



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

ROBERTO SANTOS LIMA

BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO PRÓTESE
ENDOUROLÓGICA EM RATOS WISTAR

RECIFE

2014

ROBERTO SANTOS LIMA

**BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO PRÓTESE
ENDOUROLÓGICA EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia
do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

ORIENTADOR

PROF. DR. SALVADOR VILAR CORREIA LIMA

PROFESSOR ASSOCIADO DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA, CCS,
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

L732b Lima, Roberto dos Santos.
Biopolímero de cana-de-açúcar como prótese endourológica em ratos wistar / Roberto dos Santos Lima. – 2014.
75 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Salvador Vilar Correia Lima.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2014.

Inclui referências e anexos.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Incrustação biológica. 3. Stents. 4. Ureteroscopia. I. Lima, Salvador Vilar Correia (Orientador). II. Título.

617.91 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-276)

“BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO PRÓTESE ENDOUROLÓGICA EM RATOS WISTAR”

ROBERTO SANTOS LIMA

APROVADA EM: 28/02/2014

ORIENTADOR INTERNO: **Dr. SALVADOR VILAR CORREIA LIMA**

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF.º Dr. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR (PRESIDENTE) CCS/UFPE

PROF.º Dr. FERNANDO RIBEIRO DE MORAES NETO – CCS/UFPE

PROF.º Dr. SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO – CCS/UFPE

PRO.º Dr. JOÃO LUIZ AMARO – FAC. MEDICINA DE BOTUCATU

PROF.º Dr. FÁBIO DE OLIVEIRA VILAR – CCS/UFPE

À minha esposa Adriana, por todo amor, dedicação, cuidado e incentivo.

Agradecimentos

Ao Professor **Salvador Vilar**, pelo apoio desde o período de residência médica. Por não ter deixado que eu desistisse desta empreitada. Por simplificar as coisas e inspirar as pessoas com sua visão científica e empreendedora. Pelo exemplo de equilíbrio entre pesquisa, ensino e assistência. Por tratar pares, alunos e pacientes com respeito e empatia.

Ao Professor **Lamartine Aguiar** pela ajuda na confecção de material para este estudo. Também pelas dicas preciosas durante os experimentos. Pela dedicação e empenho a pesquisa que influencia tantos.

Às pessoas/profissionais do Núcleo de Cirurgia Experimental, **Adriana, Paulo, Dora, Veridiana, Rodrigo e Joaquim**: indispensáveis.

À **Flávia Morone** pela imensa ajuda nas discussões, nos cálculos, nos e-mails trocados. Pelo incentivo e motivação.

Ao biólogo **Sidleley** do Serviço de Patologia do HC UFPE pela paciência e preparação do material para histologia.

Ao patologista **Eziel Rocha** por ter aceitado fazer estudo histológico de maneira dedicada e competente.

Ao amigo e farmacêutico **Valderes Almeida** e ao pesquisador **Elvis França** do Centro Regional de Energia Nuclear pela ajuda nas análises químicas.

Ao farmacêutico **Paulo André Miranda** pelo apoio nas muitas análises químicas e microbiológicas, sempre disponível, seguro e incentivador.

Ao Professor **Marcos Germano** também doutorando da UFPB, pela disponibilidade em ajudar na análise química.

Ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia, na pessoa do Professor **Álvaro Ferraz**, pela boa condução na gestão do programa e pelas cobranças importantíssimas. Aos professores que ministraram as disciplinas do curso de doutorado. A **Isabela**, secretária, pela

paciência e simpatia, pelas informações precisas e pela organização de toda nossa documentação escolar.

À minha esposa **Adriana**, pelo amor e cuidado. Por ser minha maior incentivadora. Por ter me dado condições de trabalho cuidando de nossos filhos e da nossa casa enquanto estava nas viagens para as disciplinas e experimentos e em casa nas semanas que precisei parar tudo para estudar e escrever.

Aos meus filhos **Davi** e **Miguel**, por terem entendido as tantas negativas para o: “-Papai, vamos brincar!”

Aos meus pais, **Edson Roberto** e **Leticia**, por todo o amor, esforço e cuidado dedicados a mim desde a infância. Pelo incentivo e investimento em minha educação.

À minha sogra **Marli Tenório**, também pesquisadora do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pelo incentivo, solicitude e ajuda na revisão e formatação desta tese.

À minha família mais chegada, em especial **Thiago** e **Sr. Zé Carlos**, pelas conversas e apoio. Também a **Lairce**, meus **sobrinhos, tios, tias** e **primos**.

A **Deus** por ter permitido que eu chegasse até aqui, pelas alegrias e decepções. Tenho a certeza de ter recebido D’Ele tudo que agradei acima. A Ele toda honra e glória.

RESUMO

Lima, RS. Biopolímero de cana-de-açúcar como prótese endourológica: estudo experimental. [tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

INTRODUÇÃO: Desde 2001 um grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco vem estudando um polissacarídeo produzido por síntese extracelular de bactéria (*Zoogloea sp*) sobre o melão da cana-de-açúcar. Após estudos de biocompatibilidade este biopolímero de cana-de-açúcar (BPCA) vem sendo utilizado na forma de membranas e gel em diferentes aplicações e regiões anatômicas essencialmente em pesquisas com animais de experimentação e mais recentemente aplicações clínicas como curativos na cirurgia de hipospádia. O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento deste biomaterial quando colocado em contato com a urina e o trato urinário por tempo prolongado na perspectiva de confecção de próteses endourológicas. Os biomateriais atuais dos dispositivos mais utilizados (cateter uretral de Foley e stents ureterais) não se comportam de maneira ideal, tem alto custo e morbidade no que diz respeito à formação de biofilme, incrustação, colonização por microrganismos e infecção.

MATERIAIS E MÉTODOS: Foi realizado um estudo experimental com ratos Wistar totalizando 51 animais distribuídos em cinco grupos. Realizou-se a implantação de pequenos tubos na bexiga por meio de laparotomia e os animais foram sacrificados após 3-6 meses. Grupo 1 e 3, implantação de tubos de BPCA com sacrifício após período de 3 e 6 meses respectivamente. Grupos 2 e 4, implante de tubos de poliuretano e sacrifício após período de 3 e 6 meses respectivamente. No quinto grupo nada foi implantado, mas foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico: cistotomia e cistorrafia de forma semelhante aos demais grupos. Este quinto grupo foi sacrificado após seis meses. Os tubos mediam de cinco mm de comprimento e tinham calibre de 6F. Foram construídos a partir de membranas do BPCA. Para comparação utilizou-se seções de cinco mm de um stent ureteral de poliuretano de 6F (Stent Ureteral Universa Cook Medical®). Foram analisados fenômenos macroscópicos sofridos pelo tubo, a bexiga e seu conteúdo. As bexigas foram ressecadas e analisadas histologicamente com preparações padrões de hematoxilina-eosina. Amostras de urina foram coletadas no momento do sacrifício para estudo microbiológico e o material incrustado ou cálculos foram analisados quimicamente. As variáveis analisadas foram mudança de cor do tubo, mudança de forma do tubo, presença de material orgânico aderido ao tubo, incrustação sobre o tubo, presença de cálculos e se havia alterações histológicas como reação do urotélio e resposta inflamatória na lâmina própria.

RESULTADOS: No período de três meses houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1 e 2 na variável mudança de coloração dos tubos (7 de 8 e 0 de 10, respectivamente; $p < 0,05$) e na mudança da forma do tubo (4 de 8 e 0 de 10, respectivamente; $p < 0,05$). Não houve diferença nas alterações histológicas, bem como em relação à presença de material orgânico, incrustação e formação de cálculos. No período de seis meses houve diferença na mudança de forma dos tubos nos grupos 3 e 4 (10 de 12 e 0 de 9, respectivamente, $p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à mudança de cor, material orgânico aderido, incrustação e formação de cálculos. Nas alterações histológicas o grupo 3 apresentou maior reação epitelial do que o grupo 4 com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O grupo controle não apresentou cálculos, nem alterações histológicas importantes.

CONCLUSÃO: O BPCA, no presente estudo, comportou-se de forma inferior ao material comparado quando analisados alguns fenômenos macroscópicos e microscópicos em médio prazo (alterações de cor, forma, reação epitelial). Contudo, os resultados desfavoráveis não comprometem a continuação de pesquisas com este biomaterial.

Palavras-chave: Materiais Biocompatíveis. Incrustação Biológica. Stents. Ureterosopia.

ABSTRACT

Lima, RS. Sugarcane biopolymer as endourological prosthesis: experimental study. [Thesis]. Recife: Federal University of Pernambuco, 2014.

INTRODUCTION: Since 2001, a group of researchers from the Federal University of Pernambuco has been studying a polysaccharide produced by extracellular synthesis of bacteria (*Zoogloea sp*) on molasses from sugarcane. After biocompatibility studies this biopolymer has been used as membranes and gels in different applications and anatomical regions, mainly in studies with experimental animals and more recently, in clinical applications, such as curative surgery for hypospadias. The present study aimed to evaluate the behavior of this biomaterial when placed in contact with the urine and urinary tract for prolonged time. Current biomaterials of the most used endourological devices (urethral Foley catheter and ureteral stents) do not behave ideally; they have high cost and morbidity with respect to biofilm formation, colonization, encrustation e infection.

MATERIALS AND METHODS: An experimental study with 51 Wistar rats divided into 5 groups was performed. Implantation of small tubes in the bladder was performed by laparotomy and animals were sacrificed after 3-6 months. Group 1 and 3 had a biopolymer tube implantation for a period of 3 and 6 months, respectively. Groups 2 and 4 had a polyurethane tube implantation for period of 3 and 6 months, respectively. A fifth group had no material implanted, but the same surgical procedure was performed: cystotomy and cistorrhaphy as it was done in others groups. This group was sacrificed after 6 months. The tubes measured 5mm in length and 6F in caliber. They were built from sugarcane membrane. To comparison it was used 5mm sections from a 6F polyurethane ureteral stent (Ureteral Stent Universa Cook Medical®). Macroscopic phenomena on tubes, on bladder and his content were analyzed. The bladders were resected and analyzed histologically on hematoxylin-eosin preparations. At sacrifice time urine samples were collected for microbiological study. Chemical analysis was performed on encrustation burden and uroliths. Variables were analyzed: tube's color change, tube's shape change, adhesion of organic material, macroscopic encrustation, uroliths formation and histological changes on urothelium and/or inflammatory response.

RESULTS: In 3 months, comparing groups 1 and 2, BPCA tubes were more discolored (7 of 8 and 0 of 10, respectively, $p < 0.05$) and shapeless (4 of 8 and 0 of 0, respectively, $p < 0.05$). No difference statistically significant was observed in histological changes, as well as for the presence of organic material, encrustation and stone formation. In 6 months period, comparing groups 3 and 4, BPCA tubes changed in shape (10 of 12 and 0 of 9, respectively, $p < 0.05$). There was not statistically significant difference in color change, adhesion of organic material, and uroliths formation. Group 3 showed higher epithelial reaction (epithelial hyperplasia) on histological analysis than group 4 ($p < 0,05$). The control group showed no uroliths and major histologic changes.

CONCLUSION: Sugarcane biopolymer, in this study, presented inferior performance comparing to polyurethane material evaluating some macroscopic and microscopic phenomena in medium term (changes in color, shape, epithelial reaction). However, these results do not discourage future researches in this field.

Key words: Biocompatible materials. Biofouling. Stents. Ureteroscopy.

Lista de figuras

Página

- Figura 1 - Radiografia simples da região pélvica com seta apontando grande cálculo na porção vesical de um stent ureteral. 18
- Figura 2 - Uro-Tomografia com reconstrução em 3 dimensões mostrando excreção normal a esquerda e presença de stent ureteral incrustado em sua porção renal, ureteral distal e vesical. Neste ponto encontra-se também fraturado. Há ureterohidronefrose associada. 18
- Figura 3 - Porção vesical de stent ureteral incrustado. 19
- Figura 4 - Desenho esquemático da formação biofilme e incrustação sobre um catéter urinário. A enzima urease produzida por bactérias desdobra a uréia em amônia e íon hidroxila, aumentando o pH e causando a precipitação do cálcio e magnésio em cristais de fosfato de cálcio e fosfato amoníaco magnésiano. 27
- Figura 5 - Evolução histórica dos biomateriais usados na confecção dos stents ureterais. 29
- Figura 6- Tubo de BPCA, á esquerda. Tubo de Duplo J, à direita. 34
- Figura 7 -Tempo cirúrgico de implantação de tubo de BPCA na luz da bexiga 36
- Figura 8 -Síntese da bexiga com Vicryl® 6-0 36
- Figura 9 -Visualização do tubo de BPCA por transparência da parede vesical no momento do sacrifício. 38
- Figura 10 - Grupo 1 BPCA 3 meses. Fenômenos macroscópicos. 44
- Figura 11 - Grupo 2 Duplo J 3 meses. Fenômenos macroscópicos. 44

Figura 12 - Grupo 3 BPCA 6 meses. Fenômenos macroscópicos.	45
Figura 13 - Grupo 4 Duplo J 6 meses. Fenômenos macroscópicos.	47
Figura 14 - Rato 4: HE, 400x. Epitélio e lâmina própria com arquitetura preservada.	48
Figura 15 - Rato 33: HE, 400X. Espessamento do urotélio com aumento do número de camadas epiteliais e superfície de aspecto ondulado (hiperplasia epitelial).	49
Figura 16 - Rato 35: HE, 400X. Permeação de neutrófilos em urotélio (inflamação aguda).	49
Figura 17 - Rato 34: HE, 100X. Concreções basofílicas com calcificação em invaginações do epitélio (cálculos).	49
Figura 18 - Rato 33: HE, 400X. Agregado linfóide em lâmina própria.	50
Figura 19 - Rato 10: HE, 400X. Formações glanduliformes revestidas por urotélio em lâmina própria.	50
Figura 20 - Rato 17: HE, 400X. Infiltrado linfoplasmocitário em lâmina própria, com agregado linfóide (inflamação crônica).	51
Figura 21 - Rato 27: HE, 400X. Presença de mastócitos em lâmina própria.	51
Figura 22 - Gráficos de detecção dos 3 elementos. Da esquerda para direita magnésio, fósforo e cálcio. Amostra do rato 17. No eixo vertical, ciclos por segundo por microampère (cps/ μ A); no eixo horizontal, quilo elétron volt (KeV).	53

Lista de tabelas

		Página
Tabela 1	Média de peso dos animais utilizados nos experimentos.	40
Tabela 2	Ganho e perda de peso. Pesagem antes do implante e antes do sacrifício.	41
Tabela 3	Fenômenos macroscópicos observados no momento por grupo.	43
Tabela 4	Resultados da avaliação histológica dos animais estudados.	47
Tabela 5	Resultados da avaliação microbiológica de amostras de urina dos animais estudados.	52
Tabela 6	Dos elementos químicos encontrados no material incrustado e cálculos. Expressão em ppm (partes por milhão).	53

Abreviaturas e Siglas

a.C.	Antes de Cristo
ASTM	American Society for Testing and Materials
BPCA	biopolímero de cana-de-açúcar
Ca	Cálcio
CCS	Centro de Ciências da Saúde
DJ	duplo jota
FDA	Food and Drug Administration
HE	hematoxilina-eosina
ISO	International Organization for Standardization
Mg	Magnésio
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
P	Fósforo
PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Polivinilclorido
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

Sumário

	Página	
1	Introdução	15
2	Objetivos	21
3	Literatura	22
3.1	Biopolímero de cana-de-açúcar	22
3.2	Biocompatibilidade, biofilme, incrustação, biomateriais e direcionamento das pesquisas para dispositivos urinários.	25
4	Materiais e métodos	33
4.1	Tipo de estudo	33
4.2	Locais de estudo	33
4.3	Seleção e tamanho da amostra	33
4.4	Procedimentos técnicos	34
4.4.1	Anestesia	35
4.4.2	Técnica cirúrgica	35
4.4.3	Cuidados pós-operatórios	37
4.4.4	Eutanásia dos animais	37
4.4.5	Análise histológica	38
4.4.6	Análise microbiológica	38
4.4.7	Análise química	39
4.5	Procedimentos analíticos	39

4.6	Análise estatística	39
4.7	Procedimentos éticos	39
5	Resultados	40
5.1	Características da amostra	40
5.2	Mortes	41
5.3	Fenômenos macroscópicos	42
5.4	Avaliação histológica	46
5.5	Avaliação microbiológica	52
5.6	Análise química	52
6	Discussão	54
6.1	Considerações iniciais	54
6.2	Método utilizado	54
6.3	A escolha do stent de poliuretano	57
6.4	Fenômenos macroscópicos	57
6.5	O tempo	58
6.6	Microbiologia	58
6.7	Histologia	59
6.8	Análise química	60
7	Conclusão	61
	Referências	62
	Anexos	72

1 Introdução

Desde o antigo Egito se tem referência do uso de catéteres urinários para alívio da retenção urinária. Inicialmente produzidos de papiro, foram se aperfeiçoando através dos tempos e ampliando suas aplicações¹. É creditado a Erasistratus, um fisiologista e anatomista grego no século 3 a.C. o primeiro uso do termo catéter, após utilização de um tubo metálico para tratar retenção urinária².

Houve um grande avanço com a descoberta da borracha natural, quando os catéteres começaram a se tornar flexíveis, mas ainda instáveis com as mudanças de temperatura. A industrialização trouxe a borracha vulcanizada, estável em diferentes temperaturas e flexível, por meio dos trabalhos de Charles Goodyear no século XVII. No século XX, proliferaram materiais sintéticos (borrachas sintéticas) e se diversificou o uso dos catéteres para diferentes regiões anatômicas e aplicações. Na urologia: catéter uretral de Foley, catéter de nefrostomia e stent ureteral, stent uretral, etc. Pela frequência de uso e por muitas vezes precisar permanecer implantado por longos períodos os stent ureteral e o catéter uretral de Foley são os dispositivos mais estudados.³⁻⁵

Neste estudo iremos utilizar a palavra stent quando nos referirmos ao stent ureteral. Existem outras denominações como catéter duplo j, mais utilizado em nosso meio, e *double pigtail*. A palavra “stent” já aparece nos dicionários de língua portuguesa como substantivo, mas tem sua origem como epônimo.^{6,7}

Um biomaterial é definido como qualquer substância, natural ou sintética, que usada no tratamento de um paciente faz interface com qualquer tecido.⁸

Atualmente, existem vários tipos de biomateriais para confecção de catéteres urinários: látex (polisopreno), polietileno, polivinilclorido (PVC), poliuretano, silicone e vários outros. Recentemente houve a introdução de biomateriais biodegradáveis, de mucosa intestinal suína e de tecido autólogo.⁴

Apesar do biomaterial ideal para dispositivos endourológicos ainda não ter sido descoberto, algumas características desse produto seriam:⁹

- capacidade de resistir à formação de biofilme e infecção;
- capacidade de resistir à incrustação;
- ser biologicamente inerte;
- ter estabilidade química em contato com urina;
- de fácil implantação e retirada;

- não ser propenso à migração;
- permitir ótimo fluxo;
- ser passível de esterilização;
- durável;
- radiopaco
- de baixo custo

A biocompatibilidade tem sido conceituada como estado “utópico” onde um biomaterial apresente interface com um meio fisiológico, sem trazer efeitos colaterais a este meio, nem o meio, ao material. Apesar de todos os avanços, ainda não se encontrou o biomaterial ideal para confecção de catéteres urinários, sendo a incrustação o principal problema no uso destes dispositivos em contato com a urina³.

