MARCELO PITELLI TURCO

**Terapia celular com células mononucleares derivadas de
músculo estriado esquelético na deficiência esfinteriana em
modelo animal de incontinência urinária**

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

Programa de Urologia
Orientador: Prof. Dr. Cristiano Mendes Gomes

**São Paulo
2016**

MARCELO PITELLI TURCO

**Terapia celular com células mononucleares derivadas de
músculo estriado esquelético na deficiência esfinteriana em
modelo animal de incontinência urinária**

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

Programa de Urologia
Orientador: Prof. Dr. Cristiano Mendes Gomes

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Turco, Marcelo Pitelli

Terapia celular com células mononucleares derivadas de músculo estriado esquelético na deficiência esfíncteriana em modelo animal de incontinência urinária / Marcelo Pitelli Turco. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.

Orientador: Cristiano Mendes Gomes.

Descritores: 1.Incontinência urinária 2.Terapia baseada em transplante de células e tecidos 3.Uretra 4.Regeneração 5.Células musculares 6.Células-tronco

USP/FM/DBD-289/16

Dedico esta tese:

- à minha “mãezinha” Eglayr Therezinha Pitelli Turco, por seu carinho, dedicação e força; e ao meu pai Willians Turco, exemplo de integridade.
 - à minha esposa Renata de Arruda Botelho da Veiga Turco, pelo seu amor, companheirismo, apoio incondicional, compreensão e, sobretudo, por motivar-me a sempre continuar em frente.
 - e aos meus filhos Marcelo de Arruda Botelho da Veiga Turco e Rodrigo de Arruda Botelho da Veiga Turco; impossível explicar este amor.
-

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Cristiano Mendes Gomes**, meu orientador, por sua disponibilidade, por seu apoio inestimável a esta tese e, sobretudo, por seu comprometimento com a qualidade técnico-científica deste e de seus vários projetos.

Ao **Prof. Dr. Miguel Srougi**, digníssimo Professor Titular da Divisão de Urologia do Departamento de Cirurgia da FMUSP, exemplo de educador e chefe.

À **Profa. Dra. Maria Angélica Miglino**, digníssima Professora Titular do Departamento de Anatomia da FMVZ/USP, por sua atenção, seu apoio intelectual e financeiro.

À **Profa. Dra. Katia Ramos Moreira Leite**, chefe do LIM 55 da Divisão de Urologia do Departamento de Cirurgia da FMUSP, por sua amizade e disponibilidade em amparar-me em muitas das dificuldades técnicas que se apresentaram durante esta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Homero Bruschini**, chefe do grupo de Disfunção Miccional da Divisão de Urologia do Departamento de Cirurgia da FMUSP, por suas considerações que propiciaram a realização desta tese.

À **Dra. Isida de Campos Souza**, por sua amizade, disponibilidade, seriedade científica e pela sua incansável busca pelo aperfeiçoamento da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência, empregada neste trabalho.

À **Dra. Paula Fratini**, que me auxiliou na caracterização da população celular e à **Dra. Mariana Matera Veras**, por seu auxílio na realização do estudo morfométrico.

Ao **Dr. José de Bessa Jr.**, pelo auxílio com as análises estatísticas e ao **Dr. Alex Balduino de Souza**, pela produção das células.

À **Dra. Renaide Rodrigues Ferreira Gacek**, coordenadora técnica do Biotério Central do ICB/USP e à **Dra. Maria Luísa Guzzo**, chefe do Biotério da FMUSP e demais funcionários de ambos os biotérios, pelo cuidado com os animais utilizados nesta tese.

A todos os pesquisadores e funcionários do LIM 55 da FMUSP, em especial à **Dra. Sabrina T. Reis**, à **Dra. Nayara Viana** e ao **Sr. Iran Amorin Silva**, por seu grande apoio.

Aos funcionários e pesquisadores do Departamento de Anatomia – FMVZ/USP, em especial à **Dra. Marina Pandolphi Broglio** e ao **Dr. Márcio Nogueira Rodrigues**, que participaram de todas as cirurgias realizadas neste trabalho.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação e da Secretaria da Divisão de Urologia do Departamento de Cirurgia da FMUSP, pela atenção recebida durante todo este período.

Aos amigos **Prof. Dr. Joaquim Francisco de Almeida Claro**, **Dr. Marcos Lucon**, **Dr. Ricardo Luís Vita Nunes**, **Dr. Jose Pontes Jr.** e **Dr. Alexandre Danivolic**, pela amizade e estímulo.

Aos meus familiares, pelo incentivo e compreensão dos momentos de ausência ocasionados por meu trabalho excessivo.

Finalmente, agradeço a **Deus**, a quem sempre pergunto por que sou merecedor de tantas bênçãos.

Agradecimento institucional

Agradeço o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sem o qual a realização desta tese não teria sido possível.

Fundo: 2011/51868-5

“Onde está o teu tesouro, lá também
está o teu coração”

Matheus 6: 21.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2. ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Referências: adaptado de *International Committe of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	xii
Lista de Figuras	xiii
Resumo	xv
Summary	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	11
3 MÉTODOS	13
3.1 Tipo de estudo e período	14
3.2 Animais utilizados	14
3.3 Grupos experimentais	16
3.4 Cirurgias	16
3.4.1 Cirurgia de uretrolise	16
3.4.2 Cirurgia simulada	18
3.5 Obtenção das células mononucleares derivadas de músculo estriado	18
3.6 Caracterização das células mononucleares derivadas de músculo estriado <i>in vitro</i>	20
3.6.1 Análise microscópica das células	20
3.6.2 Citometria de fluxo	20
3.6.3 Imuno-histoquímica das células	21
3.7 Terapia	22
3.7.1 Injeção de células mononucleares derivadas de músculo estriado	22
3.7.2 Injeção de soro fisiológico	23
3.7.3 Injeção simulada	23
3.8 Remoção da uretra para avaliação histológica	23
3.9 Análises qualitativas	24
3.9.1 Processamento do material para análise microscópica	24

3.9.2 Imuno-histoquímica para actina e miosina	24
3.9.3 Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência	25
3.10 Análises quantitativas	27
3.10.1 Análise da proporção músculo/tecido conectivo	27
3.10.2 Análise da proporção de actina e miosina	28
3.11 Análise morfométrica	29
3.12 Análise estatística	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Animais e cirurgias	32
4.2 Caracterização das CMDME <i>in vitro</i>	32
4.3 Análises qualitativas	35
4.3.1 Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson	35
4.3.2 Imuno-histoquímica para actina e miosina	36
4.3.3 Hibridização “ <i>IN SITU</i> ” por fluorescência	38
4.4 Análises quantitativas	40
4.4.1 Análise da proporção relativa de Músculo/Tecido conectivo	40
4.4.2 Análise da proporção de actina e miosina	41
4.5 Análises morfométricas	42
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES	55
7 ANEXOS	57
7.1 Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da USP	58
7.2 Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP	59
7.3 Apresentação no Till & McCulloch Meetings, Ontário, Canadá, 2014	60
7.4 Apresentação na Society of Urodynamics, Female Pelvic Medicine & Urogenital Reconstruction (SUFU), Scottsdale, EUA, 2015	62
8 REFERÊNCIAS	65

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA - Análise de Variância

CD - *Cluster of Differentiation* (Grupamento de Diferenciação)

CMDME - Células mononucleares derivadas de músculo esquelético

CTDM - Células-tronco derivadas de músculo

DAPI - 4'-6'-diamino-2'-phenylindole

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

FACS - Separação de células ativada2q cs por fluorescência

FELASA - Federation of European Laboratory Animal Science Associations

FMVZ/USP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FISH - Hibridação *in situ* por fluorescência

IUE - Incontinência urinária aos esforços

LIM - Laboratório de investigação médica

PBS - Tampão fosfato-salino

SF - Soro fisiológico a 0,9%

WKY - Ratos Whistar-Kyoto

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do experimento	15
Figura 2 - Fotografia da cirurgia de uretrolise. A uretra encontra-se separada da parede vaginal anterior e do osso púbico	17
Figura 3 - Fotografia de rata uma semana após a cirurgia de uretrolise, sendo submetida à injeção de CMDME. Agulha posicionada periuretral, na posição três horas	22
Figura 4 - Fotografia da cultura das CMDMEs. Observar a morfologia fibroblastoide das CMDMEs na segunda passagem (Magnificação 20x)	33
Figura 5 - Análise Imuno-histoquímica das CMDMEs na segunda passagem. Observe a expressão positiva para CD 44, PCNA, MyoD e Desmina. O núcleo está corado em azul (coloração por DAPI). Imunomarcação positiva indicada pela cor verde A. CD44(+). B. PCNA (+). C. Desmina (+). D. MyoD (+). (Magnificação 100x)	33
Figura 6 - Citometria de fluxo das CMDMEs na segunda passagem. Observe expressão positiva de CD105 e CD 34, em azul, sobreposta ao seu respectivo controle negativo em vermelho. A. CD105 (+). B. CD34(+)	34
Figura 7 - Porção média da uretra de rata em corte transversal de 4µm, coloração pelo tricrômio de Masson. Observa-se em D, E e F extensa deposição de tecido conectivo e afilamento das camadas musculares; em G, H e I observa-se diminuição de tecido conectivo e camadas musculares mais espessadas	36
Figura 8 - Porção média da uretra de rata em corte transversal de 4µm, reação imuno-histoquímica com anticorpo antiactina. Observa-se, em C e D, afilamento das camadas musculares; em E e F, notam-se camadas musculares mais espessadas	37
Figura 9 - Porção média da uretra de rata em corte transversal de 4µm, reação imuno-histoquímica com anticorpo antimiosina. Observa-se em C e D, afilamento da camada muscular estriada esquelética; em E e F, nota-se camada muscular esquelética mais espessada	38
Figura 10 - Porção média da uretra de rata em corte transversal de 4µm, reação de FISH demonstrando a presença de células injetadas obtidas de animais machos, onde se detecta em vermelho o centrômero do cromossomo	

Y. As setas indicam células XY detectadas. Núcleo corado em azul (DAPI). Magnificação 1.000 x	39
Figura 11 - Representação gráfica da proporção músculo/tecido conectivo entre os três grupos.....	40
Figura 12 - Representação gráfica da proporção de actina pela área da uretra entre os três grupos.	41
Figura 13 - Representação gráfica da proporção de miosina pela área da uretra entre os três grupos.	42
Figura 14 - Representação gráfica da mensuração do diâmetro uretral nos três grupos.....	43
Figura 15 - Representação gráfica da mensuração da espessura da parede uretral entre os três grupos.....	43
Figura 16 - Representação gráfica das áreas fracionais da luz, mucosa e camada muscular, nos três grupos	44

Resumo

Turco MP. *Terapia celular com células mononucleares derivadas de músculo estriado esquelético na deficiência esfinteriana em modelo animal de incontinência urinária* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: Este estudo teve por objetivo investigar o efeito da injeção periuretral de células mononucleares derivadas de músculo estriado esquelético (CMDME) e a incorporação dessas células no esfíncter urinário de ratas, em modelo animal de incontinência urinária. **MÉTODOS:** As CMDMEs, foram isoladas de músculos dos membros pélvicos de ratos endogâmicos Whistar-Kyoto (WKY), machos. Os músculos foram submetidos à dissociação enzimática, seguida de isolamento das células mononucleares, sem necessidade de cultura e/ou expansão. A deficiência esfinteriana foi criada por uretrolise cirúrgica em 20 ratos endogâmicos WKY, fêmeas. Uma semana após, foi realizada a injeção periuretral de 1×10^6 de células, em 10 ratas (grupo CMDME), e 10 ratas receberam injeção de SF a 0,9% (grupo SF). Dez animais foram submetidos à cirurgia Sham e serviram como controle (grupo SHAM). Quatro semanas após a injeção, os ratos foram sacrificados, e as uretras, removidas. A incorporação das CMDMEs masculinas, na uretra feminina, foi confirmada pela detecção do cromossomo Y, através da hibridização *in situ* fluorescente. A porção média da uretra de cada animal foi processada para coloração pela hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson e também imuno-histoquímica para actina e miosina. Usando software digital (Image Pro Plus 6.0), calcularam-se a proporção músculo/tecido conectivo e a proporção de actina e miosina em cada amostra de uretra, sendo as proporções comparadas entre os grupos. As mudanças morfológicas da uretra de cada animal, de cada grupo, foram avaliadas medindo-se o maior e o menor diâmetro da uretra e a espessura média da parede, utilizando software digital (Image J); áreas fracionais da luz, mucosa e camada muscular da uretra foram estimadas usando o método de contagem de pontos. **RESULTADOS:** No

grupo CMDME, houve espessamento das camadas da musculatura lisa e estriada, e menor depósito de tecido conectivo, em relação aos animais do grupo SF. Uma diminuição da proporção músculo/tecido conectivo foi observada no grupo SF, em comparação ao grupo CMDME, e também em relação ao grupo SHAM ($0,51 \pm 0,28$; $1,62 \pm 0,53$ e $2,27 \pm 1,15$, respectivamente, $p < 0,001$). A proporção de actina estava diminuída no grupo SF, em comparação com o grupo CMDME, e com o grupo SHAM ($0,18 \pm 0,04$; $0,27 \pm 0,02$ e $0,27 \pm 0,03$, respectivamente, $p < 0,001$) sendo também observada esta diminuição na proporção de miosina ($0,07 \pm 0,01$; $14 \pm 0,02$ e $0,15 \pm 0,03$, respectivamente, $p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos SF, CMDME e SHAM em relação ao diâmetro da uretra, espessura da parede uretral e áreas fracionais da luz, mucosa e parede muscular uretral. CONCLUSÕES: As CMDMEs foram incorporadas na uretra do grupo CMDME. Nestes animais, houve diminuição de tecido conectivo e aumento da quantidade de músculo liso e esquelético. As CMDMEs foram facilmente obtidas, sem necessidade de expansão celular, com pequeno tempo de preparo.

Descritores: incontinência urinária; terapia baseada em transplante de células e tecidos; uretra; regeneração; células musculares; células-tronco.

Summary

Turco MP. *Cell therapy with skeletal muscle-derived mononuclear cell in the sphincter deficiency in an animal model of urinary incontinence* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

INTRODUCTION: This study investigated the effect of periurethral injection of skeletal muscle-derived mononuclear cells (SMDMCs) into the urethral sphincter in an animal model of stress urinary incontinence (SUI). **METHODS:** SMDMCs were isolated from the hind limb muscles of male Wistar-Kyoto (WKY) isogenic inbred rats. The muscles were enzymatically dissociated, and SMDMCs were directly isolated without the need for culture or expansion. Urinary sphincter deficiency was created by surgical urethrolisis in 20 female WKY rats. One week later, 10 rats received an injection of 1×10^6 cells (SMDMC group) and 10 rats received saline injections (Saline group). In addition, 10 rats were subjected to sham surgery (Sham group). Four weeks later, the rats were euthanized and their urethras harvested. The incorporation of male SMDMC in the female urethras was confirmed by the detection of Y-chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). In addition, hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome staining, as well as immunohistochemistry analyses to actin and myosin were performed. Using digital software (Image Pro Plus 6.0), the muscle to connective tissue, actin and myosin ratios were calculated. A urethral morphological evaluation was conducted by measuring the diameters and mean wall thickness, using Image J software. Fractional areas of the lumen, mucosa and muscular layer were estimated using the point counting method. **RESULTS:** The SMDMCs were successfully incorporated into the urethra. Less collagen was observed among the muscle fibers and less atrophy was found in the smooth and skeletal muscle layers of the SMDMC group. A significant decrease in the muscle to connective tissue ratio was observed in the Saline group, compared with the SMDMC and Sham groups ($0,51 \pm 0,28$ vs $1,62 \pm 0,53$ vs $2,27 \pm 1,15$, respectively; $p < 0.001$). The proportion of the actin was decreased in the Saline group, in

comparison with the SMDMC and Sham groups ($0,18 \pm 0,04$ vs $0,27 \pm 0,02$ vs $0,27 \pm 0,03$, respectively; $p < 0,001$); a decrease was also observed in the proportion of myosin ($0,07 \pm 0,01$ vs $0,14 \pm 0,02$ vs $0,15 \pm 0,03$, respectively; $p < 0,001$). No significant differences were observed among the groups Sham, Saline and SMDMC in terms of urethral diameter, urethral wall thickness and fractional areas of the lumen, mucosa and muscular layer. **CONCLUSIONS:** The SMDMCs that were incorporated into the injured urethral sphincter resulted in decreased connective tissue and increased muscle content in the SMDMC group. SMDMCs were easily obtained, without need for cell expansion, and they only required a brief preparation time.

