

## **Análises macroscópica e histopatológica do alotransplante parcial de vesícula urinária com células-tronco mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo em coelhos**

[*Macroscopic and histopathological analysis of partial urinary bladder allograft using allogenic adipose tissue derived mesenchymal stem cells in rabbits*]

S.T.L. Pinto Filho<sup>1</sup>, F. Dalmolin<sup>2</sup>, M.M. Pillat<sup>3</sup>, D.L. Graça<sup>1</sup>, L. Borges<sup>4</sup>, M.P. Rosa<sup>5</sup>,  
C.C. Danesi<sup>1</sup>, R.M. Maciel<sup>5</sup>, M.L. Veiga<sup>1</sup>, A.I.S. Dullius<sup>1</sup>, N.L. Pippi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, RS

<sup>2</sup>Universidade Federal da Fronteira Sul - Realeza, PR

<sup>3</sup>Universidade de São Paulo - São Paulo, SP

<sup>4</sup>Aluno de graduação - Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, RS

<sup>5</sup>Aluno de pós-graduação - Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, RS

### **ABSTRACT**

*The number of organ and tissue transplantation in humans and animals has grown significantly recently, especially after the advent of modern and safer techniques of immunosuppression. The objective of this study was to evaluate macro and microscopically partial urinary bladder fresh allograft in rabbits, using as immunomodulatory agent cyclosporine or allogenic adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ADSCs). For this purpose, 25 rabbits were used. One male was the donor of ADSCs; 24 females received a partial urinary bladder allograft and were treated with cyclosporine (GCi) or mesenchymal stem cells (GCE). We conclude that the GCE group had better histological acceptance of the implant than GCi group at 30 days evaluation.*

*Keywords: transplantation, bladder, surgery, MSC*

### **RESUMO**

O número de transplantes de órgãos e tecidos em humanos e animais tem crescido significativamente nos últimos anos, principalmente após o advento de técnicas modernas e mais seguras indutoras de imunossupressão. Objetiva-se com o presente estudo avaliar macro e microscopicamente o alotransplante parcial de bexiga a fresco em coelhos, utilizando como agente imunomodulador células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC) alogênicas. Foram utilizados 25 coelhos, sendo um deles macho e doador das ADSCs, e os outros 24 eram fêmeas, submetidas a alotransplante parcial de bexiga, tratadas com ciclosporina (GCi) ou células-tronco mesenquimais (GCE). Conclui-se que o GCE teve melhor aceitação histológica do implante em relação ao GCi aos 30 dias de avaliação.

Palavras-chave: transplante, bexiga, cirurgia, CTM

### **INTRODUÇÃO**

O primeiro relato descrevendo as propriedades imunomoduladoras e imunossupressoras das ADSCs foi publicado no ano de 2005; especificamente, seus experimentos *in vitro* mostraram que as ADSC não provocaram alorreatividade e foram capazes de suprimir reação de linfócitos. Além disso, descobriu-se que o efeito imunossupressor parece exigir

contato célula-célula (Puissant *et al.*, 2005). No entanto, em outros dois estudos separados, a exigência do contato célula-célula foi corroborada e contestada. Independentemente dessa divergência, o efeito imunossupressor das ADSCs foi observado de forma consistente em todos os estudos subsequentes (Lin *et al.*, 2012). De acordo com Le Blanc e Ringdén (2007), *in vitro*, as células-tronco mesenquimais (CTM) inibem a proliferação de células T para aloantígenos e agentes mitogênicos e impedem o

desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos. *In vivo*, as CTMs prolongam a sobrevivência do enxerto de pele e têm vários efeitos imunomoduladores. Possíveis aplicações clínicas incluem a terapia na doença aguda grave do enxerto contra o hospedeiro, a reparação tecidual, o tratamento da rejeição de aloenxertos de órgãos e os transtornos autoimunes.

Com o avanço da tecnologia, os diferentes tipos de transplante têm sido amplamente aceitos e efetuados no mundo todo, inclusive para a reconstituição de órgãos retirados em parte ou no todo quando tomados por determinados tipos de câncer. Contudo, mesmo com as mais diversas indicações para reconstrução vesical, ainda são poucos os relatos de transplante de bexiga (Brandt *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2007).

Órgãos do sistema gastrointestinal podem e são geralmente utilizados para este propósito, sendo o intestino o mais frequentemente usado. Uma grande variedade de tecidos, como segmentos intestinais para enxertos de fásia e vesícula biliar, têm sido estudados como materiais potenciais para cistoplastias (Lavanya *et al.*, 2014). Porém, esses procedimentos estão sujeitos a complicações, principalmente pela natureza histológica diferente entre o enxerto e a bexiga. As mais observadas são fístulas, urolitíases, ausência de dilatação, contração do enxerto, neoplasia, produção de muco e problemas metabólicos provenientes da absorção pela mucosa do tecido implantado (Teixeira *et al.*, 2007).