Na América do Norte, mais de 100 milhões de dispositivos urinários entre catéteres de Foley, stents ureterais e próteses penianas são implantados a cada ano, trazendo imensa morbidade e custo.¹⁰

Nos Estados Unidos ocorrem cerca de dois milhões de infecções nosocomiais anualmente sendo 40% relacionadas ao trato urinário e 60% destas relacionadas a catéteres urinários implantados.¹¹

O catéter uretral é uma estrutura tubular e será funcional enquanto sua luz se mantiver patente. A obstrução ocorre quando a incrustação se desenvolve no lúmen do catéter. Catéteres uretrais de Foley de longa permanência desenvolvem bloqueio em 48% dos casos; e 37% desenvolvem *bypassing*, ou seja, passagem de urina ao redor do catéter. Isso resulta em dor e incontinência. Apesar de existirem alternativas menos danosas, como a permanência do catéter por via supra púbica ou o cateterismo intermitente, pacientes com catéteres de longa permanência por via uretral ainda é uma modalidade muito comum.¹²

Pacientes com catéter de Foley implantado vão desenvolver infecção em 100% dos casos num período de 30 dias. O catéter implantado torna o tratamento mais difícil e precisa ser trocado. Pode haver evolução para septicemia, com aumento de três vezes na mortalidade. Outra complicação relacionada aos catéteres uretrais de látex é a alergia, geralmente a proteínas da borracha natural. Pode se manifestar com sintomas menores, como irritações na pele, rash, espirros e coriza, mas com a continuação da exposição podem ocorrer choques anafiláticos.¹³

Várias complicações têm sido relatadas ao uso dos stents ureterais. Estes dispositivos tem seu protótipo num catéter de silicone proposto na década de 60 (com nome de *splint* ureteral) e em 1978 aparecem as primeiras publicações com as nomenclaturas de catéter ureteral *double j* e *pigtail*.¹⁴⁻¹⁸

Quando um stent ureteral incrusta, sua disfunção pode levar a hidronefrose e dor. Se prolongada, a disfunção pode haver dano renal irreversível, e se concomitante houver pielonefrite e sepse, o dano renal acontece com muito mais rapidez. Evidências recentes demonstram que no funcionamento de um stent ureteral o fluxo se dá predominantemente pelo entorno do catéter em dois terços e apenas um terço pela luz. Se grosseiramente incrustado, sua remoção torna-se um problema, sendo necessário tratamento em centros especializados com diferentes técnicas cirúrgicas.¹⁹

Um estudo analisou 141 stents ureterais já utilizados removidos de pacientes e encontrou 46,8% de bloqueio completo da luz. Este estudo também constatou que a incrustação acontece em 6% dos stents se eles ficam menos de seis semanas implantados e aumenta para 76%, se ficam implantados por mais de 12 semanas²⁰. Outro estudo mostrou taxa de 58% de incrustação em 40 stents usados²¹.

Uma das piores complicações existentes neste contexto é o stent ureteral que foi implantado e esquecido. Todas as complicações acima relatadas estarão mais pronunciadas e geralmente ficam retidos com grande volume de cálculos principalmente na porção vesical.

²² As figuras 1,2 e 3 ilustram tais situações.

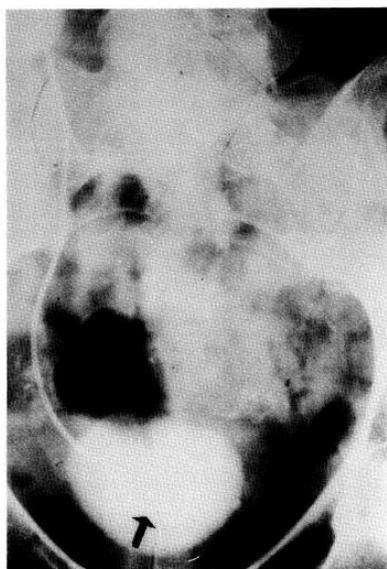


Figura 1 - Radiografia simples da região pélvica com seta apontando grande cálculo na porção vesical de um stent ureteral. Fonte: Gorman SP, Tunney MM. J Biomater Appl 1997; 12; 138p.²¹



Figura 2 - Uro-Tomografia com reconstrução em 3 dimensões mostrando excreção normal a esquerda e presença de stent ureteral incrustado em sua porção renal, ureteral distal e vesical. Neste ponto encontra-se também fraturado. Há ureterohidronefrose associada. Fonte: Singh, D., Goel, A., Ahmed, N., & Singh, B. P. Reminder of important clinical lesson: Forgotten stent leading to complex panurinary stone: single-sitting endourologic management. 2011;BMJcasereports²³

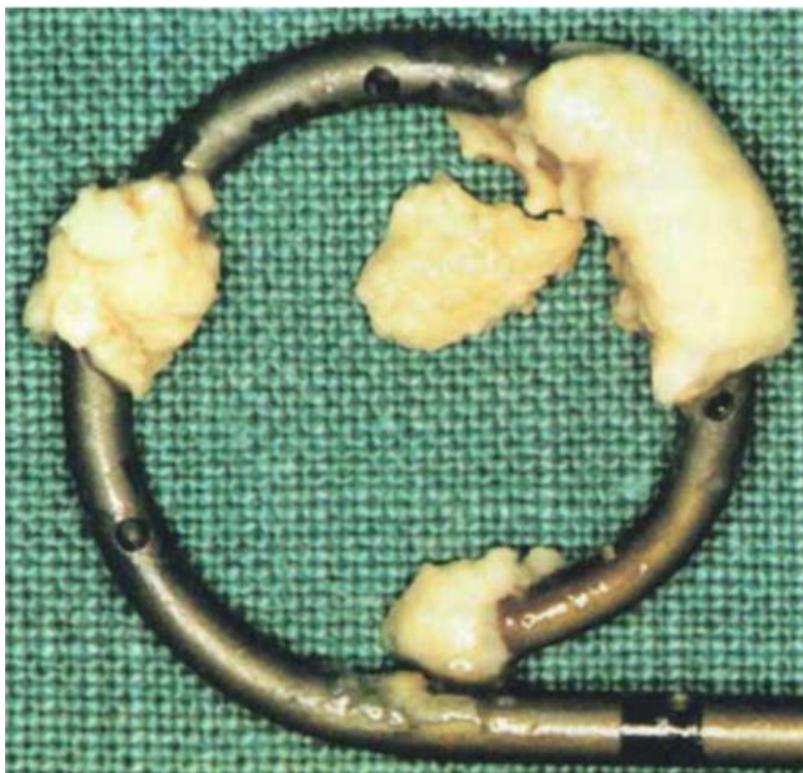


Figura 3 – Porção vesical de stent ureteral incrustado. Fonte: Keane, P. F. et al. BJU, 689p²⁴

O biopolímero da cana-de-açúcar (BPCA) é um polissacarídeo obtido por síntese bacteriana (*Zooglea sp.*) a partir de melão de cana-de-açúcar. Sua estrutura química pura é formada por diferentes monossacarídeos: glicose (87,57%), xilose (8,58%), ribose (1,68%), ácido glicurônico (0,83%), manose (0,82%), arabinose (0,37%), galactose (0,13%), ramnose (0,01%) e fucose (0,01%).²⁵

Desde 2001, o Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE vem desenvolvendo uma série de ensaios químicos com o objetivo de adequar o biopolímero, em estado de pureza, para diversas aplicações biomédicas. Até o momento, os estudos experimentais realizados com o biopolímero da cana-de-açúcar obtiveram resultados satisfatórios. O biopolímero da cana-de-açúcar aplicado em diferentes regiões anatômicas em animais de experimentação com bom desempenho tanto em se tratando de biocompatibilidade como substituto de diferentes tecidos. Mais recentemente já existem aplicações clínicas deste biomaterial publicadas que impulsiona a continuação das pesquisas, aprofundamento e diversificação dos temas já estudados.²⁶⁻⁴⁵

É neste contexto que o presente estudo foi planejado. Avaliar o comportamento do biopolímero de cana-de-açúcar em contato com a urina e o trato urinário, pois este aspecto

ainda não foi estudado e os biomateriais de uso corrente ainda não atendem às demandas como exposto acima, na perspectiva de saber se este biomaterial tem potencial para construção de próteses endourológicas.

2 Objetivos

2.1 Geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar o desempenho do biopolímero de cana-de-açúcar em contato com urina (livre na luz vesical), em modelo *in vivo*, fazendo comparação com biomaterial já utilizado na clínica.

2.2 Específicos

- Avaliar os fenômenos macroscópicos que sofreram os biomateriais implantados, a bexiga e seu conteúdo.
- Avaliar histologicamente a parede da bexiga (com ênfase na mucosa e lâmina própria) dos animais nos quais foram implantados os biomateriais.

3 Literatura

3.1 Biopolímero de Cana-de-Açúcar

Um dos primeiros trabalhos publicados utilizou membranas de biopolímero de cana-de-açúcar como curativos em feridas cutâneas de animais domésticos, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Não houve dano às feridas. Observou-se um aumento do tecido de granulação, controle de infecção e diminuição do tempo de cicatrização das feridas. ²⁶

O BPCA foi submetido a testes de citotoxicidade utilizando macrófagos alveolares, comparando com dois materiais já usados: o PTFE® (politetrafluoretileno) e telas de polipropileno. Foi determinado índice de adesividade, concentração de óxido nítrico e percentual de viabilidade celular através de ensaio do MTT. Os três testes aplicados demonstraram baixa citotoxicidade do biopolímero de cana-de-açúcar, semelhante aos materiais já usados na clínica, o que permitiu sua aplicação experimental com segurança. ²⁷

O implante de membranas de BPCA em peritônio parietal de ratos foi avaliado através de alguns fenômenos macroscópicos comparando com implantes de tela de polipropileno. Os fenômenos pesquisados foram aderências, coleções, exsudato livre, fístulas e sinais flogísticos. Não houve diferenças entre os dois materiais. ²⁸

Membranas de BPCA foram testadas do ponto de vista biomecânico avaliando a força máxima de tensão e deformação. Os testes foram realizados antes e depois de implante em subcutâneo de ratos por 180 dias. Havia um tipo de membrana com perfurações. Os melhores resultados foram para as membranas não perfuradas e naquelas que estiveram implantadas por 180 dias. ²⁹ Outro estudo avaliando também propriedade física, carga de ruptura, após implante em defeitos produzidos em parede abdominal. Foi estudado o BPCA e PTFE. Os animais foram sacrificados com 14, 28 e 60 dias. O PTFE apresentou melhor resistência à ruptura que o BPCA nos três momentos estudados. Histologicamente o BPCA se integrou melhor ao tecido sem resposta inflamatória diferentemente do PTFE. ³⁰

Membranas timpânicas de *Chinchilla laniger* foram enxertadas com enxerto livre de BPCA para reparo de perfurações crônicas, comparando com fâscia autóloga. Realizaram exames clínicos (otomicroscopia) semanais (oito semanas) e ao final, análise histológica. O biopolímero mostrou-se semelhante à fâscia autóloga como enxerto livre no tratamento de perfurações crônicas de membrana timpânicas de *Chinchilla laniger*.³¹

Um estudo experimental utilizou o BPCA em arterioplastias femorais em cães, comparando com o material já usado na clínica, o e-PTFE. Os animais foram seguidos clinicamente na primeira semana (avaliação dos pulsos femorais, avaliação da marcha, presença de tumor pulsátil, hemorragia, infecção). Após 180 dias foram submetidos à dopplerfluxometria, arteriografia transoperatória e sacrificados com anterior retirada de material para histologia. Todos os animais sobreviveram aos 180 dias. Nenhuma intercorrência foi observada na primeira semana. A resposta inflamatória encontrada foi semelhante para os dois materiais testados. O biopolímero mostrou-se um substituto adequado quando utilizado sob a forma de remendos em artérias femorais de cães. Estudo semelhante avaliou *patches* em veias femorais de cães. Também os resultados foram semelhantes ao PTFE, não houve infecção, ruptura e formação de pseudoaneurisma. Histologicamente a resposta inflamatória foi semelhante apenas com mais fibroblastos no grupo de PTFE.^{32,33} Um estudo semelhante também em cães avaliou o BPCA em veias femorais comparando também com o PTFE. Não houve complicações maiores como infecção do enxerto, ruptura, pseudoaneurisma ou trombose. A resposta inflamatória foi semelhante em ambos os grupos com invasão de fibroblastos nos *patches* de PTFE.³⁴

O BPCA foi implantado na orelha média de ratos em forma de fita de 3x1mm em comparação com fâscia autóloga após perfuração timpânica na porção tensa rente a mucosa da orelha. As orelhas com BPCA apresentaram maior reação inflamatória, comparadas às com fâscia autóloga o que diminuiu progressivamente a cada tempo de sacrifício (4, 8, 12 semanas). A fâscia foi totalmente reabsorvida por provável necrose. E as alterações locais sobre a membrana timpânica foram semelhantes.³⁵

O implante de gel de BPCA em submucosa de bexiga de coelhos por técnica aberta em comparação com biomaterial já utilizado na clínica como agente injetável para refluxo vesico-ureteral e incontinência urinária (Deflux®) foi avaliado com três dias e após três

meses. Havia poucas alterações aos três dias, mas em três meses o BPCA apresentava-se em feixes, permeado de colágeno e neovascularização de forma diferente do outro material que estava livre de células e homogêneo. ³⁶

Um fio cirúrgico composto de BPCA foi testado em bexiga de ratos Wistar utilizando uma avaliação histomorfométrica da bexiga comparando com poliglactina 910. Encontrou-se uma boa integração do material a bexiga dos ratos, com menor taxa de absorção em relação ao outro fio e maior resposta inflamatória inicial com resultados semelhantes após oito semanas. ³⁷

Em forma de gel, o BPCA foi testado na reparação de feridas feitas de maneira controlada em joelho de coelhos e não houve diferença em relação às feridas que cicatrizaram de forma espontânea tanto do ponto de vista macroscópico como histológico. ^{38,39}

Outro estudo também utilizando o BPCA em estado físico de gel, preencheu a bolsa escleral de olhos eviscerados de coelhos e encontrou bons resultados de biocompatibilidade e integração às órbitas destes animais. ⁴⁰

Uma avaliação do BPCA como matriz para células tronco mesenquimais de cordão umbilical foi conduzido. Utilizou-se a espectroscopia de impedância e microscopia eletrônica para avaliação e este biomaterial mostrou resultados promissores, com boa adesão a superfície do BPCA o que é condição para potencial crescimento e proliferação. ⁴¹

Na forma de gel o BPCA foi utilizado na reparação de defeitos em crânios de ratos. O BPCA mostrou-se ser excelente carreador de proteínas morfogenéticas na reparação de tais defeitos. ⁴²

Um estudo clínico comparando dois tipos de curativos para pós-operatório em cirurgia de correção de hipospádia. Um curativo de BPCA e outro comercialmente já utilizado de poliuretano (Tegaderm®). Eram dois grupos de 30 pacientes. Com o curativo de BPCA não houve reação local, 2m dois pacientes se desprenderam. Teve a vantagem de ser possível a lavagem 3-4 vezes ao dia com curativo in situ e ele se desprendia espontaneamente após 10-14 dias. No outro grupo houve edema importante em dois casos. ⁴³

O BPCA foi utilizado em forma de esponja hemostática para trauma renal num estudo em coelhos comparando com outro biomaterial de uso clínico (SURGIFOAM®). O grupo controle apresentou-se com maior reação inflamatória e aderências. Não houve complicações sérias no que diz respeito a biocompatibilidade, hemorragia, hematoma, fístula ou cálculos em ambos os grupos. A esponja de BPCA comportou-se de forma adequada para hemostasia e reconstrução de unidades renais controladamente traumatizadas. ⁴⁴

Alguns outros estudos foram realizados com publicações locais através de teses e congressos com utilização do BPCA em várias aplicações como por exemplo, em prega vocal de coelhos, sling em ratas, túnica albugínea em pênis de cães, dura-máter de ratos. ⁴⁵⁻⁴⁸.

3.2 Biocompatibilidade, biofilme, incrustação, biomateriais e direcionamento das pesquisas para dispositivos urinários.

Num estado de absoluta biocompatibilidade de próteses no trato urinário, o biomaterial não afeta o urotélio nem o urotélio e a urina o biomaterial. Apesar do desenvolvimento de melhores materiais para próteses do trato urinário esse estado não foi atingido. Biocompatibilidade é um processo complexo e depende de várias propriedades físicas e químicas como a composição do material, substâncias que podem ser misturadas durante a fabricação, capacidade de ser hidrofílico, a carga da superfície, a resistência a tração, o coeficiente de atrito, etc. O trato urinário representa um verdadeiro desafio para os fabricantes de catéteres e no desenvolvimento de materiais e dispositivos que possam resistir à colonização bacteriana e manter a drenagem da urina de forma eficaz. O processo de fabricação pode resultar em superfícies ásperas, especialmente em torno das regiões dos orifícios, tornando assim estes dispositivos vulneráveis a colonização e infecção por bactérias. ⁴⁹

É bem conhecida a habilidade de uropatógenos aderirem ao urotélio ou na superfície de endopróteses como evento importante na patogênese da infecção do trato urinário. Em poucas horas as bactérias podem se agregar, se multiplicar e formar matrizes de biofilme que, uma vez cercadas de glicocálix denso, podem tornar-se resistentes aos antimicrobianos e constituir um reservatório de microrganismos viáveis. A formação de biofilme é uma parte natural do ciclo de vida de microrganismos e é uma estratégia importante que os ajuda a sobreviver. ⁴⁹ O fato de microrganismos desenvolverem biofilmes em próteses implantadas

no corpo é simplesmente uma extensão do seu habitat natural na tentativa de aderir às superfícies, o que de certa forma explica porque é tão difícil de controlar este processo. Além disso, a maioria dos organismos que colonizam os dispositivos se origina a partir da pele e do trato gastrointestinal e são, portanto bem adaptados para lidar com o sistema imune. A bactéria que não é capaz de aderir e se multiplicar é lavada pela urina e não causa infecção. Infecções relacionadas ao biofilme são a principal causa de falha do dispositivo, apesar de muita pesquisa voltada para a sua prevenção e erradicação. ²⁴

Uma explicação físico-química para elucidar todo mecanismo de tais incrustações ou inibir a infecção dos biomateriais ainda não está disponível. ⁵¹

Experimentos mostram que todos os catéteres disponíveis são vulneráveis a incrustação. ^{15,52,53}

Uma forma didática de entender a formação do biofilme e incrustação segue: Vide também figura 4.

