MARCOS DE PAULA NOGUEIRA

**Uso do silicone e poliuretano na uretroplastia dorsal:
estudo experimental em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno Pereira

São Paulo

2008

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Este estudo é dedicado a:

Meus pais, Marcos e Myriam Nogueira, que me ensinaram os princípios de uma vida digna e correta, que me propiciaram raízes fortes e sombra fresca e que nunca esperaram para mim, senão o melhor.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno Pereira, pela grande oportunidade de participar do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A Dra Junko Takano Osaka, exemplo de organização e administração, pelo empenho dedicado a pós-graduação e por “fazer as coisas acontecerem”.

Ao Prof. Dr. José Pinhata Otochi, ao Prof. Dr. Luiz Marcelo Inaco Cirino e ao Prof. Dr. Uenis Tanuri, pelos brilhantes ensinamentos transmitidos, transformando a Qualificação em uma aula inesquecível.

Ao Sr. Elias Aparecido Marcelino, pelo zêlo e perícia no manejo dos animais durante a cirurgia e pela companhia durante as longas horas de laboratório.

A Sra Sandra, pelo trabalho no processamento do material e na confecção das lâminas, fundamental para toda a pesquisa

A Sra Eliane Gazeto e à Sra Fátima Aparecida (*in memorian*), pelos prazos que nos fizeram cumprir, por nos lembrar do que facilmente esquecemos e por todo o apoio de secretaria prestados durante a realização desta tese

A Empresa Silimed – Comércio de Produtos Médicos-Hospitalares Ltda, na pessoa da Sra Rosângela Palermo, pelo apoio no fornecimento do implante, sem o qual este estudo não seria possível.

Aos funcionários do Biotério da Disciplina de Técnica Cirúrgica, cujo trabalho essencial nos propicia levar a cabo nossos experimentos.

Aos funcionários do Centro de Materiais da Disciplina de Técnica Cirúrgica, por nunca deixar nada faltar

A Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez, por permitir o uso do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário para a realização da análise microbiológica. Aos técnicos do Setor de Microbiologia pela realização das culturas.

A Dra Kátia Ramos Leite, pela presteza na leitura das lâminas, deixando seus afazeres para a realização dos mesmos

A Dra Walcy Rosolia Teodoro pela dedicação em ensinar como manusear o sistema de microscopia necessário para a captação das imagens e por ceder espaço no laboratório para tal

Ao Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra, pelas horas de explicação sobre o programa de análise de lâminas e por permitir o seu uso neste trabalho

Ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos, entusiasta da pesquisa e incansável na busca constante de conhecimento. Grato pelo valioso auxílio e pela amizade sincera.

Aos pesquisadores do Laboratório de Análise Térmica Prof. Dr. Ivo Giolito do Instituto de Química da USP, pelo auxílio na coleta de dados de análise térmica

Aos amigos da Clínica Cirúrgica do Hospital Universitário, pela amizade duradoura, por “estarem sempre lá”, por todas as dicas e orientações durante a confecção dessa tese e por entenderem as necessidades de um pós-graduando

Aos Drs Américo Toshiaki Sakai, Horácio Consolmagno e Oscar Eduardo Hidetoshi Fugita – mentores de uma prática urológica magna.

A Sandra e Aziz Meziara, exemplo de desapego em prol do próximo, cujo apoio logístico foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho

A Helena Dias Meziara Nogueira, por entender as minhas necessidades, pelo apoio incontestado, por harmonizar minha vida e pelo amor dedicado a família

A Mariana e Ana Laura, alegria de viver e motivação para sempre irmos em frente. Obrigado pela paciência com que me esperaram.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Ficha Catalográfica

Dedicatória

Agradecimentos

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Enxertos.....	4
1.1.1 Implantes urinários.....	6
1.1.2 Silicone.....	6
1.1.3 Poliuretano.....	15
1.2 Cirurgia reconstrutiva uretral.....	19
1.3 Análise histológica.....	21
1.4 Análise térmica.....	24
2 OBJETIVOS.....	31
3 MÉTODOS.....	33
3.1 Animal de Experimentação.....	34

3.2 Determinação dos Grupos.....	35
3.3 Material de Implante.....	38
3.4 Instalações.....	38
3.5 Procedimentos cirúrgicos.....	39
3.6 Coleta de dados e materiais.....	47
3.6.1 Retirada do Espécime Cirúrgico.....	47
3.6.2 Análise Morfométrica.....	50
3.6.3 Análise Microbiológica.....	52
3.6.4 Análise Histológica.....	53
3.6.5 Análise Termogravimétrica.....	56
3.7 Análise estatística.....	60
4 RESULTADOS.....	62
4.1 Peso dos animais.....	63
4.2 Análise morfométrica.....	67
4.2.1 Macroscopia da Uretra.....	67
4.2.2 Macroscopia do Enxerto.....	69
4.2.3 Circunferência Uretral.....	73
4.3 Análise microbiológica.....	75
4.4 Análise histológica.....	80
4.5 Concentração de colágeno.....	102
4.6 Análise termogravimétrica.....	111
5 DISCUSSÃO.....	124
5.1 Caracterização da casuística utilizada.....	125
5.2 Enxerto sintético.....	129

5.3 Microbiologia.....	140
5.4 Histologia.....	146
5.5 Análise do colágeno.....	151
5.6 Análise termogravimétrica.....	154
5.7 Considerações finais.....	157
6 CONCLUSÃO.....	158
7 ANEXOS.....	161
8 REFERÊNCIAS.....	164

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação estrutural do polímero de silicone.....	9
Figura 2 - Reação de cura típica do silicone.....	9
Figura 3 - Reação de produção dos poliuretanos.....	16
Figura 4 - Características de uma curva TG de uma reação de decomposição térmica em etapa única.....	29
Figura 5 - Curva TG e curva DTG de reação de decomposição térmica em etapa única.....	29
Figura 6 - Aspecto cirúrgico da dissecação da uretra.....	44
Figura 7 - Aspecto cirúrgico do implante na uretra de Si-Pu do grupo Experimental.....	45
Figura 8 - Aspecto final do implante do enxerto uretral.....	46
Figura 9 – Aspecto da coleta de material.....	49
Figura 10 – Medida da circunferência da uretra.....	52
Figura 11- Espécime da uretra encaminhada para análise histológica.....	58
Figura 12 - Analisador termogravimétrico Thermogravimetric Analyser TGA-51 – Shimadzu, com transdutor e célula de medida.....	59
Figura 13 – Porcentagem de extrusão do implante.....	68
Figura 14 - Aspecto macroscópico da uretra dos animais que apresentaram extrusão do implante.....	69
Figura 15 - Aspecto dos implantes que não apresentaram descolamento de suas extremidades.....	72
Figura 16 - Infecção da uretra na área manipulada por grupo estudado. O grupo Controle não apresentou infecção da uretra.....	78

Figura 17 – Distribuição da ocorrência de infecção pelo tipo de microorganismo infectante.....	78
Figura 18 – Análise histológica da uretra de animal do grupo E-A com coloração HE.....	82
Figura 19 – Análise histológica da uretra de animal do grupo E-A com coloração TM.....	83
Figura 20 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-B com coloração HE.....	85
Figura 21 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-B com coloração TM.....	86
Figura 22 – Aspecto da parede uretral do coelho do grupo E-B, que apresentou expulsão total do implante.....	87
Figura 23 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-C com coloração HE.....	88
Figura 24 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-C com TM e HE.....	89
Figura 25 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-D com coloração HE.....	91
Figura 26 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-D com coloração TM.....	92
Figura 27 - Análise histológica da uretra de animal do grupo S-A com coloração TM.....	95
Figura 28 – Análise histológica da uretra de animal do grupo S-B com coloração HE.....	96
Figura 29 – Análise histológica da uretra de animal do grupo S-B com coloração TM.....	97
Figura 30 – Análise histológica da uretra de animal do grupo S-C com coloração TM.....	97

Figura 31 – Aspecto histológico da uretra do coelho do grupo S-D.....	98
Figura 32 – Aspecto da histologia da uretra de coelho do GC.....	100
Figura 33– Intensidade do processo inflamatório subepitelial dado por escore.....	101
Figura 34 – Aspecto das lâminas da uretra de coelhos do grupo Experimental, coradas com PR.....	103
Figura 35 – Aspecto das lâminas da uretra de coelhos do grupo <i>Sham</i> , coradas com PR.....	104
Figura 36 – Aspecto das lâminas da uretra de coelhos do grupo Controle, coradas com PR.....	105
Figura 37 – Aspecto da área de trabalho oferecida pelo programa ImageLab 2.4, para análise do espectro de cores de lâminas.....	105
Figura 38 – Porcentagem média de colágeno encontrado na submucosa de cada um dos grupos estudados e respectivo desvio padrão.....	107
Figura 39 – Espessura da parede da uretra para os diferentes grupos, obtidos por medida das lâminas corada com TM em aumento de 40x.....	110
Figura 40 - Curvas de TG e DTG com a temperatura do início da perda de massa pelos diferentes grupos.....	113
Figura 41 - Sobreposição das curvas TG e DTG da amostra de fragmento da folha de Si-Pu e amostra do implante em diferentes intervalos de tempo.....	114
Figura 42 – Curvas TG/DTG obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar da amostra E-A5.....	117
Figura 43 - Sobreposição das curvas TG e DTG (detalhe) obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar das amostras E-A1 a E-A5.....	117

Figura 44 – Curvas TG/DTG obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar da amostra E-B2.....	118
Figura 45 – Curvas TG/DTG obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar da amostra E-C5.....	118
Figura 46 – Curvas TG/DTG obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar da amostra E-D4.....	119
Figura 47 – Curvas TG/DTG obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar da amostra da folha silicone/poliuretana.....	119
Figura 48 - Gráfico evolutivo de tempo da espessura da parede uretral, da concentração de colágeno, do índice de medidas da circunferência da uretra média/uretra distal e da intensidade da inflamação do grupo Experimental.....	153
Figura 49 - Gráfico evolutivo de tempo da espessura da parede uretral, da concentração de colágeno, do índice de medidas da circunferência da uretra média/uretra distal e da intensidade da inflamação do grupo <i>Sham</i>	154

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação do enxerto quanto à origem do material constituinte predominante.....	5
Tabela 2 - Exemplos materiais aloplásticos utilizados como substitutos no trato urinário e o órgão substituído.....	8
Tabela 3 - Métodos usados para a análise do cálculo renal.....	24
Tabela 4 - Análise do peso inicial dos diferentes grupos.....	64
Tabela 5 - Variação da média de peso dos animais do grupo Experimental e do grupo <i>Sham</i> entre a cirurgia e o sacrifício.....	65
Tabela 6 - Estudo estatístico da variação de peso entre a intervenção e a morte	66
Tabela 7- Descolamento do implante da uretra por grupo de intervalo de tempo.....	71
Tabela 8 – Análise estatística da área descolada do enxerto entre o grupo E–A e o grupo E-D.....	71
Tabela 9 - Relação das medidas da circunferência uretral na área manipulada vs área distal a manipulação – índice M/D.....	74
Tabela 10 - Valores de P para a análise da circunferência da uretra proximal vs uretral distal através do teste de Mann-Whitney para duas amostras.....	74
Tabela 11 - Resultado da análise microbiológica de material colhido da área manipulada da uretra do coelho e equivalente no grupo Controle.....	77

Tabela 12 – Medidas de tendência da variação do peso dos animais quando correlacionada com o tipo de bactéria causadora de infecção.....	79
Tabela 13 – Análise estatística da associação: infecção uretral vs circunferência da uretra na área manipulada. Comparação entre a ausência de infecção e a cultura positiva para <i>Staphylococcus DNAse negativa</i>	80
Tabela 14 - Concentração de colágeno na uretra da área submetida a manipulação – nos grupos Experimental e <i>Sham</i> - e área equivalente no grupo Controle.....	106
Tabela 15 - Espessura da parede da uretra na área manipulada – para os grupos Experimental e <i>Sham</i> - e na área equivalente do grupo Controle.....	109
Tabela 16 – Medidas de tendência central e dispersão referentes TG para de perda de massa do implante e da placa de Si-Pu para a temperatura de 700°C, em atmosfera dinâmica de ar.....	116
Tabela 17 – Dados obtidos pela TG para perda de massa pelo implante para temperatura acima de 700°C, em atmosfera dinâmica de ar.....	121
Tabela 18 – Valores de P na comparação entre os grupos nas diferentes variáveis avaliadas.....	122
Tabela 19 – Exemplos de materiais sintéticos utilizados em reconstruções do trato urinário, sua aplicação e as principais complicações relacionadas ao seu uso.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	- Grau Celsius
Cap	- capítul
DP	- Desvio Padrão
Dr.	- Doutor
DTG	- Derivada da Curva de Termogravimetria
E-A	- amostra do grupo experimental coletada após 2 semanas do implante
E-B	- amostra do grupo experimental coletada após 4 semanas do implante
E-C	- amostra do grupo experimental coletada após 8 semanas do implante
E-D	- amostra do grupo experimental coletada após 24 semanas do implante
Ed.	- edição
et al	- e outros
F	- French
FM	- Faculdade de Medicina
g	- grama
G	- Gauge
GC	- Grupo Controle
GE	- Grupo Experimental
GS	- grupo <i>Sham</i>
HE	- Hematoxilina e Eosina

ID	- índice de descolamento
kg	- quilograma
LIM	- Laboratório de Investigação Médica
mg	- miligrama
mL	- mililitro
mm	- milímetro
N	- número total de indivíduos de uma amostra
NZW	- New Zealand White – raça de coelhos
P	- valor P, significância estatística em um teste
PET	- tereftalato de polietileno (Dacron®)
PR	- Picrosirius red
Prof.	- professor
p/v	- peso/volume
PTFE	- politetrafluoroetileno (Teflon™, Gore-tex™)
S-A	-amostra do grupo <i>sham</i> coletada após 2 semanas do implante
S-B	-amostra do grupo <i>sham</i> coletada após 4 semanas do implante
S-C	-amostra do grupo <i>sham</i> coletada após 8 semanas do implante
S-D	-amostra do grupo <i>sham</i> coletada após 24 semanas do implante
Si-Pu	- silicone-poliuretano
SP	- Estado de São Paulo
TDA	- toluene-diisocianato diamina
TG	- termogravimetria
TM	- Tricrômico de Masson
USP	- Universidade de São Paulo

μm	- Micrômetro
vs	- <i>versus</i>
σ	- Desvio Padrão
®	- Marca Registrada
%	- Por cento ou porcentagem
>	- maior que
<	- menor que
=	- igual a

RESUMO

RESUMO

Nogueira MP. *Uso do silicone e poliuretano na uretroplastia dorsal: estudo experimental em coelhos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 185p.

INTRODUÇÃO: O tratamento cirúrgico das estenoses uretrais com enxertos limita-se ao emprego de materiais orgânicos, mais freqüentemente auto-enxertos. O sucesso no uso de biomateriais sintéticos em diferentes áreas da medicina motivou a pesquisa desses materiais na reconstrução uretral. A informação de que o uso de prótese mamária de silicone recoberta com espuma de poliuretano revelou menor retração cicatricial que as próteses convencionais e o fato desses polímeros já serem empregados como elastômero na confecção de cateteres urinários, levou à escolha deste material para estudo. **MÉTODOS:** Foi realizada a ressecção de segmento dorsal da uretra anterior de 20 coelhos machos NZW. O defeito uretral foi tratado com o implante no leito uretral dorsal de uma placa não tubularizada de silicone, revestida externamente com espuma de poliuretano (Si-Pu). Como controle foi confeccionado o grupo *Sham* (GS) com 12 animais. Este grupo foi submetido à uretrotomia dorsal longitudinal e uretrorrafia, sem qualquer tipo de implante. As análises foram feitas com 2, 4, 8 e 24 semanas após a cirurgia. Analisaram-se alterações da circunferência da uretra e complicações cirúrgicas. Fez-se estudo histológico com coloração de Tricrômico de Mason, Hematoxilina-eosina e Picrosírius red. Foram avaliadas: intensidade e características da resposta inflamatória, espessura da parede da uretra (edema) e concentração do colágeno na submucosa da uretra. Foi realizada análise microbiológica e pesquisa de incrustação do implante por termogravimetria. Os achados foram comparados com os dados de três coelhos que não sofreram qualquer intervenção. **RESULTADOS:** Não foram encontradas fístulas, estenoses, obstrução,

calcificação, retração cicatricial ou deiscências. Ocorreu expulsão do implante em 1/5 dos animais após 4 semanas, em 2/5 com 8 semanas e em 3/5 com 24 semanas. Não houve redução da circunferência da uretra na comparação entre os grupos Experimental (GE) e GS, exceto para o intervalo de 8 semanas. Ocorreu infecção do sítio cirúrgico em 11 de 12 animais do GS e em 13 de 20 animais do GE. As bactérias mais comumente encontradas foram *Staphylococcus DNase negativa* (9/32) e *Escherichia coli* (5/32). A presença de infecção por *Enterobacter cloacae* foi acompanhada de menor ganho de peso pelos animais ($P=0,02$), fato não observado na infecção com outras bactérias. A circunferência uretral foi maior ($P=0,006$) na vigência de infecção por *Staphylococcus* do que nas amostras estéreis. A histologia do GE mostrou processo inflamatório severo e substituição das fibras musculares da lâmina própria por colágeno com regressão do edema e das células inflamatórias, tardiamente. No GS ocorreu deposição tardia de colágeno e inflamação leve, porém constante. Houve re-epitelização da uretra nos dois grupos. A concentração de colágeno na área manipulada foi maior apenas na comparação entre os GE e GS com 24 semanas ($P<0,001$). O edema da parede uretral foi maior no GE que no GS nos intervalos de 2 semanas e de 4 semanas com $P<0,001$, e após 8 semanas com $P<0,05$. Após 24 semanas não se verificou diferença entre as espessuras da submucosa. Na análise descritiva da termogravimetria observou-se incrustação de material orgânico no implante, que não se mostrou significativa estatisticamente na análise quantitativa de perda de massa. A incrustação de material inorgânico ao implante foi desprezível. CONCLUSÕES: O uso do Si-Pu leva à formação de cápsula colágena que permite a re-epitelização da uretra sem ocasionar retração local, funcionando como um biomolde, porém a expulsão do implante limita seu uso.

Descritores: Poliuretanos; Silicones; Uretra/cirurgia; Coelhos

SUMMARY

SUMMARY

Nogueira MP. *The silicone and polyurethane used in dorsal on lay urethroplasty: experimental study in rabbits* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 185p.

BACKGROUND: Actually, the treatment of urethral stenosis employs biological grafts, usually autologous grafts. The success with synthetic biomaterials in others medical specialty's motivated the search of these materials in urethral reconstruction. The knowledge about the silicone mamarian prosthesis covered with polyurethane foam reduces capsular contracture in breast implants and because these polymers are already used in the urinary tract like catheters make the choice for these materials.

METHODS: The resection of dorsal segment of anterior urethra of 20 male rabbits NZW was carried through. The urethral defect was treated with the on lay dorsal graft in urethra, compound a silicone not tabularized, coated with polyurethane foam in one face (Si-Pu). The control group (sham) was confectioned with 12 animals was submitted to longitudinal dorsal uretrotomy and suture, without any type of implantation (SG). The analyses intervals were 2, 4, 8 and 24 weeks after surgery. The circumference of urethra and surgical complications had been analyzed. Material for histological evaluation was stained with Masson's trichrome, hematoxylin and eosin and Picrosirius red. Intensity and characteristics of the inflammatory response, thickness of the urethra (oedema) and concentration of the collagen in the submucosa had been evaluated. Still, was performed microbiological analysis and research of implants incrustation with thermogravimetry. The findings had been compared with the data of three rabbits that had not suffered any intervention.

RESULTS: The morfological analysis not founded fistula, obstruction, stenosis, cicatricial retraction, calcification and dehiscence. The graft was extruded after 4 weeks in 1/5 of the animals, in 2/5 after 8 weeks and after 24 weeks, 3/5 of the animals had failure of union with the surrounding tissue. Except for the interval of 8 weeks, It did not have urethral

circumference reduction in the comparison between groups, Experimental (EG) and SG. Infection of the surgical place occurred in 11 of 12 animals of the GS and in 13 of 20 animals of EG. *Staphylococcus DNase-negative* and *Escherichia coli* were the most frequent bacterium founded, and occurred in 9/32 and 5/32, respectively. The infection with *Enterobacter cloacae* was associated to lesser weight gain for the animals ($P=0,02$), fact not observed in infection with other bacteria. The *Staphylococcus* infection was associated to larger urethral circumference ($P=0,006$), when compared to sterile samples. The EG histological analysis showed early severe inflammatory process and substitution of smooth muscle fibers for collagen and regression of edema and inflammatory cells decrease laterly. Occurred delayed deposition of collagen and slight inflammation in the SG, however this process was constant. Was observed urothelial reepithelialization in both groups. The collagen concentration in urethral wall at surgical site was larger in EG with 24 weeks when compared to SG at same time ($P< 0.001$). There was significantly less urethral wall oedema in SG at 2 weeks, at 4 weeks ($P< 0.001$) and after 8 weeks ($P< 0,05$) than EG at the same time. After 24 weeks no difference was verified in submucosa thickness between the groups. The descriptive thermogravimetric analysis showed graft incrustation with organic material, however without statistic significance in quantitative analysis of mass loss. The inorganic graft incrustation was negligible. CONCLUSIONS: The use of Si-Pu implants in urethra originated a fibrous collagen capsule that allows reepithelialization without local contracture, like a biological skeleton. Nevertheless, grafts extrusion limits their clinical employment.

Descriptors: Polyurethanes; Silicones; Urethra/ surgery; Rabbits

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As cirurgias reconstrutivas - área da medicina que engloba diferentes especialidades e diferentes sistemas orgânicos – vêm sofrendo avanços importantes nas últimas décadas, seja em relação ao desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas ou na pesquisa e desenvolvimento de novos materiais empregados como substitutos de órgãos e tecidos – permanente ou temporariamente.

Das cirurgias reconstrutivas, aquelas do sistema geniturinário mostram-se particularmente desafiadoras, uma vez que a via excretora urinária é constituída de estruturas tubulares de paredes finas - revestidas internamente por epitélio de transição apoiado em lâmina própria de tecido conjuntivo, sem tecido submucoso¹ e diâmetro, por vezes, diminuto, transportando líquido com grande variação de acidez e repleto de solutos capazes de se cristalizar.

Entre as diferentes porções da via excretora urinária, a reconstrução da uretra masculina representa um repto de grandes dificuldades. O óbice na obtenção de resultados adequados com este tipo de cirurgia é mais bem representado pela quantidade de artigos publicados a cada ano, explorando novas técnicas de reconstrução. Como ilustração, de 1965 a 2002 foram publicados 3.500 trabalhos sobre correção de hipospádias e estenoses de uretra.²

As características da uretra masculina que geram dificuldade em sua reconstrução englobam a excepcionalidade de ser asséptica mesmo mantendo contato com o meio externo - e da alta susceptibilidade de sua parede quando da presença de infecção – o fato de ter epitélio e lâmina própria sem submucosa e de ser envolta por tecido esponjoso na maior parte de sua extensão.

O tecido esponjoso, embora tenha função de proteção, torna-se fator complicador quando ocorre solução de continuidade do epitélio uretral e expõe o tecido esponjoso a extravasamento de urina, hematomas e infecção. Estas agressões ao corpo esponjoso ocasionam espongiofibrose, geralmente de extensão proximal e distal maior que a lesão observada na luz uretral e maior que a própria área de estenose.^{3,4} Para o adequado tratamento do defeito uretral toda a fibrose do tecido esponjoso deve ser ressecada.⁵ A resultante dessa ressecção – espongiofibrose e defeito uretral - é a área a ser reconstruída pelo cirurgião.

A reconstrução da área ressecada pode ser realizada por anastomose término-terminal primária da uretra ou uretroplastia por substituição. A primeira é limitada a defeitos menores que 1 cm de extensão - devido ao risco de ocasionar curvatura peniana ventral causada pelo encurtamento uretral, ao se tentar a anastomose primária de extensões maiores, além da tensão observada na área da anastomose. A última constitui-se na reconstrução da uretra com uso de enxertos ou retalhos.

1.1 Enxertos

Na prática clínica, diferentes tipos de materiais foram ou são utilizados como enxertos, de metais a materiais sintéticos, de tecidos vivos retirados de doadores a material orgânico fabricado em laboratório. Uma das maneiras de se classificar estes materiais é quanto a sua origem, conforme mostrado na Tabela 1.

Atualmente, os mais utilizados na prática médica têm sido os auto-enxertos, entre eles, o principal é a mucosa oral.⁸ A popularidade deste material deve-se a facilidade de acesso a área doadora na maioria dos casos e à baixa taxa de recorrência da lesão uretral e complicação da área doadora quando comparada a outras técnicas.⁹

Apesar da ausência de antigenicidade ou reação de corpo estranho, os autoenxertos apresentam limitações de disponibilidade da área doadora e complicações não infreqüentes, como: formação de cistos e divertículos, retenção de anexos de pele; infecção da pele enxertada; crescimento de pêlos; formação de cálculos; cicatrização tardia com contração do enxerto.¹⁰

Há ainda a necessidade de cuidados da área doadora com o enxerto autólogo. O uso de mucosa oral, por exemplo, apresenta como complicações locais precoces: 4% de sangramento, 12% de dor e 42% de edema, além de ocasionar parestesia na região doadora do cavo jugal em 34%¹¹ a 100%¹² por até seis meses após a retirada do enxerto.

As complicações com o enxerto autólogo têm motivado a pesquisa de novos materiais para uso em uretra. As pesquisas têm apontado para o uso de matriz de colágeno, como biomaterial de substituição. Esses moldes acelulares podem ser autólogos - confeccionados por engenharia de tecidos - e homólogos - obtidos a partir da uretra de cadáveres. Ainda necessita-se de maiores estudos clínicos para redução de seus custos e a viabilidade de sua aplicação na rotina médica.¹³

Tabela 1 - Classificação do enxerto quanto a origem do material constituinte predominante.

Materiais	Definição	Exemplos
Aloplásticos (implantes sintéticos)	Não absorvíveis	Material estranho e biologicamente inerte usado para aumentar ou reconstruir partes do organismo. Silicone ¹⁴
	Absorvíveis	Material estranho que serve de suporte para a cicatrização e crescimento de tecido do hospedeiro. Poli-tetra-fluoroetileno – Teflon ¹⁵ , biomatriz de colágeno ¹⁶
Orgânicos	Auto enxertos (autólogo)	Enxerto livre, transferido de um local para o outro, no mesmo indivíduo. Túnica vaginal ^{17, 18} , pele de prepúcio ¹⁹ , mucosa oral ⁷ , matriz colágena
	Isoenxertos	Enxerto livre transferido de um indivíduo para outro geneticamente idêntico (gêmeos univitelinos)
	Homoenxertos (aloenxerto)s	Enxerto transferido de um indivíduo para outro geneticamente diferente, mas da mesma espécie. Matriz acelular de uretra de cadáver ¹³
	Heteroenxertos (xenoenxertos)	Enxertos transferidos de um membro de uma espécie para outro de outra espécie. Dura máter liofilizada de humanos implantada em cães ¹⁵ , matriz acelular da camada submucosa de intestino delgado de porco (SIS) ¹⁶

FONTES: Patrocínio LG e Patrocínio JA. 2001⁶ ; Gabrich et al. 2003⁷

1.1.1 Implantes urinários

A utilização de material sintético em reconstrução uretral, na atualidade, se faz ainda de maneira experimental. São usados, basicamente, enxertos na forma de moldes de colágeno, conhecido como biomolde¹⁶, enquadrados como biocompatíveis e biodegradáveis.