Descriptors: urinary incontinence; cell and tissue-based therapy; urethra; regeneration; muscle cells; stem cells.

1 INTRODUÇÃO

A incontinência urinária é uma condição que causa grande impacto social e redução da qualidade de vida. As mulheres são as mais afetadas. Um estudo prospectivo da prevalência mundial de sintomas miccionais estimou que, em 2018, 423 milhões de indivíduos serão afetados pela incontinência urinária ¹.

A causa mais comum de incontinência em mulheres é a incontinência urinária aos esforços (IUE), que foi definida pela Sociedade Internacional de Continência (*International Continence Society* - ICS) como "queixa de perda involuntária de urina no esforço ou na atividade física (por exemplo, atividades desportivas), ou espirro ou tosse" ².

Várias estruturas anatômicas contribuem para a continência urinária, sendo que o esfíncter urinário e o sistema de suporte são as mais importantes ³. A uretra feminina é constituída de mucosa, plexos vasculares submucosos, músculo liso, músculo estriado e tecido conectivo. A luz uretral é envolvida por camadas de músculo. Em na sua porção cranial, a camada muscular é formada por músculo liso contíguo à musculatura do trígono e em sua porção média, existem duas camadas de músculo liso e uma camada de músculo estriado, que compõem o esfíncter urinário ^{4,5}.

O sistema de suporte é composto pela parede vaginal anterior e pelos músculos e fáscias circunjacentes. A parede vaginal é conectada lateralmente à face medial do músculo elevador do ânus, e a contração deste músculo modifica a posição da uretra. Há, ainda, uma interligação da parede vaginal com o arco tendíneo da fáscia pélvica. Esses elementos estão dispostos num

aparato tridimensional único e complexo que é controlado por mecanismos neurais ⁴.

Para conservar a continência urinária, a ação conjunta do esfíncter urinário e do suporte anatômico deve proporcionar pressão de fechamento uretral suficiente para resistir à pressão intravesical ⁵⁻⁸. Deficiências em alguns destes componentes podem levar a graus variáveis de IUE ⁹. Estudos eletrofisiológicos e histológicos em mulheres com IUE têm evidenciado dano miopático e neuropático no esfíncter uretral e no músculo elevador do ânus, junto com deposição de colágeno e atrofia muscular ¹⁰⁻¹².

O tratamento conservador da IUE inclui mudanças comportamentais e do estilo de vida, farmacoterapia e fisioterapia para o assoalho pélvico. O tratamento medicamentoso da IUE tem como objetivo aumentar a pressão intrauretral aumentando diretamente a tonicidade da musculatura ou aumentando a atividade neuronal. Dentre as medicações investigadas com estes objetivos, a duloxetina apresentou resultados iniciais animadores, mas a pouca eficácia e seus potenciais efeitos colaterais têm limitado sua utilização clínica ¹³⁻¹⁷.

O tratamento da IUE feminina com fisioterapia baseia-se no aumento da força e do tônus dos músculos do assoalho pélvico, que participam do mecanismo da continência ¹⁸. Com este objetivo, são frequentemente utilizados os exercícios descritos por Kegel ¹⁹, *biofeedback*, cones vaginais ou eletroestimulação ¹⁸. Não existe evidência de que uma destas modalidades de fisioterapia seja superior no tratamento da IUE ⁶ e não há evidência de que os

exercícios para reabilitação do assoalho pélvico sejam melhores que a ausência deste tratamento na cura da IUE ¹⁵.

Mulheres com IUE, nas quais os tratamentos conservadores falharam, podem ser tratadas com cirurgia. Diferentes técnicas cirúrgicas são utilizadas para a correção da IUE, dentre as quais: agentes injetáveis, a colpossuspensão e a cirurgia de *sling* (do inglês: “alça”, “tipoia”) ^{16, 17}. Devido à sua eficácia, segurança e rápido aprendizado, os *slings* sintéticos suburetrais (ou *slings* de uretra média) são a técnica preferencialmente utilizada no tratamento da IUE em mulheres ^{16,17,20}.

O uso periuretral de agentes injetáveis tem como objetivo melhorar a coaptação das paredes uretrais, aumentando a capacidade da uretra para resistir aos aumentos de pressão vesicais ^{21,22}. As substâncias mais utilizadas para este fim são: teflon, gordura autóloga, colágeno, polímeros de silicone, entre outros. Não há evidência de que uma destas substâncias tenha melhor resultado que as outras no tratamento da IUE ¹⁵. A eficácia deste tratamento é modesta no curto prazo e diminui no longo prazo ^{15, 23}.

A colpossuspensão envolve a fixação do fórnice vaginal ao ligamento de Cooper ²⁴. Estudos de longo prazo, em pacientes submetidas à colpossuspensão, evidenciam índices de cura, em 5 anos, de 82% ²⁵ e de 69% em 10 anos ²⁶. Esta técnica pode ser realizada por via laparoscópica, porém seus resultados, com pequenas séries de casos, ainda são conflitantes ^{9,27}.

A técnica de *sling* baseia-se na colocação de uma fina faixa de material sintético (tela) ou de fâscias autólogas sob a uretra média. A faixa de *sling* é

fixada na parede abdominal anterior (*slings* retropúbicos) ou na raiz da coxa (*slings* transobturatórios). Os *slings* acompanham-se de elevadas taxas de sucesso de curto e longo prazos ^{15,28} e o risco de insucesso após a implantação dos *slings* sintéticos é próximo de 15% ²⁰. As complicações destes procedimentos incluem perfuração vesical, hemorragia, lesão intestinal, extrusão vaginal, urgência miccional, urge-incontinência, infecções do trato urinário e disfunção miccional ^{20,29}. O *sling* por via retropúbica tem maior índice de complicações importantes, como as perfurações intestinais, hemorragias e até morte ²⁹.

Embora os tratamentos cirúrgicos para a correção da IUE em mulheres obtenham bons resultados, eles estão associados a significativa morbidade e falhas terapêuticas. Nenhum dos tratamentos cirúrgicos citados anteriormente tem foco na interrupção da progressão da IUE ou na recuperação das estruturas funcionalmente deficientes. Neste contexto, a terapia celular, visando à formação de novos tecidos, poderia ser usada como método primário ou suplementar aos outros métodos, no tratamento da IUE ³⁰⁻³³.

Dentre os tecidos envolvidos no mecanismo da continência urinária, o esfíncter urinário uretral tem demonstrado ser o de maior importância ⁴, sendo deficiente em pacientes com IUE ³⁴. Estudos utilizando a terapia celular com o objetivo de reparar o componente muscular do esfíncter uretral vêm sendo realizados. Este reparo pode ocorrer pela diferenciação das células injetadas em células musculares lisas ou estriadas. Outra possibilidade é a ocorrência de mecanismos parácrinos: as células injetadas produziriam fatores que iniciam e

promovem reparação tecidual, ativam células-tronco residentes, reforçam a vascularização ou promovem infiltração de células regenerativas ³⁵⁻³⁸.

As primeiras experiências com terapia celular para IUE foram feitas por Chancellor et al. ³⁹ usando animais, em 2000. Estes pesquisadores estudaram o papel da injeção intrauretral de mioblastos para favorecer a coaptação da parede uretral e melhorar a função do esfíncter uretral. Em 2002 Yiou et al. ⁴⁰ utilizaram células precursoras de músculo esquelético para tratar ratos com lesão esfíncteriana e observaram aumento de fibras musculares. Posteriormente, outros estudos experimentais foram realizados, utilizando células-tronco, nos quais as células foram obtidas após isolamento e cultivo, com modificação ou separação celular. As células foram obtidas de variados tecidos, incluindo músculo esquelético ⁴¹⁻⁴⁸, tecido adiposo ⁴⁹⁻⁵³, medula óssea ⁵⁴⁻⁵⁷, células do cordão umbilical ⁵⁸ e líquido amniótico ^{59, 60}.

Avaliação histológica da uretra foi realizada nos estudos experimentais com o objetivo de avaliar melhora tecidual, incorporação das células injetadas e identificar possível diferenciação celular. De maneira geral, a terapia celular promoveu aumento localizado ^{43,52,56} ou difuso ^{42,43,45,48,53,57-63} das camadas musculares. Também foi verificado que as camadas musculares, em alguns destes animais, apresentavam desarranjo estrutural, fibras musculares desorganizadas ^{43,45,48,61,62}, menor depósito de colágeno ^{54,58} e maior proporção músculo/tecido conectivo ^{48,49,54}. A distribuição e a sobrevivência das células injetadas foram avaliadas por ampla variedade de métodos, sendo verificado que algumas destas células foram incorporadas ao tecido hospedeiro ^{46-48,52,54,57,63,64} e/ou diferenciaram-se em células musculares ^{52,54,56,57,59,60}.

A avaliação funcional nos estudos pré-clínicos foi executada principalmente pela mensuração da pressão de perda e da pressão de fechamento uretral, sendo relatada a melhora destes parâmetros, com recuperação da função esfinteriana ^{42,43,45-59,61,63-73}. Também foi investigada através de estimulação elétrica por Cannon et al. ⁶² que observaram melhora da contração muscular da tira de esfíncter uretral no grupo que recebeu células-tronco derivadas de músculo (CTDM) em relação ao grupo que não as recebeu. Kwon et al. ⁴⁵ observaram melhora da contratilidade muscular da tira de esfíncter uretral, no grupo que recebeu CTDM em comparação com o grupo que recebeu fibroblastos.

São escassos na literatura estudos clínicos que utilizaram injeção de células-tronco em pacientes com incontinência urinária. Nestes estudos, as células-tronco foram obtidas de tecido adiposo ⁷⁴, tecido muscular ⁷⁵ ou de células do cordão umbilical ⁷⁶. Mitterberger et al. realizaram estudos utilizando células-tronco autólogas, obtidas por meio de biópsia muscular. Num dos estudos, 123 mulheres foram submetidas a injeção de CTDM e fibroblastos, no esfíncter urinário: 79% tornaram-se continentes e 13% melhoraram as perdas urinárias ⁷⁷. Noutro estudo, 63 homens incontinentes receberam CTDM e fibroblastos: 41 deles ficaram continentes e 17 tiveram melhora da continência ⁷⁸. Estes pesquisadores realizaram ainda um estudo com 20 mulheres, das quais 16 estavam continentes, após dois anos de seguimento ⁷⁹. É importante ressaltar, entretanto, que dois trabalhos deste mesmo grupo foram “retratados” por questões éticas ou por falta de consistência científica ⁸⁰⁻⁸².

Injetando um total de 4×10^8 de células derivadas de cordão umbilical na uretra de 39 mulheres com IUE, Lee et al. verificaram, através do Teste de Satisfação de Paciente (*Patient Satisfaction Test*) que 26 (72,2%) permaneceram satisfeitas após um ano da injeção ⁷⁶. Carr et al. observaram melhora subjetiva e objetiva (com diminuição do volume de perda urinária diária) em cinco das oito mulheres incontinentes que foram tratadas com injeções transuretrais de CTDM ⁸³.

Ao testar a segurança e a eficácia do uso de CTDMs autólogas, em 38 mulheres com incontinência urinária, Carr et al., em um estudo prospectivo, comparando variadas doses de injeção de CTDM (entre 1×10^6 e $1,28 \times 10^8$), não observaram efeitos adversos importantes em nenhuma das doses. Verificaram que 88,9% das pacientes que receberam doses acima de $3,2 \times 10^7$ de CTDM (8/9 pacientes) tiveram redução maior que 50% no volume de perda urinária diária, e 77,8% (7/9 pacientes) tiveram redução maior que 50% dos episódios de perdas com os esforços ⁷⁵.

Estudos clínicos com maior número de pacientes, maior tempo de seguimento, com grupos-controle e duplo-cegos são necessários para que as células-tronco sejam utilizadas de maneira segura, como modalidade terapêutica, na correção da incontinência urinária feminina ^{84, 85}.

De maneira geral, os estudos envolvendo terapia celular e IUE demonstraram que as células-tronco injetadas podem ser incorporadas, reparar o tecido lesado e melhorar a continência urinária. O estado atual da terapia celular no tratamento da IUE é considerado experimental. Clinicamente, tem sido realizado por poucos grupos, sempre com rígido controle de agências

reguladoras e comissões de ética. Os resultados, embora animadores, ainda são preliminares.

Permanecem várias dúvidas em relação à terapia celular para tratamento da IUE, já que os trabalhos realizados utilizaram metodologias diversas. Um dos aspectos importantes é o tipo de célula mais adequado para a terapia celular. Ao eleger a fonte para a terapia celular, devem-se considerar vários fatores, como facilidade de obtenção, tempo para preparo, custo do preparo, dentre outros. Também se deve atentar para: o tipo de modificação celular envolvido na produção; o risco de contaminação, especialmente das células cultivadas por longo tempo; e o número de células produzidas.

Neste cenário, ao escolher-se a fonte de células desta pesquisa, optou-se por uma que pudesse ser obtida do próprio indivíduo para injeção no esfíncter sem necessidade de cultura e sem os custos e os riscos inerentes. Também procurou-se um método de produção utilizando técnica simples, com tempo de preparo curto e que proporcionasse quantidade de células suficiente para o tratamento proposto. Seria ainda conveniente que este método e as células tivessem potencial para eventual aplicação terapêutica em seres humanos.

Optou-se pelo uso do músculo estriado esquelético como provedor das células. Ele compreende aproximadamente 40% a 50% da massa corpórea total e, assim, uma grande quantidade de células pode ser obtida facilmente e com segurança ⁸⁶. Além disto, pequeno número de células provenientes deste tecido seria necessário para a regeneração do esfíncter uretral, que tem pequenas dimensões.

O tecido muscular esquelético adulto é uma rede altamente organizada de diferentes tipos celulares, estruturas neurovasculares e tecido conectivo, que possui notável capacidade regenerativa natural ^{87,88}. Nele, existe uma população de células composta por células-satélite, pericitos, células perivascularres, células progenitoras musculares e células endoteliais, que naturalmente participam da renovação, reparação e regeneração do tecido muscular e que poderiam ser utilizadas para a reparação de outros tecidos: neste caso, o esfíncter urinário ⁸⁹.

A conjectura é que, empregando as células existentes na musculatura estriada esquelética, que possuem capacidade regenerativa, poder-se-ia produzir uma população celular que se incorporasse e restaurasse o esfíncter uretral.

Avaliou-se, neste estudo, a recuperação histológica e morfológica do esfíncter uretral, após a injeção de células mononucleares derivadas de músculo estriado esquelético (CMDME) em modelo animal de incontinência urinária.

