

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do curso de Pós-graduação

**ALO-TRANSPLANTE PARCIAL DE BEXIGA EM CÃES (*Canis familiaris*): AVALIAÇÃO
CLÍNICA, HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA**

MARCELO WEINSTEIN TEIXEIRA

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG
2007

Marcelo Weinstein Teixeira

**ALO-TRANSPLANTE PARCIAL DE BEXIGA EM CÃES (*Canis familiaris*): AVALIAÇÃO
CLÍNICA, HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA**

Tese apresentada na Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Ciência Animal
Área: Patologia e Ciências Clínicas
Orientadora: Profa. Cleuza Maria de Faria Rezende

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG

Dedicatória.....

Dedico esta conquista à minha querida
esposa Juliana, pela paciência,
dedicação, amor e
cumplicidade.....

Aos meus filhos Wilson Neto e
Marcella.

Homenagem especial.....

Aos meus pais Ney e Kenny, o
porto seguro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Cleuza Maria de Faria Rezende por ter aceitado este desafio, pelo seu exemplo de dedicação, seriedade e criteriosa orientação durante a realização deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Profs. Ney Luiz Pippi, Ana Paula Sobral, Geovanni Dantas Cassali, Júlio Cambraia Veado e Cleuza Maria de Faria Rezende, pela enriquecedora contribuição ao texto da tese e pelas brilhantes sugestões durante a arguição. “A esses notáveis, serei eternamente grato”.

Ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio e por possibilitar meu afastamento para a realização do curso de Doutorado;

Aos queridos colegas da Clínica Veterinária Harmonia, Amaro Fábio, Elayne Cristine, Fábio Pina e Daniele Granville, pela grande ajuda na execução do experimento, sem os quais este trabalho não seria possível;

A minha amiga e sócia Cíntia Valadares, pelo apoio, dedicação e pensamento positivo;

Aos estagiários Cinara, Alexandre, Robertinha, Bruno Pantera e Rita Vidal, que tanto se dedicaram no cuidado dos animais;

Ao Prof. Bernardo Sabat pelo entusiasmo, apoio e colaboração;

Aos meus queridos amigos Marcelo Sá e Érika pela calorosa e divertida acolhida na cidade de Belo Horizonte, com os quais compartilhei momentos inesquecíveis de alegria e descontração;

Ao nosso “guru” João Chumbinho, um grande amigo que a vida nos trouxe. Cidadão de incomensurável bondade e um exemplo de respeito ao próximo;

Aos companheiros Waldemiro Júnior e Fred Maia pelos conselhos, amizade e orientação;

A Ana Paula Sobral, que caiu de pára-quedas nesta aventura, pela grande contribuição na imunistoquímica e pelas ricas sugestões;

A Paola Teles pela gentil colaboração nos exames laboratoriais;

Ao Sr. Natal pela competente contribuição na avaliação estatística da tese;

Ao Dr. Marcos Vinicius Barbosa pelas sugestões e colaboração na avaliação estatística;

Ao Alexandre Barbosa pela colaboração na organização e impressão da Tese;

A empresa NN Pessoa, distribuidor da marca *Royal Canin*, por ter fornecido gratuitamente a ração dos cães durante o experimento;

Ao laboratório Shering-Plough e Viviane, pelo apoio e medicações cedidas;

A CAPES pela bolsa concedida durante a realização do curso de qualificação, a qual aproveitei para parabenizar pela qualidade do Programa de Qualificação Institucional (PQI);

A Universidade Federal de Minas Gerais, por nos receber e permitir que compartilhássemos da excelência do saber.

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	
	LISTA DE TABELAS	
	LISTA DE GRÁFICOS	
	LISTA DE FIGURAS	
	RESUMO	
	ABSTRACT	
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1.	Objetivo Geral.....	2
2.2.	Objetivos Específicos.....	2
3.	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	2
3.1.	Anatomia e fisiologia da bexiga.....	2
3.2.	Indicações para reconstrução da bexiga.....	3
3.2.1.	Neoplasias da vesícula urinária.....	3
3.2.2.	Traumas vesicais.....	4
3.2.3.	Outras indicações.....	4
3.3.	Tratamentos cirúrgicos da bexiga urinária.....	5
3.3.1.	Cistostomia.....	5
3.3.2.	Cistectomia parcial.....	5
3.3.3.	Anastomose ao trígono vesical.....	5
3.3.4.	Utilização de membranas biológicas na reconstrução da bexiga.....	6
3.3.5.	Engenharia de tecidos.....	9
3.4.	Transplante de bexiga.....	9
3.4.1.	Histórico dos transplantes.....	9
3.4.2.	Imunologia dos transplantes.....	11
3.4.3.	Imunossupressão.....	11
3.4.4.	Situação atual.....	13
3.5.	Imunoistoquímica.....	14
4.	MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1.	Seleção das amostras.....	15
4.2.	Preparo dos animais.....	15
4.3.	Procedimento cirúrgico.....	16
4.4.	Pós-operatório.....	19
4.5.	Avaliação histológica.....	21
4.6.	Avaliação imunoistoquímica.....	21
4.7.	Análise estatística.....	22
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1.	Amostras.....	21
5.2.	Procedimento cirúrgico.....	23
5.3.	Aspectos clínicos.....	27
5.3.1.	Avaliação clínica no pós-operatório.....	27
5.4.	Aspectos imunológicos.....	27
5.4.1.	Toxicidade do imunossupressor.....	27
5.4.2.	Rejeição ao transplante.....	28
5.5.	Exames laboratoriais no pós-operatório.....	29
5.5.1.	Hemogramas.....	29
5.5.2.	Perfil Bioquímico.....	38
5.5.3.	Urinalise.....	41
5.6.	Volume da bexiga.....	41
5.7.	Avaliação por meio de imagem.....	45

5.7.1.	Cistografia simples e contrastada.....	45
5.7.2.	Ultra-sonografia.....	46
5.8.	Avaliação Histopatológica.....	46
5.8.1.	Machos – 60 dias.....	47
5.8.2.	Machos – 120 dias.....	50
5.8.3.	Fêmeas – 60 dias.....	52
5.8.4.	Fêmeas – 120 dias.....	55
5.8.5.	Rejeição Tecidual da Bexiga.....	58
5.9.	Imunoistoquímica.....	58
5.9.1.	Machos 60 dias.....	58
5.9.2.	Machos 120 dias.....	59
5.9.3.	Fêmeas 60 dias.....	59
5.9.4.	Fêmeas 120 dias.....	60
6.	CONCLUSÕES.....	64
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	64
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
9.	ANEXO.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

TGF β_1 – fator transformador de crescimento β_1

AML – actina-músculo-liso

α - alfa

β – beta

CCT – carcinoma de células de transição

TNM – T- tamanho do tumor; N- comprometimento do linfonodo regional; M- presença de metástases (Classificação proposta por Owen, (1983) para tumores).

USG – ultra-sonografia

SIS – submucosa de intestino delgado

GAGS – glicosaminoglicanos

APG – ácido poliglicólico

HLA - antígenos linfocitários humanos

EEG - eletro-encefalograma

MHC - complexos principais de histocompatibilidade

MMF - micofenolato mofetil

mTOR - mammalian target of rapmycin

IL – interleucina

DMFA – Departamento de Morfologia e Fisiologia

UFRPE – Universidade Federal Rural de pernambuco

CVA – Centro de Vigilância Ambiental

mHz – mega hertz

HE – hematoxilina eosina

PBS – phosphate buffer solution

pH – pressão de hidrogênio

T.A. – temperatura ambiente

DLA – antígeno linfocitário canino

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos da contagem total das hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$), dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.....	30
Tabela 2 -	Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos do hematócrito (%) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.....	31
Tabela 3 -	Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos dos leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{l}$) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.....	32
Tabela 4 -	Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos dos linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.....	34
Tabela 5 -	Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos dos monócitos dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.....	35
Tabela 6 -	Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos das plaquetas (/mL) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.....	36
Tabela 7 -	Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos da creatinina sérica (mg/dl) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.....	39
Tabela 8 -	Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos da uréia (mg/dl) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.....	40
Tabela 9 -	Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos do volume da bexiga (mL) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.....	42
Tabela 10 -	Avaliação imunoistoquímica para Fator de Crescimento Transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) em cães do gênero masculino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 60 dias de pós-operatório.....	71
Tabela 11 -	Avaliação imunoistoquímica para Fator de Crescimento Transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) em cães do gênero masculino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 120 dias de pós-operatório.....	71
Tabela 12 -	Avaliação imunoistoquímica para Fator de Crescimento Transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) em cães do gênero feminino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 60 dias de pós-operatório.....	72
Tabela 13 -	Avaliação imunoistoquímica para Fator de Crescimento Transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) em cães do gênero feminino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 120 dias de pós-operatório.....	72

Tabela 14 -	Avaliação imunoistoquímica para Actina-músculo-liso (AML) em cães do gênero masculino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 60 dias de pós-operatório.....	73
Tabela 15 -	Avaliação imunoistoquímica para Actina-músculo-liso (AML) em cães do gênero masculino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 120 dias de pós-operatório.....	73
Tabela 16 -	Avaliação imunoistoquímica para Actina-músculo-liso (AML) em cães do gênero feminino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 60 dias de pós-operatório.....	74
Tabela 17 -	Avaliação imunoistoquímica para Actina-músculo-liso (AML) em cães do gênero feminino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 120 dias de pós-operatório.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Variação dos valores individuais de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.	30
Gráfico 2 -	Variação dos valores individuais do hematócrito (%) dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia), após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.	31
Gráfico 3 -	Variação dos valores individuais dos leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{l}$), dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.	33
Gráfico 4 -	Variação dos valores individuais dos linfócitos dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.....	34
Gráfico 5 -	Variação dos valores individuais dos monócitos dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.	35
Gráfico 6 -	Variação dos valores individuais dos plaquetas (/mL) dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.	37
Gráfico 7 -	Variação dos valores individuais da creatinina sérica (mg/dl) dos animais com intercorrências após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia).....	39
Gráfico 8 -	Variação dos valores individuais uréia (mg/dl) dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.....	40

Gráfico 9 -	Variação dos valores individuais do volume da bexiga (mL) dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.	42
Gráfico 10 -	Variação dos valores médios do volume da bexiga (mL) dos 16 animais sem intercorrências após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães, durante o período de observação.....	43
Gráfico 11 -	Variação individual do volume da bexiga (mL) dos 20 cães submetidos ao alo-transplante parcial de bexiga em cães. Os animais de número 1, 3, 4 e 12 tiveram complicações no pós-operatório.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cadelas em decúbito dorsal, sob anestesia geral, imediatamente antes do transplante parcial de bexiga a fresco e simultâneo.....	17
Figura 2 -	Aspecto das bexigas expostas (setas) e distendidas, no momento do transplante parcial de bexiga a fresco e simultâneo.....	18
Figura 3 -	Aspecto do enxerto (asterisco) durante sutura no leito receptor (seta), em transplante parcial de bexiga simultâneo a fresco em cães.....	18
Figura 4 -	Ultra-sonografia da bexiga de cão 60 dias após o transplante parcial de bexiga a fresco, demonstrando a recuperação da morfologia da bexiga.....	19
Figura 5 -	Cistografia contrastada 120 dias após transplante parcial de bexiga a fresco, em cães, demonstrando a recuperação da morfologia da bexiga.....	20
Figura 6 -	Aspecto da cirurgia para retirada de fragmento da bexiga para avaliação histopatológica, aos 60 dias de pós operatório. Observar o detalhe do fragmento (seta).....	20
Figura 7 -	Aspecto do enxerto rejeitado e retirado cirurgicamente, após 50 dias do transplante parcial de bexiga, em um cão.....	23
Figura 8 -	Bexiga de cão transplantada, aos 60 dias de pós-operatório. Observar aderência do omento no enxerto (seta) e aspecto macroscópico da mesma (asterisco).....	24
Figura 9 -	Aspecto da mucosa necrosada do enxerto, expelida por uma cadela, 50 dias após transplante parcial de bexiga a fresco.....	25
Figura 10 -	Aspecto interno da bexiga de cão transplantada, aos 60 dias de pós-operatório, durante cistotomia para realização de biópsia. Observação de processo de necrose da mucosa do implante e migração de urotélio sob a mesma (seta).....	26
Figura 11 -	Aspecto da bexiga transplantada, aos 120 dias de pós-operatório, durante a cirurgia para retirada de material para avaliação histopatológica.....	41
Figura 12 -	Cistografia contrastada realizada aos 15 dias de pós-operatório após transplante parcial de bexiga em cães, onde se observa o pequeno tamanho da bexiga neste momento (seta) e a impregnação do contraste à aderência na região fúndica da mesma (asterisco).....	45
Figura 13 -	Fotomicrografias de alo-enxerto de bexiga de cão 60 dias após o transplante parcial de bexiga.....	49

Figura 13a -	Mucosa com epitélio hiperplásico (seta) e lâmina própria de tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório (asterisco). Aumento 100X.....	49
Figura 13b -	Mucosa com epitélio hiperplásico (seta), lâmina própria de tecido conjuntivo espessada contendo vasos congestos (cabeça de seta) e discreto foco inflamatório (seta larga). Aumento 100X.....	49
Figura 13c -	Detalhe da lâmina própria da figura 1a. Notar presença de vasos (seta) entremeados por infiltrado inflamatório e pigmento de hemossiderina (cabeça de seta). Aumento 400X.....	49
Figura 13d -	Detalhe da mucosa com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (asterisco). Aumento 400X.....	49
Figura 13e -	Adventícia com presença de fio encapsulado (seta). Aumento 100X.....	49
Figura 13f -	Reação fibroblástica e formação de fibras musculares lisas próximo a vasos neoformados (seta). Aumento 100X.....	49
Figura 14 -	Fotomicrografia de alo-enxerto de bexiga de cão 120 dias após o transplante parcial de bexiga.	51
Figura 14a -	Mucosa contendo vasos congestos, remanescentes do tecido de granulação, e infiltrado linfoplasmocitário intenso bem com formações nodulares linfóides (seta).....	51
Figura 14b -	Detalhe da fotomicrografia anterior em maior aumento. Notar projeção de epitélio estratificado para lâmina própria (estrela), vasos congestos (V) e intenso infiltrado linfoplasmocitário em permeio.....	51
Figura 14c -	Área de transição entre lâmina própria e túnica muscular. Observar feixes de fibras musculares (seta) e tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório abaixo do urotélio (estrela).....	51
Figura 14d -	Detalhe de fotomicrografia anterior onde se observa urotélio típico (estrela), fibroblastos (seta) e vasos remanescente do tecido de granulação em regressão (V).....	51
Figura 15 -	Fotomicrografia de alo-enxerto de bexiga de cadela 60 dias após o transplante parcial de bexiga.....	54
Figura 15a -	Observar o epitélio polimórfico de transição (estrela), lâmina própria com aglomerados linfóides (seta) e vasos congestos. Aumento 100x.....	54
Figura 15b -	Observar urotélio (estrela branca). Notar vasos congestos (V) remanescentes do tecido de granulação circundado por fibroblastos (seta) e infiltrado linfoplasmocitário. Aumento 400x.....	54
Figura 15c -	Detalhe de fibras musculares lisas (mioblastos) em corte longitudinal (seta) cercada por uma matriz de tecido conjuntivo em camada mais profunda da bexiga. Aumento 400x.....	54
Figura 15d -	Detalhe de fibras musculares lisas (mioblastos) em corte transversal (seta) cercada por uma matriz de tecido conjuntivo em camada mais profunda da bexiga. Aumento 400x.....	54

Figura 15e -	Lâmina própria da bexiga (LP). Notar presença de metaplasia óssea (MPO). Aumento 100x.....	54
Figura 15f -	Detalhe da metaplasia óssea. Observar membrana osteogênica (MO), osteoblastos ativos apoiados sobre matriz óssea jovem (seta branca). Aumento 400x.....	54
Figura 16 -	Fotomicrografia de alo-enxerto de bexiga de cadela 120 dias após o transplante parcial de bexiga.....	57
Figura 16a -	Bexiga com estrutura histológica típica. Notar presença de urotélio (estrela branca), lâmina própria (demarcação com linha pontilhada azul) com discreto infiltrado inflamatório e túnica muscular (de-marcação com linha pontilhada amarela).....	57
Figura 16b -	Detalhe da mucosa da bexiga com urotélio típico (estrela). Observar lâmina própria com fibroblastos (seta) e vasos cercados por discreto número de linfócitos e plasmócitos.....	57
Figura 16c -	Detalhe do limite da túnica serosa (linha pontilhada) com a túnica muscular. Notar túnica serosa com sua estruturação histológica típica.....	57
Figura 16d -	de neurônio motor ganglionar observado entre as fibras musculares da bexiga.....	57
Figura 16e -	Túnica muscular da bexiga. Notar feixes em orientação longitudinal (seta) e transversal (estrela).....	57
Figura 16f -	Núcleo de miócito liso em corte longitudinal (seta amarela) e transversal (seta preta). Detalhe de um feixe de fibras nervosas entre os feixes de fibras musculares lisas (FN).....	57
Figura 17 -	Avaliação imunoistoquímica de corte histológico de alo-enxerto de bexiga em cães para expressão da proteína Fator transformador de crescimento $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), nos tempos de 60 e 120 dias.....	62
Figura 17a -	Observar a expressão para o anticorpo anti-TGF $\beta 1$ na porção da lâmina própria, bem como ausência de marcação na porção epitelial em machos aos 60 dias (100x).....	62
Figura 17b -	Detalhe da figura anterior (400x).....	62
Figura 17c -	Observar ausência de marcação do TGF $\beta 1$ no tecido epitelial de fêmeas aos 60 dias (100x).....	62
Figura 17d -	Observar marcação do TGF $\beta 1$ em tecido conjuntivo de todas as camadas da bexiga, na direção epitélio-serosa, em fêmeas aos 60 dias (400x).....	62
Figura 17e -	Expressão para o anticorpo anti-TGF $\beta 1$ na porção da lâmina própria, bem como ausência de marcação na porção epitelial em machos aos 120 dias (100x).....	62
Figura 17f -	Detalhe da figura anterior (400x).....	62
Figura 17g -	Marcação positiva para o anticorpo anti-TGF $\beta 1$ em tecido epitelial e conjuntivo de fêmeas aos 120 dias (200x).....	62

Figura 17h -	Ausência de marcação do TGFβ1 aos 120 dias nas regiões onde observa-se infiltrado linfo-plasmocitário (200x).....	62
Figura 18 -	Avaliação imunoistoquímica de corte histológico de alo-enxerto de bexiga em cães para expressão da proteína Actina músculo liso (AML), nos tempos de 60 e 120 dias.....	63
Figura 18a -	Observar coloração acastanhada no citoplasma das células epiteliais, considerada moderada, aos 60 dias (200x).....	63
Figura 18b -	Células fusiformes positivas para AML, aos 60 dias (200x).....	63
Figura 18c -	Epitélio exibindo marcação positiva moderada para o anticorpo anti-AML, aos 60 dias (200x).....	63
Figura 18d -	Marcação em miofibroblastos diferenciados na lâmina própria, aos 120 dias (200x).....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Tipos de anticorpos primários, diluição de trabalho, tratamento e tempo de incubação, na avaliação imunoistoquímica de bexiga de cães submetidos a alo-transplante parcial de bexiga.....	21
------------	---	----

RESUMO

Testou-se a hipótese de que o alo-transplante parcial de bexiga, em cães, restabelece a capacidade estrutural e funcional desse órgão. Vinte cães saudáveis (10 do gênero masculino e 10 do feminino) foram submetidos à cistectomia experimental, com retirada de 70 a 80% do órgão e preservação do trígono vesical. Utilizou-se o alo-transplante a fresco na reconstrução da vesícula urinária e os animais foram acompanhados durante 180 dias. Aos oito dias de pós-operatório, apresentavam capacidade de contenção urinária e micção espontânea. Houve aumento gradativo do volume da vesícula urinária, alcançando, aos 120 dias de pós-operatório, valores semelhantes aos determinados antes da cirurgia. O tecido transplantado atuou como substrato para a migração do tecido vesical, permitindo o crescimento do mesmo e conseqüente aumento gradual da capacidade volumétrica do órgão. Histologicamente observou-se regeneração de todas as camadas da bexiga nos tempos estudados. A expressão imunohistoquímica da proteína TGF β 1 esteve envolvida no processo de diferenciação do urotélio e da proteína AML no processo de reparo do tecido conjuntivo. Concluiu-se que o alo-transplante de bexiga em cães é viável, restabelece a capacidade de repleção e demais funções fisiológicas da vesícula urinária.

Palavras-chave: Alo-transplante, bexiga, cães.

ABSTRACT

The hypothesis that the bladder partially allotransplantation in dogs, develop the structural and functional capacity of this organ was tested. Twenty healthy dogs (10 of male gender and 10 of female) were submitted to an experimental cystectomy, with a withdrawal between 70 and 80% of the organ and preservation of the vesical trigone. The fresh allotransplant was used in the reconstruction of the urinary vesicle and the animals were watched during 180 days. At the eighth day of postoperative, they showed urinary contention capacity and spontaneous urination. There was a gradual growth of the urinary vesicle volume, reaching at the 120th days of postoperative similar values of the ones determined before the surgery. The transplanted tissue acted as a substratum for the migration of vesical tissue, permitting the bladder growth and gradual increase of the organ volumetric capacity. Histologically the regeneration of all the bladder layers during the study time was observed. The expression immunohistochemistry of the protein TGF β 1 had been involved in the differentiation process of the urotelium and AML in the repair of the conjunctive tissue process. It is concluded that the bladder allotransplant is viable, develop the repletion capacity and others physiological functions of the urinary vesicle.

Key words: Allotransplantation, bladder, canine.

1. INTRODUÇÃO

O número de transplantes de órgãos e tecidos em humanos e animais tem crescido significativamente nos últimos anos, principalmente após o advento de técnicas modernas e mais seguras para a imunossupressão. O aprimoramento das técnicas operatórias proporcionou aos pacientes transplantados uma qualidade de vida aceitável e sobrevida mais longa. Apesar disto, ainda existem órgãos e tecidos que necessitam de pesquisas para a sua utilização na rotina dos transplantes. Embora a bexiga seja essencial para a manutenção da qualidade de vida dos animais e seres humanos, até o momento não se tem comprovação da viabilidade dos transplantes deste órgão.

Quando a capacidade de armazenamento da bexiga se torna comprometida, os transtornos funcionais podem ser graves e provocar complicações como a hidronefrose, incontinência urinária e infecções recorrentes (Lepper et al., 2002). As cirurgias reconstrutivas da bexiga são essenciais na correção de distúrbios caracterizadas pela baixa capacidade de contenção e alta pressão intravesical, como nas grandes falhas decorrentes de necrose por traumatismos ou após cistectomias parciais para o tratamento do câncer deste órgão (Piechota et al., 1998).

Nos cães, as principais indicações para a cirurgia reparadora da bexiga são as neoplasias e os traumatismos graves. As cirurgias reconstrutoras da vesícula urinária têm como objetivo promover um reservatório de baixa pressão, com capacidade de continência, micção espontânea e mínimo resíduo pós-micção (Crandis et al., 1998).

Geralmente, faz-se a reconstrução da vesícula urinária por meio da transposição de segmento autólogo de estômago ou intestino (Rigaud e Normand, 2004). Estes procedimentos, conhecidos como anastomose do trígono vesical, muito utilizados em humanos, estão sujeitos a complicações, decorren-

tes, principalmente, da diferença histológica entre o enxerto e a bexiga. As complicações mais observadas são as fístulas, urolitíases, ausência de dilatação, contração do enxerto, neoplasias, produção de muco e problemas metabólicos provenientes da absorção pelo tecido implantado (Fries et al., 1991).

Grande variedade de materiais sintéticos tem sido também, usada na reconstrução da bexiga. As membranas biológicas conservadas, como bexiga homóloga (Baiotto, 2001; Oliveira, 1999), pericárdio bovino (Kambic et al., 1992), placenta de humanos (Fishman et al., 1987) e submucosa de bexiga, entre outras, foram usadas na correção de falhas na bexiga de cães com resultados variados e às vezes conflitantes.

A matriz acelular é considerada como uma nova alternativa para a correção de falhas da bexiga e tem sido utilizada experimentalmente em animais, todavia sua utilização na rotina clínica ainda não é uma realidade (Nuininga et al., 2004). Estes enxertos não causam rejeição, mas podem apresentar problemas semelhantes a outras membranas, como as fístulas, formação de crostas e contração do implante (Zini et al., 2004).

A engenharia de tecidos, através da cultura celular autóloga, poderá ser uma opção viável para a resolução de falhas extensas da bexiga e outros órgãos, pois eliminará a rejeição e diferenças celulares entre os tecidos (Zini et al., 2004). Porém, sua utilização em órgãos pluricelulares ainda é um desafio, devido a limitações técnicas (Obepnering et al., 1999, Atala e Koch, 2005).

Segundo Teixeira, (2002) o alo-transplante de bexiga urinária poderá ser uma alternativa eficaz na correção dos defeitos extensos ou incapacidade de dilatação da vesícula urinária em animais. Esta alternativa terapêutica pode trazer grandes benefícios, inclusive para o homem, desde que promova a recuperação da capacidade de armazenamento de urina e controle da micção.

Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade do transplante homólogo parcial de bexiga a fresco, em cães, considerando a regeneração tecidual, capacidade de armazenamento, contenção e esvaziamento espontâneo da vesícula urinária.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade do alo-transplante parcial de bexiga a fresco em cães.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Verificar o comportamento clínico, bem como a funcionalidade e morfologia da bexiga após o alo-transplante de bexiga a fresco, por meio da avaliação clínica, de exames por imagem e laboratoriais, durante 180 dias;

2.2.2. Analisar a morfologia do tecido transplantado, por meio da histologia, nos intervalos de 60 e 120 dias após a cirurgia;

2.2.3. Avaliar a expressão das proteínas TGF β 1 e AML pela técnica de imunohistoquímica aos 60 e 120 dias de pós-operatório.

3. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

3.1. Anatomia e fisiologia da bexiga

A bexiga é um órgão muscular elástico e complacente, que recebe a urina proveniente dos rins e a armazena até a sua expulsão para o meio externo. Trata-se de um órgão de funcionamento complexo que apresenta duas funções básicas: armazenamento da urina, em regime de baixa pressão, e esvaziamento do seu conteúdo, sob alta pressão (Nelson e Couto, 2001). Em cães e gatos, a bexiga é parcialmente coberta pelo peritônio, sustentada pelos ligamentos laterais que a prende à parede lateral do canal pélvico e pelo ligamento ventral que a une com a parede média

ventral. A bexiga recebe suprimento sanguíneo pelas artérias vesicais craniais (ramos da artéria umbilical) e caudais (ramos da artéria urogenital). Anatomicamente, a bexiga dos cães pode ser dividida em fundo, corpo e colo. A região de inserção dos ureteres na bexiga e início da uretra tem formato triangular e recebe o nome de trígono vesical. O segmento do ureter situado dentro da parede da bexiga forma a válvula vesico-ureteral que impede o refluxo da urina (Lobato, 1998).

A atividade da vesícula urinária é conhecida por micção e a continência urinária é possível graças ao sincronismo entre a camada muscular lisa da bexiga (músculo detrusor) e a musculatura uretral (Lane, 2003).

A micção é dividida em duas fases distintas: contenção e eliminação. A fase de contenção é regida pela inervação simpática, que mantém a musculatura da bexiga flácida e o músculo liso uretral contraído, originando uma válvula de alta pressão. A inervação simpática da bexiga é suprida pelo nervo hipogástrico e é composta pelas fibras pré-ganglionares existentes na região lombar da medula espinhal a partir dos segmentos lombares 1 a 4 (L1-L4). Essas fibras se dividem em β e α -adrenérgicas. As fibras β -adrenérgicas terminam no músculo detrusor e sua estimulação resulta em relaxamento do mesmo, facilitando o armazenamento da urina. As fibras α -adrenérgicas inervam a musculatura lisa no trígono e na uretra. A estimulação dessas fibras faz com que elas se contraiam, dando origem ao esfíncter uretral interno funcional (Silverman e Long, 2000)

Na fase de eliminação ocorre dominância do núcleo parassimpático, que promove a despolarização e contração do músculo detrusor com concomitante relaxamento do esfíncter uretral. A inervação parassimpática da bexiga é suprida pelo nervo pélvico que se origina nos segmentos sacrais 1 a 3 (S1-S3) da medula espinhal. A estimulação do nervo

pélvico resulta na despolarização das fibras marcapasso ao longo do músculo detrusor, com conseqüente contração ativa do mesmo. Quando a bexiga está vazia, a ação simpática é retomada e o músculo detrusor se relaxa, permitindo que ocorra o acúmulo de urina (Nelson e Couto, 2001). Entretanto, alterações que interferem de maneira irreversível na atividade normal da bexiga podem necessitar de cirurgias reconstrutoras para a sua correção (Nelson e Couto, 2001).

3.2. Indicações para reconstrução da bexiga

3.2.1. Neoplasias da vesícula urinária

Embora de baixa prevalência, as neoplasias da vesícula urinária, nos cães, são as principais causas de perda tecidual e conseqüentemente a indicação mais freqüente para as cirurgias reparadoras deste órgão. Esses tumores podem acometer o epitélio e todas as camadas e segmentos das vias urinárias baixas, e possuem natureza agressiva e metastática (Henry, 2003).

Tumores primários da bexiga urinária representam apenas 0,5% dos tumores malignos na espécie canina e são os de maior prevalência no sistema urinário (Henry, 2003). A maioria dos tumores da bexiga, em cães, são carcinomas de células de transição (CCT), que pode se originar na pelve renal, ureter, bexiga ou uretra. Acredita-se que a sua ocorrência esteja relacionada à retenção urinária, que permite o contato contínuo de agentes carcinogênicos com o epitélio da bexiga (Nikula et al., 1989; Henry, 2003). Em gatos, o linfossarcoma renal é mais comum do que as neoplasias vesicais (Nikula et al., 1989).

Nikula et al., (1989) após estudo retrospectivo de necrópsia de 990 cães da raça Beagle, que receberam baixas doses de radiação gama por longo período, observaram a prevalência de 38 casos de CCT, sendo 23 na bexiga, 13 na uretra e dois em ambos os locais.

As neoplasias ocorreram entre 7,5 e 13,9 anos. Os autores não observaram a ocorrência de CCT primário no rim.

A etiologia do câncer espontâneo da bexiga em cães é ainda desconhecida (Henry, 2003), embora vários compostos sejam capazes de provocar câncer urotelial experimentalmente, incluindo o ácido nitrilotriacético, ciclofosfamida, plantas tóxicas, entre outros.

Segundo Henry, (2003) os sintomas mais comuns da neoplasia da bexiga são a hematuria e polaciúria, acompanhadas, ou não, de disúria. Sintomas gerais, como anorexia, emagrecimento e desidratação não são geralmente observados. O volume do tumor na vesícula urinária é variável, podendo às vezes não ser detectado devido à dificuldade da palpação em alguns animais (Rocha et al., 2000). Leucocitose é um achado comum. O perfil bioquímico pode apresentar-se normal ou com aumento de creatinina sérica. Quando associado à infecção pode-se encontrar hematuria, proteinúria e piúria na urinálise (Henry, 2003). A ultra-sonografia (USG) abdominal pode revelar presença de massa envolvendo toda a bexiga, parte dela ou não mostrar qualquer alteração dependendo do tamanho e extensão do tumor (Biller, 1990). Pneumocistografia e urografia excretora podem ser úteis na determinação do local e da extensão do tumor (Henry, 2003).