Teixeira *et al.* (2007) testaram a hipótese de o alotransplante de bexiga devolver a capacidade estrutural e funcional desse órgão. Para isso, utilizaram 10 cães machos, saudáveis, que foram submetidos à cistectomia parcial com preservação do trígono vesical, e realizaram avaliações clínicas e histopatológicas. O alotransplante na reconstrução da vesícula urinária foi acompanhado durante 60 dias e, como agente imunossupressor, foi utilizada ciclosporina. Os achados histopatológicos caracterizaram o processo de rejeição inicial do transplante. Entretanto, observaram-se regeneração e integração parcial dos tecidos na interface do transplante, caracterizada por proliferação fibroblástica, neoangiogênese e surgimento de fibras musculares lisas. Os autores concluíram que o alotransplante de bexiga em

cães é viável, devolve a capacidade de repleção e as demais funções fisiológicas da bexiga durante o período de observação.

Oliveira *et al.* (2008) implantaram um retalho de membrana peritoneal bovina em substituição a um fragmento da face ventral da bexiga de coelhos Nova Zelândia adultos, objetivando avaliar o processo de reparação tecidual no que se referia à biocompatibilidade, à capacidade de reparação tecidual e a possíveis complicações. Os autores verificaram que, macroscopicamente, em todos os períodos, houve aderências de estruturas adjacentes ao local do implante, presença de cálculos e ausência de sinais de rejeição. Com base nos resultados histológicos obtidos, o estudo concluiu que o peritônio bovino conservado em glicerina a 98% fornece arcabouço para orientação e desenvolvimento dos tecidos vesicais, mediante processos de reparação, restabelecendo, aos 60 dias de pós-operatório, os tecidos que compõem o órgão. Além disso, ressaltou-se que o implante é biocompatível, uma vez que não provoca reação do tipo corpo estranho.

O objetivo do presente artigo foi avaliar macro e microscopicamente o alotransplante parcial de bexiga a fresco em coelhos, utilizando-se como agente imunomodulador ADSCs alogênicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a elaboração deste experimento, foram utilizados 25 (vinte e cinco) coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), sendo 24 fêmeas, adultas, da raça Nova Zelândia Branco, e um macho, doador do tecido adiposo para a cultura celular, clinicamente saudáveis, com peso médio de  $3,73 \pm 0,88$  kg, oriundos do biotério central de uma instituição. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (Ceua) institucional, sob parecer número 066/2011.

Todos os animais foram alojados em gaiolas individuais, por um período mínimo de 15 dias, para sua adaptação às condições ambientais e ao convívio humano, bem como para detecção de possíveis enfermidades. Durante todo o período do experimento, os animais permaneceram em boxes individuais, recebendo ração comercial para a espécie e água à vontade, sendo também submetidos a exame clínico prévio e coleta de sangue para análise laboratorial (hemograma,

contagem de plaquetas, dosagem de ureia e creatinina, AST e urinálise) e ultrassonografia (US) abdominal para avaliação vesical. A coleta de sangue foi realizada pela veia jugular, e a de urina por cistocentese guiada por US.

Após o período de observação, os animais foram separados e identificados em dois grupos experimentais, GCi (tratados com ciclosporina) e GCe (tratados com ADSCs), sendo cada um composto por 12 animais, conforme o tipo de tratamento. Os grupos foram subdivididos em dois subgrupos, com seis animais cada. Todos os subgrupos tiveram os períodos de avaliação de 15 e 30 dias. Após o procedimento de transplante, os animais do GCi foram tratados com ciclosporina ( $5\text{mg kg}^{-1}$ ) IV, a cada 24 horas, até o término do período de avaliação. Os do GCe receberam fração de ADSCs, na dose de  $2 \times 10^6$  células/mL, cultivadas em laboratório, intramuralmente, nas laterais da sutura do enxerto na face vesical receptora.

Após a tricotomia e a antisepsia ampla da região dorsal cervical do coelho macho, próximo às escápulas, esse foi anestesiado e posicionado em decúbito ventral, protegido da contaminação por panos de campo, para coleta de um fragmento de tecido adiposo. O animal doador do TA não participou das outras fases do experimento, somente doou o TA para posterior cultivo das ADSCs. O doador do tecido adiposo era de sexo diferente dos receptores, para a pesquisa do cromossomo Y, por meio da expressão do gene SRY por análise de PCR, a fim de se verificar a presença das células no local de implantação nas coelhas receptoras.

O fragmento de TA coletado, com aproximadamente 10 gramas de peso, era imediatamente encaminhado em um recipiente de vidro estéril, contendo 150mL de solução de Hanks, para o Laboratório de Terapia Celular Regenerativa. No interior da capela de fluxo laminar, o tecido foi transferido para uma placa de Petri e seccionado várias vezes em diversos fragmentos menores até não ser mais possível sustentá-lo com a pinça de dissecação. Os pequenos fragmentos de TA foram lavados com solução de Hanks, com o auxílio de uma peneira que não permitia a passagem dos fragmentos de gordura, totalizando três lavagens.