2 OBJETIVOS

- 1- Verificar a incorporação das células mononucleares derivadas de músculo esquelético (CMDME) de ratos no esfíncter urinário de ratas, em modelo animal de incontinência urinária.
 - 2- Avaliar o efeito da terapia celular com CMDME na regeneração do esfíncter urinário, em modelo animal de incontinência urinária, previamente estabelecido.
-

3 MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo e período

Foi realizado estudo experimental no Laboratório de Investigação Médica da Urologia (LIM/55) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), no período compreendido entre agosto de 2012 E fevereiro de 2016. Protocolo de pesquisa número 376/11, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Comissão de Ética em Pesquisa da FMUSP, em 09 de novembro de 2011 (Apêndice I), e Protocolo de Pesquisa número 2201/2011, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), em 30 de junho de 2011 (Apêndice II).

3.2 Animais utilizados

Foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus*), de linhagem endogâmica, da raça Wistar- Kyoto, com idade de 12 semanas, sendo 30 fêmeas e dois machos, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pesando entre 250 e 300 g. Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo da FMUSP, em condições de barreiras para animais convencionais, segundo as referências da Federação das Associações Europeias de Ciência com Animal de Laboratório (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations - FELASA*), separados por sexo e colocados em gaiolas coletivas de polietileno, mantidos nas condições ambientais e de temperatura constante, iluminação de 13 horas de escuro e 11

horas de claridade. Todos os grupos tiveram acesso à água *ad libitum* e foram alimentados com ração habitual.

Figura 1 - Representação esquemática do experimento.

3.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente, em três grupos:

No **grupo CMDME** (n=10), foi realizada uretrolise para produzir deficiência esfinteriana e submetidos à injeção de células mononucleares derivadas de músculo esquelético (CMDME).

No **grupo SF** (n=10), foi realizada uretrolise para produzir deficiência esfinteriana e submetidos à injeção de soro fisiológico a 0,9% (SF).

No **grupo SHAM** (n=10), foi realizada cirurgia simulada, na qual a uretra foi exposta, mas o esfíncter não foi lesado, e injeção simulada, sem administração de qualquer substância.

3.4 Cirurgias

3.4.1 Cirurgia de uretrolise

Os animais dos grupos SF e CMDME foram contidos manualmente e, posteriormente, anestesiados com maleato de midazolam (2 mg/Kg) e cloridrato de quetamina (50 mg/kg) por via intraperitoneal, em todos os procedimentos cirúrgicos.

As ratas foram colocadas em posição supina, com os membros pélvicos abduzidos, e um cateter 24G foi inserido através da uretra para facilitar sua

identificação e manipulação. Com auxílio de lupa binocular, com aumento de 2,5 x, a bexiga e a uretra foram expostas mediante incisão abdominal mediana.

Após dissecação e identificação, a uretra foi circunferencialmente individualizada dos tecidos adjacentes; desde sua porção proximal até sua porção mais distal, preservando-se somente o orifício uretral externo, o segmento medial foi separado da parede vaginal anterior e do osso púbico com dissecação cuidadosa (Figura 2).. Após este procedimento, a parede abdominal foi fechada em dois planos com fio de poliglactina 4.0.

Para a analgesia pós-operatória, os animais receberam morfina (2mg/kg/IM) como terapia analgésica, durante cinco dias de pós-operatório, e antibioticoterapia com 10 mg/kg de enrofloxacina por via intramuscular.

Figura 2 - Fotografia da cirurgia de uretrolise. A uretra encontra-se separada da parede vaginal anterior e do osso púbico.

3.4.2 Cirurgia simulada

Nos animais do grupo SHAM, a bexiga e a uretra foram expostas mediante incisão abdominal mediana, sem realização de dissecação destas estruturas. A parede abdominal foi fechada em dois planos com fio de poliglactina 4.0.

3.5 Obtenção das células mononucleares derivadas de músculo estriado

Foram realizados dois procedimentos em datas distintas para a obtenção das CMDMEs, no Centro de Pesquisa e Inovação em Células-Tronco, Terapia Celular e Terapia Gênica da FMVZ/USP. Em cada um deles, foi utilizado um rato endogâmico Wistar-Kyoto (WKY), macho, pesando entre 250 e 300 g, para coletar células para cinco dos 10 ratos do grupo CMDME.

O animal foi sacrificado, sendo que foi primeiramente anestesiado com maleato de midazolam (2 mg/kg) e cloridrato de quetamina (50 mg/kg) por via intraperitoneal. Após 15 minutos, foi administrada overdose de tiopental sódico (100 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a eutanásia, para antissepsia, o animal foi mergulhado em álcool a 96 graus, por 10 segundos.

Em seguida, foram incisados a pele e o tecido celular subcutâneo da coxa, e procedeu-se à dissecação e à retirada de todos os músculos da coxa, que foram imediatamente colocados em meio DMEM estéril (Dulbecco's minimum essential medium) (Sigma-Aldrich).

Os músculos foram fragmentados até que seus pedaços atingissem 1-2 mm³, sendo imerso um grama de músculo em solução de colagenase tipo II (1 mg/ml)(Sigma), na proporção de 200 mg de músculo por mL de solução. Este material foi deixado *overnight* em geladeira, à temperatura de 5 °C. No dia seguinte, este material foi retirado da geladeira e colocado na estufa, por quatro horas, à 37 °C, com 5% de CO₂.

O material foi homogeneizado e filtrado em membrana de náilon de 70 µm para a remoção dos debris. As CMDMEs, foram separadas do material filtrado por um gradiente de concentração com Percoll (Sigma) a 60%, em NaCl (Sigma) 1,5 M. Para isso, o filtrado foi transferido para tubo de centrifuga de 15 mL contendo Percoll a 60%, com PBS (tampão fosfato-salino, Sigma-Aldrich), na proporção de 1:1. Os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm, 20 °C, por 20 minutos. As células do anel do gradiente foram coletadas com pipeta e lavadas em PBS, duas vezes, a 2.000 rpm, 20 °C, por um minuto cada.

As células foram então ressuspensas em DMEM (Sigma-Aldrich) com 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia) e contadas em câmara de Neubauer. As células mortas foram identificadas e excluídas com o corante azul de Tripan. Após a contagem, as células foram ressuspensas em PBS, na concentração de 1×10^6 CMDME, em 10 µl. O tempo total de preparo foi de 16 horas.

3.6 Caracterização das células mononucleares derivadas de músculo estriado *in vitro*

3.6.1 Análise microscópica das células

Para a caracterização celular, as CMDMEs foram plaqueadas em cultura contendo DMEM, com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina e estreptomicina (LGC Biotecnologia). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a proliferação celular foi acompanhada em microscópio invertido. As células foram documentadas em foto a fim de registrar a morfologia celular. Após nove dias, quando as culturas estavam confluentes, as células foram tripsinizadas e subcultivadas. Somente as células da segunda passagem foram usadas para a caracterização das CMDMEs.

3.6.2 Citometria de fluxo

As CMDMEs da segunda passagem foram tripsinizadas e centrifugadas a 1.500 rpm. O sedimento foi lavado em 5 mL de SF a 0,9% e centrifugado a 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi ressuspenso em solução tampão para a análise das células marcadas por fluorescência (FACS). A suspensão foi transferida para tubos de citometria, e os anticorpos CD34 (BD Pharmingen®) e CD105 (Abcam®) foram adicionados por 12 h, a 4°C. Foram realizadas análises no FACASARIA II Sorter System (10.000 eventos) e analisados por FlowJo v.8 software.

3.6.3 Imuno-histoquímica das células

As CMDMEs foram cultivadas em placas contendo DMEM e 10 % de soro fetal bovino. Após 24 horas, as células foram lavadas duas vezes em solução salina tris com Tween 20 (20mM Tris-HCL [pH7,4], 0.15M NaCl, e 0,5% Tween 20 a 0,5%) e fixadas por 24 horas em solução de paraformaldeído a 4% após permeabilização com Triton X-100 (Sigma®). Após bloqueio com albumina de soro bovino a 5%, as células foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente, com anticorpos primários diluídos em albumina de soro bovino a 5%. Os anticorpos primários usados para a imuno-histoquímica das células foram MyoD (SC760)(Santa Cruz Biotechnology®), PCNA (SC56)(Santa Cruz Biotechnology®), CD44 (SC9960)(Santa Cruz Biotechnology®) e Desmina (ab15200)(Abcam®). Após lavar os anticorpos duas vezes em solução salina tris com Tween 20, o anticorpo conjugado ao isotiocianato foi adicionado e incubado por 40 minutos, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário usado foi anti-mouse IgG e anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology®). (As lâminas foram montadas com meio Vectashield, com e sem DAPI (4'-6'-diamino-2'-phenylindole)(Vector Laboratories). As imagens digitais foram obtidas com câmera CCD (PCO, VC44) e processadas no software ISIS (MetaSystems).

3.7 Terapia

3.7.1 Injeção de células mononucleares derivadas de músculo estriado

A injeção das CMDMEs foi realizada imediatamente após o término de seu preparo, uma semana após a uretrolise nos animais do grupo CMDME, através de incisão mediana e com auxílio de lupa binocular, com aumento de 2,5 x, com a mesma técnica anestésica utilizada na cirurgia de uretrolise.

Um total de 1×10^6 células diluídas em 10 μ l foram injetadas em cada animal, uma única vez. Foram realizadas duas aplicações periuretrais de 5 μ l, utilizando seringa de Hamilton702N (Sigma-Aldrich), nas posições três e nove horas, distando aproximadamente 5 mm do colo vesical (Figura 3).

Figura 3 - Fotografia de rata uma semana após a cirurgia de uretrolise, sendo submetida à injeção de CMDME. Agulha posicionada periuretral, na posição três horas.

3.7.2 Injeção de soro fisiológico

No grupo SF, a injeção de soro fisiológico a 0,9% foi realizada uma semana após a uretrolise. O procedimento foi rigorosamente igual ao descrito para a injeção no Grupo CMDME, sendo, entretanto, injetados 10 µL de soro fisiológico a 0,9%, utilizando seringa de Hamilton 702N (Sigma-Aldrich).

3.7.3 Injeção simulada

No grupo SHAM, foi realizada injeção simulada uma semana após a uretrolise. O procedimento foi igual ao descrito para os outros grupos, sendo simulada a injeção com a introdução da agulha da seringa de Hamilton 702N (Sigma-Aldrich), na área de injeção, sem injetar nenhuma substância.

3.8 Remoção da uretra para avaliação histológica

Após quatro semanas do procedimento de injeção das células, as ratas de todos os grupos foram sacrificadas. Inicialmente, foram anestesiadas como nos outros procedimentos e, após 15 minutos, foi administrada overdose de tiopental sódico (100 mg/kg) por via intraperitoneal.

Procedeu-se, imediatamente após, às remoções das uretras e bexigas em bloco. Todos os materiais removidos foram enviados para análise no Laboratório de Investigação Médica da Urologia (LIM/55) da FMUSP.

3.9 Análises qualitativas

3.9.1 Processamento do material para análise microscópica

Após permanecerem no fixador (paraformaldeído a 4%) por 24 horas, as porções médias das uretras foram desidratadas em gradiente de etanol e diafanizadas em xilol. Posteriormente, foram embebidas em parafina. Cortes de 4µm foram feitos a partir dos blocos de parafina para o processamento da coloração, pela hematoxilina-eosina e pelo tricrômio de Masson.

Após as colorações, cada uma das peças dos diferentes grupos foi avaliada através de microscopia de luz (microscópio Nikon Eclipse E 200). Avaliaram-se a qualidade da coloração e a presença de todas as camadas de uretra (epitelial urotelial, camada muscular da mucosa, duas camadas de músculo liso e uma camada de músculo estriado esquelético). Nos casos onde um ou mais parâmetros acima descritos não estavam adequados, era realizado novo corte a partir do bloco de parafina original.

3.9.2 Imuno-histoquímica para actina e miosina

Os cortes foram montados em lâminas com carga positiva (Leica Biosystems) e colocadas em estufa a 60°C, por aproximadamente 1 hora, para remover o excesso de parafina. A imuno-histoquímica foi realizada nos cortes do bloco de parafina correspondente, usando um imunomarcador automático (Bond-Max Leica Biosystems Nussloch, Alemanha). Os anticorpos primários usados foram *Mouse Monoclonal* [ACTN05(C4)] (ab3280)(Abcan) para actina e

Rabbit Monoclonal [EPRA 4160] (ab108923)(Abcan) para miosina. Os anticorpos foram diluídos a 1:100 de acordo com as recomendações do fabricante. Na sequência, foi colocado o anticorpo secundário (*Bond Polymer Refine Detection Kit*). A recuperação antigênica foi feita com *Retrival Solution* (ER1) pH 6, por 20 minutos, e a incubação dos marcadores foi realizada em 15 minutos. O processo automatizado durou cerca de 3 horas e 30 minutos. As lâminas já coradas foram manualmente tratadas com etanol e xilol, e montadas com lamínula.

3.9.3 Hibridização *in situ* por fluorescência

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) foi realizada nas amostras de uretra das ratas de todos os grupos.

Cortes histológicos de uretras das ratas, com 4µm de espessura, foram montados em lâminas Leica Bond TM com carga positiva e mantidos entre 56°C e 70°C *overnight*. Em seguida, as lâminas foram desparafinadas com Xilol (Qeel – São Paulo - Brasil), desidratadas e mantidas em etanol (Merck) a 100% até à realização da técnica de FISH.

As lâminas com as amostras foram retiradas do etanol a 100%, secas à temperatura ambiente e transferidas para um coplin contendo solução de NaSCN 1N (Sigma-Aldrich) a 80°C, em banho-maria por 15 minutos e, em seguida, lavadas em água destilada para a remoção do NaSCN.

As amostras foram digeridas em uma solução de protease (Pepsina Sigma-Aldrich P6887) na concentração de 2,0 mg/mL em HCl 0,1N a 37°C, por

10 a 20 minutos. As lâminas foram então novamente lavadas em água e, em seguida, foram desidratadas em uma bateria de etanol a 70%, 85% e 100%, dois minutos em cada e secas ao ar.

Como a finalidade da técnica de FISH neste trabalho era verificar a incorporação das células dos ratos machos injetadas nas uretras dos ratos fêmeas, optou-se por utilizar, na mesma reação, as sondas específicas para rato (Rat IDetect™ Chromosome Paint Probes) para o cromossomo X, marcada com fluoróforo verde, e para o cromossomo Y, marcada com fluoróforo vermelho.

Foi aplicado sobre as amostras o volume de 2µl da mistura das sondas X, Y e tampão de hibridação (0,6 µl da sonda X, 0,1 µl da sonda Y e 1,3 µl do tampão de hibridação). A amostra foi coberta com lamínula circular colada com cola de borracha (Elmer's rubber cement).

As lâminas foram colocadas sobre uma placa aquecedora a 73°C, por 3 minutos, para ocorrer a desnaturação da amostra e da sonda, concomitantemente. Em seguida, as lâminas foram colocadas em câmara úmida na estufa a 37°C, por 16 horas.

Após esse período, iniciou-se a etapa de lavagem para a remoção do excesso de sonda. As lâminas foram retiradas da câmara úmida e transferidas para uma solução de 2xSSC+0,3% de Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) à temperatura ambiente, por 5 minutos, em seguida transferidas para 2xSSC+0,3% de Igepal CA-630 a 73°C, por 2 minutos. As lâminas foram retiradas dessa solução e secas à temperatura ambiente no escuro.