Ainda não é conhecido o melhor método de tratamento para a neoplasia do trato urinário inferior. Algumas limitações à terapia são: diagnóstico tardio, ausência de sintomas clínicos patognomônicos, custos da terapia e comprometimento de estruturas essenciais ao funcionamento do órgão (Rocha et al., 2000). Geralmente, o tratamento é feito por meio de cistectomia parcial ou total, associada à quimioterapia sistêmica ou intravesical. Independentemente do método utilizado, a terapia é considerada paliativa, devido ao caráter maligno da doença (Stone, et al., 1996).

Henri, (2003), preconizaram a utilização de mitoxantrone com piroxican e relataram 50% de redução dos sintomas de estrangúria e hematúria. Em casos resistentes este autor recomendou o uso da carboplatina durante 21 a 30 dias.

A radioterapia, quando utilizada concomitantemente com a cirurgia pode predispor à fibrose do ureter e da bexiga. Tais alterações resultam em hidronefrose e incontinência urinária (Henry, 2003).

A cirurgia para retirada total do tumor é ainda a terapia recomendada e mais eficiente nos casos de tumores das vias urinárias (Stein et al., 2001). Diversas técnicas cirúrgicas têm sido propostas e variam com a extensão do tumor. Para Rocha et al., (2000) o fator mais importante a ser considerado antes da intervenção cirúrgica é a determinação das estruturas atingidas pelo câncer (ureter, bexiga, trígono e uretra) e um acurado estadiamento da neoplasia. O estadiamento segue o sistema preconizado pela Organização Mundial de Saúde por meio da avaliação do tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos regionais e presença de metástases (classificação TNM, segundo Owen, 1983).

3.2.2. Traumatismos vesicais

A segunda causa mais comum de perda de tecido na bexiga urinária são os traumatismos vesicais. Em seres humanos, e nos pequenos animais, a grande maioria das rupturas vesicais é ocasionada por trauma externo fechado associado à bexiga distendida durante o mesmo. A bexiga repleta de urina absorve o impacto, mas não tem resistência suficiente e rompe-se como um "balão de água". Os acidentes automobilísticos são as causas mais frequentes deste tipo de lesão. Com a ruptura da bexiga, a urina e o sangue resultante da hemorragia espalham-se pela cavidade abdominal e causam peritonite química e dor (Nelson e Couto, 2001).

Em cães, pode ocorrer necrose de segmentos da bexiga por esmagamento provocado por mordidas de outro animal. Traumas extensos podem provocar perda de quantidade variável de tecido, o que exige cirurgias reconstrutivas urgentes da bexiga urinária (Nelson e Couto, 2001).

O diagnóstico da ruptura da vesícula urinária pode ser feito por exames radiográficos com contraste iodado estéril (Essman, 2005) ou por meio da ultra-sonografia (USG) abdominal. Galati e Iwasaki, (2004) afirmaram ser a cistografia contrastada superior à USG no diagnóstico da lesão. Cote et al., (2002) propuseram a associação de cistografia contrastada com USG para o diagnóstico da ruptura de bexiga em cães. Estes autores afirmaram que a presença do contraste microgranulado, infundido por sonda uretral, facilita o diagnóstico da ruptura pela USG pela sua maior densidade quando comparado à urina. Porém, Barsanti et al., (1981) citou que a uretrocistografia contrastada pode predispor à hematúria e infecções urinárias quando não executada adequadamente.

3.2.3. Outras indicações

Animais portadores de lesões medulares podem desenvolver bexiga neurogênica, que perde a complacência ou torna-se incapaz de se contrair adequadamente. Ambas as situações, que variam de acordo com o segmento da lesão, podem promover transtornos importantes como: incontinência urinária, infecções recorrentes e neoplasia (Hoelzler e Liedbetter, 2004). Os animais portadores de bexiga neurogênica desenvolvem cistites recorrentes e o aumento da pressão intravesical pode provocar a hidronefrose.

Segundo Kockum et al., (1999) a extrofia vesical, cistite intersticial e ureteres ectópicos são outras alterações que podem levar à necessidade de reconstrução cirúrgica da bexiga.

3.3. Tratamentos cirúrgicos da bexiga urinária

3.3.1. Cistostomia

A cistostomia consiste na abertura cirúrgica da bexiga para drenagem da urina. Tais procedimentos se tornam necessários quando ocorre obstrução total da uretra. As causas mais comuns desse tipo de obstrução são os cálculos uretrais e tumoração no trígono vesical ou na uretra (Smith et al., 1995). Estudos, em 106 cães, comprovaram que a cistostomia pode trazer conforto aos pacientes com obstrução por tumores no trígono vesical, promove uma saída patente para a urina acumulada e evita todos os transtornos advindos da obstrução.

Este procedimento pode ser permanente, como no caso do carcinoma não operável, ou temporário, antes da correção definitiva. Geralmente, a bexiga é fixada por sutura na parede abdominal e coloca-se ou não uma sonda de Foley permanente para promover a saída da urina (Smith et al., 1995; Stone et al., 1996).

3.3.2. Cistectomia parcial

A Cistectomia parcial é recomendada para tratamento de tumorações da vesícula urinária nas quais o tumor pode ser completamente excisado, com margem de segurança de pelo menos um a dois centímetros de tecido saudável (Stone et al., 1996). Quando a completa retirada do tumor não for possível, outro método mais radical deve ser considerado. Vários estudos demonstraram que animais submetidos à cistectomia parcial com retirada de todo o tecido neoplásico apresentam sobrevida superior à obtida por outras técnicas. Stone et al., (1996) empregaram a cistectomia parcial em 11 cães com CCT, removendo entre 40 e 70% da bexiga. Os animais apresentaram polaciúria que regrediu espontaneamente em três meses. Houve dois casos de deiscência da sutura vesical. Nove cães sobreviveram um ano, e os outros

dois, 17 e 27 meses respectivamente. Liebermann-Meffert, (2000) indicaram a utilização do omento nas cirurgias reparadoras da bexiga, para evitar o extravasamento de urina e prevenir a deiscência da sutura.

As complicações mais comuns da cistectomia parcial são: a deiscência da sutura vesical, hidroureter e hidronefrose por aumento da pressão intravesical, e recidiva tumoral por retirada incompleta do tecido neoplásico (Stone et al., 1996). A hidronefrose causa danos irreversíveis aos rins e a presença de cilindros granulados, encontrados durante urinálise, sugere prognóstico reservado (Meyer, et al., 1995).

Para evitar o aumento excessivo da pressão intravesical, provocada pela cistectomia de grande segmento da bexiga, são indicadas as cirurgias reconstrutoras do órgão (Costello et al., 2000).

3.3.3. Anastomose ao trígono vesical

A principal indicação para a cirurgia reconstrutiva de aumento da vesícula urinária é a perda da complacência, que provoca incontinência urinária ou refluxo da urina para as vias urinárias altas (Atala e Koch, 2005). Esta situação pode decorrer de perda de tecido vesical, alterações neurológicas, patologias congênitas ou cistite intersticial.

A reconstrução da bexiga urinária usando-se parte do intestino foi realizada pela primeira vez em 1888 por Tizzoni e Foggi, os quais fizeram, em cães, anastomose de uma alça do íleo ao trígono vesical após cistectomia experimental. Desde então diversas técnicas foram usadas para este fim, como segmento pediculado de tecidos musculares, estômago e regiões do intestino (Salle et al., 1990 e Pereira et al., 2002). Tais técnicas se limitam a cirurgias reparadoras da bexiga onde haja preservação do trígono vesical (Crandis, 1998). A técnica cirúrgica consiste na substituição do corpo e fundo da bexiga por segmento pediculado do intestino ou estômago

preservando o trígono-vesical (Ueno et al., 2001). A “neobexiga” funciona como reservatório e a continência é mantida pelo esfíncter uretral externo (Ueno et al., 2001).

As técnicas de anastomose com preservação do trígono vesical permitem a manutenção das válvulas ureterovesicais patentes, as quais protegem os rins de refluxo e infecção ascendente, que impede o comprometimento da função renal (Costello et al., 2000). Outra vantagem desse procedimento é a manutenção da continência urinária pela preservação da função motora do trígono. Quando o uretér é preservado, a “neobexiga” apresenta melhores resultados funcionais, permitindo o esvaziamento normal pela uretra e a continência (Ueno et al., 2001).

A seleção do segmento digestivo usado para a reconstrução da bexiga é de suma importância, porque dele depende a função pós-operatória do órgão. Dessa forma, o cólon tem se mostrado mais indicado do que o íleo e estômago para a reconstrução da bexiga, por apresentar menor índice de complicação (Pereira et al., 2002). Em contrapartida estudos experimentais demonstraram que a gastrocistoplastia apresenta menor índice de falha renal que a enterocistoplastia, em cães (Piser et al., 1987). Piser et al., (1987) relataram em modelo experimental a absorção transmural de íons pelo segmento gástrico e intestinal. Nesse estudo, as concentrações de sódio, cloro e amônia foram menores na gastrocistoplastia. Segundo Loran et al., (1999) cães submetidos à enterocistoplastia apresentaram baixa pressão ureteral, com ureteres de diâmetro fisiológico e bexiga com baixa pressão.

Kockum et al., (1999) utilizaram o ceco autólogo na reconstrução da vesícula urinária de suínos. Em um grupo experimental utilizaram o intestino com todas as camadas e em outro, procederam a retirada da mucosa e submucosa intestinais. Ocorreu aumento do volume vesical no primeiro grupo e contração do enxerto no segundo. Os autores con-

cluíram que a remoção da mucosa e submucosa resultou em processo inflamatório mais acentuado, levando à diminuição do tecido intestinal enxertado.

As técnicas de anastomose ao trígono vesical estão associadas a complicações como infecção ascendente, que resulta em pielonefrite e função renal reduzida, hidronefrose, fístulas, contração do enxerto, desequilíbrio eletrolítico secundário à reabsorção de componentes da urina, neoplasias e urolitíases (Cubillana et al., 1998; Gitlin et al., 1999). Segundo Schauffert et al., (2000) a utilização de fios inadequados ou o contato do fio com a urina são fatores importantes na etiologia da urilitíase após cirurgia da bexiga. Para Vöros (1993) a ultrassonografia é o exame de escolha no diagnóstico das urolitíases.

As diferenças histológicas e funcionais entre o tecido implantado e a bexiga são consideradas como as causas principais das complicações das enterocistoplastias e gastrocistoplastias (Loran et al., 1999). Gitlin et al., (1999) estudaram, em cães, as alterações na mucosa entérica e gástrica após o contato contínuo com a urina, decorrentes de seu emprego para aumentar a bexiga. Os autores observaram a presença de metaplasia glandular e urotélio hiperplásico e concluíram ser o contato com a urina o principal fator responsável pelas neoplasias decorrentes destas cirurgias. Pesquisas recentes têm sugerido a utilização de segmento intestinal sem epitélio ou recoberto com urotélio autólogo para minimizar estes problemas (Atala, 2004).

3.3.4. Utilização de membranas biológicas na reparação da bexiga

A primeira aplicação de um enxerto para substituição de parte da bexiga foi relatada por Neuhoff em 1917, quando a fásia lata autóloga foi usada em bexiga de cães. Posteriormente, diferentes materiais biológicos conservados foram utilizados experimental-

mente, incluindo alo-enxerto de mucosa vesical, pericárdio bovino, dura-máter e placenta, entre outros (Atala, 2004).

A utilização de biomateriais na reconstrução de defeitos da bexiga se baseia no conceito de que a bexiga tem capacidade de regeneração e o implante é usado como substrato para o crescimento do tecido vesical (Elbahnasy et al., 1998). O biomaterial usado para a reconstrução da bexiga deve ser absorvível, ser substituído por tecido do receptor, promover o crescimento de células de transição e de músculo liso e o funcionamento normal da bexiga (Atala e Koch, 2005).

Muitas formas de tratamento químico têm sido utilizadas para suprimir a antigenicidade dos implantes, conservar os mesmos mantendo suas características e evitar contaminação. No Brasil, a glicerina a 98% foi utilizada na conservação e esterilização de membranas biológicas, como demonstraram Inatomi et al., (1980) e Daleck et al., (1992). As membranas devem ser estocadas por pelo menos 30 dias para diminuir a antigenicidade (Oliveira, 1999; Baiotto, 2001).

Kambic et al., (1992) utilizaram pericárdio bovino tratado em ácido acético e anidrido acético e conservado em etanol por 24 meses, em dez cães submetidos à cistectomia parcial experimental de aproximadamente 50%. Foi observado o retorno da capacidade vesical normal dos animais em 36 meses. Os autores concluíram que o enxerto permitiu a formação de um reservatório estrutural para a urina, serviu de base para a reepitelização e proporcionou o aumento da capacidade volumétrica à medida que foi reabsorvido.

A matriz acelular é considerada como uma nova alternativa para a correção de falhas da bexiga e tem sido utilizada experimentalmente em animais, todavia sua utilização na rotina clínica ainda não é uma realidade. As matrizes acelulares são preparadas de intestino, estômago ou bexiga, por meio de manipulação mecânica e química, retirando-se

as células do tecido e mantendo-se a matriz extracelular (Nuininga et al., 2004). O grande desafio do emprego deste material é promover a neoformação de um urotélio com propriedades urodinâmicas fisiológicas e com o menor índice de contração cicatricial. Em estudos com animais, nos quais se procedeu à substituição de segmentos da bexiga por matriz acelular, houve completa reepitelização, revascularização e infiltração progressiva por músculo liso (Lai et al., 2005). Segundo Zini et al., (2004) estes enxertos não causam rejeição, mas podem apresentar problemas semelhantes a outras membranas, como as fístulas, formação de crostas e contração do implante (Atala, 2004).

Enxertos com matriz acelular de membrana de submucosa do intestino delgado de suínos (SIS) têm sido usados na substituição do tecido vesical em ratos, coelhos, suínos e cães, com resultados promissores na reconstrução da bexiga (Lepper et al., 2002). Segundo Atala, (2004) materiais derivados de tecido acelular possuem a vantagem da imunocompatibilidade, mas quando comparadas com os polímeros, mostram mais dificuldade de manipulação e menor resistência.

A SIS é biocompatível, biodegradável e não imunogênica. Em ratos, este implante promoveu o retorno da contratilidade da bexiga e propiciou a regeneração do tecido nervoso normal (Sutherland et al., 1996). Embora os estudos iniciais sejam promissores, nenhum implante à base de SIS tem sido usado na rotina cirúrgica em humanos, devido à contração do enxerto e formação de crostas que causam infecção (Nuininga et al., 2004).

Ayyildiz et al., (2006) avaliaram a eficácia da matriz acelular de suíno na reconstrução da bexiga em coelhos e relataram presença de micro-calcificações, perda da elasticidade do tecido implantado, espessamento da parede da bexiga e regeneração irregular do músculo detrusor.

Nuininga et al. (2004) compararam biomatriz de colágeno associada a polímero, com submucosa de suíno (SIS) na reparação experimental de defeitos da bexiga em 60 coelhos. As avaliações histológicas e imunohistoquímicas foram realizadas em duas semanas, um, dois, três e nove meses. Na face luminal de ambos os materiais houve a formação de crostas no primeiro mês, com desaparecimento espontâneo aos três meses. A biomatriz de colágeno foi superior a SIS, pois mostrou integração tecidual e desenvolvimento do tecido vesical receptor. Esta diferença se deve às suas características de porosidade, presença de fatores de crescimento e glicosaminoglicanas (GAGS). Em humanos, a utilização de SIS está associada à incrustação, cálculos e contração do material.

Kropp et al., (1996) utilizaram SIS na reconstrução da bexiga em 19 cães Beagle machos, dos quais foram retirados 35 a 45% da bexiga urinária. Observou-se crescimento da bexiga remanescente com deslocamento cranial da inserção do ureter. Histologicamente, o novo tecido apresentou características normais com definição das três camadas (mucosa com urotélio, musculatura lisa e serosa) e arquitetura normal. Após 15 meses, não havia presença de enxerto comprovando a sua absorção. O estudo mostrou que a SIS pode ser utilizada na reconstrução da bexiga de cão, sem evidência de rejeição, contração ou complicações sistêmicas.

Magunna et al., (1999) usaram SIS após ressecção total de bexiga por trauma e neoplasia, em um cão e um gato, respectivamente. Os autores utilizaram SIS congelada a qual foi reidratada imediatamente antes da cirurgia. Exames radiográficos, ultra-sonográficos e cistoscopia revelaram o retorno da arquitetura da bexiga. Histologicamente observou-se completa reabsorção do material com regeneração do tecido vesical.

Lepper et al., (2002) usaram a membrana aniônica acelular de bovino para reparação a

bexiga de coelhos submetidos à prévia cistectomia parcial. Os autores suturaram um segmento de 4,0 x 4,0cm da membrana aniônica na bexiga, com e sem a preservação do urotélio. Os animais foram avaliados semanalmente para observação do volume urinário e residual, sendo sacrificados na décima segunda semana. Todo o sistema urinário, exceto uretra, foi retirado e acondicionado em formol tamponado 10% para valiação histopatológica. A bexiga foi avaliada quanto à presença ou ausência do implante, fibrose, processo inflamatório, calcificação e outras alterações. No que se refere à capacidade de repleção não houve diferença significativa entre os grupos com e sem urotélio e todos retornaram à capacidade normal após três meses. No grupo em que se preservou o urotélio, a bexiga apresentou processo inflamatório extenso. Não houve presença de cálculos em nenhum dos grupos.

Lai et al., (2005) avaliaram a reparação da bexiga, em coelhos, utilizando diferentes implantes biodegradáveis. Os animais foram submetidos à cistectomia parcial de 70% do órgão. Os resultados obtidos revelaram que o ácido poliglicólico (APG) permitiu crescimento mais acentuado do volume vesical que a SIS e que ambos podem ser usados como substrato para o desenvolvimento de músculo liso. A contração cicatricial no tecido implantado foi também menor quando utilizado o APG. A capacidade volumétrica da bexiga foi avaliada introduzindo solução salina, por meio de sonda, a uma pressão de 40 cm de H₂O. Verificou-se um retorno entre 41 e 73% do volume inicial aos 180 dias de pós-operatório.

Sutherland et al., (1996) utilizaram matriz extracelular de bexiga e estômago para cistoplastia de aumento em 40 ratos. Os autores avaliaram o processo de formação da musculatura lisa, vasos sanguíneos e nervos na interface do implante com a bexiga remanescente. Observou-se regeneração da musculatura lisa a partir da segunda semana após a enxertia, e presença da superfície epitelial

e feixe muscular de tamanho normal, 26 semanas após a implantação. Revascularização do enxerto foi notada duas semanas após a cirurgia e fibras nervosas iniciaram seu desenvolvimento ao redor dos feixes de musculatura lisa quatro semanas após o enxerto.

Gucer e Ozkardis, (1992) empregaram vesícula biliar como substituto da bexiga urinária em oito cães. Neste estudo não foi observado extravasamento da urina pela sutura, muito embora o volume final alcançado tenha sido significativamente inferior ao volume normal da bexiga. Dois cães tiveram aumento acentuado de uréia e creatinina sérica e ambos apresentaram alterações renais na urografia excretora.

A substituição parcial ou total de órgãos sempre foi um desafio para a ciência. Todos os tecidos usados, como substitutos, apresentam graus variáveis de complicação, principalmente relacionados às diferenças de natureza dos materiais com o leito receptor. Dentre estes, o enxerto de matriz acelular em bexiga urinária parece ser promissor (Atala, 2004).

3.3.5. Engenharia de tecidos

As técnicas comumente utilizadas para reconstrução da bexiga com tecido intestinal, e de outras origens não urológica, estão associadas a complicações como produção de muco, infecção crônica, cálculos vesicais, ruptura com extravasamento de urina, fibrose, desequilíbrio eletrolítico e neoplasia maligna (Atala, 2004). Segundo Lima et al., (1995) as complicações variam de 3 a 44%.

A engenharia de tecidos autólogos tem apresentado avanços para a reconstrução e substituição de tecidos e órgãos (Nuininga et al., 2004). Oberpening et al., (1999) sugeriram que a criação de uma bexiga, a partir de células de tecido autólogo, pode ser útil na prevenção de complicações e favorecer a formação de urotélio. Os autores estudaram cultura de células da bexiga de coelhos. Se-

mearam urotélio e musculatura lisa em polímero e avaliaram por 11 meses. O tecido formado demonstrou ser impermeável à urina, ter elasticidade e possuir arquitetura histológica normal. Os resultados obtidos, *in vitro*, sugeriram a viabilidade da engenharia de tecidos na reconstrução da vesícula urinária.

Hou et al., (2006) empregaram urotélio de coelho semeado em superfície de ácido poliglicólico, implantados no subcutâneo de coelhos atímicos. Os resultados mostraram que o polímero foi coberto por camadas de células de urotélio.

Recentemente, Atala et al., (2006) relataram sucesso na produção de bexiga para humanos a partir de células da bexiga do próprio paciente. Os autores empregaram um modelo de bexiga biodegradável como substrato, no qual foram semeadas células autólogas de bexiga. Após o implante da bexiga numa paciente portadora de patologia crônica (mielomeningocele), observou-se retorno da atividade fisiológica da mesma.

3.4. Transplante de bexiga

3.4.1. Histórico dos transplantes

Historicamente, a idéia de se fazer transplantes pode ter sido inspirada na mitologia grega, quando há séculos acreditava-se em híbridos de homem-animal. Na idade média, existiram relatos de transplantes de dentes, nariz e até membros, mas com resultados quase sempre desastrosos. Os transplantes nasais eram realizados para corrigir lesões decorrentes da sífilis, muito comum na época, utilizando enxertos de pele do próprio indivíduo (auto-enxerto). As principais contribuições destas primeiras experiências foram as técnicas cirúrgicas empregadas, como a descrita por Tagliacozzi em 1596, as quais são até hoje utilizadas como base das cirurgias plásticas (Pereira, 2004).

O termo transplante foi usado pela primeira vez por Hunter em 1178, que descreveu seus experimentos com enxertos ovarianos e testiculares em animais. O avanço das técnicas operatórias veio com os trabalhos pioneiros de Carrel, em 1905, que desenvolveu as técnicas de sutura vascular com fios e agulhas finos, impulsionando as pesquisas experimentais e a aplicação clínica dos transplantes de órgãos. O primeiro transplante em animais de que se tem registro, foi feito por Ullmann, em 1902, que realizou um auto-transplante renal em cão (Pereira, 2004).

Após experiências mal-sucedidas com transplantes inter-espécies (xenotransplante), Guthrie, colaborador de Carrel, hipotetizou serem as falhas devidas à reação imunológica (Pereira, 2004). Posteriormente, Peter Medawar, estudou as complicações imunológicas relacionadas aos transplantes de pele em humanos durante a segunda guerra mundial. Em 1952, foram descobertos, por Dausset, os antígenos de histocompatibilidade e, em 1954, a equipe de Murray, iniciou o programa de transplante renal com gêmeos com antígenos linfocitários humanos (HLA) idênticos, obtendo sucesso (Pereira, 2004).

O desenvolvimento das primeiras drogas imunossupressoras, a 6-mercaptopurina e em seguida a azatioprina, deu início à era moderna dos transplantes. A azatioprina é um imunossupressor eficaz, mas pouco seletivo, por impedir a proliferação inespecífica de células ativadas (Lasmar e Lasmar, 2003). Após 1975, com o desenvolvimento da ciclosporina, que interfere na produção das linfocinas, e portanto, é mais específica, houve avanço nos transplantes clínicos em todo o mundo, aumentando o índice de sobrevivência e dando novo impulso nestes tipos de cirurgias (Tizard, 2002).

Os transplantes ou enxertos podem ser classificados, de acordo com a sua origem, em: autoenxerto (ou enxerto autólogo), isoenxerto (ou enxerto isólogo), aloenxerto (ou enxerto homólogo) e xenoenxerto (ou enxerto

heterólogo).

Enxertos no mesmo indivíduo (autoenxertos) ou entre animais geneticamente idênticos, como os gêmeos monozigóticos (isoenxertos), são tolerados pelo receptor por não expressar antígenos estranhos e, conseqüentemente, não ativar resposta de rejeição. Enxertos entre animais geneticamente não idênticos são rejeitados, com uma velocidade que é dependente do grau das diferenças genéticas. O aloenxerto ocorre entre indivíduos da mesma espécie, porém geneticamente diferentes. Neste caso, as células do aloenxerto manifestarão aloantígenos que serão reconhecidos como estranhos pelo hospedeiro (Tizard, 2002).

A disparidade genética máxima, porém, se dá entre membros de diferentes espécies (xenoenxerto), sendo o enxerto rapidamente rejeitado, seja pela presença de anticorpos IgM naturais no receptor ou pela rejeição rápida mediada por células. Se a incompatibilidade imunológica do xenoenxerto fosse suprimida, a utilização de animais como doadores poderia aliviar a escassez mundial de órgãos para transplantação (Lasmar e Lasmar, 2003).

Tanto doadores vivos quanto cadáveres são utilizados nas cirurgias de transplantes. Doadores vivos são utilizados quando o organismo pode repor ao doador o material retirado, como o sangue, medula óssea e fragmento de órgão como o fígado, ou quando se trata de órgãos pares como os rins. O conceito de cadáver como doador se baseia no fato de que os tecidos e órgãos do corpo não morrem todos ao mesmo tempo, podendo vários deles ser retirados após a morte cerebral (Tizard, 2002; Pereira, 2004).

A morte cerebral, diagnosticada por exame físico e eletro-encefalograma (EEG), substituiu nos últimos anos a parada cardíaca como parâmetro para a doação dos órgãos, por ser segura quanto ao prognóstico e permitir maior viabilidade dos órgãos doados (Las-

mar e Lasmar, 2003).

3.4.2. Imunologia dos transplantes

Na prática clínica, os transplantes visam preencher falha anatômica ou melhorar uma deficiência funcional. A menos que doador e receptor sejam geneticamente idênticos, os antígenos do enxerto são capazes de provocar resposta imunológica desencadeando a rejeição (Lasmar e Lasmar, 2003). Apenas recentemente, com o entendimento do fenômeno da rejeição, passou-se a compreender a razão da maioria dos insucessos em transplantes, provocando a morte do tecido ou órgão transplantado (Kahan, et al., 2003). Segundo Lasmar e Lasmar, (2003) um transplante pode estimular os vários mecanismos de imunidade celular e humoral, específicos e não-específicos. Os linfócitos T são as principais células responsáveis pela rejeição dos transplantes e muitos dos conhecimentos sobre a fisiologia e função das células T advêm dos estudos dos transplantes (Tizard, 2002).

A rejeição pode ser prevenida pela seleção do doador baseada na histocompatibilidade, e com o uso de imunossuppressores. A destruição tecidual associada à rejeição do transplante decorre da ação de macrófagos ativadas e células citotóxicas T (Mathews et al., 1994). Os anticorpos causam danos ao enxerto e os macrófagos estão envolvidos nas reações inflamatórias no tecido enxertado. No entanto, as células B (produtoras de anticorpos) e macrófagos não são suficientes para provocar a rejeição. Estas células dependem da ação das células T, especialmente na rejeição primária (Tizard, 2002; Toppa, 2004).

O estudo da rejeição de enxertos de pele em camundongos levou à descoberta dos principais complexos de histocompatibilidade (MHC) que atuam na apresentação de antígenos aos linfócitos. Estas moléculas são classificadas em classes I e II e têm participação importante no mecanismo de ação dos

linfócitos T. Os linfócitos T envolvidos na rejeição só reconhecem peptídeos do doador em associação com os antígenos MHC presentes no enxerto (Mathews et al., 1994; Lasmar e Lasmar, 2003).

A rejeição hiper-aguda, a qual pode ocorrer nas primeiras 24 horas após o transplante, é mediada por anticorpos anti-doador pré-formados no receptor e pelo complemento, ou pode ocorrer até cinco dias após, sendo mediada por ativação de células T sensibilizadas. A rejeição aguda ocorre em uma semana ou mais e está associada à resposta imunomediada de células T do receptor contra o enxerto. A rejeição crônica está associada com o declínio gradual da função do enxerto, que resulta da ação de fatores humorais, complexos imunes, reação celular lenta e recorrência de doença. A rejeição não deve ser vista como um fenômeno de tudo ou nada, mas como um processo gradual (Tizard, 2002).

A despeito do marcante progresso na clínica dos transplantes de órgãos nas duas últimas décadas, complicações significativas como rejeição, infecção oportunista, neoplasias, complicações metabólicas e toxicidade das drogas imunomediadoras ainda ocorrem (Jiang e Kobayashi, 1999).

3.4.3. Imunossupressão

As terapias imunossupressoras têm aumentado na rotina clínica, tanto na Medicina Veterinária quanto na Medicina Humana. Estes métodos de tratamento são empregados principalmente no controle de doenças auto-imunes, nas reações de hipersensibilidade e nos casos de transplantes de órgãos e tecidos. Apesar do índice crescente de transplantes e a maior utilização de agentes imunossuppressores, tem se observado significativa redução na morbidade e mortalidade de pacientes submetidos à medicação continuada, o que comprova os avanços obtidos nesta área (Morris, 1995).

Segundo Toppa, (2004) os métodos disponíveis para a inibição das respostas imunes podem ser classificados em dois grupos principais, imunossupressão inespecífica e específica. A imunossupressão inespecífica se baseia em procedimentos como a radiação; utilização de anti-inflamatórios esteróides e drogas citotóxicas que inibem a divisão celular de um modo inespecífico, reduzindo as respostas de células sensíveis a antígenos. Essa abordagem é precipitada e relativamente perigosa, já que também podem ocorrer danos graves em outras populações celulares, diminuindo as possibilidades de defesa do organismo (Pirch et al., 1997).

A imunossupressão específica é dirigida ao bloqueio seletivo e reversível da atividade do sistema imune, principalmente no que se refere à atividade das células T (Pascual et al., 2003). Segundo Kahan et al., (2003) e Pascual et al., (2003) um dos fatos mais importantes no desenvolvimento de alo-transplantes foi o advento de agentes imunossupressores potentes e seletivos. Apesar dos efeitos benéficos comprovados destas novas drogas, o custo proveniente da aplicação continuada nos pacientes tem prejudicado a popularização das mesmas (Morris 1995; Pirch et al., 1997).

Dentre os imunossupressores mais utilizados encontra-se a ciclosporina A, que é um polipeptídeo derivado de duas espécies de fungo (*Tolyplocadium inflatum* e *Cylindrocarpon lucidum*). A ciclosporina atua no bloqueio da transdução de sinais e impede a produção de interleucina (IL2) e interferon pelas células T (Kahan et al., 2003). Ao que parece, a ciclosporina bloqueia os linfócitos durante a fase G0 ou G1 do ciclo celular e inibe a liberação de linfocinas pelas células T ativadas (Morris, 1995; Pirch et al., 1997). Embora a ciclosporina possa ser usada isoladamente, é normalmente associada a outras drogas como a azatioprina e ou prednisona, permitindo a redução das dosagens individuais devido ao sinergismo entre as drogas. Dentre os efeitos colaterais, em humanos, destaca-se a

hipertensão arterial refratária, diabetes, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, distúrbios digestivos e edema gengival. As nefropatias merecem atenção especial, pois a ciclosporina pode causar vasoconstrição das arteríolas pré-glomerulares levando a hipoperfusão glomerular. Portanto, a monitorização do nível sanguíneo da ciclosporina é importante na determinação da dosagem de manutenção da droga. Várias doenças oportunistas ou sub-clínicas podem progredir durante a imunossupressão. Em cães, a Erlichiose é uma doença que cursa sem sintomas até encontrar ambiente favorável ao seu desenvolvimento (Codner, 1986). As neoplasias decorrentes dos tratamentos imunossupressores também ocorrem com a ciclosporina e suas associações (Morris 1995; Vicenti et al., 2002).