Concluída esta etapa, a gordura era transferida para tubos de polipropileno graduados, de 50mL, e adicionava-se a ela, uma solução de 1mg/mL de colagenase tipo II, na proporção 1:3 (volume:volume). Os tubos eram tampados e lacrados com uma película semitransparente, resistente a água, encaminhados ao banho-maria, em uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , e agitados manualmente a cada cinco minutos. Nessas condições, permaneciam por aproximadamente 25 minutos, até ser gerado um aspecto leitoso na mistura. A seguir, os tubos eram retirados do banho-maria e encaminhados novamente para a capela de fluxo laminar. A colagenase era neutralizada mediante a adição de meio completo DMEM (Eagle modificado por Dulbecco), em um volume de 1:1. Os tubos de TA com o meio completo adicionado foram centrifugados a 600G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. Em seguida, realizou-se agitação manual vigorosa dos tubos, objetivando-se romper os adipócitos e promover a liberação de mais células mononucleares. Depois, os tubos eram recolocados na centrífuga, por mais cinco minutos, com a mesma rotação.

O sobrenadante foi descartado, e a fração lavada com meio completo e centrifugada, desta vez, a 440G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. A lavagem foi repetida novamente. Ao término da nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a fração vascular estromal (FVE) ressuspendida em 1mL de meio completo. Uma pequena fração ( $70\mu\text{L}$ ) da FVE suspensa era coletada com pipeta automática para quantificação manual da porcentagem de células mononucleares e teste de viabilidade celular com azul de *Trypan* 1% em lâmina de Neubauer. Logo depois, as células eram plaqueadas em garrafas de cultura primária de  $75\text{cm}^2$ , com DMEM e 10% de SFB. As garrafas eram, então, encaminhadas para estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , com concentração de 5% de dióxido de carbono, local onde permaneceram a fim de se expandirem. A aplicação era realizada depois da terceira passagem, durante o procedimento cirúrgico de transplante.

As células da terceira passagem foram incubadas e submetidas à caracterização por citometria de fluxo com os anticorpos anti-CD105, anti-CD90, anti-CD45 e anti-CD73 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), nas diluições recomendadas pelo fabricante, a saber: 5:100, 5:100, 20:100 e

10:100, respectivamente. Passados 30 minutos de incubação com os anticorpos em temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS e ressuspendidas em 400mL de PBS para aquisição dos dados no citômetro de fluxo BD FACSDiva.

No período anterior ao procedimento cirúrgico, todos os animais foram pesados e submetidos à tricotomia ampla da parede abdominal para a realização do transplante, e das orelhas, para acesso à veia auricular caudal.

A medicação pré-anestésica foi constituída da associação de cloridrato de cetamina ( $20\text{mg kg}^{-1}$ ), maleato de midazolam ( $2\text{mg kg}^{-1}$ ) e sulfato de morfina ( $5\text{mg kg}^{-1}$ ), por via intramuscular (i.m.). A seguir, os animais eram encaminhados para o bloco cirúrgico do Laboratório de Cirurgia Experimental (Lace) do Hospital Veterinário Universitário institucional. Posteriormente, realizava-se indução anestésica com isoflurano, mediante o uso de máscara, e a manutenção anestésica era realizada com o mesmo fármaco, por meio do uso de máscara, com sistema inalatório aberto (vaporizador universal), vaporizado em 100% de oxigênio, com respiração espontânea. A antibioticoprofilaxia foi realizada com ampicilina sódica ( $5\text{mg kg}^{-1}$ ), pela via intravenosa (i.v.), 30 minutos antes do início do procedimento.

A manutenção do acesso venoso era feita com solução de ringer com lactato, por meio de canulação da veia auricular caudal com cateter 24G, durante todo o procedimento cirúrgico, em gotejamento venoso de  $10\text{mL kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

Os animais foram operados aos pares, com procedimentos simultâneos no mesmo ambiente cirúrgico, sendo cada um doador e receptor. As operações foram realizadas mediante incisão pré-púbica com bisturi, passando através do tecido subcutâneo e chegando-se à linha alba, incidindo-se esta com bisturi e tesoura Metzemaum. Na sequência, a bexiga era localizada, exteriorizada e esvaziada por meio de cistocentese, quando necessário, para não haver extravasamento de urina para a cavidade. Depois desse processo, isolava-se a bexiga com compressas úmidas em solução de NaCl 0,9% e três reparos eram colocados no ápice vesical, com fio de náilon 3-0, área em que o orifício foi criado. A bexiga era excisada removendo-se aproximadamente 30% dela (vazia), deixando-se

os reparos na porção remanescente. A seguir, a porção removida era lavada com solução de ringer com lactato e posteriormente suturada junto à bexiga remanescente do outro animal em plano único, com fio de poliglactina 910 5-0 em padrão contínuo simples, de modo seromuscular. Ao término da sutura, realizava-se o teste de repleção da bexiga com solução salina para se verificarem possíveis vazamentos. As ADSCs eram colocadas ao redor da linha de sutura, em volume de 0,8mL, e diluídas em DMEM, mediante injeção com seringa de 1mL e agulha 12,7mm x 0,33mm, sob a camada serosa da bexiga. A sutura da linha alba foi realizada com poliglactina 910 3-0, em padrão isolado tipo Sultan, sendo o espaço subcutâneo reduzido com o mesmo material e padrão contínuo simples. A dermorráfia foi obtida com náilon 4-0 e pontos isolados em padrão Wolf.