O uso de material inabsorvível no trato urinário limita-se a constituinte de material de derivação temporária como sondas, drenos, cateteres e dispositivos periuretrais para continência urinária. Pouco se tem pesquisado o material aloplástico como enxerto. A Tabela 2 mostra exemplos de materiais sintéticos que já tiveram sua utilização no trato urinário, seja clínica ou experimentalmente. Vale observar que as pesquisas com estes materiais são raras atualmente e mais freqüentes na década de 70, mostrando um abandono de interesse por esses materiais.

1.1.2 Silicone

Dos materiais sintéticos utilizados na confecção de cateteres e próteses no trato urinário tem destaque o silicone.^{39, 40, 41, 42, 43, 44, 45} Sintetizado por volta de 1 900 pelo cientista alemão Wöhler, o silicone é um polímero composto por matriz inorgânica de silício e oxigênio (... -Si-O-Si-O-

Si-O-...) intercalado com grupos orgânicos - metil, etil e fenil - ligados ao átomo de silício tetravalente, cuja fórmula química é $[R_2SiO]_n$, onde o R é a denominação dos grupos orgânicos, como ilustrado na Figura 1A. O silicone é obtido pela transformação da areia de quartzo em silício metálico quando submetida à alta temperatura. O silício é quimicamente transformado em silanos e siloxanos, matérias-primas destinadas à fabricação dos polímeros. Variações no tamanho da cadeia -Si-O-, nos grupos laterais e nas ligações transversais fornecem diferentes propriedades químicas e físicas ao polímero, como óleo de silicone – moléculas menores - gel de silicone ou elastômero de silicone – moléculas maiores com ligações cruzadas semelhantes às encontradas no quartzo, no vidro e na areia (Figura 1B e 1C). Como características principais, o elastômero resiste a temperaturas extremas – de -80°C a $+400^{\circ}\text{C}$ - não contém nenhum outro aditivo ou amaciante, é resistente a decomposição pela água, agentes oxidantes e ozônio, com inércia química e fisiológica, é moldável e elástico, com baixa deformação permanente, resistindo à tração, estiramento e compressão, além de possuir propriedades condutivas e isolantes. A Figura 2 representa a reação de cura típica do polímero.

Tabela 2 - Exemplos materiais aloplásticos utilizados como substitutos no trato urinário e o órgão substituído

Investigador	Aplicação	Material
Lord e Eckel (1945) ²⁰	Bexiga	Vitallium™ (60% cobalto, 20% cromo, 5% molibdênio e outros metais)
Kudish (1957) ²¹	Cistoplastia	Esponja de polivinil
Swinney (1961) ²²	Trato urinário	PTFE
Blum et al (1969) ²³	Implante vesical e substituto ureteral	Silicone, Látex, PTFE
Dressler e Many (1969) ²⁴	Bexiga	Silicone revestido por veludo de nylon
Stanley et al (1971) ²⁵	Bexiga	Elastômero de silicone revestido por veludo de PET
Kelâmi et al (1971) ¹⁵	Uretra	Dura-máter, PET revestido de colágeno
Hakky (1976) ²⁶	Uretra	PET e “tubo fibrótico”
Hakky (1977) ²⁷	Uretra	PET siliconizada
Abbou et al (1977) ²⁸	Bexiga	Silicone
Block et al (1977) ²⁹	Ureteres	PTFE revestido por gel hidrofílico de metacrilato
Bergman et al (1978) ³⁰	Ureteres	PET, Ácido láctico poli L (-)
Kline et al (1978) ³¹	Bexiga	PET revestido de poli éter uretano
Palleschi e Tanagho (1978) ³²	Uretra	Silicone revestido de PET
Dreikorn et al (1979) ³³	Uretra	PTFE
Totoro et al (1981) ³⁴	Ureter	Poliuretano
Varady et al (1982) ³⁵	Ureter	PTFE expandido
Anwar et al (1984) ³⁶	Uretra	PTFE
Olsen et al (1992) ³⁷	Uretra	Poligalactina (PGA) revestida com ácido polihidróxibutírico (PHB)
Italiano et al (1997) ³⁷	Uretra	Benzil Ester de ácido hialurônico (Hyaff-11®) - absorvível

Dessas características, o silicone é moldável e inabsorvível, além de permitir fácil esterilização. Possui outras propriedades requeridas aos biomateriais como pouca hidrofília, baixo grau de degradação em sistemas biológicos, elasticidade e, particularmente importante ao sistema urinário, baixa reatividade na presença de urina.⁴⁶ A importância médica do silicone pode ser facilmente aferida com uma pesquisa simples em sites de busca de informação em saúde. Em março de 2008, a pesquisa do termo *silicone* no site de busca PubMed (www.pubmed.gov) do *National Center for Biotechnology Information*, encontrou pelo menos 4700 publicações nos últimos cinco anos.

Possui, ainda, um baixo coeficiente de fricção cinética com a uretra quando comparado com o látex – sabendo-se que quanto maior o atrito do cateter com a uretra, maior é a abrasão local, e maior a susceptibilidade a invasões por microorganismos ou formação de estenose.⁴⁷

Em relação à reatividade tecidual, o silicone apresenta menor indução de reação inflamatória na mucosa uretral comparativamente ao látex⁴³, látex siliconizado, látex revestido com hidrogel⁴², látex revestido com polímero de tetrafluoretileno, polivinil clorídrico (PVC) e poliéster-poliuretano.⁴⁸ Ilustrativamente, em trabalho clássico, Talja et al. (1986)⁴⁹ observaram a ocorrência de estenose de uretra em pacientes submetidos a circulação extra-corpórea com hipotermia causada pela eliminação de produtos químicos tóxicos por dissolução dos cateteres de látex, potencializando lesão celular por ativação da cascata do complemento, com acúmulo de granulócitos polimorfonucleares no epitélio uretral e no espaço

subepitelial, causando desestruturação tecidual e fibrose da uretra. A investigação com sondas de outros materiais, os autores verificaram que estas alterações não ocorrem com o uso de sondas de silicone.

Porém o silicone não é isento de causar inflamação. Antes disso, ele induz a reação inflamatória uretral⁵⁰ independente do tempo de contato com o tecido,^{42, 51} composta principalmente por granulócitos eosinofílicos e granulócitos neutrofílicos. A resposta imune ao silicone compreende principalmente fagocitose macrofágica; com pouca resposta linfocitária.

Em outros tecidos, que não o trato urinário, o implante de prótese de elastômero de silicone preenchida com gel de silicone demonstrou uma resposta não uniforme ao implante, com reação granulomatosa de diferentes intensidades ao longo da sua superfície.⁵¹ Este processo inflamatório origina-se do aumento da permeabilidade vascular resultante da interação do silicone da superfície com complexos protéicos do hospedeiro. A intensidade da inflamação também mostrou ser independente do tempo de implantação.

Particularmente na uretra, a colonização bacteriana aos materiais sintéticos apresenta importante papel na resposta inflamatória.⁴³, sendo imputado até como o principal fator na gênese da inflamação, independente do tipo de substância constituinte do implante.⁴⁸

Portanto, além das características citadas para um enxerto aloplástico ideal, o implante na uretra necessita de baixa adesão bacteriana ao material. Alguns autores, em estudo comparativo entre diferentes cateteres de drenagem vesical, verificaram que cateteres fabricados com

silicone puro mostraram ser uma opção melhor que o látex,⁴³ que o látex tratado com prata, que o látex revestido com hidrogel e que o látex siliconizado para a colonização por *Proteus mirabilis* e conseqüente incrustação de cristais.⁵²

O contato com a urina exige que os implantes uretrais tenham mais uma característica: ausência de cristalização dos solutos urinários em sua superfície. Mais uma vez o silicone mostrou menores índices de incrustação quando em contato com a urina em comparação com cateteres de látex, látex revestido de teflon⁵³ e látex coberto com hidrogel,⁵⁴ - apesar de dados discordantes quanto à ação do hidrogel na prevenção da cristalização, sendo a hidrofília deste material um fator protetor.⁴²

Finalmente, a biossegurança do silicone – não tóxico a não alergeno - pode ser observada em trabalhos como o de Pflüger e Stachelberger (1982)⁵⁵, que, observando a constrição cicatricial e a indução de proliferação de miofibroblastos em pacientes com extravasamento de silicone de implantes, formularam a hipótese de dispersão de moléculas de silicone dos cateteres uretrais como responsáveis pela indução de estenose uretral após sondagem uretral. Implantando pedaços de sonda de silicone no subcutâneo e no intra-peritoneo de ratos e, com a análise dos tecidos adjacentes ao implante por microscopia eletrônica e EDXA (microanálise por dispersão de raio-X) não encontraram partículas de silicone após seis e 12 semanas do implante. Assim, afastaram a hipótese de ser o silicone o responsável pela ocorrência de estenoses de uretra pós sondagem vesical de demora e

verificaram que não ocorre dispersão de moléculas de silicone a partir de elastômero.

Janowski et al⁵⁶, em estudo de meta-análise realizada em 2000, refutaram a possível associação de implantes de silicone com doenças do tecido conjuntivo – tanto isoladas quanto em conjunto - ou com outras patologias reumáticas ou autoimunes.

Outra extensa revisão realizada por Briton e Brown (1997)⁵⁷, buscando analisar a associação entre câncer e implantes mamários de silicone, sugere que o risco de câncer de mama pode estar reduzido entre as mulheres portadoras de implante mamário, e que, aquelas que desenvolvem câncer da mama não apresentam tumores mais agressivos ou avançados, nem de prognóstico pior.

A correlação entre sarcomas – resultado de carcinogênese de corpo estranho - e tumores hematogênicos – por alteração imune - com implantes de silicone foi observada em animais de laboratório.⁵⁷ Porém, revisões recentes de estudos clínicos e epidemiológicos não observaram a associação em humanos do uso médico do silicone com tumores hematogênicos, sarcomas ou tumores de cérvix, vulva, pulmão e cérebro.⁵⁸

Como substituto da uretra, o silicone foi usado pela primeira vez em 1950 por Nicola⁵⁹, para tratamento de estenose complexa da uretra, quando a uretra posterior em um homem foi totalmente substituída por uma prótese tubular de silicone com sucesso.

Na década seguinte ocorreram outros relatos de sucesso experimental e clínico - com humanos e animais - em reconstruções uretrais

para correção da estenose da uretra empregando implantes de silicone, sempre com moldagem tubuliforme.^{60,61, 62}

Na década de 70, encontramos novamente trabalhos experimentais que empregaram o implante tubuliforme de silicone para reconstrução uretral em cães⁴⁶ e gatos⁶³ e o uso clínico em humanos.⁶⁴ Utilizou-se também o silicone como substituto vesical.⁶⁵ Todos estes pesquisadores declararam como bons os resultados encontrados, apesar da frequência elevada de complicações como fístulas, extrusão das próteses, infecção local e formação de cálculos.

Nas décadas de 80 e 90, o implante de silicone no trato urinário, além do seu uso em cateteres de drenagem, ficou restrito a confecção experimental de reservatórios e substitutos ureterais em animais.^{66, 67} E nos últimos oito anos, o silicone na porção final do trato urinário foi utilizado na forma de injeção e na confecção de fitas e esfíncteres para o tratamento da incontinência urinária, sempre em situação periuretral – nunca em contato com a luz uretral.

Em outras áreas da medicina o silicone tem sido amplamente estudado e empregado, puro ou associado a outros polímeros, mostrando biossegurança⁵⁶ e biocompatibilidade⁵⁷ em diferentes usos.

1.1.3 Poliuretano

O poliuretano na prática médica tem sido pesquisado intensamente, com os primeiros trabalhos sobre seu uso, na década de 50, como substituto ósseo⁶⁸. É considerado o “polímero ideal” para aplicações biomédicas devido suas excelentes propriedades de durabilidade, elasticidade, resistência a fadiga mecânica, complacência, biocompatibilidade e propriedade de modificação de espessura e superfície por modificação do balanço hidrofóbico/hidrofílico, além de fácil manufatura. Atualmente ele toma parte desde a confecção de bolsas de coleta de sangue, cateteres vasculares e urinários, enxertos vasculares, até coração totalmente artificial.⁶⁹

O poliuretano é um polímero constituído de uma cadeia de unidades orgânicas unidas por ligações de uretano. A principal reação de produção de poliuretano engloba um reagente, um [catalisador](#) e materiais para o controle da estrutura das células, como os [surfactantes](#)⁶⁸. É o reagente que vai determinar as características do poliuretano – como ser termoplástico ou não. Assim, ao usarmos um [diisocianato](#) - na forma alifática ou aromática – ou diamina teremos um segmento duro de poliuretano; para obtermos segmentos “moles” de poliuretano usa-se terminal poliol - como o [etilenoglicol](#), [1,4 butanodiol](#), [dietilenoglicol](#), [glicerol](#) ou [trimetilol propano](#) - ou hidroxil, ou ainda amina, [poliéster](#), poliéter, policarbonato e hidrocarbono. Os seguimentos duros e moles podem ser utilizados em conjunto na

composição de um único dispositivo, aproveitando-se as qualidades de cada um dos seus componentes⁶⁹. A reação de produção do poliuretano está ilustrada na Figura 3. O uso do surfactante é imprescindível para a confecção da espuma de poliuretano. Esta é geralmente feita com a adição de pequenas quantidades de materiais voláteis, chamados de agentes de sopro, à mistura reacional. Tais materiais podem ser substâncias químicas voláteis e simples - como a [acetona](#) ou o [cloro de metileno](#) - ou [fluorocarbonetos](#) mais sofisticados – os quais conferem características importantes, como o isolamento térmica. A porosidade da espuma de poliuretano, bem como alterações da sua superfície são capazes de mediar ativamente ou controlar a inflamação associada ao implante e intrusão dos biomateriais.⁶⁹

Figura 3 - Reação de produção dos poliuretanos, onde uma cadeia orgânica se liga a um catalizador por ligação de uretano (CO₂).

A espuma de poliuretano utiliza, na sua confecção, o tolueno diisocianato em reação rápida com poliol na presença de amina. Como consequência, na degradação da espuma de poliuretano, encontramos 2,4 e 2,6–toluene-diisocianato diamina ou TDAs - produto químico também chamado de Toluenediamina 2,4.⁷⁰ As TDAs liberadas mostraram-se carcinogênicos em animais de laboratório. Em camundongos levou a câncer de fígado, ovários, baço, tecido celular subcutâneo e peritônio; em ratos ocasionou câncer de pâncreas e fígado e fibrossarcoma de mama. Há evidências do aumento dos índices de câncer quando 2,4-TDA é injetado no tecido subcutâneo, pintado na pele ou adicionado a dieta.⁷¹ Ainda, a inalação de TDAs por trabalhadores de indústrias que fabricam o poliuretano, é um importante causador de asma ocupacional.⁷⁰

Em humanos, a espuma do poliuretano é utilizada desde 1970 na cobertura de próteses mamárias de silicone para reduzir o risco de contraturas mamárias. Estima-se que 10% das próteses mamárias usadas nos Estados Unidos são cobertas por poliuretano.⁵⁷ Com relação ao risco de câncer por exposição ao TDA, a *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* emitiu relatório em novembro de 1995 liberando o emprego deste material – após quatro anos de suspensão do seu uso – afirmando que o risco é negligenciável, em torno de 1:1 000 000 em toda a vida, já que o volume de TDA nestas próteses é pequeno, que o valor de TDA detectado na urina das pacientes com implantes mamários com poliuretano é semelhante daquelas com prótese mamária sem poliuretano e porque não foi detectado TDA no sangue periférico daquelas pacientes.⁷²

O poliuretano induz uma reação inflamatória tipo corpo estranho homogeneamente distribuída ao redor do implante. A inflamação é mediada por interação antígeno-anticorpo, com migração de macrófagos e células gigantes multinucleadas, que fagocitam ou englobam os fragmentos de poliuretano, formando microcápsulas, que tardiamente são substituídas por fibroblastos e colágenos. Estas microcápsulas levam ao crescimento lento da fibrose e atrapalham a contração da cápsula fibrótica ao redor da prótese e levam a maior aderência do implante aos tecidos circunjacentes.⁷³

Os estudos de Bucky et al. (1994) realizado com implantes de silicone liso, silicone texturizado e poliuretano no tecido subcutâneo de coelhos mostra que o silicone texturizado gera resposta inflamatória mais intensa e induz uma cápsula fibrosa mais rígida e dura; a poliuretano gera cápsula mais macia e complacente com menor depósito de tecido fibroso e ao redor do implante de silicone liso não existe cápsula.^{74, 75}

No trato urinário, o poliuretano na forma de polímero é empregado na confecção de cateter ureteral para drenagem pielo-vesical da urina⁷⁶ e na fabricação de endoprótese uretral para tratamento paliativo da obstrução⁷⁷. Estes drenos, tanto ureterais quanto intrauretrais, sofreram obstrução por cálculos urinários ou coágulos, em média, após 110⁷⁷ a 170⁷⁶ dias. A hidrofília parece ser o fator protetor de maior importância para se evitar a incrustação do dispositivo em contato com a urina, como evidenciado quando se reveste estes cateteres com hidrogel.⁷⁶

Em comparação ao silicone, há trabalhos mostrando que o poliuretano é mais bioestável, com menores taxas de infecção e

incrustação,^{76,78} e outros o mostram com menor resistência a degradação oxidativa que o silicone,⁷⁹ e maior toxicidade celular *in vitro*.⁸⁰

A dificuldade na avaliação de resultados com o poliuretano como biomaterial deve-se ao fato de sua composição ser variável para diferentes empregos e para diferentes fabricantes. Ainda, o poliuretano tem suas características modificadas quando polimerizado com outras substâncias, tornando cada associação – do poliuretano com outros polímeros – como um composto único. A associação de polímeros é vantajosa, pois é possível, somar as características desejadas de cada um dos compostos, obtendo um material de maior aplicabilidade.⁶⁹

1.2 Cirurgia reconstrutiva uretral

As cirurgias reconstrutivas de uretra têm na correção da hipospádia e no tratamento da estenoses da uretra as patologias mais freqüentes. As pesquisas nas últimas décadas trouxeram avanços cirúrgicos, tanto de técnica quanto de materiais. Apesar de todo o desenvolvimento, a taxa global de sucesso das uretroplastias para estenose de uretra é de 82% em sete anos e meio, em levantamento realizado por Kesler et al em 2003¹⁰. Santucci e Al-Qudah⁹, em trabalho retrospectivo, encontraram 40% de complicações precoces e 48% de complicações tardias – destas 18% de complicações maiores.

Das mudanças técnicas que tiveram maior impacto para a melhora dos resultados das uretroplastias podemos citar a preservação de uma faixa de uretra na reparação da área estenosada. Proposta por Duckett⁸¹, a manutenção da uretra dorsal, utiliza o tecido esponjoso como suporte para estabilizar e nutrir o enxerto. Em estudo experimental em cães, El-Sherbiny *et al*⁸² encontraram 66% de re-estenose com enxerto tubular e apenas 8% de re-estenose com o enxerto tipo “*on lay*”, utilizando diferentes tipos de materiais – mucosa oral, mucosa de bexiga e pele total.

Outra modificação técnica que veio se somar à descrita acima foi proposta em 1995 e é conhecida como técnica de Barbagli.⁸³ Preconiza a fixação do enxerto na albugínea dos corpos cavernosos - na face dorsal da uretra - preservando a uretra e o corpo esponjoso ventral. As vantagens sobre o enxerto colocado na face ventral da uretra são: melhor fixação do enxerto, diminuindo riscos de migração e formação de saculações e pseudo-divertículos⁸⁴; redução do sangramento intra-operatório por menor abertura do corpo esponjoso;⁸⁵ melhor vascularização do enxerto com redução das taxas de re-estenose e fístulas urinárias.⁸⁵ Esta técnica é empregada na prática clínica em humanos com índices de sucesso na correção da estenose de 97%.⁸³ Dubey *et al*⁸⁶, comparando os resultados de uretroplastias com as técnicas *on lay* dorsal e ventral, feitas com retalhos de pele e enxertos de mucosa, encontrou 23% de gotejamento terminal *versus* 39%, 5% de disfunção ejaculatória *versus* 20% e 2,6% de pseudo-divertículos e saculações *versus* 26% entre retalho dorsal e retalho ventral, respectivamente.

Quanto ao modelo animal utilizado em cirurgias experimentais da uretra, o coelho tem sido empregado na maioria dos estudos.^{8,87,88,89} A escolha obedece os critérios para escolha do animal de experimentação citado por Leader e Padgett em 1980,⁹⁰ ou seja, ele deve reproduzir o fenômeno – lesão ou doença - a ser estudado, deve estar disponível para outros investigadores e ser facilmente adquirido, deve ser de tamanho suficiente para o experimento, obtido por biotério e manipulável pela maioria dos pesquisadores, deve sobreviver o suficiente para o período do experimento. O coelho é um animal de fácil manipulação, baixa exigência para a manutenção e de baixo custo.⁸⁸ O coelho macho possui condição anatômica que permite a instrumentação padrão da uretra e a uretra destes animais se assemelha histologicamente a uretra do homem, com um epitélio delgado amparado pelo corpo esponjoso rico em vasos sanguíneos.⁸⁷ Além disso, o diâmetro da uretra do coelho adulto é semelhante a de um menino de 12 meses.⁸⁹ Este animal mostra-se, ainda, próprio para a avaliação de biomateriais associados a infecção do trato urinário.⁸⁸

1.3 Análise Histológica

A avaliação microscópica do tecido adjacente a implantes experimentais nos traz informação do grau de agressão que o material implantado causa ao organismo receptor. A análise histológica de tecidos

submetidos a contato com material sintético pode ser feita com diferentes técnicas de coloração e microscopia. Dentre estas técnicas, a coloração basófila- acidófila por hematoxilina-eosina (HE) com avaliação por microscopia óptica permite a avaliação dos tipos de células constituintes dos tecidos, corando de azul os núcleos e de róseo o citoplasma das células. A técnica de HE não permite a avaliação de fibras colágenas, coradas também de róseo, ou de fibra elástica, já que a coloração desta é irregular.⁹¹

Exemplo de utilização da coloração HE pode ser encontrado no trabalho de Engelbart et al⁴⁸, de 1978, que utilizaram a técnica na avaliação das reações da mucosa uretral frente a diferentes cateteres. Esta avaliação permitiu aos autores graduarem as variações histológicas encontradas na uretra em (1) sem reação: uma a três pequenas áreas de epitélio desnudado e/ou hemorragia nos tecidos subjacentes, ou lâmina própria contendo poucos e dispersos leucócitos polimorfonucleares ou linfócitos; (2) reação moderada: mais de três áreas de epitélio desnudado e/ou hemorragia, ou lâmina própria com aglomerados de leucócitos polimorfonucleares ou linfócitos; (3) reação severa: alterações hipertróficas da mucosa, lâmina própria contendo grande acúmulo de linfócitos ou hemorragia envolvendo a circunferência total da parede uretral.

A coloração constituída por hematoxilina férrica, fucsina ácida e *ponceau* de xilidina e de verde-luz, conhecida como tricrômico de Masson (TM) cora o citoplasma de vermelho e as fibras colágenas de verde.⁹¹ Esta coloração é utilizada no estudo da fibrose que ocorre em processos inflamatórios.^{92,93} Ainda tem a vantagem de diferenciar fibrose de edema⁹⁴ e

a transição entre os tecidos conjuntivos.⁹⁵ Porém, a intensidade de cor é insuficiente para diferenciar o colágeno presente nas fibras colágenas daquele colágeno presente em outras estruturas, como em membrana basal e em fibras de reticulina.

O estudo com microscopia de luz polarizada serve para distinguir as substâncias monorrefringentes das substâncias birrefringentes. Permite que se conheça o arranjo e a orientação das substâncias birrefringentes em escala sub-microscópica.⁹¹ O colágeno apresenta birrefringência em luz polarizada devido à orientação de suas moléculas. Sob a coloração de picrosírius em luz polarizada, o colágeno dos cortes de tecido exhibe diferentes intensidades de birrefringências e permite, inclusive, diferenciação dos tipos de colágeno. Picrosírius é um procedimento histoquímico seletivo para detecção de colágeno em tecidos incluídos em parafina, que não utiliza impregnação metálica. A não utilização de metais, como ouro ou prata, na coloração, reduzem custos e aumentam a aplicabilidade em rotinas laboratoriais.

1.4 Análise térmica

A incrustação de material cristalino em material sintético colocado em contato com o trato urinário pode ser analisada pelas mesmas técnicas empregadas para análise dos cálculos urinários. Na tabela 3 listamos os métodos empregados para avaliação dos cálculos urinários.