- Adsorção de proteínas sobre a superfície do biomaterial. Este processo é influenciado por forças eletrostáticas e polaridade, temperatura e composição da urina.
- Formação de um filme orgânico por deposição de eletrólitos e moléculas orgânicas sobre o substrato orgânico.
- Início de adesão de bactérias (processo reversível). Envolve interações hidrofílicas, forças eletrostáticas e mecanismos termodinâmicos.
- Crescimento bacteriano, colonização e formação de biofilme (irreversível). Há produção de uréase.
- Elevação do pH urinário e do biofilme devido à hidrólise da uréia e liberação de íons amônia e hidroxila.
- Atração de cálcio e magnésio para dentro da matriz de biofilme. Em pH alcalino a solubilidade da estruvita e da hidroxiapatita diminui.
- Estabilização do cálcio e do fosfato-amoníaco-magnésiano dentro da matriz de biofilme, formando cristais.
- Mais formação de cristais e colonização bacteriana leva a maior formação de biofilme e mais agregação de incrustação. ^{54,55}

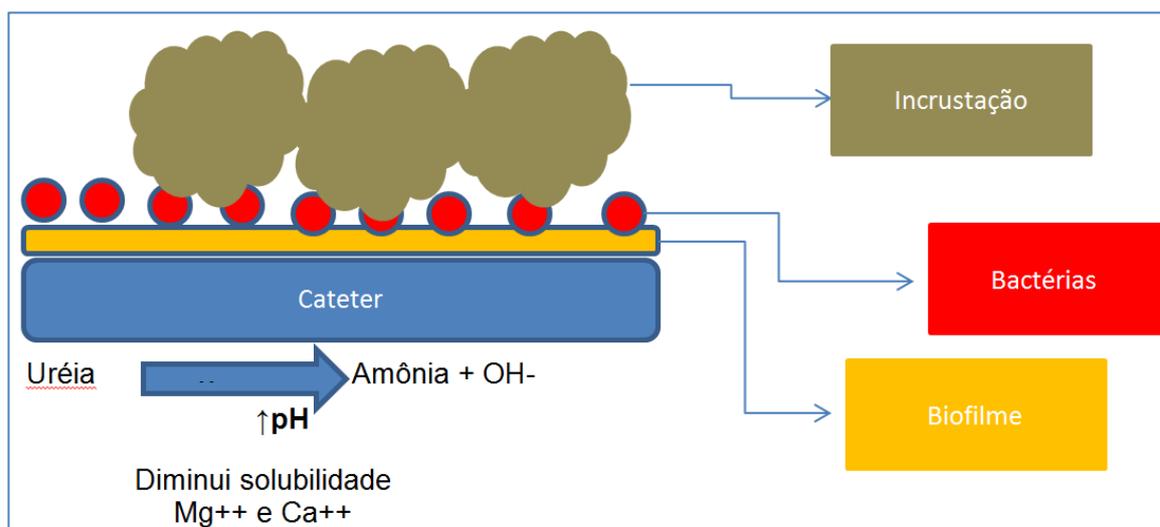


Figura 4 - Desenho esquemático da formação biofilme e incrustação sobre um catéter urinário. A enzima urease produzida por bactérias desdobra a uréia em amônia e íon hidroxila, aumentando o pH e causando a precipitação do cálcio e magnésio em cristais de fosfato de cálcio e fosfato amoníaco magnésiano. Fonte: Esquema baseado no texto de Sofer M, Denstedt JD. Current Opinion in Urology 2000, 10:563±569⁵⁴

O aparelho urinário normal tem uma série de mecanismos de defesa para se proteger contra a infecção, incluindo a lavagem regular do trato urinário com urina estéril, a presença de bactérias benéficas, tais como os lactobacilos, que impedem a colonização por bactéria patogênica além do próprio tecido epitelial conhecido como o urotélio. A falha de qualquer uma desses mecanismos de defesa do hospedeiro através de envelhecimento, processos patológicos ou a inserção de um dispositivo médico vai resultar em um indivíduo mais susceptível à colonização e infecção por bactérias patogênicas. Este fato é bem demonstrado com o catéter de Foley, que é usado para drenar a urina da bexiga. O uso de um catéter prejudica o enchimento e o esvaziamento cíclico que normalmente assegura que todas as bactérias contaminantes da urina sejam lavadas para fora. A presença do balão para manter o catéter no lugar adequado e os orifícios acima do balão fazem estagnar cerca de 10 ml de urina que atua como fonte de nutrientes para organismos contaminantes e permite o seu crescimento e proliferação.⁴⁹

O risco de infecção associada ao uso de catéter urinário de Foley aumenta em 5-8% por dia e mais de 90% dos pacientes submetidos à cateterização por longo período irá desenvolver bacteriúria dentro de quatro semanas, apesar de sistemas de drenagem fechados.

A associação entre infecção urinária e formação de cálculos foi reconhecida desde o final do século 17.⁵⁶

Estudo *in vitro* encontrou vantagem em insuflar o balão do cateter de Foley com triclosano, que se difundia através do silicone e fazia efeito antisséptico diminuindo a carga bacteriana contra diferentes patógenos⁵⁷. Outro estudo *in vitro* também encontrou superioridade de cateteres de Foley 100% silicone tratados com triclosano e de látex revestido com hidrogel e tratado também com triclosano⁵⁸.

Análise da composição da incrustação em 10 pacientes e com quatro diferentes tipos de cateter de Foley mostrou a presença do mineral estruvita ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – ortofosfato amoníaco magnésiano hexahidratado) em todas as amostras⁵⁹.

A hidroxiapatita (fosfato de cálcio) aparece como segundo cristal mais comum em incrustações e cálculos associados a cateteres urinários⁶⁰.

Em avaliações de superfície de materiais incrustados a estruvita aparece como cristais grandes em forma de Y enquanto o fosfato de cálcio pode aparecer tanto em cristais de hidroxiapatita com aspecto amorfo⁶¹.

Várias teorias têm sido sugeridas para explicar porque um material é menos propenso a incrustação do que outro. Dois estudos sugerem que a morfologia da superfície, por exemplo, de um cateter de silicone tem maior resistência à incrustação pois é lisa e não pegajosa, o que reduz a adsorção de incrustações sobre o cateter. As irregularidades da superfície podem atuar como sítios de nucleação para o crescimento de cristais e colonização bacteriana, e que incrustação é mais provável no áspero do que em superfícies lisas.^{62,62,64}

Alguns estudos focam em testar inibidores da urease para na intenção de inibir o processo de incrustação⁶⁵.

Existe alguma susceptibilidade individual. Alguns trabalhos dividiram pacientes que viviam cronicamente com cateter uretral de Foley implantado em duas categorias: “*blockers*” e “*nonblockers*”. Descobriram que os primeiros excretam urina mais alcalina, sem achar relação entre a composição da urina ou a composição do material incrustado.^{66,67}

Avaliando estas duas categorias de pacientes com cateter de Foley (“*blockers*” e “*nonblockers*”) um estudo encontrou também maior pH urinário nos primeiros, assim como

a maioria dos cálculos eram de estruvita ou hidroxapatita. Já os pacientes com melhor evolução tinham menor pH e incrustação e cálculos principalmente por oxalato de cálcio⁶⁸.

Estudos *in vitro* já testaram a possibilidade de soluções ácidas aplicadas para lavar estes catéteres *in situ* para dissolver o material incrustado com resultado satisfatório⁶⁹.

Desde sua introdução na prática urológica na década de 1970 os stents ureterais se tornaram fundamentais e largamente utilizados em obstruções ureterais por cálculo ou após cirurgia para litíase ureteral ou renal prevenir obstrução por edema ou fragmentos residuais e prevenção de estenoses tardias, nas estenoses ureterais, nas estenoses de junção pieloureteral, na fibrose retroperitoneal na desobstrução ureteral em tumores retroperitoneais ou pélvicos. São mantidos em posição correta pelo seu desenho que incorpora a ideia das extremidades enroladas com uma memória física. Disponíveis em diferentes formas e tamanhos para dar conforto ao paciente.⁷⁰

Uma variedade de polímeros tem sido testada na confecção de stents ureterais. Poliuretano e poliuretano modificado, silicone, polisobutileno, ácido polilático, ácido poliglicólico, poliéster, poliestireno, polimetilacrilato e outros. Atualmente o poliuretano é o biomaterial mais utilizado⁷¹. A Figura 5 representa de forma esquemática a evolução histórica recente destes biomateriais para confecção de stents ureterais através do tempo.

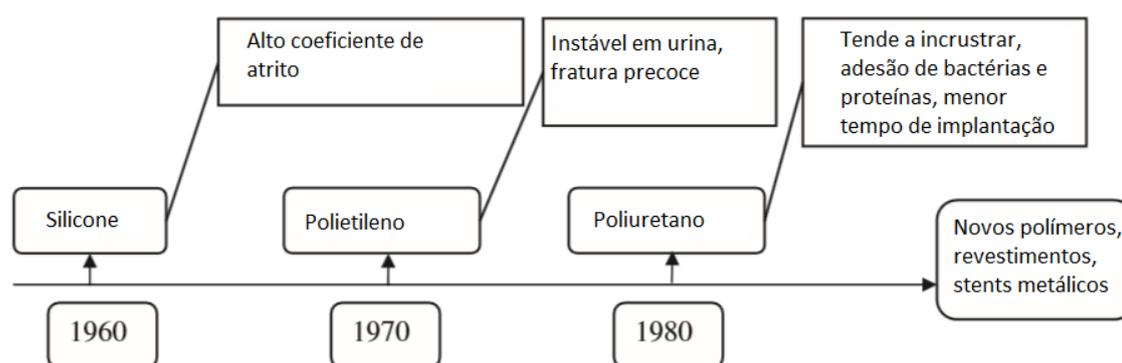


Figura 5 – Evolução histórica dos biomateriais usados na confecção dos stents ureterais. Adaptado de Venkatesan, N., Shroff, S., Jayachandran, K., & Doble, M. Polymers as ureteral stents. *Journal of Endourology*, 2010, 24(2), 191-198⁷²

O poliuretano é um membro de uma classe genérica de polímeros de condensação. Embora altamente versátil e de baixo custo em comparação com outros, poliuretano causa

maior ulceração e erosão ureteral. Silicone, composto por de silício e oxigênio, é o atual padrão-ouro com respeito a compatibilidade com os tecidos, devido à seu potencial não tóxico. Silitek® é um copolímero com base no silicone. C - Flex é um copolímero em bloco de estireno / etileno / butileno com silicone e Percuflex® é um copolímero de bloco olefínico. Tecoflex®, por outro lado, é um termoplástico alifático e não é um polímero à base de silicone . Cada um desses biomateriais tem suas particularidades e tem sido amplamente utilizados com sucesso no trato urinário.⁷²

Os biomateriais metálicos que são usados atualmente para implante tanto na uretra como no ureter são compostos de titânio ou de uma superliga de níquel / titânio (nitinol). Um estudo avaliando este material como stent uretral houve migração do stent, não remoção do stent, acúmulo de tecido de granulação em ambas as extremidades do stent, levando os autores a concluir que algumas modificações de projeto seriam necessárias⁷³.

Dos biomateriais biodegradados para confecção de stents ureterais e uretrais o copolímero de ácido L-lático e ácido glicólico na razão molar de 80:20, teve boa adaptação ao urotélio, não incrustou e foi quase totalmente degradado em 3 meses⁷⁴.

Inicialmente em modelos suínos e em estudos em fase II um stent ureteral que se degrada com o tempo vem sendo testado com resultados satisfatórios. Noventa por cento dos stents eliminados em 8 dias e 89% de satisfação dos pacientes. Desenvolvido por Boston/Microinvasive tem nome de TUDS (temporary ureteral drainage stent).⁷⁵⁻⁷⁷

O desenvolvimento de stents através da engenharia de tecidos está em fase bem inicial. A utilização de tecido autólogo teria a vantagem da biocompatibilidade inerente. Alguns estudos utilizam matrizes de polímeros como molde para semear células como condrócitos e células uroteliais para revestirem esses moldes na perspectiva de confeccionar stent ureteral e até reconstrução ureteral.^{78,79}

Existem pesquisas que focam no estudo do filme de macromoléculas (proteínas, lipídeos e polissacarídeos) que constituem a matriz na formação de um cálculo ou na incrustação, tentando entender quais macromoléculas participam deste processo, se existem diferenças na composições desses constituintes na urina ou da preferência na aderências de diferentes biomaterias à essas macromoléculas. Também a relação destas macromoléculas com a microbiologia. Este aspecto da gênese acontece numa fase anterior à formação de

cristais e várias proteínas têm sido estudadas neste processo: albumina, α 1-microglobulina, β -2 microglobulina e proteína de Tamm-Horsfall. ⁸⁰

Também existe evidência que a composição do material incrustado em stents ureterais é um bom preditor da composição de cálculos em pacientes operados por litíase, sejam cálculos a base de cálcio ou ácido úrico. O oxalato de cálcio é o principal constituinte de incrustações em formadores de cálculo. ^{81,82}

Portar um stent ureteral pode ser mórbido sem incluir os problemas relacionados a formação de incrustação, danos ao urotélio e infecção. Sintomas com polaciúria, disúria, hematúria, urgência, dor lombar podem surgir. Algumas abordagens foram tentadas para dar conforto aos pacientes com stents ureterais implantados. Do ponto de vista do design, da arquitetura, da estrutura, várias linhas de pesquisa se apresentam na literatura também com intenção de melhorar a interação com a urina e urotélio e principalmente dar conforto ao paciente, facilitar implantação e remoção e melhorar drenagem. Pode-se citar stents em espiral, extremidades mais delgadas e menos enroladas (para melhorar conforto na porção vesical), extremidades com magnetismo (para efetuar a retirada principalmente em crianças sem a necessidade de anestesia apenas introduzindo um guia também magnético na bexiga), etc. ⁸³⁻⁸⁷

Avanço mesmo houve no que diz respeito à farmacoterapia com uso de alfa-bloqueadores orais como alfuzosina e tansulosina em aliviar os sintomas ⁸⁸.

Do ponto de vista de revestimento dos dispositivos urinários uma grande variedade de agentes para revestir as superfícies de dispositivos urológicos está sendo testados. Tanto para melhorar a interação com a urina e urotélio como liberadores de substâncias como antimicrobianos, inibidores de urease ou anti-inflamatórios. Um revestimento de superfície que foi muito estudado em urologia foi para o revestimento do catéter de Foley com prata. Os hidrogéis são os revestimentos mais comumente usados para os dispositivos do trato urinário. Os hidrogéis são compostos de um polímero hidrofílico que permite que a água fique presa na estrutura química. Isto reduz o coeficiente de atrito do material e melhora a biocompatibilidade, reduzindo a irritação e a adesão celular por atrito na interface com o tecido. Além disso, há alguma evidência de que os revestimentos de hidrogel reduzem incrustação. ⁸⁹⁻⁹⁵

Outras substâncias têm sido utilizadas para revestir a superfície de stents como glicosaminoglicanos (polisulfato de pentosan, heparina), inibidores de urease, enzimas que degradam oxalato, antimicrobianos. Todos estes artifícios têm seu fundamento no entendimento do mecanismo de formação do biofilme, colonização microbológica e incrustação, tentando inibir este processo atuando em diferentes etapas. ⁹⁶⁻⁹⁸

Estudo interessante e com bons resultados foi de um stent ureteral com um anti-inflamatório carregado na sua superfície para liberação quando implantado. Foi utilizado o cetocoralaco. Resultados satisfatórios em relação ao desconforto e dor principalmente em homens, com menor utilização de analgesia oral. ⁹⁹

Pesquisa e desenvolvimento são essenciais para superar muitas das complicações associadas com dispositivos urológicas atuais. A morbidade para os pacientes e os custos para os sistemas de saúde que resultam da utilização de cateteres urinários de longo prazo são inaceitáveis. ⁴⁹

4 Materiais e Métodos

4.1 Tipo de estudo

Estudo experimental com as amostras alocadas em grupos de forma aleatória.

4.2 Locais de estudo

As etapas experimentais ocorreram no Núcleo de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia, do Centro de Ciências da Saúde – CCS/UFPE, na sala de microcirurgia e biotério de experimentação e no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas UFPE. Esterilização por raios gama no Departamento de Energia Nuclear da UFPE. Análise microbiológica e físico-química realizada no Laboratório Paulo Miranda – laboratório privado, Caruaru-PE. Análise química no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste CRCN-NE, órgão do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação, Recife-PE.

4.3 Seleção e tamanho da amostra

Foram utilizados no estudo 51 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, procedentes do Biotério de Nutrição e transferidos para o Biotério de Experimentação do Núcleo de Cirurgia Experimental, ambos da Universidade Federal de Pernambuco. Foram distribuídos da seguinte forma:

- Grupo 1 – 10 animais operados e tubos de BPCA implantados. Sacrificados após 3 meses.
- Grupo 2 – 10 animais operados e tubos de Duplo J implantados. Sacrificados após 3 meses.
- Grupo 3 – 13 animais operados e implantados com tubos de BPCA. Sacrificados após 6 meses.
- Grupo 4 - 9 animais operados e implantados com tubos de Duplo J. Sacrificados após 6 meses.
- Grupo controle – 9 animais operados sem implante. Sacrificados após 6 meses.

4.4 Procedimentos técnicos

Os animais passaram período de 6 meses de adaptação, crescimento e desenvolvimento, na perspectiva de terem uma anatomia mais favorável para as intervenções cirúrgicas. Ficaram em gaiolas coletivas nesse período com, no máximo, quatro animais, com piso maravalha, com controle de temperatura e umidade, ciclo dia-noite artificialmente estabelecidos em 12 por 12 horas, livre acesso à água potável e ração Labina® *ad libitum*.

Todos os procedimentos tiveram supervisão veterinária, de acordo com normas institucionais do Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE), Departamento de Cirurgia, Centro de Ciências da Saúde - CCS, UFPE.