Em seguida aplicaram-se 10 µl do contra-corante Vectashield/DAPI (4'-6'-diamino-2'-phenylindole) (H1000/H1200) na proporção de 3:1 e cobriu-se a amostra com lamínula. A lâmina foi colocada em caixa ao abrigo da luz e mantida na geladeira.

A análise da reação foi feita em um microscópio de fluorescência (Nikon – E600) com filtros dual band exciter (SpectGreen/Red), single band exciter (spect green) e single band exciter (spect red). A análise das amostras consistiu em procurar, nos cortes histológicos das uretras, células marcadas com um sinal verde correspondente ao cromossomo X e um sinal vermelho correspondente ao cromossomo Y, e verificar se houve a incorporação das células masculinas na uretra das ratas.

3.10 Análises quantitativas

3.10.1 Análise da proporção músculo/tecido conectivo

Usando a coloração pelo tricrômio de Masson, as camadas musculares foram quantificadas pela seleção de tonalidades avermelhadas ou alaranjadas, e o tecido conectivo presente nos campos foi quantificado pela seleção de tonalidade azul. Com magnificação de 200 x, no microscópio óptico Nikon Eclipse E 200, sob a mesma intensidade de luz e altura do condensador, foram capturadas as imagens de cinco campos não coincidentes, para cada animal, de cada grupo, utilizando o programa NIS Elements D 3.10 - Nikon.

As imagens foram transferidas para o programa Image Pro Plus 6.0 onde foi criada uma máscara para a análise do tricrômio de Masson, sendo utilizada igualmente em todas as imagens, a fim de se homogeneizarem as devidas seleções e minimizar possíveis vieses de aferição, que poderiam ser decorrentes de seleções diferentes para cada elemento a ser analisado. Com isto, para cada imagem o mesmo tipo de estrutura foi selecionado para a quantificação.

Na área total, foram incluídas as áreas ocupadas pela camada muscular e pelo tecido conectivo, bem como as áreas em branco, presentes na imagem em estudo. Foram excluídas da aquisição as áreas correspondentes aos vasos, à mucosa e à camada submucosa.

Os cálculos das áreas foram realizados através da quantificação em número de pixels, sendo posteriormente obtida a proporção músculo/tecido conectivo de cada uma das imagens. O número de pixels corresponde à área da porção selecionada e sua relação foram expressos em porcentagem [90](#), [91](#).

3.10.2 Análise da proporção de actina e miosina

Usando a imuno-histoquímica para actina e para a miosina, as camadas musculares foram quantificadas pela seleção de tonalidades marrons e acastanhadas. Com magnificação de 200 x, no microscópio óptico Nikon Eclipse E 200, sob a mesma intensidade de luz e altura do condensador, foram capturadas as imagens de cinco campos não coincidentes, para cada animal, de cada grupo, utilizando o programa NIS Elements D 3.10 - Nikon.

As imagens foram transferidas para o programa Image Pro Plus 6.0 onde foi criada uma máscara para a análise da actina e outra para a análise da miosina, sendo utilizadas da mesma maneira que na aquisição da coloração pelo tricrômio de Masson.

Na área total, foram incluídas as totalidades das áreas da imagem em questão, inclusive das áreas em branco, com exceção das áreas correspondentes dos vasos, da mucosa e da camada submucosa.

Os cálculos das áreas foram realizados através da quantificação em número de pixels; então foram obtidas a proporção actina/área total e a proporção de miosina/área total de cada uma das imagens, como realizado na proporção músculo/tecido conectivo.

3.11 Análise morfométrica

A avaliação das mudanças morfométricas da uretra de cada animal, de cada grupo, foi conduzida utilizando-se de métodos morfométricos tradicionais ([92](#), [93](#)) nos cortes corados pela hematoxilina-eosina. O maior e o menor diâmetro da uretra e a espessura média da parede foram medidos diretamente, em milímetros, utilizando o Image J software.

Áreas fracionais da luz, mucosa e camada muscular da uretra foram estimadas, usando o método de contagem de pontos. Para isto, um sistema de pontos foi sobreposto nas fotomicrografias, com magnificação de 200 x, e o número de pontos caindo em cada uma das estruturas foi contado

separadamente. A seguinte fórmula foi usada para estimar a área fracional (Fa) de cada compartimento (luz, mucosa ou camada muscular):

$$Fa \text{ (comp)} = \Sigma pt \text{ comp} / \Sigma \text{ total}$$

em que $\Sigma pt \text{ comp}$ é o número de pontos que caíram no compartimento de interesse (ex. mucosa) e $\Sigma \text{ total}$ é a soma de todos os pontos contados nos três compartimentos (luz, mucosa e camada muscular).

3.12 Análise estatística

Os dados obtidos foram organizados e tabulados em planilhas com auxílio do programa Excel.

As variáveis quantitativas, contínuas ou ordinais foram descritas por suas medidas de tendência central (médias ou medianas) e pelas respectivas medidas de dispersão (desvio-padrão, variação interquartil ou valores mínimo e máximo). As variáveis nominais ou qualitativas foram descritas por seus valores absolutos, percentagens ou proporções.

Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada na avaliação das diferenças entre os grupos. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significativos.

Nas análises, foi utilizado programa estatístico para sistema computacional (GraphPad Prism, versão 5.0.3, GraphPad Software, San Diego-CA- USA).

4 RESULTADOS

4.1 Animais e cirurgias

Dez animais de cada grupo foram submetidos às cirurgias propostas, sem que nenhuma intercorrência tenha ocorrido no momento do procedimento cirúrgico. Um animal do grupo SHAM morreu durante a anestesia da cirurgia simulada, e dois animais do grupo CMDME morreram no pós-operatório precoce da cirurgia de uretrolise.

Nenhum dos outros animais apresentou qualquer intercorrência clínica durante o estudo. Após as cinco semanas do estudo, todos os animais tinham comportamento semelhante e aspecto saudável, sem qualquer diferença entre os grupos. Um total de 27 ratas foram sacrificadas, e suas uretras médias foram analisadas.

4.2 Caracterização das CMDME *in vitro*

As CMDMES foram obtidas conforme o protocolo. Para sua caracterização, as culturas de células foram preparadas, sendo observadas células com morfologia fibroblastoide, confluentes e aderentes ao plástico na segunda passagem (Figura 4).

Através de análise imuno-histoquímica foi confirmada expressão positiva para MyoD, Desmin, PCNA e CD 44 (Figura 5) e utilizando-se a citometria de fluxo, foi observada positividade para CD 34 e CD 105 (Figura 6).

Figura 4 - Fotografia da cultura das CMDMEs. Observar a morfologia fibroblastoide das CMDMEs na segunda passagem (Magnificação 20x).

Figura 5 - Análise Imuno-histoquímica das CMDMEs na segunda passagem. Observe a expressão positiva para CD 44, PCNA, MyoD e Demina. O núcleo está corado em azul (coloração por DAPI). Imunomarcação positiva indicada pela cor verde **A.** CD44(+). **B.** PCNA (+). **C.** Desmina (+). **D.** MyoD (+). (Magnificação 100x).

Figura 6 - Citometria de fluxo das CMDMEs na segunda passagem. Observe expressão positiva de CD105 e CD 34, em azul, sobreposta ao seu respectivo controle negativo em vermelho. **A.** CD105 (+). **B.** CD34(+).

4.4 Análises qualitativas

4.3.1 Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson

Foram realizadas análises histológicas com o uso das colorações de hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson. Achados representativos dos três grupos de animais estão demonstrados na Figura 7.

A histologia normal da porção média da uretra de ratas do grupo SHAM, mostra diferentes camadas do lúmen para a parede vaginal: uma de revestimento epitelial urotelial, a camada muscular da mucosa, duas camadas de músculo liso (uma camada de musculatura longitudinal mais espessa e outra circular mais fina) e outra camada de músculo estriado esquelético

externo. Notam-se, ainda, fibras musculares esqueléticas correspondentes ao assoalho pélvico.

Em comparação com a histologia normal, nota-se deformidade nos contornos da uretra do grupo SF. Neste grupo, observa-se extensa fibrose cicatricial com grande deposição de tecido conectivo entre as fibras da camada muscular da mucosa. As camadas musculares lisas e a camada muscular estriada encontram-se mais afiladas, desorganizadas e fragmentadas, com interposição de tecido conectivo entre suas fibras.

No grupo CMDME, nota-se menor depósito de tecido conectivo entre as fibras da camada muscular da mucosa do que havia sido observado no Grupo SF. As camadas musculares lisas e a camada muscular estriada encontram-se desorganizadas; são mais espessas e entremeadas por menor depósito de tecido conectivo intersticial, em relação aos animais do grupo SF.

Figura 7 - Porção média da uretra de rata em corte transversal de 4 μ m, coloração pelo tricrômio de Masson. Observa-se em D, E e F extensa deposição de tecido conectivo e afilamento das camadas musculares; em G, H e I observa-se diminuição de tecido conectivo e camadas musculares mais espessadas.

4.3.2 Imuno-histoquímica para actina e miosina

Os anticorpos antiactina e antimiosina, marcadores de tecido muscular liso e esquelético, mostram a histologia preservada no grupo SHAM. No grupo SF, nota-se alteração dos contornos habituais da uretra; há desorganização, fragmentação e afilamento das camadas musculares lisas e da camada muscular estriada esquelética. No grupo CMDME, nota-se alteração dos contornos habituais da uretra, e as camadas musculares (lisas e esquelética)

encontram-se desorganizadas e mais espessadas que no grupo SF (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Porção média da uretra de rata em corte transversal de 4 μ m, reação imuno-histoquímica com anticorpo antiactina. Observa-se, em C e D, afilamento das camadas musculares; em E e F, notam-se camadas musculares mais espessadas.

Figura 9 - Porção média da uretra de rata em corte transversal de 4µm, reação imuno-histoquímica com anticorpo antimiosina. Observa-se em C e D, afilamento da camada muscular estriada esquelética; em E e F, nota-se camada muscular esquelética mais espessada.

4.3.3 Hibridização “*IN SITU*” por fluorescência

O intuito da realização da reação de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), utilizando a sonda específica para centrômero Y, foi confirmar a presença de CMDME viáveis obtidas de ratos machos na parede da porção média da uretra de ratas. Verificou-se a presença de células na camada muscular da uretra, no grupo CMDME, demonstrando sua sobrevivência por, pelo

menos, quatro semanas após a injeção. Para controle, a técnica foi realizada também em animais dos grupos SHAM e SF, não ocorrendo detecção do cromossomo Y (Figura 10).

Figura 10 - Porção média da uretra de rata em corte transversal de 4 μ m, reação de FISH demonstrando a presença de células injetadas obtidas de animais machos, onde se detecta em vermelho o centrômero do cromossomo Y. As setas indicam células XY detectadas. Núcleo corado em azul (DAPI). Magnificação 1.000 x.

4.4 Análises quantitativas

4.4.1 Análise da proporção relativa de Músculo/Tecido conectivo

A proporção relativa de músculo/tecido conectivo, nos cortes transversais da porção média da uretra, foi $2,27 \pm 1,15$; $0,51 \pm 0,28$ e $1,62 \pm 0,53$ nos grupos SHAM, SF e CMDME, respectivamente. A proporção músculo/tecido conectivo no grupo SF foi significativamente menor que a do grupo SHAM ($p < 0,0001$). No grupo CMDME, a proporção músculo/tecido conectivo foi significativamente maior que a do grupo SF ($p = 0,0009$) e menor que a do grupo SHAM ($p = 0,001$) (Figura 11).

*= $p < 0,05$.

Figura 11 - Representação gráfica da proporção músculo/tecido conectivo entre os três grupos.

4.4.2 Análise da proporção de actina e miosina

A proporção relativa de actina pela área, na porção média da uretra, foi de $0,27 \pm 0,03$; $0,18 \pm 0,04$ e $0,27 \pm 0,02$ nos grupos SHAM, SF e CMDME, respectivamente. A proporção de actina no grupo SF foi significativamente menor que a do grupo SHAM ($p < 0,0001$) e que a do grupo CMDME ($p < 0,0001$). Não houve diferença significativa na proporção de actina entre os grupos SHAM e CMDME ($p = 0,788$) (Figura 12).

A proporção relativa de miosina pela área, na uretra média, foi de $0,15 \pm 0,03$; $0,07 \pm 0,01$ e $0,14 \pm 0,02$ nos grupos SHAM, SF e CMDME, respectivamente. A proporção de miosina no grupo SF foi significativamente menor que a do grupo SHAM ($p = 0,0005$) e que a do grupo CMDME ($p = 0,0001$). Não houve diferença significativa na proporção de miosina entre os grupos SHAM e CMDME ($p = 0,562$) (Figura 13).

n.s. = não significante; $*=p < 0,05$.

Figura 12 - Representação gráfica da proporção de actina pela área da uretra entre os três grupos.

n.s. = não significante; $*=p < 0,05$.

Figura 13 - Representação gráfica da proporção de miosina pela área da uretra entre os três grupos.

4.5 Análises morfométricas

Não houve diferença significativa entre os grupos SHAM, SF e CMDME na mensuração do diâmetro da uretra (1.81 ± 0.58 , 1.34 ± 0.37 , e 1.53 ± 0.51 , respectivamente; $p= 0.22$) e na da espessura da parede uretral (0.90 ± 0.54 , 0.74 ± 0.33 e 0.74 ± 0.50 , respectivamente; $p= 0.81$) (Figuras 14 e 15).

Em relação às áreas fracionais, não houve diferença entre os grupos SHAM, SF e CMDME nas áreas fracionais da luz uretral (0.19 ± 0.10 , 0.11 ± 0.08 , e 0.19 ± 0.07 , respectivamente; $p= 0.21$), mucosa (0.18 ± 0.08 , 0.20 ± 0.08 , e 0.22 ± 0.13 , respectivamente; $p= 0.80$) e parede muscular (0.62 ± 0.10 , 0.68 ± 0.13 , e 0.58 ± 0.17 , respectivamente; $p= 0.41$) (Figura 16).

n.s = não significante.

Figura 14 - Representação gráfica da mensuração do diâmetro uretral nos três grupos.

n.s = não significante.

Figura 15 - Representação gráfica da mensuração da espessura da parede uretral entre os três grupos.

Figura 16 - Representação gráfica das áreas fracionais da luz, mucosa e camada muscular, nos três grupos.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram examinados os efeitos da injeção periuretral de CMDME em um modelo animal de lesão de esfíncter uretral. Após quatro semanas da injeção, as CMDMEs foram incorporadas na uretra e promoveram recuperação histológica do esfíncter, como verificado nos experimentos realizados.

Várias pesquisas utilizaram terapia celular na IUE. A principal argumentação para sua utilização é que a incontinência urinária ocorre por degeneração da musculatura do esfíncter e/ou do suporte uretral, levando a pressão de fechamento uretral insuficiente e perdas urinárias durante esforço físico ³. Assim, o papel da terapia celular na IUE é substituir, reparar ou melhorar as funções biológicas dos tecidos deficientes, particularmente a musculatura do esfíncter, aumentando a pressão de fechamento uretral ³¹. Estes efeitos ocorrem por as células injetadas restaurarem diretamente os tecidos lesados ou por secretarem fatores e mediadores tais como: imunomoduladores, antiapoptóticos, angiogênicos, antifibróticos, quimioatrativos e proteínas estimuladoras de crescimento ⁹⁴.