No pós-operatório (PO) imediato, os animais eram monitorados até o restabelecimento completo da consciência e, então, encaminhados novamente para os seus boxes. Como analgésico, foi administrado cloridrato de tramadol ( $6\text{mg kg}^{-1}$ ), i.m., a cada 12 horas, durante três dias. A limpeza da ferida cirúrgica era realizada com solução fisiológica uma vez a cada dois dias. A remoção dos pontos cutâneos foi feita depois de sete dias do procedimento cirúrgico.

Posteriormente ao término dos períodos de avaliação (15 ou 30 dias) e coleta de material, os animais foram submetidos à eutanásia. Para o procedimento, foram sedados com associação de cloridrato de cetamina ( $20\text{mg kg}^{-1}$ ), maleato de midazolam ( $2\text{mg kg}^{-1}$ ) e sulfato de morfina ( $5\text{mg kg}^{-1}$ ), i.m., com posterior aplicação de propofol ( $10\text{mg kg}^{-1}$ ), i.v., na veia auricular caudal.

Na avaliação macroscópica, investigou-se a região do implante quanto à presença de aderências, falhas no implante, necrose, fístula, inflamação local, além de se verificar a presença de muco e urólitos na luz da bexiga. Quando presentes, os urólitos foram enviados ao Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da instituição, utilizando-se um *kit* (Cálculo Renal K008® - Bioclin-Quibasa, Brasil) com metodologia baseada em um conjunto de métodos físico-químicos.

Depois da análise macroscópica, os fragmentos dos tecidos foram levados à avaliação histológica aos 15 e 30 dias de pós-operatório para mensuração da cicatrização e presença de rejeição do tecido implantado, além de pesquisa de outras alterações. O material foi obtido por uma incisão, com bisturi, na interface do implante com a bexiga remanescente. As lâminas foram preparadas por meio de amostras do tecido da bexiga fixado em solução de formol tamponado 10%, processado e embebido em parafina, e seccionado a 5-7 $\mu$ m em micrótomo rotativo. As secções dos tecidos tiveram dois tipos de coloração: metade foi corada com hematoxilina e eosina, e a outra metade com a coloração tricrômica de Masson-Goldner. As lâminas foram analisadas por uma patologista que, às cegas, avaliou a evolução do processo inflamatório pelas características do infiltrado, pela neovascularização e organização colágena, com ênfase na interface bexiga normal/implante em cada grupo.

Em cada uma das lâminas, foram analisados cinco campos (CPs), aleatórios e não consecutivos, por meio de microscópio de luz Axiolab A1 (Carl Zeiss - Göttingen, Germany), em aumento de 200x (Saban *et al.*, 2007). Cada campo observado teve a imagem capturada e digitalizada pelo programa de captura de imagens ZEN 2012 (Carl Zeiss - Göttingen, Germany). Para mensurar e classificar a intensidade da infiltração de células inflamatórias no tecido conjuntivo da amostra, foi utilizado o seguinte critério (escores): 1 - ausência de células inflamatórias crônicas; 2 - leve (+), presença de poucas células inflamatórias dispersas no tecido conectivo; 3 - moderada (++), presença de grande número de células inflamatórias focalmente arrançadas; 4 - severa (+++), presença de grande número de células inflamatórias dispersas no tecido conectivo (Moura *et al.*, 2014).

Para cálculo das médias e do desvio-padrão, foi utilizado o *software* Microsoft Office Excel for Windows 7. Para comparação entre os grupos GCi e GCe, assim como entre os 15 e 30 dias, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon, ao nível de 5% de significância. Também foi empregado o teste de Kruskal-Wallis (5% de significância) para comparação das medianas entre os campos (CPs) em cada grupo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ambos os tratamentos utilizados na pesquisa alcançaram resultados clínicos satisfatórios, impedindo a rejeição do aloimplante. Todos os animais tiveram recuperação satisfatória, não apresentando nenhuma alteração clínica ou comportamental em decorrência do tratamento, durante todo o período de avaliação pós-cirúrgica.

No aspecto macroscópico das bexigas, foi verificada, similarmente em todos os animais, boa integração do enxerto com o tecido vesical receptor (Fig. 1), sem sinais de rejeição, corroborando os resultados encontrados por Daleck *et al.* (1989), Piechota *et al.* (1998) e Oliveira *et al.* (2008). Adicionalmente, não foram verificadas externamente, nas bexigas analisadas, presença de muco e sinais de necrose ou de fístula. Oliveira *et al.* (2008) afirmaram que estas complicações podem ser encontradas após a utilização de implantes vesicais. Oliveira (2008), quando estudou xenoenxerto vesical em cães, afirmou apenas ter encontrado, macroscopicamente, em todos os grupos, um discreto espessamento e aderências vesicais leves, localizados na área do enxerto, o que constitui as mesmas observações encontradas no presente estudo. Na face interna do enxerto das bexigas avaliadas aos 15 dias em ambos os grupos, na região do enxerto, foram observados restos de tecido necrótico (Fig. 1A), os quais não foram visualizados aos 30 dias de avaliação. Isso se deveu ao próprio processo inflamatório, visualizado na microscopia, conforme descrito abaixo.