O tacrolimus, um antibiótico macrolídeo isolado da cultura de *Streptomyces tsukunensis*, possui mecanismo de ação semelhante à ciclosporina. O tacrolimus inibe diretamente a calcineurina impedindo a liberação da IL2 responsável pela ativação dos linfócitos T (Pirch et al., 1997; Vicenti et al., 2002). Como resultado desta ação molecular, a droga inibe especialmente a resposta imune mediada por células. Jiang e Kobayashi (1999), em trabalho comparativo entre ciclosporina A e tacrolimus (FK 506), concluíram que ambos bloqueiam as vias de transdução do sinal cálcio dependente do receptor das células T, inibindo a ativação das mesmas. Vincent e Kirkman, (1998) em observações, in vitro, mostraram que as duas drogas possuem um padrão de imunossupressão diferente e o Tacrolimus é 10 a 100 vezes mais potente que a ciclosporina A na inibição da produção de IL2, proliferação de células T e produção de outras citocinas.

Mathew et al., (2003) avaliaram o efeito de infusão de medula óssea do doador e soro antitímócito associada com imunossupressores, no prolongamento da sobrevivência de transplantes renais em cães. Todos os cães receberam soro tímócito anti-cães de coelhos, prednisona, azatioprina e ciclosporina.

Um grupo recebeu também medula óssea do doador e outro não. Os resultados demonstraram que esta associação de drogas pode prolongar a sobrevivência de transplantes renais e que a adição do transplante de medula pode prolongar ainda mais a ausência de resposta imune. Os autores concluíram que, apesar da resposta satisfatória dos imunossupressores na sobrevivência de rins transplantados em cães, a adição do soro antitímocito e o subsequente transplante de medula óssea podem prolongar ainda mais estes efeitos.

O sirolimus, um antibiótico macrolídeo do fungo *Streptomyces higroscopicus*, encontrado na ilha Rapa Nui, penetra livremente nas células, unindo-se à mesma imunofilina do tacrolimus (FKBP12). Este complexo sirolimus-FKBP12 não inibe a calcineurina, mas bloqueia o sinal de transdução de uma proteína denominada mTOR (mammalian target of rapamycin), essencial para a proliferação de linfócitos (Lasmar e Lasmar, 2003). Alguns estudos demonstraram que o sirolimus pode substituir a ciclosporina em pacientes estáveis, bem como permitir a retirada precoce do esteróide em transplante renal de humanos (Vincent e Kirkman, 1998). Em estudos recentes foi observado que a associação tacrolimus-sirolimus é eficaz e promissora, principalmente no transplante de ilhotas pancreáticas em humanos (Kahan et al., 2001). O sirolimus não é nefrotóxico, mas pode causar trombocitopenia, anemia, hiperlipidemia e leucopenia dose-dependente.

Para Lasmar e Lasmar, (2003) anticorpos monoclonais promovem maior concentração de moléculas de anticorpo reativo quando comparado a frações de antiglobulina policlonal. Anticorpos bloqueadores da IL são anticorpos monoclonais que bloqueiam a fixação da IL2 no receptor do linfócito ativado, impedindo a sua proliferação. Esta ação é semelhante à das drogas inibidoras de calcineurina. A associação destes anticorpos ao esquema de imunossupressão por drogas tem diminuído o índice de rejeição aguda em

transplantes renais de humanos.

Nos últimos 20 anos, o surgimento das drogas imunossupressoras específicas proporcionou um progresso significativo na clínica dos transplantes de órgãos, diminuindo a morbidade e mortalidade dos pacientes transplantados (Teixeira e Rezende, 2004). Segundo os mesmos autores, a associação de drogas imunomoduladoras e as manobras para aumentar a tolerância do receptor têm também contribuído neste sentido. Porém, complicações como infecção, neoplasia ou rejeição crônica ainda persistem, e novas alternativas precisam surgir.

3.4.4. Situação atual

Apesar das pesquisas ininterruptas para se determinar o tecido ideal na reconstrução da bexiga, não existe ainda um consenso. A utilização de tecido transplantado de bexiga homóloga pode ser uma solução viável e carece de mais estudos no que se refere à rejeição e comportamento do transplante em contato constante com a urina (Teixeira, 2002).

Yamataka et al., (2001) realizaram transplante de bexiga em ratos, com a finalidade de avaliar sua aplicabilidade como alternativa para aumento de bexiga. As bexigas de ratos com 21 dias de idade eram excisadas e implantadas em uma bolsa criada no omento de ratos de seis semanas de idade. A imunossupressão dos receptores era feita com tacrolimus, para evitar possível rejeição. O transplante de bexiga foi bem sucedido e a mucosa vesical permaneceu sem alteração durante todo o processo de reparação. Os autores concluíram que a técnica de transplante de bexiga poderia ser usada clinicamente para o aumento vesical.

Segundo Teixeira, (2002) o transplante de bexiga pode ser uma alternativa eficaz na correção dos defeitos extensos ou incapacidade de dilatação da vesícula urinária tanto em animais como nos seres humanos. A

possibilidade de transplantar com sucesso o órgão, proveniente de seres da mesma espécie, evita as complicações observadas, visto que a maioria delas se deve ao fato do tecido enxertado ser de natureza histológica diferente do tecido receptor. A integração do tecido implantado, com controle da rejeição, poderá comprovar a hipótese da utilização do alo-transplante de bexiga. O alo-transplante poderá trazer grandes benefícios para o homem e animais, desde que promova o condicionamento da capacidade de armazenamento de urina e controle da micção. O possível sucesso de tais intervenções trará forte impacto no meio, devolvendo a dignidade e auto-estima a pacientes ora desamparados.

Tendo como base o que ocorre com transplante cardíaco, onde após secção completa da vascularização e inervação ocorre regeneração destes tecidos, foi iniciado um projeto inovador de transplante de bexiga em cães (Teixeira, 2002). Neste experimento a sutura se limitou ao órgão transplantado, não tendo sido realizada anastomose de vasos e nervos. A cirurgia foi realizada em duas cadelas, cujas bexigas foram trocadas simultaneamente. Observou-se retorno da capacidade de armazenamento da bexiga e continência urinária, 30 e 90 dias após a cirurgia, respectivamente.

3.5. Imunoistoquímica

A imunoistoquímica, segmento moderno da histoquímica é um conjunto de métodos relativamente recente cuja crescente utilização tem provocado impacto na patologia humana e veterinária, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade.

Os miofibroblastos, conhecidos como células reparadoras, estão morfológicamente em um estágio intermediário entre os fibroblastos e as células do músculo liso. Vários fatores de crescimento e citocinas estão relacionados com a diferenciação dos fibroblastos, sendo o fator transformador de crescimento

$\beta 1$ (TGF $\beta 1$) um dos principais. Atualmente, sabe-se que os miofibroblastos possuem características peculiares visíveis em reações imunoistoquímicas. Essas células são fortemente positivas para o anticorpo α -actina músculo-liso (AML) (Desmouliere et al., 1993; Sobral, 2000; Sobral et al., 2004).

Segundo Massague, (1990) os fatores transformadores de crescimento β (TGF β) compõem uma família de citocinas multifuncionais com atividades diversificadas, que podem ter papel na proliferação, diferenciação e controle da expressão da matriz extracelular. O TGF $\beta 1$ é o fator de crescimento mais estudado dentro da família de TGF β . O TGF $\beta 1$ afeta a diferenciação, migração, e apoptose epitelial. Ele é expresso por plaquetas, macrófagos e por células do urotélio, e é encontrado também na urina de indivíduos normais (Izadifar et al., 1999). Roberts et al., (1990) demonstraram que TGF $\beta 1$ pode intensificar a presença de colágeno *in vitro* e induzir fibrose de órgãos.

Howard et al., (2005) investigaram, em humanos, a ação do TGF $\beta 1$ na ativação de hiperplasia, hipertrofia e alteração na expressão de colágeno e da musculatura lisa detrusora, *in vitro*. Nos resultados obtidos observou-se que, embora tenha havido hipertrofia vesical, não houve proliferação da musculatura detrusora. Os colágenos tipo I e III tiveram um aumento significativo nas culturas tratadas com TGF $\beta 1$. Esses resultados indicam que a musculatura lisa da bexiga sofre influência potencial para hipertrofia e fibrose quando sob a estimulação do TGF $\beta 1$.

De Boer et al., (1994) estudaram, em ratos, a expressão de fatores de crescimento e seus receptores durante fases específicas da regeneração do urotélio, após lesões agudas. Os dados mostraram aumento da expressão do TGF $\beta 1$ e seus receptores nas fases de reepitelização e diferenciação.

Kim et al., (2001) avaliaram, pela imunoistoquímica, a expressão do TGF $\beta 1$ e seus re-

ceptores no carcinoma de células de transição (CCT) da bexiga urinária e observaram aumento da expressão do TGF β 1 e diminuição dos receptores.

Izadifar et al., (1999) estudaram a expressão do TGF β 1 e seus receptores no urotélio humano normal e com CCT. Os resultados indicaram que no urotélio normal a expressão de TGF β 1 e seus receptores aumentam proporcionalmente à maturação e diferenciação do mesmo. Este padrão foi particularmente perdido nos tumores invasivos. A alteração no padrão de expressão sugere haver um controle autócrino para o TGF β 1 e seus receptores, o qual é mais pronunciado nos tumores mais invasivos. Booth et al., (2002) observaram a diminuição da expressão do TGF β 1 nos tumores mais invasivos e paralelamente aumento nos menos invasivos e nas bexigas normais. Os autores concluíram haver associação entre a expressão do TGF β 1 e a diferenciação urotelial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção da amostra

O presente estudo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (DMFA/UFRPE), segundo o protocolo nº 0001/07 (anexo 1).

Foram utilizados 20 caninos, sem raça definida, provenientes do Centro de Vigilância Ambiental do Município de Recife (CVA), destinados à eutanásia para controle populacional pelo programa de erradicação de zoonoses do Estado de Pernambuco. O experimento foi realizado no Hospital Veterinário Harmonia, sito à Estrada do Encanamento – 585, Bairro de Casa Forte, no Município de Recife.

Realizou-se um estudo prospectivo, no qual os animais foram submetidos a transplante parcial de bexiga homóloga a fresco. Para

tal, utilizaram-se dez cães do gênero masculino e dez do gênero feminino, adultos jovens (conforme dentição), saudáveis, com peso variando de 9,1 a 13,5 Kg ($10,8 \pm 1,45$). Os animais foram numerados de 1 a 20, sendo os machos identificados de 1 a 10 e as fêmeas de 11 a 20. O experimento foi dividido em duas etapas, com 10 animais em cada. A primeira etapa foi iniciada em abril de 2004 e teve seu término em novembro do mesmo ano. Nesta etapa, participaram os caninos do gênero masculino. A segunda etapa, da qual participaram as fêmeas, foi iniciada em maio de 2005 e finalizada em dezembro do mesmo ano. A opção de realizar o experimento em etapas deveu-se ao limite de capacidade das instalações e de pessoal técnico.

Os critérios de inclusão foram: animais saudáveis, com peso corporal entre 10 e 15 kg, adultos jovens, ambos os sexos, livres de doenças infectocontagiosas, neoplasias ou feridas cutâneas. Os critérios de exclusão foram: animais com alterações no sistema urogenital e fêmeas gestantes.

Após avaliação clínica, os animais pré-selecionados foram divididos aleatoriamente em duplas do mesmo sexo e encaminhados para teste de compatibilidade sanguínea, por meio de prova eritrocitária cruzada (maior e menor). Confirmada a compatibilidade, os cães foram submetidos à avaliação hematólógica, urinálise, ultra-sonografia abdominal, cistografia e testes para Leishmaniose e Eritríose caninas.

4.2. Preparo dos animais

Os cães foram acomodados em canis individuais de 1,0 x 1,2m para período de adaptação de 15 dias, onde receberam água e ração comercial¹ *ad-libitum*. Sete dias antes da

¹ **Ração Special Crock®**. Royal Canin Indústria e Comércio. R. Augusto Cirelli, n.270, Descalvado – SP.

cirurgia, foram todos desverminados² e tratados para ectoparasitas³. Vinte e quatro horas antes da cirurgia iniciou-se a imunossupressão, com administração de ciclosporina A microemulsificada⁴ em uma única dose diária de 10 mg/kg por via oral, conforme preconizado por Jiang e Kobayashi, (1999). A imunossupressão foi mantida durante trinta dias após o procedimento cirúrgico. Durante a imunossupressão não foram mensuradas as concentrações sanguíneas da ciclosporina A.

4.3. Procedimento cirúrgico

Todos os cães foram doadores e receptores, sendo a intervenção realizada simultaneamente em dois animais do mesmo sexo (fig. 1). Após tricotomia ampla da região abdominal ventral, os animais foram submetidos à pré-medicação com cloridrato de acetilpromazina⁵ 1% (0,2 mg/kg) pela via intramuscular, vinte minutos antes da indução anestésica. A indução foi feita com tiopental sódico⁶ a 5% (12,5 mg/kg) por via intravenosa, em cateter na veia cefálica, seguida de intubação orotraqueal e manutenção com isoflurano⁷ vaporizado com oxigênio em circuito anestésico semi-fechado. Os animais foram mantidos com infusão venosa contínua de Ringer Lactato⁸ (10ml/kg/h), durante a cirurgia e pós-operatório imediato. Antes do procedimento cirúrgico, colocou-se sonda uretral para mensuração do volume basal da

bexiga e também promover seu esvaziamento durante a cirurgia. O volume da bexiga foi mensurado com adaptação de um equipo de soro na sonda uretral e elevação do frasco de soro até que houvesse estabilização da pressão do tubo com a pressão interna da bexiga, o que ocorreu a cerca de 1, 2m acima do animal.

² **Drontal plus**[®]. Bayer S.A. Saúde Animal. Rua Domingos Jorge 1000. São Paulo – SP.

³ **Front Line**[®]. Merial Saúde Animal. Fazenda São Francisco. Paulínia – SP.

⁴ **Ciclosporina A** – Sandimmun neoral[®]. Fabricado por Novartis Pharma AG, Suíça.

⁵ **Acepran**[®]. Univet. Indústria Veterinária. R. Cimaco Barbosa. São Paulo – SP.

⁶ **Tiopentax**[®]. Cristália Rod. Itapira-Lindóia Km.14. Itapira SP.

⁷ **Isoforine**[®]. Cristália. Rod. Itapira-Lindóia Km.14. Itapira SP.

⁸ **Ringer com lactato**. Fresenius Kabi Brasil Ltda. Rodovia 040. Aquiraz. Ceará.



Figura 1 – Cadelas em decúbito dorsal, sob anestesia geral, imediatamente antes do transplante parcial de bexiga a fresco e simultâneo.

Com a área abdominal preparada de forma rotineira para celiotomia mediana, procedeu-se o acesso cirúrgico retro-umbilical, nas fêmeas, e paraprepucial nos machos, para a exposição vesical. Os procedimentos foram realizados simultaneamente para minimizar a exposição cirúrgica e o sofrimento do implante por isquemia. Após colocação de afastador auto-estático e campos protetores, as bexigas foram expostas por retroversão e distendidas com soro fisiológico para localização precisa do trígono vesical (fig. 2). Colocaram-se dois reparos, com fio de nylon 3-0, posicionados imediatamente cranial à inserção de cada ureter e um terceiro reparo na face ventral do colo vesical. Os reparos foram usados como referência para a cistectomia, que foi realizada 0,5 cm cranial à inserção dos ureteres, preservando-se apenas o trígono vesical,

sendo retirado 70 a 80% da bexiga. Após a ligadura das artérias vesicais caudais, as bexigas foram excisadas e imersas em solução de Ringer com lactato de sódio, resfriado a 5°C, por aproximadamente 10 minutos, para remover resquícios de sangue. Posteriormente, as mesmas foram suturadas no coto remanescente do animal receptor em plano único, com fio polyglecaprone 25⁹ 4-0 em padrão contínuo simples, envolvendo a serosa/adventícia, muscular e submucosa (fig. 3). Ao término da sutura procedeu-se à repleção da bexiga com solução salina para verificar possíveis extravasamentos. Quando necessário, procedeu-se pontos isolados para conter pequenos extravasamentos.

⁹ **Monocryl**[®]. Ethicon. Rodovia Pres. Dutra Km. 54. S.J. dos Campos SP.



Figura 2 – Aspecto das bexigas expostas (setas) e distendidas, no momento do transplante parcial de bexiga a fresco e simultâneo.

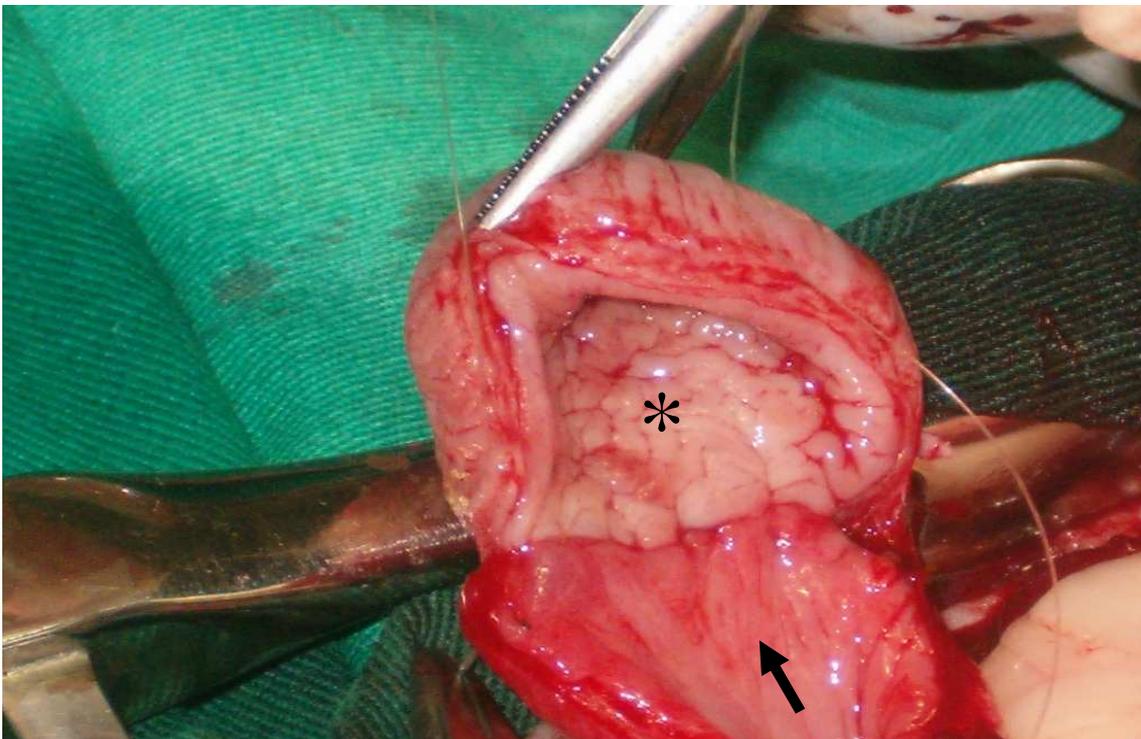


Figura 3 – Aspecto do enxerto (asterisco) durante sutura no leito receptor (seta), em transplante parcial de bexiga a fresco e simultâneo em cães.

A celiorráfia foi realizada em padrão Sultan na linha Alba com fio de nylon monofilamentoso¹⁰ 2-0, redução de espaço morto em padrão contínuo simples, utilizando polyglecaprone 25 3-0 e sutura intradérmica com fio de nylon monofilamentoso 4-0. As sondas foram fixadas cirurgicamente por meio de sutura com o mesmo fio e mantidas nos animais por oito dias.

4.4. Pós-operatório

No pós-operatório imediato, os cães receberam antibiótico sistêmico à base de enrofloxacin¹¹ (5,0 mg/kg) durante dez dias e anti-inflamatório não esteroidal à base de cetoprofeno¹² (1,0 mg/kg), ambos por via oral em dose única diária, durante quatro dias. A imunossupressão com ciclosporina (10 mg/kg) foi mantida diariamente até 30 dias de pós-operatório. As sondas foram retiradas aos oito dias de pós-operatório, juntamente com os pontos de pele.

Os cães foram mantidos em canis individuais durante os 180 dias de observação. Após este período, os mesmos foram doados para proprietários pré-selecionados, os quais se comprometeram a assumir os animais por tempo indeterminado. Os dados coletados foram registrados em fichas individuais e arquivados para posterior análise.

Durante o período de observação (180 dias), os animais foram submetidos aos seguintes exames e correspondente periodicidade:

1- Avaliação clínica diária nos primeiros 15 dias e semanal até 180 dias. Os animais eram pesados, observados, palpados (principalmente abdome e linfonodos), ausculta-

dos e tinham sua temperatura mensurada. Exame neurológico foi efetuado nos primeiros 30 dias para avaliar alterações provenientes da neurotoxicidade da terapia imunossupressiva.

2- Ultra-sonografia abdominal semanal foi realizada durante 30 dias e quinzenalmente até 180. Os exames ultra-sonográficos foram realizados com transdutor convexo de 5,0 mHz e linear de 7,5 mHz. Durante o exame foi dada ênfase à avaliação do conteúdo vesical, formato e volume da bexiga, sendo posteriormente avaliados os rins e ureteres (fig. 4).

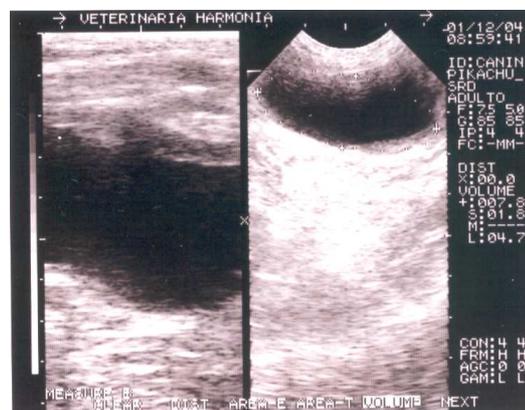


Figura 4 – Ultra-sonografia da bexiga de cão 60 dias após o transplante parcial de bexiga a fresco, demonstrando a recuperação da morfologia da bexiga.

3- Mensuração semanal do volume da bexiga foi realizada durante 30 dias e quinzenalmente até 180. Para aferição do volume da bexiga utilizou-se sonda com balonete¹³ e procedeu-se infusão de solução fisiológica pela sonda a uma altura de aproximadamente 1,2 m acima do animal, que é a altura de equilíbrio entre a pressão intravesical e do soro. O volume foi também mensurado por meio de ultra-sonografia.

4- Cistografia contrastada aos 15, 30 e 120 dias de pós-operatório. As cistografias contrastadas foram realizadas com o animal

¹⁰ **Mononylon**[®]. Ethicon. Rodovia Pres. Dutra Km. 54. S.J. dos Campos SP.

¹¹ **Flotril**[®]. Shering-Plough S.A. Est. dos Bandeirantes, 3901. Rio de Janeiro RJ.

¹² **Ketofen**[®]. Merial Saúde Animal. Fazenda São Francisco. Paulínia – SP.

¹³ **Sonda de Foley**[®]. Syncrofilm. Av. Eng. Luiz Carlos Berrini, 1645, 12o andar São Paulo/SP

sob anestesia geral com tiopental sódico. Inicialmente, procedia-se cistografia com contraste negativo e em seguida administrava-se o contraste positivo. Para administrar o contraste e impedir seu extravasamento, manteve-se a sonda de Foley®. O meio de contraste utilizado foi a solução aquosa a 50% de 3,5 diacetamido - 2,4,6 triiodo benzoato de sódio¹⁴ (fig. 5).



Figura 5 – Cistografia contrastada 120 dias após transplante parcial de bexiga a fresco, em cães, demonstrando a recuperação da morfologia da bexiga

5- Hemograma com pesquisa de hematozoários foi realizado semanalmente nos primeiros 30 dias e quinzenalmente até 180 dias.

6- Exame do perfil bioquímico renal (uréia e creatinina), semanal foi feito nos primeiros 30 dias e quinzenalmente até 180 dias.

7- Urinálise semanal foi realizada nos primeiros 30 dias e quinzenalmente até 180 dias.

8- Biópsia da interface enxerto-bexiga foi colhida aos 60 e 120 dias de pós-operatório. A biópsia foi realizada por meio de celiotomia, com remoção de um segmento, de cerca de 2,0 x 0,5 cm, da interface do implante com a bexiga remanescente (fig. 6).

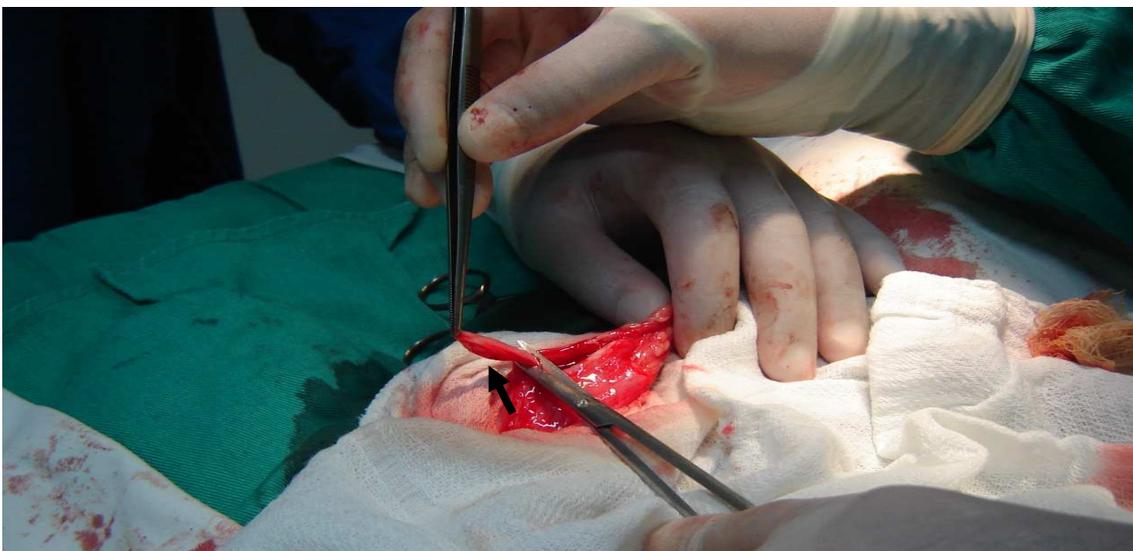


Figura 6 – Aspecto da cirurgia para retirada de fragmento da bexiga para avaliação histopatológica, aos 60 dias de pós-operatório. Observar o detalhe do fragmento (seta).

¹⁴ **Telebrix**®. Guerbet Produtos Radiológicos Ltda. R. André Rocha, 3000. Rio de Janeiro RJ.

4.5. Avaliação histológica

Foram retirados fragmentos de cerca de 2,0 X 0,5 cm na interface do implante com a bexiga remanescente nos tempos pós-implante de 60 e 120 dias. Os fragmentos foram analisados macroscopicamente, levando-se em consideração a presença de necrose, espessura da parede, fibrose e presença de fio de sutura. Após a colheita, as amostras foram fixadas em formalina tampoadas a 10% e acondicionadas em frascos individuais. No laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, as amostras foram incluídas em parafina, seccionadas na espessura de 5µm e coradas pela hematoxilina-eosina (HE).

Na avaliação microscópica da bexiga remanescente, interface e bexiga implantada foram considerados os eventos de reação tecidual decorrente do implante nos três segmentos, onde foram avaliados:

- Reação da túnica mucosa e submucosa ao implante;
- Reação da túnica muscular ao implante;
- Reação da túnica serosa/adventícia ao implante.

4.6. Avaliação imunoistoquímica

As amostras, já emblocadas em parafina, foram cortadas em 3µm e estendidas em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano. Todas as amostras foram submetidas a estudo

imunoistoquímico por meio do método da Estreptovidina-biotina-peroxidase com os seguintes anticorpos: Fator transformador de crescimento $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) e actina-músculo-liso (AML) (quadro 1).

Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, o primeiro a 60° C por 30 minutos, e o segundo, a temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia decrescente de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95%, 85% e 80%, durante 5 minutos cada. Posteriormente, procedeu-se à remoção do pigmento formólico com as secções submetidas à solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a 95% durante 10 minutos. Os preparados foram lavados em água corrente por 10 minutos e em duas passagens de água destilada por 5 minutos cada.

As secções teciduais foram submetidas, a seguir, aos tratamentos para recuperação antigênica (quadro 1). Na seqüência, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena, no qual os cortes foram incubados em peróxido de hidrogênio a 10% com metanol (1:1, v/v), em duas trocas de 5 minutos. Após estes passos, todos os procedimentos foram precedidos de lavagens em solução tampão de PBS com pH 7,4.

Os anticorpos primários foram diluídos e incubados conforme indicação do fabricante, como demonstra o quadro 1.

Quadro 1. Tipos de anticorpos primários, diluição de trabalho, tratamento e tempo de incubação, na avaliação imunoistoquímica de bexiga de cães submetidos a alo-transplante parcial de bexiga.

Anticorpo	Clone	Diluição de Trabalho	Tratamento	Incubação
α -Actina-músculo-liso	1A4	1:150	Citrato/pH 6,0/Steamer/30'	60'
TGF $\beta 1$	Sc-146	1:150'	Pepsina 1%/pH 1,8/Estufa 37°C/ 30'	60'

Fonte: Dako

Após duas lavagens em soluções tampão de PBS (pH 7,4), foram feitas as incubações dos cortes com anticorpo secundário biotinado polivalente, anti-cabra/coelho/camundongo, à temperatura ambiente (T.A.) por 30 minutos. Em seguida, foi feita a adição do complexo streptoavidina-biotina por 30 minutos a T.A.. A reação foi revelada pela utilização da solução cromógena contendo 0,03mg de diamino-benzidina (3,2'-diamino-benzidina) diluída em 100ml de PBS acrescida de 0,6ml de água oxigenada a 10% por 5 minutos.

Posteriormente, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos, passados duas vezes em água destilada, sendo em seguida contra-corados com hematoxilina de Mayer por 45 segundos. Após nova lavagem, seguiram os passos de desidratação, diafanização e montagem das lâminas em ENTELAM.

Foram analisados os padrões de marcação imunoistoquímica e a distribuição dos antígenos actina-músculo-liso (AML) e TGF β 1 à microscopia de luz. Os achados foram anotados individualmente. Posteriormente à leitura de cada uma das lâminas, foram estabelecidos os padrões de marcação para cada antígeno pesquisado, bem como sua localização específica. Os padrões de marcação foram descritos, conforme intensidade, da seguinte maneira: marcação fraca (+), marcação moderada (++) e marcação forte (+++).

4.7. Análise estatística

Os dados das variáveis foram resumidos por medidas de tendência central (média e mediana), dispersão (desvio padrão) e valores mínimo e máximo. Para cada variável mensurada, foi construído um gráfico cartesiano para mostrar, ao longo do tempo, a variação da média das medidas obtidas nos animais. Foram realizadas comparações pareadas das médias correspondentes ao sétimo, trigésimo e centésimo octogésimo

dia. Essas comparações pareadas foram realizadas com o teste t de Student.

Para os valores do volume da bexiga foi ajustado um modelo de regressão linear para descrever a variação das médias, em função do tempo. No ajuste do modelo de regressão linear foi empregado o método que leva em consideração a possível correlação das observações.

Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%. A análise dos dados foi realizada com o “software” Stata 9.2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Amostras

Os cães oriundos do Centro de Vigilância Ambiental do município de Recife apresentaram uniformidade de peso e idade, porém muitos animais foram excluídos durante triagem por apresentarem doenças infecto-contagiosas, hemoparasitas, alterações renais, demodicose e tumorações (especialmente tumor venéreo transmissível). Os testes para leishmaniose e erlichiose canina foram negativos em todos os animais avaliados para o experimento. A maioria dos cães (13) do experimento apresentou cristais de cálcio na urina durante o processo de seleção, mas apenas quatro desenvolveram urolitíase durante o pós-operatório, com formação de crostas calcificadas aderidas à mucosa margeando a linha de sutura. Segundo Gitlin et al, (1999) é comum o aparecimento de cálculos no pós-operatório de cirurgias reconstrutoras da bexiga urinária, devido ao processo inflamatório e muitas vezes pela presença do material de sutura no lúmen da bexiga, em contato direto com a urina. No presente estudo teve-se o cuidado de não incluir a mucosa na sutura, o que sugere ter sido o processo inflamatório o causador da sedimentação.

Todos os animais tiveram ganho de peso durante o período de confinamento, de-

monstrando sua completa adaptação ao novo meio. Decorridos os 180 dias do experimento, os animais foram encaminhados para a adoção, tendo sido todos (fêmeas e machos) castrados para evitar a reprodução.

Três animais morreram durante o período experimental, dos quais dois eram do gênero masculino e um do feminino. Dois apresentaram erlichiose na forma aguda e morreram aos 60 e 82 dias de pós-operatório, respectivamente. O aparecimento da doen-

ça, nestes animais, pode ter sido favorecido pela imunossupressão. O diagnóstico para erlichiose foi estabelecido por meio de exame clínico, hemograma e presença do parasito em esfregaço sanguíneo.

O terceiro caso de óbito foi devido à rejeição do implante e ocorreu 50 dias após a cirurgia. Outro cão também apresentou sinais de rejeição, mas sobreviveu após a retirada do enxerto (fig. 7).

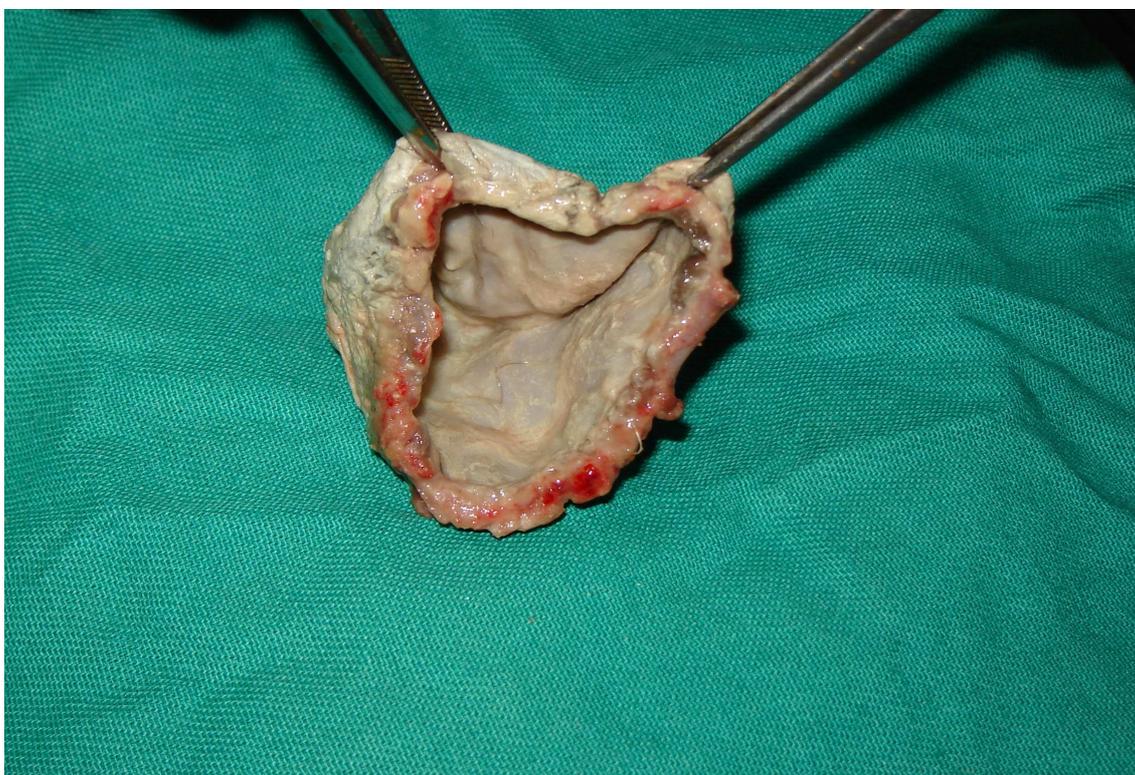


Figura 7 – Aspecto do enxerto rejeitado e retirado cirurgicamente, após 50 dias do transplante parcial de bexiga, em um cão.

5.2. Procedimento cirúrgico

A abordagem cirúrgica permitiu exposição adequada da bexiga com visualização direta do trígono vesical, tanto nas fêmeas quanto nos machos. Nos machos, a presença do prepúcio próximo à incisão, exigiu maior cuidado com a assepsia, o que foi conseguido com a colocação de compressas junto

aos afastadores. Os afastadores autoestáticos foram especialmente úteis devido à pressão que os mesmos exerceram na parede muscular, o que ampliou o acesso cirúrgico.

A colocação dos fios de reparo próximo ao local de incisão da bexiga facilitou a tração e sustentação do coto após a incisão, como

sugerido por Stone et al., (1996). A ligadura das artérias vesicais caudais antes da incisão na bexiga minimizou a hemorragia e, ao final da sutura não se observava mais sangramento. Apesar disso, a maioria dos animais apresentou hematúria nos primeiros cinco dias de pós-operatório, o que comprova que vasos, como a artéria vesical cranial, continuaram sangrando. Segundo Lobato, (1998) a bexiga recebe suprimento sanguíneo pelas artérias vesicais craniais (ramos da artéria umbilical) e caudais (ramos da artéria urogenital).

Durante a sutura do enxerto foram necessários dois pontos iniciais de sutura, próximo às artérias vesicais caudais, para manter o enxerto em posição adequada e facilitar a orientação anatômica. Apesar da opção por uma sutura em única camada, ocorreu extravasamento pela sutura, em apenas quatro animais durante a repleção imediata com

solução salina, os quais foram contidos com o emprego de pontos isolados simples. Estes resultados diferem dos de Liebermann-Meffert, (2000), que afirmou ser essencial dupla sutura do enxerto e o uso do omento maior em cirurgias reconstrutoras da bexiga para minimizar vazamentos imediatos. Para Stone et al., (1996) a dupla camada de sutura proporciona maior resistência, embora diminua o lúmen da bexiga. Apesar de não ter se fixado o omento sobre a linha de sutura do enxerto, todos os animais apresentaram aderência do omento à bexiga aos 60 dias de pós-operatório (fig. 8). Estes achados decorreram do processo inflamatório na região do implante e do tropismo natural do omento pelos focos inflamatórios. Sutherland et al., (1996) observaram a aderência de vários órgãos abdominais, quando testaram matriz acelular em bexiga de ratos.

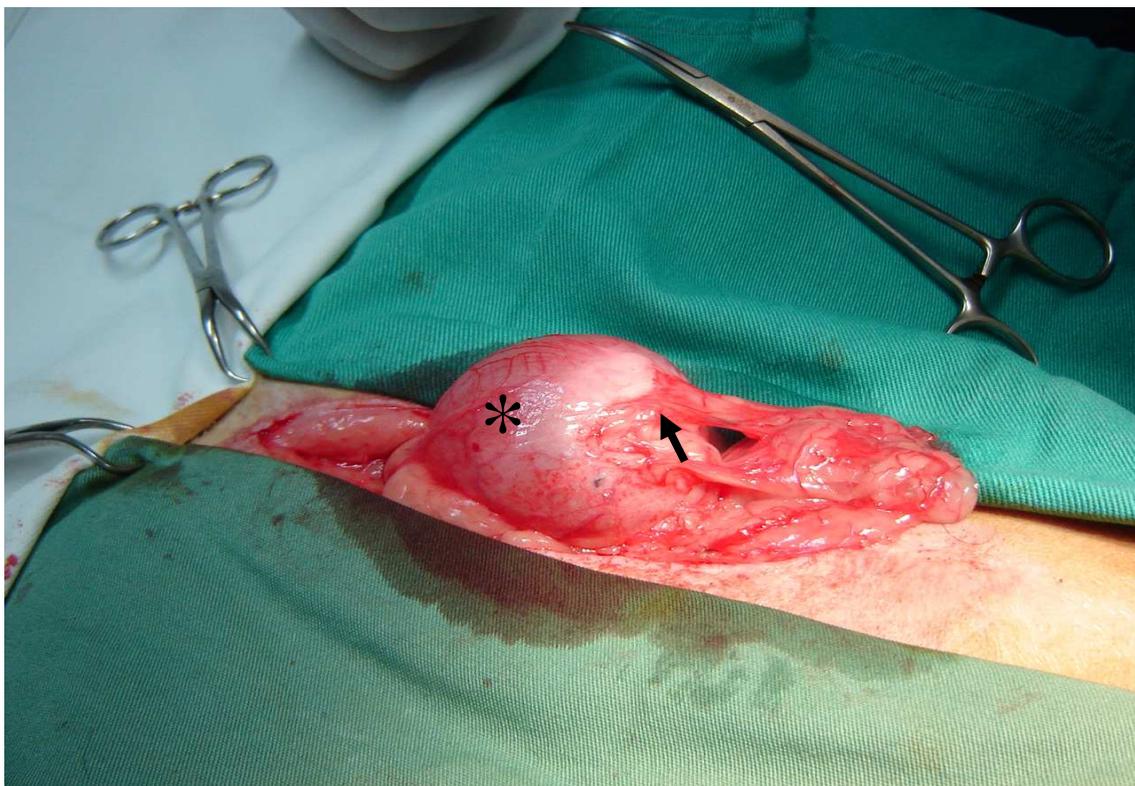


Figura 8 – Bexiga de cão transplantada, aos 60 dias de pós-operatório. Observar aderência do omento no enxerto (seta) e aspecto macroscópico da mesma (asterisco).

O fio utilizado, poliglecrapone 25, foi de fácil manuseio e apresentou resistência satisfatória, tendo em vista não ter havido rupturas durante e após as suturas. Devido à sua característica monofilamentar, o mesmo deslizou livremente no tecido vesical, o que facilitou a confecção de uma sutura com tensão constante. Notou-se, porém, que o fio possui “memória”, o que exige uma quantidade maior de seminós para evitar que o nó se desfaça. O fio poliglecrapone 25 é considerado por Schauffert et al., (2000) o ideal para suturas da bexiga, pois apresenta tensão de nó adequada, é monofilamentar e não estimula a formação de cálculos.

A fixação da sonda de Foley com o balonete e sutura, foi eficiente nas fêmeas, mas os machos mostraram desconforto constante e dois animais conseguiram retirar a sonda, mesmo com a utilização do colar elizabetano. Apesar disso, não houve extravasamento da urina na cavidade abdominal destes animais. Segundo Smith et al., (1995) a sonda de Foley permite uma via patente para a eliminação da urina e pode ser útil também em pacientes obstruídos por neoplasia vesical.

Todos os animais tiveram evolução satisfatória da cicatrização da ferida cirúrgica, tendo sido retirados os pontos no oitavo dia de pós-operatório.

Um cão foi submetido a uma segunda cirurgia aos 48 dias, pois um fragmento desprendido da mucosa vesical do enxerto obliterou a uretra, causando retenção urinária. Após a retirada cirúrgica do material, o mesmo voltou a urinar normalmente. Os cães do gênero masculino são conhecidos pela facilidade em desenvolver quadro obstrutivo devido à anatomia da uretra, que sofre estreitamento na base do osso peniano (Nelson e Couto, 2001). No momento da cirurgia deste animal, observou-se espessamento das paredes do órgão e aderência

do omento ao mesmo. Uma cadela expulsou a mucosa necrosada do implante durante a micção, porém nenhuma das fêmeas apresentou desconforto proveniente de obstrução (fig. 9). As fêmeas têm menor probabilidade de obstrução que os machos por possuírem a uretra mais curta e larga.



Figura 9 – Aspecto da mucosa necrosada do enxerto, expelida por uma cadela, 50 dias após transplante parcial de bexiga a fresco.

Durante o procedimento cirúrgico para retirada de fragmento para avaliação histológica aos 60 dias, confirmou-se a presença de material livre no lúmen da bexiga ou parcialmente aderido à mucosa da mesma, em quatro animais (fig. 10). O exame histopatológico revelou tratar-se do urotélio desprendido do enxerto. Esta alteração pode ter sido proveniente da vascularização insuficiente. Baiotto, (2001) observou a mesma alteração quando utilizou cólon descendente autólogo na reconstrução da bexiga em cadelas e considerou ser decorrente da necrose parcial do enxerto.

Segundo Fries et al., (1991) e Rigaud e Norman, (2004) as anastomoses do trígono vesical, estão sujeitas, ainda, a outras complicações como as fístulas, urolitíases, ausência de dilatação, contração do enxerto, neoplasias, produção de muco e problemas metabólicos provenientes da absorção pelo tecido implantado.



Figura 10 Aspecto interno da bexiga de cão transplantada, aos 60 dias de pós-operatório, durante cistotomia para realização de biópsia. Observação de processo de necrose da mucosa do implante e migração de urotélio sob a mesma (seta).

Houve crescimento celular da bexiga remanescente invadindo o tecido enxertado, mostrando que o implante atuou como substrato para a migração do tecido vesical. Resultados semelhantes foram obtidos por Teixeira, (2002). Kambic et al., (1992) em estudos com pericárdio bovino na reconstrução da vesícula urinária de dez cães, também observaram que o enxerto proporcionou um reservatório estrutural para a urina, serviu como base para a reepitelização e permitiu o aumento da capacidade volumétrica à medida que foi substituído. Estes achados reforçam a idéia de que os materiais utilizados nas cistoplastias de aumento devem ser capazes de permitir que o tecido receptor regenere como um tecido funcional, com todas as suas características morfológicas (Sutherland et al., 1996; Elbahnasy et al., 1998). No entanto, nas técnicas de anastomose ao trígono vesical, citadas por Salle et al., (1990) e Pereira et al.,

(2002), não ocorre migração do tecido vesical para o implante, o que favorece o aparecimento de complicações pelo contato contínuo da urina com o epitélio do enxerto. Nikula et al., (1989) acreditaram ser este contato o responsável pelo aparecimento de neoplasias vesicais em pacientes submetidos a enterocistoplastias.

Piser et al., (1987) relataram em modelo experimental a absorção transmural de íons pelo segmento gástrico e intestinal após anastomose ao trígono vesical. As diferenças histológicas e funcionais entre o tecido implantado e a bexiga são consideradas como as causas principais das complicações das enterocistoplastias e gastrocistoplastias (Loran et al., 1999). Segundo Lima, (1995) as complicações com as cirurgias de anastomose ao trígono vesical variam de 3 a 44%.

5.3. Aspectos clínicos

5.3.1. Avaliação clínica no pós-operatório

Durante todo o pós-operatório, 16 animais (80%) apresentaram normotermia, mucosas normocoradas e ausência de alteração nos linfonodos palpáveis. Quatro animais (20%) tiveram complicações como rejeição (2) e erlichiose canina (2) e três deles vieram a óbito.

Todos os cães do experimento apresentaram hematúria e polaciúria nos primeiros dias de pós-operatório, as quais regrediram totalmente aos cinco e 30 dias respectivamente. A polaciúria é um sinal clínico encontrado nas afecções vesicais inflamatórias, e seu desaparecimento significa melhora do quadro inflamatório (Nelson e Couto, 2001).

Em experimentos semelhantes para cistoplastia de aumento, tem-se optado por realizar defeitos menores na bexiga, retirando 30 a 35% do tecido vesical, para evitar o comprometimento do órgão pela contração do implante. No presente trabalho a remoção de 70 a 80% da bexiga mostrou-se factível do ponto de vista da recuperação cirúrgica, pois a capacidade de repleção e de contração foram mantidas após o transplante. As capacidades de repleção e de contração vesical foram confirmadas por meio da ultra-sonografia (USG) abdominal, com a mensuração do volume da bexiga antes e após a micção. Isso comprova a teoria de que a manutenção do trígono vesical evita danos à inervação autonômica do colo da bexiga, a qual é responsável pelo mecanismo de continência (Lane, 2003; Silverman e Long, 2000), pela sensação de distensão e capacidade de esvaziamento vesical (Costello et al., 2000). Após a retirada da sonda no oitavo dia de pós-operatório, como recomendado por Stone et al., (1996), todos os animais já apresentavam capacidade de continência urinária e micção espontânea. Este resultado é importante para evitar

complicações como a incontinência urinária e infecções, que são muito comuns nos animais portadores de bexiga neurogênica (Hoelzler e Liedbetter, 2004).

Três machos apresentaram estrangúria e disúria causados pela obstrução parcial da uretra, após 45 dias da cirurgia. O fato decorreu do desprendimento da mucosa do enxerto, que pode ter sido proveniente da necrose isquêmica. Baiotto, (2001) observou a mesma alteração quando utilizou cólon descendente autólogo na reconstrução da bexiga em cadelas e considerou ser decorrente da necrose parcial do enxerto. Em contrapartida, a retirada prévia da mucosa pode predispor a processo inflamatório mais acentuado e diminuição do tecido intestinal enxertado, como citado por Kocum et al., (1999).

5.4. Aspectos imunológicos

5.4.1. Toxicidade do imunossupressor

Episódios de vômitos, hematoemese e perda de apetite ocorreram em três cães na primeira semana de pós-operatório, porém, com a terapia sintomática com antieméticos e protetores de mucosas, houve remissão dos sinais. Não houve, portanto, a necessidade de descontinuar a terapia imunossupressora. Outros problemas abdominais comuns em pacientes sob imunossupressão, como intussuscepção, diarreia recorrente e megaesôfago não foram observados no estudo (Vicenti et al., 2002). Isto comprova que a dosagem utilizada foi bem tolerada pelos animais, embora dois deles tenham adquirido erlichiose durante o pós-operatório. Yamataka et al. (2000) também obtiveram êxito quando utilizaram tacrolimus na imunossupressão de ratos submetidos a transplante de bexiga.

Os agentes imunossupressores são conhecidos como potencialmente tóxicos, chegando alguns, a predispor os pacientes ao câncer (Kahan, et al, 2003; Pascual, 2003). As alte-

rações provocadas por estes fármacos vão desde distúrbios digestivos até sinais de comprometimento neurológico. As nefropatias merecem atenção especial, pois a ciclosporina A pode causar vasoconstrição das arteríolas pré-glomerulares levando à hipoperfusão glomerular (Morris, 1995).

Todos os cães apresentaram aumento significativo de creatinina sérica durante o tempo de administração da ciclosporina, conforme já foi descrito na literatura (Pirch et al., 1997; Jiang et al., 1999). Este aumento nos parâmetros bioquímicos renais foi temporário, tendo os mesmos voltado à normalidade após o encerramento da terapia imunossupressora.

Um cão apresentou eritema na região abdominal ventral com regressão deste sinal sem terapia específica, mas infecções bacterianas localizadas (piodermites) não ocorreram durante o pós-operatório. No presente estudo não ocorreram alterações neurológicas, como desequilíbrio, excitação ou convulsões, em nenhum dos animais. Alterações neurológicas são comuns em humanos, quando submetidos à imunossupressão pela ciclosporina A (Morris, 1995). A alternativa de utilizar Tacrolimus (FK506) em substituição à ciclosporina A pode minimizar os efeitos colaterais, tendo em vista ser esta droga 10 a 100 vezes mais potente e menos tóxica que a ciclosporina (Vicenti e Kirkiman, 1998). Manobra útil para aumentar a tolerância do receptor aos alantígenos do doador é a infusão prévia de medula óssea do doador (Mathew et al., 2003). O mecanismo desta ação não é ainda conhecido, mas pode permitir a diminuição da dosagem dos imunossupressores.

Dois cães apresentaram infecção por *Erllichia canis*, diagnosticada em esfregaço sanguíneo aos 55 e 62 dias após a cirurgia e foram tratados com doxiciclina oral (10mg/kg/dia). Ambos vieram a óbito com alterações significativas em todos os parâmetros hematológicos analisados. A infec-

ção provavelmente, ocorreu em virtude do efeito imunossupressor acentuado nestes animais.

5.4.2. Rejeição ao transplante

Dois animais (10%) mostraram sinais característicos de rejeição aguda ao implante, entre 35 e 50 dias de pós-operatório. Um cão morreu aos 50 dias de pós-operatório e o outro teve seu implante retirado 52 dias após a cirurgia. Este último apresentou polaciúria e incontinência urinária permanente, com volume vesical claramente diminuído e aumento na pressão intravesical. O mesmo desenvolveu hidronefrose e insuficiência renal, mas se recuperou e passou a ter uma vida clinicamente normal.

No período da rejeição, ambos apresentaram hematuria recorrente, polaciúria-disúria, febre, anemia, anorexia e caquexia. No exame histológico da interface do tecido transplantado-receptor destes animais, foi observado infiltrado inflamatório mononuclear linfoplasmocitário difuso, bem como áreas de necrose na mucosa e na camada muscular. Segundo Topa, (2004) estes achados histopatológicos são comuns nos casos de rejeição aguda.

Para Teixeira e Rezende, (2004) um transplante pode estimular os vários mecanismos de imunidade celular e humoral, específicos e não-específicos. A rejeição aguda está associada à resposta imunomediada de células T do receptor contra o enxerto, mas a rejeição não deve ser vista apenas como um fenômeno reacional imediato, mas como um processo gradual (Tizard, 2002; Toppa, 2004). Para Mathews et al., (1994) a destruição tecidual associada com a rejeição do transplante decorre da ação de macrófagos ativados e células T citotóxicas.

Nos dois animais que apresentaram rejeição observou-se leucocitose acentuada, mas apenas o cão que veio a óbito teve linfocitose associada. O aumento sanguíneo de

linfócitos é proporcional ao grau de rejeição aos implantes. O exame bioquímico e a urinalise destes animais mostraram alterações significativamente maiores que os exames dos demais cães.

O processo de rejeição ocorrido nos dois cães do experimento demonstrou que os protocolos de teste de compatibilidade e de imunossupressão precisam de mais estudos. A este fato, soma-se a observação histológica de reação imune na maioria dos animais do estudo, caracterizado por presença de infiltrado inflamatório mononuclear linfomacrofágico, como citado por Toppa, (2004).

Tais achados sugerem a necessidade de imunossupressão por tempo mais longo que trinta dias. A consideração de controlar as concentrações sanguíneas de ciclosporina e associá-la a outros fármacos imunossupressores, como indicado por Vicenti et al., (2002), pode também ser útil no controle da rejeição.

No presente estudo não foi realizado teste para determinar a compatibilidade sanguínea linfocitária em cães (DLA), a qual é importante na seleção dos possíveis doadores (Pereira, 2004). Estudos específicos para determinar a presença dos complexos de histocompatibilidade principal (HCM) na vesícula urinária dos cães precisam ser ainda realizados.

A possibilidade futura de utilização da engenharia de tecidos para reconstrução do tecido vesical, como citado por Oberpening et al., (1999) e Hou et al., (2006), eliminaria as complicações ora causadas pela rejeição aos alo-antígenos. Recentemente Atala et al., (2006) relataram sucesso na confecção de bexiga para um humano a partir de células do próprio paciente.

5.5. Exames laboratoriais no pós-operatório

5.5.1. Hemogramas

Os eritogramas da maioria dos animais (80%) apresentaram alterações discretas durante o tempo de observação (180 dias). A contagem total de hemácias e o hematócrito mantiveram-se constantes e dentro dos níveis fisiológicos para a espécie, em 16 animais do experimento, nos quais não houve intercorrências após a cirurgia. Em quatro cães, que tiveram complicações no pós-operatório, observaram-se alterações significativas nos índices hematimétricos. As tabelas 1 e 2 apresentam as médias e desvio padrão dos valores das hemácias e hematócrito dos 16 animais sem intercorrências após a cirurgia. Os Gráficos 1 e 2 apresentam a variação dos valores individuais de hemácia e hematócrito dos animais com intercorrências após a cirurgia (linhas coloridas) e a variação da média dos animais sem intercorrências (linha cheia preta)

Tabela 1. Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos da contagem total das hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$), dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.

Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
0	5,5	0,4	5,1	5,4	6,4
7	5,6	0,3	5,2	5,6	6,4
15	5,1	0,5	4,8	4,9	6,5
22	5,6	0,4	5,0	5,5	6,4
30	5,8	0,3	5,1	6,0	6,3
45	5,7	0,3	5,2	5,7	6,5
60	5,5	0,4	4,4	5,6	6,1
75	5,4	0,4	4,8	5,3	6,2
90	5,0	0,4	4,4	4,7	5,8
105	5,0	0,5	4,4	5,0	6,0
120	6,0	0,6	5,0	6,0	6,8
135	5,8	0,6	4,4	6,0	6,7
150	6,1	0,5	5,3	6,0	6,7
165	5,5	0,4	5,2	5,2	6,4
180	6,0	0,5	5,3	6,0	6,8

Gráfico 1. Variação dos valores individuais de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.

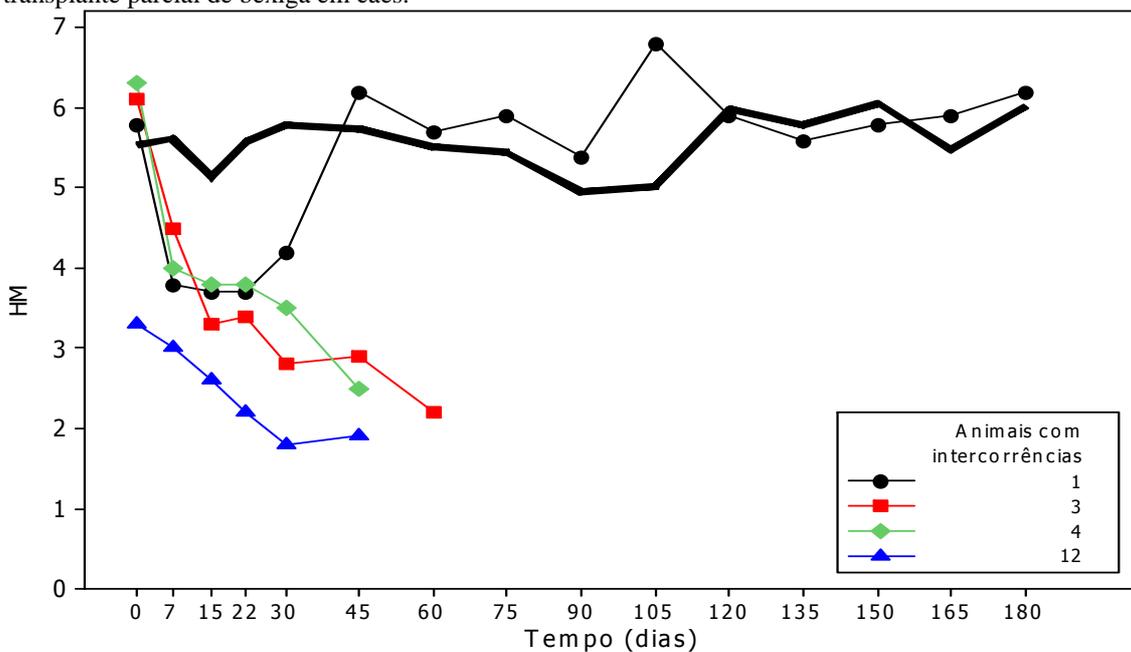
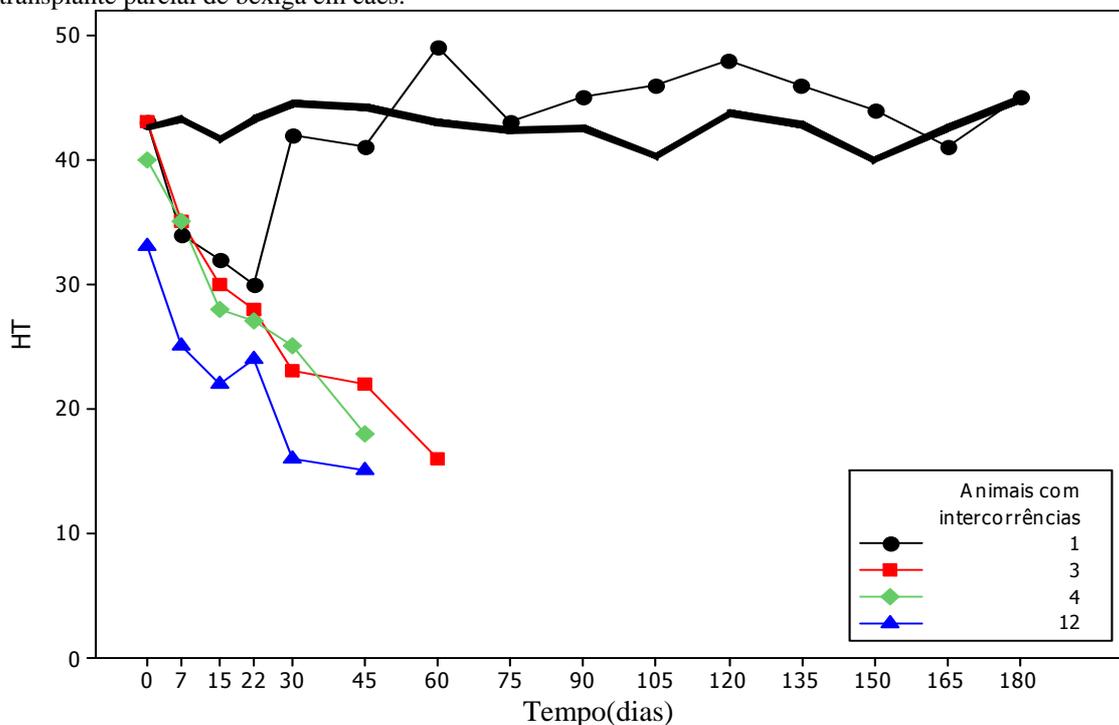


Tabela 2. Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos do hematócrito (%) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.

Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
0	42,6	2,2	39,0	42,5	46,0
7	43,2	2,3	39,0	44,0	46,0
15	41,6	3,0	32,0	42,0	44,0
22	43,2	2,0	40,0	44,0	47,0
30	44,4	1,9	41,0	44,0	48,0
45	44,2	3,2	39,0	43,5	49,0
60	43,0	2,9	36,0	44,5	46,0
75	42,4	2,3	40,0	42,0	46,0
90	42,5	3,2	36,0	43,0	48,0
105	40,3	2,9	36,0	40,5	47,0
120	43,7	2,5	40,0	45,0	46,0
135	42,8	2,4	36,0	43,0	46,0
150	39,9	10,5	4,0	42,0	46,0
165	42,4	2,3	40,0	42,0	47,0
180	44,8	2,8	41,0	45,0	49,0

Gráfico 2. Variação dos valores individuais do hematócrito (%) dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia), após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.