Tabela 3 - Métodos usados para a análise do cálculo renal

Métodos principais	Outros métodos
Morfológico	Cristalografia
Químico	Térmica
Microscopia de polarização	Microscopia eletrônica
Difração de Raio-X	Espectometria de absorção atômica
Espectroscopia infravermelha	Espectometria - indução atômica-plasmática
	Histoquímica
	Microprobe de elétron

FONTE: Smith (1998)⁹⁶

O exame morfológico do cálculo baseia-se em fragmentação do cálculo e estudo com microscópio de dissecação, permitindo identificar o núcleo aparente e a morfologia externa e interna do mesmo. O componente cristalino é identificado pela sua aparência.⁹⁶

O método químico é considerado o mais confiável na identificação dos íons presentes. Sua limitação é a incapacidade de realização do exame com amostras de pequeno tamanho, a identificação apenas de íons e não de compostos e a impossibilidade de identificar substâncias raras,⁹⁶ além de ser um método de difícil execução e exigir laboratório especializado para sua realização⁹⁷ e baixa sensibilidade - de 58%.⁹⁸

Microscopia de polarização é usada extensivamente e reconhece o cristal pela sua configuração e birrefringência em luz polarizada. É um método dependente da experiência do examinador, altamente sensível, e que requer um segundo método para verificação dos achados.⁹⁶

A difração de raio-X determina os cristais de maneira precisa, mesmo quando vários cristais estão envolvidos na formação do cálculo. A limitação do método está na incapacidade de detectar compostos presentes em quantidade menor que 10% da amostra e por não detectar material amorfo, como fosfato de cálcio.⁹⁶

A avaliação por espectroscopia infravermelha permite a identificação não apenas de componentes cristalinos, mas também de material não cristalino, porém tem dificuldade de diferenciar as várias formas de cristais de cálcio (oxalato ou fosfato).⁹⁶

Vale ressaltar que estes métodos apresentam 12% de erro nos resultados e que 80% dos laboratórios são incapazes de analisar litíase menor que 10mg de massa.⁹⁶ Além desse fato, apenas 10% dos cálculos com mais de dois componentes podem ser analisados corretamente pelos métodos difração de raio-X e microscopia de polarização.⁹⁷

Entre as outras opções para análise de cálculos, encontramos a análise térmica. Por definição: “Análise Térmica constitui um grupo de técnicas nas quais as propriedades físicas e/ou químicas de uma substância são medidas em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura (*International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry – ICTAC*). A análise térmica permite estimar o conteúdo de matriz orgânica presente na amostra, além de verificar os compostos inorgânicos da amostra.”⁹⁹

Os métodos termoanalíticos são classificados de acordo com a propriedade física medida. Exemplificando, a avaliação da propriedade física dimensão é feita pela técnica de Termodilatometria, as características elétricas do material é obtida por Termoeletrometria e a emissão de luz pela Termoluminescência. Todos os aparelhos de medição de análise térmica têm características comuns, diferenciando-se apenas pelo transdutor que converte a propriedade física avaliada em sinal elétrico.”⁹⁹

A massa de uma amostra pode ser realizada pelos seguintes métodos termoanalíticos: Termogravimetria, Detecção de gás desprendido, Análise de gás desprendido e Análise térmica por emissão. De acordo com Matos⁹⁹, dentre estas técnicas, a Termogravimetria (TG) “... possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias (perda ou ganho), permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química definida e constante, determinar a temperatura em que começam a se decompor, acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, entre

outras aplicações”. De modo resumido, uma pequena amostra do material a ser analisado é colocada em aparelho que faz a medição constante da massa da amostra. Essa amostra, então, é submetida a aumento controlado de temperatura com uma atmosfera de ar conhecida. Chama-se TG *isotérmica* quando ocorre primeiro a variação de temperatura para então ser analisada a massa da amostra; TG *quasi-isotérmica* quando a amostra é aquecida somente quando não está ocorrendo variação de massa e TG *convencional* ou *dinâmica* onde a massa é medida concomitante com o aumento linear da temperatura. Todas estas informações são expressas na forma de um gráfico de massa vs. temperatura, conhecida como **curva termogravimétrica**, ou simplesmente **curva TG**.⁹⁹

As variações de massa podem ser determinadas quantitativamente, enquanto outras informações obtidas a partir de uma curva TG são de natureza empírica, visto que as temperaturas dos eventos térmicos são dependentes de parâmetros relacionados a características da amostra e/ou fatores instrumentais.⁹⁹

As informações fornecidas pelas curvas TG sobre a estabilidade térmica da amostra, sua composição e a estabilidade dos compostos intermediários e do produto final, permitindo diferenciar os componentes do material de implante daqueles compostos que porventura possam ser incrustados ao implante, é que motivaram a escolha deste método analítico. Vale ressaltar também o emprego incontestável da termogravimetria na análise de polímeros e na determinação de sua composição.⁹⁹

Exemplo de curva TG é dado na Figura 4, onde X e Y representam estados sólidos e Z representa o componente volátil; T_{onset} representa o início do evento térmico e T_{endset} o final extrapolado do evento térmico.⁹⁹

A curva termogravimétrica derivada (DTG) é um registro obtido a partir da curva TG, sendo sua derivada primeira da variação da massa em função do tempo. Ela pode ser registrada em função da temperatura ou do tempo, e substitui por picos as perdas de massa observadas na curva TG – esses picos delimitam áreas proporcionais às alterações de massa.. Exemplo de curva DTG é dado na Figura 5, onde observa-se que o degrau bc da curva TG é substituído por um pico bcd, que determina área proporcional à variação de massa da amostra. O ponto b, corresponde à T_i - temperatura em que inicia-se a decomposição térmica da substância X. O ponto c corresponde ao máximo na curva DTG (obtido quando a curva TG apresenta um ponto de inflexão) e a temperatura do pico (T_{pico}) é aquela em que massa está variando mais rapidamente. O ponto d corresponde à T_f indica o final da etapa de decomposição térmica (liberação total do volátil Z) e início do patamar de, que caracteriza a estabilidade térmica do produto final Y.⁹⁹

A curva DTG não fornece informações adicionais às mostradas na curva TG. Mas o faz de modo diferente. A sua utilização tem indicação para separar reações sobrepostas mal vistas na curva TG, possibilitando, inclusive, o cálculo da variação da massa e a identificação de uma impressão digital do material analisado.^{100,101}

Figura 4 - Características de uma curva TG, de uma reação de decomposição térmica em etapa única. X e Y = estados sólidos e Z = volátil; T_{onset} = início do evento térmico e T_{endset} = final extrapolado do evento térmico. *Figura cedida pelo autor. Matos J. Introdução a análise térmica e termogravimetria.*

Figura 5 - Curva TG (linha tracejada) e curva DTG (linha sólida) de reação de decomposição térmica em etapa única. O ponto b e T_i = temperatura em que inicia-se a decomposição térmica da substância X. O ponto c = máximo na curva DTG e ponto de inflexão da curva TG; T_{pico} = temperatura em que massa está variando mais rapidamente. O ponto d e T_f = final da etapa de decomposição térmica; Z = substância volátil; patamar de = caracteriza a estabilidade térmica do produto final Y. *Figura cedida pelo autor. Matos J. Introdução a análise térmica e termogravimetria.*

Estudos da análise térmica e decomposição calorimétrica de compostos de silicone e espuma de poliuretano usados na indústria têxtil^{102,103,104} revelam que o poliuretano, quando composto por um segmento duro e outro macio, possui pelo menos duas temperaturas de fundição das estruturas microcristalinas – em torno de 200°C para o segmento duro e de 10°C para o segmento macio. Possui também dois pontos de transição vítrea, devido a duas fases da estrutura e a temperatura de suas endotérmicas depende da associação de álcalis, isocianatos e uréia na sua composição, mas as suas endotermas geralmente são identificadas entre 30°C a 80°C e entre 120°C e 190°C. O silicone aumenta a estabilidade térmica e diminui a flamabilidade do poliuretano.

A escolha da termogravimetria como método para a análise da incrustação de materiais, orgânicos ou cristalinos, ao implante de silicone e poliuretano na uretra do coelho deve-se a capacidade que o método possui de diferenciar reações superpostas – através da DTG - importante quanto se utiliza polímeros diferentes como implante e se deseja separar materiais de incrustação neste enxerto.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Este estudo experimental, em modelo animal, tem por objetivo testar um novo material de implante – constituído de silicone polimérico revestido de espuma de poliuretano – utilizado como substituto uretral na forma de retalho fixado no leito dorsal da uretra, com manutenção de sua porção ventral. Para tanto descreveremos as alterações histológicas - inflamatórias e regenerativas - e morfométricas ocorridas na uretra do coelho submetido a esta cirurgia. Analisaremos, também, as alterações sofridas pelo implante através do estudo microbiológico e termogravimétrico, para detectar, respectivamente, colonização bacteriana e incorporação de materiais cristalinos ou orgânicos ao implante.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Animal de Experimentação

Foram utilizados 35 coelhos machos (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia (NZW), com peso aproximado no ato operatório de 3.300g.¹⁰⁵ Foi escolhido este animal de experimentação por já se caracterizar como um bom modelo para manipulações uretrais.^{13,16,106,107} Os animais foram obtidos do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em bom estado de saúde, livres de ectoparasitas ou endoparasitas, em acordo com as normas daquele biotério. Os animais passaram por dez dias de ambientação pré-operatória no biotério da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, recebendo água e alimentação balanceada e padronizada (PURINA®) sob livre demanda, permanecendo em gaiolas individuais, em condições físicas e ambientais próprias para a espécie, sem necessidade de dieta especial, de acordo com as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.¹⁰⁸

3.2 Determinação dos Grupos

Os coelhos foram organizados em nove grupos em função de duas variáveis: (1) o tipo de intervenção realizada e (2) o intervalo de tempo entre a intervenção e a coleta de material. Os grupos são caracterizados e denominados a seguir:

- Em função do tipo de intervenção realizada – os coelhos foram submetidos a três modalidades de intervenção, assim determinadas:

1. Implante de silicone-poliuretano (Si-Pu) na uretra após ressecção parcial da mesma - este grupo é composto por 20 animais e é denominado de Grupo **Experimental (E)**. Ele constitui o objeto de estudo deste trabalho;
2. Uretrotomia e uretrorrafia – este grupo não foi submetido a implante de material de substituição uretral, apenas a mobilização cirúrgica da uretra idêntica àquela a que foi submetido o grupo Experimental – a descrição da cirurgia será feita abaixo. Constituído de 15 coelhos, é denominado de Grupo **Sham (S)**. Este grupo recebe esta denominação por ser termo consagrado em literatura, originário da palavra inglesa *sham* que significa “falso, fingido, imitado”.¹⁶ A realização da uretrotomia e uretrorrafia sem implante de material sintético serve como controle, cujo objetivo é analisar as alterações uretrais causadas apenas pela manipulação uretral e pelo fio de sutura e, comparativamente, auxiliar na determinação das alterações originárias da presença do Si-Pu na uretra.

3. Nenhuma intervenção – este é o Grupo **Controle (GC)**, composto por três animais que não foram submetidos a qualquer manipulação cirúrgica prévia a coleta de dados e materiais.

- Em função do tempo entre a intervenção e a coleta de materiais e dados para estudo. Esta divisão foi empregada apenas nos grupos Experimental e *Sham*, uma vez que o grupo Controle não sofreu cirurgia uretral. Utilizamos quatro intervalos de tempo para a coleta dos dados e materiais, descritos a seguir:

1. Intervalo de duas semanas: composto por oito animais – cinco do grupo Experimental e três do grupo *Sham* – e denominados “-A”. Neste grupo visa-se avaliar as alterações precoces da cirurgia, como fístulas e deiscências, além de verificar o processo inflamatório agudo ocasionado pelo implante de Si-Pu.
2. Intervalo de quatro semanas: composto por oito animais – cinco do grupo Experimental e três do grupo *Sham* – e denominados “-B”. Neste grupo analisou-se o processo inflamatório crônico causado pelo implante, a reepitelização sobre o implante e a formação de neovascularização.¹⁶
3. Intervalo de oito semanas: composto por oito coelhos – cinco do grupo Experimental e três do grupo *Sham* – e denominados “-C”. Avaliou-se a persistência ou não de processo inflamatório associado ao implante,¹⁶ bem como alterações da luz uretral, uma vez que a ocorrência de estenose da uretra nos três primeiros meses após intervenção está associada a pior prognóstico.¹⁰⁹

4. Intervalo de 24 semanas: com oito animais – cinco do grupo Experimental e três do grupo *Sham* – e denominados “-D”. Este grupo avaliou as alterações tardias da uretra causadas pelo implante de Si-Pu.

Descrevemos abaixo os grupos utilizados neste trabalho de pesquisa, sua denominação, descrição e abreviatura:

- E-A (N=5) – grupo Experimental com duas semanas de intervalo
- E-B (N=5) – grupo Experimental com quatro semanas de intervalo
- E-C (N=5) – grupo Experimental com oito semanas de intervalo
- E-D (N=5) – grupo Experimental com 24 semanas de intervalo
- S-A (N=3) – grupo *Sham* com duas semanas de intervalo
- S-B (N=3) – grupo *Sham* com quatro semanas de intervalo
- S-C (N=3) – grupo *Sham* com oito semanas de intervalo
- S-D (N=3) – grupo *Sham* com 24 semanas de intervalo
- GC (N=3) – grupo Controle

O número de animais por grupo foi determinado após aconselhamento estatístico levando-se em conta tratar-se de trabalho experimental descritivo, procurando utilizar o mínimo necessário de animais para obtenção de resultados, em acordo com o código de ética em manejo de animais de experimentação. O número de animais por grupo assim determinado encontrou equivalência com trabalhos de desenho semelhante.¹⁶ Estes estudos usam amostras de três,⁸⁹ cinco,⁸ seis¹¹⁰ até 15 animais para o grupo experimental,⁸⁷ e um menor número de animais nos grupos controle.¹¹⁰

3.3 Material de Implante

O implante foi confeccionado, por solicitação do pesquisador, exclusivamente para fins de pesquisa em animais, pela empresa Silimed – Silicone Médico SC LTDA, com número do projeto de fabricação ET-120, com as seguintes especificações: folha de elastômero de silicone com espessura de 0,17 mm, uma superfície lisa e outra superfície recoberta por uma camada de espuma de poliuretano.

A folha de silicone foi esterilizada em óxido de etileno ciclo único,^{111,112} de acordo com protocolos de esterilização aceitos.¹¹³ O implante foi tratado com nitrato de prata a 2% p/v para diminuir o risco de formação de biofilme e infecção, da prótese ou do sítio de implante.^{87,114,115,116,117,118.}

3.4 Instalações

Intervenções cirúrgicas e coleta de dados e materiais de análise foram realizadas na sala de cirurgia experimental do LIM 26 – Laboratório de Investigação Médica de Técnica Cirúrgica da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP. Todos instrumentais e materiais de consumo utilizados nas intervenções foram fornecidos pelo próprio laboratório.

3.5 Procedimentos cirúrgicos

3.5.1 Pré-operatório

O preparo pré-operatório constou de: jejum absoluto durante 6 horas prévias à cirurgia para redução do volume gástrico^{105, 119}, pesagem dos animais em balança imediatamente antes da cirurgia e administração intramuscular de ceftriaxona dissódica (ROCEFIN® - 250 mg) de Produtos Roche Química e Farmacêutica S.A - na dose de 30 mg/kg de peso, 30 minutos antes do ato operatório.^{8,111}

Os dados obtidos com a pesagem dos animais foram usados para verificar equivalência entre os grupos de pesquisa utilizando-se o tratamento estatístico adequado.

3.5.2 Anestesia

Foram anestesiados para a cirurgia apenas os animais dos grupos Experimental e *Sham*. A anestesia dos animais compreendeu: indução anestésica via intramuscular, manutenção da anestesia via intravenosa e anestesia tópica, seguindo o protocolo de anestesia da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A indução anestésica foi realizada com agulha 20G em

quadríceps caudal esquerdo com Rompum[®] a 2% - [cloridrato de 2-(2,6-xilidina-5,6 dihidro-4-H 1,3 tiazina] - do laboratório Bayer do Brasil e Ketalar[®] (cloridrato de cetamina), do laboratório Park-Davis do Brasil. A dose de Rompum[®] utilizada foi de 5 mg/ Kg e a dose de Ketalar[®] foi de 35 mg/Kg. A manutenção da anestesia foi feita por punção da veia marginal da orelha externa, com agulha 21G, para aplicação de doses complementares das mesmas drogas anestésicas, *em bolus* sob demanda, no volume de um quarto a metade da dose inicial, não ultrapassando 3 mL por hora.¹²⁰ Os animais foram mantidos em ventilação espontânea durante todo o procedimento. A solução anestésica era preparada 01 hora antes da realização do procedimento.¹²¹

Anestesia local foi associada à anestesia geral através de infiltração da prega perineal com cloridrato de bupivacaína 0,25% sem vasoconstritor (MARCAÍNA[®]) do laboratório Astra-Zeneca do Brasil LTDA, na dose máxima de 8mg/kg, aplicada com agulha 23G, localmente na base peniana. A anestesia local era realizada após a anti-sepsia e após a colocação dos campos estéreis.⁸

3.5.3 Ato operatório

Grupo Experimental

Todos os procedimentos, tanto o implante do Si-Pu quanto à coleta de material foram realizados com técnica asséptica. Os instrumentais empregados no ato operatório – pinças de apreensão e dissecação, tesouras, porta-agulha, régua, compressas e campos cirúrgicos – foram esterilizados em autoclave. O material de consumo – fios de sutura, seringas, agulhas, bisturis, luvas, sondas, tubos para coleta de materiais, e outros – foram esterilizados de acordo com a natureza do material por seus respectivos fabricantes. A equipe cirúrgica utilizou luvas e aventais estéreis, gorro e máscara em todos os procedimentos.

Depois de anestesiado, o animal foi posicionado em decúbito dorsal e realizada a tricotomia da região do abdômen inferior e pelve. Realizou-se a anti-sepsia com iodopolvidona solução degermante, seguida da aplicação de polivinilpirrolidona-iodo solução aquosa (POVIDINE TÓPICO[®]) do laboratório *Johnson Wax Professional*. Colocaram-se campos estéreis, segundo técnica habitual. A uretra foi sondada com sonda uretral plástica de 8 Fr após lubrificação da sonda com cloridrato de lidocaína geléia a 2% do Laboratório Apsen Farmacêutica S.A.

Incisou-se transversalmente a prega perineal com bisturi lâmina 15, como mostrado na Figura 6-A. A musculatura periuretral foi divulsionada, para exposição do corpo esponjoso. O descolamento da uretra e do corpo esponjoso adjacente da face ventral dos corpos cavernosos foi conseguido com auxílio de tesoura de dissecação (Figuras 6-B e 6-C). Com a rotação da uretra expôs-se a parede dorsal da uretra, como ilustrado na Figura 6-D. Abriu-se a parede dorsal da uretra anterior a partir de 20 milímetros do meato uretral e ressecamos parte da parede dorsal da uretra, como mostra a Figura 7-A.⁸³ Moldou-se a placa de Si-Pu à falha uretral recém-criada (Figura 7-B). Suturou-se o enxerto à uretra com pontos contínuos de polidioxanona 6-0 (PDS[®]), com magnificação com lupa de 10 vezes,⁸ colocando a superfície da placa coberta por silicone em contato com a luz uretral e a superfície revestida com poliuretano externamente, em contato com os corpos cavernosos, mostrado nas Figuras 7-C e 7-D. Fixou-se, então, o implante aos corpos cavernosos com 2 pontos simples de polidioxanona 7-0 (Figura 8-A). O controle de continência da sutura foi feito com azul de metileno injetado por via retrógrada e observação de extravasamento de contraste pela linha de anastomose, como evidenciado da Figura 8-B e 8-C. Na ausência de vazamento pela sutura, os animais eram submetidos ao fechamento da ferida operatória com aproximação da musculatura periuretral por sutura com pontos invertidos separados de categute cromado 4-0 (Ethycon) e fechamento da pele com pontos simples e invertidos de categute cromado 4-0.

Não se utilizou drenos, cateteres uretrais ou cistostomia no pós-operatório, para não aumentar o risco de infecção associado a sondagens, e também para evitar processo inflamatório uretral relacionado a presença da sonda, causando interferência na análise histológica e microbiológica da uretra e do implante.¹⁶ Além disso, a alta concentração de cristais de fosfato na composição da urina do coelho, leva a fácil obstrução da sonda de 8F – ideal para o diâmetro da uretra deste animal – causando retenção urinária.⁸⁹

Grupo *Sham*

Os animais do grupo *Sham* foram submetidos ao mesmo procedimento descrito para aqueles do grupo Experimental, porém não sofreram ressecção da parede dorsal da uretra e não tiveram nenhum tipo de implante uretral. Estes animais sofreram apenas o descolamento uretral de seu leito e uretrotomia longitudinal da parede dorsal por 15 mm de extensão, iniciando-se a 20 mm do meato uretral. Realizou-se, então, uretrorrafia com sutura contínua de fio de PDS® 6-0 e averiguação de vazamento com azul de metileno – do mesmo modo que o realizado no grupo Experimental.

Figura 6 - Aspecto cirúrgico da dissecação da uretra. **A** - abertura da prega perineal e exposição das glândulas perineais; **B** – divulsão dos tecidos periuretrais com exposição do corpo esponjoso; **C** – descolamento e rotação do corpo esponjoso com exposição do corpo cavernoso; **D** - rotação do corpo esponjoso e exposição da uretra esponjosa; a sonda uretral é visibilizada por transparência

Figura 7 – Aspecto cirúrgico do implante na uretra de Si-Pu do grupo Experimental. A - exérese de faixa dorsal da uretra e exposição da sonda; B - moldagem do implante ao defeito uretral; C - sutura do implante a uretra e fixação do mesmo ao corpo cavernoso com auxílio de magnificação; D - aspecto final da cirurgia após a anastomose do implante de Si-Pu a uretra.

Figura 8 – Aspecto final do implante do enxerto uretral. **A** - enxerto fixado em corpo cavernoso; **B, C** - controle de extravasamento pela sutura do enxerto (seta), com a observação de saída do azul de metileno pela uretra obtida em micção por Credè

3.5.4 Pós-operatório

Após o procedimento os animais foram mantidos no biotério da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental - LIM26, sob rigorosa vigilância quanto à micção e comportamento, com livre acesso a água e alimentos e tratados de acordo com as Princípios Éticos na Experimentação Animal recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.¹⁰⁸ Não foi administrado antibiótico no pós-operatório.

3.6 Coleta de dados e materiais

3.6.1 Retirada do Espécime Cirúrgico

Os animais dos grupos Controle, Experimental e *Sham* foram mortos, os dados relevantes da análise local do implante - ou de seu correspondente nos grupos Controle e *Sham* - foram anotados e um fragmento da uretra foi retirado para análise posterior por técnica idêntica para os três grupos.

Todos os animais foram pesados imediatamente antes da coleta de dados. Os dados obtidos com a pesagem dos animais foram avaliados

quanto ao ganho ou perda de peso em função do tempo transcorrido entre a cirurgia e a morte dos animais dos grupos E e S.

Os animais foram mortos com infusão de solução contendo Hypnol[®] a 3% (pentobarbital sódico) do Laboratório Fontoveter, Divisão Veterinária de Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, na dose de 65 mg/kg de peso¹²² após punção da veia marginal da orelha com agulha 21G. Depois de sacrificados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal horizontal e a equipe cirúrgica paramentada com gorro e máscara, aventais e luvas estéreis. Realizou-se anti-sepsia e colocação de campos cirúrgicos, seguindo os princípios de cirurgia asséptica. Sondou-se a uretra com sonda uretral plástica 8F e desenluvamos o pênis. A uretra foi retirada em bloco a partir do assoalho pélvico – com corpos cavernosos e corpo esponjoso - como mostrado na Figura 9.

Figura 9 – Aspecto da coleta de material. **A** - desenlramento peniano; **B** - uretra, corpo esponjoso e corpos cavernosos, em bloco, após a retirada

Após a retirada do material para análise, a ferida cirúrgica foi fechada por sutura contínua da pele com fio de catgut cromado 4-0. Os coelhos foram descartados de acordo com o protocolo da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Após sua retirada em bloco, a peça foi analisada em bancada quanto as suas características macroscópicas e morfométrica. Foi feita a separação de material para análise microbiológica, histológica e análise térmica. Todos estes procedimentos foram realizados com material esterilizado e técnicas assépticas.

3.6.2 Análise Morfométrica

A uretra foi seccionada na linha mediana, na face ventral para todos os grupos estudados. Avaliou-se macroscopicamente o implante e a uretra circundante, a área de uretrotomia e uretrorrafia, quando foi o caso. As alterações estudadas foram: busca de fístulas, presença ou ausência do implante; adesão do Si-Pu ao seu leito e alteração da mucosa da uretra na área manipulada.

Os dados encontrados foram descritivos, exceto pelo descolamento do implante, que foi medido em milímetros de implante não aderido ao leito uretral. Como as dimensões dos implantes não forma igualitárias para todos os animais, criamos um índice representado pela medida da extensão do descolamento dividida pela medida total do implante, ambas em milímetros. Foi realizada a comparação dos valores de descolamento entre os diferentes intervalos de tempo do grupo Experimental.

Mediu-se a circunferência da uretra, em milímetros, utilizando régua estéril, como mostrado na Figura 10. Foram tomadas medidas em três pontos distintos da uretra de todos os animais:

- 10 mm proximal a região manipulada – denominada proximal (P).

Portanto, fora da área de implante do Si-Pu no grupo Experimental e fora da área de uretrorrafia no grupo *Sham*. Para o grupo Controle, esta medida foi tomada a 45 mm do meato uretral.

- Na região manipulada – denominada média (M). No GC utilizou-se a medida a trinta milímetros do meato uretral.
- 10 mm distal a área de manipulação – denominada distal (D). No GC, a medida foi tomada a 10 mm do meato uretral.

As medidas das circunferências avaliaram estreitamentos e dilatações da luz uretral. Utilizou-se cada animal como seu próprio controle, para evitar que variações anatômicas normais do diâmetro uretral pudessem interferir na avaliação. Para tanto, foi usada a uretra distal – livre de manipulações – como “normalidade”. Como o seguimento manipulado por implante ou por uretrotomia/uretrorrafia estivesse sujeito a alteração de diâmetro pelo processo de cicatrização local, ele foi comparado com a uretra distal à manipulação, criando-se um “índice M/D” – quanto maior o índice, maior o diâmetro da uretra na área manipulada.

Compararam-se, também, as medidas da uretra proximal com a uretra distal à área de cirurgia, criando o “índice P/D”. Esta avaliação busca detectar alterações na luz da uretra proximal em consequência de alteração de fluxo urinário e pressão exercida na parede uretral como resultado de possíveis alterações causadas pela manipulação.

Compararam-se todas as medidas entre os grupos Experimental e *Sham*, para os diferentes intervalos de tempo de coleta de dados. Comparou-se também cada grupo com os dados coletados do GC.

As medidas de circunferência dos animais do grupo Controle foram tomadas nas áreas equivalentes àsquelas dos grupos Experimental e *Sham*, como já descrito.

Figura 10 – Medida da circunferência da uretra

3.6.3 Análise Microbiológica

Coletou-se um fragmento do terço distal do implante de Si-Pu de aproximadamente 5 mm, para cada animal do grupo Experimental. O material foi colocado em frasco estéril e encaminhado para incubação em meio de cultura para bactérias aeróbias. Nos grupos *Sham* e Controle, foi retirado um fragmento da uretra de 5 mm de extensão, distando 20 mm do meato uretral de cada animal e encaminhado da mesma maneira para cultura de bactérias.

As análises microbiológicas foram realizadas pelo Setor de Microbiologia do Hospital Universitário da USP. O tempo médio entre a coleta do material e o início da semeadura foi de 90 minutos. Não foi realizado o antibiograma das culturas positivas, já que a intenção era verificar a presença ou não de bactérias colonizando a uretra ou o implante e não o padrão de resposta dessas bactérias a antibióticos.

Os dados foram analisados por comparação entre os grupos E, S e C quanto a frequência de infecção e tipo de bateria infectante. Avaliou-se também a presença de infecção com a variação do peso corporal dos animais e a variação do diâmetro uretral com a presença de infecção do sítio operatório.

3.6.4 Análise Histológica

Uma amostra da uretra de todos os animais foi enviada para a análise histológica. Esta amostra era composta por toda a circunferência da área manipulada e o equivalente do grupo Controle, o corpo esponjoso adjacente e corpos cavernosos, com extensão de aproximadamente 5 mm. Um exemplo deste fragmento é mostrado na Figura 11.

As amostras foram fixadas em formol a 10% e processadas pelo Laboratório de Patologia da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da FM-USP utilizando-se as técnicas convencionais de fixação,

desidratação, inclusão em parafina e microtomia. Os cortes de 6 µm foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e tricômico de Masson (TM) e foram coloridos em vermelho brilhante com Picrosírius Red (PR). As lâminas coradas com HE e TM contaram com uma amostra de cada animal; as lâminas coradas com PR contaram com cinco amostras para cada animal.