Na maioria dos coelhos, em ambos os períodos de observação, foram encontradas aderências da sutura do implante com mesentério, alça intestinal, mesométrio, sutura muscular abdominal e ligamento médio ventral da bexiga. No GCi, 58,3% (7/12) dos animais apresentaram aderências, e no GCe todos os animais apresentaram aderências com alguma(s) das estruturas citadas acima. Oliveira *et al.* (2008) também notaram, em seu estudo com coelhos Nova Zelândia, que, em todos os períodos de observação, havia aderências da região do implante com o peritônio parietal ventral do abdome; aos sete e aos 14 dias de pós-operatório, os mesmos autores observaram que os testículos estavam aderidos ao local da cistoplastia e, aos

60 dias, notou-se aderência do ceco e segmento do jejuno ao sítio do implante. Já Teixeira *et al.* (2007) afirmaram ter encontrado aderências da bexiga com o omento, aos 60 dias de observação, em seis cães, dos 10 utilizados em seu experimento. Os achados do presente estudo também corroboram os de Daleck *et al.* (1989), ao verificarem aderências do intestino delgado, reto e omento, após cistoplastia dorsal, em cães,

com membrana peritoneal bovina. Segundo Oliveira (2008), a omentização é favorável em cirurgias reconstrutivas, pois proporciona neovascularização e minimiza a formação de aderências. No presente estudo, optou-se por não omentalizar, já que se comparou a eficácia das ADSCs em relação ao GCi para cicatrização do aloenxerto com a bexiga receptora.

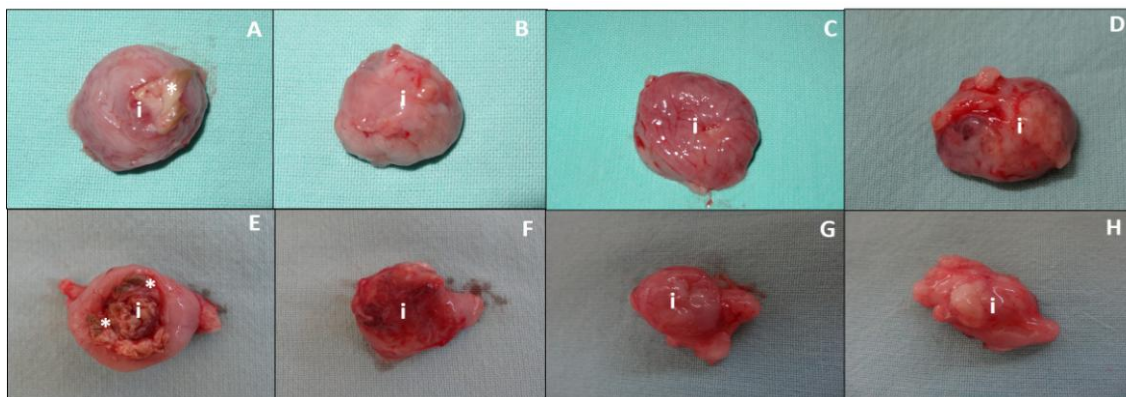


Figura 1. Aspecto macroscópico das faces interna (A) e externa (B) das vesículas urinárias de coelhas Nova Zelândia submetidas a alotransplante parcial de vesícula urinária com o implante (i), do GCi, aos 15 dias de pós-operatório. Observar em A a presença de tecido necrótico resultante do processo inflamatório local (\*). C e D demonstram o resultado aos 30 dias do mesmo grupo. Observar em C, face interna vesical, que já não há mais presença de tecido necrótico na região do implante (i). E e F correspondem às faces interna e externa, respectivamente, do GCe aos 15 dias de pós-operatório. Observar em E a presença de tecido necrótico resultante do processo inflamatório local (\*). G e H correspondem as faces interna e externa, respectivamente, do GCe aos 30 dias de pós-operatório. Observar em todas as figuras a boa integração do implante com o tecido receptor.

Constatou-se que 58,3% dos animais do GCi apresentaram urolitíase vesical PO, entretanto somente 33,3% dos coelhos do GCe apresentaram urolitíase vesical. Em ambos os grupos, as concreções apresentavam-se aderidas à face interna da bexiga. Piechota *et al.* (1998), ao implantarem matriz acelular de *hamsters*, coelhos e cães em ratos, também verificaram uma porcentagem bem maior de cálculos vesicais nos animais do grupo enxertado. Oliveira *et al.* (2008), após cistoplastia experimental em coelhos, observaram que os implantes propiciaram a formação de cálculos constituídos por carbonato de cálcio, mas não por estruvita, oxalato de cálcio e fosfato de cálcio, conforme haviam constatado outros autores até então. Na presente pesquisa, verificou-se a existência de diferentes constituintes nos cálculos, na sua maioria, carbonato, fosfato e urato de cálcio.

