de cartilagem da pino. *Ciência Rural*. v.31, n.4, p.633-637, 2001.

COSTA, C.B. Anatomohistopatologia de implantes de pericárdio bovino conservados em diferentes concentrações de glutaraldeído em parede abdominal de camundongos. 87 p. 2009. *Dissertação* (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal) Instituto de Veterinária. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica-RJ.

COSTA NETO, J.M. et al. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.29, n.4, p.697-703, 1999.

COVARRUBIAS, D.P.; VEJA, A. S.; JASSO VICTORIA, R.; OLMOS ZÚÑIGA, J. R.; CALOCA, J.V.; SALGADO, J.A.S.; SANTILLÁN-DOHERTY, P. Uso del pericardio bovino tratado con glutaraldeído. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Mex.* v.18, n.3, p. 224-229, 2005.

CUBILLANA, P.L.; GÓMES, G.G.; GÓMEZ J.R., et al. Incidencia y factores de riesgo para la formación litiasica em pacientes sometidos a cistoplastias de ampliación o sustitución com intestino. *Archivos Españoles de Urología*, v.51, p.347-352, 1998.

CUNRATH, G. S. Pericárdio de bovino tratado pelo glutaraldeído no reparo de hérnia incisional: estudo experimental. São José do Rio Preto, *Dissertação* (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 1999.

DALECK, C.R. et al. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: estudo experimental. *Ars Veterinária*, Jaboticabal, v.4, n.1, p.53-61, 1988.

DALECK, C.L.M. et al. Cistoplastia com peritônio autólogo em cães. *Semina*, Londrina, v.10, n.1, p.22-26, 1989.

DALECK, C.R. et al. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.22, n.2, p.179-183, 1992.

FISHMAN, I.J.; FLORES, F.N.; SCOTT, F.B., et al. Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *Urology*, v.138, p.1291-1294, 1987.

FLECKNELV, P. A.; LILES, J. H.; WILLIAMSON, H. A. The use of lignocaine-prilocaine local anaesthetic cream for pain-free venepuncture in laboratory animals. *Laboratory Animals*, v.24, p. 142-146, 1990.

FRIES, C.; BINNINGTON, A.G.; VALLI, V.E. et al. Enterocystoplasty with cystectomy and subtotal intracapsular prostatectomy in the male dog. *Veterinary Surgery.*, v.20, p.104-112, 1991.

GRECA, F.H. et al. Utilização da submucosa de intestino delgado porcino como retalho para aumento da capacidade vesical em cães. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v.19, n.6, 2004.

GOISSIS, G.; BRAILE, D.M.; GIGLIOTI, A.F. Desenvolvimento de processo automático para a reticulação progressiva de matrizes de colágeno com glutaraldeído. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* Jul/Set , p.92-97, 1999.

GURGEL, S.; CORTEZ FILHO, J.J. Uso do pericárdio caprino conservado em glicerina no reparo de bexiga de *Felis catus*. In: *Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais*, 22., 2001, Fortaleza. Anais: Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará, 2001. p.169.

GURUNG P M., ATTAR K H, ABDUL-RAHMAN A, MORRIS T, HAMID R, SHAH PJ. Long-term outcomes of augmentation ileocystoplasty in patients with spinal cord injury: A minimum of 10 years of follow-up. *BJU International*. 2012; 109: 1236-42

HADDAD FILHO, D.; MARQUES, A.; KAFEJIAN-HADDAD, A.P.; ZVEIBEL, D.K. Estudo Comparativo das reações teciduais ao implante de pericárdio bovino e a inclusão de politetrafluoroetileno expandido em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. v. 19, n. 2, p.131-135, 2004.

HIGUCHI TT, FOX JA, HUSMANN DA. Annual endoscopy and urine cytology for the surveillance of bladder tumors after enterocystoplasty for congenital bladder anomalies. *Journal of Urology*. 2011 Nov;186(5):1791-5.

JENKINS, S.D.; KLAMER, T.W.; PARTEKA, J.J.; CONDON, R.E. A comparison of prosthetic materials used to repair abdominal wall defects. *Surgery*, v.94, p.392-398, 1983.