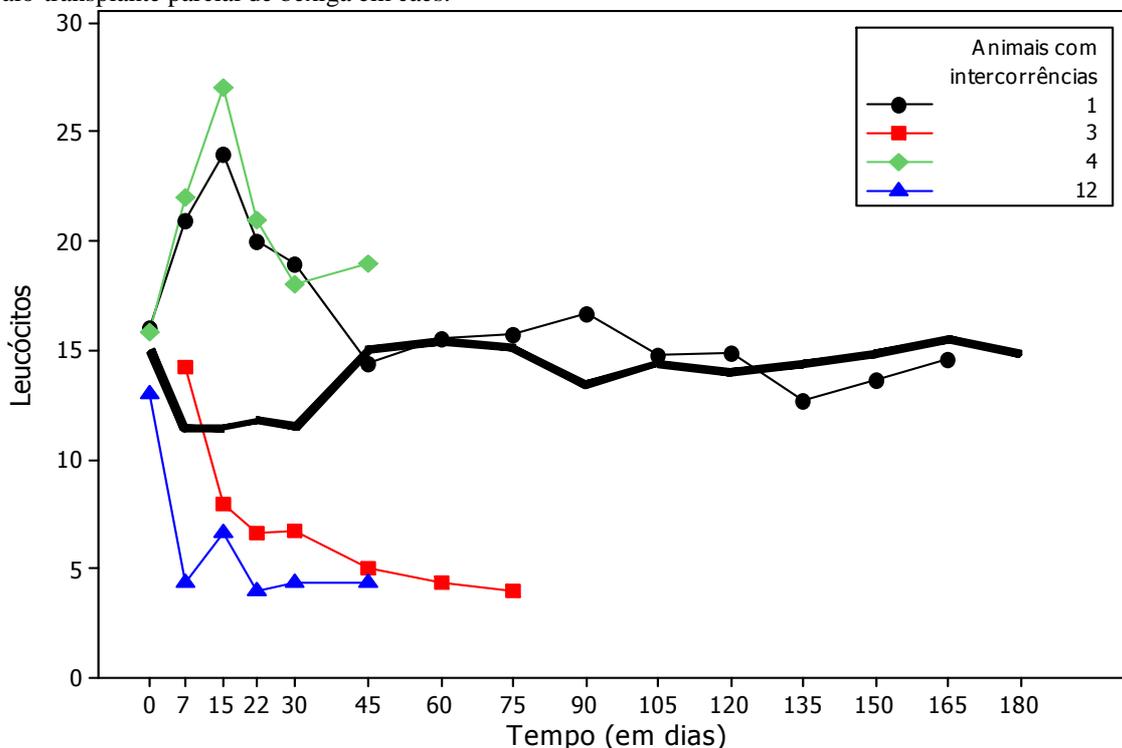
Os leucócitos totais, linfócitos, monócitos e plaquetas dos 16 animais sem intercorrência após a cirurgia, apresentaram comportamento semelhante. Nestes animais, ocorreu diminuição absoluta dos leucócitos durante a imunossupressão, porém se manteve dentro de níveis fisiológicos. A diminuição dos leucócitos totais foi reflexo da linfopenia relativa e absoluta que todos os animais mostraram durante o tempo de imunossupressão. Segundo Kahan et al., (2003) a ciclosporina é uma droga imunossupressora capaz de diminuir a produção de linfócitos pelo bloqueio dos mesmos durante a fase

G0 ou G1 do ciclo celular. Após o término da imunossupressão, aos trinta dias de pós-operatório, houve um retorno gradual aos níveis leucocitários considerados normais para a espécie (tabelas e gráficos 3, 4, 5 e 6). Os resultados do teste t de Student para amostras pareadas mostram que a média dos leucócitos aos 30 dias foi significativamente menor que no momento inicial ($p = 0,011$) e final ($p = 0,006$). Entretanto, a diferença das médias entre os momentos inicial e final não foi estatisticamente significativa ($p = 0,762$).

Tabela 3. Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos dos leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{l}$) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.

Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
0	15,0	1,7	12,0	15,2	17,6
7	11,4	4,6	4,4	13,2	16,6
15	11,5	4,6	5,3	14,0	16,9
22	11,8	4,1	5,4	14,1	15,6
30	11,5	4,2	4,8	12,9	16,0
45	15,0	0,9	12,5	15,5	16,0
60	15,4	1,2	13,0	15,5	16,7
75	15,1	1,4	12,4	15,9	16,7
90	13,4	2,0	11,3	13,0	17,5
105	14,4	1,2	11,9	14,3	15,9
120	13,9	1,2	11,8	14,3	16,0
135	14,4	1,3	11,8	14,2	16,9
150	14,9	1,1	12,9	14,9	17,0
165	15,5	1,0	12,5	16,0	16,0
180	14,8	1,2	13,0	14,2	17,0

Gráfico 3. Variação dos valores individuais dos leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{l}$), dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.



A tabela 4 apresenta as médias e desvio padrão dos valores dos linfócitos dos 16 animais sem intercorrências após a cirurgia. Os resultados do teste t de Student para amostras pareadas mostram que a média dos linfócitos aos 30 dias foi significativamente menor que no momento inicial ($p < 0,001$) e final ($p < 0,001$). Entretanto, a diferença de médias entre os momentos inicial e final não foi estatisticamente significativa ($p = 0,794$).

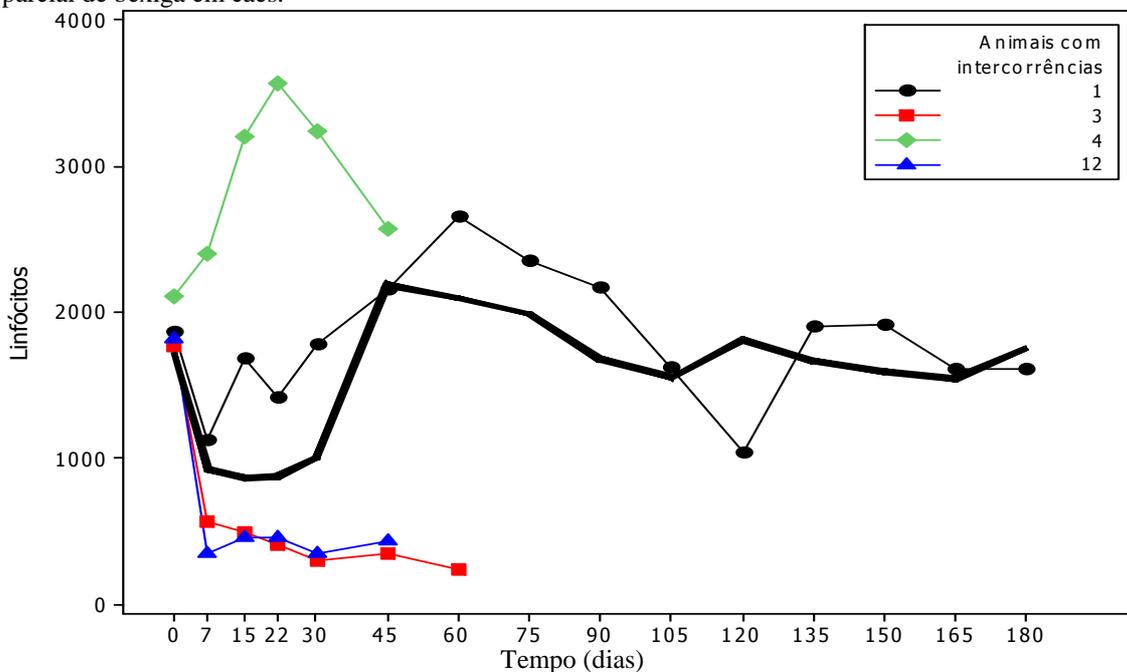
O gráfico 4 mostra a variação dos valores

individuais de linfócitos dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e a variação da média dos animais sem intercorrências (linha cheia preta). Observa-se ainda, neste gráfico, que um animal (linha verde com losangos) apresentou aumento dos linfócitos durante o período de imunossupressão. Este comportamento provavelmente ocorreu em consequência do processo de rejeição aguda, pois os linfócitos T são considerados os principais agentes desencadeantes deste fenômeno (Tizard, 2002 ; Pereira, 2004).

Tabela 4. Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos dos linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.

Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
0	1,71	0,25	1,09	1,73	2,14
7	0,92	0,24	0,58	0,87	1,54
15	0,86	0,12	0,74	0,84	1,23
22	0,87	0,22	0,64	0,82	1,67
30	1,02	0,34	0,70	0,85	1,84
45	2,19	0,48	1,04	2,20	2,71
60	2,09	0,29	1,27	2,17	2,60
75	1,98	0,29	1,33	2,03	2,50
90	1,67	0,25	1,27	1,64	2,10
105	1,55	0,28	1,27	1,51	2,35
120	1,81	0,24	1,50	1,78	2,48
135	1,66	0,21	1,27	1,66	2,00
150	1,59	0,22	1,32	1,50	2,05
165	1,54	0,94	0,22	2,02	2,56
180	1,75	0,50	1,42	1,42	2,65

Gráfico 4. Variação dos valores individuais dos linfócitos dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.



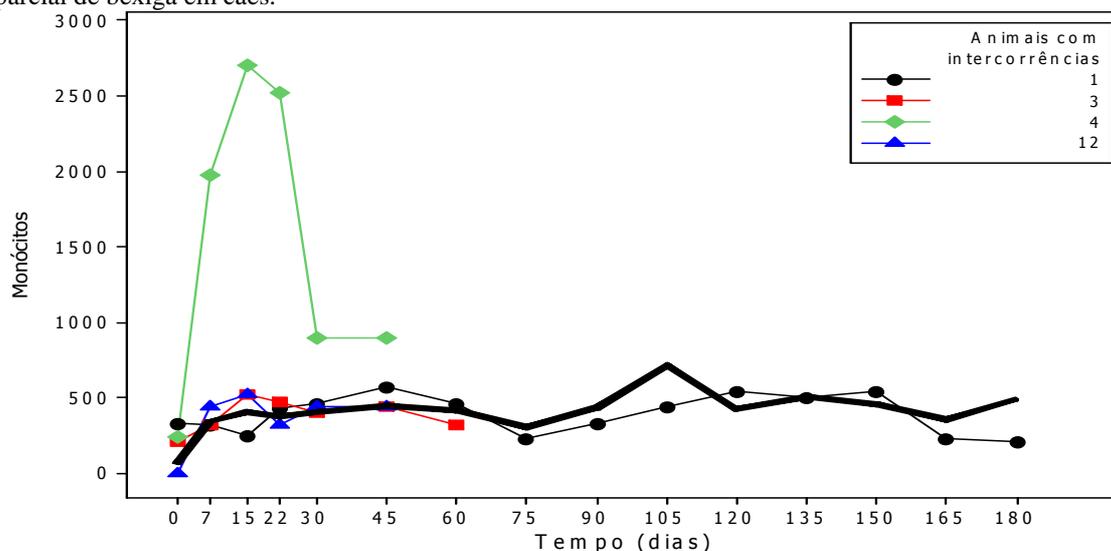
A tabela 5 apresenta as médias e desvios padrões dos valores dos monócitos dos 16 animais sem intercorrências. O gráfico 5 mostra a variação dos valores individuais dos monócitos dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e a variação da

média dos animais sem intercorrências (linha cheia preta). Neste gráfico, pode-se observar o aumento exacerbado dos monócitos, provavelmente provocado pela reação de rejeição.

Tabela 5. Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos dos monócitos dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.

Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
0	62,6	74,2	0,0	15,0	213,0
7	343,6	139,6	134,0	292,0	666,0
15	411,8	210,7	216,0	276,0	765,0
22	381,0	187,2	134,0	292,0	666,0
30	412,3	336,8	134,0	258,0	1500,0
45	444,6	122,2	260,0	468,0	756,0
60	414,7	156,2	260,0	334,0	765,0
75	308,1	202,3	112,0	242,0	666,0
90	438,4	141,8	123,0	471,0	700,0
105	715,0	410,0	165,0	593,0	1278,0
120	426,0	126,8	123,0	443,0	725,0
135	510,2	209,0	112,0	524,0	869,0
150	457,9	163,0	265,0	438,5	725,0
165	356,2	172,5	112,0	312,0	666,0
180	492,8	135,3	260,0	468,0	714,0

Gráfico 5. Variação dos valores individuais dos monócitos dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.



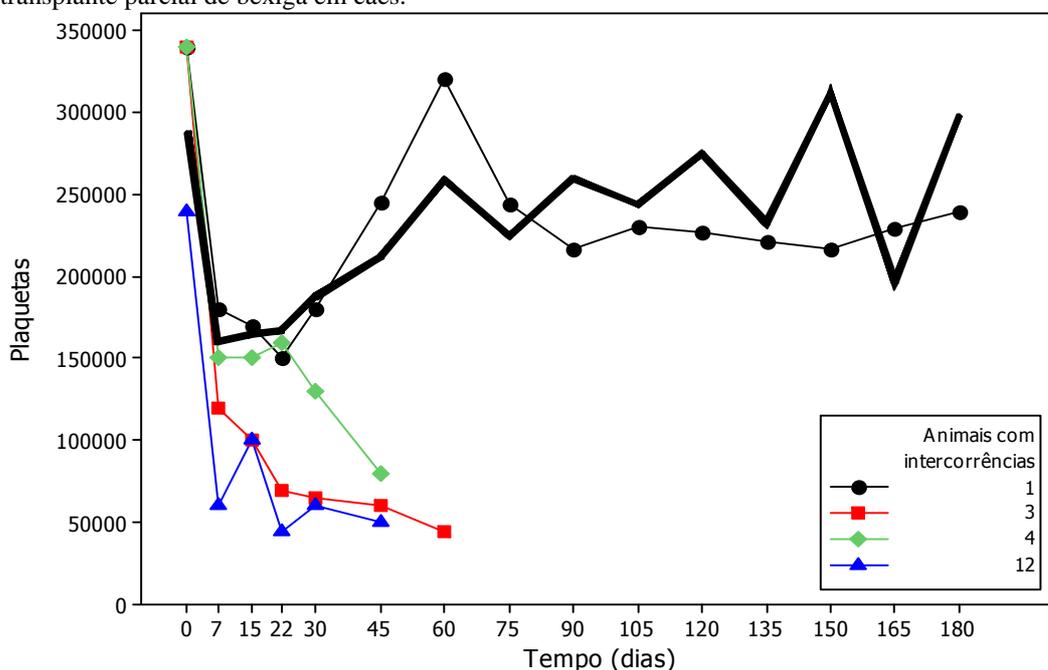
Os valores das plaquetas permaneceu abaixo do limite mínimo durante o período de imunossupressão e retornou à sua normalidade após o término do mesmo. Segundo Lasmar e Lasmar, (2003) a ciclosporina, dentre outros imunossupressores, causa trombocitopenia por inibir a atividade da medula óssea. A tabela 6 mostra as médias e desvio padrão dos valores das plaquetas dos 16 animais sem intercorrências. Os resultados do teste t de Student para amostras pareadas mostram

que a média das plaquetas aos 30 dias foi significativamente menor que momento inicial ($p < 0,001$) e final ($p < 0,001$). Entretanto, a diferença das médias entre os momentos inicial e final não foi estatisticamente significativa ($p = 0,494$). O gráfico 6 mostra a variação dos valores individuais de plaquetas dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e a variação da média dos animais sem intercorrências (linha cheia preta).

Tabela 6. Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos das plaquetas (/mL) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.

Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
0	288063	41094	230000	280000	355000
7	160563	36520	60000	158000	221000
15	164313	22393	130000	160000	221000
22	167375	27058	130000	158000	224000
30	187750	26195	140000	185000	224000
45	212375	23830	179000	213500	258000
60	259188	36402	217000	261500	326000
75	224313	47616	145000	234000	330000
90	259688	37171	210000	257000	330000
105	244000	24612	190000	244500	280000
120	275000	46583	230000	270000	355000
135	232438	39122	179000	220000	330000
150	312125	58010	223000	310000	465000
165	196438	52998	140000	190000	310000
180	298500	30380	230000	310000	320000

Gráfico 6. Variação dos valores individuais dos plaquetas (/mL) dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.



Dois cães tiveram graves alterações hematológicas mesmo durante o período de imunossupressão no pós-operatório. Estes animais apresentaram quadro clínico de rejeição ao transplante, tendo um deles morrido aos 50 dias de pós-operatório em decorrência da rejeição. O outro cão sobreviveu, porém teve seu implante retirado aos 52 dias de pós-operatório. Estes animais apresentaram leucocitose total, linfocitose e monocitose relativa e absoluta, trombocitopenia e anemia progressiva (gráficos de 1 a 6). A recuperação do quadro hematológico do animal sobrevivente, após a retirada do implante, comprovou que a causa das alterações observadas neste animal foram decorrentes do processo de rejeição. Tais achados são característicos da rejeição aguda, como citado por Toppa, (2004).

O processo de rejeição ao transplante demonstra que o teste de compatibilidade por meio da reação cruzada não foi suficiente para evitar a rejeição aguda em dois ani-

mais. Este achado sugere a necessidade de estudos mais aprofundados dos complexos de histocompatibilidade maior (HCM) da bexiga. Pode-se, ainda, conjecturar a falha na imunossupressão como fator coadjuvante no aparecimento da rejeição, levando-se em conta que o tempo resumido de imunossupressão possa ter favorecido esse processo.

Dois cães tiveram erlichiose diagnosticada em esfregaço sanguíneo e vieram a óbito aos 60 e 82 dias, respectivamente. Estes cães apresentaram pancitopenia e aplasia medular não responsiva a tratamento clínico, como citado por Codner et al., (1986) (gráficos 1 a 6). Suspeita-se que o aparecimento da erlichiose na forma aguda e grave destes animais tenha sido influenciado pela imunossupressão instituída no pós-operatório, já que todos os animais eram negativos para hematozoários antes da cirurgia.

5.5.2. Perfil Bioquímico

Durante a administração da ciclosporina, todos os animais tiveram aumento das concentrações de uréia e creatinina sérica. A tabela 7 mostra as médias e desvio padrão dos valores da creatinina dos 16 animais sem intercorrências após a cirurgia. Os resultados do teste t de Student para amostras pareadas mostram que a média da creatinina aos 30 dias foi significativamente maior que nos momentos iniciais. ($p < 0,001$) e final ($p < 0,001$). Também, a diferença de médias entre os momentos inicial e final foi estatisticamente significativa ($p = 0,003$). O gráfico 7 mostra a variação dos valores individuais dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e a variação da média dos animais sem intercorrências (linha cheia preta). A tabela 8 apresenta as médias e desvios padrões dos valores da uréia dos 16 animais sem intercorrências. Os resultados do teste t de Student para amostras pareadas mostram que a média da uréia aos 30 dias foi significativamente maior que nos momentos iniciais ($p < 0,001$) e final ($p = 0,004$). O gráfico 8 mostra a variação dos valores individuais da uréia dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e a variação da média dos animais sem intercorrências (linha cheia preta). Entretanto, a diferença de médias entre os momentos inicial e final não foi estatisticamente significativa ($p = 0,053$). Essa alteração reforça a informação de que a ciclosporina A é um imunossupressor nefrotóxico e pode alterar substancialmente o perfil renal dos pacientes (Morris, 1995; Pirch et al., 1997; Jiang e Kobayashi, 1999). Os achados bioquímicos sugerem que as alterações ocorridas nas concentrações plasmáticas de creatinina e uréia foram provocadas pela imunossupressão, pois todos os animais sobreviventes mantiveram níveis fisiológicos das mesmas após o encerramento da terapia imunossupressora.

O retorno das concentrações plasmáticas de uréia e creatinina à normalidade sugerem

que o transplante de bexiga permitiu o desenvolvimento de um reservatório de baixa pressão, mantendo o mecanismo das válvulas ureterovesicais patentes, as quais protegem os rins de refluxo e infecção ascendente, impedindo que haja comprometimento da função renal, conforme observado por Costello et al., (2000). Segundo Ueno et al., (2001) outra vantagem desse procedimento é a manutenção da continência urinária pela preservação da função motora do trigono.

Embora alguns (3) caninos machos tenham mostrado episódios de obstrução pela mucosa desprendida do implante, não houve diferença significativa entre machos e fêmeas com relação aos níveis de uréia e creatinina séricas. Essa observação demonstra que a intensidade e tempo de ocorrência das obstruções não foram suficientes para provocar alteração na válvula vesico-ureteral e o retorno da urina à pelve renal.

O perfil bioquímico renal de quatro animais apresentou variação significativa, quando comparado aos demais (gráficos 7 e 8). Estes animais foram acometidos de erlichiose (2) e rejeição (2). O cão que teve o implante retirado aos 52 dias de pós-operatório, devido à rejeição, apresentou as maiores alterações, com um pico máximo de 12 mg/dl de creatinina e 125 mg/dl de uréia 21 dias após a cirurgia. As concentrações plasmáticas de uréia e creatinina deste animal decresceram gradativamente após a retirada do implante e atingiram a normalidade 180 dias após a cirurgia. Neste animal, ocorreu dilatação ureteral e hidronefrose, com recuperação clínica aos 4 meses de pós-operatório. Mesmo após sua recuperação clínica, este cão permaneceu com azotemia, polaciúria e cistite recorrente devido às pequenas dimensões de sua bexiga. Gucer e Ozkardis, (1992), também, observaram aumento acentuado nas concentrações séricas de creatinina e uréia em cães com bexigas pequenas após utilização de vesícula biliar para reconstrução das mesmas.

Tabela 7. Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos da creatinina sérica (mg/dl) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.

Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
0	0,6	0,1	0,6	0,6	0,8
7	2,2	0,6	1,2	2,3	3,3
15	2,4	0,6	1,2	2,4	3,5
22	2,5	0,7	1,5	2,5	4,5
30	2,3	0,6	1,5	2,3	3,7
45	2,0	0,5	1,3	1,8	3,2
60	1,7	0,8	0,7	1,5	3,4
75	1,4	0,5	0,7	1,3	2,2
90	1,4	0,5	0,6	1,3	2,5
105	1,1	0,3	0,6	1,2	1,5
120	1,0	0,3	0,7	0,9	1,6
135	0,9	0,3	0,5	0,8	1,7
150	0,8	0,3	0,6	0,7	1,3
165	0,8	0,2	0,5	0,8	1,2
180	0,8	0,1	0,6	0,8	1,1

Gráfico 7. Variação dos valores individuais da creatinina sérica (mg/dl) dos animais com intercorrências após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia).

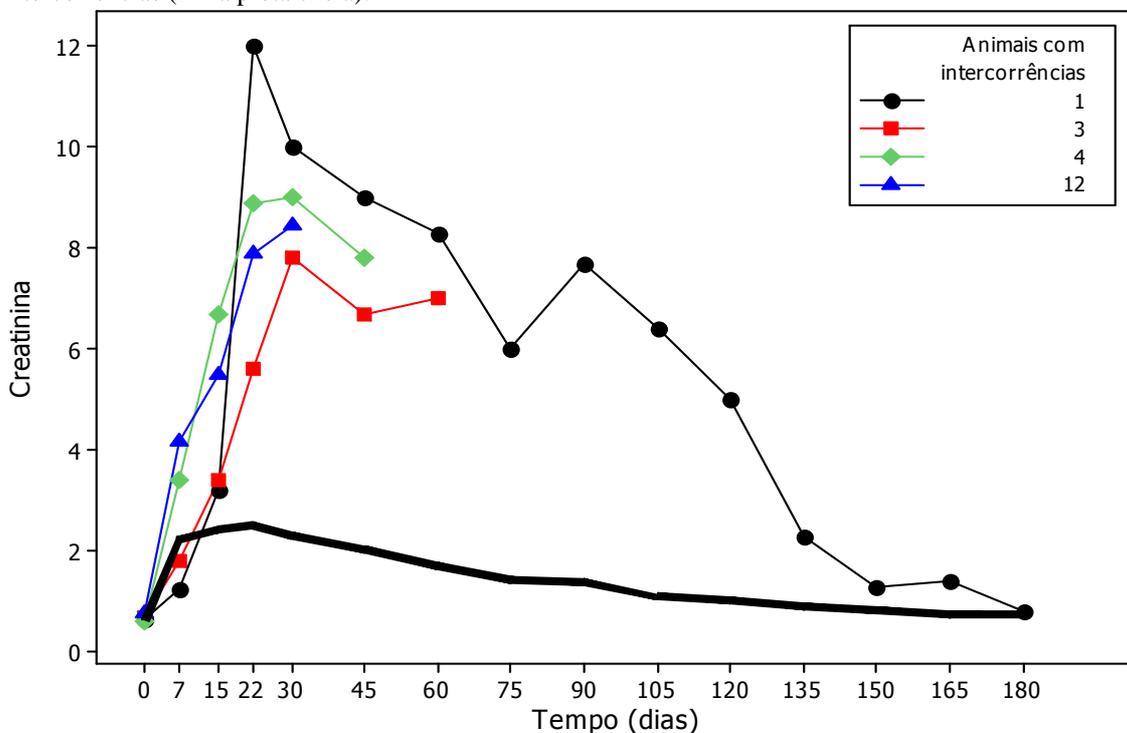
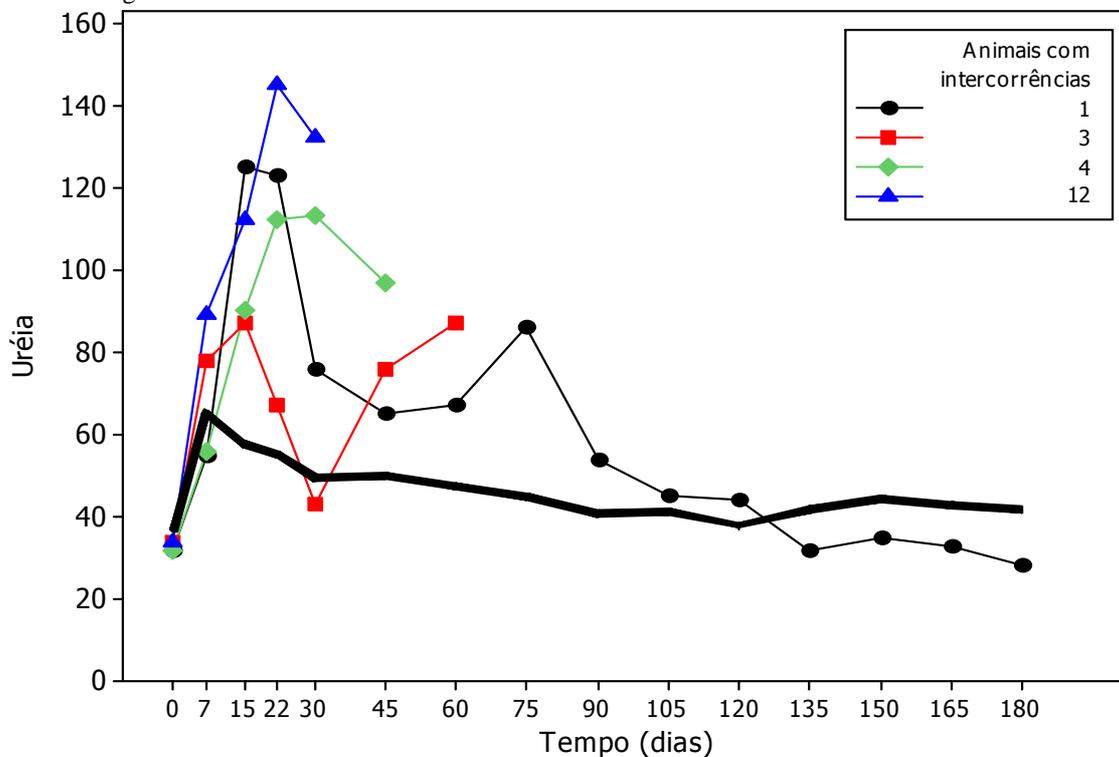


Tabela 8. Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos da uréia (mg/dl) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.

Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
0	36,5	6,3	23,0	37,0	45,0
7	64,9	17,5	43,0	63,0	98,0
15	57,5	18,3	9,0	55,0	87,0
22	55,3	11,1	40,0	57,5	78,0
30	49,4	8,8	36,0	47,5	67,0
45	50,1	14,7	34,0	45,0	89,0
60	47,4	15,3	32,0	43,0	86,0
75	45,0	12,0	28,0	43,0	78,0
90	40,9	6,9	31,0	40,5	54,0
105	41,4	5,6	30,0	42,5	52,0
120	37,9	4,9	30,0	39,0	45,0
135	41,8	8,0	32,0	40,5	65,0
150	44,4	8,5	30,0	43,0	65,0
165	42,6	8,1	32,0	41,0	59,0
180	41,8	6,8	32,0	41,0	56,0

Gráfico 8. Variação dos valores individuais uréia (mg/dl) dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.



5.5.3. Urinálise

Onze cães (55%) mostraram cristais de cálcio na urina nas primeiras três semanas, embora apenas quatro deles tenham desenvolvido litíase, macroscopicamente visível durante as cirurgias para biópsia. Segundo Kropp et al., (1999) a litíase vesical é um achado comum quando se faz a reconstrução da bexiga e cristalúria com presença de depósito de sais podem ocorrer precocemente após cirurgias reparadoras da bexiga (Kockum et al., 1999). Para Cubillana et al., (1998) o pH urinário alcalino, a infecção recorrente e o resíduo pós-miccional, assim como, o contato da urina com o material de sutura podem ser os fatores mais importantes na etiologia da litíase vesical pós-cirúrgica.

Todos os cães apresentaram hematória e polaciúria no pós-operatório, as quais regressaram totalmente aos cinco e 30 dias, respectivamente. A hematória e polaciúria são comuns no pós-operatório imediato de cirurgias da bexiga urinária (Oliveira et al, 1999). Para Nelson e Couto, (2001) a polaciúria é um sinal clínico encontrado nas afecções vesicais inflamatórias, onde há hiperatividade da musculatura detrusora.

Os quatro cães (20%) que apresentaram complicações no pós-operatório, tiveram maiores alterações na urinálise, a qual foi proporcional ao grau de comprometimento sistêmico. Além da hematória e proteinúria, observou-se presença de células epiteliais e cilindros granulosos na urina destes animais. Segundo Meyer et al, (1995) a presença de cilindros granulosos é indicativo de lesão renal avançada e sugere prognóstico reservado.

5.6. Volume da bexiga

Houve decréscimo acentuado (aproximadamente 50%) do volume vesical no primeiro exame, aos sete dias, em todos os animais operados, a partir de quando se iniciou uma curva de aumento gradativo. O retorno ao volume inicial ocorreu por volta do 120º dia após a cirurgia (fig. 11). A tabela 9 apresenta as médias e desvio padrão do volume vesical dos 16 animais sem intercorrências. O gráfico 9 mostra a variação dos valores individuais do volume vesical dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e a variação da média dos animais sem intercorrências (linha cheia preta).