A análise histopatológica das amostras dos animais do GCi avaliados aos 15 dias de pós-operatório demonstrou congestão vascular leve e edema moderado na lâmina própria da bexiga receptora e no implante; não se observou epitélio de transição (Fig. 2A). Na interface do implante com a bexiga receptora, foi observado fio de sutura fagocitado por células gigantes e depósitos de cálcio ao redor. No estudo de Oliveira *et al.* (2008), também com coelhos, nas amostras referentes aos animais submetidos a eutanásia aos 14 dias de pós-operatório, a lâmina própria e o epitélio estavam ausentes, havia presença de intenso infiltrado inflamatório misto, além de acentuada neovascularização. Aos 30 dias, foram evidenciados congestão vascular leve, edema moderado da lâmina própria e acúmulo linfocitário nos linfáticos na bexiga receptora (Fig. 2C). Na área do implante, havia edema leve, congestão vascular moderada e infiltrado mononuclear difuso com presença de

### Análises macroscópica...

plasmócitos. Na interface, verificaram-se células gigantes fagocitando o material de sutura e depósitos de cálcio (Fig. 2G). No estudo de Oliveira (2008), também era evidente nos

animais (cães) avaliados aos 35 dias a precipitação de sais de cálcio dispostos em duas placas de dimensões discretas em nível da lâmina própria.

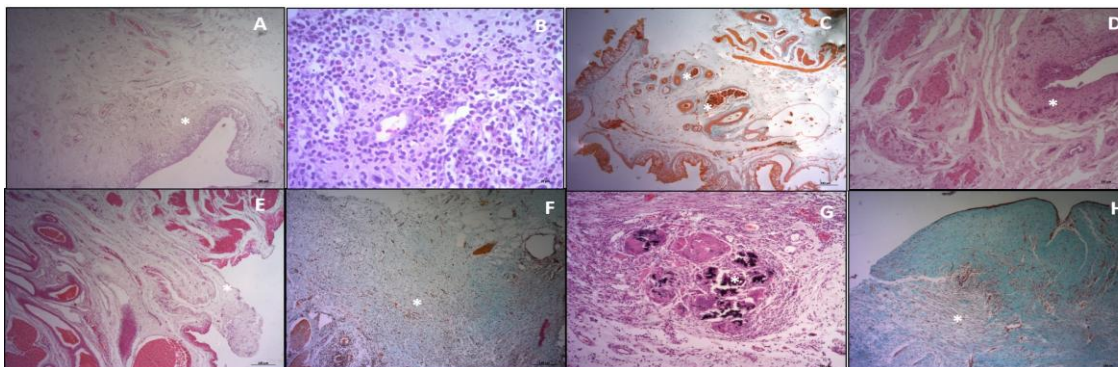


Figura 2. Imagens histopatológicas dos diferentes grupos e momentos de avaliação das vesículas urinárias de coelhas submetidas a alotransplante parcial. GCi 15 dias (A) - coloração HE, observar presença de edema na zona de transição (\*) e ausência do epitélio de transição (E\*) - coloração HE; GCe 15 dias (B) - coloração HE, observar infiltrado mononuclear e presença de fibrose com fibras desordenadas (F\*) - coloração tricrômico de Masson (MA); GCi 30 dias (C) - coloração HE, observar congestão vascular leve e material de sutura sendo fagocitado na junção bexiga-implante (G\*) - coloração HE; GCe 30 dias (D) - coloração HE, observar hiperplasia do epitélio de transição e presença ordenada de fibras colágenas (H\*) - coloração MA. Escala de 200µm

Na análise histopatológica dos animais do GCe, aos 15 dias foi observado infiltrado mononuclear moderado com alguns eosinófilos (Fig. 2B). Na interface, observou-se a presença desordenada de fibras colágenas (Fig. 2F). Esses resultados diferem dos encontrados por Oliveira *et al.* (2008), os quais revelaram a presença de intenso infiltrado inflamatório misto, além de acentuada neovascularização. Já aos 30 dias, foi observada fibrose ordenada de fibras colágenas na interface do implante com a bexiga receptora e áreas de hiperplasia do epitélio de transição (Fig. 2D e H). Esses resultados diferem dos resultados encontrados por Pinto Filho *et al.* (2003), quando utilizaram pericárdio homólogo para restaurar diafragma de felinos, sem a utilização de CTMs. Na ocasião, no período de pós-operatório, observaram presença de restos de fio envoltos por intensa reação piogranulomatosa. Já na pesquisa de Oliveira *et al.* (2008), quando utilizaram peritônio bovino em bexiga de coelhos sem o uso de CTMs, aos 30 dias havia presença de intenso infiltrado inflamatório misto, fibras colágenas mais organizadas, neovascularização e escassos feixes musculares, porém, no local do implante, não havia lâmina própria nem epitélio. Essas diferenças nas reações em cada estudo podem ocorrer pela presença dos efeitos das

CTMs diante do processo inflamatório gerado pela presença do implante.