As análises histológicas das lâminas HE e TM foram realizadas com microscopia óptica sob ocular com aumento de 10 vezes e objetivas com aumento de quatro vezes, 10 vezes, 20 vezes e 40 vezes, pela patologista Dra. Kátia Ramos Moreira Leite, coordenadora do Laboratório de Investigação Médica da Urologia (LIM-55) da FM-USP.

Os parâmetros avaliados a microscopia óptica foram classificados em descritivos e quantitativos. A análise do GC foi utilizada como parâmetro de normalidade. Os dados avaliados são relacionados a seguir:

- Presença ou ausência de urotélio;
- Presença ou ausência de metaplasia do urotélio;
- Presença ou ausência de edema da submucosa e urotélio;
- Presença de células inflamatórias no epitélio e sua caracterização;
- Presença de células inflamatórias na camada subepitelial e sua caracterização em reação inflamatória aguda ou crônica pela presença predominante de polimorfonucleares ou infiltrado mononuclear, respectivamente;
- Presença ou ausência de reação granulomatosa tipo corpo estranho;
- Presença ou ausência de necrose;

- Descrição da deposição do colágeno na lâmina própria, quando ocorreu;
- Avaliação quantitativa da intensidade da reação inflamatória, adotando os seguintes critérios: 0 = reação inflamatória ausente; 1 = reação inflamatória discreta, dada por até 25% de células inflamatórias entre as células visualizadas em campo de grande aumento (400x); 2 = reação inflamatória leve, dada pelo encontro de 25% a 50% de células inflamatórias entre as células visualizadas em campo de grande aumento (400x); 3 = reação inflamatória moderada, dada pelo encontro de 50% a 75% de células inflamatórias entre as células visualizadas em campo de grande aumento (400x); 4 = reação inflamatória severa, dada pelo encontro de 75% a 100% de células inflamatórias entre as células visualizadas em campo de grande aumento (400x).
- Avaliação quantitativa da espessura da parede uretral, utilizando as lâminas coradas com TM, fotografadas com mesma máquina digital, em idêntico aumento (100x); e analisada pelo programa ImageLab 2000, versão 2.4, com medida dada em pixels.

Os dados quantitativos da espessura da parede uretral foram comparados entre os grupos Experimental e *Sham* para cada um dos intervalos de tempo utilizados no estudo. Os dados de cada grupo foram comparados com o grupo Controle. Os dados receberam tratamento estatístico adequado.

A análise das lâminas de PR foi realizada com microscópio de luz polarizada marca Olympus, modelo U-25ND25 Q Color 5 e a captação de imagens feita com o programa Image ProPlus 6.0, do Laboratório de Estudos da Matriz Extracelular da Disciplina de Reumatologia (LIM 17) da FM-USP, sob orientação da Dra Walcy Rosolia Teodoro. Realizou-se análise quantitativa do colágeno por meio de espectro de cores com o auxílio do programa ImageLab 2000, versão 2.4, (cedido pelo criador do programa, Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra, pesquisador e professor do Laboratório de BioOdontologia da Universidade Ibirapuera de São Paulo). Os resultados foram expressos como porcentagem de colágeno por lâmina, resultando em 25 amostras para cada um dos grupos Experimentais e 15 amostras para cada um dos grupos *Sham* e Controle. Os dados foram comparados entre os grupos E, S e C

3.6.5 Análise Termogravimétrica

O terço proximal do implante de Si-Pu retirado da uretra, de aproximadamente 5 mm de extensão, foi destacado do seu leito acompanhado do tecido uretral aderido a ele. Este material foi encaminhado para Análise Termogravimétrica (TG), assim como uma amostra da placa de silicone-poliuretano esterilizada em óxido de etileno, mas não implantada.

Esta última foi submetida inteira à TG e, posteriormente, com seus componentes separados (silicone isolado e espuma de poliuretano isolada).

As avaliações foram feitas pelo Laboratório de Análise Térmica Prof. Dr. Ivo Giolito do Instituto de Química - Universidade de São Paulo, coordenado pelo Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos. Utilizou-se o aparelho Thermogravimetric Analyser TGA-51 do fabricante Shimadzu, mostrado na Figura 12, com ganho de temperatura de 10°C/minuto em atmosfera contínua de ar. A massa de cada amostra foi de aproximadamente 5 mg.

Os dados obtidos através das curvas de termogravimetria foram expressos em porcentagem de massa perdida em cada amostra a 700°C. Escolheu-se a temperatura de 700°C por ser esta a temperatura na qual a perda de massa pela queima do Si-Pu se estabiliza. A avaliação da perda de massa revela se há ou não material incorporado ao implante de Si-Pu – a maior perda de massa em relação ao Si-Pu não implantado, para uma mesma temperatura, demonstra agregação de materiais a estrutura do implante.¹²³

Realizou-se a análise descritiva da derivada da curva termogravimétrica (DTG), para avaliar temperaturas de perda de massa. Os dados obtidos foram comparados entre os grupos E-A, E-B, E-C e E-D e eles foram comparados com a folha de Si-Pu.

Os valores referentes a perda de massa foram comparados entre os animais pertencentes a diferentes intervalos de tempo

Figura 11 - Espécime da uretra encaminhada para análise histológica - grupo Experimental

Figura 12 – Aspecto do Thermogravimetric Analyser Shimadzu: **A** – termopar e equipamento de informática utilizado para visibilização gráfica do processo; **B** – vista frontal do termopar; **C** – célula de medida com cadinho onde é depositado o material a ser analisado. Está localizado no interior do termopar; **D** – transdutor, localizado na parte superior do termopar, transforma a variação de peso em sinal elétrico

3.7 Análise estatística

Este é uma pesquisa experimental, controlada e prospectiva, realizada em coelhos, com seguimento de seis meses e análise de dados em períodos de duas, quatro, oito e 24 semanas, realizada nas dependências do LIM 26 da FM-USP, com análise de materiais realizadas no Laboratório Clínico do Hospital Universitário – USP, Laboratório de Análise Térmica do Instituto de Química da USP, LIM 17 da FM-USP e Laboratório de Patologia do Hospital Sírio Libanês. Todos os dados quantitativos obtidos foram tratados estatisticamente. Os dados analisados e os respectivos métodos empregados são descritos abaixo.

Os dados obtidos com a pesagem dos animais foram usados para verificar equivalência entre os grupos de pesquisa utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis na comparação entre os grupos.

A comparação da variação do peso em função do tempo foi feita com o teste de Mann-Whitney.

A comparação entre os valores de descolamento do implante e da perda de massa pelo implante encontrados nos animais com diferentes intervalos de análise dentro do grupo Experimental foi realizado com o teste de Mann Whitney.

As medidas da variação da circunferência uretral, a variação do peso corporal relacionada à presença de infecção e a variação da circunferência

uretral relacionada à presença de infecção receberam tratamento estatístico com o teste de Kruskal-Wallis e análise por postos de Mann Whitney.

A análise da espessura da parede uretral utilizamos os testes de Kruskal-Wallis. A comparação da concentração de colágeno entre grupos foi feita pela análise de variância (ANOVA).

Todos os testes estatísticos aplicados neste estudo foram bicaudais e considerou-se significativos valores de probabilidade menores que 0,05 e extremamente significativos valores menores que 0,001. O teste de distribuição normal (Kolmogorov e Smirnov) foi realizado todas as análises com auxílio do “software” estatístico GraphPad InStat®.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Peso dos animais

O peso médio dos 35 coelhos submetidos à análise foi de 3 302g (com variação de ± 600 g) na pesagem inicial. Ao analisar-se o peso em cada um dos grupos objetos de estudo verificou-se que o peso médio dos coelhos do grupo Experimental e do grupo *Sham* na data da cirurgia foi de 3 435g ($\sigma \pm 283,35$) e de 3 041g ($\sigma \pm 367,9$), respectivamente; no grupo Controle foi de 3 466g ($\sigma \pm 378,6$).

Os dados de peso do grupo Experimental foram submetidos a tratamento estatístico através da análise de variância pelo teste de Bartlett, sendo verificado que os DP entre os grupos eram idênticos. Aplicando o teste de Kolmogorov e Smirnov verificou-se que obedeciam a distribuição Gaussiana.

A comparação entre as médias de peso dos grupos Controle, Experimental e *Sham* aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis não evidenciou diferença significativa entre eles ($P = 0,1731$), aceitando que os grupos são equivalentes.

Os resultados das análises dos pesos iniciais dos animais são expressos na Tabela 4

Tabela 4 - Análise do peso inicial dos animais dos diferentes grupos

Parâmetros	E-A	E-B	E-C	E-D	S-A	S-B	S-C	S-D	GC
N	5	5	5	5	3	3	3	3	3
Média	3320	3520	3560	3340	3067	2967	3167	2967	3467
Desvio Padrão	164,3	311,3	270,2	357,8	378,6	461,9	568,6	152,7	378,6
Erro Padrão	73,5	139,3	120,8	160	218,6	266,7	328,3	88,2	218,6
IC 95% inferior	3200	3000	3200	3000	2800	2700	2700	2800	3200
IC 95% superior	3600	3800	3900	3800	3500	3500	3800	3100	3900
Mínimo	3116	3133,3	3224,6	2895,8	2126,1	1819,2	1754	2587,2	2526,1
Máximo	3524	3906,7	3895,4	3784,2	4007,2	4114,1	4579,3	3346,2	4407,7

À pesagem dos coelhos realizada na data da morte mostrou média de peso de 3 550g para o grupo Experimental e de 3 449g para o grupo *Sham*.

Já a variação do peso entre a data da cirurgia e a da morte para os grupos Experimental e *Sham* é expressa na Tabela 5 e mostra ganho de

peso menor no grupo Experimental em função do tempo em comparação ao observado no grupo *Sham*.

O grupo Experimental apresentou perda de peso no primeiro mês de pós-operatório, fato não observado no grupo *Sham*. Porém, na análise comparativa entre grupos com o mesmo intervalo de tempo de cirurgia, pelo teste de múltipla comparação de Dunn, não se observou diferença significativa na variação de peso entre os grupos E-A vs S-A, E-B vs S-B, E-C vs S-C e E-D vs S-D ($P>0,05$). O mesmo foi verificado ao se empregar o teste de Mann-Whitney (não paramétrico) entre cada grupo. O detalhamento dos cálculos é demonstrado abaixo na Tabela 6.

Tabela 5 - Variação da média de peso dos animais do grupo Experimental e do grupo *Sham* entre a cirurgia e o sacrifício.

Grupo	Intervalo (semanas)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Variação de peso (g)
E-A	2	3320	3180	(140)
E-B	4	3520	3480	(40)
E-C	8	3560	3820	+240
E-D	24	3340	3720	+380
S-A	2	3066	3166	+100
S-B	4	2966	3266	+300
S-C	8	3166	3666	+500
S-D	24	2966	3700	+734

Tabela 6 – Estudo estatístico da variação de peso entre a intervenção e a morte pelo teste de Mann-Whitney. Valores negativos são representados entre parênteses.

Parâmetros:	E-A	S-A	E-B	S-B	E-C	S-C	E-D	S-D
Média	(140)	100	(400)	300	260	500	380	733,33
N	5	3	5	3	5	3	5	3
Desvio Padrão	167,3	100	89,4	200	151,7	100	216,8	404,1
Erro Padrão	74,8	57,7	40	115,5	67,8	57,7	96,95	233,3
Mínimo	(400)	0	(100)	100	100	400	100	500
Máximo	0	200	100	500	400	600	600	1200
Mediana	(100)	100	(100)	300	300	500	300	500
Intervalo de confiança 95% inferior	(347,7)	(148,4)	(151)	(196,9)	71,7	251,6	110,9	(270,7)
Intervalo de confiança 95% superior	67,74	348,4	71,04	796,9	448,3	748,4	649,1	1737,4
P (bicaudal)	0,072		0,052		0,072		0,393	

4.2 Análise morfométrica

4.2.1 Macroscopia da Uretra

Não foram observadas alterações macroscópicas na análise dos espécimes coletados entre os animais do GS, exceto por hiperemia da mucosa uretral no local da manipulação nos animais do subgrupo A. Os fios de sutura utilizados não foram encontrados a partir do subgrupo B (quatro semanas de intervalo). Não foram observadas fístulas ou deiscências no local da uretrorrafia. Não foram detectadas alterações dos tecidos periuretrais.

No GE, a avaliação macroscópica da uretra não revelou fístulas. Não houve alteração dos tecidos periuretrais. Em seis animais (6 de 20 animais da amostra) não foi encontrado o implante na uretra, fazendo crer que ocorreu extrusão total do implante. E também não encontramos o material de implante nas gaiolas dos coelhos durante a limpeza das mesmas. Os casos de extrusão estavam assim distribuídos: nenhuma ocorrência (0/5) no grupo E-A, um caso (1/5) no grupo E-B, dois (2/5) no grupo E-C e mais da metade dos animais (3/5) no grupo E-D não apresentavam o implante na uretra no momento da análise. A Figura 13 ilustra a porcentagem de perda do implante Si-Pu em cada grupo, o que terá importância na análise de incrustação através da Termogravimetria.

Nos animais que tiveram extrusão do enxerto havia fibrose intensa e ectasia vascular para o animal do grupo E-B; fibrose e granuloma protraindo para a luz uretral nos dois animais do grupo E-C e, para os animais do grupo E-D, um apresentava fibrose leve e dois não apresentavam qualquer alteração detectável a macroscopia da uretra, como mostrado na Figura 14.

Um coelho do grupo E-C apresentou extrusão apenas da folha de silicone, mantendo uma placa local formada pelo material de degradação do poliuretano. (Figura 14-B). A extrusão do material implantado não foi correlacionada com nenhuma alteração clínica detectável na avaliação diária dos coelhos.

Figura 13 – Porcentagem de extrusão de implante para cada um dos intervalos de tempo de estudo (-A, -B, -C e -D) nos animais do grupo Experimental

Figura 14 – Aspecto macroscópico da uretra dos animais que apresentaram extrusão do implante. **A:** espécime de coelho do grupo E-B com fibrose e ectasia vascular no leito uretral onde havia o implante; **B e C:** dois espécimes do grupo E-C mostrando granuloma no local do implante; **D:** D com aspecto “normal” do leito do enxerto.

4.2.2 Macroscopia do Enxerto

O tamanho do enxerto implantado variou de 10 mm a 18 mm de comprimento por 3 mm a 6 mm de largura em uma configuração elipsóide.

Os implantes que permaneceram na uretra, quase todos apresentavam sinal de descolamento de uma ou das duas extremidades, por extensão variável. O descolamento da extremidade distal e da extremidade proximal foi medido em milímetros e foi progressivamente maior nos grupos com maior intervalo entre o implante e a morte dos animais.

Como o comprimento de cada placa era adequado ao defeito realizado e, portanto, as placas possuíam medidas diferentes para os diferentes animais, a extensão total do descolamento - somatória do descolamento da extremidade proximal e do descolamento da extremidade distal do implante, dada em mm - foi correlacionada com a extensão total da placa de enxerto (também em mm), criando-se um Índice de Descolamento (ID), que é a expressão como número decimal da fração de descolamento (extensão descolada/extensão total do enxerto). A Tabela 7 exhibe os dados do descolamento do enxerto.

Apenas um animal do grupo E-A, um do grupo E-B e um do grupo E-C não apresentavam qualquer descolamento do enxerto, e são mostrados na Figura 15.

Ao submetermos a análise estatística os dados do descolamento, aplicando-se o teste de Mann-Whitney para comparação entre cada grupo, encontramos diferença significativa ($P=0,016$) apenas entre o E-A e o E-D. Os detalhes são mostrados na Tabela 8.

Tabela 7- Descolamento do implante da uretra por grupo de intervalo de tempo. Os valores são dados em milímetros e correlacionados com o comprimento total do implante. Onde ID = Índice de Descolamento – medido em milímetros

Animais	E-A (ID)	E-B (ID)	E-C (ID)	E-D (ID)
1	1:14 (0,07)	0:16 (0,0)	10:10 (1,0)	14:14 (1,0)
2	7:15 (0,46)	12:12 (1,0)	2:12 (0,17)	15:15 (1,0)
3	0:14 (0,0)	3:15 (0,2)	3:14 (0,2)	12:14 (0,86)
4	9:13 (0,7)	7:18 (0,39)	0:17 (0,0)	8:12 (0,66)
5	7:14 (0,5)	9:18 (0,5)	13:13 (1,0)	15:15 (1,0)
Soma do ID	1,73	2,09	2,37	4,52
% média de descolamento da placa	34,6%	41,8%	47,4%	90,4%

Tabela 8 – Análise estatística da área descolada do enxerto entre o grupo E-A e o grupo E-D

Parâmetros	Grupos	
	E-A	E-D
Soma dos postos	16	39
Média	0.346	0.904
N	5	5
Desvio padrão	0,3	0,15
Erro padrão	0,14	0,07
Mediana	0.46	1
Intervalo de confiança 95%	(0,25) - 0,72	0,72 – 1,09

Figura 15 - Aspecto dos implantes que não apresentaram descolamento de suas extremidades. Sendo **A** – uretra do animal do grupo E-A; **B** – uretra do animal do grupo E-B e **C** – uretra do animal do grupo C

4.2.3 Circunferência Uretral

A medida da circunferência uretral não revelou diminuição da sua luz na área submetida à cirurgia com o passar do tempo, ao se comparar as medidas da uretra distal à área manipulada com a região da uretra submetida a implante.

A comparação entre os grupos Experimental e Controle e entre os grupos Experimental e *Sham*, para os diferentes intervalos de tempo também não mostraram alteração da circunferência uretral nos animais do grupo Experimental, exceto na comparação entre E-B com S-B. Os dados, obtidos pela relação do diâmetro da uretra média com a uretra distal – índice M/D - são mostrados na Tabela 9.

Realizou-se análise estatística com a aplicação análise de variância não paramétrica com teste de Kruskal-Wallis e por postos de Mann-Whitney e não foi encontrada diferença significativa nos valores de circunferência uretral entre os grupos Experimental, *Sham* e Controle para os diferentes intervalos de tempo.

A correlação da circunferência da uretra proximal com a circunferência da uretra distal à área manipulada - índice P/D - não revelou diferenças estatísticas significantes na comparação do grupo Experimental com o grupo *Sham* para cada intervalo de tempo de coleta de dados.

Também não foram observadas diferenças na comparação do índice P/D entre as amostra coletadas com duas semanas – grupo E-A - se comparadas àqueles do grupo E-D - 24 semanas ($P=0,916$). Ao comparar-se

o grupo Experimental com o grupo Controle pelo teste de Mann-Whitney, encontrou-se diferença estatisticamente significativa apenas para E-A vs GC (P=0,035). Os resultados desta análise estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 9 – Relação das medidas da circunferência uretral na área manipulada vs área distal a manipulação – índice M/D. Para o grupo Controle foi usada a medida da uretra na área correspondente a manipulação sofrida pelo grupo Experimental e *Sham*.

Parâmetros	E-A	E-B	E-C	E-D	S-A	S-B	S-C	S-D	GC
Média dos Índices M/P	1,10	0,99	1,08	1,13	1,14	1,14	1,2	1,07	1,14
Desvio Padrão	0,21	0,17	0,15	0,09	0,09	0,25	0,2	0,22	0,1
Erro Padrão	0,093	0,052	0,07	0,04	0,05	0,14	0,11	0,13	0,05
IC 95% inferior	0,84	0,84	0,89	1,01	0,9	0,77	0,7	0,52	0,9
IC 95% superior	1,36	1,13	1,27	1,24	1,38	2,0	1,7	1,62	1,38
Mínimo	0,91	0,86	0,92	1,0	1,08	1,23	1,0	0,82	1,08
Máximo	1,43	1,17	1,33	1,23	1,25	1,67	1,4	1,25	1,25

Tabela 10 - Valores de P para a análise da circunferência da uretra proximal vs uretral distal através do teste de Mann-Whitney para duas amostras (Experimental vs *Sham*, Experimental vs Controle e *Sham* vs Controle)

GRUPOS	E-A	E-B	E-C	E-D	CONTROLE
S-A	0,786	-	-	-	0,124
S-B	-	0,999	-	-	0,124
S-C	-	-	0,295	-	0,100
S-D	-	-	-	0,654	0,124
CONTROLE	0,035*	0,143	0,100	0,143	-

4.3 Análise microbiológica

O resultado da cultura aeróbia dos espécimes coletados para cada animal foi expresso na Tabela 11. Observou-se uma maior frequência de culturas negativas nos espécimes coletados dos animais do grupo Experimental (7 de 20 animais da amostra) daquelas do grupo *Sham* (1/12). O grupo *Sham* apresentou uma prevalência maior (5/12) de bactérias Gram positivas - *Staphylococcus sp DNase negativa* – do que a apresentada pelo grupo Experimental (4/20). A positividade para bactérias Gram negativas na cultura do fragmento de uretra coletado dos animais do grupo *Sham* ocorreu apenas para os intervalos de duas semanas e de 24 semanas. O grupo Controle apresentou todas as análises microbiológicas sem crescimento bacteriano. Graficamente, podemos expressar a frequência de infecção para cada um dos grupos pela Figura 16.

Para analisar a importância da infecção da uretra com a perda ou ganho de peso de cada animal, dividiu-se a variação de peso de cada animal – ou seja, o peso no dia da cirurgia subtraído do peso no dia da morte - pelo número de dias de observação de cada grupo. Agruparam-se os animais pelo tipo de bactéria infectante e obtivemos a média de variação de peso por dia de estudo para cada grupo de bactéria. A frequência de ocorrência de cada tipo de bactéria é mostrada na Figura 17.

Com a aplicação do teste de Mann-Whitney para comparação por tipos de bactérias causadoras de infecção e sua importância na variação do

peso foi encontrada correlação negativa significativa quando estava presente infecção pela bactéria *Enterobacter cloacae*. Os valores de P foram significantes quando comparado *Enterobacter cloacae* à ausência de infecção (P=0,02) ou à presença de infecção por bactérias Gram positivas *Staphylococcus DNAse Negativa* (P=0,003) ou quando comparada a presença de infecção por *Enterococcus sp* e *E. coli* (P=0,03). Ou seja, a presença da bactéria *Enterobacter cloacae* na uretra foi acompanhada de variação negativa do peso dos animais. A *Enterobacter cloacae* não foi comparada com as outras bactérias verificadas na análise microbiológica devido a baixa ocorrência destas (Tabela 12). Não foi verificada variação do peso dos animais associada aos outros microorganismos encontrados.

A análise da circunferência uretral (Índice M/D) em correlação com a presença ou ausência de infecção uretral pela aplicação do teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferença significativa entre os grupos.

Porém, ao analisar-se os tipos distintos de bactéria e sua influência no Índice uretral M/D – medida da circunferência – foi encontrado, com a aplicação do teste de Mann-Whitney, que a infecção por bactérias do tipo *Staphylococcus DNAse negativa* está relacionada a maior circunferência da uretra na área manipulada em comparação com aqueles que não apresentavam infecção no sítio cirúrgico (P=0,006). Estes dados são mostrados na Tabela 13.

Tabela 11 - Resultado da análise microbiológica de material colhido da área manipulada da uretra do coelho e equivalente no grupo Controle. Algumas amostras contêm mais que uma bactéria

GRUPO	MICROBIOLOGIA
E-A	1 amostra: <i>Escherichia coli</i> + <i>Proteus vulgaris</i> ; <i>Enterococcus sp</i> ; 3 amostras <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Nenhuma cultura negativa</i>
E-B	1 amostra: <i>Enterococcus sp</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; 3 amostras: Culturas negativas
E-C	2 amostras: Culturas negativas; 3 amostras: <i>Staphylococcus sp</i> DNase negativa;
E-D	1 amostra: <i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus sp</i> DNase negativa; <i>Enterococcus faecalis</i> ; 2 amostras: Culturas negativas;
S-A	1 amostra: <i>Escherichia coli</i> + <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Enterobacter sp</i> ; <i>Enterococcus sp</i> ; <i>Nenhuma cultura negativa</i>
S-B	3 amostras: <i>Staphylococcus sp</i> DNase negativa <i>Nenhuma cultura negativa</i>
S-C	1 amostra: Cultura negativa 2 amostras: <i>Staphylococcus sp</i> DNase negativa
S-D	1 amostra: <i>Enterococo sp</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Serratia marcescens</i> . <i>Nenhuma cultura negativa</i>
GC	3 amostras: Culturas negativas. <i>Nenhuma cultura positiva</i>

Figura 16 - Infecção da uretra na área manipulada por grupo estudado. O grupo Controle não apresentou infecção da uretra

Figura 17 – Distribuição da ocorrência de infecção pelo tipo de microorganismo infectante

Tabela 12 – Medidas de tendência da variação do peso dos animais quando correlacionada com o tipo de bactéria causadora de infecção

Resultado microbiológico	Variação de peso / dia				
	Média	N	DP	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% (mínimo – máximo)
Negativo	3,12	8	4,35	1,54	(0,51) – 6,76
<i>Staphylococcus DNAse negativa</i>	7,01	9	5,23	1,74	2,99 – 11,02
<i>Escherichia coli</i>	0,29	4	2,85	1,43	(4,24) – 4,83
<i>Enterococcus sp</i>	2,68	4	5,35	2,68	(5,84) – 11,2
<i>Enterobacter cloacae</i>	(12,5)	4	12,2	6,1	(31,9) – 6,91
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,57	1	0,00	0,00	-
<i>Enterobacter sp</i>	14,28	1	0,00	0,00	-
<i>Serratia marcescens</i>	2,97	1	0,00	0,00	-

Tabela 13 – Análise estatística da associação: infecção uretral vs circunferência da uretra na área manipulada. Comparação entre a ausência de infecção e a cultura positiva para *Staphylococcus DNase negativa*

Mann-Whitney U = 7.000 e U' = 65.000		
Parâmetros	Cultura Negativa	<i>Staphylococcus DNase</i> Negativa
Soma dos postos	43	110
Média	1,03	1,26
N	8	9
Desvio padrão	0,10	0,19
Erro padrão	0,04	0,06
Mediana	1,0	1,23
Intervalo de confiança 95%	0,95 – 1,12	1,18 – 1,44

4.4 Análise histológica

Ao exame histológico foi encontrada grande uniformidade nas alterações da área submetida à manipulação nos animais de um mesmo intervalo de tempo de estudo. E a comparação entre os diferentes intervalos permitiu formar uma “história evolutiva” da histologia do implante de Si-Pu, no grupo Experimental, e acompanhar a evolução da cicatrização uretral no grupo *Sham*. Todas as avaliações foram comparadas com o padrão normal obtido com o grupo Controle. As descrições da análise histológica de cada intervalo de tempo são apresentadas a seguir.

Microscopia óptica com Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Mason

Grupo Experimental

E-A - a análise histológica revelou atividade inflamatória severa – escore 4 de intensidade de inflamação com mais de 75% de células inflamatórias em campo de 400x - tanto no epitélio quanto na lâmina própria, com intenso infiltrado neutrofílico. O urotélio apresentava-se com sinais de agressão, caracterizado por: metaplasia escamosa, vacuolizações e úlceras do epitélio associada a hemorragia subconjuntival. Houve proliferação fibroblástica da derme e lâmina própria com alguns focos de calcificação. Ocorreu edema importante da lâmina própria. O implante apresenta sinais de extrusão para a luz da uretra, com reação de corpo estranho e células gigantes ao redor do mesmo. À coloração de Masson foi encontrado pouco colágeno nas áreas analisadas, e o mesmo estava depositado ao redor do material implantado. No entanto, encontramos muito núcleo de células fusiformes (fibroblastos) na lâmina própria. Estas alterações são mostradas na Figura 18 e 19.