Como material para implantação na bexiga dos ratos foram usados pequenos tubos de 5 mm de comprimento com 6F de diâmetro externo, confeccionados artesanalmente a partir de membranas de biopolímero de cana-de-açúcar (figura 6). Para comparação utilizou-se secções transversais de 5mm de stents ureterais de poliuretano 6F (Stent Ureteral Universa, Handle Cook®), produto de muito utilizado na clínica para implantação e drenagem por 6 meses, figura 6. Foram utilizadas duas unidades adquiridas com recursos próprios.

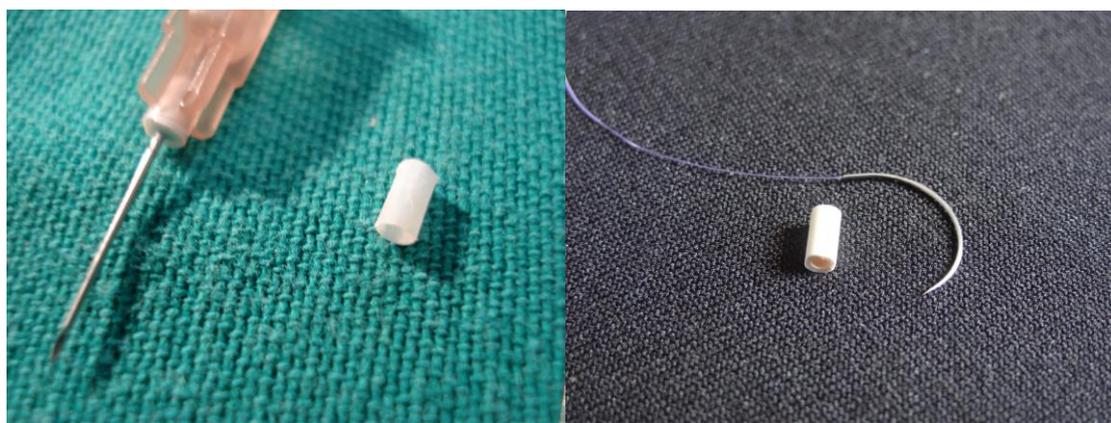


Figura 6 - Tubo de BPCA, á esquerda. Tubo de Duplo J, à direita. Fonte: Do autor

Todos os tubos foram esterilizados com radiação gama (γ) no Departamento de Energia Nuclear da UFPE. Os cinco grupos de animais foram submetidos aos mesmos procedimentos de anestesia, intervenção cirúrgica, cuidados pós-operatórios e

sacrifício, diferindo exclusivamente no material implantado na bexiga. O controle também foi submetido às mesmas intervenções diferindo a não implantação de material na bexiga. Apenas a cistotomia e síntese da mesma forma dos demais.

O estudo foi dividido em duas etapas: a primeira etapa consistiu na realização de uma laparotomia mediana, com cistotomia e implantação na luz da bexiga livre dos materiais propostos. Na segunda etapa, após período de 3 a 6 meses dependendo do grupo os animais retornaram à sala de experimentos e foram sacrificados para a ressecção da bexiga e recuperação do material implantado e do seu conteúdo para análise. No total foram realizados 98 experimentos, sendo 42 cirurgias para implantação dos materiais, 9 cirurgias no grupo controle sem implantação, 46 cirurgias na ocasião do sacrifício e uma necropsia.

4.4.1 Anestesia

Antes da anestesia os animais foram pesados e identificados numericamente. Após jejum de 12 horas, os animais foram pré-medicados com sulfato de atropina, na dose de 0,44mg/100g por via subcutânea e anestesiados com uma mistura de xilazina 2% e ketamina 5% na proporção de 1:1, na dose de 0,2 ml para cada 100g de peso por via intramuscular. Durante o ato cirúrgico recebiam oxigênio suplementar.

4.4.2 Técnica cirúrgica

O animal era colocado na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, após tricotomia dos pelos da região abdominal, submetido à antissepsia com Povidine®. Após aposição de campo estéril incisão infra-umbilical de 4cm e dissecação roma até a cavidade peritoneal. A bexiga era identificada e reparada com ponto de poliglactina 910 (Vicryl 6-0®) na cúpula. Incisão de cerca de 6-7mm era realizada na cúpula e introdução do tubo sob visão direta como ilustra a Figura 7. Rafia da cúpula com sutura contínua com o mesmo fio como ilustra a Figura 8. Toailete de alguma urina na cavidade peritoneal e fechamento em 2 planos com pontos separados de cat gut cromado 4-0 (aponeurose e pele). Aplicava-se sobre a ferida já suturada pequena quantidade de Povidine® degermante.

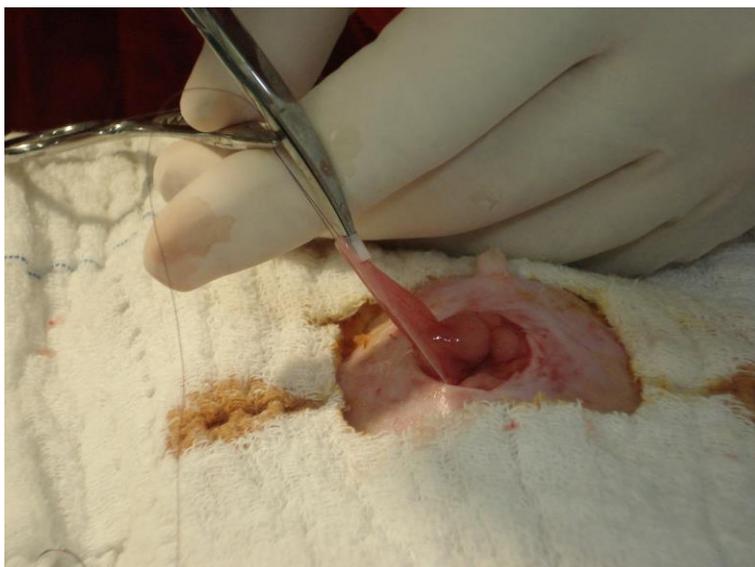


Figura 7- Tempo cirúrgico de implantação de tubo de BPCA na luz da bexiga



Figura 8 - Síntese da bexiga com Vicryl® 6-0

4.4.3 Cuidados pós-operatórios

Os animais eram encaminhados para as gaiolas individuais com decúbito levemente elevado, permanecendo aquecidos sob fonte luminosa nas primeiras horas do pós-operatório. Na primeira semana receberam avaliação diária e após o oitavo dia, avaliação semanal. A avaliação consistiu na observação do nível de vigília do animal, sua atividade motora, ingestão alimentar e hídrica, o estado da ferida cirúrgica quanto à cicatrização e a existência de sangramentos, hematomas, deiscência e infecção.

4.4.4 Eutanásia dos animais

Por ocasião do sacrifício, os animais foram pesados novamente e receberam dose letal de anestésico intraperitoneal. Depois de anestesiados, eram colocados sobre a mesa cirúrgica em decúbito dorsal, submetido à procedimento de antisepsia e assepsia, e através de laparotomia em U invertido era realizado inventário da cavidade peritoneal. A bexiga era puncionada e aspirada para coleta de urina para avaliação microbiológica com seringa estéril de 1ml. Em seguida era procedido com dissecação da bexiga e cistectomia. A bexiga era aberta no sentido longitudinal com introdução de tesoura através da uretra. Verificada sua aparência macroscópica e do seu conteúdo, (tubos, cálculos, incrustações, material orgânico) e o material recuperado era acondicionado em tubo seco e estéril. A figura 9 ilustra momento antes da cistectomia com tubo de BPCA visto por transparência.

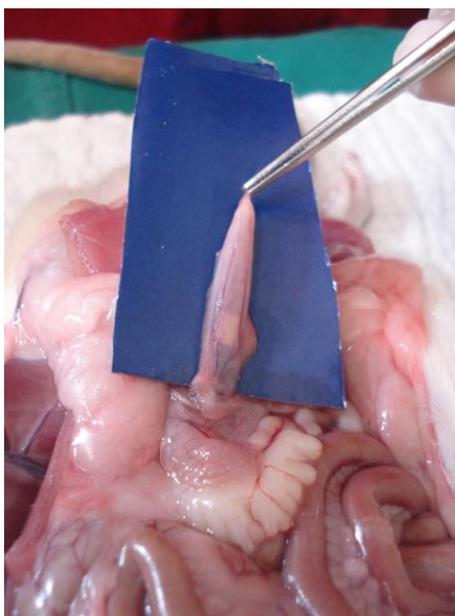


Figura 9 - Visualização do tubo de BPCA por transparência da parede vesical no momento do sacrifício.

4.4.5 Análise histológica

As bexigas abertas foram posicionadas sobre pedaço de papel vegetal para impedir contração do tecido que era delgado e facilmente se dobrava. Em seguida foram colocadas em formalina a 10%, tamponada. O material (bexiga) coletado foi preparado em parafina para posterior preparação de lâminas para análise histológica, com coloração em Hematoxilina e Eosina. A avaliação histopatológica foi realizada por um único patologista.

4.4.6 Análise microbiológica

As amostras de urina foram semeadas em meio MacConkey e ágar sangue rico (meio de Casoy com 5% de sangue de carneiro desfibrinado) a 35°C por 18 a 24 horas em aerofilia, sendo feita a leitura após 24 horas. Os meios utilizados permitem a identificação de bactérias gram-positivas e gram-negativas, realizada em nível de gênero e espécie através de provas bioquímicas.

4.4.7 Análise química

O material incrustado e cálculos passaram por análise físico-química qualitativa pelo teste Cálculo Renal - Bioclin® registro Anvisa 10269360091.

Os elementos químicos do material de incrustação e cálculos recuperados no sacrifício também foram analisados por espectrômetro de fluorescência de raios x por energia dispersiva – EDX720, Shimadzu®.

4.5 Procedimentos analíticos

A amostra foi caracterizada com peso em gramas no momento da primeira cirurgia.

Os fenômenos macroscópicos constituíram 5 variáveis categóricas: mudança de coloração do tubo, mudança de forma, presença de material orgânico, incrustação e formação de cálculos. Essas variáveis foram expressas em forma de frequência (proporção) em cada grupo. A avaliação histológica também se deu sob a forma de categorias se havia ou não alterações histológicas.

4.6 Análise estatística

Foi calculado a média e desvio padrão do peso em gramas de cada grupo e a perda ou ganho de peso entre a cirurgia e o sacrifício, também expressos com média e desvio-padrão. As comparações foram entre os grupos foram feitas através de teste t de Student e o teste de Tuckey para comparações múltiplas. As variáveis categóricas entre os grupos foram comparadas através do teste exato de Fisher. Aceitou-se como força da verdade probabilidades com valores menores que 5%. Como suporte para o tratamento estatístico foi utilizado o programa EpiInfo 6.0 e Microsoft Excel (Microsoft USA).

4.7 Procedimentos éticos

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da UFPE (CCB), conforme documento (Anexo A).

5 Resultados

5.1 Características das amostras

Os pesos dos animais de todos os grupos usados nas cirurgias de implantes dos tubos variaram de 260 g a 589 g, como demonstrado na Tabela 1. Houve diferença estatística entre o Grupo 1 e os demais, entre o Grupo 2 e o controle e entre o Grupo 4 e o controle. Todos os grupos com implante de tubos tiveram perda de peso na média sem diferença entre os grupos. O grupo controle apresentou ganho e diferença estatística em relação aos outros grupos como mostra a Tabela 2.

Tabela 1 – Média de peso dos animais utilizados nos experimentos.

Peso dos animais em gramas	Grupos (Número de animais)				
	G1 (10)	G2 (10)	G3 (13)	G4 (9)	Controle (9)
Média aritmética	515	451,2	424,76	463,22	356
±Desvio Padrão	±40,91	±64,95	±52,97	±42,92	±99,42
Mínimo/máximo	449-580	380-589	350-539	449-527	260-511
Valor de p	<i>p < 0,05 G1 vs G2.G3.G4.Controle; G2 vs Controle; G4 vs Controle</i>				
	<i>p > 0,05 G2 vs G3.G4; G3 vs G4; G3 vs Controle</i>				

Tabela 2 – Ganho e perda de peso. Pesagem antes do implante e antes do sacrifício.

		G1	G2	G3	G4	Controle
Peso (g)	Média	515	451,2	424,76	463,22	356,0
Implante	±DP	±40,91	±64,95	±52,97	±42,92	±99,42
Peso (g)	Média	495,75	434,5	413	450,44	397,57
Sacrifício	± DP	±33,93	±53,46	±41,95	±42,13	±104,91
Diferença ganho ou perda (g)	Média	-17	-16,7	-10,55	-12,77	45,71
	± DP	±14,2	±13,7	±16,3	±20,0	±9,5
Valor de p		<i>p < 0,001 G1G2G3G4 vs controle</i>				
		<i>p > 0,05 G1 vs G2G3G4, G2 vs G3G4, G3 vs G4</i>				

5.2 Mortes

Houve cinco mortes no total de 51 animais (9,8%). Todas as mortes ocorreram dentro das 24h seguintes à cirurgia. Nenhuma morte ocorreu no grupo de implantação do tubo de Duplo J. Foram duas mortes no grupo 1, uma morte no grupo 3 e duas mortes no grupo controle. Comparações entre as diferenças não se encontrou significância estatística. (grupo 1 vs grupo 2 $p=0,473$; grupo 3 vs grupo 4 $p=1$; grupo 3 vs grupo controle $p=0,544$; grupo 4 vs grupo controle $p=0,470$). Só foi realizada a necropsia de um animal (rato 29), no qual não foi encontrado qualquer tipo de lesão anatômica.

5.3 Fenômenos macroscópicos

Os fenômenos macroscópicos observados no momento do sacrifício dos animais foram agrupados em cinco categorias: mudança de coloração do tubo (MC), mudança na forma do tubo (MF), presença de material orgânico/amorfo aderido ao biomaterial (MO), incrustação macroscópica (INC) e presença de cálculos (CALC), apresentados na Tabela 3.

No período de 3 meses houve mudança de coloração na maioria dos tubos de BPCA do Grupo 1 em comparação com grupo 2 (7 de 8 e 0 de 10 respectivamente com $p=0,0007$). Também houve diferença quanto a mudança de forma dos tubos que só aconteceram com os tubos de BPCA (4 de 9 e 0 de 10 respectivamente com $p=0,022$). Quanto a material orgânico, incrustação e presença de cálculos não houve diferença como pode ser visto na tabela 2.

No período de 6 meses houve diferença estatisticamente significante entre os grupos 3 e 4 na variável mudança de forma (10 de 12 e 0 de 9, respectivamente, com $p=0,0002$). Quanto à mudança de cor, material orgânico, incrustação e presença de cálculos não houve diferença como pode ser visto na tabela 3. No rato 21, por ocasião do sacrifício e abertura da bexiga, não foi encontrado o tubo de BPCA implantado. Realizamos inventário da cavidade peritoneal sem nenhum achado importante.

Apenas um tubo apresentou-se incrustado por ocasião do sacrifício, no rato de número 3, do grupo 1, e ainda havia um cálculo único associado. Esse cálculo, assim como o material que incrustou, tinha coloração pardo-amarelada e superfície com reentrâncias. Mais outros dois animais se apresentaram com cálculos formados. Um no grupo 2, esse com cálculos múltiplos, de variados tamanhos, pardo-amarelados, espiculados, mucosa vesical hiperemiada, algum conteúdo sanguinolento (rato 17) e outro no Grupo 4 (rato 34), com cálculos múltiplos e arredondados, como que esculpido pelo tempo, de coloração mais clara. No grupo controle não se encontrou nenhuma formação de material orgânico ou cálculos.

Tabela 3 – Fenômenos macroscópicos observados no momento por grupo

Grupos	n	Morte	MC	MO	MF	INC	CALC
G1	10	2	7	2	4	1	1
G2	10	0	0	3	0	0	1
valor p G1 vs G2		0,473	0,0007	1	0,022	0,444	1
G3	13	1	11	0	10	0	0
G4	9	0	7	1	0	0	1
valor p G3 vs G4		1	0,553	0,428	0,0002	NA	0,428
GC	9	2	NA	NA	NA	NA	NA
valor p G3 vs GC		0,544	NA	NA	NA	NA	NA
valor p G4 vs GC		0,470					

Legenda: n = número de animais; G1=Grupo1 e assim por diante; GC=Grupo controle;

MC = mudança de cor; MO =Material Orgânico Aderido; MF = Mudança de forma;

INC= Incrustação no material; CALC =Presença de cálculos; NA=não se aplica

As figuras de 10 a 13 ilustram os achados no momento do sacrifício. Houve danos nos arquivos das fotografias dos animais do grupo 2, rato 15 e 19.

O anexo B traz tabela com todos os animais e eventos.



Figura 10 – Grupo 1 BPCA 3 meses. Fenômenos macroscópicos. Fonte: do autor.



Figura 11 – Grupo 2 Duplo J 3 meses. Fenômenos macroscópicos.

Fonte: Do autor

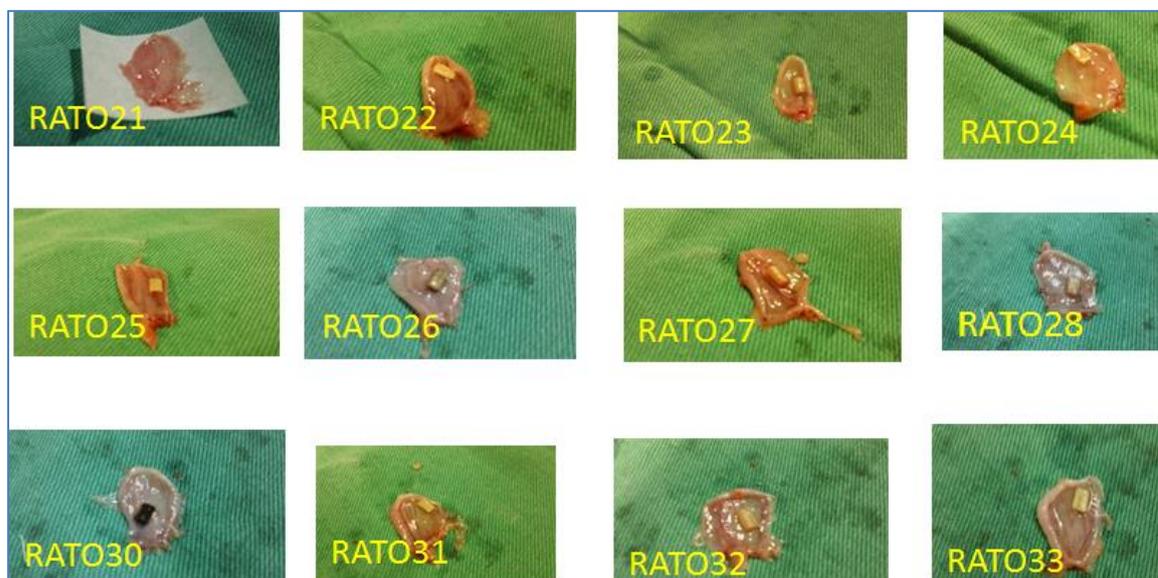


Figura 12 – Grupo 3 BPCA 6 meses. Fenômenos macroscópicos.