Com este enfoque, foi obtida uma população multicelular isolada do tecido muscular esquelético de ratos machos e foi efetuada injeção desta população celular em fêmeas. As CMDMEs foram produzidas em número suficiente e administradas 16 horas após o início do seu preparo (retirada dos músculos da coxa dos ratos), sem necessidade de cultura, minimizando o risco de contaminação microbiana, alterações celulares e erros humanos que podem ocorrer quando a cultura é necessária ⁴⁹.

A população de CMDME foi analisada por imuno-histoquímica e citometria de fluxo e expressou MyoD, Desmina, PCNA, CD105, CD44 e CD34. O MyoD é um fator de transcrição envolvido na diferenciação de células da linhagem miogênica, expresso em células-satélites [95](#); o PCNA é expresso nas células em proliferação, inclusive nas células musculares em proliferação [96](#); a Desmina é expressa em células musculares satélite em proliferação [95,97](#); o CD44 é uma proteína transmembrana, importante nas interações célula-célula, em diversos tipos celulares e na diferenciação e fusão dos mioblastos [98](#); o CD34 é expresso em células-tronco miogênicas [99](#); e o CD 105, expresso em células endoteliais, células mesenquimais e pericitos [100](#). O perfil de expressão das CMDMEs é consistente com uma população de células que incluem células musculares, células-satélite musculares, células perivasculares, células progenitoras musculares e células endoteliais [95,97,99-104](#).

O papel central na regeneração muscular é efetuado por células musculares satélite, que estão localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema das miofibras. Elas são ativadas em resposta a condições patológicas como trauma e doenças degenerativas, para gerar mioblastos que podem agregar-se às miofibras existentes, reparando fibras musculares lesadas, ou fundir-se a outras células musculares satélite para formar novas miofibras [95,99](#). Foi demonstrado que as células-satélite recém-isoladas de músculo adulto contêm uma população que se comporta como células-tronco, exibindo implantação mais eficiente e atividade de autorregeneração muscular [105](#).

Outras células progenitoras no músculo estriado esquelético, as células perivasculares, que incluem os pericitos e as células adventícias, têm

propriedades similares às células-tronco mesenquimais, como a capacidade multipotencial de diferenciação (adipogênica, osteogênica, condrogênica e miogênica)¹⁰³. Os pericitos que margeiam as células endoteliais dos capilares são precursores multipotentes com poderosa capacidade de regeneração, construção de tecido muscular e cicatrização de feridas ^{89,106}. As células progenitoras musculares realizam uma importante função na manutenção da homeostase tecidual e contribuem para o desenvolvimento de novas miofibras e células-satélite ^{89,107}.

Uma população muscular com células heterogêneas propicia um ambiente excelente para a função celular, tendo um papel importante na homeostase tecidual, com colaborações recíprocas entre as células e o hospedeiro, sendo críticas para uma regeneração efetiva ⁸⁹. Supõe-se que os múltiplos tipos celulares que compõem as CMDMEs, contribuíram para a recuperação dos esfíncteres lesados nas ratas.

A maioria dos estudos animais em IUE usou células alogênicas ^{42,45,48,61,62,86}. Estes estudos podem ter sido limitados por alguns problemas, principalmente pela rejeição imunológica do receptor às células do doador ⁶¹. Neste estudo, foram utilizados ratos endogâmicos, que possuem alto grau de consanguinidade, com média de 99% de alelos idênticos ¹⁰⁸⁻¹⁰⁹. O objetivo foi prevenir reações imunológicas à injeção das células. De fato, foi encontrada mínima infiltração linfocitária após quatro semanas da injeção das CMDMEs, o que foi coerente com as expectativas.

Os animais do grupo SF e CMDME foram submetidos à lesão de esfíncter uretral para produzir IUE. Vários modelos animais de IUE têm sido

usados, incluindo lesão direta do esfíncter com eletrocoagulação [42,61](#), injeção de substância miotóxica [40](#), lesão do nervo ciático [62](#), esmagamento de nervo podendo [110](#), insuflação de balão intravaginal [41,111](#), distensão vaginal associada à ovariectomia [112](#) e secção de medula espinal [113](#). Neste trabalho, optou-se por utilizar a uretrolise transabdominal [114](#), para provocar lesão do esfíncter uretral. Este modelo de IUE produz dano uretral significativo, associado com diminuição da resistência uretral de longa duração.

Apesar de não reproduzir as lesões teciduais que naturalmente ocorrem por ocasião do parto, a uretrolise é de fácil execução e reproduz algumas das mudanças observadas na estrutura intrínseca das uretras das mulheres idosas [115](#). Entre elas, diminuição do conteúdo de músculo liso e músculo estriado, e deposição de tecido conectivo [116,117](#). Por estas razões, este modelo tem sido usado para investigar tratamentos intervencionistas em experimentos animais, incluindo a terapia celular [54,117](#). Neste estudo, diminuição significativa na proporção relativa músculo/tecido conectivo foi observada após a uretrolise, o que é consistente com a literatura [114](#).

Nas ratas que receberam injeção de CMDME, a deposição de colágeno nas camadas musculares foi menor do que a observada nos animais que receberam SF, assim como a atrofia de musculatura lisa e estriada. Isto refletiu-se na proporção relativa músculo/tecido conectivo que foi significativamente diminuída no grupo SF, em comparação com o grupo CMDME. Dois outros estudos avaliaram, quantitativamente, o efeito da terapia celular na proporção relativa músculo/tecido conectivo: Xu et al. [48](#) e Lin et al. [49](#) também observaram aumento da proporção relativa músculo/tecido conectivo após injeção de células-tronco derivadas de músculo e células-tronco

derivadas de tecido adiposo, respectivamente.

A imuno-histoquímica confirmou aumento da quantidade de músculo liso e músculo estriado esquelético na uretra após a injeção de CMDME. Silwal Gautam et al. [67](#) também mostraram que a proporção de músculo liso e de músculo estriado esquelético foi significativamente maior do que os controles sem células após a injeção de células-tronco derivadas de adipócitos. Outros autores encontraram aumento somente de músculo liso após a terapia celular [49, 63, 71](#). Em contraposição a estes estudos, Kinebuchi et al. [54](#) observaram somente aumento da quantidade de músculo estriado esquelético após a injeção de células-tronco derivadas de medula óssea.

Um aspecto fundamental a ser considerado em terapia celular é a incorporação e a possível diferenciação das células injetadas. Alguns métodos comumente utilizados com o propósito de rastreamento celular podem levar a conclusões equivocadas. Isto deve-se aos problemas intrinsecamente associados com os marcadores celulares. Alguns deles podem apresentar citotoxicidade ou adsorção por células hospedeiras ou, ainda, ocorrer transferência dos marcadores de células transplantadas para células hospedeiras [120,121](#). No presente estudo, a incorporação das CMDMEs de machos nas uretras das fêmeas foi confirmada pela detecção dos cromossomos Y, por FISH, que é método muito sensível e específico [122](#). Eles estavam presentes na camada muscular e na lâmina própria da uretra, confirmando a incorporação das células injetadas no tecido reparado e sua sobrevivência ou diferenciação para outro tipo celular.

Apesar de altamente específico, o FISH não permite avaliar a diferenciação das células injetadas, que requer a realização de dupla

marcação e verificação de possível diferenciação das células injetadas no tecido hospedeiro. Em outros trabalhos, a diferenciação foi comprovada com técnica que permite dupla marcação, incluindo *Green Fluorescence Protein* (GFP), DAPI e PKH-26, conjuntamente com a imuno-histoquímica com actina, desmina, vimetina e calponina [54,56,57](#).

A ação combinada das estruturas que compõem as várias camadas da uretra, tais como: músculo estriado esquelético, músculo liso, tecido conectivo, plexo vascular submucoso e epitélio de revestimento, gera tensão na parede uretral que viabiliza seu fechamento [4,5](#). Apesar da importância da morfologia uretral, as mudanças morfométricas associadas com a lesão do esfíncter uretral têm sido pobremente estudadas. Watanabe et al. [52](#) verificaram que a luz uretral estava diminuída após injeção de células-tronco derivadas de adipócitos em comparação com as ratas que receberam colágeno. Shi et al. [121](#) injetaram um agente de volume que continha microesferas de seda com células-tronco derivadas de adipócitos e verificaram diminuição da luz uretral maior do que observado no grupo que recebeu microesferas de seda sem as células-tronco.

Neste estudo realizaram-se análises morfométricas usando métodos quantitativos para investigar as mudanças na estrutura uretral após a terapia celular, nas ratas submetidas à uretrolise. Não se observaram diferenças entre os grupos SF, SHAM e CMDME, em relação ao diâmetro uretral, à espessura da parede uretral e nas áreas fracionais da luz, mucosa e parede muscular.

A recuperação funcional do esfíncter uretral é um aspecto fundamental da terapia celular. Tem sido avaliada em grande parte dos estudos experimentais através da análise de pressão de perda ou de perfil pressórico

uretral. Entretanto, estes métodos apresentam limitações. A mensuração do perfil pressórico uretral e da pressão de perda pode envolver a colocação de um cateter na uretra das ratas (que apresenta pequenas dimensões), o que poderia produzir efeito obstrutivo, interferindo na adequada avaliação da incontinência urinária. Quando a pressão de perda é medida através da introdução de um cateter intravesical, poder-se-ia ter resultados falseados pelas contrações involuntárias do detrusor (muitas vezes associadas a perdas) produzidas por sua presença na bexiga. Se for medida indiretamente a pressão de perda através da colocação de um transdutor retal, pode-se ter resultados com viés de subjetividade [114](#). Antes de iniciar este estudo, realizaram-se experimentos de teste em alguns animais, com objetivo de padronizar a medição das pressões de perda. Não se obtiveram resultados fidedignos. Desta forma, optou-se por não incluir estudos funcionais neste projeto.

A quantidade de células injetadas parece ser importante fator para o sucesso da terapia celular [75,122](#). Foram obtidos 5×10^6 de CMDME de um grama de músculo de rato e injetou-se 1×10^6 CMDME em cada animal. Esta quantidade de células é equivalente à maioria dos estudos similares que utilizaram técnicas mais complexas com expansão e modificação de células, exigindo, em muitos deles, semanas de preparo [54,55](#). Estudos clínicos utilizaram de 1×10^7 a 4×10^8 células para cada paciente. Carr et al. [75](#) estudaram o efeito de diferentes concentrações de CTDM e sugeriram que a concentração de $3,2 \times 10^7$ é necessária para obter-se melhora clínica de mulheres com IUE. Se fossem extrapolados estes números para a população celular de CMDMEs, seria viável a sua utilização em seres humanos, pois cinco gramas de músculo esquelético seriam suficientes para obter-se o número de

CMDMEs necessárias para o tratamento de cada paciente.

Outro aspecto a ser considerado refere-se ao custo da produção e da utilização destas células em humanos. O custo da terapia celular é de difícil estimativa, pois não são produzidas em larga escala e comercialmente até o presente momento. Na opinião de Blaganji ⁸⁵, foi estimado o custo de uma terapia celular em 5,000 Euros. Nesta estimativa, está incluído o custo do isolamento e de expansão das células por 03 semanas. Este custo é maior que outros procedimentos utilizados rotineiramente para correção de incontinência urinária. No Reino Unido, uma cirurgia de colpossuspensão tem custo estimado de £1,396, e uma cirurgia de Sling suprapúbico tem custo estimado de £1,135 ¹²⁴. Os altos custos da terapia celular, neste cenário, poderiam limitar seu uso. Acredita-se que, para a produção da dose para tratamento em humanos utilizando as CMDMEs, o custo médio atual seria de R\$ 1.800,00 (não incluídos os custos hospitalares) e poderia representar uma alternativa viável.

As CMDMEs parecem conferir um efeito protetor ou reparador do esfíncter uretral, num modelo agudo de lesão promovido pela uretrolise. Verificou-se que houve incorporação das células e recuperação da musculatura uretral. Novos estudos serão necessários para avaliar as mudanças funcionais após a injeção de CMDME e o mecanismo pelo qual as CMDMEs produzem seu efeito reparador no esfíncter uretral. Também, será interessante avaliar se este efeito é dose dependente bem como sua durabilidade. Outro aspecto a ser abordado é se a reinjeção de células acrescenta melhora adicional à função esfincteriana.

Acredita-se que as CMDMEs, por serem autólogas e não necessitarem de cultura, poderão ser utilizadas brevemente em seres humanos, dentro de um protocolo de pesquisa supervisionado rigorosamente por comissão de ética. Por serem constituídas por diferentes tipos celulares, parecem representar uma população capacitada para o reparo de tecidos lesados por sua multiplicidade de efeitos reparatórios. Pode-se especular, ainda, que possam ser utilizadas no tratamento de outros problemas urológicos ou mesmo não urológicos nos quais o preparo ou a regeneração muscular são importantes. Exemplos na urologia incluem a incontinência urinária masculina após prostatectomia radical, problemas de contratilidade da bexiga e disfunção erétil.

6 CONCLUSÕES

Baseando-se nos achados obtidos, pode-se concluir:

- 1- Através de hibridização *in situ* por fluorescência, confirmou-se a incorporação das células mononucleares derivadas de músculo estriado esquelético na musculatura do esfíncter urinário das ratas.
 - 2- A terapia com células mononucleares derivadas de músculo estriado esquelético teve efeito reparador no esfíncter urinário de ratas submetidas a uretrolise, reduzindo a deposição de tecido conectivo e promovendo a recuperação das camadas musculares.
-

7 ANEXOS

7.1 Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da USP

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **09/11/2011**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **376/11** intitulado: **“TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS MONONUCLEARES DERIVADAS DE MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO NA DEFICIÊNCIA ESFINCTERIANA EM MODELO ANIMAL DE INCONTINÊNCIA URINÁRIA ”** que utilizará **15** animais da espécie **Rattus rattus**, apresentado pelo **Departamento de CIRURGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Cristiano Mendes Gomes

Pesquisador (a) Executante: Marcelo Pitelli Turco

CEP-FMUSP, 09 de Novembro de 2011.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador interino
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep_fmusp@hcnet.usp.br

7.2 Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Terapia celular com células mononucleares derivadas de músculo estriado esquelético na deficiência esfinteriana em modelo animal de incontinência urinária", protocolado sob o nº 2201/2011, utilizando 20 (vinte) ratos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Cellular therapy with mononuclear cell skeletal muscle derived in sphincter deficiency in the animal model of urinary incontinence", protocol number 2201/2011, utilizing 20 (twenty) rats, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 30 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
Reitor: Dr. Roberto de Almeida

7.3 Apresentação no Till & McCulloch Meetings, Ontário, Canadá, 2014

The 2014 Till & McCulloch Meetings October 27-29, 2014

that are not available in North America. These interventions often have limited (if any) data of preclinical and clinical safety or efficacy, and yet, are often marketed as bona fide treatments. Patients often receive conflicting information regarding stem cell interventions from sources such as their clinicians, their family and the media. Our study aims to investigate how patients situate their trust when deciding whether or not to pursue these interventions. We conducted semi-structured interviews with individuals with SCI and physicians who provide care for them, exploring perspectives about the patient-physician trust relationship specifically. Interviews were transcribed verbatim and analyzed using a grounded theoretical approach. Preliminary analysis reveals that both patients (n=6) and physicians (n=7) express a range of perspectives on how discussions about stem cell interventions can affect trust in the patient-physician dyad. To date, the expectations of patients and their dispositions to risk, alongside the burden on physicians of bearing bad or conflicting news, and the difficulty of staying informed against the volume and scattered nature of stem cell information, are factors that affect the discourse. We hope to use our results to provide better tools for trusted communication between physicians and patients about the rapid evolution of biotechnology and for their interactions about stem cells.