Figura 18 – Análise histológica da uretra de animal do grupo E-A com coloração HE. **A** – processo inflamatório neutrofílico severo na lâmina própria; implante “expulso” para a luz uretral envolto em tampão leucocitário (seta branca); hemorragia subconjuntival (seta negra) e metaplasia epitelial. **B** – proliferação fibroblástica em lâmina própria e reação de corpo estranho ao redor do implante. (Coloração HE e aumento de 40x)

Figura 19 – Análise histológica da uretra de animal do grupo E-A com coloração TM. **A** – deposição colágena ao redor do material de implante (seta). **B** – núcleos de fibroblastos na lâmina própria. (Coloração TM e aumento de 100x)

E-B – à microscopia óptica com coloração HE encontrou-se atividade inflamatória ainda severa no epitélio e na lâmina própria – escore 4 de intensidade de inflamação. A resposta inflamatória ocorreu com maior intensidade na periferia do implante. O edema da lâmina própria ainda estava presente. O urotélio mostrava-se com metaplasia escamosa no local do implante e com hiperplasia papilomatosa no restante da circunferência da uretra. A submucosa apresentava edema severo e espessamento fibroso tipo colagênico. Em comparação com o grupo E-A, havia menor ocorrência de processo fibroblástico. O implante encontrava-se ainda mais deslocado para a luz uretral, envolto por tampão fibrinoleucocitário. Havia, ainda, menor quantidade de material de implante dentro da lâmina própria, se afastando do urotélio (Figura 20). Ao TM via-se substituição das fibras musculares por fibras colágenas em todo o perímetro uretral e pouca concentração de material fibrótico no interior da cicatriz. A maior deposição do colágeno ao concentrava-se ao redor do implante (Figura 21). O coelho que apresentou extrusão do implante de Si-Pu na análise histológica havia sinais de re-epitelização urotelial e moderada atividade inflamatória infiltrando a lâmina própria. Encontrou-se neste animal a substituição mais pronunciada de fibras musculares da lâmina própria por tecido fibrótico à microscopia óptica do material corado com TM, como mostrado na Figura 22.

Figura 20 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-B com coloração HE. **A** - implante na luz uretral envolto em tampão fibrino leucocitário (seta branca); e metaplasia escamosa do epitélio (seta negra). **B** – processo inflamatório ao redor do implante. (Coloração HE e aumento de 40x e 200x, respectivamente)

Figura 21 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-B com coloração TM. **A** substituição por colágeno das fibras musculares da lâmina própria. **B** – deposição de colágeno e reação gigante celular ao redor do implante. (Coloração TM e aumento de 40x e 200x, respectivamente)

Figura 22 – Aspecto da parede uretral do coelho do grupo E-B, que apresentou expulsão total do implante. Observa-se restauração do urotélio e infiltração da musculatura por tecido fibrótico. (Coloração TM em 40x)

E-C – encontrou-se infiltrado linfomonocitário e edema da lâmina própria de intensidades moderadas – escore 3 . A albugínea do corpo cavernoso adjacente a área do implante apresentava material de inclusão no seu interior com congestão vascular, proliferação vascular e edema. A reatividade epitelial diminuiu. Parte do implante encontrava-se expulso para a luz uretral envolto por tampão fibrino leucocitário e outra parte era vista no interior da lâmina própria ocasionando espessamento com colagenização (Figura 23). À coloração de TM foi observada colagenização da lâmina própria localizada na área de implante, com espessamento da mesma. O restante da lâmina própria apresentava menor espessura, porém com dissecção das fibras musculares por colágeno (Figura 24 A). No coelho que apresentou extrusão total do implante via-se cicatriz fibrosa (Figura 24 B).

Figura 23 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-C com coloração HE. **A** – nota-se presença de material de implante próximo a albugínea dos corpos cavernosos e material de implante na luz uretral (setas). **B** – observa-se menor concentração de células inflamatórias na lâmina própria. (Coloração HE e aumento de 40x e 200x, respectivamente)

Figura 24 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-C. **A** – aspecto da colagenização da lâmina própria ao TM, com destruição da musculatura (aumento 100x). **B** – aspecto histológico da uretra do coelho que apresentou expulsão do implante de Si-Pu, com cicatrização fibrosa evidenciada na lâmina própria (Coloração HE e aumento de 40x)

E-D - nos animais que permaneceram com o implante até 24 semanas, observou-se reação gigante-celular exuberante ao silicone- poliuretano, com acúmulo de células linfocitárias formando folículos, como ilustrado na Figura 25-A. A atividade inflamatória era pontual e localizada somente aonde havia material sintético permeando a camada subepitelial. O epitélio apresentou-se com papilomatose e encontrou-se infiltrado inflamatório em grau discreto - escore 1 de inflamação - apenas naqueles animais que apresentavam exame microbiológico positivo - com infecção bacteriana local – como exemplificado na Figura 25-B. Havia extrusão de material sintético em alguns pontos. No local do implante havia colágeno maduro (Figura 26-A) e no restante da lâmina própria ocorreu diminuição do colágeno e, portanto, diminuição da espessura da parede uretral – ficando com espessura próxima a da uretra normal (Figura 26-B). Os coelhos que tiveram expulsão do implante, o epitélio apresentou-se recuperado. Nestes animais, a lâmina própria teve desarranjo arquitetural com perda das fibras musculares lisas, mas não se observou deposição de colágeno na lâmina própria, senão na área correspondente a área do implante, caracterizando a formação de cicatriz local.

Figura 25 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-D com coloração HE. **A** – nota-se presença de reação gigante-celular (seta branca) e folículo linfocitário (seta negra) ao redor do implante de Si-Pu. **B** – observa-se infiltrado inflamatório subepitelial (seta) em coelho apresentando análise microbiológica do sítio de implante com infecção por *E. coli*. (Aumento de 100x e 40x, respectivamente)

Figura 26 - Análise histológica da uretra de animal do grupo E-D com coloração TM. **A** – presença de colágeno maduro abaixo do epitélio no local do implante (seta). **B** – diminuição do edema e da deposição de colágeno com redução da espessura do urotélio (tracejado) em coelho que apresentou expulsão do Si-Pu. (Aumento de 100x e 40x, respectivamente)

Grupo *Sham*

S-A – ao exame com microscopia óptica encontrou-se infiltrado inflamatório na lâmina própria permeando o urotélio, com neutrófilos e polimorfonucleares em grau moderado – escore 3 de reação inflamatória. Observou-se edema separando as fibras musculares, bem como atividade fibroblástica ao redor do fio de sutura usado na uretrorrafia. As fibras musculares e o urotélio mantiveram suas características preservadas. Estas alterações são visibilizadas na Figura 27.

S-B – após quatro semanas de pós-operatório, houve aumento importante da congestão vascular na lâmina própria, com quase total desaparecimento da atividade inflamatória - grau discreto ou escore 1 de intensidade de reação inflamatória, mantendo o urotélio sem alterações (Figura 28-A). O edema diminuiu e a arquitetura das fibras musculares lisas da lâmina própria permaneceu de aspecto normal, apenas permeada por poucas células polimorfonucleares. (Figura 28-B e Figura 29)

S-C – na oitava semana pós uretrorrafia, a congestão capilar da lâmina própria diminuiu, porém houve aumento dos neutrófilos infiltrando a lâmina própria – de grau leve ou escore 2 de intensidade de reação inflamatória. Associou-se a estas alterações, deposição de colágeno e, por consequência, fibrose região da manipulação cirúrgica. (Figura 30)

S-D – tardiamente, ocorreu aumento da congestão capilar na camada subepitelial em grau mais intenso que o observado nos coelhos com avaliação em quatro e oito semanas de pós-operatório, S-B e S-C. Apareceu infiltrado neutrofílico permeando o epitélio em grau leve, ou escore 2 de intensidade de reação inflamatória. Em algumas regiões do epitélio uretral notou-se erosão do urotélio associada à células mononucleares - características de reação inflamatória crônica. Nestas áreas o processo inflamatório foi considerado severo – ou escore 4 de intensidade de reação inflamatória. A coloração por Tricômico de Masson mostrou que as fibras colágenas estavam arranjadas ao redor – e não de permeio – das fibras da muscular da lâmina própria da uretra. Não houve, portanto, alteração da histoarquitetura da lâmina própria, mas aumento da espessura da parede da uretra com distanciamento da luz uretral da albugínea do corpo cavernoso.

Figura 27 - Análise histológica da uretra de animal do grupo S-A com coloração TM. Observa-se edema (em azul claro) entre as fibras musculares (em vermelho claro) sem alteração da histoarquitetura uretral (Aumento de 40x)

Figura 28 – Análise histológica da uretra de animal do grupo S-B com coloração HE. **A** – nota-se congestão vascular subepitelial (seta branca). **B** – observa-se histoarquitetura preservada e permeada por células polimorfonucleares (seta). (Aumento de 100x e 40x, respectivamente)

Figura 29 - Análise histológica da uretra de animal do grupo S-B com coloração TM. Observa-se diminuição do edema da lâmina própria, em comparação ao grupo S-A, sem alteração da histoarquitetura uretral (Aumento de 40x)

Figura 30 - Análise histológica da uretra de animal do grupo S-C com coloração TM. Observa-se deposição de colágeno no local da manipulação uretral. (Aumento de 40x)

Figura 31 – aspecto histológico da uretra do coelho do grupo S-D. **A** – vê-se intensificação do infiltrado polimorfonuclear no urotélio com coloração HE. **B** – mostra congestão vascular subepitelial e disposição do colágeno ao redor das fibras musculares, sem alterar a histoarquitetura - coloração TM. (Aumento de 40x e 100x, respectivamente)

Imagens da análise histológica do grupo Controle são mostradas na Figura 32 e serviram de comparação do aspecto normal da uretra não manipulada do coelho.

A intensidade do processo inflamatório foi traduzida numericamente, conforme estabelecido anteriormente no capítulo de Métodos. Assim, para a inflamação discreta (com menos de 25% de células inflamatórias por campo de 400x) recebeu escore 1; para a inflamação leve (de 25% a 50% de células inflamatórias por campo de 400x) recebeu escore 2; para a graduação moderada da inflamação (de 50% a 75% de células inflamatórias em campo de 400x) foi utilizado escore 3 e, para a inflamação severa (de 75% a 100% de células inflamatórias por campo de 400x) recebeu escore 4.

Encontrou-se, para o grupo Experimental, intensidade de inflamação 4 para o grupo E-A e E-B, 3 para E-C e 1 para o grupo E-D. No grupo *Sham*, temos intensidade de inflamação 2 para o grupo S-A, escore 1 para o grupo S-B e, para os grupos S-C e S-D, novamente intensidade 2 de inflamação. Estes dados são representados em graficamente na Figura 33.

Figura 32 – Aspecto da histologia da uretra de coelho do GC. **A** - nota-se a integridade do epitélio de transição, ausência de células inflamatórias e de edema da lâmina própria em coloração HE. **B** – arquitetura normal da lâmina própria com integridade do arranjo muscular em coloração TM. (aumento de 40x)

Figura 33– Intensidade do processo inflamatório subepitelial dado por escore. Onde 4 = processo inflamatório severo; 3 = processo inflamatório moderado; 2 = reação inflamatória leve e 1 = reação inflamatória discreta

4.5 Concentração de colágeno

Microscopia de Luz Polarizada com Vermelho Picrosírius

A análise das fotos das lâminas coradas com Picrosirius obtidas com luz polarizada foi realizada utilizando-se programa computadorizado de avaliação de espectro de cores. Foi possível, dessa maneira, avaliar a concentração relativa de colágeno na espessura da parede uretral – na mucosa e na lâmina própria - em relação ao volume total da uretra.

Encontramos uma pequena quantidade de colágeno na lâmina própria da uretra na avaliação das lâminas dos animais com duas semanas de pós-operatório, para ambos os grupos Experimental e *Sham*.

A concentração de colágeno na lâmina própria aumentou progressivamente com o tempo, atingindo seu pico em 24 semanas no grupo Experimental. No grupo *Sham*, o pico de concentração de colágeno ocorreu nos animais com oito semanas de pós-operatório e houve queda importante da concentração de colágeno com 24 semanas de pós-operatório. As Figuras 34, 35 e 36 mostram a imagem da lâmina corada com Picrosírius de um representante de cada intervalo de tempo de estudo para os três grupos, Experimental, *Sham* e Controle, respectivamente. A Figura 37 ilustra aspecto do programa gráfico de análise de espectro de cores.

Figura 34 – Aspecto das lâminas da uretra de coelhos do grupo Experimental, coradas com PR. **A** – espécime com duas semanas de pós-operatório; **B** – espécime com quatro semanas de pós-operatório; **C**– espécime com oito semanas de pós-operatório e **D**– espécime com 24 semanas de pós-operatório. (Aumento de 40x)

Figura 35 – Aspecto das lâminas da uretra de coelhos do grupo *Sham*, coradas com PR. **A** – espécime com duas semanas de pós-operatório; **B** – espécime com quatro semanas de pós-operatório; **C**– espécime com oito semanas de pós-operatório e **D**– espécime com 24 semanas de pós-operatório. (Aumento de 40x)

Figura 36 – Aspecto das lâminas da uretra de coelhos do grupo Controle, coradas com PR. **A** – análise com aumento de 40x; **B** – análise com aumento de 100x

Figura 37 – Aspecto da área de trabalho oferecida pelo programa ImageLab 2.4, para análise do espectro de cores de lâminas coradas com PR em aumento de 100x

Os valores de concentração de colágeno foram expressos como porcentagem e representam a porção da parede uretral que é constituída por colágeno em relação ao constituinte total da parede. Os valores encontrados em cada grupo de estudo são expressos na forma de medidas de tendência central e dispersão e estão expressos na Tabela 14 e na Figura 38.

Tabela 14 - Concentração de colágeno na uretra da área submetida a manipulação – nos grupos Experimental e *Sham* - e área equivalente no grupo Controle. Os dados são apresentados como medidas de tendência central e dispersão calculados à partir de valores obtidos como porcentagem de colágeno que constitui a parede uretral

Parâmetros	E-A	E-B	E-C	E-D	S-A	S-B	S-C	S-D	GC
N	25	25	25	25	15	15	15	15	15
Média	22,22	39,48	36,41	54,39	31,99	30,84	42,31	32,69	35,82
Desvio Padrão	5,69	11,99	8,63	13,94	7,53	7,41	11,91	10,35	8,74
Erro Padrão	1,14	2,4	1,73	2,79	1,94	1,91	3,08	2,67	2,26
IC 95% inferior	19,87	34,52	32,85	48,64	27,82	26,74	35,71	26,96	30,98
IC 95% superior	24,57	44,43	39,97	60,15	36,16	34,95	48,9	38,42	40,66
Mínimo	12,27	16,38	20,87	20,1	20,33	16,7	16,43	18,57	23,34
Máximo	36,65	60,36	57,16	73,79	45,05	48,65	63,5	49,27	50,14

Figura 38 – Porcentagem média de colágeno encontrado na submucosa de cada um dos grupos estudados e respectivo desvio padrão

Após tratamento estatístico dos dados pelo método não paramétrico com Análise Múltipla de Variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer de Comparação Múltipla, foi encontrada diferença estatisticamente significativa na concentração de colágeno na parede uretral apenas entre os grupos E-A quando comparado com o GC ($P < 0,01$); quando se comparou E-D vs S-D ($P < 0,001$) e entre E-D vs GC ($P < 0,001$).

Houve aumento relativo de colágeno com o maior intervalo tempo de implante observado no grupo Experimental. À análise estatística, mostrou-se diferença significativa quando comparamos E-A vs. E-B, na comparação de E-A vs. E-C, na comparação de E-A vs E-D, na comparação de E-B vs. E-D e quando comparamos E-C vs. E-D ($P < 0,001$).

A variação da concentração relativa de colágeno observada nos diferentes intervalos de tempo de estudo das amostras do grupo *Sham* não mostraram significância estatística pelos testes empregados quando comparamos os grupos S-A, S-B, S-C e S-D entre si.

Espessura da Submucosa

A análise das lâminas coradas com Tricrômico de Mason em aumento de 40x, com auxílio do “*software*” ImageLag 2000, versão 2.4, permitiram obter a medida da espessura da parede da uretra. Os valores foram medidos em pixels e são expressos como medidas de tendência central e de dispersão na Tabela 15. A Figura 39 ilustra estes dados na forma de gráfico.

Tabela 15 - Espessura da parede da uretra na área manipulada – para os grupos Experimental e *Sham* - e na área equivalente do grupo Controle. Os dados são apresentados como medidas de tendência central e dispersão calculados à partir de valores obtidos em pixels

Parâmetros	E-A	E-B	E-C	E-D	S-A	S-B	S-C	S-D	GC
N	15	9	20	15	15	15	15	10	10
Média	495,8	643,8	626,1	465,1	191,2	199,5	378,1	301,6	344
Desvio Padrão	120,1	222,2	75,6	277,7	65,2	41,6	223,5	91,4	102,1
Erro Padrão	31	71,1	16,9	71,7	16,8	10,7	57,7	28,9	32,3
IC 95% inferior	429,3	472,9	590,7	311,3	155,1	176,4	254,3	236,3	271
IC 95% superior	526,3	814,6	661,4	618,9	227,3	222,5	501,8	367	417
Mínimo	284	344,5	498,1	195	90,4	92	150	171,4	145,6
Máximo	718	858	798,1	868,3	291,2	276,1	776	433	455

Figura 39 – Espessura da parede da uretra - média e desvio padrão por grupos - para os diferentes grupos, obtidos por medida das lâminas corada com TM em aumento de 40x (medidas em pixels)

Realizou-se tratamento estatístico pelo método de Kruskal-Wallis e pelo teste de Comparação Múltipla de Dunn e verificamos que há diferença significativa entre os grupos E-A vs S-A ($P < 0,001$), entre os grupos E-B vs S-B ($P < 0,001$), e entre os grupos E-C vs S-C ($P < 0,05$). Porém não foi observada diferença nos valores obtidos entre os animais dos grupos Experimental e do grupo Controle.

4.6 Análise termogravimétrica (TG)

Análise Descritiva das Curvas TG e DTG

Submetendo à TG as amostras de fragmento da placa silicone-poliuretano, de fragmento de silicone isolado da placa original e de fragmento de poliuretano isolado da placa original – todos sem contato com sistema biológico – encontrou-se estabilidade desses materiais até a temperatura de 250° C a 300°C. Ou seja, apenas após 250°C de temperatura observamos início da perda de massa dos polímeros. Esta característica do material pode ser observada na análise da Derivada da Curva de Termogravimetria (DTG), mostrado na Figura 40-C.

Submetendo à TG as amostras de Si-Pu com exposição biológica - ou seja, que tiveram contato com sistema orgânico do coelho – encontrou-se características de degradação distintas das observadas para o polímero não exposto ao trato urinário do coelho. Observou-se que há perda de massa com temperaturas menores que 200°C o que revela presença de matéria orgânica e água na amostra, portanto há modificação das características do polímero após interação deste com o meio biológico. Estas curvas são demonstradas nas Figuras 40-A e 40-B.

Observa-se deslocamento para esquerda na curva de DTG da temperatura em que ocorre a maior perda de massa pelo implante Si-Pu,

expressa pela maior depressão da curva ao compararmos os dados obtidos com o grupo Experimental em relação ao Si-Pu isolado, como mostrado na Figura 41. Esta curva de maior depressão ocorre em temperatura próxima a 460°C para o fragmento da placa de Si-Pu e quase 50°C acima para o implante uretral. Esta depressão corresponde à perda de massa pela “queima” do silicone e do poliuretano e a alteração na temperatura de pico da maior perda de massa indica mudança na estrutura do Si-Pu após seu implante, exigindo maior temperatura para ocasionar esta fase da perda de massa do polímero.

Observou-se o aparecimento de novas curvas de perda de massa em temperaturas mais elevadas para o material implantado, ou seja, nova curva a esquerda da depressão pela “queima” do Si-Pu. Esta alteração indica presença de nova matéria incorporada ao implante após sua exposição ao meio biológico. Os animais do grupo E-D (com 24 semanas de enxertia) tiveram esta alteração mais acentuada que os dos grupos E-A, E-B ou E-C, conforme ilustrado na Figura 41.

Figura 40 - Curvas de TG e DTG com a temperatura do o início da perda de massa pelos diferentes grupos. **A** – curva TG e DTG de amostra do grupo E-A; **B** – curva TG e DTG de amostra do grupo E-D; **C** – curva TG e DTG de amostra de Si-Pu. (a seta vermelha mostra o início da perda de massa pelas amostras).

Figura 41 - Sobreposição das curvas TG – superior - e DTG – inferior - da amostra de fragmento da folha de Si-Pu e amostra do implante em diferentes intervalos de tempo. Notar o deslocamento para a esquerda da maior curva da DTG das amostras de animais em relação ao material de implante sem contato com meio biológico. As setas mostram o aparecimento de uma segunda curva em sobreposição a esquerda da curva mais acentuada

Análise Quantitativa das Curvas TG

A análise das curvas de termogravimetria obtidas com material sintético retirado dos coelhos do grupo Experimental permitiram extrair dados referentes a porcentagem de perda de massa em determinada temperatura. Foi determinada a temperatura de 700°C para esta análise por ser esta a temperatura na qual a maioria das amostras apresentou estabilização na perda da massa, isto é, cessar a sua queima. Os dados obtidos foram comparados com a perda de massa de um fragmento da placa de Si-Pu, na mesma temperatura (700°C).

Observamos que o maior intervalo de tempo entre o implante e a retirada do material para análise foi associado a menor perda de massa, aproximando-se os valores de perda de massa ao apresentado pelo Si-Pu isolado. Os valores encontrados são exibidos como medidas de tendência central e dispersão na Tabela 16 e exemplos de curvas de análise termogravimétrica são ilustrados pela Figura 42.

Vale ressaltar a expressiva perda de amostras para análise TG no grupo E-D, devido a expulsão do implante ocorrida em 3 dos 5 animais de experimentação. A Figura 13 mostra os dados referentes as perdas de informação pela expulsão do implante.

Aplicando-se o teste de Mann-Whitney (não paramétrico) para comparação entre as colunas, não ocorreu diferença estatística para a perda de massa do implante entre os valores médios encontrados no grupo Experimental - para os diferentes intervalos de tempo - e o fragmento da placa de Si-Pu original. Os valores de P encontrados foram: $P=0,19$ na comparação entre E-A vs Si-Pu, de $P=0,13$ para análise de E-B vs Si-Pu, para E-C vs Si-Pu encontramos $P=0,40$ e entre E-D vs Si-Pu obtivemos $P=0,66$.

Tabela 16 – Medidas de tendência central e dispersão referentes TG para de perda de massa do implante e da placa de Si-Pu – expresso em porcentagem – pra a temperatura de 700°C , em atmosfera dinâmica de ar

Parâmetros	E-A	E-B	E-C	E-D	Si-Pu
N	5	4	3	2	2
Média	61,75	60,39	57,36	56,74	53,84
Desvio Padrão	5,92	4,52	2,46	6,63	3,34
Erro Padrão	2,65	2,26	1,42	4,68	2,36
IC 95% inferior	54,4	53,2	51,25	-2,78	23,85
IC 95% superior	69,11	67,58	63,46	116,27	83,83

Figura 42 – Curvas TG/DTG obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar da amostra E-A5

Figura 43 - Sobreposição das curvas TG e DTG (detalhe) obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar das amostras E-A1 a E-A5

Figura 44 – Curvas TG/DTG obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar da amostra E-B2

Figura 45 – Curvas TG/DTG obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar da amostra E-C5

Figura 46 – Curvas TG/DTG obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar da amostra E-D4

Figura 47 – Curvas TG/DTG obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar da amostra da folha de silicone/poliuretana

Outro dado extraído da análise das curvas de TG foi a mensuração da perda de massa das amostras de implante quando submetidas a temperaturas acima de 700°C. A temperaturas dessa magnitude ocorre a “queima” de matéria inorgânica, ou seja, que não contém carbono. A análise TG da folha do Si-Pu não mostra perda de massa acima de 700°C, portanto, perdas de massa apresentada pelo implante em temperaturas acima dos 700°C caracterizariam substâncias inorgânicas incrustada no implante. Os dados referentes a essas medidas são mostrados na Tabela 17.

Não se encontrou diferença estatística significativa com a utilização do teste não paramétrico de Mann-Whitney na comparação entre grupos.

Os resultados obtidos de todas as análises, seu possível significado e implicações serão discutidos a seguir

Tabela 17 – Dados obtidos pela TG para perda de massa pelo implante – expresso em % - para temperatura acima de 700°C em atmosfera dinâmica de ar

Amostra Grupo Experimental	% Perda de massa	Média	DP	Erro Padrão
A1	0,538%	0,545%	0,139	0,062
A2	0,676%			
A3	0,469%			
A4	0,358%			
A5	0,684%			
B1	0,616%	0,541%	0,259	0,129
B2	NI			
B3	0,267%			
B4	0,418%			
B5	0,865%			
C1	0,017%	0,521%	0,439	0,254
C2	0,720%			
C3	NI			
C4	0,825%			
C5	NI			
D1	NI	0,337%	0,315	0,223
D2	NI			
D3	0,560%			
D4	0,114%			
D5	NI			

Os principais resultados obtidos são resumidos na Tabela 18 e mostram os valores das probabilidades estatísticas e as significâncias (P) obtidos com os diferentes testes aplicados.

Tabela 18 – Valores de P na comparação entre os grupos nas diferentes variáveis avaliadas

Parâmetros	Valores de P	Grupos comparados
Média do peso inicial dos animais	0,173	GE x GS
Média da variação de peso inicial e final	0,072*	E-A x S-A
	0,052*	E-B x S-B
	0,072*	E-C x S-C
	0,393	E-D x S-D
Circunferência da área manipulada (índice)	0,143	E-A x S-A
	0,036*	E-B x S-B
	0,455	E-C x S-C
	0,55	E-D x S-D
	>0,3	GE x GC
	>0,1	GS x GC
Circunferência da uretra proximal (índice)	0,035*	E-A x GC
	0,786	E-A x S-A
	0,999	E-B x S-B
	0,295	E-C x S-C
	0,654	E-D x S-D
Infecção do sítio operatório	0,2	GE x GS
Infecção por <i>Enterobacter cloacae</i> e variação negativa de peso	0,02*	<i>E. cloacae</i> x cultura negativa
	0,003*	<i>E. cloacae</i> x <i>S. DNase negativa</i>
	0,03*	<i>E. cloacae</i> x <i>E. coli</i>
	0,03*	<i>E. cloacae</i> x <i>Enterococcus</i>

continua

Tabela 18 – Valores de P na comparação entre os grupos diferentes variáveis avaliadas (conclusão)

Infecção e maior circunferência uretral	0,006*	<i>Staphylococcus</i> x sem infecção
	<0,01*	E-A x GC
Concentração de colágeno na parede uretral	<0,001*	E-D x S-D
	<0,001*	E-D x CG
	<0,001*	E-A x S-A
Espessura da parede uretral	<0,001*	E-B x S-B
	<0,05*	E-C x S-C
	0,19	E-A x Si-Pu
Perda de massa do implante	0,13	E-B x Si-Pu
	0,4	E-C x Si-Pu
	0,66	E-D x Si-Pu

(*) valores significantes estatisticamente

DISCUSSÃO

5 Discussão

5.1 Caracterização da casuística utilizada

Outros trabalhos utilizaram o silicone como implante para substituição uretral e foram realizados na década de 70, em animais (cães e felinos) e em humanos. Estes trabalhos utilizaram o elastômero de silicone puro na forma de um tubo, e substituíam todo um segmento uretral – em toda a sua circunferência. Apesar das conclusões dos autores, que creditavam ótimos e promissores resultados à técnica, a mesma foi abandonada nas décadas seguintes para dar lugar ao uso dos enxertos autólogos.