JOHNSON E.U. and SINGH G. Long-term outcomes of urinary tract reconstruction in patients with neurogenic urinary tract dysfunction. *Indian Journal of Urology*. 2013 Oct-Dec; 29(4): 328–337.

- KIM, B.S.; MOONEY, D.J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnology*. v. 16, p. 224-230, 1998.
- KIM, B.S.; BAEZ, C.E.; ATALA A. Biomaterials for tissue engineering. *World Journal of Urology*. v. 18, p. 2-9, 2000.
- KIWULL-SCHÖNE, H. et al. Food mineral composition and acid-base balance in rabbits. *European Journal of Nutrition*, Steinkopff, v.44, n.8, p.499-508, 2005.
- KROPP, B.P. Small-intestinal submucosa for bladder augmentation: a review of preclinical studies. *World Journal of Urology*, Baltimore, v.16, p.262-267, 1998.
- LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; PEREIRA, L. C. Uso de pericárdio bovino conservado em glicerina em cão – Relato de Caso. In: *III Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária*. Belo Horizonte, MG, p. 109. 1998.
- LEITE, J.B.F.; MARQUES, A.F.; GOMES, O.M.; PIGOSSI, N. A glicerina e a preservação dos tecidos. *Revista Paulista Médica*, v.93, p.81-4, 1979.
- LIAKAKOS, T. et al. Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology, and clinical significance. Recent advances in prevention and management. *Digestive Surgery*, Basel, v.18, p.260-273, 2001.
- LIPMAN, N.S.; MARINI, R.P.; FLECKNELL, P.A. Anesthesia and Analgesia in Rabbits. In: FISH, R.E. et al. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2ed. London: Academic Press, 2008. p. 299-333.
- MAIZATO, M. J.S.; PIRES, M.D.; CANZIAN, M.; HIGA, O.Z.; PITOMBO, R.N.M.; LEIRNER, A.A. Histological Evaluation of Biocompatibility of Lyophilized Bovine Pericardium Implanted Subcutaneously in Rats. *Artificial Organs*. v. 32, n. 4, 2008.
- MARQUES, A. Pericárdio bovino na reparação da parede abdominal de cães. *Revista Brasileira de Cirurgia*, v. 77, n. 3, p.195-200, 1987.
- MARTIN-CANCHO, M.F. et al. Relationship of bispectral index values, haemodynamic changes and recovery times during sevoflurane or propofol anaesthesia in rabbits. *Laboratory Animals*, v. 40, p. 28-42, 2006.
- MORRIS, M.C. et al. Urolithiasis on absorbable and non-absorbable suture materials in the rabbit bladder. *Journal of Urology*, Baltimore, v.135, p.602-603, 1986.
- MURAI, S.; OGURA, Y. Effects of several analgesics on the number of vocalization discharges of the rabbit. *Japanese Journal of Pharmacology*, v.28, p.637, 1978.

NUININGA, J.E. et al. A rabbit model to tissue engineer the bladder. *Biomaterials*, Guildford, v.25, p.1657-1661, 2004.

OLIVEIRA, L.O. *Implante homogêneo de bexiga conservada em glicerina a 98 % para reparo da bexiga de cães*. 1999. 72f Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

OLIVEIRA, T.C. et al. Cistoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com peritônio bovino conservado em glicerol a 98%. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 8, Nov. 2008.

OLIVER, R.F.; HULME, M.J.; MUDIE, A.; GRANT, R.A. Skin collagen allografts in the rat. *Nature*. v. 258, n. 5535, p.537-9, 1975.

OLIVER, R.F.; GRANT, R.A. Reconstruction of full-thickness loss skin wounds using collagen allografts. *British Journal of Plastic Surgery*. v.32, p.87, 1979.

OLIVER, R.F.; GRANT, R.A.; COX, R.W.; COOKE, A. Effect of aldehyde cross-linking on human dermal collagen implants in the rat. *British Journal of Experimental Pathology*. v. 61, n. 5, p.544-9, 1980.

PENTERMANN, E.J. et al. Prerequisites for urinary bladder design. *Transaction American Society for Artificial Internal Organs, Hagerstown*, v.31, p.308-312, 1985

PIECHOTA, H.J.; DAHMS, M.P.; GLEASON, L.S. et al. Functional rat bladder regeneration through xenotransplantation of the bladder acellular matrix graft. *Brazilian Journal of Urology*, v.81, p.548-559, 1998.