30

INTRAURETHRAL MUSCLE-DERIVED MONONUCLEAR CELL INJECTION IMPROVES URETHRAL SPHINCTER RECOVERY IN A RAT MODEL OF URINARY INCONTINENCE

C. Gomes, M. Turco, J. Bessa Jr, M. Brolio, M. Rodrigues, A. Souza, K. Leite, H. Bruschini, M. Miglino, M. Srougi; University of Sao Paulo School of Medicine, Sao Paulo, BRAZIL.

INTRODUCTION: We investigated the effect of intraurethral injection of skeletal muscle-derived mononuclear cells (SMDMC) in the urethral sphincter in an animal model of stress urinary incontinence. **METHODS:** SMDMC were isolated from the femoral muscle of male Wistar rats. Urinary sphincter deficiency was created in 24 adult female rats by surgical urethrolisis. The rats were then treated with intraurethral sphincter injections of 10^6 SMDMC (Cells group; n= 12) or saline injections (Saline group; n= 12). Four weeks later, the rats were euthanized and their urethras harvested. Fluorescence in situ hybridization was used to confirm the presence of SMDMC in the urethra. Morphological and morphometric analysis were performed by Picrosirius staining. Specimens were analysed histologically and immunohistochemically for collagen, smooth muscle and striated muscle markers. **RESULTS:** Urethrolisis produced marked urethral disruption characterized by loss of its circular cross-section with increased urethral thickness. A major decrease in the ratio of muscle to connective tissue was observed in the Saline group in comparison to the Cells group as well as the Sham group (0.54 ± 0.34 vs 1.52 ± 0.60 vs 2.41 ± 1.60 , respectively; $p < 0.001$). Similarly, a greater decrease in the urethral area occupied by muscle was observed in the Saline group in comparison to the Cells group and the Sham group (0.19 ± 0.04 vs 0.27 ± 0.03 vs 0.27 ± 0.04 , respectively; $p < 0.001$). **CONCLUSIONS:** SMDMC incorporated into the injured urethral sphincter resulted in less morphological disruption and increased muscle content.

31

EFFECTS OF PREGNANCY ON TRANSPLANTED PANCREATIC BETA CELL PROGENITORS DERIVED FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS

C. Drohan¹, J. Bruin¹, N. Saber¹, S. O'Dwyer¹, A. Rezanian², T. Kieffer¹; ¹Department of Cellular and Physiological Sciences, University of British Columbia, Vancouver, BC, CANADA, ²BetaLogics Venture, Janssen R & D LLC, Raritan, NJ.

Islet transplantation is an effective therapy for type 1 diabetes. However, the scarcity of cadaveric islets necessitates investigation of alternative cell sources. We are studying the differentiation of human embryonic stem cells (hESCs) into insulin-secreting beta cells. Prolactin, placental lactogen, and recently, serotonin, have been shown to regulate a transient expansion in beta cell mass during pregnancy to compensate for increased metabolic demands. Therefore, we hypothesized that the pregnancy environment may also affect the growth and maturation of hESC-derived pancreatic progenitor cells into insulin-secreting cells *in vivo*. hESCs were differentiated into pancreatic progenitor cells using our previously published 14-day protocol and then transplanted beneath the kidney capsule of male (n=6) and female (n=30) immunodeficient mice. After 1 month, female transplant recipients (n=9) and control mice (without cell transplants, n=8) were housed with breeder males and 100% were successfully impregnated. The presence of a cell transplant did not affect pregnancy outcomes, such as weight gain or litter size. Between 12-15 days of gestation, kidney grafts and pancreas tissue were collected from pregnant and non-pregnant mice for assessing beta

cell proliferation. At 18 weeks post-transplant (7 weeks post-weaning), human C-peptide secretion in recipients of the hESC-derived cells was glucose-regulated in female mice that had experienced pregnancy, but not in the female or male control mice. This suggests that the pregnancy environment may promote progenitor cell differentiation into mature insulin-secreting cells. The effects of pregnancy on graft cell proliferation, differentiation and long-term function are presently being examined.

32

A REGULATORY NETWORK CONTROLS NEPHROCAN EXPRESSION AND MIDGUT PATTERNING

W. Wei¹, J. Hou¹, R. Saund², P. Xiang³, T. Cunningham³, Y. Yi¹, D. Lu¹, J. Savory⁴, N. Krentz¹, R. Montpetit¹, R. Cullum¹, N. Hofs¹, D. Lohnes¹, K. Humphries^{1,5}, G. Duester², Y. Saijoh², P. Hoodless^{1,6}; ¹BC Cancer Agency, Vancouver, BC, CANADA, ²Dept of Neurobiology and Anatomy, University of Utah, Salt Lake, UT, ³Development, Aging and Regeneration Program, Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, CA, ⁴Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Ottawa, ON, CANADA, ⁵Experimental Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC, CANADA, ⁶Dept of Medical Genetics, University of British Columbia, Vancouver, BC, CANADA.

While many regulatory networks involved in defining definitive endoderm have been identified, the mechanisms through which these networks interact to pattern the endoderm are less well understood. To explore the mechanisms involved in midgut patterning, we dissected the transcriptional regulatory elements of Nephrocan (Nepn), the earliest known midgut specific gene in mice. We observed that Nepn expression is dramatically reduced in Sox17-/- and Raldh2-/- embryos compared to wild-type embryos. We further show that Nepn is directly regulated by Sox17 and the retinoic acid receptor via two enhancer elements located upstream of the gene. Moreover, Nepn expression is modulated by Activin signaling with high levels inhibiting and low levels enhancing RA-dependent expression. In FoxH1-/- embryos in which Nodal signaling is reduced, the Nepn expression domain is expanded into the anterior gut region suggesting that Nodal signaling can modulate expression *in vivo*. Together, Sox17 is required for Nepn expression in the definitive endoderm, while retinoic acid signaling restricts expression to the midgut region. A balance of Nodal/Activin signaling regulates the anterior boundary of the midgut expression domain.

33

CELL FATE DECISIONS AFTER DEDIFFERENTIATION OF ADULT BETA-CELLS BY INSULIN GENE KNOCKOUT

M. Szabat¹, M. Page¹, Y. Fan², M. Trucco², J. Johnson¹; ¹University of British Columbia, Vancouver, BC, CANADA, ²Children's Hospital of Pittsburgh, Pittsburgh, PA.

Pancreatic beta-cell dedifferentiation, including the loss of key regulatory gene networks, and loss of insulin production/storage, has been implicated in type 1 and type 2 diabetes. Mouse models of toxin-induced beta-cell destruction exhibit apparent beta-cell regeneration via beta-cell proliferation or trans-differentiation of other cell types (such as alpha cells) leading to reversal of diabetes. Our aim was to define cell-autonomous and non-cell-autonomous roles of insulin in controlling beta-cell fate, including differentiation/dedifferentiation, trans-differentiation, proliferation and apoptosis. We developed a tamoxifen inducible, beta-cell-specific insulin gene knockout model containing four engineered alleles (Pdx1-CreERT:mTmG+/-;Ins1-/-;Ins2f/f). Insulin gene deletion in beta-cells caused a significant loss in plasma insulin levels leading to severe fasting hyperglycemia within 14 ± 4 days. A significant loss of insulin-positive beta-cells was evident in islets of diabetic versus non-diabetic mice. Gross immunohistochemical analysis of pancreatic sections did not reveal obvious signs of widespread trans-differentiation. Preliminary data showed an increase in beta-cell proliferation in tamoxifen-treated Pdx1-CreERT+ animals within 6 days after tamoxifen treatment. This study sheds light onto the fate of individual beta-cells when they, or their neighbours, lose their ability to express insulin. It is the first model where the acute cell fate decisions of pancreatic islet cells can be assessed, in a model that does not involve massive induced cell killing. These results increase our understanding of the role of insulin in the maintenance of adult beta-cell differentiation and maturity, and its possible contribution to beta-cell death and dedifferentiation in diabetes.

7.4 Apresentação na Society of Urodynamics, Female Pelvic Medicine & Urogenital Reconstruction (SUFU), Scottsdale, EUA, 2015.

Society of Urodynamics, Female Pelvic Medicine
& Urogenital Reconstruction
2015 Winter Meeting
February 24–28, 2015
JW Marriott Camelback Inn Resort & Spa
Scottsdale, Arizona

characteristics of PFM and bladder detrusor muscle (BDM) in the setting of in-vitro ischemia and reperfusion.

Methods: Twelve female adult virgin rabbits were divided into three groups: control, ovariectomized (OVX) and OVX with estradiol (E) replacement. At 4 weeks animals were euthanized. BDM, pubococcygeous (PC) and coccygeous (CC) were isolated into 150mg strips. Strips were equilibrated in oxygenated Tyrodes and then stimulated under ischemic conditions at 32 Hz every 5 minutes for 1 hour in nitrogenated Tyrodes without glucose. Strips were then incubated in oxygenated Tyrodes for 2 hours and stimulated at 2, 8 and 32 Hz. Biochemical analyses were performed for nitrotyrosine, carbonylation and malondialdehyde as markers of oxidative stress.

Results: Bladder weight was significantly decreased after OVX and restored above control values after E replacement. PFM required 10 times the power to stimulate contractions at baseline. Both maximal contractile response and rate of tension generation were significantly greater for the BDM than either PC or CC and all showed diminished strength after OVX. The PC and CC were both significantly less sensitive to the effects of ischemia and continued to have stable but reduced contractile responses to field stimulation during the entire hour of ischemia. There was a progressive decline of BDM contractile strength, with completely diminished response after 1 hour of ischemia. E replacement improved the ischemic contractile response after prolonged hypoxia. Following the ischemic period, PFM contractile recovery was significantly superior to BDM and markers of oxidative stress were consistent with the improvement and recovery of contractile performance.

Conclusion: PFM contractions and recovery were significantly slower than BDM, yet not as sensitive to either in-vitro ischemia or the effects of post-ischemia reperfusion. Replacement of E after OVX reduced the oxidative stress on tissue and was protective to the effects of hypoxia on pelvic floor and bladder contractile function.

Funding: Capital Region Medical Research Foundation & Stratton VA Research and Development Office

Clinical Relevance: Female Urology - including Incontinence

Poster #BS6

THE VAGINAL DISTENTION MODEL OF STIMULATED BIRTH TRAUMA DOES NOT PRODUCE INCONTINENCE IN MICE

Alex Galante, BA, Ramzi El Hassan, MS, Michael Kavran, MS, Stephen Ganocy, PhD, Adonis Hijaz, MD
Urology Institute, University Hospitals Case Medical Center, School of Medicine, Cleveland, OH
(Presented by: Alex Galante, BA)

Introduction: Various animal models have been created in an attempt to reproduce the trauma of childbirth in order to study its physiological consequences. A small animal model using vaginal distention (VD) to simulate birth trauma has been used to study stress urinary incontinence (SUI) in mice. The objective of this study was to test whether the VD method produces incontinence in mice as previously described.

Methods: Aged Mice: A total of 190 12-week-old C57BL/6 mice were randomized into either VD or sham groups. VD mice underwent 0.3mL balloon VD for one hour. Sham mice underwent placement of an uninflated six-French foley catheter for one-hour. All the 12-week mice were divided into five subgroups containing 19 mice each to determine the timing of LPP measurement after VD (0, 4, 10, 20, or 40 days). An additional 190 40-week-old mice were similarly randomized. A separate cohort of 20 mice were set aside and served as age-matched controls. Super VD: A total of eight mice underwent VD with a balloon catheter filled with 0.5 ml of water for three

hours. Four days later, LPP was measured. Hegar VD: 16 mice underwent VD with 6 mm or 7 mm Hegar dilators for one hour. Four days later, LPP was measured.

Results: In 40 week-old mice, incontinence was produced at 0 days in both VD and sham groups as demonstrated by a significantly decreased LPP compared with age-matched, non-instrumented control mice. The VD group had significantly lower LPP values than sham on day 0 ($p = .0026$) but not during any other time point thereafter. Mice demonstrated recovery of LPP values to control values in VD and sham groups by four days, which persisted at 10, 20, and 40 days after instrumentation. In 12 week-old mice LPP achieved a nadir at day 0 for sham and VD groups which was significantly lower than controls. This nadir was followed by return to control levels by day four, continuing to day 40 post-instrumentation. An ANOVA analysis did not reveal any significant differences in LPP values among the Super VD, Hegar VD, VD, Sham VD, and control groups at 4 days after instrumentation.

Conclusion: The VD model does not produce SUI in mice.

Funding: University Hospitals of Cleveland Family Medicine Fund Award# P0089

Clinical Relevance: Female Urology - including Incontinence

Poster #BS7

PERIURETHRAL MUSCLE-DERIVED MONONUCLEAR CELL INJECTION IMPROVES MORPHOLOGICAL RECOVERY OF THE URETHRAL SPHINCTER IN A RAT MODEL OF URINARY INCONTINENCE

Marcelo Turco, MD¹, Cristiano Gomes, PhD¹, Jose Bessa, PhD¹, Marina Brolio, PhD¹, Marcio Rodrigues, PhD¹, Alex Souza, PhD², Katia Leite, PhD², Ricardo Nunes, PhD¹, Homero Bruschini, PhD¹, Maria Angelica Miglino, PhD¹ and Miguel Srougi, PhD¹

¹University of Sao Paulo School of Medicine, Sao Paulo, Brazil;

²Universidade Veiga de Almeida, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

(Presented by: Cristiano Gomes, PhD)

Introduction: We investigated the effect of periurethral injection of skeletal muscle-derived mononuclear cells (SMDMC) in the urethral sphincter in an animal model of stress urinary incontinence.

Methods: SMDMC were isolated from the gastrocnemius muscle of male WKY rats. The muscle underwent enzymatic dissociation followed by isolation of mononuclear cells with no need for culture and/or expansion. Urinary sphincter deficiency was created by surgical urethrolisis in 20 female Wistar-Kyoto isogenic (WKY) rats. One week after that a periurethral injection of 106 SMDMC was performed in 10 rats (Cells group) and 10 rats received saline injections (Saline group). Ten sham-operated animals served as controls (Sham group). Four weeks after the injection, the rats were euthanized and their urethras harvested. The incorporation of male SMDMC in the female urethra was confirmed by the detection of Y chromosomes by fluorescence in situ hybridization. Hematoxylin-eosin and morphological and morphometric analysis were performed using Masson's trichrome. We calculated the muscle to collagen rate in each urethral sample and the proportions were compared between groups.

Results: Urethrolisis produced marked urethral disruption characterized by loss of its circular cross-section and increased urethral thickness (Figure 1). The muscle layers were markedly disorganized and displayed increased collagen deposit (Figure 2). A major decrease in the ratio of muscle to connective tissue was observed in the Saline group in comparison to the Cells group as well as the Sham group (0.54 ± 0.34 vs 1.52 ± 0.60 vs 2.41 ± 1.60 , respectively; $p < 0.001$). Similarly, a greater

S6 Abstract

decrease in the urethral area occupied by muscle was observed in the Saline group in comparison to the Cells group and the Sham group (0.19 ± 0.04 vs 0.27 ± 0.03 vs 0.27 ± 0.04 , respectively; $p < 0.001$).

Conclusion: SMDMC incorporated into the injured urethral sphincter resulted in less morphological disruption and increased muscle content in a rat model of urinary incontinence. The SMDMC are easily obtained, needing no cell expansion and shorter preparation time.