No presente estudo, foi realizada a mensuração do processo inflamatório por meio de escores (ausente, leve, moderado, severo). Os resultados demonstraram que os processos inflamatórios no GCi e no GCe aos 15 dias PO foram semelhantes. Já aos 30 dias PO, foi constatada maior atividade inflamatória nos animais do GCi. Foi demonstrado, ainda, que houve diferença entre os 15 e 30 dias no GCi, o que não ocorreu nos animais do GCe, os quais demonstraram processos inflamatórios na região do implante vesical semelhantes aos 15 e 30 dias PO. Na análise estatística, utilizada para a mensuração da intensidade da infiltração de células inflamatórias no tecido conjuntivo, verificou-se que, para os animais avaliados aos 15 dias de pós-operatório, não houve diferença estatística entre os grupos tratados, com ambos apresentando medianas de escores 2. Já aos 30 dias, foi demonstrado que o GCe apresentou menor reação inflamatória (mediana de escore 2) quando comparado ao GCi (mediana de escore 3) (Tab. 1), com significativa diferença estatística. A Fig. 3 demonstra as lâminas histológicas dos diferentes escores encontrados nos grupos.

Tabela 1. Demonstração dos escores (1, 2, 3 ou 4), por medianas e quartis (Q), para cada campo analisado (Cp) e dentro de cada grupo tratado (GCi ou GCe), com seus respectivos períodos de avaliação. Os valores em **negrito** destacam as medianas dos escores nos grupos e suas diferenças ( $P < 0,05$ )

Grupos	Medianas (escores)	Q1	Q3	p-valor*	
Gci	Cp1	2,00	1,00	2,25	0,92**
	Cp2	2,00	2,00	3,00	
	Cp3	2,00	1,00	3,00	
	Cp4	2,00	1,75	3,00	
	Cp5	2,50	1,00	3,00	
	15 dias	2,00	1,00	2,00	< 0,01*
30 dias	3,00	2,00	3,00		
Gce	Cp1	2,00	2,00	2,00	0,90**
	Cp2	2,00	2,00	3,00	
	Cp3	2,00	2,00	3,00	
	CP4	2,00	1,75	2,25	
	Cp5	2,00	1,00	3,00	
	15 dias	2,00	2,00	3,00	0,15*
30 dias	2,00	1,25	2,00		

\*Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney.

\*\*Teste de Kruskal-Wallis.

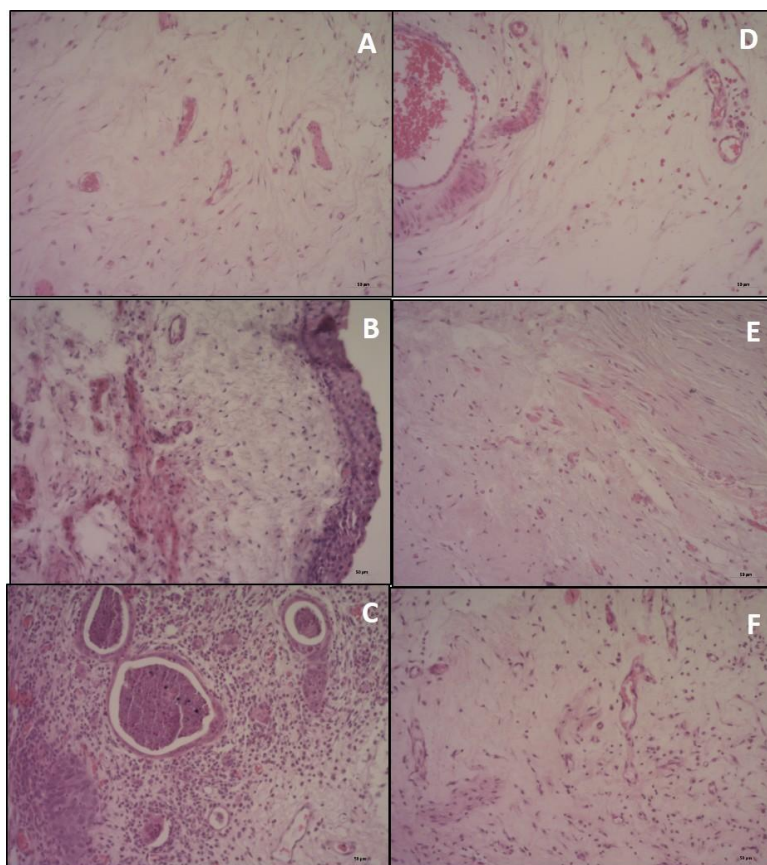


Figura 3. Demonstração dos escores inflamatórios encontrados na histopatologia de coelhas Nova Zelândia submetidas a transplante parcial de vesícula urinária. A - GCi 15d, escore leve; B - GCi 30d, escore moderado; C - GCi 15d, escore severo; D - GCe 15d, escore leve; E - GCe 30d, escore leve; F - GCe 15d, escore moderado. Observar a diferença na quantidade de células inflamatórias entre os períodos avaliados. Coloração HE. Escala 50µm.