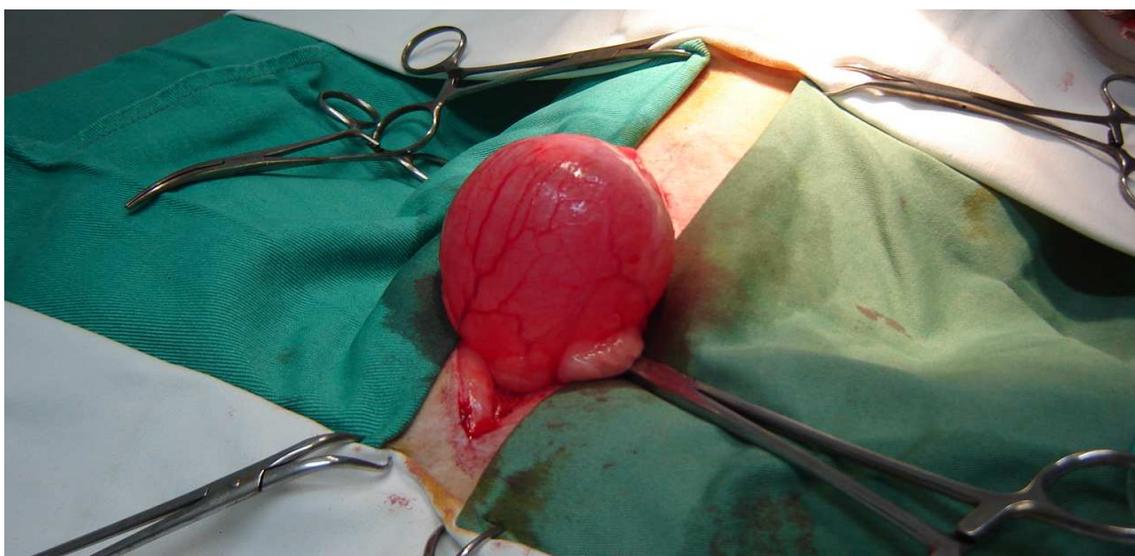
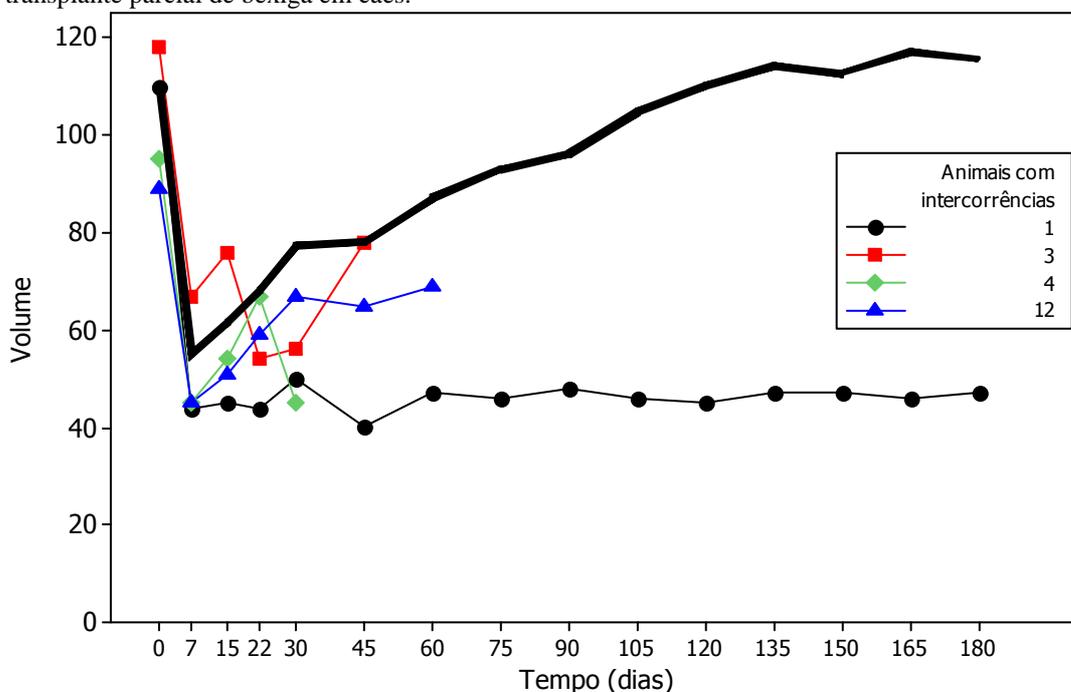


Figura 11 – Aspecto da bexiga transplantada, aos 120 dias de pós-operatório, durante a cirurgia para retirada de material para avaliação histopatológica

Tabela 9. Médias, medianas, desvio padrão e valores mínimos e máximos do volume da bexiga (mL) dos 16 animais sem intercorrências, após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.

Tempo (dias)	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
0	109,8	12,8	90,0	106,5	132,0
7	54,9	10,6	34,0	55,0	67,0
15	61,6	10,6	45,0	64,0	76,0
22	68,1	11,3	54,0	66,0	89,0
30	77,3	9,3	59,0	76,0	90,0
45	78,0	12,0	58,0	79,0	96,0
60	87,0	12,4	55,0	87,0	103,0
75	93,1	14,6	70,0	87,5	120,0
90	96,1	16,2	74,0	91,5	121,0
105	104,8	15,3	67,0	107,0	127,0
120	109,9	12,2	87,0	111,0	132,0
135	114,2	12,6	91,0	113,5	133,0
150	112,8	13,0	90,0	112,5	134,0
165	117,1	12,9	90,0	117,0	135,0
180	115,6	13,4	90,0	119,0	134,0

Gráfico 9. Variação dos valores individuais do volume da bexiga (mL) dos animais com intercorrências (linhas coloridas) e da média dos animais sem intercorrências (linha preta cheia) após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães.



O processo de estabilização do volume no 135º dia de pós-operatório demonstrou que a bexiga de todos os animais atingiu sua capacidade máxima de crescimento neste tempo. Em alguns animais o volume final da bexiga foi maior que o inicial. Este resultado mostra que ocorreu regeneração suficiente para devolver a capacidade de armazenamento da vesícula urinária. Piechota et al., (1995) e Crandis et al., (1998) preconizaram que as cirurgias reconstrutivas da vesícula urinária devem promover um reservatório de baixa pressão, com capacidade de continência, micção espontânea e baixo resíduo pós-micção. O padrão de aumento do volume vesical está de acordo com os achados histológicos, nos quais se observou um processo contínuo de crescimento tecidual em todas as camadas da bexiga nos tempos estudados.

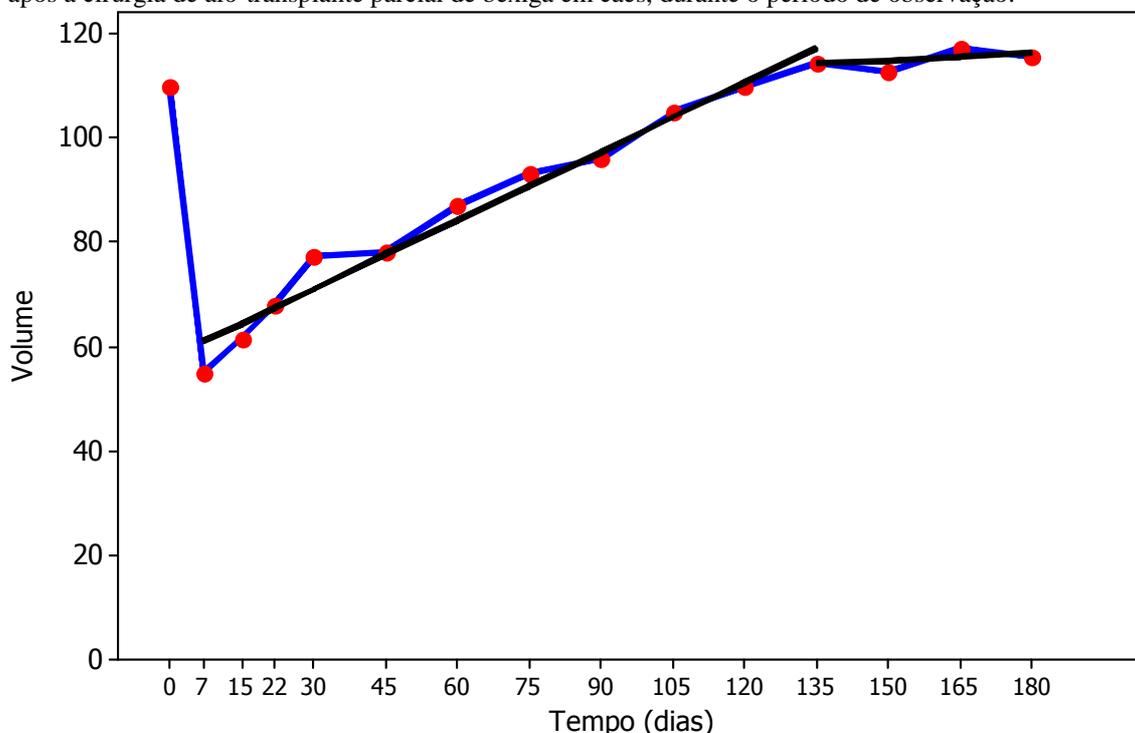
O aumento da capacidade volumétrica se-

guiu uma tendência consistentemente crescente desde o sétimo ao centésimo trigésimo quinto dia de observação. A partir deste momento, até o final do estudo, permaneceu estável (gráfico 10). O comportamento do volume médio entre o dia 7 e o dia 135 foi avaliado pela seguinte equação de regressão linear:

$$\text{Volume (médio)} = 60,9 + 0,44(\text{Tempo} - 7), 7\text{dias} \leq \text{Tempo} \leq 135 \text{ dias}$$

De acordo com essa equação, no período compreendido entre o sétimo e o centésimo trigésimo quinto dia de observação, a taxa de variação diária do volume foi igual a 0,44mL, como pode ser observado no gráfico 10 (representado pela linha preta longa) e, após isso, houve a estabilização do volume (linha preta curta). Essa taxa foi significativamente diferente de zero ($p < 0,001$).

Gráfico 10. Variação dos valores médios do volume da bexiga (mL) dos 16 animais sem intercorrências após a cirurgia de alo-transplante parcial de bexiga em cães, durante o período de observação.



No presente estudo, o volume máximo e residual das bexigas voltou aos níveis fisiológicos no período estudado (gráfico 10). Estes resultados são semelhantes aos citados por Kropp et al., (1996) após o emprego de membrana aniônica em bexiga de cães da raça Beagle e por Lai et al., (2005) em experimento com coelhos.

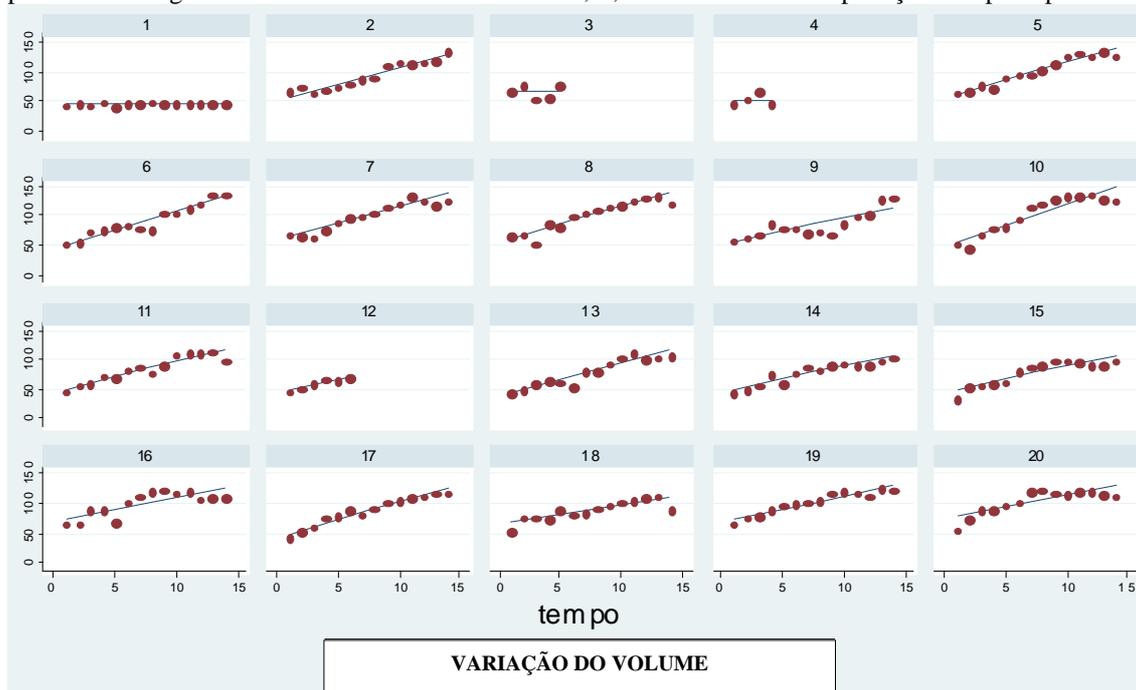
Neste experimento, embora não tenha havido grupo controle, o animal que teve seu implante retirado por rejeição manteve o volume da bexiga baixo até o final do período experimental (gráfico 9).

Isso sugere que, nos 16 animais sem complicações no pós-operatório, não ocorreu dilatação da bexiga e sim um aumento real da mesma, pelo crescimento gradual do seu tecido.

A curva de crescimento do volume da bexiga teve um padrão semelhante entre todos os animais do experimento, exceto nos quatro que tiveram complicações. Este comportamento padronizado indica que apesar de ter havido diferença clínica e histológica entre machos e fêmeas, onde os machos tiveram episódios obstrutivos e processo inflamatório mais acentuado, não houve alteração no padrão de crescimento do volume vesical entre os gêneros.

O acompanhamento individual do crescimento do volume da bexiga pode ser observado no gráfico 11, o qual demonstra a semelhança entre o padrão de crescimento vesical dos 16 animais sem intercorrência.

Gráfico 11. Variação individual do volume da bexiga (mL) dos 20 cães submetidos ao alo-transplante parcial de bexiga em cães. Os animais de número 1, 3, 4 e 12 tiveram complicações no pós-operatório.



5.7. Avaliação por meio de imagem

5.7.1. Cistografia simples e contrastada

A cistografia com contraste positivo foi mais eficiente que a com contraste negativo, pois permitiu melhor visualização intravesical. Nenhuma das duas técnicas possibilitou identificar a presença de sedimento na bexiga, embora tenham sido visualizadas crostas intravesicais em quatro cães no momento da biópsia para avaliação histológica. Biller, (1990) afirmou ser a USG e não a cistografia o exame de eleição para o diagnóstico de sedimentos e cálculos vesicais. Segundo Cote et al., (2002) e Henry, (2003) os exames radiográficos são eficazes na detecção de irregularidades da parede vesical, na avaliação do posicionamento da bexiga dentro do abdome e para identificar solução de continuidade, pelo extravasamento do contraste. Apesar de ter havido presença de hematuria e infecção urinária em alguns animais no pós-operatório, isto não parece ter ocorrido em decorrência uretrocistografia contrastada como citado por Barsanti, (1998).

A cistografia aos quinze dias de pós-operatório mostrou a bexiga diminuída de tamanho e disforme na região fúndica. As paredes se mostraram espessadas e irregulares, denotando processo inflamatório. Em todos os animais observou-se imagem de maior radiodensidade, cranial à região fúndica da bexiga, compatível com aderência. Durante a cirurgia para retirada de fragmento para a histopatologia aos 60 dias, pôde-se observar que o tecido aderido era o omento. Ocorreu, ainda, a presença de contraste na região de aderência aos 15 dias, demonstrando haver solução de continuidade na linha de sutura, mas não foi observado líquido livre na cavidade abdominal (fig. 12). Isto mostra que o volume extravasado foi contido pelo omento. Cinco machos apresentaram deslocamento caudal da bexiga e dilatação da uretra prostática aos 15 dias. Isto ocorreu, provavelmente devido ao pro-

cesso de obstrução provocada pelo descolamento da mucosa do implante. A maioria dos animais (13) apresentava área de estenose no local da sutura, dando à cúpula vesical um aspecto de divertículo.



Figura 12 – Cistografia contrastada realizada aos 15 dias de pós-operatório após transplante parcial de bexiga em cães, onde se observa o pequeno tamanho da bexiga neste momento e a impregnação do contraste à aderência na região fúndica da mesma (seta).

Aos 30 dias, o volume vesical aumentou significativamente e não mais se observou a estenose no local da sutura. O formato das bexigas, neste momento, se aproximava da normalidade. A causa da estenose temporária pode ter ocorrido pela presença do fio, que foi utilizado em padrão de sutura contínuo, semelhante ao que ocorre quando se faz a anastomose do esôfago (Prado Filho et al., 1999).

No exame aos 120 dias, as bexigas apresentaram formato, volume e paredes dentro da normalidade. A bexiga e suas estruturas adjacentes apresentaram anatomia fisiológica, porém persistia a aderência ao fundo da mesma. Resultados consonantes foram citados por Kropp et al., (1996) e Lepper et al., (2002) quando avaliaram o crescimento da bexiga de cães e coelhos.

5.7.2. Ultra-sonografia (USG)

Os exames de USG foram realizados sem dificuldades e permitiram a visualização satisfatória da bexiga quanto ao seu formato, aspecto da parede e conteúdo vesical. A avaliação do volume por meio da USG, também, foi de fácil execução e não houve diferença significativa quando comparado aos valores obtidos com a mensuração direta do mesmo.

Segundo Gallati et al., (2004) e Essman, (2005) a USG é um método sensível de diagnóstico por imagem para o exame da vesícula urinária e permite a avaliação da anatomia interna e externa do órgão sem o uso de contraste, devido ao seu conteúdo fluídico e a localização superficial.

A infusão do soro durante o exame permitiu uma avaliação adequada da celularidade do conteúdo vesical. A maioria dos animais (15) apresentou sedimento (celularidade) no primeiro exame pós-operatório, o que coincidiu com a hematúria ocorrida neste período. Para Gallati et al., (2004) o exame ultrasonográfico é o de eleição para detecção de sedimento e alterações na parede da bexiga.

Nos primeiros quatro exames ultrasonográficos observou-se um estreitamento no local da sutura, mostrando na região fúndica da bexiga uma imagem de anexo. Isto, provavelmente, se deveu à presença de sutura contínua, pois o fio não permitiu a distensão na interface do implante com a bexiga remanescente. Este achado desapareceu em torno de 45 dias, que corresponde ao tempo de perda de tensão de nó do fio.

Nos exames ultrasonográficos após 45 dias observou-se a formação de uma estrutura ecogênica no lúmen da bexiga na maioria dos animais (17). A mesma tinha aspecto membranoso com movimentação livre na urina e pontos de aderência na mucosa. Alguns animais expeliram espontaneamente a estrutura, mas três machos tiveram episódio

obstrutivo e um deles necessitou de cirurgia para retirar o material da uretra. Após a avaliação histológica, observou-se que se tratava do urotélio do transplante, o qual necrosou e despreendeu-se dentro do lúmen vesical.

A parede da vesícula urinária apresentou, no período de 7 a 21 dias, imagem ultrasonográfica de espessamento, irregularidade na mucosa e maior ecogenicidade, sem, contudo, perder a integridade. Os pontos mais alterados foram a interface e o tecido implantado. As alterações na parede diminuíram gradualmente em intensidade, atingindo a normalidade aos 60 dias de pós-operatório. Estes achados são semelhantes às alterações ultrasonográficas observadas em pacientes com processo inflamatório da vesícula urinária (Vöros, 1993). Nos exames posteriores a 75 dias de pós-operatório, os animais sem intercorrências, apresentaram bexiga com paredes regulares e formato anatômico normal, sendo consideradas normais para a espécie.

Quatro cães apresentaram cálculos vesicais observáveis nos exames ultrasonográficos. Os mesmos foram confirmados e retirados durante a cirurgia para obtenção de fragmento para biópsia, aos 60 dias de pós-operatório, não havendo caso de recidiva até o término do experimento.

Nos quatro animais com complicações, observou-se processo inflamatório acentuado da parede vesical, incapacidade de distensão completa da bexiga e presença de líquido livre na cavidade abdominal. Destes, sobreviveu um cão, um veio a óbito devido à rejeição, e dois em decorrência da erlichiose.

5.8. Avaliação Histopatológica

Devido às diferenças histológicas observadas entre os gêneros nos tempos estudados, optou-se pela descrição dos achados histopatológicos por sexo. Os dois casos de re-

jeição ao implante foram descritos em separado.

5.8.1. Machos – 60 dias

Na avaliação histológica da interface do implante com a bexiga remanescente observou-se, na mucosa, epitélio hiperplásico, sem a presença de células globosas típicas de epitélio polimórfico de transição. Notou-se, também, intensa proliferação fibroblástica (Fig. 13a). Em algumas áreas da mucosa os vasos estavam congestionados, com focos inflamatórios linfoplasmocitários discretos difusos e perivascular (fig. 13b). Na lâmina própria, verificou-se infiltrado inflamatório mononuclear linfoplasmocitário com arranjo vascular típico de tecido de granulação, áreas de hemorragia e depósitos de hemossiderina (Fig. 13c e 13d). Na adventícia da bexiga, visualizou-se a presença de fio encapsulado com áreas adjacentes de fibrose e infiltrado inflamatório (Fig. 13e). Os achados histopatológicos caracterizam processo inicial de rejeição do transplante, o qual provavelmente decorreu da retirada da imunossupressão. Segundo Toppa, (2004) a presença de infiltrado de células mononucleadas como linfócitos e plasmócitos, e da hemorragia na avaliação histopatológica de tecidos transplantados, é típica da rejeição aguda. A persistência da inflamação na linha de sutura sugere que os eventos obstrutivos, ocorridos com os machos, foram determinantes no retardo da reparação tecidual. Entretanto, observaram-se regeneração tecidual parcial na interface do enxerto, caracterizadas por proliferação fibroblástica, angiogênese e surgimento de fibras musculares lisas (Fig. 13f).

Baiotto et al., (2001) em experimento com bexiga conservada em glicerina observaram a ausência de reepitelização da bexiga enxertada aos 60 dias. Os mesmos autores encontraram, ainda, granulomas na linha de sutura e mineralização do tecido, ora sob forma de granulações, ora de placas. Resultados semelhantes foram obtidos por Da-

leck et al., (1992) e Inatomi et al., (1980). No presente estudo optou-se pela utilização do transplante a fresco, realizando apenas, durante 10 minutos, lavagem do implante com solução de ringer lactato resfriada a 5°C, para retirada de resquícios de urina e sangue do doador. Tal procedimento proporcionou melhores resultados quando comparados aos implantes conservados em glicerina, que tiveram maiores complicações como fístulas, formação de crostas, neoplasias e contração do implante (Atala, 2004; Zinni et al., 2004). Isto, provavelmente, ocorreu devido às alterações teciduais provocadas pelo processo de conservação, mesmo considerando a redução da antigenicidade proporcionada pelo mesmo.

Figura 13. Fotomicrografias de alo-enxerto de bexiga de cão 60 dias após o transplante parcial de bexiga.

Figura 13a – Mucosa com epitélio hiperplásico (seta) e lâmina própria de tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório (asterisco). Aumento 100X.

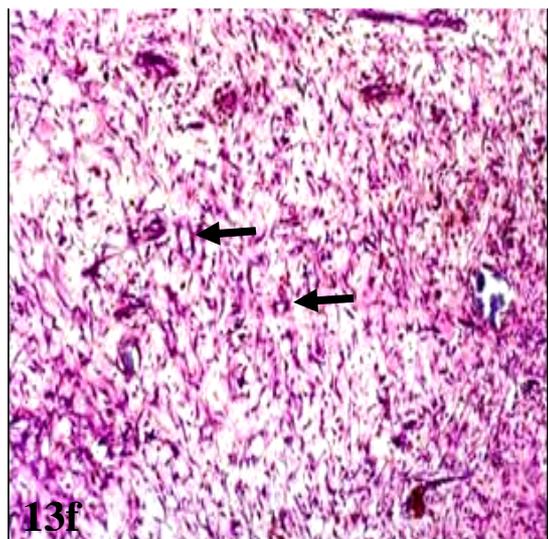
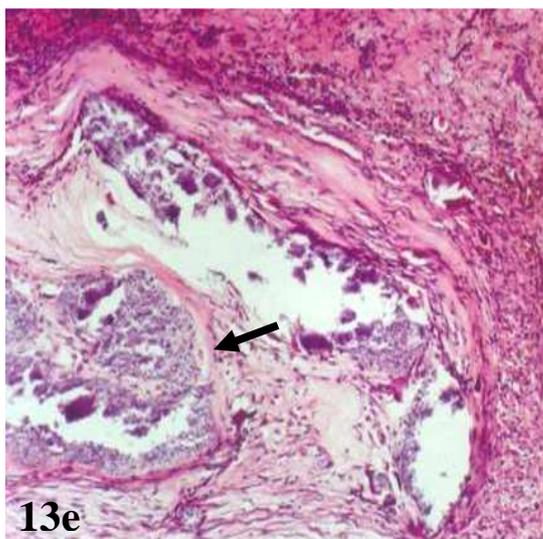
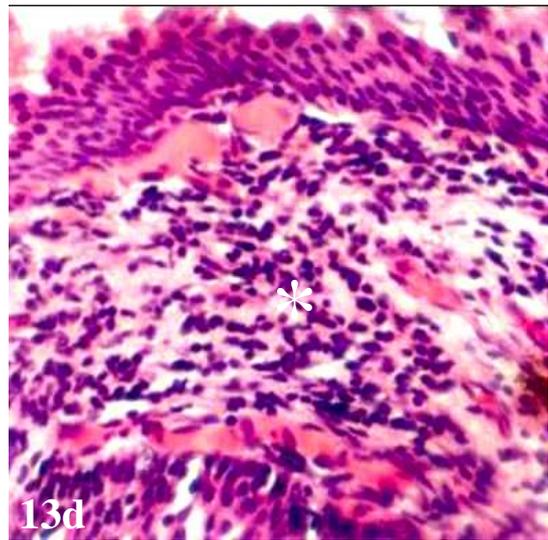
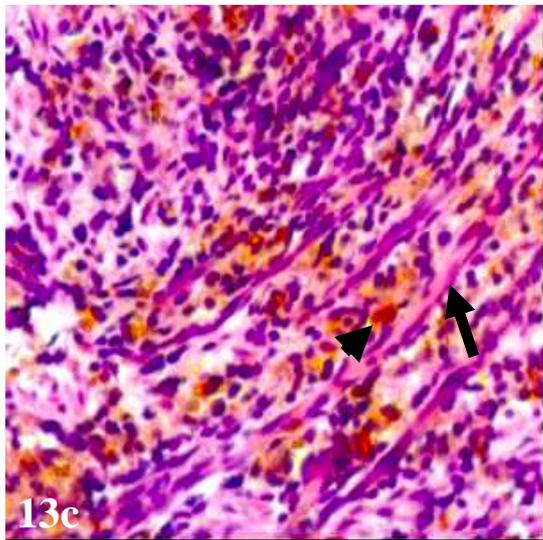
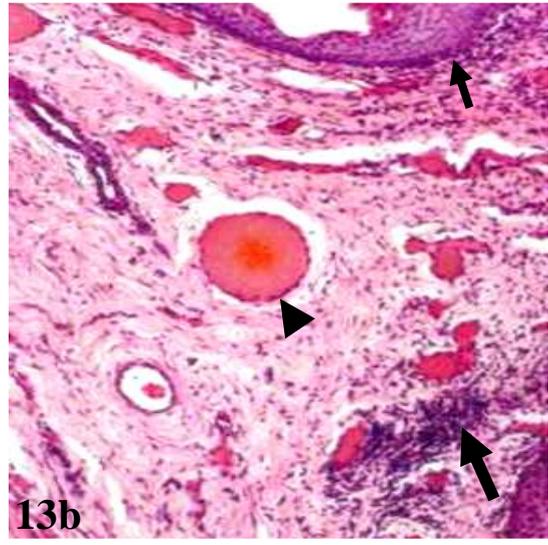
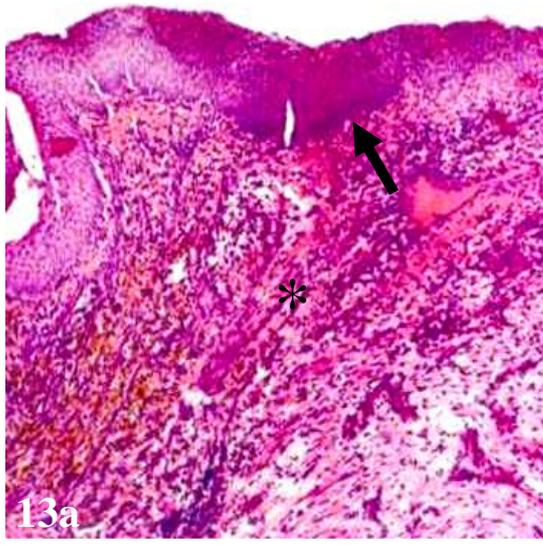
Figura 13b – Mucosa com epitélio hiperplásico (seta), lâmina própria de tecido conjuntivo espessada contendo vasos congestos (cabeça de seta) e discreto foco inflamatório (seta larga). Aumento 100X.

Figura 13c – Detalhe da lâmina própria da figura 1a. Notar presença de vasos (seta) entremeados por infiltrado inflamatório e pigmento de hemossiderina (cabeça de seta). Aumento 400X.

Figura 13d - Detalhe da mucosa com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (asterisco). Aumento 400X.

Figura 13e - Adventícia com presença de fio encapsulado (seta). Aumento 100X.

Figura 13f – Reação fibroblástica e formação de fibras musculares lisas próximo a vasos neoformados (seta). Aumento 100X.



5.8.2. Machos – 120 dias

Verificou-se epitélio de transição com espessamento da lâmina própria contendo vasos remanescentes do tecido de granulação (fig. 14a e 14b). Notou-se, também, presença de infiltrado inflamatório subepitelial moderado constituído por plasmócitos e linfócitos, além da formação de nódulos linfóides (fig. 14a). Na interface do leito receptor com o enxerto, observou-se regeneração no urotélio e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário discreto a moderado na lâmina própria/submucosa. Hiperplasia e hipertrofia muscular (fig. 14c) também foram observadas. Na serosa, visualizou-se espessamento do tecido conjuntivo, contendo infiltrado inflamatório linfoplasmocitário classificado como discreto a moderado na submucosa (fig. 14d). Em um cão, além da semelhança do que foi descrito anteriormente para as três camadas da bexiga, verificou-se, na lâmina própria, processo de metaplasia óssea e presença de células fusiformes semelhantes a miofibroblastos.

No tecido implantado remanescente, o epitélio apresentou áreas de regeneração caracterizadas por estratificação. Na lâmina própria verificou-se espessamento e vasos sanguíneos, sugerindo reparo. Visualizou-se, também, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário de moderado a intenso, com localização subepitelial e perivascular. Agregados linfóides organizados estavam presentes nesta região. As túnicas muscular e serosa possuíam arranjo típico, podendo, desta forma, ser caracterizadas como regeneradas e funcionais.

Apesar da presença de infiltrado linfoplasmocitário moderado na lâmina própria, foi possível observar reestruturação morfológica das camadas da bexiga. Estes achados demonstram que houve regeneração da bexiga no seu aspecto morfofuncional, o que decorreu em função do crescimento do tecido da bexiga remanescente em direção da região fúndica da mesma. O enxerto foi re-

absorvido ao longo do processo de regeneração e houve formação de novo tecido vesical, porém este processo não havia se encerrado aos 120 dias. Magunna, (1999) observou completa reabsorção do material com regeneração total do tecido vesical, quando utilizou membrana acelular em bexiga de um cão acometido de neoplasia vesical.