Funding: Research Grant from FAPESP (# 2011/51868-5)

Clinical Relevance: Female Urology - including Incontinence

Poster #BS8**CHRONIC IRRITATION OF THE BLADDER LEADS TO CHANGES IN THE SYMPATHETIC REFLEX**

Jang-Hwan Kim, MD¹, Sanghyun Jee, MD¹, Sangwoon Kim, MD¹, Jiyu Kim, MS¹, Sooyoung Moon, MS¹ and Jaeyoeb Hong, MD²

¹Department of Urology, Urological Science Institute, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea; ²Department of Urology, CHA medical school, Korea
(Presented by: Jang-Hwan Kim, MD)

Introduction: There is increasing evidence that the sympathetic system is involved in chronic pain conditions. Recent study has shown that sympathetic over activity is seen in interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS) patients and that bladder sympathetic fibers and urine noradrenaline levels are increased in an animal model of inflamed bladder using lipopolysaccharide (LPS) bladder instillation. Changes in blood pressure (BP) and heart rate during hydrodistention (HD) of IC/BPS patients is probably due to a sudden increase in sympathetic output. We investigated the changes in blood pressure during HD of rats instilled with LPS into the bladder. This study was funded by Handok Pharmaceuticals (Seoul, Korea).

Methods: Sprague-Dawley female rats (200–250 g) were divided into two groups (short term $n = 6$; long term $n = 8$). The short term group received protamine sulfate (PS) 10 mg/ml in the urinary bladder for 30 minutes followed by 2 mg/ml LPS instillation for 45 minutes. HD (intravesical pressure of 140–150 mmHg) was performed for 1 minute per each session (total 3 sessions) and BP measured from the carotid artery. The long term group received PS and 750ug/ml LPS instillation once a week for 5 weeks. One week after the last instillation, BP measurement during HD of rats was performed.

Results: BP did not change during HD in the short term group (Δ MBP 17.722 ± 21.215 mmHg, $p = 0.0961$). However, BP significantly increased during HD in the long term group (Δ MBP 34.280 ± 9.870 mmHg, $p = 0.002$).

Conclusion: We observed a significant increase in BP during HD of rats instilled with LPS. Although previous study has shown an increased bladder sympathetic fiber density after a single LPS bladder instillation, increased BP, a possible manifestation of that change was observed only in the long term group. It seems chronic irritation of the bladder leads to changes in the sympathetic reflex.

Clinical Relevance: IC and Pelvic Pain - UTI / Inflammatory

Fig 1. Change in blood pressure during hydrodistention (HD). A) Short term, B) Long term

Poster #BS9**WIRELESS URODYNAMIC DEVICE DEMONSTRATES SUBMUCOSAL SENSOR IS COMPARABLE TO URODYNAMIC CATHETER**

CR Powell, MD¹, Albert Kim, MS², Mouhamad Alloosh, PhD³, Michael Sturek, PhD³ and Babak Ziaie, PhD²

¹Indiana University, Indianapolis, IN; ²Purdue University School of Electrical and Computer Engineering; ³Indiana University Department of Cellular and Integrative Physiology
(Presented by: CR Powell, MD)

Introduction: Conventional urodynamic measurement is not suitable for long-term bladder pressure sensing because it requires trans-urethral catheters that are exposed to urine. It is hypothesized that a sub-mucosal sensor would sense changes in pressure as accurately as a trans-urethral, intra-luminal catheter.

Methods: Female Ossabaw minipigs were implanted with a novel wireless bladder pressure sensor developed collaboratively between the Purdue University School of Electrical and Computer Engineering, the Indiana University Department of Urology, and Department of Cellular and Integrative Physiology. Called the UPLink, this device can be implanted beneath the bladder mucosa and will broadcast data wirelessly to a nearby receiver. Urodynamic studies were completed in anesthetized animals using a Laborie Delphis machine (Laborie, Toronto, Canada) using gas-charged T-Doc catheters for comparison.

Results: The device was implanted in five animals. Intra-class correlation coefficients (ICCs) were calculated for concurrent measurement analysis of bladder pressure resulting in calculated ICCs of 0.979, Figure 1, indicating a strong validity (R^2 of 0.946). After zeroing to atmosphere, urodynamic bladder measurement demonstrated mean pressures of 9.0 ± 3.5 cm H₂O (95% CI) with empty bladder and 53.2 ± 21.8 cmH₂O with a full bladder. Mean capacity was $1,328.6 \pm 125.2$ ml. No devices were noted to perforate bladder mucosa at the conclusion of the trial. Urinary incontinence was noted in one animal at capacity.

Conclusion: Sub mucosal bladder pressure monitoring is strongly correlated with reference measurements, demonstrating that a sensor implanted within the wall of the bladder can accurately represent the intraluminal bladder pressure without contacting urine directly.

This project was supported by A Project Development Team within the ICTSI NIH/NCRR Grant Number RR025761 and NIDDK DiaComp Pilot & Feasibility project, 13GHSU260

Clinical Relevance: Urodynamics

8 REFERÊNCIAS

-
1. Irwin DE, Kopp ZS, Agatep B, Milsom I, Abrams P. Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction. *BJU Int*. 2011;108(7):1132-8.
 2. Haylen BT, de Ridder D, Freeman RM, Swift SE, Berghmans B, Lee J, Lee J, Monga A, Petri E, Rizk DE, Sand PK, Schaer GN; International Urogynecological Association; International Continence Society. An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction. *Neurourol Urodyn*. 2010;29(1):4-20.
 3. Deng DY. Urinary incontinence in women. *Med Clin North Am*. 2011;95(1):101-9.
 4. Delancey JO. Why do women have stress urinary incontinence? *Neurourol Urodyn*. 2010;29 Suppl 1:S13-7.
 5. Rud T, Andersson KE, Asmussen M, Hunting A, Ulmsten U. Factors maintaining the intraurethral pressure in women. *Invest Urol*. 1980;17(4):343-7.
 6. Hay-Smith J, Herderschee R, Dumoulin C, Herbison P. Comparisons of approaches to pelvic floor muscle training for urinary incontinence in women: an abridged Cochrane systematic review. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2012;48(4):689-705.
 7. Robinson D, Tooze-Hobson P, Cardozo L, Digesu A. Correlating structure and function: three-dimensional ultrasound of the urethral sphincter. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2004;23(3):272-6.
 8. McLean L, Varette K, Gentilcore-Saulnier E, Harvey MA, Baker K, Sauerbrei E. Pelvic floor muscle training in women with stress urinary incontinence causes hypertrophy of the urethral sphincters and reduces
-

-
- bladder neck mobility during coughing. *Neurourol Urodyn*. 2013;32(8):1096-102.
9. Norton P, Brubaker L. Urinary incontinence in women. *Lancet*. 2006;367(9504):57-67.
 10. Hale DS, Benson JT, Brubaker L, Heidkamp MC, Russell B. Histologic analysis of needle biopsy of urethral sphincter from women with normal and stress incontinence with comparison of electromyographic findings. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180(2 Pt 1):342-8.
 11. Dimpfl T, Jaeger C, Mueller-Felber W, Anthuber C, Hirsch A, Brandmaier R, et al. Myogenic changes of the levator ani muscle in premenopausal women: the impact of vaginal delivery and age. *Neurourol Urodyn*. 1998;17(3):197-205.
 12. Smith AR, Hosker GL, Warrell DW. The role of partial denervation of the pelvic floor in the aetiology of genitourinary prolapse and stress incontinence of urine. A neurophysiological study. *Br J Obstet Gynaecol*. 1989;96(1):24-8.
 13. Dmochowski RR, Miklos JR, Norton PA, Zinner NR, Yalcin I, Bump RC, et al. Duloxetine versus placebo for the treatment of North American women with stress urinary incontinence. *J Urol*. 2003;170(4 Pt 1):1259-63.
 14. Ghoniem GM, Van Leeuwen JS, Elser DM, Freeman RM, Zhao YD, Yalcin I, et al. A randomized controlled trial of duloxetine alone, pelvic floor muscle training alone, combined treatment and no active treatment in women with stress urinary incontinence. *J Urol*. 2005;173(5):1647-53.
 15. Lucas MG, Bosch RJ, Burkhard FC, Cruz F, Madden TB, Nambiar AK, Neisius A, de Ridder DJ, Tubaro A, Turner WH, Pickard RS; Asociación Europea de Urología. Guía clínica de la Asociación Europea de Urología sobre la evaluación y el tratamiento no quirúrgico de la incontinencia urinaria. *Actas Urol Esp*. 2013;37(4):199-213.
-

-
16. Syan R, Brucker BM. Guideline of guidelines: urinary incontinence. *BJU Int.* 2016;117(1):20-33.
 17. Abrams P CL, Khoury S, Wein A. Incontinence: 5th International Consultation on Incontinence Paris, France: ICUD-EUA2012
 18. Price N, Dawood R, Jackson SR. Pelvic floor exercise for urinary incontinence: a systematic literature review. *Maturitas.* 2010;67(4):309-15.
 19. KEGEL AH. Progressive resistance exercise in the functional restoration of the perineal muscles. *Am J Obstet Gynecol.* 1948;56(2):238-48.
 20. Blaivas JG, Purohit RS, Benedon MS, Mekel G, Stern M, Billah M, et al. Safety considerations for synthetic sling surgery. *Nat Rev Urol.* 2015;12(9):481-509.
 21. Kerr LA. Bulking agents in the treatment of stress urinary incontinence: history, outcomes, patient populations, and reimbursement profile. *Rev Urol.* 2005;7(Suppl 1):S3-11.
 22. Reynolds WS, Dmochowski RR. Urethral bulking: a urology perspective. *Urol Clin North Am.* 2012;39(3):279-87.
 23. Zoorob D, Karram M. Bulking agents: a urogynecology perspective. *Urol Clin North Am.* 2012;39(3):273-7.
 24. Burch JC. Cooper's ligament urethrovesical suspension for stress incontinence. Nine years' experience: results, complications, techniques. 1968. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(2):512, discussion 513.
 25. Bergman A, Elia G. Three surgical procedures for genuine stress incontinence: five-year follow-up of a prospective randomized study. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173(1):66-71.
-

-
26. Alcalay M, Monga A, Stanton SL. Burch colposuspension: a 10-20 year follow up. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995;102(9):740-5.
 27. Dean N, Herbison P, Ellis G, Wilson D. Laparoscopic colposuspension and tension-free vaginal tape: a systematic review. *BJOG.* 2006;113(12):1345-53.
 28. Chung E, Tse V, Chan L. Mid-urethral synthetic slings in the treatment of urodynamic female stress urinary incontinence without concomitant pelvic prolapse repair: 4-year health-related quality of life outcomes. *BJU Int.* 2010;105(4):514-7.
 29. Daneshgari F, Kong W, Swartz M. Complications of mid urethral slings: important outcomes for future clinical trials. *J Urol.* 2008;180(5):1890-7.
 30. Novara G, Artibani W. Stem cell therapy in the treatment of stress urinary incontinence: a significant step in the right direction? *Eur Urol.* 2008;53(1):30-2.
 31. Bhatia NN, Ho MH. Stem cell therapy for urinary incontinence and pelvic floor disorders: a novel approach. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2004;16(5):397-8.
 32. Smaldone MC, Chancellor MB. Muscle derived stem cell therapy for stress urinary incontinence. *World J Urol.* 2008;26(4):327-32.
 33. Becker C, Jakse G. Stem cells for regeneration of urological structures. *Eur Urol.* 2007;51(5):1217-28.
 34. Morgan DM, Umek W, Guire K, Morgan HK, Garabrant A, DeLancey JO. Urethral sphincter morphology and function with and without stress incontinence. *J Urol.* 2009;182(1):203-9.
 35. Lin CS. Advances in stem cell therapy for the lower urinary tract. *World J Stem Cells.* 2010;2(1):1-4.
-

-
36. Lin CS. Stem cell therapy for the bladder--where do we stand? *J Urol*. 2011;185(3):779-80.
 37. Lin CS, Lue TF. Stem cells in urology: how far have we come? *Nat Clin Pract Urol*. 2008;5(10):521.
 38. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):11-5.
 39. Chancellor MB, Yokoyama T, Tirney S, Mattes CE, Ozawa H, Yoshimura N, et al. Preliminary results of myoblast injection into the urethra and bladder wall: a possible method for the treatment of stress urinary incontinence and impaired detrusor contractility. *Neurourol Urodyn*. 2000;19(3):279-87.
 40. Yiou R, Dreyfus P, Chopin DK, Abbou CC, Lefaucheur JP. Muscle precursor cell autografting in a murine model of urethral sphincter injury. *BJU Int*. 2002;89(3):298-302.
 41. Cannon TW, Wojcik EM, Ferguson CL, Saraga S, Thomas C, Damaser MS. Effects of vaginal distension on urethral anatomy and function. *BJU Int*. 2002;90(4):403-7.
 42. Chermansky CJ, Tarin T, Kwon DD, Jankowski RJ, Cannon TW, de Groat WC, et al. Intraurethral muscle-derived cell injections increase leak point pressure in a rat model of intrinsic sphincter deficiency. *Urology*. 2004;63(4):780-5.
 43. Lee JY, Paik SY, Yuk SH, Lee JH, Ghil SH, Lee SS. Long term effects of muscle-derived stem cells on leak point pressure and closing pressure in rats with transected pudendal nerves. *Mol Cells*. 2004;18(3):309-13.
 44. Yiou R, Yoo JJ, Atala A. Failure of differentiation into mature myotubes by muscle precursor cells with the side-population phenotype after
-

-
- injection into irreversibly damaged striated urethral sphincter. *Transplantation*. 2005;80(1):131-3.
45. Kwon D, Kim Y, Pruchnic R, Jankowski R, Usiene I, de Miguel F, et al. Periurethral cellular injection: comparison of muscle-derived progenitor cells and fibroblasts with regard to efficacy and tissue contractility in an animal model of stress urinary incontinence. *Urology*. 2006;68(2):449-54.
46. Kim YT, Kim DK, Jankowski RJ, Pruchnic R, Usiene I, de Miguel F, et al. Human muscle-derived cell injection in a rat model of stress urinary incontinence. *Muscle Nerve*. 2007;36(3):391-3.
47. Furuta A, Jankowski RJ, Pruchnic R, Egawa S, Yoshimura N, Chancellor MB. Physiological effects of human muscle-derived stem cell implantation on urethral smooth muscle function. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2008;19(9):1229-34.
48. Xu Y, Song YF, Lin ZX. Transplantation of muscle-derived stem cells plus biodegradable fibrin glue restores the urethral sphincter in a pudendal nerve-transected rat model. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(11):1076-83.
49. Lin G, Wang G, Banie L, Ning H, Shindel AW, Fandel TM, Lue TF, Lin CS. Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*. 2010;12(1):88-95.
50. Fu Q, Song XF, Liao GL, Deng CL, Cui L. Myoblasts differentiated from adipose-derived stem cells to treat stress urinary incontinence. *Urology*. 2010;75(3):718-23.
51. Zhao W, Zhang C, Jin C, Zhang Z, Kong D, Xu W, Xiu Y. Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells with controlled-release nerve growth factor for the treatment of stress urinary incontinence in a rat model. *Eur Urol*. 2011;59(1):155-63.
-