Associação de outros materiais, como PTFE e PET, ao silicone foi realizada na tentativa de melhorar o alto índice de expulsão do implante, verificada nos primeiros trabalhos com silicone puro. Foram realizados estudos em humanos e animais sem sucesso de obter diminuição da taxa de expulsão. Apesar desse fracasso, as conclusões dos autores mantinham a afirmação de que a prótese de silicone era uma boa opção para a substituição da uretra. Talvez esta afirmação baseie-se no achado de baixa taxa de recorrência de estenose nas uretras tratadas com este material e correspondente técnica.

O presente estudo difere dos outros que utilizaram o implante de silicone por, basicamente, três aspectos. Primeiro pela inovação do uso do poliuretano visando melhorar a adesividade do implante aos tecidos adjacentes e diminuir a retração da cicatriz gerada pelo implante. O uso do Pu permite também ainda, imprimir características hidrofílicas ao silicone ocasionada pela polimerização desses dois compostos. As características hidrofílicas tencionam diminuir a ocorrência de infecção, de reação inflamatória e de incrustação de material inorgânico ao implante quando em contato com a uretra e a urina.

A segunda diferença entre os estudos prévios que utilizaram o silicone como substituto uretral e este trabalho está na técnica cirúrgica empregada, contrapondo o enxerto tubular ao implante dorsal com preservação do leito ventral de epitélio de transição.

Finalmente a terceira diferença entre este estudo e os anteriores está na metodização do estudo, com o uso de um grupo controle no qual foi realizada manipulação com uretrotomia e uretrorrafia para comparação – denominado grupo *Sham* neste estudo – e o uso de outro grupo controle sem qualquer manipulação. Ainda, utilizamos a busca de infecção e de incrustação do implante, além da análise histológica e da pesquisa de colágeno. Outro diferencial é a utilização da análise termogravimétrica do implante, permitindo perceber as alterações sofridas pelo polímero não apenas relacionadas a incrustação de material inorgânico, mas também as alterações ocasionadas pelo ataque biológico causado pelo sistema imune do hospedeiro.

Assim, Gilbaugh *et al*⁶², utilizaram o silicone na forma tubular na substituição de parte da uretra de seis cães machos, em três deles usaram próteses de diâmetro menor que o diâmetro uretral e nos outros três, próteses de diâmetro igual ao da uretra do cão. Os autores mantiveram uma faixa de epitélio uretral intacta, externamente ao tubo de silicone, para facilitar a re-epitelização. Fez-se estudo radiológico com uretrocistografia pré-operatória e seriada, fez-se estudo microbiológico da urina e análise histológica após quatro meses do implante. Não houve grupo controle e a análise de calcificação e incrustação inorgânica foi realizada apenas através de microscopia óptica.

Court *et al* em 1973⁶⁴ utilizaram próteses de silicone semelhantes às próteses ureterais para substituição da uretra humana masculina em três casos de estreitamento da uretra no qual não houve solução com outras técnicas de correção. Eram próteses tubulares, de extremidades afiladas, texturizadas externamente, polidas na sua luz e com curvatura de aproximadamente 115°. Esta publicação foi um relato de casos e não contou com a busca por incrustação ou infecção e tampouco fez estudo histológico da reação tecidual ao implante – exceto por um dos pacientes que foi submetido a autópsia pois faleceu de outra causa.

Também em 1973, Robinette⁶³ utilizou um tubo de silicone para fazer derivação urinária vésico-perineal em 24 gatos machos, sendo dez em grupo controle – o autor não especifica como é definido este grupo - e 14 gatos com obstrução uretral crônica. O autor não faz qualquer tipo de

análise, seja histológica ou microbiológica, nem sequer compara os grupos controle e com obstrução uretral.

Em 1976, Vincent e Anquetil¹²⁴ fazem relato de caso no qual substituíram a uretra de um paciente do sexo masculino de 56 anos por 8 cm com um tubo de silicone de 24 Ch de diâmetro, devido estenose complexa da uretra, com seguimento de sete meses. Apesar de o autor estimular a utilização deste tipo de prótese na conclusão do trabalho, trata-se apenas de um caso isolado.

Munro e Scott¹²⁵ apresentaram relato de série de 10 casos de pacientes com lesão espinhal que estavam sob regime de cateterismo intermitente, que tiveram implantadas, por via endoscópica, uma endoprótese de silicone com 11,5 cm de comprimento e 20 F ou 24 F de diâmetro, com uma extremidade na bexiga e a outra distal ao esfíncter. Estas endopróteses permaneceram na uretral. Os dispositivos foram removidos após período de 29 dias até 231 dias (média de 109 dias) por mau funcionamento, infecção urinária persistente ou evidência de formação de concreção de moderada a severa. Não foi realizada análise histológica.

A escolha dos intervalos de tempo para nosso estudo das alterações uretrais baseou-se em dados da literatura que indicavam os principais períodos pós-operatórios de uretroplastias em que ocorreriam complicações. Bødker *et al*¹²⁶, em um estudo de recorrência de estenoses de uretra após uretrotomia interna em humanos, verificaram que novo estreitamento ocorre, em média, quatro meses após a correção. Em outro estudo, Goel *et al*¹²⁷ encontraram taxa de recorrência da estenose em três meses após

uretrotomia de 69% e, após um ano, recorrência de 25%, identificando o caráter precoce da estenose sucedendo manipulação uretral. Em 2007, Palmintieri *et al*¹²⁸ encontraram fístula precocemente, em três semanas após a reconstrução uretral com enxerto de mucosa bucal.

5.2 Enxerto sintético

Fator que deve ser considerado na escolha do uso de polímero inabsorvível para a reconstrução uretral é a porção da uretra a ser tratada e a extensão da lesão. Sendo um implante permanente, a uretra não pode ter grande mobilidade e a lesão não pode ser extensa sob o risco de curvatura peniana durante a tumescência, ou por risco de acotovelamento da uretra como apontado por Court *et al*⁶⁴ com o uso de próteses tubulares. O fato de substituímos a circunferência parcial da uretra e fixarmos o implante no corpo cavernoso evitou a mobilidade do implante e eventual decalagem entre a luz da uretra normal e a luz da área manipulada.

Deve se notar que, sendo este um estudo experimental em animal, utilizamos uretra sadia e sem manipulações prévias para as análises. Situação distinta da rotina médica habitual, na qual os pacientes são multi-operados e/ou têm espongiosclerose intensa, fato este já citado como possível falha de uso de polímeros na reconstrução uretral em humanos.⁶⁴

Diferentes polímeros foram estudados em diferentes finalidades no trato urinário durante décadas. A aplicação e as complicações de alguns desses trabalhos são relatados na Tabela 17.

Particularmente, o silicone não apresenta aderência tecidual e, no trato urinário, tende a ser expulso. Este fato foi relatado por Kropp *et al*⁶⁷ em seu estudo sobre o uso de bainha de silicone posicionada circunferencialmente ao colo vesical na reconstrução deste pela técnica de Young-Dees-Leadbetter, visando manter o local da cirurgia retificado e facilitar uma futura colocação de esfíncter artificial. O procedimento foi realizado em 15 pacientes pediátricos portadores de incontinência urinária secundária a mielodisplasia, disfunção neurogênica, extrofia vesical e epispádia. Ocorreu erosão de 10 das 15 bainhas para a uretra e bexiga, em média após 48,2 meses do implante. Dado a alta taxa de erosão, os autores recomendaram abandonar este uso do silicone.

Outros autores que demonstraram esta característica do silicone foi Forrest e Said.⁴⁵ Eles utilizaram um tubo de silicone para constriar a uretra e, assim, obter continência em vinte e duas mulheres e dois homens (idade média de 15 anos) portadores de espinha bífida sofriam de falência esfinteriana. Das pacientes do sexo feminino, 15% (3/20) apresentaram extrusão do material sintético para a luz uretral e o procedimento teve seu uso descontinuado.

Já Pentermann *et al*¹²⁹ relataram bons resultados em seu trabalho em que confeccionam uma bexiga artificial com silicone e a implantam em 2 cães, porém o seguimento é curto, de apenas 18 dias.

A baixa aderência dos tecidos ao silicone tem vantagens em algumas aplicações, por exemplo, como suporte para o crescimento de tecidos tanto *in vitro*, em culturas de células, quanto *in vivo*, como guia para regeneração de nervo periférico, de acordo com o exposto por Lundborg *et al*¹³⁰ e por Chen *et al*.¹³¹

A textura da superfície da prótese de silicone não interfere na aderência tecidual ou na formação da cápsula ao redor do implante, como observado por Poppl *et al*.¹³² Estes autores observaram que não existe diferença significativa entre superfície lisa ou texturizada de enxerto mamário no desenvolvimento de contratura capsular. A contratura capsular mostrou correlação linear positiva com o grau de reação inflamatória local, o que é independente da superfície do implante.

Tabela 19 – Exemplos de materiais sintéticos utilizados em reconstruções do trato urinário, sua aplicação e as principais complicações relacionadas ao seu uso

Investigador	Aplicação	Material	Achados
Kudish (1957) ²¹	Cistoplastia em cães	Esponja de polivinil comprimida	Extrusão e calcificação do implante
Swinney (1961) ²²	Trato urinário	Teflon	Extrusão do implante
Blum <i>et al</i> (1963) ¹³³	Substituto ureteral em cães	Silicone tubular com revestimento externo de polivinil	Infecção do sítio de implante (2/7) e estenose da anastomose (1/7)
Gilbaugh <i>et al</i> (1969) ⁶²	Uretroplastia em cães	Silicone tubular com Dacron nas extremidades	Fístula (3/6), estenose (3/6) e deslocamento da prótese (3/6)
Blum <i>et al</i> (1969) ²³	Implante vesica e substituto ureteral	Silicone, látex e teflon	Silicone tem menores taxas de incrustação e infecção. Enquanto prótese não houve incrustação e quando ocorreu infecção, não houve fixação.
Dressler e Many (1969) ²⁴	Neobexiga sintética em cães	Silicone revestido externamente por nylon	Encapsulamento da prótese por fibrose e reação de corpo estranho, sem crescimento de mucosa
Stanley <i>et al</i> (1971) ²⁵	Ampliação vesical em ovelhas e cães	Silicone revestido externamente por PET	Encapsulamento da prótese por tecido conectivo precocemente e por musculatura tardiamente, sem crescimento de mucosa
Court <i>et al</i> (1973) ⁶⁴	Uretroplastia em homens	Silicone tubular	Decalagem entre prótese e uretra(2/3), obstrução da luz do implante por crescimento epitelial reacional (2/3), fístula urinária (1/3) e incontinência urinária (1/3)
Robinette (1973) ⁶³	Uretrostomia em gatos	Silicone tubular com PET em uma extremidade	Cistite crônica, esforço à micção e obstrução por cálculo de estruvita
Vincent e Anquetil (1976)	Uretroplastia em homem	Silicone tubular com politeriftalato de etileno (PET) nas extremidades	Gotejamento terminal
Munro e Scott (1976)	Endoprótese uretral em homem	Silicone tubular	ITU persistente (6/9), concreção (3/9) e mau funcionamento

continua

Tabela 19 – Exemplos de materiais sintéticos utilizados em reconstruções do trato urinário, sua aplicação e as principais complicações relacionadas ao seu uso – conclusão

Investigador	Aplicação	Material	Achados
Hakky (1976) ²⁶ e Hakky (1977) ²⁷	Uretroplastia em cães	Malha de Dacron siliconizada e tubo de tecido fibrótico autólogo	10% fístula precoce, malha de Dacron foi expulsa para a luz sem diminuição do diâmetro uretral
Abbou <i>et al</i> (1977) ²⁸	Neobexiga sintética em cães	Elastômero de silicone	30% de fístula, infecção freqüente, sem incrustação após 2 meses
Block <i>et al</i> (1977) ²⁹	Ureteres em cães	Teflon revestindo tubo hidrofílico de metacrilato	Filme protéico sobre a prótese, sem calcificação após 2 anos. Intensa fibrose peri-prótese
Bergman <i>et al</i> (1978) ³⁰	Ureteres	Dacron, ácido láctico poli L (-)	Desintegração do implante e obstrução ureteral
Kline <i>et al</i> (1978) ³¹	Neobexiga sintética em cães	PET revestido de poli éter uretano	Apenas 9 dias de sobrevivência dos animais sob avaliação
Palleschi e Tanagho (1978) ³²	Uretra	PET revestido de silicone	Sem complicações
Totoro <i>et al</i> (1981) ³⁴	Ureter	Poliuretano	Sem complicações
Furey	Válvula ureteral	Teflon, silicone	Sem complicações
Varady <i>et al</i> (1982) ³⁵	Substituto ureteral em cães	Politetrafluoroetileno (PTFE)	Migração da prótese, infecção, calcificação e hipertrofia da mucosa ureteral
Anwar <i>et al</i> (1984) ³⁶	Uretroplastia em cães	PTFE tubularizado	Fístula, calcificação e fibrose sem crescimento urotelial
Olsen <i>et al</i> (1992) ³⁷	Uretroplastia em cães	Poligalactina revestida com ácido polihidroxibutírico	Sem complicações
Italiano <i>et al</i> (1997) ³⁸	Uretroplastia em coelho	Ácido hialurônico tubularizado	Sem complicações com possível expulsão do enxerto

A associação do silicone com outros materiais visa solucionar o problema da expulsão do material. O uso de materiais inabsorvíveis em contato com a urina favorece a cristalização e formação de cálculos. O uso de materiais biodegradáveis leva a necessidade de processo inflamatório pelo organismo hospedeiro, podendo, assim, dificultar a regeneração tecidual. A associação de polímeros inabsorvíveis com biodegradáveis parece “criar” novos materiais, incorporando características dos dois compostos.

Desse modo, compostos de silicone com hidrogel - que nada mais é que elastômero de silicone com partículas muito finas de hidrogel - possuem, quando em meio líquido, algumas propriedades típicas dos hidrogéis sintéticos. Uma dessas propriedades é a permeabilidade a partículas de baixo peso molecular hidro-solúveis, como compostos orgânicos não-iônicos e sais inorgânicos, que, contrariando o esperado pela matriz hidrofóbica de borracha, a velocidade de passagem é alta.

Lopour e Janatová¹³⁴ testaram vulcanização e polimerização de silicone com metacrilatos, transformando o silicone em biomaterial, com menores toxicidade e reatividade.

O poliuretano é um polímero que pode ser associado ao silicone, e a associação desses compostos leva a modificação de suas características. Exemplo deste fato é o poliéter-poliuretano que leva silicone em sua composição e é hidroliticamente estável, diferente dos poliuretanos baseados em poliéster, que são hidroliticamente instável.⁶⁹ A utilização desses dois polímeros em conjunto pode ainda ser feita não na forma de

mistura para constituição de um novo composto, mas na forma de revestimento. Esta prática tem aplicabilidade na medicina.

A aplicação da associação Si-Pu pode ser encontrada nas próteses mamárias nas quais uma base de silicone é vulcanizada por espuma de poliuretano. Vasquez e Pellón⁷³ relatam os seguimento por 15 anos de 180 casos submetidos a este tipo de implante mamário e observaram e menor incidência de contratura da cápsula fibrótica ao redor do implante. Referem, também, que o Pu desaparece em dois anos após implantado, mas que o processo de vulcanização para a cobertura da prótese deixa o silicone com textura rugosa, com parte do Pu aderido a ela. A presença do poliuretano induz a desorganização do colágeno da cápsula – diferente do colágeno organizado de forma linear e paralela encontrado com o implante de próteses de silicone puro com superfície lisa.

Achados semelhantes foram descritos por Smahel¹³⁵ e por Brand⁷¹, onde ressaltam a importância da ejeção para os tecidos adjacentes, de micropartículas de Pu, responsáveis pela reação de corpo estranho e o padrão de colagênese.

Os autores Gorna e Gogolewski¹³⁶ e Gogolewski *et al*¹³⁷ citam o uso do poliuretano para confecção de esqueleto usado na reparação e regeneração tecidual e exemplificam métodos para o desenvolvimento de porosidade no material, relatado como o principal fator para o sucesso do seu uso como citoesqueleto.

Exemplo desta aplicação é dado por Hausner *et al*¹³⁸ em estudo experimental em ratos, onde os autores obtêm regeneração de um

seguimento de nervo ciático utilizando um esqueleto tubular de poliuretano coberto com selante de fibrina. Outro exemplo dado por Chia *et al*¹³⁹ utiliza o poliuretano na forma de uma membrana fina como suporte para cultura de células, condrócitos, usada no desenvolvimento laboratorial de um substituto para a membrana periostal, visando futura aplicação no tratamento de defeitos da cartilagem articular. Ainda, van Minnen *et al*¹⁴⁰ utilizaram a espuma de poliuretano para o fechamento de comunicação entre a cavidade oral e o seio maxilar de coelhos em estudo experimental e verificaram o crescimento de tecido conectivo permeando o Pu.

No trato urinário, o Pu é utilizado na confecção de cateteres pielo-vesicais tipo duplo jota ou “*pig tail*”, que têm uso rotineiro na prática urológica. O uso dos cateteres endourológicos de longa permanência está associado a complicações relacionadas a sua interação com a urina e com o urotélio. Uma das principais complicações é a incrustação de material orgânico e inorgânico nos cateteres, levando a obstrução da luz do cateter.¹⁴¹

Em estudo experimental em dezesseis cães, Totoro *et al*³² substituíram o ureter terminal por uma prótese tubular de poliuretano e observou o desenvolvimento de um “neoureter”, caracterizado como um pseudoureter ao redor da prótese. Este tecido era composto por músculo liso desorganizado, sem evidências de células de corpo estranho ou crescimento tecidual no interior da prótese; a camada epitelial de células de transição era hiperplásica, com evidência de metaplasia de células escamosas.

Antes desses autores, Stanley *et al*²⁵ usaram o silicone revestido de poliéster na ampliação vesical de ovelhas e cães. O material sintético serviu de molde para a regeneração tecidual após dezoito meses do implante.

Nosso estudo também obteve resultado semelhante. Conseguimos a formação de tecido conectivo no local do implante que serviu de suporte para a regeneração do urotélio. A manutenção da circunferência uretral semelhante àquela encontrada no grupo Sham corrobora a inferência de que a neouretra formada não apresenta contração.

O motivo pelo qual algumas cicatrizes contraem e outras não ainda é indeterminado. Alguns estudos apontam a presença de miofibroblastos permeando a cicatrização como a causa da contração cicatricial, outros, tipo de colágeno envolvido. Silva *et al*^{142, 143} estudaram a composição de glicosaminoglicanos (GAGs) na uretra de homens saudáveis e de homens portadores de estenoses uretrais e encontraram acúmulo excessivo de colágeno nas áreas estenosadas acompanhada de diminuição do total de GAGs. Os GAGs ocorrem na forma de glicoconjugados denominados proteoglicanos – estes são importantes componentes da superfície celular e interagem com os componentes matriciais (colágeno, laminina, fibronectina e citocinas), desempenhando papel fundamental na cicatrização. Os GAGs sulfatados com maior concentração na uretra masculina sadia são: o dermatan sulfato e o condroitin sulfato e, ainda, em menor quantidade heparan sulfato. Já na uretra estenosada o GAG com maior prevalência é o dermatan sulfato e o ácido hialurônico é o GAG com maior decréscimo de sua concentração. O ácido hialurônico é o GAG com maior concentração no

início dos processos de cicatrização e os GAGs sulfatados têm maior concentração com a progressão da cicatriz.

Outra provável explicação para a não contração da cicatriz, que não a sua composição, é justamente o desarranjo na organização das fibras colágenas. E, conforme citado anteriormente, pode ser conseguida com o uso da espuma de poliuretano. Em nosso estudo, apesar de não ter sido objeto de análise sistemática, o detalhamento das lâminas na análise histológica, tanto na coloração com TM quanto com Picrosírius Red, revelou a desorganização da musculatura lisa da uretra dada pela “infiltração” desordenada do colágeno, que não se dispõe em nenhum arranjo específico.

A ocorrência de musculatura lisa na uretra do coelho com participação na continência urinária foi demonstrado por Sergeant *et al*¹⁴⁴ em 2000, quando estes autores identificaram células intersticiais semelhantes células de músculo liso na parede uretral, porém com abundância de filamentos de vimentina e com poucos filamentos de miosina, especializadas em neuromodulação. Estas células controlariam a contração dessa musculatura. A destruição do arranjo da musculatura lisa e das células marca-passo provocada pela reação inflamatória ao implante pode levar a perda da capacidade de contração da uretra e poderia ser o terceiro motivo par a manutenção do diâmetro uretral na área manipulada. Nos estudos com matriz acelular para reconstrução uretral em coelhos, Sievert *et al*^{13, 145} observaram que, após seis meses do implante, a presença de fibras de músculo liso era pequena e orientada longitudinalmente com o uso da matriz

autóloga, porém era praticamente ausente com a matriz heteróloga, notando-se apenas a presença de miofibroblastos. Nesta última, o músculo liso é detectado após oito meses, indicando que a regeneração do tecido depende do tipo de suporte oferecido para seu crescimento.

Achado semelhante é observado na uretra de coelhos submetidos a substituição uretral por retalho ventral *on lay* de submucosa intestinal – material xenogênico, não imunogênico de base colágena. Onde a análise histológica em após três meses da cirurgia revela ausência de músculo liso¹⁴⁶, ou a presença de algumas fibras musculares de distribuição não organizada, principalmente na periferia do implante.¹⁰⁷

Não utilizamos técnicas específicas para avaliar regeneração muscular em nosso estudo, bem como nosso intervalo de estudo de seis meses pode ter sido curto para avaliar o aparecimento de fibras musculares no tecido cicatricial. Apesar dos estudos da fibrose ao redor da prótese mamária coberta com espuma de silicone, realizados após longos intervalos do implante, não citarem a presença de fibras musculares neste tecido,⁷³ essas especulações merecem investigação apropriada.

A utilização de cateteres uretrais após uretroplastias foi defendida durante muitas décadas pelos cirurgiões como método de proteção uretral contra re-estenose, sendo indicada sonda uretral de grosso calibre e por longos períodos – por até quatro a seis semanas.¹⁴⁷ O uso do cateter serviria não apenas para manter a uretra “aberta” como para facilitar a drenagem de secreções uretrais resultante do processo inflamatório pós-operatório – as secreções seriam mais facilmente eliminadas ao redor da sonda.

Recentemente, estudos quanto ao tempo de utilização de cateteres tem recomendado a retirada mais precoce do mesmo, havendo cada vez mais a tendência pela sua não utilização. A maior taxa de infecção urinária encontrada em pacientes usando sondas uretrais de demora e a relação direta do tempo de utilização da sonda e a taxa de infecção, assim como a observância do atrito entre o cateter e a mucosa uretral, e de presença de processo inflamatório associado ao uso de cateteres têm motivado a menor permanência possível do cateter e foi o motivo da nossa escolha pela não utilização do cateter pós-operatório. Ao analisarmos os dados da circunferência uretral obtidos em nosso estudo em consideração a não utilização de drenagem urinária no pós-operatório – quer por cistostomia ou cateter uretral - não verificamos diminuição do diâmetro uretral em comparação com o grupo Controle.

5.3 Microbiologia

As infecções, particularmente as bacterianas, têm papel fundamental na resposta tecidual ao implante e no resultado final das reconstruções cirúrgicas. Prova disso está no trabalho de Kesler *et al*¹⁰ que, analisando pelo método de Kaplan-Meier os dados da literatura para tratamento de estenose de uretra, definiu os três critérios de sucesso para a reconstrução

uretral em humanos: ausência de re-estenose por uretrocistografia ou endoscopia; fluxo urinário maior que 15 ml por segundo e ausência de infecção urinária recorrente.

Por seu contato com o meio exterior, a uretra está sujeita a infecção quando manipulada. A resposta uretral a infecção tem sido mais estudada quando associada ao uso de próteses temporárias, particularmente os cateteres de drenagem urinária de demora. Classicamente, a infecção urinária associada ao uso de cateteres uretrais depende da colonização do meato uretral¹⁴⁸ e maior adesividade bacteriana ao cateter e a mucosa uretral. Esta, causada, entre outras, pelo acúmulo de muco entre o cateter e a parede uretral. As bactérias progridem tanto por flutuação na secreção uretral ou por expansão da população bacteriana ou ainda por aderência e migração séssil,¹⁴⁹ além da colonização da urina do coletor mesmo que de sistemas fechados.

O tipo de material sintético utilizado como implante uretral também é de grande importância, havendo um maior grau de infecção nos implantes com características hidrofílicas. Para melhorar a formação do biofilme nestes implantes, diferentes técnicas de tratamento, com diversos materiais são utilizadas. O uso de tratamento do material de implante com nitrato de prata encontra apoio nas evidências que o uso de metais pesados, prata entre eles, previne a formação de biofilme¹⁵⁰ e, conseqüente infecção urinária,^{151,152,153} apesar de não haver unanimidade quanto a eficácia da prata para tal finalidade.^{154,155}

Em nosso trabalho, o material implantado não teve contato com o meato uretral, no entanto houve colonização do implante em 65% (13/20) dos animais. Porém, a alta incidência de colonização bacteriana na uretra manipulada dos animais do grupo *Sham* – de 92% (11/12) – faz diminuir a importância do uso do material sintético no grupo Experimental como causador da infecção (diferença não significativa estatisticamente com $P=0,2$). As hipóteses para a alta taxa de infecção são: a modificação da mucosa uretral facilitando a aderência bacteriana dada pelo processo inflamatório, ou contaminação durante o ato operatório ou, ainda, contaminação por via hematogênica.

O tipo de resposta tecidual à infecção da uretra é de difícil determinação já que dependente do tipo de agente infectante. Ainda, a presença de implante sintético dificulta a avaliação da resposta isolada a infecção pela parede uretral. Bruce *et al*⁴³ descreveram os principais agentes causadores de infecção a *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Streptococcus faecalis*, além de estafilococos coagulase-negativa, lactobacilos e corinebactérias associados a cateteres de silicone ou látex em pacientes sondados após manipulação endoscópica uretral.