Os achados histopatológicos da bexiga dos machos mostraram a presença de processo inflamatório crônico e alterações compatíveis com rejeição. Apesar disso e da diferença observada entre os gêneros, houve recuperação da capacidade volumétrica da bexiga e retorno da atividade fisiológica do órgão

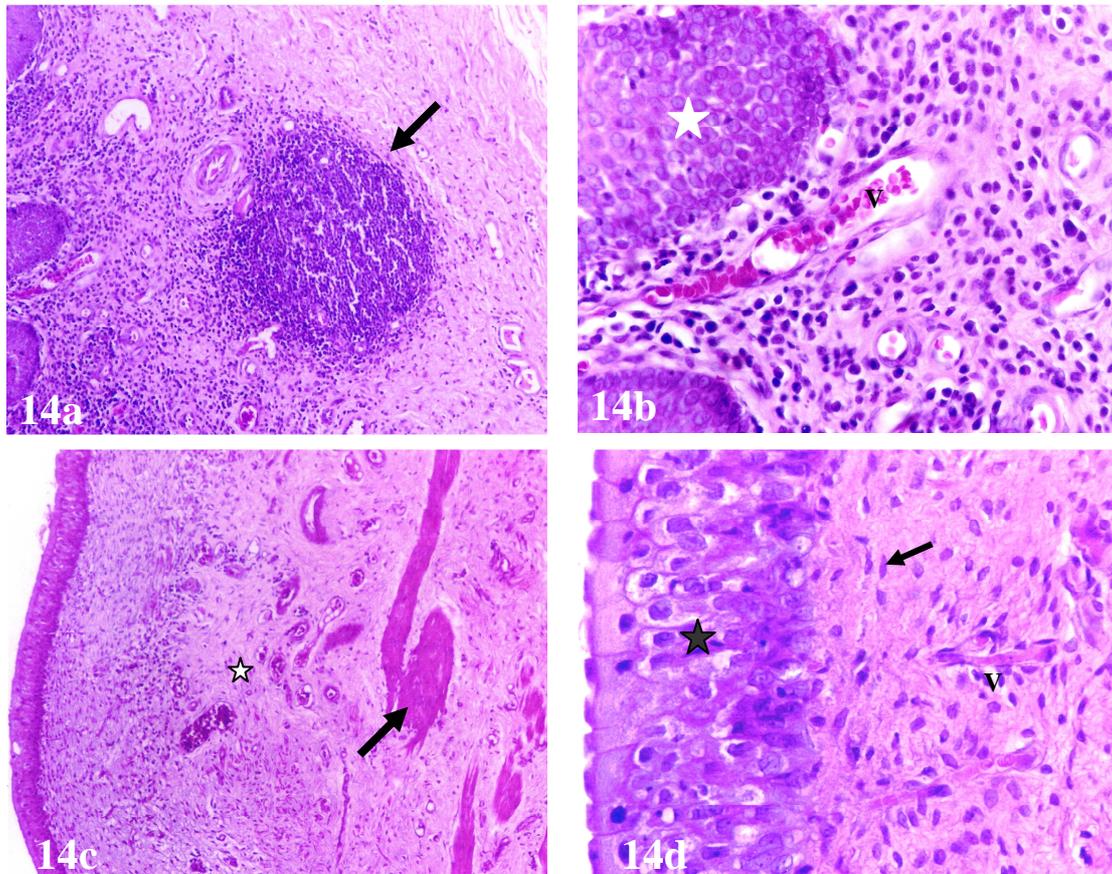


Figura 14- Fotomicrografia de alo-enxerto de bexiga de cão 120 dias após o transplante parcial de bexiga.

Figura 14a – Mucosa contendo vasos congestos, remanescentes do tecido de granulação, e infiltrado linfoplasmocitário intenso bem com formações nodulares linfóides (seta).

Figura 14b– Detalhe da fotomicrografia anterior em maior aumento. Notar projeção de epitélio estratificado para lâmina própria (estrela), vasos congestos (V) e intenso infiltrado linfoplasmocitário em permeio.

Figura 14c – Área de transição entre lâmina própria e túnica muscular. Observar feixes de fibras musculares (seta) e tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório abaixo do urotélio (estrela).

Figura 14d – Detalhe de fotomicrografia anterior onde se observa urotélio típico (estrela), fibroblastos (seta) e vasos remanescente do tecido de granulação em regressão (V).

5.8.3. Fêmeas – 60 dias

Neste tempo observou-se mucosa constituída por epitélio polimórfico de transição, ora caracterizado por estratificação, ora não, e áreas de descontinuidade (fig. 15a) e infiltrado linfoplasmocitário. Na lâmina própria, verificou-se proliferação vascular e fibroblástica típica de tecido de granulação, bem como congestão vascular (fig. 15b). Na camada mais profunda, além da intensa proliferação fibroblástica, algumas destas células possuíam orientação regular sugerindo diferenciação muscular (fig. 15c).

Na túnica muscular, visibilizaram-se feixes contendo de permeio tecido conjuntivo e discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (fig. 15d). Alguns feixes de músculo liso apresentavam vacuolização e necrose. Em áreas mais profundas desta túnica, os feixes eram mais espessos, entretanto o comportamento do tecido conjuntivo foi o mesmo. Nesta região, observou-se formação muscular a partir de células do conjuntivo. A serosa/adventícia do enxerto estava espessada próximo à interface devido à proliferação fibroblástica, e apresentava discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, tecido de granulação e vasos congestos (fig. 15b). Em alguns animais, onde se visualizaram áreas focais de necrose, foram observadas áreas de calcificação distrófica e metaplasia óssea (fig. 15e e 15f).

O processo de regeneração foi mais avançado do que o observado nos machos no mesmo período. Isto pôde ser evidenciado pela menor quantidade de processo inflamatório e presença de epitélio, embora descontínuo, na maior parte da mucosa. Na túnica muscular, verificaram-se extensas áreas com características morfológicas de regeneração, apesar de terem sido encontradas áreas com necrose de feixes musculares. A diferença dos resultados entre os gêneros pode ter decorrido dos eventos obstrutivos nos machos, quando do descolamento da mucosa necrótica do implante. Os proces-

os obstrutivos, ocorridos após o 40º dia de pós-operatório, causaram distensão acentuada da bexiga e conseqüentemente diminuição do aporte sanguíneo e retardamento no processo de reparação tecidual. Estes eventos perduraram até o momento da cirurgia para biópsia, aos 60 dias após a cirurgia.

Houve reepitelização do tecido transplantado nos espécimes examinados no período de 60 dias, porém em alguns pontos observava-se a formação de epitélio com camada única e, em outros, urotélio normal. Esta transformação rápida do tecido epitelial parece ocorrer com o intuito de impermeabilizar o órgão para evitar extravasamento de urina. Isto é compatível com o que ocorre na bexiga sadia, cujo urotélio prolifera muito lentamente, mas quando lesionado, pode acelerar a sua regeneração. Os mecanismos que controlam a reepitelização são desconhecidos. Nos ratos, a alteração na velocidade de reepitelização tem correlação com fatores de crescimento confinados ao urotélio, tal como TGF β_1 (fator de crescimento transformador β_1) (De Bøer et al., 1994).

Figura 15- Fotomicrografia de alo-enxerto de bexiga de cadela 60 dias após o transplante parcial de bexiga.

Figura 15a – Observar o epitélio polimórfico de transição (estrela), lâmina própria com aglomerados linfóides (seta) e vasos congestos. Aumento 100x.

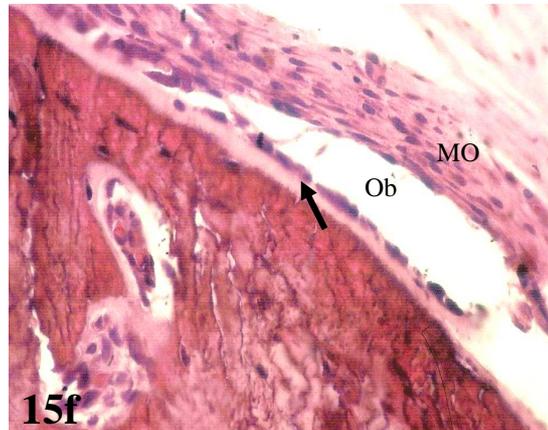
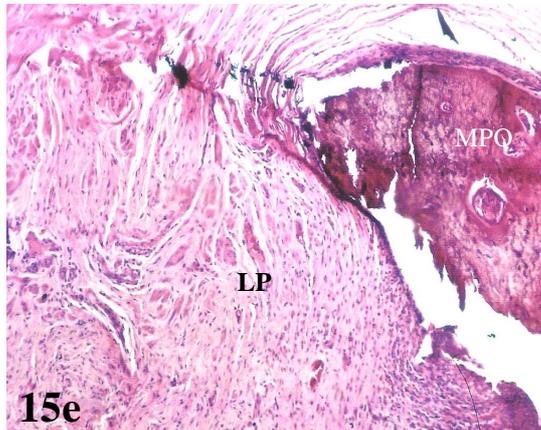
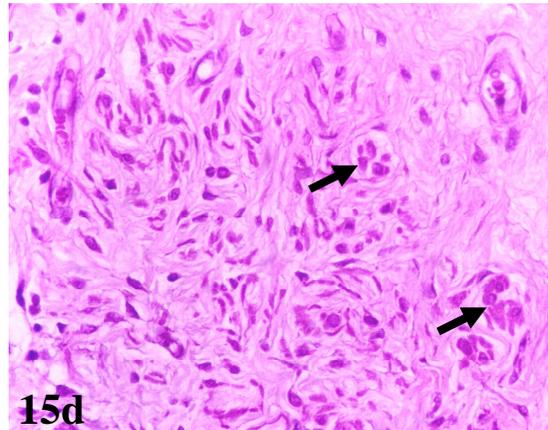
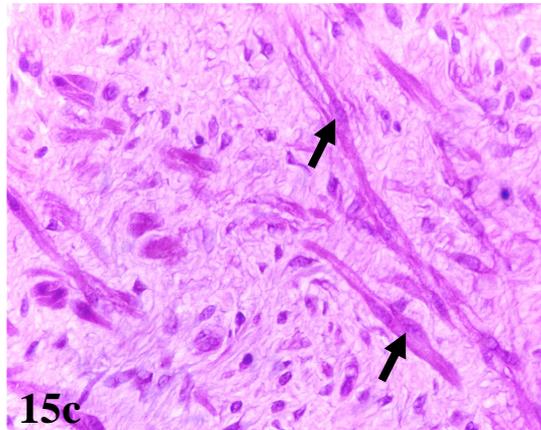
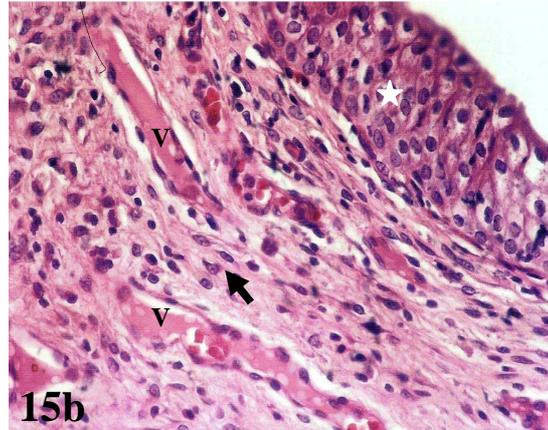
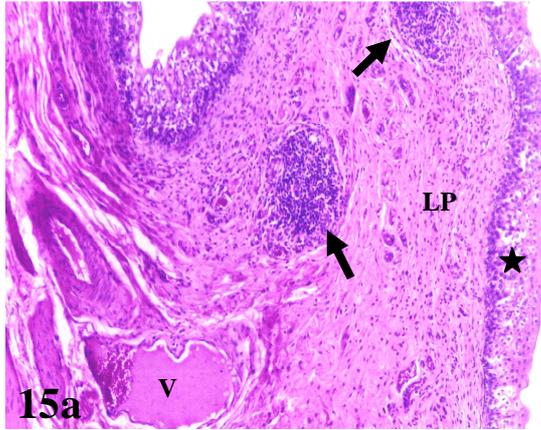
Figura 15b – Observar urotélio (estrela branca). Notar vasos congestos (V) remanescentes do tecido de granulação circundado por fibroblastos (seta) e infiltrado linfoplasmocitário. Aumento 400x.

Figura 15c - Detalhe de fibras musculares lisas (mioblastos) em corte longitudinal (seta) cercada por uma matriz de tecido conjuntivo em camada mais profunda da bexiga. Aumento 400x.

Figura 15d - Detalhe de fibras musculares lisas (mioblastos) em corte transversal (seta) cercada por uma matriz de tecido conjuntivo em camada mais profunda da bexiga. Aumento 400x.

Figura 15e – Lâmina própria da bexiga (LP). Notar presença de metaplasia óssea (MPO). Aumento 100x.

Figura 15f – Detalhe da metaplasia óssea. Observar membrana osteogênica (MO), osteoblastos ativos apoiados sobre matriz óssea jovem (seta branca). Aumento 400x.



5.8.4. Fêmeas – 120 dias

No tecido vesical formado, e na área referente ao resquício do implante de bexiga, a mucosa exibiu epitélio polimórfico de transição (fig. 16a e 16b). Lâmina própria, túnicas muscular e serosa/adventícia mostraram características de normalidade (fig. 16c). A musculatura da “neobexiga” foi formada inicialmente por fascículos próximos ao lúmen, passando posteriormente por um processo de maturação e invadindo outras camadas do órgão (fig. 16d). Havia ainda presença de feixe de fibras nervosas entre os feixes de fibras musculares lisas (fig. 16e e 16f). Esse mecanismo difere da embriogênese, no qual o músculo se desenvolve a partir da camada externa da parede da bexiga (Sutherland et al., 1996).

Entretanto, na região do implante foi visualizado discreto infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria. Na túnica muscular foram observadas fibras musculares em formação e sem arranjo definido, além de proliferação fibroblástica no tecido conjuntivo entre as fibras musculares. A serosa e/ou adventícia possuíam aspecto morfológico de normalidade.

Estes resultados indicam que a bexiga das fêmeas apresentou processo de regeneração tecidual aos 120 dias, semelhante ao ocorrido com os machos no mesmo tempo. Neste momento, o órgão encontrava-se funcional com capacidade de contenção e esvaziamento normais. O mecanismo de reparação tecidual, no qual o implante atuou como substrato para que os fibroblastos, urotélio e músculo liso crescessem, foi determinante para o aumento gradativo de bexiga, confirmado pelos exames de USG e de aferição de volume. Estes achados são semelhantes aos relatados por Sutherland et al., (1996) e Kambic et al., (1992) quando utilizaram membrana acelular e pericárdio, respectivamente, em cistoplastia de aumento, nas quais realizaram a retirada de 30 e 50% do tecido vesical respectivamente. Kropp et

al., (1996) em outro estudo com matriz de submucosa acelular, em cães, observaram que, histologicamente, o tecido da “neobexiga” apresentou todas as características do receptor. Neste estudo em todas as regiões estudadas, as três camadas (mucosa coberta pelo epitélio de transição, músculo liso e serosa) estavam presentes e com preservação de arquitetura e organização celular. Apesar dos resultados promissores com membrana acelular em animais, a utilização desta técnica apresenta restrições devido a complicações como: incrustação, contração do implante, formação de cálculos e fistulas na interface do implante com a bexiga (Atala, 2004; Zini, 2004; Atala e Koch, 2005). Ayyildiz et al., (2006) em experimento com coelhos, encontraram ainda perda da elasticidade do tecido implantado, espessamento da parede da bexiga e regeneração irregular do músculo detrusor, como complicação da membrana acelular. Isto fortalece a necessidade de novas alternativas para cistoplastias de aumento, tais como a engenharia de tecido e transplante de bexiga.

As cirurgias reconstrutoras da bexiga visam promover um reservatório complacente de baixa pressão e, como estratégia, tenta-se induzir a bexiga remanescente a regenerar como um tecido funcional com todas as características morfológicas (Sutherland et al., 1996; Nuininga et al., 2004). Lepper et al., (2002) em estudo com membrana aniônica observaram que após três meses, o material foi totalmente absorvido e substituído por tecido funcional. Nos estudos com membrana acelular, geralmente são substituídos segmentos de tecido vesical que não ultrapassam 30% a 50% do seu total. No presente trabalho, foram retirados entre 70 e 80% da bexiga, preservando apenas o trígono vesical e, mesmo assim, o crescimento tecidual e retorno de 100% do volume vesical ocorreram no período de observação de 180 dias. Trabalhos utilizando membrana acelular na reconstrução de segmentos maiores da bexiga urinária precisam ser realizados, para que se possam estabelecer parâmetros

de comparação com o presente estudo. Lai et al., (2005) utilizando vários tipos de membrana acelular na reconstituição da bexiga de coelhos, obtiveram retorno do volume entre 41 e 76% ao final do tempo es-

tudado (180 dias), o que demonstra a inferioridade do método quando comparado ao transplante de bexiga a fresco.

Figura 16 - Fotomicrografia de alo-enxerto de bexiga de cadela 120 dias após o transplante parcial de bexiga.

Figura 16a– Bexiga com estrutura histológica típica. Notar presença de urotélio (estrela branca), lâmina própria (demarcação com linha pontilhada azul) com discreto infiltrado inflamatório e túnica muscular (demarcação com linha pontilhada amarela).

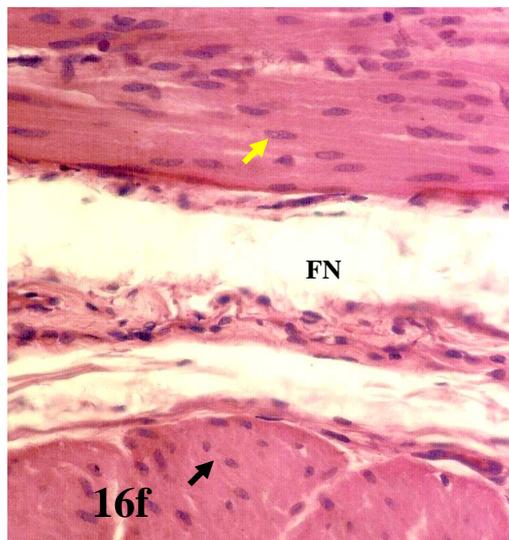
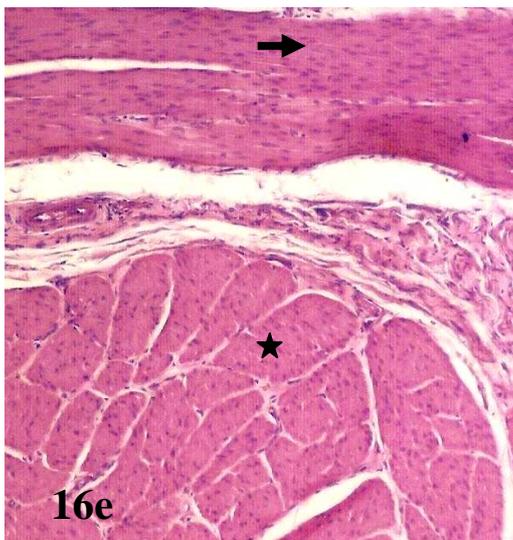
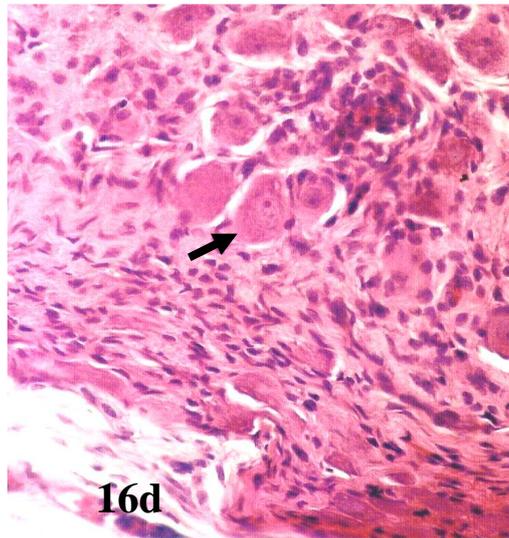
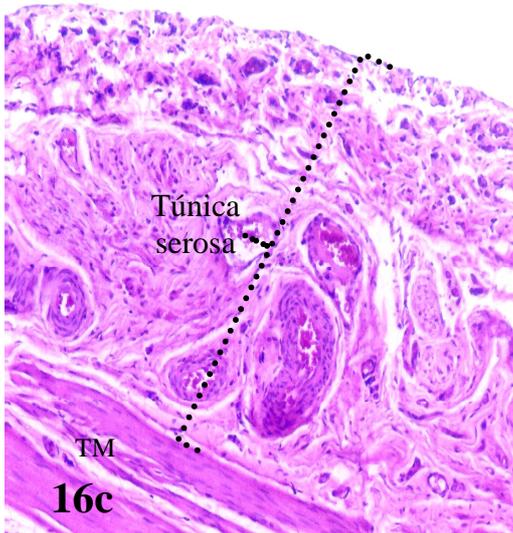
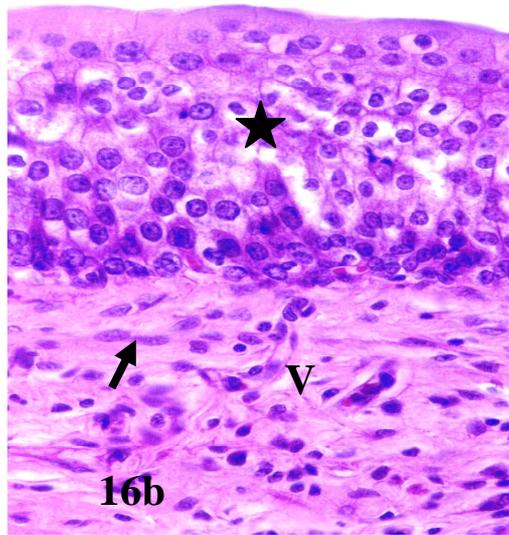
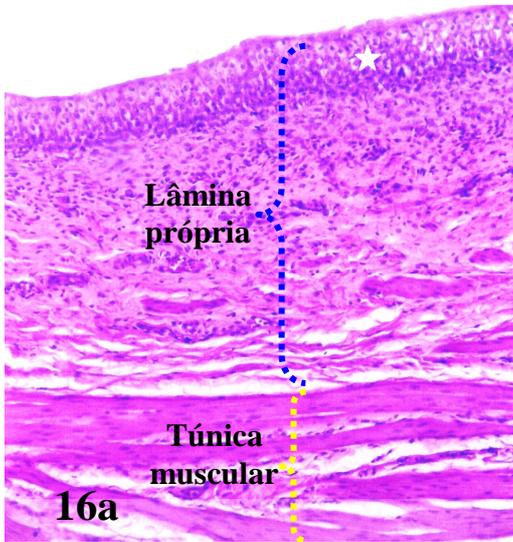
Figura 16b – Detalhe da mucosa da bexiga com urotélio típico (estrela). Observar lâmina própria com fibroblastos (seta) e vasos cercados por discreto número de linfócitos e plasmócitos.

Figura 16c – Detalhe do limite da túnica serosa (linha pontilhada) com a túnica muscular. Notar túnica serosa com sua estruturação histológica típica.

Figura 16d – Detalhe de neurônio motor ganglionar observado entre as fibras musculares da bexiga.

Figura 16e – Túnica muscular da bexiga. Notar feixes em orientação longitudinal (seta) e transversal (estrela).

Figura 16f – Núcleo de miócito liso em corte longitudinal (seta amarela) e transversal (seta preta). Detalhe de um feixe de fibras nervosas entre os feixes de fibras musculares lisas (FN).



5.8.5. Rejeição Tecidual da Bexiga

Dentre os 20 animais selecionados, apenas dois apresentaram sinais clínicos característicos de rejeição aguda. Destes, um sobreviveu após a retirada de todo implante e o outro veio a óbito em virtude da rejeição. Na bexiga remanescente do animal sobrevivente, foi observado epitélio vestigial e na lâmina própria/submucosa reação inflamatória moderada, caracterizada por infiltrado constituído, predominantemente, por polimorfonucleares, neutrófilos e linfócitos. Na túnica muscular visualizaram-se extensas áreas de hemorragia, infiltrado inflamatório focal, vacuolização difusa e necrose de fibras musculares. Na interface entre bexiga remanescente e implante, a reação de rejeição se caracterizou por ausência de epitélio, necrose e reação inflamatória intensa com infiltrado polimorfonuclear, na lâmina própria/submucosa. Na túnica muscular estava presente infiltração neutrofílica, vasos congestos e hemorragia intensa.

Aos 60 dias, a reação de rejeição provocou necrose do epitélio e áreas de calcificação na lâmina própria do implante. A reação inflamatória na lâmina própria/submucosa e perivascular foi constituída por células mononucleares, principalmente linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Na túnica serosa/adventícia, além da reação inflamatória, se observaram áreas hemorrágicas e depósitos de fibrina.

A rejeição à bexiga transplantada foi semelhante ao que se observa nos casos de rejeição aguda em órgãos parenquimatosos, como citado por Toppa, (2004). Segundo o mesmo autor, nos eventos que caracterizam a rejeição renal, em humanos, além das alterações descritas anteriormente, observa-se destruição do endotélio vascular com obliteração dos vasos. Este mecanismo é responsável pela necrose isquêmica do órgão transplantado.

5.9. Imunoistoquímica

Devido às diferenças histológicas observadas entre os gêneros, optou-se pela descrição dos achados imunoistoquímicos por sexo, nos tempos estudados.

5.9.1. Machos 60 dias

No epitélio de revestimento não foi observado, a expressão do fator transformador de crescimento β_1 (TGF β_1). Segundo Izadifar, (1999) e Booth et al., (2002) o urotélio normal é positivo para o TGF β_1 que é um dos responsáveis pela diferenciação final deste tipo de epitélio uma vez que a expressão mais intensa é verificada nas camadas superficiais. Porém, essa expressão é suprimida no processo de transformação maligna (Kim et al., 2001). Portanto, a ausência de marcação para o anticorpo anti-TGF β_1 no epitélio de revestimento dos casos deste experimento pode estar relacionada ao processo de reparo epitelial (Robert et al., 1990; Massague, 1999; Howard, 2005). Dados semelhantes foram encontrados por De Boer et al., (1994) quando estudou o TGF β_1 na reparação tecidual de bexiga de ratos.

Verificou-se expressão moderada do TGF β_1 nos fibroblastos da lâmina própria da mucosa, na qual estava presente o epitélio de revestimento (fig. 17a). Por outro lado, em áreas onde este epitélio esteve ausente, e visualizou-se a presença de células inflamatórias, bem como áreas de edema, não se detectou a expressão para o anticorpo anti-TGF β_1 . Já foi demonstrado em outros trabalhos que a presença do processo inflamatório é um fator que impede a síntese do TGF β_1 (Desmoulière et al., 1993; Sobral, 2000). No tecido conjuntivo entre as fibras musculares e na serosa, a intensidade da expressão para TGF β_1 variou de fraca a intensa, sendo observado o aumento da intensidade da marcação no sentido mucosa /serosa adventícia (fig. 17b) (tabela 10 em anexo).

No tecido conjuntivo da camada mucosa, serosa e entre as fibras musculares não se observou marcação da actina de músculo liso (AML). Apenas, verificou-se marcação positiva nas células da musculatura lisa da parede da bexiga e de vasos, que são reconhecidamente positivos para este anticorpo e são utilizados como controle interno positivo para AML (tabela 14 em anexo).

Pode-se considerar, também, que a ausência de marcação para AML neste período se deu em decorrência da atividade da reação inflamatória como descrita para o anticorpo anti-TGF β_1 , uma vez que este fator de crescimento é reconhecidamente um modulador da diferenciação miofibroblástica e é inibido por citocinas mediadas durante o processo inflamatório. Sabe-se que o interferon γ provoca uma redução na síntese de mRNA da AML, interferindo na diferenciação de subtipos de fibroblastos. Todos esses eventos são descritos na literatura, entretanto, a via de sinalização ainda não foi identificada (Sobral et al., 2004). A reação inflamatória pode ser o fator responsável pelo retardo do processo de reparo do tecido transplantado, e suporta a idéia de aumentar o tempo de imunossupressão para que a resposta tecidual seja minimizada. Em contrapartida, quando da síntese do TGF β_1 , em bexiga humana, ocorre um incremento da síntese de AML resultando na formação de resposta hipertrófica e fibrose, o que provoca mudanças significantes nas propriedades fisiológicas deste órgão (Howard et al., 2005), o que poderia, em parte, ser responsável pelo insucesso dos transplantes.

5.9.2. Machos - 120 dias

O TGF β_1 foi negativo para o epitélio. No tecido conjuntivo da lâmina própria do enxerto observou-se forte expressão para este fator de crescimento. No tecido conjuntivo da submucosa e serosa, a expressão do TGF β_1 foi moderada. Na bexiga remanescente, a reação foi mais intensa nos fibroblastos em todas as camadas (fig. 17c e

17d). Por outro lado, nas áreas de tecido conjuntivo da “neobexiga” onde havia edema e células inflamatórias a reação foi fraca (tabela 11 em anexo).

A expressão para AML foi negativa em todo tecido conjuntivo, sendo positiva no controle interno constituído pela parede de músculo e vasos. Entretanto, em um animal, observou-se reação focal fraca no epitélio de revestimento, enquanto, em outro, verificou-se expressão fraca nos miofibroblastos da lâmina própria e submucosa (tabela 15 em anexo). O processo de reparo mais tardio nos machos, quando comparado com as fêmeas, justifica a semelhança entre os achados imunoistoquímicos entre os intervalos de tempo de 60 e 120 dias, para este gênero. A manutenção do processo inflamatório pode ter provocado a diminuição da expressão ou ausência da marcação dos antígenos estudados.

5.9.3. Fêmeas - 60 dias

No epitélio de revestimento não foi observada a expressão TGF β_1 , semelhante ao gênero masculino. Verificou-se expressão moderada do mesmo em toda extensão de tecido conjuntivo na lâmina própria, submucosa e serosa (fig. 17a). A marcação foi intensa em fibroblastos próximos a fibras musculares. Entretanto, nos animais onde se observou ocorrência de infiltrado inflamatório e área de necrose na lâmina própria, a marcação foi fraca (tabela 15 em anexo). Em áreas de bexiga com infiltrado inflamatório constituído por linfócitos e macrófagos, o TNF α (Fator de necrose tumoral α) ou interferon- γ produzidos por estas células competem com os receptores de TGF β_1 . Esta competição inibe a diferenciação promovida por este fator de crescimento nas células de conjuntivo, epitélio e músculo (Booth et al., 2002) (tabela 12 em anexo).

A expressão de AML variou de fraca a intensa (fig. 18a) no epitélio em todos os animais. É inesperada a expressão desta pro-

teína (AML) em células epiteliais, uma vez que não participa do citoesqueleto de tais células. Tal expressão só tem sido observada em células epiteliais neoplásicas (Desmoulière et al., 1993). Porém, a ausência de marcação para o $TGF\beta_1$ revela um estágio de imaturação das células. Raras células fusiformes e musculares foram marcadas quando se detectou infiltrado inflamatório contendo macrófagos e linfócitos (fig. 18b). Por outro lado, a expressão para AML oscilou de fraca a moderada na lâmina própria justaepitelial referente à detecção de miofibroblastos e células rabdóides (rabdomioblastos) (fig. 18c). De maneira geral a expressão para AML foi positiva no controle interno (tabela 16 em anexo).

5.9.4. Fêmeas -120 dias

A expressão para $TGF\beta_1$ foi intensa no epitélio e moderada no tecido conjuntivo na lâmina própria, submucosa e serosa (fig. 17e). Nos locais onde ainda persistia o infiltrado inflamatório não se detectou a expressão do $TGF\beta_1$. Um fato relevante a ser considerado é que neste gênero aos 120 dias já se observava a diferenciação final das células epiteliais, uma vez que as mesmas foram positivas para este fator de crescimento (tabela 13 em anexo), como encontrado por Booth et al., (2002).

A expressão de AML foi moderada no epitélio (fig. 18c). Tal expressão reforça a sugestão de desenvolvimento celular avançado, uma vez que a diminuição da intensidade da marcação para AML, quando comparado com o período de 60 dias, indica processo de maturação do músculo na amostra estudada. Pode-se sugerir que, num período observacional maior, talvez ocorresse ausência de marcação para o antígeno pesquisado. Contudo, constatou-se que onde havia expressão de AML no epitélio não se detectava marcação para este filamento do citoesqueleto em fibroblastos e miofibroblastos (fig. 18d). Este achado está provavelmente associado à presença de processo inflamató-

rio. Por outro lado, a área onde o epitélio era negativo para AML observava-se a marcação em miofibroblastos diferenciados (tabela 17 em anexo)

Figura 17 - Avaliação imunoistoquímica de corte histológico de alo-enxerto de bexiga em cães para expressão da proteína Fator transformador de crescimento β 1 (TGF β 1), nos tempos de 60 e 120 dias.