-
52. Watanabe T, Maruyama S, Yamamoto T, Kamo I, Yasuda K, Saka Y, Ozaki T, Yuzawa Y, Matsuo S, Gotoh M. Increased urethral resistance by periurethral injection of low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells in rats. *Int J Urol*. 2011;18(9):659-66.
 53. Wu G, Song Y, Zheng X, Jiang Z. Adipose-derived stromal cell transplantation for treatment of stress urinary incontinence. *Tissue Cell*. 2011;43(4):246-53.
 54. Kinebuchi Y, Aizawa N, Imamura T, Ishizuka O, Igawa Y, Nishizawa O. Autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation into injured rat urethral sphincter. *Int J Urol*. 2010;17(4):359-68.
 55. Zou XH, Zhi YL, Chen X, Jin HM, Wang LL, Jiang YZ, et al. Mesenchymal stem cell seeded knitted silk sling for the treatment of stress urinary incontinence. *Biomaterials*. 2010;31(18):4872-9.
 56. Kim SO, Na HS, Kwon D, Joo SY, Kim HS, Ahn Y. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation enhances closing pressure and leak point pressure in a female urinary incontinence rat model. *Urol Int*. 2011;86(1):110-6.
 57. Corcos J, Loutochin O, Campeau L, Eliopoulos N, Bouchentouf M, Blok B, Galipeau J.. Bone marrow mesenchymal stromal cell therapy for external urethral sphincter restoration in a rat model of stress urinary incontinence. *Neurourol Urodyn*. 2011;30(3):447-55.
 58. Lim JJ, Jang JB, Kim JY, Moon SH, Lee CN, Lee KJ. Human umbilical cord blood mononuclear cell transplantation in rats with intrinsic sphincter deficiency. *J Korean Med Sci*. 2010;25(5):663-70.
 59. Kim BS, Chun SY, Lee JK, Lim HJ, Bae JS, Chung HY, Atala A, Soker S, Yoo JJ, Kwon TG.. Human amniotic fluid stem cell injection therapy for urethral sphincter regeneration in an animal model. *BMC Med*. 2012;10:94.
-

-
60. Chun SY, Cho DH, Chae SY, Choi KH, Lim HJ, Yoon GS, Kim BS, Kim BW, Yoo JJ, Kwon TG. Human amniotic fluid stem cell-derived muscle progenitor cell therapy for stress urinary incontinence. *J Korean Med Sci.* 2012;27(11):1300-7.
 61. Lee JY, Cannon TW, Pruchnic R, Fraser MO, Huard J, Chancellor MB. The effects of periurethral muscle-derived stem cell injection on leak point pressure in a rat model of stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2003;14(1):31-7.
 62. Cannon TW, Lee JY, Somogyi G, Pruchnic R, Smith CP, Huard J, Chancellor MB. Improved sphincter contractility after allogenic muscle-derived progenitor cell injection into the denervated rat urethra. *Urology.* 2003;62(5):958-63.
 63. Li GY, Zhou F, Gong YQ, Cui WS, Yuan YM, Song WD, Xin H, Liu T, Li WR, Gao ZZ, Liu J, Guo YL, Xin ZC. Activation of VEGF and ERK1/2 and improvement of urethral function by adipose-derived stem cells in a rat stress urinary incontinence model. *Urology.* 2012;80(4):953.e1-8.
 64. Badra S, Andersson KE, Dean A, Mourad S, Williams JK. Long-term structural and functional effects of autologous muscle precursor cell therapy in a nonhuman primate model of urinary sphincter deficiency. *J Urol.* 2013;190(5):1938-45.
 65. Yiou R, Yoo JJ, Atala A. Restoration of functional motor units in a rat model of sphincter injury by muscle precursor cell autografts. *Transplantation.* 2003;76(7):1053-60.
 66. Chun SY, Kwon JB, Chae SY, Lee JK, Bae JS, Kim BS, et al. Combined injection of three different lineages of early-differentiating human amniotic fluid-derived cells restores urethral sphincter function in urinary incontinence. *BJU Int.* 2014;114(5):770-83.
 67. Silwal Gautam S, Imamura T, Ishizuka O, Lei Z, Yamagishi T, Yokoyama H, et al. Implantation of autologous adipose-derived cells
-

-
- reconstructs functional urethral sphincters in rabbit cryoinjured urethra. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(13-14):1971-9.
68. Deng K, Lin DL, Hanzlicek B, Balog B, Penn MS, Kiedrowski MJ, et al. Mesenchymal stem cells and their secretome partially restore nerve and urethral function in a dual muscle and nerve injury stress urinary incontinence model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(2):F92-F100.
69. Williams JK, Eckman D, Dean A, Moradi M, Allickson J, Cline JM, et al. The dose-effect safety profile of skeletal muscle precursor cell therapy in a dog model of intrinsic urinary sphincter deficiency. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(3):286-94.
70. Choi JY, Chun SY, Kim BS, Kim HT, Yoo ES, Shon YH, Lim JO, Yun SJ, Song PH, Chung SK, Yoo JJ, Kwon TG. Pre-clinical efficacy and safety evaluation of human amniotic fluid-derived stem cell injection in a mouse model of urinary incontinence. *Yonsei Med J*. 2015;56(3):648-57.
71. Yiou R, Mahrouf-Yorgov M, Trébeau C, Zanaty M, Lecointe C, Souktani R, Zadigue P, Figeac F, Rodriguez AM. Delivery of human mesenchymal adipose-derived stem cells restores multiple urological dysfunctions in a rat model mimicking radical prostatectomy damages through tissue-specific paracrine mechanisms. *Stem Cells*. 2016;34(2):392-404.
72. Sadeghi Z, Isariyawongse J, Kavran M, Izgi K, Marini G, Molter J, Daneshgari F, Flask CA, Caplan A7, Hijaz A. Mesenchymal stem cell therapy in a rat model of birth-trauma injury: functional improvements and biodistribution. *Int Urogynecol J*. 2016;27(2):291-300.
73. Wang Z, Wen Y, Li YH, Wei Y, Green M, Wani P, Zhang P, Pera RR, Chen B. Smooth muscle precursor cells derived from human pluripotent
-

-
- stem cells for treatment of stress urinary incontinence. *Stem Cells Dev.* 2016;25(6):453-61.
74. Kuismanen K, Sartoneva R, Haimi S, Mannerström B, Tomás E, Miettinen S, Nieminen K. Autologous adipose stem cells in treatment of female stress urinary incontinence: results of a pilot study. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(8):936-41.
75. Carr LK, Robert M, Kultgen PL, Herschorn S, Birch C, Murphy M, Chancellor MB. Autologous muscle derived cell therapy for stress urinary incontinence: a prospective, dose ranging study. *J Urol.* 2013;189(2):595-601.
76. Lee CN, Jang JB, Kim JY, Koh C, Baek JY, Lee KJ. Human cord blood stem cell therapy for treatment of stress urinary incontinence. *J Korean Med Sci.* 2010;25(6):813-6.
77. Mitterberger M, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Colleselli D, Frauscher F, Ulmer H, Fussenegger M, Bartsch G, Strasser H. Autologous myoblasts and fibroblasts for female stress incontinence: a 1-year follow-up in 123 patients. *BJU Int.* 2007;100(5):1081-5.
78. Mitterberger M, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Frauscher F, Ulmer H, Fussenegger M, Bartsch G, Strasser H. Myoblast and fibroblast therapy for post-prostatectomy urinary incontinence: 1-year followup of 63 patients. *J Urol.* 2008;179(1):226-31.
79. Mitterberger M, Pinggera GM, Marksteiner R, Margreiter E, Fussenegger M, Frauscher F, Ulmer H, Hering S, Bartsch G, Strasser H. Adult stem cell therapy of female stress urinary incontinence. *Eur Urol.* 2008;53(1):169-75.
80. Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, Mitterberger M, Pinggera GM, Frauscher F, Fussenegger M, Kofler K, Bartsch G. Transurethral ultrasonography-guided injection of adult autologous stem cells versus
-

-
- transurethral endoscopic injection of collagen in treatment of urinary incontinence. *World J Urol*. 2007;25(4):385-92.
81. Kleinert S, Horton R. Retraction--autologous myoblasts and fibroblasts versus collagen [corrected] for treatment of stress urinary incontinence in women: a [corrected] randomised controlled trial. *Lancet*. 2008;372(9641):789-90.
82. Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Mitterberger M, Frauscher F, Ulmer H, Fussenegger M, Kofler K, Bartsch G. Autologous myoblasts and fibroblasts versus collagen for treatment of stress urinary incontinence in women: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;369(9580):2179-86.
83. Carr LK, Steele D, Steele S, Wagner D, Pruchnic R, Jankowski R, Erickson J, Huard J, Chancellor MB. 1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2008;19(6):881-3.
84. Goldman HB, Sievert KD, Damaser MS. Will we ever use stem cells for the treatment of SUI? ICI-RS 2011. *Neurourol Urodyn*. 2012;31(3):386-9.
85. Aref-Adib M, Lamb BW, Lee HB, Akinnawo E, Raza MM, Hughes A, Mehta VS, Odonde RI, Yoong W. Stem cell therapy for stress urinary incontinence: a systematic review in human subjects. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;288(6):1213-21.
86. Hoshi A, Tamaki T, Tono K, Okada Y, Akatsuka A, Usui Y, Terachi T. Reconstruction of radical prostatectomy-induced urethral damage using skeletal muscle-derived multipotent stem cells. *Transplantation*. 2008;85(11):1617-24.
87. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A(5):822-32.
-

-
88. 88. Relaix F, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development*. 2012;139(16):2845-56.
 89. Judson RN, Zhang RH, Rossi FM. Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs? *FEBS J*. 2013;280(17):4100-8.
 90. Lehr HA, van der Loos CM, Teeling P, Gown AM. Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *J Histochem Cytochem*. 1999;47(1):119-26.
 91. Lais A, Paolocci N, Ferro F, Bosman C, Boldrini R, Caione P. Morphometric analysis of smooth muscle in the exstrophy-epispadias complex. *J Urol*. 1996;156(2 Pt 2):819-21.
 92. Howard C, Reed M. *Three-dimensional measurement in microscopy.: unbiased stereology*. 2nd ed. Abingdon, Oxon: Garland Science/Bios Scientific; 2005. p.103-17.
 93. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988;96(5):379-94.
 94. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:457-78.
 95. Musarò A. The Basis of Muscle Regeneration. *Adv Biol* [online]. 2014; (2014): 612471, 16 pages. [cited 2016 Jul 26]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ab/2014/612471/>
 96. Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol*. 1994;164(2):588-603.
-

-
97. Li BJ, Li PH, Huang RH, Sun WX, Wang H, Li QF, et al. Isolation, culture and identification of porcine skeletal muscle satellite cells. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2015;28(8):1171-7.
 98. Scimeca M, Bonanno E, Piccirilli E, Baldi J, Mauriello A, Orlandi A, Tancredi V, Gasbarra E, Tarantino U. Satellite Cells CD44 Positive drive muscle regeneration in osteoarthritis patients. *Stem Cells Int* [online]. 2015;2015:469459. [cited 2016 July 26]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/sci/2015/469459/>
 99. Motohashi N, Asakura Y, Asakura A. Isolation, culture, and transplantation of muscle satellite cells. *J Vis Exp.* 2014; (86): doi: 10.3791/50846.
 100. Crisan M, Corselli M, Chen WC, Péault B. Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med.* 2012;16(12):2851-60.
 101. Crisan M, Corselli M, Chen CW, Péault B. Multilineage stem cells in the adult: a perivascular legacy? *Organogenesis.* 2011;7(2):101-4.
 102. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301-13.
 103. Gökçinar-Yagci B, Uçkan-Çetinkaya D, Çelebi-Saltik B. Pericytes: Properties, Functions and Applications in Tissue Engineering. *Stem Cell Rev.* 2015;11(4):549-59.
 104. Zheng B, Cao B, Crisan M, Sun B, Li G, Logar A, Yap S, Pollett JB, Drowley L, Cassino T, Gharaibeh B, Deasy BM, Huard J, Péault B. Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat Biotechnol.* 2007;25(9):1025-34.
-

-
105. Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, Vitorovic S, Blau HM. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature*. 2008;456(7221):502-6.
 106. Klimczak A, Kozłowska U. Mesenchymal stromal cells and tissue-specific progenitor cells: their role in tissue homeostasis. *Stem Cells Int*. 2016;2016:4285215.
 107. Usas A, Mačiulaitis J, Mačiulaitis R, Jakubonienė N, Milašius A, Huard J. Skeletal muscle-derived stem cells: implications for cell-mediated therapies. *Medicina (Kaunas)*. 2011;47(9):469-79.
 108. Santos BF. Classificação dos animais de laboratório quanto ao status genético. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, organizadores. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2002. [cited 2016 July 26]. Available from: <http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-11.pdf>
 109. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MV. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir Bras*. 2005;20(Suppl 2):28-34.
 110. Damaser MS, Broxton-King C, Ferguson C, Kim FJ, Kerns JM. Functional and neuroanatomical effects of vaginal distention and pudendal nerve crush in the female rat. *J Urol*. 2003;170(3):1027-31.
 111. Lin AS, Carrier S, Morgan DM, Lue TF. Effect of simulated birth trauma on the urinary continence mechanism in the rat. *Urology*. 1998;52(1):143-51.
 112. Resplande J, Gholami SS, Graziottin TM, Rogers R, Lin CS, Leng W, Lue TF. Long-term effect of ovariectomy and simulated birth trauma on the lower urinary tract of female rats. *J Urol*. 2002;168(1):323-30.
-

-
113. Shaker H, Mourad MS, Elbially MH, Elhilali M. Urinary bladder hyperreflexia: a rat animal model. *Neurourol Urodyn*. 2003;22(7):693-8.
 114. Rodríguez LV, Chen S, Jack GS, de Almeida F, Lee KW, Zhang R. New objective measures to quantify stress urinary incontinence in a novel durable animal model of intrinsic sphincter deficiency. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(5):R1332-8.
 115. Gomes CM, Arap S, Trigo-Rocha FE. Voiding dysfunction and urodynamic abnormalities in elderly patients. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*. 2004;59(4):206-15.
 116. Strasser H, Tiefenthaler M, Steinlechner M, Bartsch G, Konwalinka G. Urinary incontinence in the elderly and age-dependent apoptosis of rhabdosphincter cells. *Lancet*. 1999;354(9182):918-9.
 117. Hijaz A, Daneshgari F, Sievert KD, Damaser MS. Animal models of female stress urinary incontinence. *J Urol*. 2008;179(6):2103-10.
 118. Lin CS, Xin ZC, Wang Z, Deng C, Huang YC, Lin G, et al. Stem cell therapy for erectile dysfunction: a critical review. *Stem Cells Dev*. 2012;21(3):343-51.
 119. Iwashita Y, Crang AJ, Blakemore WF. Redistribution of bisbenzimidazole Hoechst 33342 from transplanted cells to host cells. *Neuroreport*. 2000;11(5):1013-6.
 120. Volpi EV, Bridger JM. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques*. 2008;45(4):385-6, 8, 90 passim.
 121. Shi LB, Cai HX, Chen LK, Wu Y, Zhu SA, Gong XN, et al. Tissue engineered bulking agent with adipose-derived stem cells and silk fibroin microspheres for the treatment of intrinsic urethral sphincter deficiency. *Biomaterials*. 2014;35(5):1519-30.
-

122. Peters KM, Dmochowski RR, Carr LK, Robert M, Kaufman MR, Sirls LT, et al. Autologous muscle derived cells for treatment of stress urinary incontinence in women. *J Urol*. 2014;192(2):469-76.
 123. Imamura M, Abrams P, Bain C, Buckley B, Cardozo L, Cody J, Cook J, Eustice S, Glazener C, Grant A, Hay-Smith J, Hislop J, Jenkinson D, Kilonzo M, Nabi G, N'Dow J, Pickard R, Ternent L, Wallace S, Wardle J, Zhu S, Vale L. Systematic review and economic modelling of the effectiveness and cost-effectiveness of non-surgical treatments for women with stress urinary incontinence. *Health Technol Assess*. 2010;14(40):1-188, iii-iv.
-