Ainda, há evidências que as incrustações que se formam rapidamente nos cateteres são invariavelmente associadas com grandes populações de bactérias produtoras de urease, a mais prevalente é a *Proteus mirabilis*.¹⁵⁶ E tais incrustações têm se mostrado clara e repetidamente serem biofilmes bacterianos cristalinos.¹⁵⁷

Gilbaugh *et al*⁶² na análise de urocultura de seis cães machos submetidos a implante tubular de silicone em substituição à uretra encontrou *Escherichia coli* em metade deles (3/6), *Staphylococcus coagulase-negativa* em um terço (2/6) e *Staphylococcus aureus* em apenas um animal (1/6). E não notou correlação entre infecção e a ausência ou presença de fístula uretral, calcificações da prótese, estreitamentos da uretra ou deslocamento do implante.

Em 1976, Vincent e Anquetil¹²⁴ em relato de substituição da uretra masculina por tubo de silicone para tratamento de estenose complexa não identificou infecção urinária após sete meses de implante.

Munro e Scott¹²⁵ implantaram, por via endoscópica, uma endoprótese uretral de silicone - com uma extremidade na bexiga e a outra distal ao esfíncter - em dez pacientes com lesão espinhal, que estavam sob regime de cateterismo intermitente. Com tempo de permanência de 29 dias até 231 dias (média de 109 dias), os dispositivos facilitaram infecção urinária persistente (6 casos em 9) e intervalo entre a inserção do cateter e o diagnóstico de ITU variou de 7 a 202 dias (média de 63 dias). Porém nenhum paciente teve febre ou sepsis.

Bruce *et al*⁴³ comparando cateteres de silicone e látex encontrou, ao estudo bacteriológico, 17% e 20% de infecção respectivamente, tendo como principais agentes causadores de infecção a *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Streptococcus faecalis*, além de *Staphylococcus coagulase-negativa*, lactobacilos e corinebactérias.

Mesmo a substituição de segmento supra-vesical do trato urinário, como o realizado por Totoro *et al*³⁴ no ureter distal de dezesseis cães, é passível de formação de biofilme na prótese, infecção urinária ou infecção no sítio cirúrgico. Neste estudo, os autores identificaram como patógenos: *Proteus*, *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus alpha haemolyticus*, *Clostridium* ocasionando dois casos de pielonefrite com óbito do animal.

Segundo Meares Jr¹⁵⁸ o uso de antibiótico profilático tem pouca eficácia na prevenção da infecção relacionada a cateteres, e deve apenas ser usado em pacientes submetidos à cirurgia do trato urinário imediatamente antes do procedimento e continuado por curtos períodos de tempo, evitando bacteremia e bacteriúria. Já Choong e Whitfield,¹⁵⁰ em revisão sobre a formação de biofilmes no trato urinário, afirmam que o tratamento antimicrobiano deve ser efetivo em duração menor que 24 horas; que após esse período o biofilme já está estabelecido na prótese implantada e a ação antibiótica é pouco eficaz.

A escolha do antibiótico deve ser feita com vistas à sensibilidade dos principais patógenos do trato urinário. No nosso estudo, o uso de ceftriaxone como profilaxia antibiótica deveu-se a meia-vida longa do ceftriaxone entre as cefalosporinas, à facilidade de administração em dose única diária, à dose empregada estar definida em trabalhos com desenho semelhante⁸ e, principalmente, no fato dos principais patógenos urinários apresentarem sensibilidade a cefalosporinas de terceira geração, além de prover boa cobertura para patógenos Gram positivos colonizadores de feridas

operatórias, como *Streptococcus sp* e *Staphylococcus epidermidis* - excetuando-se *Enterococcus faecalis*.¹⁵⁹

Vale lembrar que a formação de biofilme bacteriano ou mesmo infecção não é exclusividade dos implantes sintéticos do trato urinário, e que a presença de infecção em outros tecidos também altera a resposta tecidual. Virden *et al*,¹⁶⁰ estudando cinquenta e cinco dispositivos de silicone - implantes mamários ou expansores teciduais, removidos de quarenta pacientes, detectaram bactérias em 56% dos dispositivos quando havia contratura capsulares associada, contra 18% de bactérias presentes nos implantes não associados a contratura capsular. Nestes últimos, o a *Staphylococcus epidermidis* foi o principal agente encontrado.

Em nosso estudo, também a presença da colonização por *Staphylococcus* se correlacionou com menor contração da cicatriz e, portanto, maior circunferência uretral quando comparado com os animais que não apresentaram infecção do sítio operatório ($P=0,006$). O significado desta associação e o motivo pelo qual a infecção por *Staphylococcus* seria protetora contra contraturas de cicatrizes precisam ser melhor esclarecidos.

5.4 Histologia

A análise histológica avaliou o processo inflamatório e cicatricial, identificando maior intensidade da inflamação no grupo Experimental que no grupo *Sham*. A reação tecidual iniciou logo após a colocação do Si-Pu, e seu resultado foi a formação de cápsula ao redor do implante e expulsão do mesmo para a luz uretral. A extrusão do material se fez de maneira parcial, pois fragmentos do enxerto – provavelmente a espuma de poliuretano - permaneceram em meio ao tecido cicatricial, chegando até a albugínea dos corpos cavernosos. Estes restos de material sintético foram destruídos pelo processo inflamatório, o que ocasionou desestruturação da arquitetura normal da uretra.

Tardiamente, após a extrusão do enxerto, o processo inflamatório diminuiu em intensidade, com menor edema tecidual e conseqüente redução da espessura da parede uretral, sem que houvesse recuperação da musculatura lisa da lâmina própria. Estas alterações tardias restituíram a luz da uretra à proporções próximas da normalidade, e foram associadas a diminuição da colonização bacteriana local.

Já no grupo *Sham*, as alterações inflamatórias foram discretas ao final de quatro semanas, com pouca celularidade, porém progressiva em intensidade nos meses seguintes. Próximo aos seis meses após a manipulação havia deposição de colágeno ao redor de uma uretra de arquitetura normal, afastando a luz uretral da albugínea do corpo cavernoso

pelo aumento da espessura da parede da uretra. A expressão dessas alterações foi a diminuição progressiva da luz uretral e aumento da incidência de infecção local.

Como descrito, a principal alteração observada na análise histológica é o processo inflamatório, importante tanto no grupo Experimental quanto no grupo *Sham*. No GE, o Si-Pu sofre ataque maciço do sistema imunológico do hospedeiro com incrustação de material orgânico no implante e alteração de suas características. Este ataque imune é tão mais importantes quanto maior o contato da prótese com a lâmina própria da uretra. Ao ser expulso para a luz uretral, o implante tem menor interação com o sistema imunológico, diminuindo a resposta tecidual.

Diferentes critérios são utilizados para graduação da reação inflamatória. Bruce *et al*⁴³ descreveram a resposta tecidual pela quantidade de leucócitos polimorfonucleados encontrados na uretra como leve (10 a 100 células/mL), moderada (100 a 1.000 células/mL) ou alta (mais de 1.000 células/mL) em estudo da reação inflamatória a cateteres de silicone e látex. A menor reação inflamatória – em número e intensidade – ocorreu ao silicone (43%) em comparação com o látex (60%) neste estudo. Em seu estudo da cápsula fibrosa de prótese mamária, Siggelkow *et al*¹⁶¹ graduaram a resposta inflamatória em quatro graus – de negativo a severo – baseado no número de células minonucleares encontradas, mas não especificam os valores adotados para desenvolvimento desta escala. Engelbart *et al*⁴⁸ compararam as reações da mucosa uretral a diferentes materiais inseridos na uretra posterior de cães. As variações histológicas foram graduadas em:

(a) sem reação – quando uma a três pequenas áreas de epitélio apresentava-se desnudado e/ou havia hemorragia nos tecidos subjacentes, ou submucosa continha poucos e dispersos leucócitos polimorfonucleares ou linfócitos; (b) reação moderada – quando mais de três áreas de epitélio apresentava-se desnudado e/ou com hemorragia subjacente, ou quando havia aglomerados de leucócitos polimorfonucleares ou linfócitos na lâmina própria; (c) reação severa - quando havia alterações hipertróficas da mucosa, ou a submucosa continha grande acúmulo de linfócitos ou havia hemorragia envolvendo a circunferência total da parede uretral.

Em nosso estudo fundamentamos nossa avaliação da graduação de resposta inflamatória proposta por Edwards e Trott⁵⁰, onde compraram a quantidade de células inflamatórias com a quantidade de células epiteliais encontradas no raspado uretral de pacientes submetidos à cateterização uretral. Os autores categorizaram cinco graus de inflamação – nenhuma, leve, moderado, severa e completa – segundo a porcentagem de células inflamatórias encontradas – 0% para nenhuma inflamação, 25% de células inflamatórias para inflamação leve, 50% de células inflamatórias para grau moderado, 75% para grau severo e 100% para grau total de resposta inflamatória. Na nossa avaliação criamos faixas de gradação da atividade inflamatória para facilitar a análise das lâminas e suprimimos a classificação “total” por se tratar de fragmento de tecido e não de secreção coletada e, portanto, esta classificação não se aplicaria ao material.

O maior grau de inflamação encontrado no GE e sua melhora com a expulsão do implante estão dentro do esperado como resposta ao corpo

estranho que o Si-Pu é. A resposta inflamatória mais intensa que o esperado, encontrada tardiamente – após oito semanas - nos animais do grupo *Sham* pode se explicada pela presença de bactérias no local. A existência de bactérias nessa região pode se dever a alteração da adesividade uretral no local ou a alteração de fluxo urinário local secundário ao espessamento da parede uretral dada pela fibrose da lâmina própria.

A deposição colágena, resultado final do processo inflamatório, foi outro dado retirado da análise histológica. O uso isolado do silicone, como acontece em implantes de próteses mamárias, parece ter correlação positiva entre o tempo de implante e a espessura da cápsula fibrosa – quanto maior o tempo, mais espessa a cápsula - como encontrado por Siggelkow *et al*¹⁶¹ em estudo da cápsula colágena de cinquenta e três próteses mamárias retiradas de pacientes submetidas a mamoplastia por diferentes motivos. Estes mesmos autores ainda descrevem o processo inflamatório causado pelo silicone como sendo composto por células mononucleares histiocíticas.

Citamos a seguir pesquisas do uso de silicone na uretra para tratamento de lesões uretrais, seja como implante ou como cateter de drenagem; nelas observamos alterações semelhantes a encontradas na descrição das lâminas histológicas de nosso material. Assim, Andersen *et al*⁸⁷, estudando coelhos submetidos à ressecção endoscópica uretral, observaram que, quando há agressão ao epitélio de transição da uretra encontramos, após 30 dias da lesão, a perda da distensibilidade uretral e mucosa ainda erodida, com dificuldade de se identificar epitélio de transição

em meio ao epitélio escamoso com grossas camadas de colágeno de permeio.

Gilbaugh *et al*⁶², quatro meses após substituição de parte da uretra de seis cães machos por prótese tubular de silicone, encontraram na análise histológica mínima reação tecidual e re-epitelização completa – de toda a circunferência uretral - ao redor da prótese; porém não identificaram regeneração de músculo liso. A prótese estava envolvida por tecido conectivo feito de colágeno maduro e sem qualquer sinal de microcalcificação. Não ocorreu qualquer aderência do silicone à uretra.

Court *et al*⁶⁴ fez a autópsia de um paciente do sexo masculino que teve parte de sua uretra anterior substituída por prótese tubular de silicone. A histologia revelou regeneração epitelial, com tecido conjuntivo pouco vascularizado e com fibras musculares ao redor do implante.

Talja *et al*⁴⁰, compararam a reação inflamatória aguda, que ocorre entre um a quatro dias de exposição da uretra humana à diferentes materiais de composição de sondas vesicais de demora (silicone, látex siliconizado e látex revestido com hidrogel). Encontraram reação inflamatória composta principalmente por granulócitos eosinofílicos e granulócitos neutrofílicos e mediado pela ativação do complemento. O silicone causou menor reação inflamatória que outros materiais de maneira significativa estatisticamente ($P<0,05$). Os autores observaram que a reação inflamatória inicia-se imediatamente após a exposição da uretra ao material sintético e sua intensidade independe do tempo de contato.

Pflüger e Stachelberger⁵⁵ observaram que o extravasamento de silicone gel de implantes contendo este polímero induzia a constrição cicatricial e proliferação de miofibroblastos em humanos. Porém não encontraram resposta semelhante ao analisar os tecidos adjacentes a implante de elastômero de silicone colocados no subcutâneo e na cavidade peritoneal de ratos.

5.5 Análise do colágeno

Para a análise do colágeno optamos pelo uso da coloração Tricrômico de Masson, por ser método de técnica fácil, permitindo análise com o uso de microscopia ótica e, principalmente, por permitir boa avaliação do processo cicatricial, com fácil identificação do colágeno e a orientação de suas fibras.^{162,163,164}

Utilizamos a coloração de Picrosirius red - vermelho sírius em ácido pícrico – na avaliação quantitativa do colágeno, uma vez que a coloração intensa que o colágeno assume com esta técnica, quando sob luz polarizada, permite uma maior precisão na avaliação por espectro de cores. Apesar de haver boa correlação da análise quantitativa do colágeno intersticial realizada com o Picrosirius red quando comparado com a avaliação semi-quantitativa feita com microscopia óptica,⁹³ o PR tem se

mostrado superior na quantificação do colágeno quando comparado com o TM.¹⁶⁵

A análise do tipo de colágeno envolvido no processo cicatricial não foi objeto de estudo deste trabalho. Vale lembrar, porém, a importância do tipo de colágeno envolvido na cicatrização uretral e sua relação com a estenose uretral, como mostrado por Sievert *et al*¹⁴⁵ que citam o colágeno 1 e 3 como os principais envolvidos no processo de estenose uretral e que as concentrações relativas dessas fibras interferem na velocidade de reparação dos tecidos lesados.

Neste estudo encontramos aumento da concentração relativa do colágeno no sítio do implante de Si-Pu com o tempo, porém não associado a aumento da espessura da parede da uretra ou diminuição da circunferência uretral. Neste grupo a concentração relativa do colágeno pode ter aumentado pela diminuição do edema e da celularidade característica da reação inflamatória. E não conseguimos correlacionar o aumento do colágeno com retração cicatricial, uma vez que não houve diminuição da circunferência uretral até os seis meses de análise. No entanto, a tendência crescente da concentração de colágeno após oito semanas da intervenção pode indicar uma continuidade do processo inflamatório e a necessidade de intervalo de tempo mais longo para avaliar as consequências desse processo. Para uma mais fácil visualização dessas correlações introduzimos a Figura 48.

No grupo *Sham* as variações encontradas na concentração relativa do colágeno, na espessura da parede uretral e na intensidade do processo

inflamatório tendem a seguir juntas. A concentração do colágeno segue em descenso após oito semanas da cirurgia, bem como a espessura da parede uretral, mostrando a resolução do processo de cicatrização causado pela manipulação (Figura 49)

Figura 48 - Gráfico evolutivo de tempo da espessura da parede uretral, da concentração de colágeno, do índice de medidas da circunferência da uretra média/uretra distal e da intensidade da inflamação do grupo Experimental. Os valores do eixo das ordenadas são dados em pontos e não representam valores absolutos

Figura 49 - Gráfico evolutivo de tempo da espessura da parede uretral, da concentração de colágeno, do índice de medidas da circunferência da uretra média/uretra distal e da intensidade da inflamação do grupo *Sham*. Os valores do eixo das ordenadas são dados em pontos e não representam valores absolutos

5.6 Análise termogravimétrica

A TG na análise de biomateriais, especialmente polímeros, traz informações relevantes não obtidas com outros métodos, principalmente na caracterização das modificações sofridas pelo material quando exposto ao meio ou quando introduzida alguma modificação em sua composição – em outras palavras, se ocorreu ou não incrustação do implante, seja por material orgânico ou inorgânico.¹⁶⁶ As análises feitas através de termogravimetria são mais rápidas que a análise por outros métodos, por exemplo, a complexometria por EDTA e com resultados semelhantes.^{100.}

A incrustação de material orgânica ocorreu em todas as peças submetidas a exposição biológica. Apesar da hidrofobia do silicone, a análise térmica identificou água permeando o polímero, demonstrada pela perda de massa com temperaturas abaixo de 100°C. Como o poliuretano encontrava-se macroscopicamente quase ausente durante a retirada do material de implante, infere-se que o material biológico estaria incrustado, em sua maior parte, no silicone.

Já citamos que a vulcanização de dois polímeros pode modificar a característica de ambos,^{69,134} o que poderia explicar as alterações encontradas. Outro possível fator que pode influenciar na característica do polímero é o processo de esterilização. Zhang *et al*¹¹¹ estudaram as alterações que três modalidades de esterilização – óxido de etileno, radiação beta e calor – podem provocar no polímero de silicone e no poliuretano. Notaram que nenhuma das modalidades induz a degradação ou ligações cruzadas das extensões dos polímeros, porém o óxido de etileno eleva a taxa de carbono e aumenta as características hidrofóbicas na superfície do Pu. Os autores ainda implantaram os polímeros esterilizados no espaço pré peritoneal de ratos e observaram a resposta biológica. Assim, observaram que após 10 dias do implante há muitas células aderidas ao polímero e esse ataque celular ao polímero diminui após 90 dias e o aumento celular acarreta aumento de nitrogênio, carbono e oxigênio na superfície do polímero - e mais que a superfície do Si após 90 dias apresenta estrutura irregular. O silicone esterilizado com óxido de etileno tem menor aderência celular em sua superfície que com os outros métodos de esterilização e gera menor

reação inflamatória, porém o Pu esterilizado com óxido de etileno tem reação de corpo estranho maior.

Já a incrustação de material inorgânico foi de pouca expressão em nosso estudo e pouco variou em função do tempo nas análises realizadas. Muitos são os fatores que podem influenciar esta resposta. Blum *et al*¹³³, em estudo controlado, inseriram na bexiga de ratos corpo estranho constituído por silicone ou por látex ou por PTFE e observaram que a incrustação e formação de cálculos só ocorre sobre o silicone na presença de infecção, enquanto nos outros materiais a incrustação acontece independente da presença de bactérias – os autores não especificam as bactérias facilitadoras dessa incrustação. Dumanski *et al*¹⁶⁷ estudaram a formação de cálculos em cateteres expostos a *P. mirabilis* e observaram que a mineralização ocorre em pH elevado, entre 8 e 9, e os exopolissacarídeos da bactéria atraem especificamente não apenas o cálcio mas também íons de magnésio para dentro do biofilme da matriz – aliás, o magnésio é o maior componente dos depósitos tipicamente encontrados em cateteres (predominantemente estruvita e hidroxiapatita). Munro e Scott¹²⁵ encontraram formação de concreção não obstrutiva de endoprótese de silicone em um terço (3/9) dos pacientes em regime de cateterismo intermitente.

5.7 Considerações finais

Verificamos, portanto, que o implante de Si-Pu modificou o meio onde ele foi inserido, causando reação inflamatória intensa e facilitando infecção da uretra com conseqüente cicatriz fibrosa local. Verificamos ainda, que o implante de Si-Pu teve sua composição e características modificado pelo meio onde ele foi inserido.

As modificações que o implante de Si-Pu causa à uretra não são desprezíveis e as conseqüências dessas alterações são agudamente relevantes – como ao aumento da espessura da parede uretral e facilitação de infecção local. Porém, tardiamente, há aparente proteção da uretra causada pela cicatrização desordenada, com menores complicações tardias que aquelas encontradas com a espongiosclerose observada no procedimento mais simples – uretrorrafia - no qual a manutenção intacta da estrutura uretral somada a cicatrização ao redor da uretra associou-se a infecção tardia e aumento da espessura da parede da uretra.

Esse estudo não esgota um assunto que há muito é polêmico – o uso de polímeros sintéticos no trato urinário. A investigação de novos dispositivos e a pesquisa de novos materiais ainda são necessárias.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A análise dos resultados deste trabalho nos permite concluir que:

- O implante de Si-Pu uretral não está associado à formação de fístulas, seios ou coleções periuretrais. Não foi encontrada obstrução uretral dado por cristalização ou crescimento tecidual;
- O implante de Si-Pu induz formação de tecido conjuntivo que permite a re-epitelização urotelial;
- A cicatriz da uretroplastia, empregando implante de Si-Pu, não apresenta contração e, portanto, não diminui a circunferência uretral;
- A colonização do implante por *Staphylococcus* parece estar associada à menor contração da cicatriz fibrosa, à maior circunferência uretral e melhor resultado da uretroplastia;
- O implante de Si-Pu sofre intensa incrustação orgânica ao ser exposto ao trato urinário, mas não apresenta calcificação;
- O silicone não apresenta aderência ao tecido uretral mesmo revestido por espuma de poliuretano.

A expulsão do implante de Si-Pu limita seu uso em uretroplastia na maneira como foi concebido neste experimento. O desenvolvimento de novo dispositivo de uso temporário e facilmente removível seria necessário para o uso deste material. No entanto, o processo inflamatório intenso gerado na uretra pelo implante de Si-Pu parece proteger a uretra de retração cicatricial

e serve como um suporte para a neo formação de uma cápsula fibrosa e crescimento do epitélio de transição.

Mais estudos devem ser feitos para elucidação dessa questão. Há, também, a necessidade de se buscar novos polímeros e testar os já existentes para estabelecer os mais adequados para o uso no trato urinário.

ANEXOS

SILIMED - Silicone e Instrumental Médico-Cirúrgico e Hospitalar Ltda.

DRC-0987/03

Rio de Janeiro, 16 de outubro de 2003.

Dr. Marcos de Paula Nogueira

Ref.: Pesquisa em animais

Objetivo: Estudar o uso de material sintético não absorvível a base de silicone na substituição da uretra lesada previamente, em coelhos adultos.

Prezado Dr. Marcos Nogueira,

Agradecemos seu interesse e confiança pelo envio de sua pesquisa à Silimed.

Nossa Empresa possui um rigoroso controle de qualidade, nossos produtos são objetos de cuidadosos testes, fabricados conforme as Boas Práticas de Fabricação para Produtos Médicos (cGMP) e a todo um sistema de gestão da qualidade segundo as normas internacionais ISO-9001e EN-46001.

Sendo assim, solicitamos a gentileza de sua assinatura de recebimento na carta anexa, referente ao produto enviado para sua pesquisa em animais, para atender a normas de processos internos da qualidade.

Nos colocamos a sua inteira disposição para quaisquer informações adicionais que se façam necessárias.

Atenciosamente,

Luzinete Cesar Figueiredo
Chefe de Marketing e Qualidade.
Tel: (0xx21) 3687-7032/81
luzinete@silimed.com.br

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27.11.03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **928/03**, intitulado: "Estudo das alterações histológicas, histomorfométricas e infecciosas após substituição parcial da uretra por folha de elastômero de silicone em coelhos adultos" apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno Pereira

Pesquisador(a) Executante: Dr. Marcos de Paula Nogueira

CAPPesq, 27 de Novembro de 2003.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ência do Coordenador da Área

Prof. Dr. Alberto R. Ferraz
Coordenador da Área de
Clínica Cirúrgica

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS¹

1. Junqueira LCU, Carneiro J. Histologia Básica. 6ª Edição. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara Koogan; 1985. Cap. 19: pag.394.
2. Atala A, McAninch JW. Preface. Urethral reconstruction. *Urol Clin North Am.*2002; 29(2):xiii.
3. Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Mitchell ME. Stricture of the male urethra – Etiology. in: Adult & Pediatric Urology. 2002. 4th Edition;1762:5. Lippincott Williams & Wilkins.
4. Brannan W. Management of urethral strictures. Editorial. *J Urol.* 1985; 13:442
5. Turner-Warwick R. Prevention of complications resulting from pelvic fracture urethral injuries – and from their management. *Urol Clin North Am.* 1989;16(2):335-58.

¹ * De acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

6. Patricinio LG, Patrocinio JA. Atualização em enxertos na rinoplastia. RBORL - *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2001;67(3):394-402.
7. Gabrich PN, Silva EA, Damião R. O uso do enxerto em uretroplastias. *Ars Cvrandi*. 2003; 36(2):18-22.
8. Calado AA, Macedo Jr A; Delcelo R, de Figueiredo LF, Ortiz V, Srougi M. The tunica vaginalis dorsal graft urethroplasty: experimental study in rabbits. *J Urol*. 2005; 174(2):765-70.
9. Al-Qudah HS, Santucci RA. Extended complications of urethroplasty. *International Braz J Urol*. 2005; 31(4):315-325
10. Kessler TM; Schreiter F; Kralidis G; Heitz M; Olanas R; Fisch M. Long-term results of surgery for urethral stricture: a statistical analysis. *J Urol*. 2003;170(3):840-4.
11. Barbagli G, Palminteri E, Guazzoni G., Turini D, Lazzeri M. The morbidity of buccal mucosa graft harvest from cheek in 90 adult patients. *J Urol*. 2005; 173 (suppl)33: Abst 122
12. Kamp S, Knoll T, Häcker A, Oman M, Guzman S, Hatzinger M, Michel M, Alken P. Inner cheek or lower lip? Difference in donor-site morbidity in buccal mucosa urethroplasty. 2005; 4(3): 189.
13. Sievert KD; Bakircioglu ME; Nunes L; Dahiya R; Tanagho EA. Homologous acellular matrix graft for urethral reconstruction in the rabbit: histological and functional evaluation. *J Urol*. 2000; 163 (6):1958-65.

14. Moulonge A; Jaupitre A. Un cas de prothèse de l'urètre postérieur pour rétrécissement post-traumatique. *J. Urol. Nérol.* 1974; 80(3): 292-4.
15. Kelâmi A; Korb G; Ludtke-Handjerv A; Rolle J; Schnell J; Lehnhardt FH. Alloplastic replacement of the partially resected urethra on dogs. *Invest. Urol.* 1971;9(1): 55-8.
16. Nuiniga JE, van Moerkerk H, Hanssen A, Hulsbergen CA, Oosterwijk-Wakka J, Oosterwijk E, de Gier RPE, Schalken JA, van Kuppevelt T, Feitz WFJ. Rabbit urethral replacement with a defined biomatrix or small intestinal submucosa. *European Urology.* 2003; 44 (2): 266-71.
17. Roemer KR; Das S. Tunica vaginalis patch graft urethroplasty. *Surg Gynecol Obstet.* 1984;159 (2): 145-8.
18. Khoury AE; Olson ME; McLorie GA; Churchill, BM. Urethral replacement with tunica vaginalis: a pilot study. *J Urol.* 1989;142(2 Pt 2):628-630.
19. Presman D; Greenfiel DL. Reconstruction of the perineal urethra with a free full-thickness skin graft from the prepuce. *J. Urol.* 1953; 69(5): 677-680.
20. Lord JW Jr, Eckel JH. The use of vitalium tubes in the urinary tract of the dog. *J Urol.* 1942, 48: 412-21.
21. Kudish HG. The use of polyvinyl sponge for experimental cystoplasty *J Urol.* 1957 Sep;78(3):232-5.
22. Swiney J. Treatment of stricture of the urethra and its sequelae. *J Int Coll Surg.* 1961 Feb;35:188094.
23. Blum J, Skemp C, Reiser M. Silicone rubber ureteral prosthesis. *J Urol.* 1963 Sep;90:276-80.