Figura 17a – Observar a expressão para o anticorpo anti-TGF β 1 na porção da lâmina própria, bem como ausência de marcação na porção epitelial em machos aos 60 dias (100x).

Figura 17b – Detalhe da figura anterior (400x).

Figura 17c – Observar ausência de marcação do TGF β 1 no tecido epitelial de fêmeas aos 60 dias (100x).

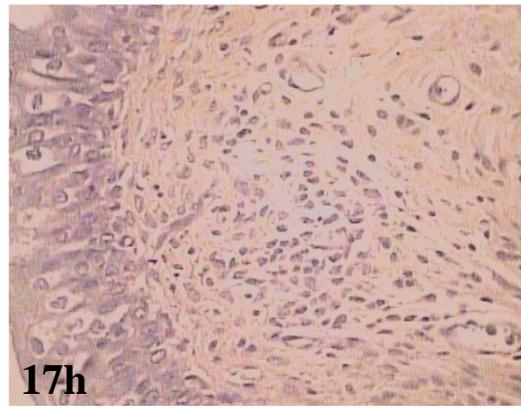
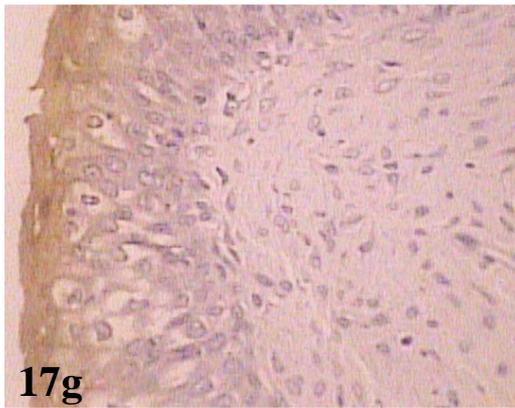
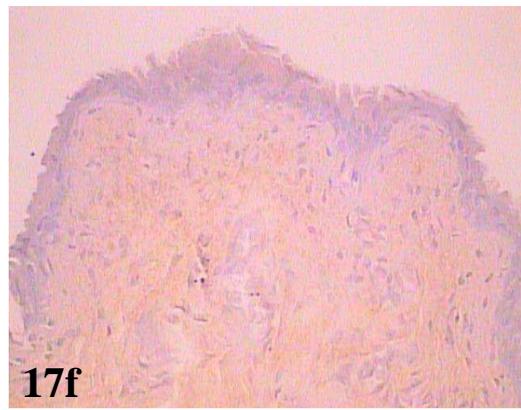
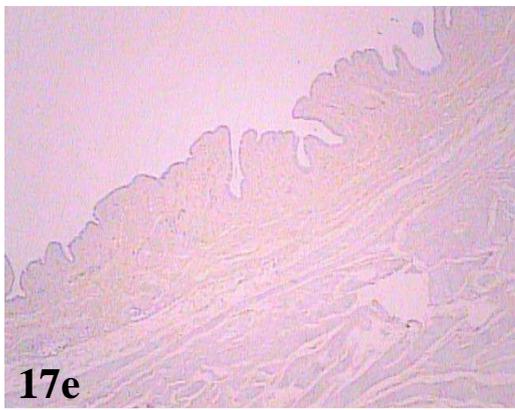
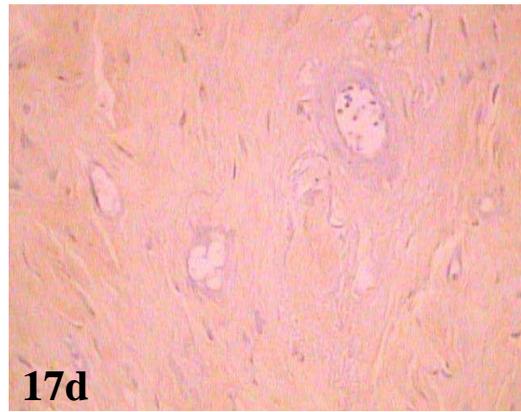
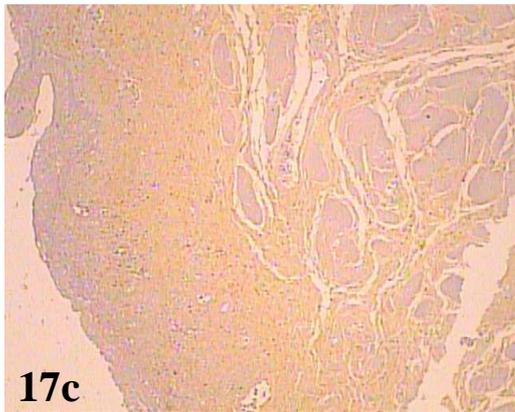
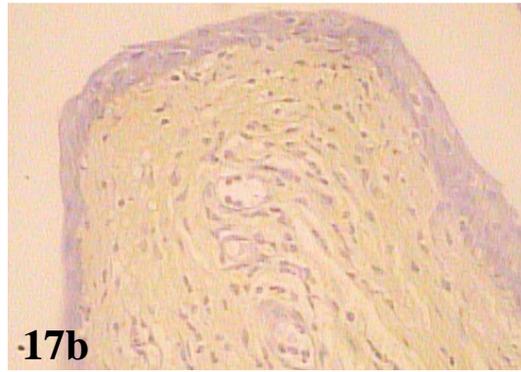
Figura 17d – Observar marcação do TGF β 1 em tecido conjuntivo de todas as camadas da bexiga, na direção epitélio/serosa, em fêmeas aos 60 dias (400x).

Figura 17e – Expressão para o anticorpo anti-TGF β 1 na porção da lâmina própria, bem como ausência de marcação na porção epitelial em machos aos 120 dias (100x).

Figura 17f – Detalhe da figura anterior (400x).

Figura 17g - Marcação positiva para o anticorpo anti-TGF β 1 em tecido epitelial e conjuntivo de fêmeas aos 120 dias (200x).

Figura 17h - Ausência de marcação do TGF β 1 aos 120 dias nas regiões onde observa-se infiltrado linfoplasmocitário (200x).



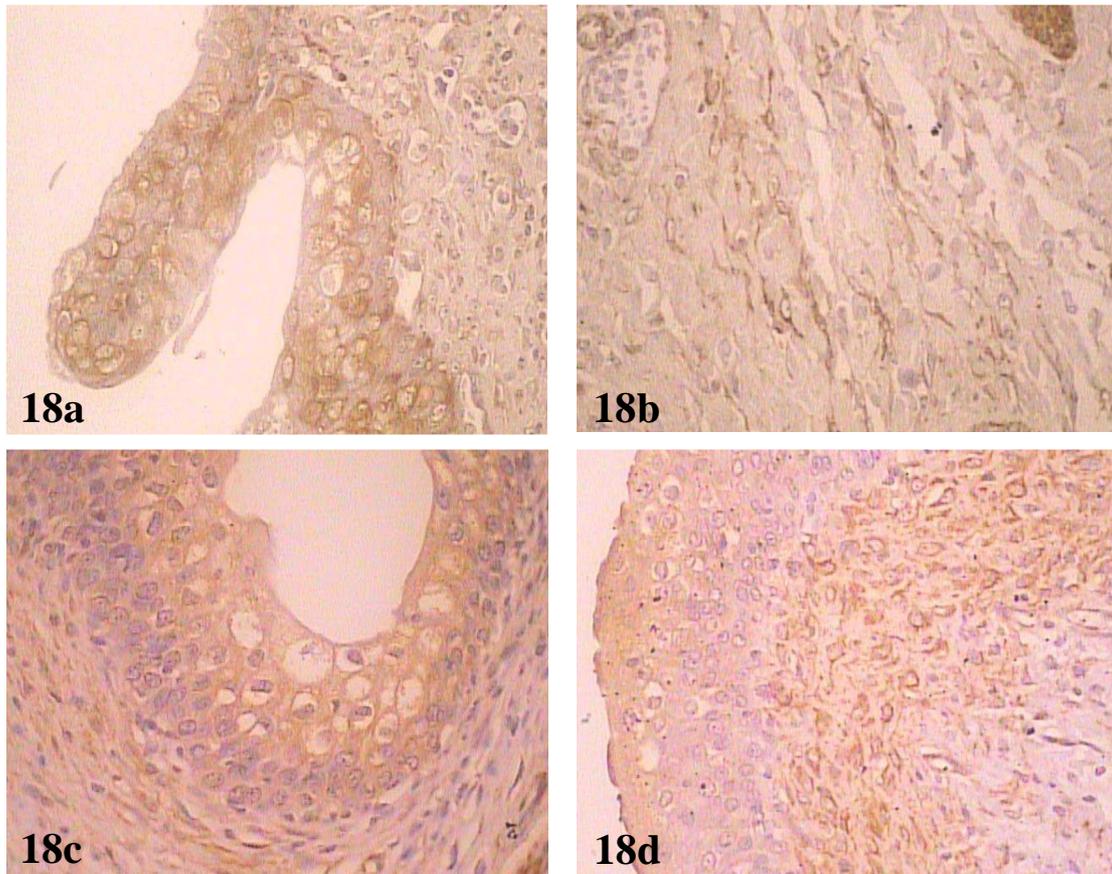


Figura 18 - Avaliação imunoistoquímica de corte histológico de alo-enxerto de bexiga em cães para expressão da proteína Actina músculo liso (AML), nos tempos de 60 e 120 dias.

Figura 18a – Observar coloração acastanhada no citoplasma das células epiteliais, considerada moderada, aos 60 dias (200x).

Figura 18b – Células fusiformes positivas para AML, aos 60 dias (200x).

Figura 18c – Epitélio exibindo marcação positiva moderada para o anticorpo anti-AML, aos 60 dias (200x).

Figura 18d – Marcação em miofibroblastos diferenciados na lâmina própria, aos 120 dias (200x)

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o presente estudo e da análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1- O alo-transplante parcial de bexiga em cães é viável, promove retorno da capacidade de armazenamento, contenção e esvaziamento espontâneo da vesícula urinária.

2- O alo-transplante parcial de bexiga a fresco propicia a recuperação da morfologia da vesícula urinária, porém o processo de regeneração tecidual não é completado até 120 dias.

3- O tecido transplantado atua como substrato para a migração do tecido vesical, permitindo o crescimento da bexiga e aumento gradual da capacidade volumétrica do órgão.

4- A expressão imunoistoquímica da proteína TGF β 1 está envolvida no processo de diferenciação do urotélio e AML no processo de reparo do tecido conjuntivo.

5- Os protocolos de seleção dos doadores-receptores, bem como o protocolo de imunossupressão precisam ser mais bem estudados.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante das observações deste estudo prospectivo, pode-se inferir que:

O transplante parcial de bexiga poderá vir a ser uma alternativa para a cirurgia de aumento da bexiga urinária em cães. Porém, dificuldades como a necessidade de anastomose vascular e o controle da rejeição do transplante precisam ser mais bem estudados. O sucesso no controle de tais dificuldades reforçaria a idéia de se realizar estudos clínicos em humanos, tendo em vista que, na espécie humana, existe frequente-

mente indicação para cirurgias de aumento da bexiga urinária.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATALA, A. Tissue engineering for the replacement of organ function in the genitourinary system. *Amer. J. Transp.* v.4, n.6, p.58-73, 2004.
- ATALA, A.; BAUER, S.B.; SOKER, S. et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.* v.367, n.9518, p.1215-6, 2006.
- ATALA, A.; KOCH, C. Applications of tissue engineering in the genitourinary tract. *Expert. Rev. Med. Devices.* v.2, n.1, p.119-26, 2005.
- AYYILDS, A.; BARIS N.; EMRE H., et al. Using porcine acellular collagen matrix (Pelvicol®) in bladder augmentation: Experimental study. *International Braz. J. Urol.* v.32, n.1, p.88-93, 2006.
- BAIOTTO, G. C. *Reconstrução vesical em cães após cistectomia supratrigonal utilizando cólon descendente ou bexiga homóloga conservada em glicerina.* 35 f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 2001.
- BARSANTI, J.A.; CROWELL, W.; LOSONSKY, J., et al. Complications of bladder distension during retrograde urethrography. *Am. J. Vet. Res.* v.42, n.1, p.819-21, 1981.
- BILLER, D. S. Diagnostic ultrasound of the urinary bladder. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 26, n. 4, p. 397-402, 1990.
- BOOTH, C; HARNDEN, P.; SELBY, P. et al. Towards defining roles and relationships for tenascin-C and TGFβ-1 in the normal and neoplastic urinary bladder. *J. Pathol.* v.198, p.359-68, 2002.
- CODNER, E.C.; FARRIS-SMITH, L.L. Characterization of the subclinical phase of erlichiosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* v.189, n.1, p.47-50, 1986.
- COSTELLO, A. J.; CROWE, H.; AGARWAL, D. Supratrigonal cystectomy and ileocystoplasty in management of interstitial cystitis. *Austr. New Z. J. Surg.* v.70, n.1, p.34-38, 2000.
- COTE, E.; CARROLL, M.C.; BECK, K.A. et al. Diagnosis of urinary bladder rupture using ultrasound contrast cystography: in vitro model and two case-history reports. *Vet. Radiol. Ultrasound.* v.43, n.3, p.281-6, 2002.
- CRANDIS, A.; NESTORIDIS, G.; DELAKAS, D. et al. Bladder autoaugmentation using the rabbit using depithelialized segments of small intestine, stomach and lyophilized human dura mater. *Br. J. Urol.* v.81, n.1, p.62-67, 1998.
- CUBILLANA, P. L.; GÓMES, G. G.; GÓMEZ J.R., et al. Incidencia y factores de riesgo para la formación litiásica em pacientes sometidos a cistoplastias de ampliación o sustitución com intestino. *Arch. Esp. Urol.* v.51, n.4, p.347-352, 1998.

- DALECK, C.R.; DALECK, C.L.M. PADILHA FILHO, J.G. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. *Ciência rural*. v.22, n.2, p.179-83, 1992.
- DE BOER, W.I.; SCHULLER, A.G.; VERMEY, M. et al. Expression of growth factors and receptors during specific phases in regenerating urothelium after acute injury in vivo. *Am. J. Pathol.* v.145, n.5, p.1199-207, 1994.
- DESMOULIÈRE, A.; GEINOZ, A.; GABBIANI, F. et al. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* v.122, p.103-11, 1993.
- ELBAHNASY, A.M.; SHALHAV, A.; HOENIG, D.M. Bladder wall substitution with synthetic and non-intestinal organic materials. *J. Urol.* v.159, n.3, p.628-37, 1998.
- ESSMAN, S.C. Contrast cystography. *Clin. Tech. Small Anim. Practice.* v.20, n.1, p.46-51, 2005.
- FISHMAN, I.J.; FLORES, F.N.; SCOTT, F.B. et al. Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *Urol* v.138, n.5, p.1291-4, 1987.
- FRIES, C.; BINNINGTON, A.G.; VALLI, V.E. et al. Enterocystoplasty with cystectomy and subtotal intracapsular prostatectomy in the male dog. *Vet. Surg.* v.20, n.2, p.104-112, 1991.
- GALLATTI, L.B.; IWASAKI, M. Comparison of ultrasonography and positive contrast cystography for detection of urinary bladder disorders in dogs. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v.41, p.40-6, 2004.
- GITLIN, J.S.; WU, X.R.; SUN, T.T. New concepts of histological changes in experimental augmentation cystoplasty: insights into the development of neoplastic transformation at the enterovesical and gastrovesical anastomosis. *J. Urol.* v.162, n.3, p.1096-100, 1999.
- GUCER, T.; OZKARDIS, H. Vesica fellea – A new substitute for the bladder? *Br. J. Urol.* v.70, p.269-270, 1992.
- HENRY, C. J. Management of transitional cell carcinoma. *Vet. Clin. North Am.: small anim. Pract.* v.33. p.597-613, 2003a.
- HOELZLER, M.G.; LIDBETTER, D.A. Surgical management of urinary incontinence. *Vet. Clin. North Am.: small anim. Pract.* v.346, n.4, p.1057-1073, 2004.
- HOU, W.; YUAN, F.; WANG, C. et al. Reconstruction of urothelium tissue using tissue-engineering technique. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi* v.20, n.3, 2006.
- HOWARD, S.P.; KUCICH, U.; COPLEN, D. E. et al. Transforming growth factor- β 1-induced hypertrophy and matrix expression in human bladder smooth muscle cells. *Urol.* v.66, n.6, 2005.

- INATOMI, L.S.; PRANTONI, G.A.; RAISER, A.G. Implante de dura-mater heteróloga em cães. *Ciência rural*. v.10, n.3, p.291-97, 1980.
- IZADIFAR, V.; DE BOER, W.I.; MUSCATELLI-GROUX, B. et al. Expression of transforming growth betal and its receptors in normal human urothelium and human transitional cell carcinomas. *Human Pathol*. v.30, n.4, p.372-7, 1999.
- JIANG, H.; KOBAYASHI, M. Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation. *Transplant. Proc.* v.31, p.1978-80, 1999.
- KAHAN, B.D.; KIRKEN, R.A.; Stepkowski, S.M. New approaches to transplant immunosuppression. *Transplant. Proc.* v.35, p.1621-63, 2003.
- KAMBIC, H.; KAY, R.; CHEN, J.F., et al. Biodegradable pericardial implants for augmentation: a 2.5 year studying dogs. *J. Urol*. v.148, n.8, p.539-543, 1992.
- KIM, J.; SHARIAT, S.F.; KIMI.Y. et al. Predictive value of expression of transforming growth factor- β -1 and receptors in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer*. v.92, n.6, p.1475-1483, 2001.
- KOCKUM, C. C.; WÍLLEN, R.; MALMFORS, G. Bladder augmentation with different forms of intestinal grafts: an experimental study in the pig. *Br. J. U. Internat*. v.1, n.83, p.305-311, 1999.
- KROPP, B.P.; RIPPY, M.K.; BADYLAK, S.F. et al. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations. *J. Urol*. v.55, n.6, p.2098-104, 1996.
- LAI, J.; CHANG, P.; LIN, J. Bladder autoaugmentation using various biodegradable scaffolds seeded with autologous smooth muscle cells in a rabbit model. *J. Pediat. Surg*. v.40, p.1869-1873, 2005.
- LANE, I.F. A diagnostic approach to micturition disorders. *Vet. Med*. v.98, n.1, p.49-56, 2003.
- LASMAR, E.P.; LASMAR, M.F. Perspectivas atuais e futuras em transplantes de órgãos. *Prática Hospitalar*. v.5, n.29, 2003.
- LEPPER, F.G.O.; RAMOS, T.M.; TRINDADE FILHO, J.C.S. et al. Bladder augmentation in rabbits with anionic collagen membrane, with or without urotelial preservation. Cistometric and hystologic evaluation. *Int. Braz. J. Urol*. v.28, n.5, p.464-470, 2002.
- LIEBERMANN-MEFFERT, D. The greater omentum: anatomy, embryology and surgical applications. *Surg. Clin. North Am*. v.80, n.1, p.275-293, 2000.
- LIMA, S.V.; ARAUJO, L.A.; VILAR, F.O. et al. Nonsecretory sigmoid cystoplasty: experimental and clinical results. *J. Urol*. v.153, n.5, p.1651-4, 1995.

- LOBATO, M.A. Distúrbios da micção. In: BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. *Manual Saunders-Clínica de Pequenos Animais*. São Paulo: Rocca. 1998. p.956-972.
- LORAN, O.B.; KIRPATOVSII, V.I.; MUDRAIA, I.S. et al. Functional status of urinary tract after plastic surgery of the urinary bladder with a segment of the ileum *Urol. Nefrol.* n.2, p.17-23, 1999.
- MAGUNA, C.; SPELLMEYER, O.; HUND, M. et al. Augmentation der harnblase nach radikaler resektion: erste klische erfhrungenmit einem lyophilisierten xenoimplantat aus der dünddarmsubmukosa des schweins bei hund und katze. *Kleintierpraxis.* v.44, p.809-821, 1999.
- MASSAGUE, J. The transforming growth factor beta family. *Ann. Rev. Cell Biol.* v.6, p.597-641, 1990.
- MATHEW, J.M.; GARCIA-MORALES, R.O., CARRENO, M. et al. Immune responses and their regulation by donor bone marrow cells in clinical organ transplantation. *Transplant. immunol.* v.11, p.307-21, 2003.
- MATHEWS, K.A.; HOLMBERG, D.L.; JOHNSTON, K. et al. Renal allograft survival in outbred mongrel dogs using rabbit anti-dog thymocyte serum in combination with immunosuppressive drug therapy with or without donor bone marrow. *Vet. Surg.* v.23, p.347-57, 1994.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. *Medicina de laboratório veterinária*. São Paulo: Rocca. 1995. 308 p.
- MORRIS, R.E. Mecanismos of action of new immunospressive drugs. *Ther drug monit.* v. 17, p.564, 1995.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Medicina interna de pequenos animais*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1084p.
- NIKULA, K.J.; BENJAMIN, S.A.; ANGLETON, G.M. et al. Transitional cells carcinomas of the urinary tract in a colony of beagle dogs. *Vet. Pathol.* v.26. 455-61, 1989.
- NUININGA, J.E.; MOERKERK, H.V.; HANSSEN, A. et al. A rabbit model to tissue engineer the bladder. *Biomaterials.* v.25, p.1657-61, 2004.
- OBERPENNING, F.; MENG, J.; YOO, J.J. et al. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* v.17, n.2, p.133-34, 1999.
- OLIVEIRA, L.O. *Implante homogêneo de bexiga conservada em glicerina a 98 % para reparo da bexiga de cães*. 1999, 42p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Santa Maria.
- PASCUAL, J.; SEGOLONI, M.; MOLINA, M.G. Comparison between a two-drug regimen with tacrolimus and steroids and a triple one with azathioprine in kidney transplantation: results of a European trial with 3-year follow up. *Transplant. Proc.* v.35, p.1701-03, 2003.

- PEREIRA, L.C.; ARAUJO, R.B.; GHELLER, V.A. et al. Colonic-trigonal anastomosis in dogs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.54, n.4, p.390-95, 2002.
- PEREIRA, W.A. História dos transplantes. In: PEREIRA, A.P. *Manual de transplantes de órgãos e tecidos*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2004. p. 1-9.
- PIECHOTA, H.J.; DAHMS, M.P.; GLEASON, L.S. et al. Functional rat bladder regeneration through xenotransplantation of the bladder acellular matrix graft. *Br. J. Urol.* v.81, p.548-59, 1998.
- PIRCH, J.D.; MILLER, J.; DEIERHOI, M.H. et al. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. *Transplant.* v.63, p.997, 1997.
- PISER, J.A.; MITCHELL, M.E.; KULB, T.B. et al. Gastrocystoplasty and cololecystoplasty in canines: the metabolic consequences of acute saline and acid loading. *J. Urol.* v.138, n.4, p.1009-13, 1987.
- PRADO FILHO, O.R.; NIGRO, A.J.T.; BANDEIRA, C.O.P. et al. Estudo comparativo entre diferentes tipos de revestimento interno de anastomoses esofágicas em cães. *Acta Cir. Bras.* v.14, n.2. 1999.
- RIGAUD, J.; LE NORMAND, L. Augmentation enterocystoplasty. *Ann Urol.* v.38, p.298-310, 2004.
- ROBERTS, A.B.; HEINE, U.I.; FLANDERS, K.C. Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix. *Ann New Z. Acad. Sci.* v.580, p.225-32, 1990.
- ROCHA, T.A.; MAULDIN, G.N.; PATNAIK, A.K., et al. Prognostic factors in dogs with urinary bladder carcinoma. *J. Vet. Intern. Med.* v.14, n.5, p.486-90, 2000.
- SALLE, J.L.P.; FRAGA, J.C.S.; LUCIB, A. et al. Seromuscular enterocystoplasty in dogs. *J. Urol.* v.144, p.454-6, 1990.
- SCHAUFFERT, M.D.; SIMÕES, M.J.; JULIANO, Y. Estudo da ação dos fios de catgut cromado e poliglecaprone 25, na ileocistoplastia em ratos, destacando a formação de cálculos. *Acta Cir. Bras.* v.15, n.1, 2000.
- SILVERMAN, S.; LONG, C.D. The diagnosis of urinary incontinence and abnormal urination in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am.: Small An. Practice.* v.30, n.2, p.427-48, 2000.
- SMITH, J.D.; STONE, E.A.; GILSON, S.D. Placement of a permanent cystostomy catheter to relieve urine outflow obstruction in dogs with transitional cell carcinoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.206, n.4, p.496-99, 1995.
- SOBRAL, A.P.V. *Correlação do grau de malignidade de carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares maiores e menores com a presença de miofibroblastos estromais: estudo imuno-histoquímico*. 82f. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2000.

- SOBRAL, A.P.V.; LODUCCA, V.L.; NUNES, F.D. et al. Relationship between major and minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma malignancy grading and presence of stromal myofibroblasts: immunohistochemical study. *J. Oral Pathol. Med.* v.33, 315-9, 2004.
- STEIN, J.P.; LIESKOVSY, G.; COTE, R. et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long term results in 1054 patients. *J. Clin. Oncol.* v.19, n.3, p. 666-75, 2001.
- STONE, E.A.; GEORGE, T.F.; GILSON, S.E., et al. Partial cystectomy for urinary bladder neoplasia: surgical technique and outcome in 11 dogs. *J Small Anim. Pract.* v.37, n.10, p. 480-85, 1996.
- SUTHERLAN, R.S.; BASKIN, L.S.; HAYWARD, S.W. et al. Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerve into an acellular tissue matrix. *J. Urol.* v.156, n.2, p.571-7, 1996.
- TEIXEIRA, M. W. Transplante de bexiga. *V&Z- Veterinária e Zootecnia.* v.10, n.4, p.7-9, 2002.
- TEIXEIRA, M.W.; RESENDE, C.M.F. Imunossupressão e Transplantes: Perspectivas Atuais e Futuras. *Medvop.* v.2, n.7, 7-12, 2004.
- TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária – uma introdução.* 6ed. São Paulo: Roca; 2002, 532.
- TOPPA, N. H. Anatomia Patológica da rejeição de transplantes. In: PEREIRA, W. *Manual de transplantes de órgãos e tecidos.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2004. p. 74-87.
- UENO, K.; YAMANKA, A.K.; KIMURA, K. et al. Bladder reconstruction with auto-transplanted ileum in the dog: better functional results than standard enterocystoplasty. *Br. J. U. Internat.* v.87, p.703-7, 2001.
- VICENTI, F.; JENSI, K.S.; FILO, R. et al. A long-term comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplant.* v.73, n.1, 773-75, 2002.
- VINCENT, F.; KIRKMAN, R. Interleukin-2-receptorblockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. *New Engl. J. Med.* v.338, p.161, 1998.
- VÖRÖS, K. Ultrasonographic diagnosis of urinary bladder calculi in dogs. *Canine Practice,* v.18, n. 1, p. 29-33, 1993.
- ZINI L.; YIOU; R.; LECOEUR, C. et al. Tissue engineering in urology. *Ann. Urol.* v.38, n.6, p.266-74, 2004.
- YAMATAKA, A.; WANG, K.; KOBAYASHI, H. et al. Bladder transplantation in rats using FK-506. *J. Urol.* v.166, n.1, p.259-62, 2001.

9. ANEXO

Tabela 10. Avaliação imunohistoquímica para Fator de Crescimento Transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) em cães do gênero masculino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 60 dias de pós-operatório.

60 dias		Fator de Crescimento Transformador $\beta 1$											
Macho Animal	Neobexiga				Interface				Implante				
	Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		
	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	
1	-	-	-	-	-	++	++	++	-	++	++	++	
2	-	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	++	
3	-	++	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	
4	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+	++	
7	-	++	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++	
8	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	
9	-	++	-	++	-	++	-	-	-	++	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabela 11. Avaliação imunohistoquímica para Fator de Crescimento Transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) em cães do gênero masculino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 120 dias de pós-operatório.

120 dias		Fator de Crescimento Transformador $\beta 1$											
Macho Animal	Neobexiga				Interface				Implante				
	Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		
	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	+++	-	+++	-	-	-	++	-	-	-	+	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	
6	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	
7	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	
8	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	
9	-	++	-	++	-	+++	-	++	-	++	-	++	
10	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	

Tabela 12. Avaliação imunohistoquímica para Fator de Crescimento Transformador β_1 (TGF β_1) em cães do gênero feminino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 60 dias de pós-operatório.

60 dias		Fator de Crescimento Transformador β_1											
Fêmeas		Neobexiga				Interface				Implante			
Animal		Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa	
		Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj
11		-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++
12		-	-	++	++	-	-	++	++	-	-	++	++
13		-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++
14		-	-	++	++	-	-	++	++	-	-	++	++
15		-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++
16		-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++
17		-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++
18		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
19		-	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++
20		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Tabela 13. Avaliação imunohistoquímica para Fator de Crescimento Transformador β_1 (TGF β_1) em cães do gênero feminino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 120 dias de pós-operatório.

120 dias		Fator de Crescimento Transformador β_1											
Fêmeas		Neobexiga				Interface				Implante			
Animal		Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa	
		Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj
11		-	+	++	++	-	+	++	++	-	+	++	++
12		Rej.	Rej.	Rej.	Rej.	Rej.	Rej.	Rej.	Rej.	Rej.	Rej.	Rej.	Rej.
13		-	+	-	++	-	+	-	++	-	+	-	++
14		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15		+++	++	-	-	+++	++	-	-	+++	++	-	-
16		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
17		-	+	-	++	-	+	-	++	-	+	-	++
18		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
19		-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
20		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Tabela 14. Avaliação imunoistoquímica para Actina-músculo-liso (AML) em cães do gênero masculino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 60 dias de pós-operatório.

60 dias													
ACTINA-MÚSCULO-LISO (AML)													
Machos Animal	Neobexiga				Interface				Implante				
	Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		
	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	
1	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	
2	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	
3	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	
4	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	
5	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	
6	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	
7	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	
8	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	
9	-	-	+++	++	-	-	+++	++	-	-	+++	++	
10	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	

Tabela 15. Avaliação imunoistoquímica para Actina-músculo-liso (AML) em cães do gênero masculino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 120 dias de pós-operatório.

120 dias													
ACTINA-MÚSCULO-LISO (AML)													
Machos Animal	Neobexiga				Interface				Implante				
	Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		
	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	
1													
2	+	-	++		+	-	++		+	-	++		
3													
4													
5	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	
6	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	
7	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	
8	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	
9	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	
10	-	+	+++	+	-	+	+++	+	-	+	+++	+	

Tabela 16. Avaliação imunoistoquímica para Actina-músculo-liso (AML) em cães do gênero feminino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 60 dias de pós-operatório.

60 dias												
ACTINA-MÚSCULO-LISO (AML)												
Fêmeas Animal	Neobexiga				Interface				Implante			
	Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa	
	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj
11	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-
12	+++	-	++	-	+++	-	++	-	+++	-	++	-
13	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
16	+++	-	++	++	+++	-	++	++	+++	-	++	++
17	+++	-	++	++	+++	-	++	++	+++	-	++	++
18	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
19	+++	-	++	++	+++	-	++	++	+++	-	++	++
20	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-

Tabela 17. Avaliação imunoistoquímica para Actina-músculo-liso (AML) em cães do gênero feminino, submetidos a alo-transplante parcial de bexiga a fresco, aos 120 dias de pós-operatório.

120 dias												
ACTINA-MÚSCULO-LISO (AML)												
Fêmeas Animal	Neobexiga				Interface				Implante			
	Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa		Mucosa		Serosa	
	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj	Epi	Lam	Musc	Conj
11	-	+	+++	+	-	+	+++	+	-	+	+++	+
12	ER- LIC.											
13	++	++	-	-	++	++	-	-	++	++	-	-
14	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-
15	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-
16	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++
17	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
18	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
20	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-