Fonte: Do autor.

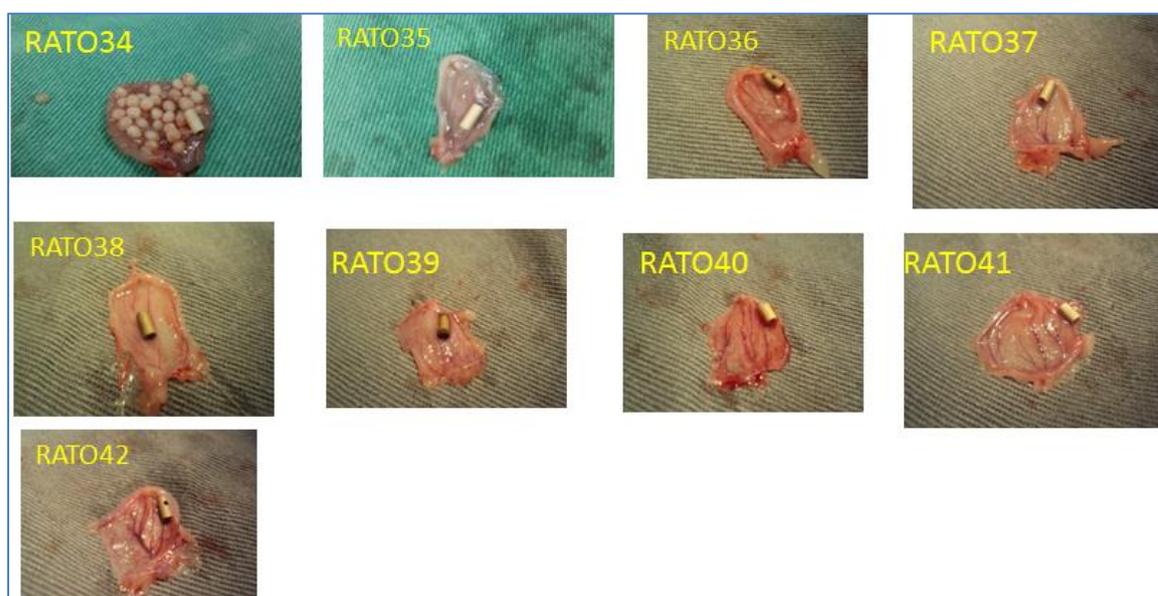


Figura 13 – Grupo 4 Duplo J 6 meses. Fenômenos macroscópicos.

Fonte: Do autor.

5.4 Avaliação Histológica

Quarenta e seis dos 51 ratos estudados tiveram suas bexigas ressecadas e processadas para avaliação histológica. Em 23 animais não houve alterações e foram encontradas alterações histológicas importantes também em 23 animais, todas elas consideradas benignas, sem nenhuma atipia. As alterações tinham duas naturezas: na camada epitelial (urotélia) todas elas consideradas reativas à agressão recebida, pelos próprios tubos, infecções secundárias ou agressões pela presença de cálculos e incrustação; ou na lamina própria com achados de células da resposta inflamatória. Na primeira situação havia espessamento do urotélia, ondulações, crescimento papilar e às vezes tipos mais específicos com formação de invaginações e nichos chamada de cistite cística. Na segunda situação eram encontradas células inflamatórias como neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, mastócitos. Algumas preparações histológicas são apresentadas para ilustração nas figuras de 14 a 21.

No período de 3 meses não houve diferença entre os grupos 1 e 2. Os dois grupos tiveram 5 animais cada com histologia dentro dos limites da normalidade e as alterações encontradas, entre elas maior número de animais no grupo 2 com inflamação, não foram diferentes estatisticamente como mostra a Tabela 4. Ainda no grupo de 3 meses o rato 3 que apresentou cálculo e incrustação exibia várias alterações como inflamação aguda, cistite cística e hiperplasia epitelial. O rato 17 do Grupo 2, tinha cálculo e cultura positiva (*Staphylococcus epidermidis*). Exibia na histologia inflamação crônica, cistite cística e agregados linfoides como ilustrado na figura 17.

No período de 6 meses, o Grupo 4 tinha quatro animais com histologia normal contra dois do grupo 3, mas não houve diferença estatística entre eles. Também não houve diferença quando se avaliou a reação inflamatória. Quanto a agressão epitelial havia dez animais no grupo 3 contra três no grupo 4 com diferença estatística ($p=0,031$). O animal 34 tinha cultura negativa e tinha cistite cística, agregados linfoides e presença de mastócitos.

Em todos os grupos alguns animais apresentavam alterações focais e isoladas num tecido com arquitetura e celularidade preservada nas demais regiões, e não foram consideradas alterações significativas. Eram agregados linfoides, mastócitos, eosinófilos.

Tabela 4 – Resultados da avaliação histológica dos animais estudados.

Grupos	n	Mortes	Normal	Alteração epitelial	Reação inflamatória	Ambas as alterações
G1	10	2	5	3	1	1
G2	10	0	5	4	4	3
Valor de p G1 vs G2			0,66	1	0,31	0,58
G3	13	1	2	10	2	2
G4	9	0	4	3	2	0
Valor de p G3 vs G4			0,33	0,031	1	0,48
GC	9	2	7	0	0	0
Valor de p G3 vs GC			0,0007	0,0007	0,508	NA
Valor de p G4 vs GC			0,033	0,21	0,475	NA
Total	51	5	23	20	9	6

Legenda: n = número de animais; G1=Grupo1 e assim por diante; GC=Grupo controle.

NA=não se aplica

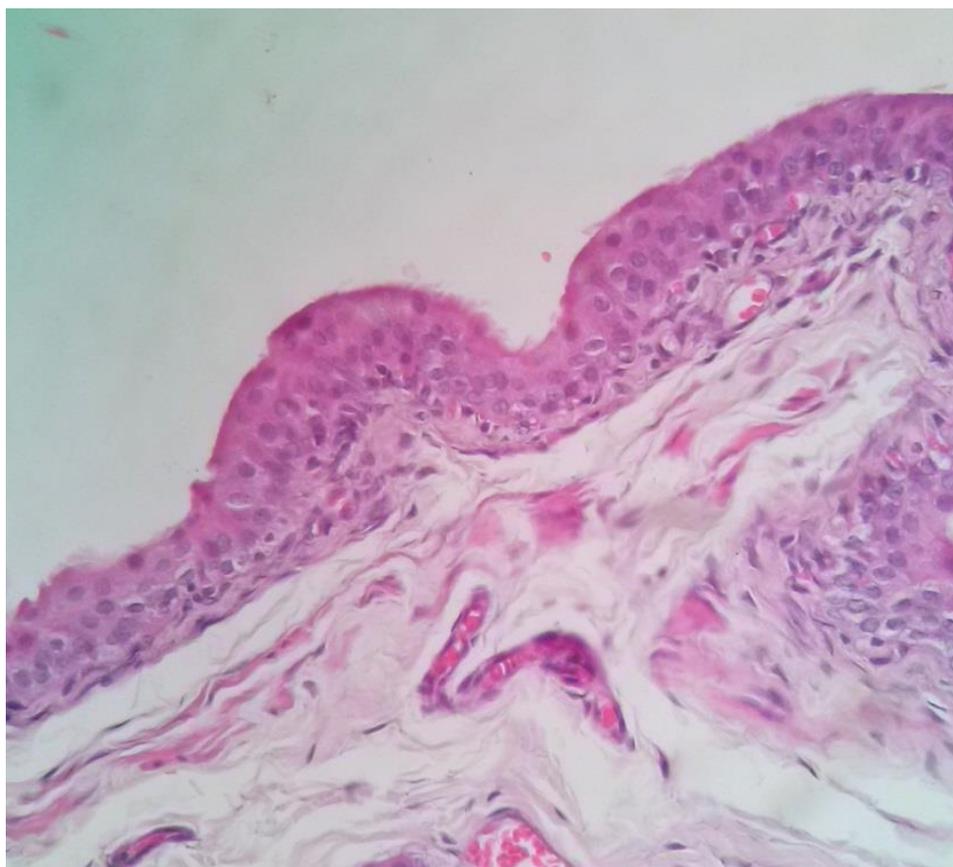


Figura 14 – Rato 4: HE, 400x. Epitélio e lâmina própria com arquitetura preservada.

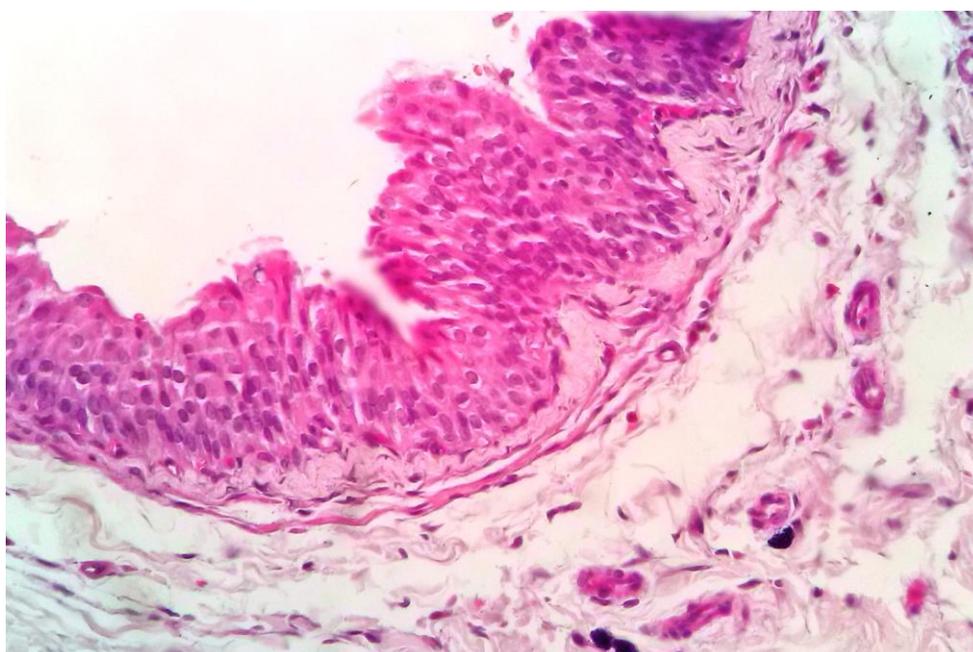


Figura 15 - Rato 33: HE, 400X. Espessamento do urotélio com aumento do número de camadas epiteliais e superfície de aspecto ondulado (hiperplasia epitelial).

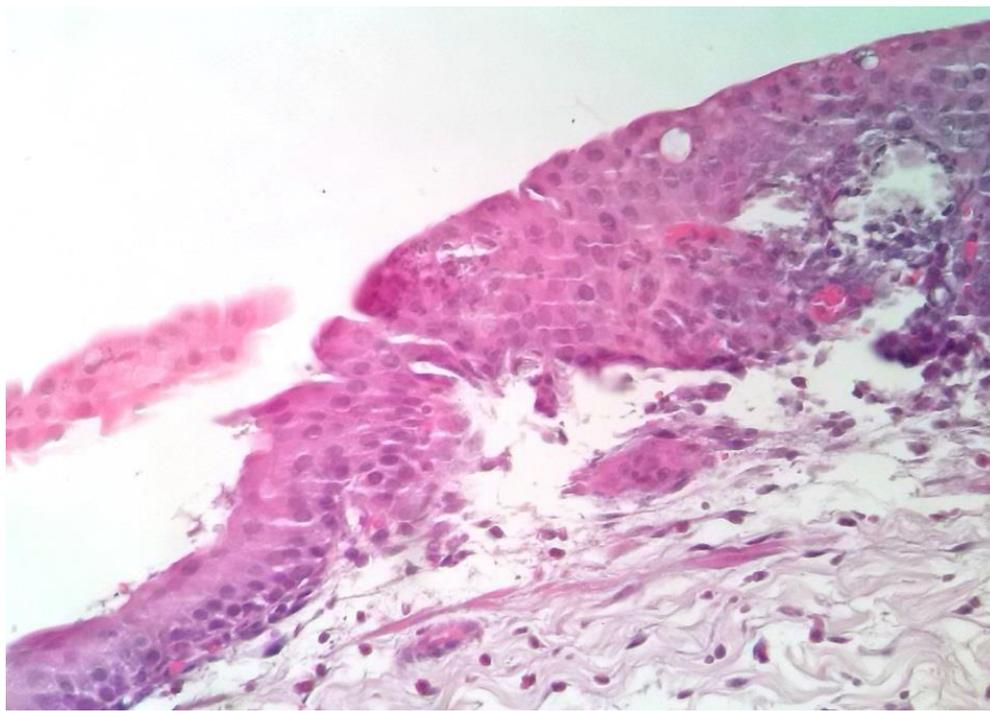


Figura 16 – Rato 35: HE, 400X. Permeação de neutrófilos em urotélio (inflamação aguda).

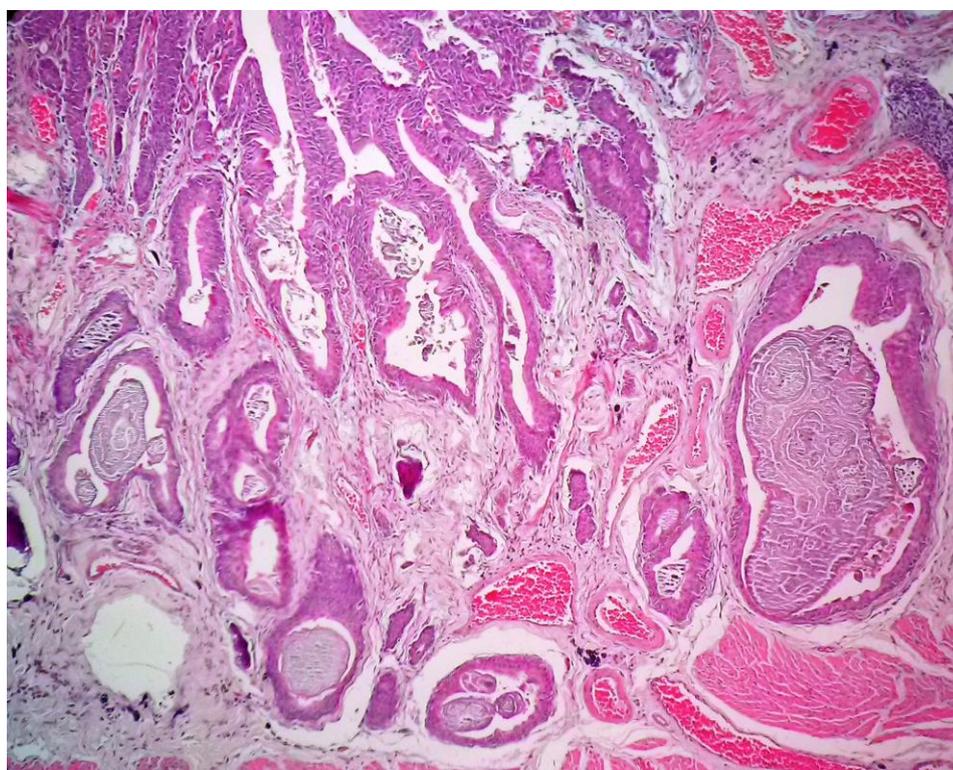


Figura 17 – Rato 34: HE, 100X. Concreções basofílicas com calcificação em invaginações do epitélio (cálculos).

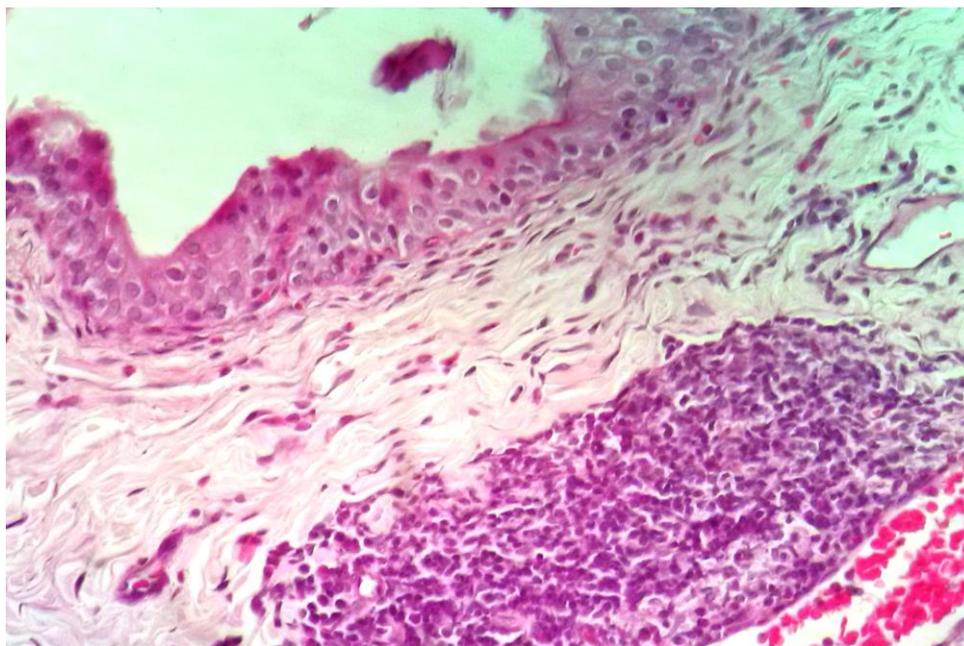


Figura 18 - Rato 33: HE, 400X. Agregado linfóide em lâmina própria.