Não foram encontrados artigos com dados específicos sobre a ação imunomoduladora das ADSCs em transplante de bexiga. Porém, Wan *et al.* (2008), após analisarem os efeitos das ADSCs em transplante de fígado em ratos, afirmaram que seus dados sugerem que as MSCs podem ser uma nova estratégia no tratamento da rejeição após transplantes de órgãos, entretanto o mecanismo do efeito modulador ainda é incerto. Franquesa *et al.* (2013) reconheceram que a fonte de onde são extraídas as células é um fator importante a ser considerado em futuros estudos clínicos. Os autores destacam que, além das MSCs derivadas da medula óssea, destacam-se as ADSCs, as derivadas do cordão umbilical, entre outros tecidos. No caso da presente investigação, foram utilizadas as ADSCs, as quais demonstraram boa capacidade imunomoduladora, bem como oriundas de uma fonte tecidual acessível e abundante na espécie estudada. Em relação ao rendimento celular durante o cultivo, foi verificado que as ADSCs possuem boas médias de proliferação e viabilidade durante as passagens, a exemplo do que constatarem Kern *et al.* (2006) e Pinto Filho *et al.* (2015).

### CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que ambos os tratamentos realizados nos coelhos foram bem-sucedidos. O GCe demonstrou melhor aceitação histológica do implante e evolução do processo aos 30 dias em relação ao GCi.

### REFERÊNCIAS

- BRANDT, F.T.; LORENZATO, F.R.; ALBUQUERQUE, C.D.C. Transplante de bexiga: estudo piloto. *Acta Cir. Bras.*, v.19, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502004000400015>>. Acessado em: 03 set. 2014.
- DALECK, C.L.M.; DALECK, C.R.; PADILHA FILHO, J.G. Cistoplastia com peritônio autólogo em cães. *Semina*, v.10, p.22-26, 1989.
- FRANQUESA, M.; HOOGDUIJN, M.J.; REINDERS, M.E. *et al.* Mesenchymal stem cells in solid organ transplantation (MiSOT) 4<sup>th</sup> meeting: lessons learned from first clinical trials. *Transplantation*, v.96, p.234-238, 2013.
- KERN, S.; EICHLER H.; STOEVE, J. *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.*, v.24, p.1294-1301, 2006.
- LAVANYA, K.; SREENU, M.; PRASAD, V.D.; SURESH, K. Acellular matrix of swim bladder for augmentation cystoplasty in rabbits. *Int. J. Agric. Sci. Vet. Med.*, v.2, p.1-13, 2014.
- LE BLANC, K.; RINGDÉN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J. Intern. Med.*, 2007, v.262, p.509-525. Available in: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17949362>>. Accessed in: 05 Nov. 2015.
- LIN, C.S.; LIN, G.; LUE, T.F. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. *Stem Cells Dev.*, v.21, p.2770-2778, 2012. Available in: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2012.0176>>. Accessed in: 20 Jul. 2014.
- MOURA, C.C.G.; CUNHA, T.C.; CREMA, V.O. *et al.* A study on biocompatibility of three endodontic sealers: intensity and duration of tissue irritation. *Iran. Endod. J.*, v.9, p.137-143, 2014.
- OLIVEIRA, L.L. *Reconstituição vesical em cães (canis familiaris): xenoenxerto com túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98%*. 2008. 61f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, RJ.
- OLIVEIRA, T.C.; SCAVONE, A.R.S.; MACHADO, M.R.F.; MAZZUCATTO, B.C. Cistoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com peritônio bovino conservado em glicerol a 98%. *Ciênc. Rural*, v.38, p.2218-2224, 2008. Available in: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000800020>>. Accessed in: 01 Jun. 2013.
- PIECHOTA, H.J.; DAHMS, S.E.; PROBST, M. *et al.* Functional rat bladder regeneration through xenotransplantation of the bladder acellular matrix graft. *Br. J. Urol.*, v.81, p.548-559, 1998.

PINTO FILHO, S.T.L.; BRONDANI, J.T.; GRAÇA, D.L.; SCHOSSLER, J.E. Restauração do diafragma de felino com enxerto autólogo de pericárdio. *Acta Cir. Bras.*, v.18, p.471-477, 2003. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502003000500014&lng=en&nrm=iso)

86502003000500014&lng=en&nrm=iso>.

Acessado em: 8 jan. 2016.

PINTO FILHO, S.T.L.; TREICHEL, T.L.E.; ARAMBURÚ JR, J.S. *et al.* Proliferação e viabilidade de células-tronco derivadas do omento maior, tecido adiposo perirrenal e bolsa adiposa interescapular em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Zootec.*, v.22, p.607-618, 2015.

PUISSANT, B.; BARREAU, C.; BOURIN, P. *et al.* Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Haematol.*, v.129, p.118-129, 2005.

SABAN, M.R.; SIMPSON, C.; DAVIS, C. *et al.* Discriminators of mouse bladder response to intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *BMC Immunol.*, v.8, 2007.

TEIXEIRA, M.W.; REZENDE, C.M.F.; SILVA JÚNIOR, V.A. *et al.* Avaliação clínica e histopatológica de alo-transplante de bexiga em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.350-357, 2007. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000200013>>. Acessado em: 10 nov. 2013.

WAN, C.D.; CHENG, R.; WANG, H.B.; LIU, T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, v.7, p.29-33, 2008.