PIGOSSI, N. Implantação da dura-máter homogênea conservada em glicerina. Estudo experimental em cães. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, v. 22, p. 204-212, 1967.

PIGOSSI, N.; RAIA A ALEX A.; GAMA A. H; SOMOSEN O.; HADDAD J.; STOLF, N. A.G.; ZERBINI, E. J.; MINITI, A.; TENUTO, R. Estudo experimental e clínico de duramáter homóloga conservada em glicerina à temperatura ambiente. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 17, n. 8, p. 263-278, 1971.

PINTO, T.J. A.; SAITO, T.; GLERAN, A. Biocompatibilidade de materiais empregados na confecção de próteses cardiovasculares: comparação entre pericárdio de bovino e dacron. *Revista de Saúde Pública*, v. 27, n. 3, 1993.

QUINTA A, CARVALHO AP, OLIVEIRA M, OLIVEIRA C, RIBEIRO SANTOS A. Bladder adenocarcinoma 41 years after augmentation enterocystoplasty for tuberculosis. *Archivos Españoles de Urología*. Mar;66(2):231-3.

QUITZAN, G.Q.; RAHAL, S.C.; ROCHA, N.S.; CROCCI, A.J. Comparação entre pericárdio bovino preservado em glicerina e malha de poliéster no reparo de falhas da parede abdominal em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, n.4, 2003.

RIGAUD, J., LE NORMAND, L. Augmentation enterocystoplasty. *Ann. Urol.*, v.38, p.298-310, 2004.

ROBBINS; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. 7ª ed. Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, Capítulos 2 e 3. p. 50-84 e 92-121, 2005.

SANTILLAN – DOHERTY, P.; JASSO – VICTORIA, R.; SOTRES – VEGA, A.; OLMOS, R.; ARREOLA, J.L.; GARCIA, D.; VANDA, B.; GAXIOLA M. Repair of thoracoabdominal wall defects in dogs using a bovine pericardial bioprosthesis. *Revista de Investigacion Clinica*. v. 47, n. 6, p.439-46, 1995.

SANTILLAN – DOHERTY, P.; JASSO – VICTORIA, R.; SOTRES – VEGA, A.; OLMOS, R.; ARREOLA, J.L.; GARCIA, D.; VANDA, B.; GAXIOLA M.; SANTIBANEZ, A.; MARTIN, S.; CABELLO, R. Thoracoabdominal wall repair with glutaraldehyde-preserved bovine pericardium. *Journal of Investigative Surgery*. v. 9, n. 1, p.45-55, 1996.

SUTHERLAND, R.S. et al. Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. *Journal of Urology*, Baltimore, v.156, p.571-577, 1996.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SCIENCE – NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, site acessado em Junho/2011.

TANG, L.; EATON, J. W. Inflammatory Responses to Biomaterials. *American Journal of Clinical Pathology*. v. 103, p.466-471, 1995.

TRANI, R.A.S. Eficácia das soluções de Glicerina 98% e Glutaraldeído 0,625% na desinfecção de pericárdio de camundongos (*Mus musculus*) experimentalmente inoculados com vírus da Raiva. 2006. 68p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

TURNER, P.V.; CHEN, H.C.; TAYLOR, M.W. Pharmacokinetics of meloxicam in rabbits after single and repeat oral dosing. *Comparative Medicine*, v.56, n.1, p. 63–67, 2006.

YAMATAKA. A. et al. Living-related partial bladder transplantation for bladder augmentation in rats: an experimental study. *Journal of Pediatric Surgery*, Philadelphia, v.38, n.6, p.913-915, 2003

YAMATOGLI, R.S.; RAHAL, S.C.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, R.; CESTARI, T.M.; LIMA, A.F.M. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. *Revista Ciência Rural*, v.35, n.4, jul-ago, 2005.

YOO, J.J.; MENG, J.; OBERPENNING, F. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology*, v.51, p.221-225, 1998.

ZHENG, H.E. Pathological changes in allogenic skin combined radiation-burn injury in rats. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Waike Zazhi*. v. 7, n. 2, p. 116-8 e 158, 1991.