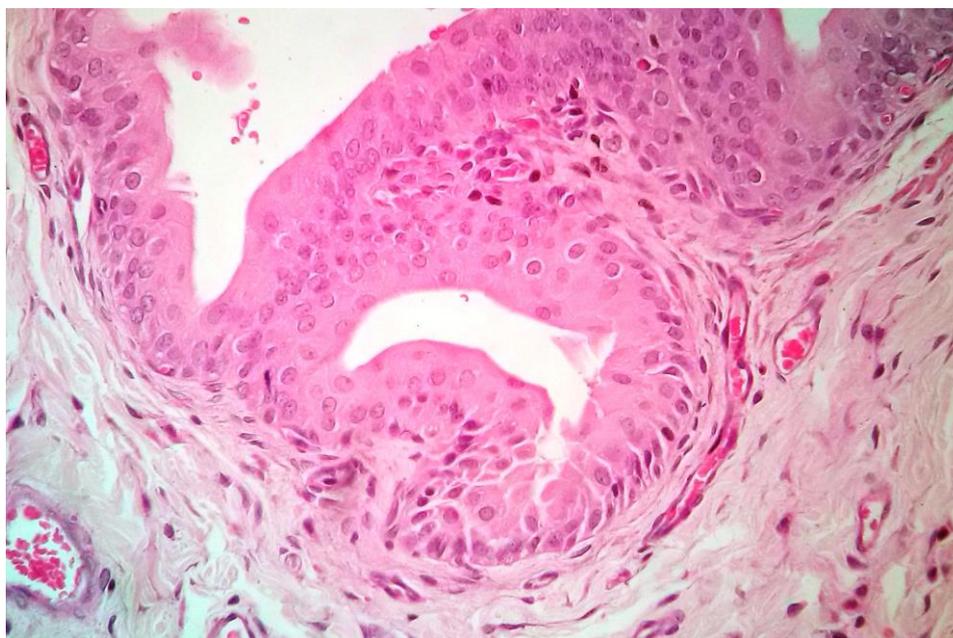


Figura 19 - Rato 10: HE, 400X. Formações glanduliformes revestidas por urotélio em lâmina própria.

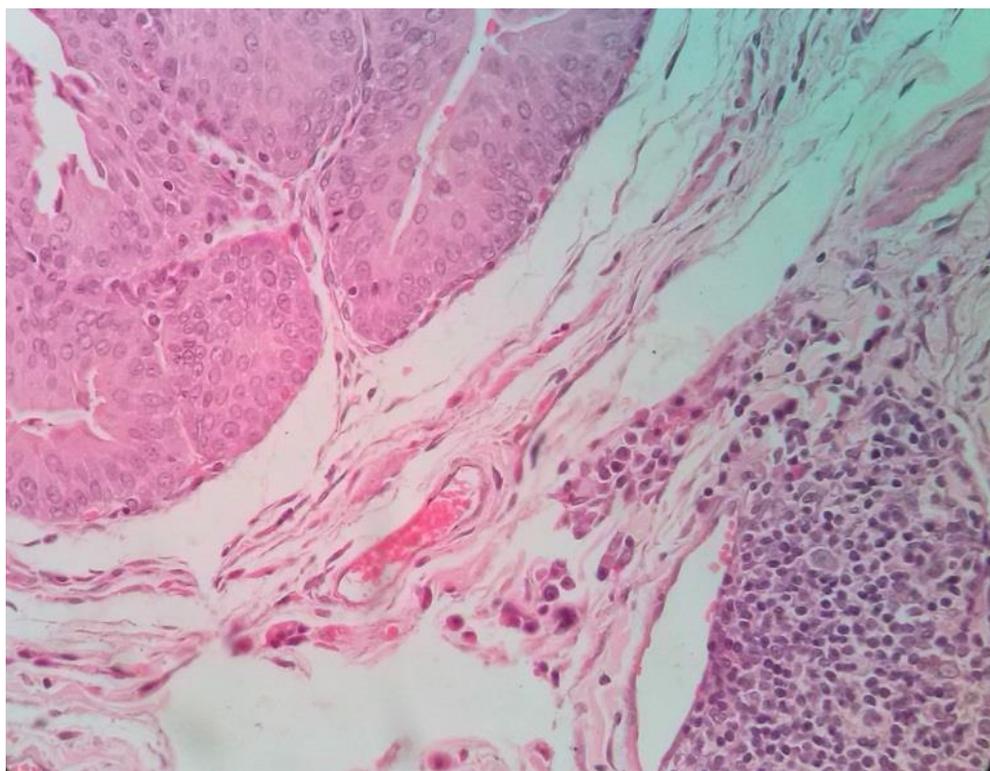


Figura 20 – Rato 17: HE, 400X. Infiltrado linfoplasmocitário em lâmina própria, com agregado linfoide (inflamação crônica).

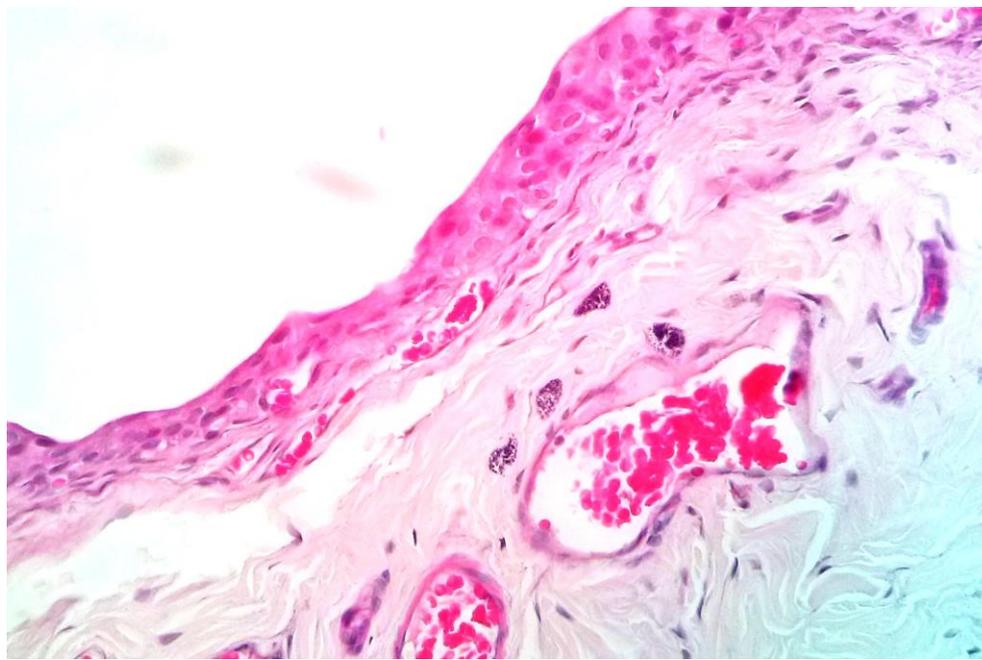


Figura 21 - Rato 27: HE, 400X. Presença de mastócitos em lâmina própria.

5.5 Avaliação microbiológica

Na ocasião do sacrifício foi conseguido 36 amostras de urina, do total de 51 animais, 71% de amostragem. Considerando apenas os animais vivos, 78% de amostragem. Considerando os grupos 1, 2, 3, 4 e controle foi conseguido amostra de urina com cultura em 80%, 100%, 92%, 56% e 11%, respectivamente. No total foram seis animais com cultura de urina com crescimento bacteriano (11,76%). Os grupos 2 e 3 apresentaram os maiores percentuais (20 e 23,08%), enquanto nos grupos 1 e controle não houve cultura positiva, como mostra a Tabela 5.

Os microrganismos isolados foram todos estafilococos, pertencentes a duas espécies: *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. Nos ratos 17 e 20 do grupo 2 (Duplo J) foi identificado o *Staphylococcus epidermidis*, enquanto nos ratos 26, 30 e 33 do grupo 3 (BPCA) e no rato 35 do grupo 4 (Duplo J) foi encontrado *Staphylococcus aureus*.

Tabela 5 – Resultados da avaliação microbiológica de amostras de urina dos animais estudados.

	Grupos				
	G1	G2	G3	G4	GC
n animais	10	10	13	9	9
n amostras	8	10	12	5	1
n cultura +	0	2	3	1	0

Valor de p

G1vsG2 = 0,477

G3 vs G4 = 1

Legenda: n = número de animais; G1=Grupo1 e assim por diante; GC=Grupo controle;

5.6 Análise química

A avaliação qualitativa físico-química mostrou presença de 3 substâncias: carbonato, fosfato e amônia nos cálculos dos três animais: rato 3 (grupo 1), rato 17 (grupo 2) e rato 34 (grupo 4).

As mesmas amostras submetidas a avaliação no espectrômetro de fluorescência de raios x por energia dispersiva. Esta técnica usa o material já incinerado onde todo o material orgânico é eliminado como hidrogênio, oxigênio, carbono e nitrogênio, restando os demais elementos químicos. Foi encontrado nas 3 amostras os mesmos elementos : fósforo, cálcio e magnésio. A figura 22 ilustra curvas de detecção dos elementos Mg, P e Ca. Todas as amostras tinham proporções semelhantes dos elementos como mostra a tabela 6. Os resultados apontam para maior concentração de cálculos de estruvita (fosfato amoníaco magnésiano) que de fosfato de cálcio.

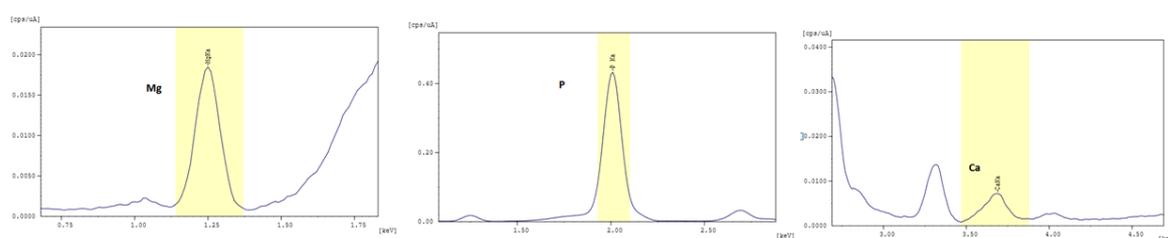


Figura 22 – Gráficos de detecção dos 3 elementos. Da esquerda para direita magnésio, fósforo e cálcio. Amostra do rato 17. No eixo vertical, ciclos por segundo por microampère (cps/ μ A); no eixo horizontal, quilo elétron volt (KeV).

Tabela 6 – Dos elementos químicos encontrados no material incrustado e cálculos. Expressão em ppm (partes por milhão).

		Animal		
		rato 3	rato 17	rato 34
		ppm	ppm	ppm
Elementos químicos	Mg	71.222	82.322	76.853
	P	67.813	78.661	70.005
	Ca	1.216	401	2.233

6 Discussão

6.1 Considerações iniciais

O BPCA até o momento foi utilizado na maioria dos estudos implantado na intimidade dos tecidos em diferentes regiões anatômicas. Banhado por sangue ou líquido intersticial se mostrou com excelente interação com esses meios e com as células locais e inflamatórias. O presente estudo submeteu o BPCA a ambiente bem diferente das pesquisas anteriores, quando o colocou em contato em médio prazo com a urina. Com uma grande concentração de sais e material orgânico é um meio que desafia os pesquisadores a mais de um século na solução para incrustação e demais tópicos da biocompatibilidade como visto anteriormente.

A despeito de alguns resultados desfavoráveis em relação ao BPCA neste estudo, para um urologista que lida com próteses endourológicas, chama a atenção um biomaterial ficar implantado nas bexigas de 20 ratos por um período de 3 a 6 meses e somente ter incrustado macroscopicamente em um animal, sendo este do grupo de menor tempo. Este fato é que impulsiona a continuação das pesquisas.

6.2 Método utilizado

Poucos estudos têm sido feitos para acessar a biocompatibilidade de biomateriais na construção de próteses endourológicas. A tendência tem sido focar os efeitos da urina sobre biomateriais relegando a segundo plano a avaliação do urotélio.¹⁰⁰

A literatura é vasta em diferentes modelos de experimentação para testar o poder de incrustação de um determinado biomaterial^{95, 101-106}. De forma geral, existem os modelos *in vitro* e *in vivo*. Para modelos *in vivo* vários animais já foram usados, como ratos, coelhos, cães e porcos. Esses estudos antecedem à aplicação em humanos³.

Os modelos *in vitro* podem se subdividir em modelos que utilizam urina artificial ou humana, e em modelos estáticos ou dinâmicos (com fluxo contínuo tentando reproduzir as

características do trato urinário). Não existe um modelo ideal. Os modelos *in vitro* têm a vantagem de serem controlados e de menor variação, mas com a desvantagem de não reproduzirem o funcionamento fisiológico do trato urinário, com contrações peristálticas, esvaziamento vesical e interação com o urotélio. Os modelos *in vivo* têm essas vantagens relatadas, mas as desvantagens de não se controlar a composição da urina, as variações quanto à ingesta hídrica, a alimentação dos animais e as idiossincrasias dos seres vivos. Há várias maneiras de se avaliar a incrustação sejam em modelos *in vivo* ou *in vitro*. A aparência macroscópica, peso do material, análises químicas quantificando ou especificando as moléculas encontradas (espectroscopia de absorção atômica, difração de raio x, espectroscopia por infravermelho, análise por energia dispersiva de raios x, reações químicas, etc) e avaliação das superfícies dos biomateriais por microscopia eletrônica, microscopia de força atômica, etc.^{21,93}

Várias instituições nacionais e internacionais de padronização como a ASTM (American Society for Testing and Materials), ISO (International Organization of Standardization) e BSI (British Standardization Institute) formulam normatizações para dispositivos como stent ureteral e cateteres uretrais de Foley, fazendo revisões periódicas. As mais utilizadas, inclusive pelo FDA, são as normatizações da ASTM. Há de se salientar que essas padronizações são aplicáveis a produtos acabados e testam uma série de parâmetros principalmente físicos. Existe apenas um tópico na padronização F 1828 da ASTM para stents ureterais em que submete o biomaterial submerso em urina artificial ou água destilada por 30 dias, em modelo estático. Há pouca importância para incrustação focando apenas na retenção de líquido e aumento no peso do material. Portanto, o presente estudo coloca-se numa fase bem preliminar a estas normatizações, pois não temos ainda o dispositivo pronto, apenas testa-se a potencialidade do biomaterial para este fim.^{108,109}

A escolha do modelo *in vivo* e em ratos se deu pela facilidade de aquisição dos animais com biotério dentro da universidade, possibilidade de uma amostragem em maior número, grande resistência a infecções, baixo custo, homogeneidade genética e principalmente a experiência prévia dos pesquisadores do Núcleo de Cirurgia Experimental que já estudaram o BPCA em ratos Wistar de diferentes maneiras.²⁸⁻⁴⁸

Deve-se ter cautela na extrapolação dos resultados em animais pra humanos. Entretanto há muitas similaridades entre a estrutura e fisiologia do trato urinário de ratos e humanos¹¹⁰. Alguns estudos mostram muitas semelhanças entre a urina humana e de ratos

em composição e cristalização. Naturalmente é muito rara a formação de litíase espontânea em trato urinário baixo ou alto. São muito utilizados como modelos na formação de cálculos induzindo formação com drogas que aumentem substâncias urinárias promotoras de litíase (p.ex. cálcio, oxalato) ou diminuam substâncias protetoras (p.ex. citrato, magnésio). Também existem modelos com implantes na bexiga de materiais estranhos (p.ex. zinco) ou associações dos modelos.¹¹¹⁻¹¹⁵

A metodologia adotada foi muito semelhante aos trabalhos de Ford et al. e Carvalho Júnior et al.^{116,37}

O primeiro avaliou o comportamento de diferentes polímeros divididos em 2 grandes grupos colocados na luz vesical em forma de lâminas de 5mm quadrados com 3 meses de exposição. Em um grupo de 12 animais utilizou-se polímeros base e em outro grupo com 16 animais, esses mesmos poliméricos num composto com ácido acrílico sintetizados através de radiação (copolímeros). No grupo dos copolímeros houve formação de cálculo ou incrustação dos materiais em 12 de 16 animais. Este material analisado mostrou-se composto em sua grande maioria de estruvita (24-70%) e hidroxiapatita (fosfato de cálcio). Apenas um material foi recuperado no estado original. Três com mudança de cor. Seis animais apresentavam material orgânico aderido. Este material era amolecido e amorfo, revelando-se tratar de material proteináceo. No grupo dos polímeros base utilizou-se 12 animais. Um animal morreu após 6 semanas. Nove apresentaram-se com incrustação ou formação de cálculos. A incrustação foi de material orgânico em quatro. Na incrustação novamente estruvita foi o principal constituinte como no outro grupo. As amostras de urina foram estéreis em cinco animais dos dois grupos. A bactéria mais frequente foi *Streptococcus epidermidis*, seguido de *Staphylococcus epidermidis*, coliformes. Não encontraram relação da microbiologia com formação de cálculos e incrustação. A histologia não foi quantificada em frequência. Mas os dois grupos mostraram alterações semelhantes. Hiperplasia epitelial, algumas vezes com prolongamentos deste urotélio como a cistite cística descrita neste estudo, e alguns com focos de linfócitos, plasmócitos e mastócitos na lamina própria e ocasionalmente polimorfonucleares em fendas do epitélio.¹¹⁷

O segundo trabalho estudou o comportamento da bexiga de ratos com ênfase na densidade de fibras colágenas com pontos transfixantes com fio de BPCA comparando com outro fio cirúrgico absorvível. Foram utilizados 42 ratos Wistar distribuídos em quatro grupos com 10-11 animais cada. Foram seguidos por período de 4-8 semanas.³⁷

Quanto ao fato de se seccionar stents ureterais outros estudos utilizaram o mesmo artifício para avaliação e comparação de incrustação.¹¹⁷⁻¹²⁰

6.3 A escolha do stent de poliuretano

O poliuretano é um dos polímeros mais versáteis no meio biomédico. Já foi utilizado como próteses mamárias e atualmente compõe inúmeros dispositivos biomédicos como catéteres urinários, bolsas para sangue, coração artificial. Durável, elástico, resistente e de baixo custo. Tem ótima interação com a água e sangue. Como stent ureteral é o polímero mais utilizado na prática urológica.^{50,71,72}

6.4 Fenômenos macroscópicos

No que diz respeito aos fenômenos físicos há de se fazer algumas considerações. Os tubos de BPCA foram construídos de forma artesanal com membranas sem nenhum revestimento especial na sua superfície. As membranas tinham fina espessura/arquitetura, macroscopicamente se via sua superfície com ranhuras, por isso foram facilmente deformadas e descoloridas na maioria das amostras. Essa característica de deformar pode impedir o fluxo adequado através da luz, mas é uma característica de alguns outros cateteres com biomateriais biodegradáveis, por exemplo, que só mantém a potência da luz por dois dias⁷². Na própria confecção dos tubos de BPCA foi utilizada água destilada para se moldar as membranas mais facilmente e construir a estrutura tubular. Era previsível a alteração na forma.

Já os tubos de Duplo J foram bem mais resistentes, com aparecimento de descoloração apenas no grupo de 6 meses e nos 2 grupos sem nenhuma deformação, assim nenhum ficou grosseiramente incrustado. Houve discreta diferença no aspecto de material orgânico aderido. Essas alterações, assim como maior descoloração, aconteceram na superfície de corte, onde era exposta a parte interna e bruta do poliuretano e com superfície mais irregular.