24. Dressler DP, Many M. A new concept in prosthetic urinary bladder material. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1969;15:25-8.
25. Stanley TH, Feminella JG Jr, Priestly JB, Lattimer JK, Kessler TR. Bladder regeneration after cystectomy and prosthetic urinary bladder replacement. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1971;17:134-7.
26. Hakky SI Urethral replacement by "Dacron" mesh. *Lancet*. 1976 Nov 27;2(7996):1192.
27. Hakky SI. The use of fine double siliconised Dacron in urethral replacement. *Br J Urol*. 1977 Apr;49(2):167-71.
28. Abbou C, Leandri J, Auvert J, Rey P. New prosthetic bladder. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1977;23:371-4
29. Block, NL, Stover E, Politano VA. A new prosthetic ureter in the dog. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1977;23:367.
30. Bergman S, Javadpour N, Wade C, Terril R. Biodegradable ureteral grafts in dogs. *Invest Urol*. 1978 Jul;16(1):48-9.
31. Kline J, Eckstein EC, Block NL, Lyon F, Kelly R, Morgan D, Ehrlich S. Development of a total prosthetic urinary bladder. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1978;24:254-6.
32. Palleschi JR, Tanagho EA. Urethral tube graft in dogs: prosthesis of Dacron lined silicone. *Invest Urol*. 1978 Mar;15(5):408-11
33. Dreikorn K, Löbelnz J, Horsch R, Röhl L. Alloplastic replacement of partially resected canine urethra by expanded PTFE grafts. Preliminary results. *Urol Res*. 1979;7(1):19-21.

34. Totoro AJ, Lyman DJ, Middleton RG, Seifert KB. Ureteral replacement with a new polyurethane prosthesis. *J Surg Research*. 1981;30(6):583-92.
35. Varady S, Friedman E, Yap WT, Lage A, Richie JP. Ureteral replacement with a new synthetic material: Gore-tex. *J Urol*. 1982 Jul;128(1):171-5.
36. Anwar H, Dave B, Seebode JJ. Replacement of partially resected canine urethra by polytetrafluoroethylene. *Urology*. 1984;24(6):583-6.
37. Olsen L, Bowald S, Busch C, Carlsten J, Eriksson I. Urethral reconstruction with a new synthetic absorbable device. An experimental study. *Scand J Urol Nephrol*. 1992;26(4):323-6.
38. Italiano G, Abatangelo G Jr, Calabrò A, Abatangelo G Sr, Zanoni R, O'Regan M, Passerini GlazelG. Reconstructive surgery of the urethra: a piloto study in the rabbit on the use of hyaluronan benzyl ester (Hyaff-11) biodegradable grafts. *Urol Res*. 1997;25(2):137-42.
39. Roberts JA, Fussell EN, Kaack MB. Bacterial adherence to urethral catheters. *J Urol*. 1990; 144(2 Pt 1):264-9.
40. Talja M, Korpela A, Järvi K. Comparison of urethral reaction to full silicone, hydrogen-coated and siliconised latex catheters. *Br J Urol*. 1990; 66(6):652-7.
41. van Kerrebroeck P, ter Meulen F, Farrelly E, Larsson G, Edwall L, Fianu-Jonasson A. Treatment of stress urinary incontinence: recent developments in the role of the urethral injection. *Urol Res*. 2003; 30(6):356-62.

42. Forres DM, Said AJ. The silastic urethral ligadture: an aid to catheter management. *Z Kinderchirurgie*. 1986; 41(Suppl I): 28-9.
43. Bruce AW; Plumpton KJ; Willett WS; Chadwick P. Urethral response to latex and silastic catheters. *CMA Journal*, 1976; 115(11): 1099-100.
44. Lima SVC, Araújo LAP, Vilar FO. Further experience with the periurethral expander: a new type of artificial sphincter. *Br J Urol*. 1997; 80 (3):460-462.
45. Forrest DM, Said AJ. The silastic urethral ligature: an aid to catheter management. *Z Kinderchir*. 1986; 41(Supp1):28-9.
46. Court B, Auvert J, Sausse A, Diep R. Remplacement d'un segment de l'urèthre par un tube d'élastomère de silicone chez le chien mâle. *J Urol Nephrol (Paris)*. 1971;77 (12):562-4.
47. Nickel JC, Olson ME, Costerton JW. In vivo coefficient of kinetic friction: study of urinary catheter biocompatibility. *Urology*. 1987;29(5): 501-3.
48. Engelbart RH, Bartone FF, Gardner P, Hutson J. Urethral reaction to catheter materials in dogs. *Invest Urol.*, 1978; 16(1),55-6.
49. Talja M, Virtanen J, Andersson LC. Toxic catheters and diminished urethral blood circulation in the induction of urethral strictures. *Eur. Urol*. 1986; 12: 340-5.
50. Edwards L, Trott PA. Catheter-induced urethral inflammation. *J Urol*. 1973;110, 678-81.
51. Carpaneda CA. Inflammatory reaction and capsular contracture around smooth silicone implants. *Aesthetic Plastic Surgery*. 1997;21(2):110-4

52. Morris NS, Stickler DJ. Encrustation of indwelling urethral catheters by *Proteus mirabilis* biofilms growing in human urine. *Journal of Hospital Infection*. 1998;39:227-34
53. Kunin CM, Chin QF, Chambers S. Formation of encrustations on indwelling urinary catheters in the elderly: a comparison of different types of catheter materials in “blockers” and “non-blockers”. *J Urol*. 1987;138:899-902
54. Bull E, Chilton CP, Gould CAL, Sutton TM. Single-blind, randomised, parallel group study of the Bard Biocath catheter and a silicone elastomer coated catheter. *Br J Urol*. 1991; 68(4):394-9.
55. Pflüger VH, Stachelberg H. Kann eine Siliziumdiffusion aus Silikonkautschuk Kathetern Harnröhrenstrikturen verursachen? *Z. Urol. u. Nephrol*. 1982; 75, 817-20
56. Janowsky EC, Kupper LL, Hulka BS. Meta-analyses of the relation between silicone breast implant and the risk of connective-tissue diseases. *N Engl J Med*. 2000; 342(11): 781-90.
57. Brinton LA, Brown SL. Breast implants and cancer. Review. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89:1341-9.
58. Brinton LA. The relationship of silicone breast implants and cancer at other sites. [Plast Reconstr Surg](#). 2007;120(7 Suppl 1):94S-102S.
59. De Nicola RR. Permanent artificial (silicone) urethra. *J Urol*. 1950; 63(1):168-172.
60. Heller E. Surgical repair of urethral strictures with a silicone rubber patch. *J Urol*. 1965; 94:576.

61. Sankey NE; Heller E. The results of urethroplasty using a silicone rubber patch. *J Urol*. 1967;69:716.
62. Gilbaugh Jr JH, Utz DC, Wakim KG. Partial replacement of the canine urethra with a silicone prosthesis. *Inv Urol*. 1969; 7(1):41-51.
63. Robinette JD. Silicone rubber prosthesis for replacement of the urethra in male cats. *JAVMA*. 1973;163(3):285-9.
64. Court B, Xerri A, Auvert J. Remplacement de l'urètre chez l'homme par une prothèse en élastomère de silicone – Trois cas – Résultats préliminaires. *J Urol Nephrol (Paris)*. 1973; 79 (12Pt 2): 643-7.
65. Abbou C, Leandri J, Auvert J, Rey P. New prosthetic bladder. *ASAIO Transactions*. 1977; 23: 371-4.
66. Rohrmann D, Albrecht D, Hannappel J, Gerlach R; Schwarzkopp G, Lutzeyer W. Alloplastic replacement of the urinary bladder. *J Urol*. 1996;156(6):2094-7.
67. Kropp BP, Rink RC, Adams MC, Keating MA, Mitchell ME. Bladder Outlet Reconstruction: Fate of the Silicone Sheath. *J Urol*; 1993, 150:703-4.
68. [Salvatore JE](#), [Mandarino MP](#). Polyurethane polymer, its use in osseous lesions: an experimental study. [Ann Surg](#). 1959 ;149(1):107-9.
69. Zdrahala RJ, Zdrahala IJ. Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, *present* realities, and a vibrant future. *J Biomater Appl*. 1999 ;14(1):67-90. Review.
70. Austin S. Biological monitoring of TDI-derived amines in polyurethane foam production. *Occup Med*.2007;54:444-8

71. Brand KG. Foam-covered mammary implants. *Clin Plast Surg*. 1988; 15(4):533-9.
72. Segal M. A status report on breast implant safety. *FDA Consum*. 1995 nov. Publication n° (FDA) 97-4262.
73. Vazquez G, Pellon A. Polyurethane-coated silicone gel breast implants used for 18 years. *Aesth Plast Surg*. 2007; 31: 330-6.
74. Bucky LP, Ehrlich HP, Sohoni S, May J Jr. The capsule quality of saline-filled smooth silicone, textured silicone, and polyurethane implants in rabbits: a long-term study. *Plast Reconstr Surg*. 1994;93(6):1123-31.
75. Bucky LP, Ehrlich HP, Sohoni S, May J Jr. The capsule quality of saline-filled smooth silicone, textured silicone, and polyurethane implants in rabbits: a long-term study. *Plast Reconstr Surg*. 1994 ;93(6): 1132-3[discussion].
76. Gorman SP, Tunney MM, Keane PF, Van Bladel K, Bley B. Characterization and assessment of a novel poly(ethylene oxide)/polyurethane composite hydrogel (Aquavene®) as a ureteral stent biomaterial. *J Biomed Mater Res*. 1988; 39(4):642-9.
77. Tsujimoto Y, Yohsimoto T. Experience with polyurethane intraurethral stents in aged patients. *Hinyokika Kiyo*. 1993; 39(6):533-9.
78. Cervera M, Dolz M, Herraes JV, Belda R. Evaluation of the elastic behaviour of the central venous PVC, polyurethane and silicone catheters. *Phys Med Biol*. 1989; 34(2):177-183.

79. Gorman SP, Jones DS, Bonner MC, Akay M, Keane PF. Mechanical performance of polyurethane ureteral stents *in vitro* and *ex vivo*. *Biomaterials*. 1997; 18(20): 1379-83.
80. Chauvel-Lebret DJ, Pellen-Mussi P, Auroy P, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the *in vitro* biocompatibility of various elastomers. *Biomaterials*. 1999; 20(3):291-9.
81. Duckett JW. The island flap technique for hypospadias repair. 1981. *J Urol*. 2002; 167(5):2148-52.
82. El-Sherbiny MT, Abol-Enein H, Dawaba MS, Ghoneim MA. Treatment of urethral defects: skin, buccal or bladder mucosa, tube or patch? An experimental study in dogs. *J Urol*. 2002; 167(5):2225-8.
83. Barbagli G, Palmintieri E, Guazzoni G, Cavalcanti A. Bulbar urethroplasty using the dorsal approach: current techniques. *International Braz J Urol*. 2003; 29(2):155-61.
84. Bhandari M, Dubey D, Verma BS. Dorsal or ventral placement of the preputial/penile skin onlay flap for anterior urethral strictures: does it make a difference?. *BJU Int*. 2001;88(1):39-43.
85. Iselin CE, Webster GD. Dorsal onlay graft urethroplasty for repair of bulbar urethral stricture. *J Urol*. 1999;161(3):815-8.
86. Dubey D, Kumar A, Bansal P, Srivastava A, Kapoor R, Mandhani A, Bhandari M. Substitution urethroplasty for anterior urethral strictures: a critical appraisal of various techniques. *BJU International*. 2003; 91:215-8.

87. Andersen HL, Duch BU, Nielsen JB, Joergensen B, Ledet T. An experimental model for strictures studies in the anterior urethra of the male rabbit. *Urol Res*. 2003; 31 (6): 363-7.
88. Fung LC, Mittelman MW, Thorner PS, Khoury AE. A novel rabbit model for the evaluation of biomaterial associated urinary tract infection. *Can J Urol*. 2003; 10(5):2007-12.
89. Fu Q, Deng CL, Liu W, Cao YL. Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix. *BJU Int*. 2007;99(5):1162-5.
90. Leader RW, Padgett GA The genesis and validation of animal models. *Am J Pathol*. 1980;101(3 Suppl):S11-6.
91. Junqueira LCU, Carneiro J. Histologia Básica – texto e atlas. 11^a Edição. Ed. Guanabara Koogan. Cap 1: Histologia e seus métodos de estudo. 2008.
92. Queiroz LS, Nucci A, Facure NO, Facure JJ. Massive spinal cord necrosis in schistosomiasis. *Arch Neurol*. 1979;36:517-9.
93. Sund S, Grimm P, Reisaeter AV, Hovig T. Computerized image analysis vs semiquantitative scoring in evaluation of kidney allograft fibrosis and prognosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19(11):2838-45
94. Reis MA, Ramos V, Pereira SAL, Rodrigues DBR, Lino Jr RS, Castro ECC, Teixeira VPA. Técnicas para Coleta, Processamento e Diagnóstico de Biópsia Renal [artigo online]. Minas Gerais: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (FMTM) e da Universidade de Uberaba (UNIUBE). Goiás: Universidade Federal de Goiás; 2003

[editado em 05 dez 2003]. Disponível em:

http://www.uftm.edu.br/instpub/fmtm/patge/coleta_renal.htm.

95. Sampaio TCFVS, Leite VHR, Souza JMG, Antunes LC. Estudo morfo-histológico da interconexão dos ligamentos cruzados no joelho humano. *Rev Bras Ortop*. 2001; 36(10):394-400.
96. Smith CL. Renal stone analysis: is there any clinical value? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998; 7:703-9.
97. Korn S, Bichler KH, Eipper E, Henzler B, Schreiber M. Methodologic comparison of the analysis of urinary calculi. Roentgen diffractometry, polarization microscopy and microscopic-microchemical component analysis. *Urologe A*. 1993; 32(3):232-6.
98. Nayir A. Determination of urinary calculi by binocular stereoscopic microscopy. *Pediatr Nephrol*. 2002; 17:425-32.
99. Matos J. Introdução a análise térmica e termogravimetria.
100. Schnitzler E, Costa W, Carvalho F^o MA, Ionashiro M. Proposta de análises rápidas de calcários da região de Ponta Grossa por termogravimetria (TG), comparadas com as titulações complexométricas clássicas. *Publicatio UEPG – Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias*. 2000;6(1):37-40.
101. Ionashiro M, Giolito I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2002.
102. Lin MF, Shu YC, Tsen WC, Chuang FS. Differential scanning calorimetry analysis of silicon-containing and phosphorus-containing

- segmented polyurethane. I-Thermal behaviors and morphology. *J Appl Polym Sci*. 2001; 81:3489-501.
103. Chuang FS, Tsen WC, Shu YC. The effect of different siloxane chain-extendors on the thermal degradation and stability of segmented polyurethanes. *Polym Degrad Stab*. 2004; 84:69-77.
104. Lin MF, Tsen WC, Shu YC, Chuang FS. Effect of silicon and phosphorus on the degradation of polyurethane. *J Appl Polym Sci*. 2001; 79:881-99.
105. Redrobe S. Soft tissue surgery of rabbit em rodents. *Seminars in avian and exotix pet medicine*. 2002; 11(4):231-45.
106. Hill GA, Lewis AG, Sheldon CA. A rabbit model of free bladder mucosal grafting in a damaged urethral bed. *J Urol*. 1994; 152:983-6
107. Kropp BP, Ludlow JK, Spicer D, Rippy MK, Badylak SF, Adams MC, et al. Rabbit urethral regeneration using small intestinal submucosa onlay graft. *Urology*. 1998;52:138-42
108. Princípios Éticos na Experimentação Animal. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Junho de 1991.
109. Naudé AM, Heyns CF. What is the place of internal urethrotomy in the treatment of urethral stricture disease? *Nat Clin Pract Urol*. 2005;2(11):538-45.
110. Kambouri K, Gardikis S, Giatromanolaki A, Efstathiou E, Pitiakoudis M, Ipsilantis P, Botaitis S, Perente S, Antypas S, Polychronidis A, Sivridis E, Simopoulos C. Comparision of angiogenic activity after urethral

reconstruction using free grafts and pedicle flap: an experimental study.

Eur J Pediatr Surg. 2006;16(5):323-8.

111. Zhang YZ, Bjursten LM, Freij-Larsson C, Kober M, Wesslen B. Tissue response to commercial silicone and polyurethane elastomers after different sterilization procedures. *Biomaterials.* 1996;17(23):2265-72.
112. Simmons A, Hyvarinen J, Poole-Warren L. The effect of sterilization on a poly (dimethylsiloxane)/poly(hexamethylene oxide) mixed macrodiol-based polyurethane elastomer. *Biomaterials.* 2006; 27:4484-97.
113. Lucas AD, Stratmeyer ME. Extraction and stability of ethylene oxide residue in medical devices. *Biomed Instrum Technol.* 2008; 42(1):76:9.
114. Carbon RT, Lugauer S, Geitner U, Regenfus A, Böswald M, Greil J, Bechert T, Simon SI, Hümmer HP, Guggenbichler JP. Reducing catheter-associated infections with silver-impregnated catheters in long-term therapy of children. *Infection.* 1999; Suppl 1:S69-73.
115. Böswald M, Lugauer S, Regenfus A, Braun GG, Martus P, Geis C, Scharf J, Bechert T, Greil J, Guggenbichler JP. Reduced rates of catheter-associated infection by use of a new silver-impregnated central venous catheter. *Infection.* 1999;27 Suppl 1:S56-60.
116. Böswald M, Mende K, Bernschneider W, Bonakdar S, Ruder H, Kissler H, Sieber E, Guggenbichler JP. Biocompatibility testing of a new silver-impregnated catheter in vivo. *Infection.* 1999;27 Suppl 1:S38-42.
117. Martus P, Geis C, Lugauer S, Böswald M, Guggenbichler JP. Clinical study of the Erlanger silver catheter--data management and biometry. *Infection.* 1999;27 Suppl 1:S61-8.

118. Samuel U, Guggenbichler JP. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;23 Suppl 1:S75-8.
119. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals. In: Canadian Council on Animal Care (CCAC), Guide Vol. 1 (2nd Ed.). 1993 Chapter XI – Anesthesia. On line: <http://www.ccca.ca>.
120. Flecknell PA. Laboratory animal anesthesia. 1987; Toronto, Ont.: Academic Press.
121. Mook D. Anesthetic management of rodents and rabbits. Center of Laboratory Animal Resources. Morehouse School of Medicine, Atlanta-USA.2004.
<http://web.msm.edu/clar/AnestheticMgmtRodentsRabbits.pdf>.
122. Euthanasia. Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc*. 1986; 188(3): 252-68.
123. Zhang Y, Xiang M, San J, Cheng G, Wang S. Effect of matrine and carvedilol on collagen and MMPs activity of hypertrophy myocardium induced by pressure overload. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006; 7(3):245-50.
124. Vincent MA, Anquetil R. A case of urethra replacement using a silicone elastomer prosthesis. Observation, preliminary results, comments. *J Urol Nephrol (Paris)*. 1976 ;82(6):478-84
125. Munro SR, Scott FB. Use of completely implantable urethral catheter in male patients with spinal cord injury. *Urology*. 1976; 8(5): 492-4

126. Bødker A, Ostri P, Rye-Andersen J, Edvardsen L, Struckmann J. Treatment of recurrent urethral stricture by internal urethrotomy and intermittent self-catheterization: a controlled study of a new therapy. *J Urol.* 1992;148 (2 Pt 1): 308-10.
127. Goel MC, Kumar M, Kapoor R. Endoscopic management of traumatic posterior urethral stricture: early results and followup. *J Urol.* 1997; 157(1):102-3.
128. Palmintieri E, Manzoni G, Berdondini E, Di Fiore F, Testa G, Poluzzi M, Molon A. Combined dorsal plus ventral double buccal mucosa graft in bulbar urethral reconstruction. *Eur Urol.* 2008;53(1):81-9.
129. Penttermann EJ, Kambic H, Matsushita M, Kay R, Nose Y. Prerequisites for urinary bladder design. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1985; 31: 308-12
130. Lundborg G; Rosen B; Abrahamson SO; Dahlin L; Danielsen N. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. Preliminary findings. *J Hand Surg (Br).*1994;198: 273-6
131. Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, Chen TH, Cheng WC, Hu CL, Yao CH. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials.* 2000;21: 1541-7
132. Poppl N, Schreml S, Lichtenegger F, Lenich A, Eisenmann-Klein M, Prantl L. Does the surface structure of implants have an impact on the formation of a capsular contracture? *Aesthetic Plast Surg.*2007;31(2):133-9

133. Blum J, Skemp C, Reiser M. Silicone rubber ureteral prosthesis. *J Urol.* 1963;90(3):276-80
134. Lopour P, Janatová V. Silicone rubber-hydrogel composites as polymeric biomaterials – VI. Transport properties in the water-sollen state. *Biomaterials.* 1995; 16(8):633-40
135. Smahel J. Tissue reactions to breast implants coated with polyurethane. *Plast Reconstr Surg.* 1978; 61(1):80-5
136. Gorna K, Gogolewski S. Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *J Biomed Mater Res.* 2006; 79A:128-38
137. Gogolewski S, Gorna K, Zaczynska E, Czarny A. Structure-property relations and cytotoxicity of isosorbide-based biodegradable polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *J Biomed Mater Res.* 2008;85(2):456-65.
138. Hausner T, Schmidhammer R, Zandieh S, Hopf R, Schultz A, Gogolewski S, Hertz H, Redl H. Nerve regeneration using tubular scaffolds from biodegradable polyurethane. *Acta Neurochir Suppl.* 2007; 100:69-72
139. Chia SL, Gorna K, Gogolewski S, Alini M. Biodegradable elastomeric polyurethane membranes as chondrocyte carries for cartilage repair. *Tissue Engeneering.* 2006; 12(7):1945-53
140. van Minnen B, Stegenga B, van Leeuwen MBM, van Kooten TG, Bos RRM. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65:218-22

141. Bithelis G, Bouropoulos N, Liatsikos EN, Perimenis P, Koutsoukos PG, Barbalias GA. Assessment of encrustations on polyurethane ureteral stents. *J Endourol.* 2004; 18(6):550-6
142. Silva EA, Sampaio FJB, Cardoso LEM. Identification of glycosaminoglycans in the human male urethra. *Braz. J Urol.* 2000;26(4): 426-32
143. Silva EA, Sampaio FJB, Dornas MC, Ortiz W, Cardoso LEM. Composition changes of glycosaminoglycans in the urethral stricture disease. *Braz. J Urol.* 2001; 27 (4): 394-8
144. Sergeant GP, Hollywood MA, McCloskey KD, Thornbury KD. Specialised pacemaking cells in the rabbit urethra. *J Physiol.* 2000;526:359-66
145. Sievert KD, Wefer J, Bakircioglu ME, Nunes L, Dahiya R, Tanagho EA. Heterologous acellular matrix graft for reconstruction of the rabbit urethra: histological and functional evaluation. *J Urol.* 2001;165(6, Part 1):2096-102
146. El-Assmy A, El-Hamid MA, Hafez AT. Urethral replacement: a comparison between small intestinal submucosa graft and spontaneous regeneration. *BJU Intern.* 2004;94:1132-5
147. Brannan W. Management of urethral strictures. Editorial. *J Urol.* 1985; 13:442
148. Daifuku R, Stamm WE. Association of rectal and urethral colonization with urinary tract infection in patients with indwelling catheters. *JAMA.* 1984;252:2028

149. Nickel JC, Downey J, Costerton JW. Movement of pseudomonas aeruginosa along catheter surfaces. A mechanism in pathogenesis of catheter-associated infection. *Urology*. 1992;39(1):93-8
150. Choong S, Whitfield H. Biofilms and their role in infections in urology. *BJU Int*. 2000;86:935-41
151. Akiyama H, Okamoto S. Prophylaxis of indwelling urethral catheter infection. Clinical experience with a modified Foley catheter and drainage system. *J Urol*. 1979;121:40-2.
152. Lundeborg T. Prevention of catheter-associated urinary tract infections by use of silver-impregnated catheters. *Lancet*, 1986;2:1031
153. Johnson JR, Roberts PL, Olsen RJ, Moyer KA, Stamm WE. Prevention of catheter-associated urinary tract infection with silver oxide urinary catheter: Clinical and microbiologic correlates. *J Infect Dis*. 1990;162:114-50
154. Riley DK, Classen DC, Stevens LE, Burke JP. A large randomized clinical trial of a silver-impregnated urinary catheter: Lack of efficacy and staphylococcal superinfection. *Am J Med*. 1995; 98:349-56
155. Stickler D, Hughes G. Ability of *Proteus mirabilis* to swarm over urethral catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999.;18:206-8
156. Stickler DJ, Ganderton L, King JB, Nettleton J, Winters C. *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Urol Res* 1993; 21: 407-11
157. Morris NS, Stickler DJ, McLean RJC. The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. *World J Urol* 1999; 17:345-50

158. Meares Jr EM. Urinary catheters and nosocomial infections. *Urology*.1985;26(1 Suppl):12-4
159. Gilbert DN, Moellering RC Jr, Sande MA. The Sanford Guide to antimicrobial therapy. 2000, 30th Edition; Antimicrobial Therapy, Inc. USA
160. Virden CP, Dobke MK, Stein P, Parsons CL, Frank DH – Subclinical infection of the silicone implant surface as a possible cause of capsular contracture. *Aesthetic Plast Surg*. 1992; 16(2):173-9
161. Siggelkow W, Faridi A, Spiritus K, Klinge U, Rath W, Klosterhalfen B. Histological analysis of silicone breast implant capsules and correlation with capsular contracture. *Biomaterials*. 2003;24:1101-9
162. . Kershaw CM, Scaramuzzi RJ, McGowan MR, Wheeler-Jones CP, Khalid M. The expression of prostaglandin endoperoxide synthase 2 messenger RNA and the proportion of smooth muscle and collagen in the sheep cervix during the estrous cycle. *Biol Reprod*. 2007; 76(1):124-9
163. Buckiova D, Popelar J, Syka J. Collagen changes in the cochlea of aged Fischer 344 rats. *Exp Gerontol*. 2006;41(3):296-302.
164. Arul, Vadivel and Kartha, Reena and Jayakumar, Rajadas. A therapeutic approach for diabetic wound healing using biotinylated GHK incorporated collagen matrices. *Life Sciences*. 2007;80(4):275-84
165. Whittaer P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosírius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol*. 1994;89(5):397-410

166. Karvat F, Camargo NHA, Soares C, Bellini OJ, Silva RF, Tomiyama M, Folgueras MV, Gemeli E. Elaboração e caracterização de um biomaterial compósito a partir de uma matriz fosfato de cálcio/ Al_2O_3 - α para aplicação como implante e restituição óssea. *Revista Matéria*. 2005;10(1):43–50.
<http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo10639>
167. Dumanski AJ, Hedelin H, Edin-Lijegren A, Beauchemin D, McLean RJC. Unique ability of *proteus mirabilis* capsule to enhance mineral growth in infectious urinary calculi. *Infect Immun* 1994; 62: 2998-3003