Um estudo avaliou fenômenos macroscópicos e entre eles a mudança de coloração como preditor para incrustação e dificuldade para retirada de stents ureterais e necessidade

de procedimento cirúrgico para tal. Foi duramente criticado pelo caráter especulativo da avaliação e que não há nenhuma evidência de que a coloração de um stent seja um bom parâmetro para avaliar incrustação e infecção.¹²¹

6.5 O tempo

Alguns trabalhos mostram que o período de 12 semanas ou 3 meses se mostra como um divisor de tempo para que haja em grande aumento na quantidade de material incrustado e da morbidade associada a stents ureterais implantados.^{20,122}

Um estudo mostra que há proporcionalidade entre tempo e tamanho de cálculos. Em um modelo para formação de cálculos em ratos com implantes de zinco nas bexigas, ratos sacrificados desde o dia 0 até o 7º dia mostram cálculos/incrustação com tamanhos progressivos.¹¹³

Estudo clínico mostrou que a colonização de stents ureterais tem relação com o tempo. Quando avaliados até 4 semanas encontraram 2,3% de colonização. Entre 4-6 semanas, 2,9% e 25% após período de 6 semanas¹²³.

O tempo de 3 meses utilizado no presente estudo também foi utilizado por outro trabalho já citado¹¹⁶. No presente estudo, pela baixa incidência de incrustação e outros fenômenos observados nos três meses se dobrou este tempo nos grupos seguintes o que deu mais robustez ao trabalho. Nenhum artigo com esta metodologia de implante livre na luz vesical foi encontrado com exposição tão longa quanto seis meses. E provavelmente esse tempo maior foi o motivo da biodegradação de um tubo de BPCA no grupo 3, por se tratar de material de origem natural e ter excelente biocompatibilidade o que coincide com o estudo de Carvalho Júnior et al.³⁷ onde também em um animal não havia nenhum vestígio do fio de BPCA. Os tubos de Duplo J foram retirados de material já utilizado e produto final para utilização clínica, o que explica seu bom desempenho.

6.6 Microbiologia

Quanto à bacteriologia encontramos cultura de urina positivas de forma semelhante entre os grupos. *Streptococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* foram os germes isolados. Diferente do estudo de Ford et al.¹¹⁶ onde muitos animais tinham culturas positivas,

a maioria com *Streptococcus faecalis* e apenas um animal com *Streptococcus epidermidis*. Não encontramos relação entre a presença de cálculos ou incrustação e a identificação de bactérias. Apesar de conseguirmos uma amostragem satisfatória, principalmente nos primeiros grupos, as quantidades eram mínimas. Muitos animais urinavam no momento da anestesia. Os animais do grupo controle eram encontrados em sua maioria com bexiga vazia.

6.7 Histologia

Todas as alterações encontradas neste estudo podem ser consideradas inespecíficas. Alguns estudos mostram resultados bem semelhantes. O fato de ter havido maior número de animais com reação do epitélio no Grupo 3 BPCA de 6 meses é um fenômeno conhecido e encontrado em muitos estudos.¹²⁴

Um estudo com intenção de avaliar a interface inflamação e fibras nervosas, para tentar melhor entendimento de cistite intersticial, induziu inflamação de diferentes formas em bexigas de ratos: instilação de solução salina, de lipopolissacarídeos, de formalina e de forma mecânica com um ponto em U na parede com catgut. Os achados: hiperplasia epitelial, inflamação aguda e crônica e presença de mastócitos em vários grupos.¹²⁵

Estudo avaliando stent em uretra prostática de coelhos, fazendo comparação entre um de biomaterial biodegradável e outro metálico. Este estudo avaliou as reações do urotélio através de microscopia eletrônica e reações inflamatórias através de microscopia óptica expressando os resultados através de frequência se havia ou não, assim como no presente estudo. Encontraram hiperplasia epitelial e polipose com um mês de implantação para o stent metálico enquanto somente com 3 meses aparecia tal reação no grupo do stent biodegradável. Ao final de 6 e 9 meses não havia diferença entre os dois. Os stents metálicos causavam maior reação inflamatória. Um cálculo foi encontrado no grupo dos stents metálicos após 12 meses.¹²⁶

A avaliação histológica realizada neste estudo contempla o que outro estudo chama a atenção: a incrustação é apenas uma das facetas do complexo fenômeno de biocompatibilidade, dando bastante ênfase a tal aspecto.¹⁰⁰

Estudo avaliando ureteres de cães após período com stents implantados mostrou hiperplasia epitelial, aumento no calibre da luz e espessamento da parede do ureter.¹²⁷

Os estudos encontrados que fazem esta avaliação não encontraram atipia, da mesma forma que o presente estudo. E é sabido que roedores portadores de litíase vesical tem

hiperplasia epitelial e este aumento da proliferação epitelial pode levar a transformação para carcinoma urotelial.^{128,129}

Tumores de bexiga em ratos Wistar acontecendo de forma espontânea são muito raros. Os casos descritos geralmente são de ratos mais velhos com média de idade de 26 meses, em machos. Os ratos Wistar vivem em torno de 36 meses. Tanto carcinomas uroteliais como adenocarcinomas são descritos. Estudos toxicológicos nunca chegam a tanto tempo de exposição para esta avaliação.^{130,131}

Estudo induziu hiperplasia epitelial em ratos com administração oral de nicotina em altas doses. As alterações podem aparecer já com 14 dias.¹³²

Todas as alterações encontradas foram de reação do urotélio e demais parede a presença do material e suas complicações como infecção secundária e presença de cálculo/incrustação. As descrições de outros estudos são bem semelhantes aos achados do presente estudo. Relatos hiperplasia epitelial, crescimento exofítico da mucosa com dobras profundas (semelhante à cistite cística encontrada) e áreas com células inflamatórias como linfócitos, mastócitos e plasmócitos também são encontrados em estudos.¹¹⁶

6.8 Análise química

Os resultados da análise química acompanham o que outros estudos encontrados. Cálculos de fosfato amoníaco magnésiano (estruvita) em sua maioria e também cálculos de fosfato de cálcio (hidroxiapatita). Em muitos estudos estruvita está presente em todas as amostras coletadas.⁵⁹

Pela quantidade de magnésio encontrada nas 3 amostras os cálculos de estruvita se formaram em maior quantidade o que acompanha os resultados de outros estudos. Não é comum a formação de cálculos de carbonato de cálcio de forma induzida. Normalmente essa composição aparece em cálculos espontâneos. Um estudo mostra pequena fração de cálculos com carbonato em ratos.^{116, 129, 133}

7 Conclusão

O BPCA, no presente estudo, comportou-se de forma inferior ao material comparado quando analisados alguns fenômenos macroscópicos e microscópicos em médio prazo (alterações de cor, forma, reação epitelial). Contudo, os resultados desfavoráveis não comprometem a continuação de pesquisas com este biomaterial.

8 Referências

1. Bitschay J, Brodny ML. A history of urology in Egypt. New York: Riverside Press. 1956; 56p, apud apud Beiko DT, Knudsen BE, Watterson JD, Cadieux PA, Reid G, Denstedt JD. Urinary tract biomaterials. *J Urol*. 2004; 171(June):2438-44.
2. Marino RA, Mooppan UM, Kim H. History of urethral catheters and their balloons: drainage, anchorage, dilation, and hemostasis. *Journal of Endourology*. 1993; 7(2): 89-92.
3. Denstedt JD, Wollin TA, Reid G. Biomaterials used in urology: Current issues of biocompatibility, infection, and encrustation. *Journal of endourology*. 1998; 12(6): 493-500.
4. Beiko DT, Knudsen BE, Watterson JD, Cadieux PA, Reid G, Denstedt JD. Urinary tract biomaterials. *J Urol*. 2004; 171(June):2438-44.
5. Foley FE. A hemostatic bag catheter: one piece latex rubber structure for control of bleeding and constant drainage following prostatic resection. *J Urol* 1937; 38: 134-9.
6. Trindade IS. Stent é realmente um epônimo. *Rev Bras Cardiol Invas*. 2003; 11(4): 64-6.
7. Houaiss A, Villar MS, Franco FM. *Dicionário Houaiss da língua portuguesa*. Rio de Janeiro: Objetiva; 2001 1ª edição.
8. Mardis HK, Kroeger RM, Morton JJ, Donovan JM. Comparative evaluation of materials used for internal ureteral stents. *Journal of endourology*. 1993; 7(2): 105-115.
9. Choong SKS, Wood S, Whitfield HN. A model to quantify encrustation on ureteric stents, urethral catheters and polymers intended for urological use. *BJU International*. 2000; 86: 414-21.
10. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HTL, Shirliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical microbiology reviews*, 2008; 21(1): 26-59.
11. Jarvis WR. Selected aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost, and prevention. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 1996: 552-557.
12. Shaw GL, Choong SKS, Fry C. Encrustation of biomaterials in the urinary tract. *Urol Res*. 2005; 33: 17-22.
13. Lawrence EL, Turner IG. Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK. *Medical Engineering & Physics*. 2005; 27: 443-453.
14. Schulze KA, Wettlaufer JN, Oldani G. Encrustation and stone formation: complication of indwelling ureteral stents. *Urology*, 1985; 25(6): 616-619.

15. Mitty HA, Dan SJ, Train JS. Antegrade ureteral stents: technical and catheter-related problems with polyethylene and polyurethane. *Radiology*. 1987 165(2): 439-443.
16. Zimskind, P. D., Fetter, T. R., & Wilkerson, J. L. Clinical use of long-term indwelling silicone rubber ureteral splints inserted cystoscopically. *The Journal of urology*, 1967;97(5): 840-844.
17. Finney RP. Experience with new double-J ureteral catheter stent. *J Urol* 1978;120:678.
18. Hepperlen TK, Mardis HK. Pigtail stent termed means of lessening ureteral surgery. *Trends Clin Urol* 1978;1:405.
19. Chew BH, Knudsen BE, Denstedt JD. The use of stents in contemporary urology. *Current Opinion in Urology*, 2004; 14:111–115.
20. El-Faqih SR, Shamsuddin AB, Chakrabarti A, Atassi R, Kardar AH, Osman MK, Husain I. Polyurethane internal ureteral stents in treatment of stone patients: morbidity related to indwelling times. *J Urol*. 1999; Dec;146(6):1487-91.
21. Gorman SP, Tunney MM. Assessment of Encrustation Behaviour on Urinary Tract Biomaterials. *J Biomater Appl* 1997; 12: 136-166.
22. Somers WJ. Management of forgotten or retained indwelling ureteral stents. *Urology*, 1996; 47(3): 431-435.
23. Singh D, Goel A, Ahmed N, Singh BP. Reminder of important clinical lesson: forgotten stent leading to complex panurinary stone: single-sitting endourologic management. *BMJcasereports*; 2011.
24. Keane PF, Bonner MC, Johnston SR, Zafar A, Gorman SP. Characterization of biofilm and encrustation on ureteric stents in vivo. *British journal of urology*. 1994; 73(6): 687-691. Página 689.
25. Paterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL, Medeiros VA. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea sp.* *Carbohydrate Polymers* 2000; 42(4): 375-383.
26. Coelho COC, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FAD, Mota A, Filho FT. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cir Bras* 2001; 17 (supl. 1):11-13.
27. Castro CMMB, Aguiar JLA, Melo FAD, Silva WTF, Marques E, Silva DB. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb.* 2004; 49(2): 119-123.
28. Lima FR, Lima JRA, Hirakawa P, Medeiros Júnior DM, Lima FMT, Aguiar JLA. Resposta inflamatória à membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de

polipropileno implantadas no peritônio parietal de ratos. An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb. 2005; 50(1): 37-40.

29. Silveira AA, Dantas MLM, Almeida YMBD, Aguiar JLA. Estudo biomecânico de membranas de biopolímero de cana de açúcar perfuradas e contínuas implantadas no celular subcutâneo da parede abdominal de ratos. An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb. 2007; 52(1): 55-59.

30. Falcão SC, Coelho ARDB, Evêncio Neto J. Biomechanical evaluation of microbial cellulose (*Zoogloea sp.*) and expanded polytetrafluoroethylene membranes as implants in repair of produced abdominal wall defects in rats. Acta Cirurgica Brasileira. 2008; 23(2): 184-191.

31. Silva DB, Aguiar JLA, Marques A, Coelho ARB, Rolim Filho EL. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana de açúcar e fásia autóloga em *Chinchilla laniger*. An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb. 2006; 51(1): 45-51

32. Marques SRB, Lins EM, Aguiar JLA, Albuquerque MCS, Rossiter RO, Montenegro LT, Vieira RJ. Um novo substituto vascular: arterioplastia femoral em cães com remendo de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar - avaliação hemodinâmica e histopatológica. J. Vasc. Bras. 2007; (6) 4: 309-315.

33. Aguiar JLA, Lins EM, de Barros Marques SR. Surgarcane biopolymer patch in femoral artery angioplasty on dogs. Acta Cirurgica Brasileira. 2007; 22(1).

34. de Barros Marques SR, Lins EM, de Albuquerque MCS, Aguiar JLA. Sugarcane biopolymer patch in femoral vein angioplasty on dogs. Journal of Vascular Surgery. 55(2): 517-521.

35. Mayer DLB, Araújo JG, Leal MC, Caldas Neto SS, Ataíde RF, Mello RJV. Membrana do biopolímero da cana-de-açúcar: avaliação experimental na orelha média. Braz J Otorhinolaryngol. 2011; 77(1): 44-50.

36. Lima SVC, Rangel AEO, Aguiar JLA, Sampaio FJB, Cardoso L, Gomes H. A new bulking agent to treat vesoureteral reflux: an experimental study. J Urology. 2011; Vol. 185 (4) Suppl: 106

37. Carvalho Junior AMD, Santos MM, Barkokébas BB, Aguiar JLA, Lima SVC, Dambros M. Characterization of the deposition of collagen fibers and Lithogenic potential in bladder of rats submitted to a sugar cane biopolymer graft. International Braz J Urol. 2012; 38(4): 544-551.

38. Albuquerque PCV, Aguiar JLA, Santos SM, Pontes Filho N, Mello RJV, Costa MLCR, Silva JC. Comparative study of the areas of osteochondral defects produced in the femoral condyles of rabbits treated with gel of sugarcane biopolymer. Acta Cirurgica Brasileira 2001; 26(5): 383-386.

39. Albuquerque PCV, Aguiar JLA, Santos SM, Pontes Filho NT, Mello RJV, Costa MLCR, Silva JC. Comparative macroscopic study of osteochondral defects produced in femurs of

rabbits repaired with biopolymer gel cane sugar. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2011; 46(5): 577-584.

40. Cordeiro-Barbosa FA, Aguiar JLA, Lira MMM, Pontes Filho NT, Bernardino-Araújo S. Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*. 2012; 75(4): 267-272.

41. Fragoso AS, Silva MB, de Melo CP, Aguiar JLA, Rodrigues CG, Medeiros PL, Oliveira ML. Dielectric study of the adhesion of mesenchymal stem cells from human umbilical cord on a sugarcane biopolymer. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014; 25(1): 229-237.

42. Medeiros Júnior MD, Carvalho EJDA, Catunda IS, Bernardino-Araújo S, Aguiar JLA. Hydrogel of polysaccharide of sugarcane molasses as carrier of bone morphogenetic protein in the reconstruction of critical bone defects in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2013; 28(4): 233-238.

43. Martins AGS, Lima SVC, Araujo LAP, Vilar FO, Cavalcante NTP. A wet dressing for hypospadias surgery. *International Braz J Urol*. 2013; 39(3): 408-413.

44. Tavares LH, Vilar FO, Aguiar JLA, Paz AR, Melo FA, Negromonte GR. Biopolymer sponge for high grade renal trauma: an experimental study in rabbits. *Open Journal of Urology*. 2014; 4: 1-6

45. Leão RAS. Comportamento do biopolímero da cana de açúcar em gel injetado em prega vocal de coelho.[tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 2012

46. Lima SVC, Vilar FO, Aguiar JLA, Pontes FA, Lucena RG, Machado M, Barros EGC. Doença de peyronie: estudo de um novo material com perspectivas de aplicação clínica. *International Braz J Urol*. 2006; 32(2): 167

47. Lucena RG. Utilização do biopolímero da cana-de-açúcar como novo material para sling pubovaginal: análise estereológica. [tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 2007.

48. Lima FMT. Sugar cane biopolymer membrane as dura mater substitute in wistar rats. [tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 2008.

49. Morris NS. The Challenge for Biomaterials in Urology. *European Medical Device Technology*. 2010; January.

50. Zdrachala RJ, Zdrachala IJ. Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *Journal of Biomaterials Applications*. 1999; 14(1): 67-90.

51. Schierholz JM, Yücel N, Rump AF, Beuth J, Pulverer G. Antiinfective and encrustation-inhibiting materials: myth and facts. *Int J Antimicrob Agents*. 2002 Jun;19(6):511-6.

52. Hedelin H, Bratt CG, Eckerdal G, Lincoln K. Relationship between urease-producing bacteria, urinary pH and encrustation on indwelling urinary catheters. *Br J Urol.* 1991 May; 67(5):527-31.
53. Stickler, D., Ganderton, L., King, J., Nettleton, J., & Winters, C. *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Urological research.* 1993; 21(6): 407-411.
54. Sofer M, Denstedt JD. Encrustation of biomaterials in the urinary tract. *Current Opinion in Urology* 2000; 10:563-569
55. Tenke P, Kovacs B, Jäckel M, Nagy E. The role of biofilm infection in urology. *World Journal of Urology.* 2006; 24(1): 13-20
56. Choong S, Wood S, Fry C, Whitfield H. Catheter associated urinary tract infection and encrustation. *International Journal of Antimicrobial agents.* 2001; 17(4): 305-310.
57. Jones GL, Muller CT, O'Reilly M, Stickler DJ. , D. J. Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2006; 57(2): 266-272.
58. Stickler DJ, Morgan SD. Observations on the development of the crystalline bacterial biofilms that encrust and block Foley catheters. *Journal of Hospital Infection.* 2008; 69(4): 350-360.
59. Hukins DWL, Hickey DS, Kennedy AP. Catheter encrustation by struvite. *BJU.* 1983; 55: 304-305
60. Cox AJ, Harries JE, Hukins DWL, Kennedy AP. Calcium phosphate in catheter encrustation. *BJU.* 1987; 59: 159-163
61. Cox AJ, Hukins DW, Morphology of mineral deposits on encrusted urinary catheters investigated by scanning electron microscopy. *The Journal of urology.* 1989; 142(5): 1347-1350.
62. Bruce AW, Sira SS, Clark AF, Awad SA. The problem of catheter encrustation. *Can Med Assoc J* 1974; 3: 238-241.
63. Cox AJ. Comparison of catheter surface morphologies. *Br J Urol* 1990; 65: 55-60
64. Axelsson H, Schonebeck J, Winblad B. Surface structure of unused and used catheters. *Stand J Urol Nephrol* 1977; 11: 283-287.
65. Jones DS, Djokic J, Gorman SP. Characterization and optimization of experimental variables within a reproducible bladder encrustation model and in vitro evaluation of the efficacy of urease inhibitors for the prevention of medical device-related encrustation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* 2006; 76(1): 1-7.

66. Kunin CM, Chin QF, Chambers S. Indwelling urinary catheters in the elderly. Relation of "catheter life" to formation of encrustations in patients with and without blocked catheters. *The American Journal of Medicine*. 1987; 82(3): 405-411.
67. Getliffe KA, Mulhall AB. The encrustation of indwelling catheters. *Br J Urol*. 1991; Apr;67(4):337-41.
68. Choong SKS, Hallson P, Whitfield HN, Fry CH. The physicochemical basis of urinary catheter encrustation. *BJU* 1999; 83: 770-775.
69. Getliffe KA, Hughes SC, Le Claire M. The dissolution of urinary catheter encrustation. *BJU* 2000; 85(1): 60-64.
70. Su LM, Sosa RE. Ureterscopy and retrograde ureteral access In: Walsh PC, Retick AB, Vaughan. ED, Wein AJ, eds. *Campbell's Urology*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Science, 2002, chapter 97.
71. Badlani GH. Role of permanent stents. *Journal of Endourology*. 1997; 11(6): 473-475.
72. Venkatesan N, Shroff S, Jayachandran K, Doble M. Polymers as ureteral stents. *Journal of Endourology*, 2010; 24(2): 191-198.
73. Ko GY, Kim GC, Seo TS, et al. Covered, retrievable, expandable urethral nitinol stent: feasibility study in dogs. *Radiology* 2002; 223:83.
74. Laaksovirta S, Isotalo T, Talja M. Interstitial laser coagulation and biodegradable self-expandable, self-reinforced poly- L-lactic and poly-L-glycolic copolymer spiral stent in the treatment of benign prostatic enlargement. *J Endourol* 2002;16:311.
75. Olweny EO, Landman J, Andreoni C, et al. Evaluation of the use of a biodegradable ureteral stent after retrograde endopyelotomy in a porcine model. *J Urol* 2002; 167: 2198.
76. Auge BK, Ferraro RF, Madenjian AR, Preminger GM. Evaluation of a dissolvable ureteral drainage stent in a swine model. *J Urol* 2002; 168: 808.
77. Lingeman JE, Preminger GM, Segura JW, et al. Use of a temporary ureteral drainage stent (TUDS) after uncomplicated ureteroscopy. *J Urol* 2003 May; 169(5): 1682-8
78. Amiel GE, Yoo JJ, Kim BS, Atala A. Tissue engineered stents created from chondrocytes. *J Urol* 2001; 165: 2091.
79. Tan H, Fu W, Li J, Wang Z, Li G, Ma X, Dong J, Gao J, Wang X, Zhang X. Construction of a capsular tissue-engineered ureteral stent seeded with autologous urothelial cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2013 Jan; 33(1): 48-52
80. Santin M, Motta A, Denyer SP, Cannas M. Effect of the urine conditioning film on ureteral stent encrustation and characterization of its protein composition. *Biomaterials*. 1999; 20(13): 1245-1251.

81. Bariol S, Farebrother T, Ruthven S, MacNeil F. Comparison of urinary stone and stent encrustation: Biochemical analysis. *Journal of Endourology*. 2003; 17(9): 741-743.
82. Bithelis G, Bouropoulos N, Liatsikos EM, Perimenis P, Koutsoukos PG, Barbalias GA. Assessment of encrustations on polyurethane ureteral stents. *Journal of Endourology*. 2004; 18(6): 550-556.
83. Tschada RK, Henkel TO, Junemann KP, et al. Spiral-reinforced ureteral stent: an alternative for internal urinary diversion. *J Endourol*. 1994; 8: 119.
84. Stoller ML, Schwartz BF, Frigstad JR, et al. An in vitro assessment of the flow characteristics of spiral-ridged and smooth-walled JJ ureteric stents. *BJU Int* 2000; 85: 628.
85. Liatsikos EN, Hom D, Dinlenc CZ, et al. Tail Stent versus re-entry tube: a randomized comparison after percutaneous stone extraction. *Urology* 2002; 59:15.
86. Macaluso JN Jr, Deutsch JS, Goodman JR, et al. The use of the magnetip double-j ureteral stent in urological practice. *J Urol* 1989; 142: 701.
87. Mykulak DJ, Herskowitz M, Glassberg KI. Use of magnetic internal ureteral stents in pediatric urology: retrieval without routine requirement for cystoscopy and general anesthesia. *J Urol* 1994; 152: 976.
88. Dellis A, Joshi HB, Timoney AG, Keeley Jr FX, Relief of stent related symptoms: review of engineering and pharmacological solutions. *The Journal of Urology*. 2010; 184(4): 1267-1272.
89. Tunney MM, Gorman SP. Evaluation of a poly(vinyl pyrrolidone)-coated biomaterial for urological use. *Biomaterials* 2002; 23: 4601.
90. Riedl CR, Witkowski M, Plas E, Pflueger H. Heparin coating reduces encrustation of ureteral stents: A preliminary report. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 507.
91. Jones DS, Djokic J, McCoy CP, Gorman SP, Poly (ε-caprolactone) and poly (ε-caprolactone)-polyvinylpyrrolidone-iodine blends as urethral biomaterials: characterisation of mechanical and surface properties, degradation and resistance to encrustation in vitro. *Biomaterials*. 2002; 23(23): 4449-4458.
92. Jones DS, McLaughlin DW, McCoy CP, Gorman SP. Physicochemical characterisation and biological evaluation of hydrogel-poly (ε-caprolactone) interpenetrating polymer networks as novel urinary biomaterials. *Biomaterials*. 2005; 26(14): 1761-1770.
93. Cox AJ, Hukins WL, Sutton M. Comparison of in vitro Encrustation on silicone and hydrogel-coated latex catheters. *BJU* 1988; 61: 156-161.
94. Cox AJ, Millington RS, Hukins DWL, Sutton TM. Resistance of catheters coated with a modified hydrogel to encrustation during an in vitro test. *Urological research*. 1989; 17(6): 353-356.

95. Morris NS, Stickler DJ. The effect of urease inhibitors on the encrustation of urethral catheters. *Urological research*. 1998; 26(4): 275-279.
96. Zupkas P, Parsons CL, Percival C, Monga M. Pentosanpolysulfate coating of silicone reduces encrustation. *J Endourol* 2000; 14: 483.
97. Watterson JD, Cadieux PA, Beiko DT, et al. Oxalate-degrading enzymes from *Oxalobacter formigenes*: A novel device coating to reduce urinary tract biomaterial-related encrustation. *J Endourol*. 2003; 17(5): 269-274.
98. Multanen M, Tammela TL, Laurila M, et al. Biocompatibility, encrustation and biodegradation of ofloxacin and silver nitrate coated poly-L-lactic acid stents in rabbit urethra. *Urol Res* 2002; 30: 227.
99. Lingeman JE, Denstedt JD, Preminger GM, Li J, Krambeck AE. The first drug eluting ureteral stent: a prospective, randomized, multicenter clinical trial to evaluate the safety and effectiveness of a ketorolac-loaded ureteral stent. *J Urol* 2009; 181: 725–726.
100. Cormio L, Talja M, Koivusalo A, Makisalo H, Wolff H, Ruutu M. Biocompatibility of various indwelling double-J stents. *The Journal of Urology*. 1995; 153(2), 494-496.
101. Holmes SAV, Cheng C, Whitfield HN., H. N. The development of synthetic polymers that resist encrustation on exposure to urine. *BJU* 1992; 69(6): 651-655.
102. Bibby JM, Hukins DW. Acidification of urine is not a feasible method for preventing encrustation of indwelling urinary catheters. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. 1993; 27(1), 63-65.
103. Tunney MM, Bonner MC, Keane PF, Gorman SP. Development of a model for assessment of biomaterial encrustation in the upper urinary tract. *Biomaterials*. 1996; 17(10): 1025-1029.
104. Pétaš A, Vuopio-Varkila J, Siitonen A, Välimaa T, Talja M, Taari K. Bacterial adherence to self-reinforced polyglycolic acid and self-reinforced polylactic acid 96 urological spiral stents in vitro. *Biomaterials*. 1998; 19(7-9), 677-681.
105. Park JH, Cho YW, Kwon IC, Jeong SY, Bae YH. Assessment of PEO/PTMO multiblock copolymer/segmented polyurethane blends as coating materials for urinary catheters: in vitro bacterial adhesion and encrustation behavior. *Biomaterials*. 2002; 23(19): 3991-4000.
106. Gorman SP, Garvin CP, Quigley F, Jones DS. Design and validation of a dynamics flow model simulating encrustation of biomaterials in the urinary tract. *J Pharm Pharmacol*. 2003 Apr; 55(4): 461-8.
107. Gorman SP, Tunney MM. Assessment of encrustation behaviour on urinary tract biomaterials. *J Biomater Appl*. 1997; 12: 136

108. US Food and Drug Administration. Recognized Consensus Standards. Recognition ASTM F 623-99. Standard Performance Specification for Foley Catheter. Available in: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfstandards/detail.cfm?standard__identification_no=29856.
109. American Society for Testing and Materials International. F1828-97 (Reapproved in 2006). Standard Specification for Ureteral Stents. United States. Available in: <http://www.astm.org>
110. De Boo J, Knight, A. Increasing the implementation of alternatives to laboratory animal use. AATEX. 2008; 13: 109-117.
111. Miyake O, Yoshioka T, Yoshimura K, Honda M, Yamaguchi S, Koide T, Okuyama A. Expression of Tamm-Horsfall protein in stone-forming rat models. BJU. 1998; 81:14
112. Atmani F, Khan SR. Characterization of uronic-acid-rich inhibitor of calcium oxalate crystallization isolated from rat urine. Urol Res. 1995; 23:95-101.
113. Olson ME, Nickel JC, Costerton JW. Animal model of human disease infection-induced struvite urolithiasis in rats. Am J Pathol. 1989; 35:581-3
114. Khan SR. Animal models of kidney stone formation: an analysis. World Journal of Urology. 1997; 15(4): 236-243.
115. Singh PK, Patil CR, Harlalka GV, Gaud NP. Zinc disc implantation model of urinary bladder calculi and humane endpoints. Laboratory animals. 2010; 44(3): 226-230.
116. Ford TF, Parkinson MC, Fydeler PJ, Ringrose BJ, Wickham JE. A preliminary in vivo assessment of acrylic acid graft-copolymers in the urinary tract. J Urol. 1985; 133(1): 141-3.
117. Cirioni O, Silvestri C, Ghiselli R, Kamysz W, Minardi D, Castelli P, Giacometti A. In vitro and in vivo effects of sub-MICs of pexiganan and imipenem on *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm development. *Le Infezioni in Medicina: Rivista Periodica di Eziologia, Epidemiologia, Diagnostica, Clinica e Terapia delle Patologie Infettive*. 2013; 21(4): 287-295.
118. Tunney MM, Keane PF, Jones DS, Gorman SP. Comparative assessment of ureteral stent biomaterial encrustation. *Biomaterials*. 1996; 17(15): 1541-1546.
119. Barbaliás GA, Bouropoulos C, Vagenas NV, Bouropoulos N, Siablis D, Liatsikos EN, Koutsoukos PG. Encrustation of a metal alloy urinary stent: A mechanistic investigation. *European Urology*. 2000; 38(2): 144-150.
120. Rosman BM, Barbosa JÁ, Passerotti CP, Cendron M, Nguyen HT. Evaluation of a novel gel-based ureteral stent with biofilm-resistant characteristics. *International Urology and Nephrology*. 2013: 1-6.

121. Joshi, H. Re: Ureteral Stent Encrustation, Incrustation, and Coloring: Morbidity Related to Indwelling Times: (From: Kawahara T, Ito H, Terao H, et al. *J Endourol.* 2012; 26: 178–182). *Journal of Endourology.* 2012; 26(7): 924-925.
122. Leibovici D, Cooper A, Lindner A, Ostrowsky R, Kleinmann J, Velikanov S, Cipele H, Goren E, Siegel YI. Ureteral stents: morbidity and impact on quality of life. *Isr Med Assoc J.* 2005 Aug; 7(8): 491-4.
123. Ozgur BC, Ekici M, Yuceturk CN, Bayrak O. Bacterial colonization of double J stents and bacteriuria frequency. *Kaohsiung J Med Sci.* 2013 Dec; 29(12): 658-61
124. Baert L, Verhamme L, van Poppel H, Vandeursen H, Baert J. Long-term consequences of urethral stents. *J Urol.* 1993; 150 : 853–5
125. Dupont MC, Spitsbergen JM, Kim KB, Tuttle JB, Steers WD. Histological and neurotrophic changes triggered by varying models of bladder inflammation. *The Journal of Urology.* 2001; 166(3): 1111-1118.
126. Isotalo TM, Nuutinen JP, Vaajanen A, Martikainen PM, Laurila M, Tormala P, Tamme la TL. Biocompatibility properties of a new braided biodegradable urethral stent: a comparison with a biodegradable spiral and a braided metallic stent in the rabbit urethra. *BJU international.* 2006; 97(4): 856-859.
127. Culkin DJ, Zitman R, Bundrick WS, Goel Y, Price VH, Ledbetter S, Venable DD. Anatomic, functional, and pathologic changes from internal ureteral stent placement. *Urology.* 1992; 40(4): 385-390.
128. Dai G, Cui L, Song L, Cheng J, Zhong Y, Zhao R, Wang X. Bladder epithelial cell proliferation of rats induced by terephthalic acid-calculi. *Food and Chemical Toxicology.* 2005; 43(2): 217-224
129. Dontas IA, Khaldi L. Urolithiasis and transitional cell carcinoma of the bladder in a Wistar rat. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* 2006; 45(4), 64-67.
130. Tucker MJ. The urinary system. In: *Diseases of the Wistar rat.* London: Taylor and Francis. 1997; p 81–96.
131. Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? *Arq Bras Cir Dig.* 2012; 25(1):49-51
132. Dodmane PR, Arnold LL, Pennington KL, Cohen SM. Orally administered nicotine induces urothelial hyperplasia in rats and mice. *Toxicology.* 2014; 315: 49-54.
133. Cauda F, Cauda V, Fiori C, Onida B, Garrone E. Heparin coating on ureteral double J stents prevents encrustations: an in vivo case study. *Journal of Endourology.* 2008; 22(3): 465-472.

9 Anexos

ANEXO A

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 14 de setembro 2009.

Ofício nº 191/09

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profº: Salvador Correia Lima**
Departamento de Cirurgia - CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.013771/2009-25

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **"Biopolímero de Cana-de-açúcar como Prótese Endourológica"**.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansen
Prof.ª Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

Observação: Aluno de pós-graduação: Roberto Santos Lima.
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição, CCS; Animais: Ratos Wistar; Sexo: Machos; Idade: adultos jovens; Nº de Animais: 22 animais.

No Animal	Material	Tempo	P (g)	P (g) sacrific	M	MC	MO	MF	INC	CALC	A.Urina	Cult+	I Aguda	I crônica	Hepitelial	Cistite cística	Agregado linfóides	Eosinófilos	Mastócitos	Observações 1		
rato 19	Duplo J	3 meses	457	438							1			1		1						
rato 20	Duplo J	3 meses	589	547							1	1										
rato 21	BPCA	6 meses	362	383		0	0	0	0	0	1											
rato 22	BPCA	6 meses	418	396		1		1			1		1		1			1	1			
rato 23	BPCA	6 meses	407	402		1		1			1			1	1			1	1			
rato 24	BPCA	6 meses	400	394		1		1			1				1				1			
rato 25	BPCA	6 meses	473	460		1		1			1				1				1			
rato 26	BPCA	6 meses	539	498		1		1			1	1			1		1		1			
rato 27	BPCA	6 meses	382	380		1					1								1			
rato 28	BPCA	6 meses	391	378		1		1			1					1			1			
rato 29	BPCA	6 meses	480	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	morreu
rato 30	BPCA	6 meses	414	400		1		1			1	1				1			1			
rato 31	BPCA	6 meses	350	361		1		1			1					1			1			
rato 32	BPCA	6 meses	459	448		1		1			1				1				1			
rato 33	BPCA	6 meses	447	456		1		1			1	1			1	1	1		1			
rato 34	Duplo J	6 meses	398	360						1	1					1	1		1		carbonato fosfato amonia + Mg, P, Ca	
rato 35	Duplo J	6 meses	402	400			1				1	1	1					1	1			
rato 36	Duplo J	6 meses	527	480		1					1					1			1			
rato 37	Duplo J	6 meses	485	473		1													1			
rato 38	Duplo J	6 meses	505	482		1								1					1			

No Animal	Material	Tempo	P (g)	P (g) sacrific	M	MC	MO	MF	INC	CALC	A.Urina	Cult+	I Aguda	I crônica	Hepitelial	Cistite cística	Agregado linfóides	Eosinófilos	Mastócitos	Observações 1	
rato 39	Duplo J	6 meses	476	479		1										1		1	1		
rato 40	Duplo J	6 meses	449	462		1															
rato 41	Duplo J	6 meses	457	460		1					1										
rato 42	Duplo J	6 meses	470	458		1					1										
rato 43	Nada	6 meses	511,0	557		0	0	0	0		1										
rato 44	Nada	6 meses	433,0	479		0	0	0	0												
rato 45	Nada	6 meses	420,0	481		0	0	0	0												
rato 46	Nada	6 meses	465,0	0	1	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	morreu
rato 47	Nada	6 meses	276,0	0	1	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	morreu
rato 48	Nada	6 meses	284,0	327		0	0	0	0								1		1		
rato 49	Nada	6 meses	281,0	317		0	0	0	0										1		
rato 50	Nada	6 meses	274,0	328		0	0	0	0										1		
rato 51	Nada	6 meses	260,0	294		0	0	0	0										1		

P(g)=peso em g na cirurgia; P(g)sacrif=peso em g no sacrifício; M=morte; MC=mudança de cor; MO=material orgânico; MF=mudança de forma; INC=incrustação; CALC=cálculos; A.Urina= amostra de urina; Cult+=cultura positiva; I Aguda=Inflamação aguda; I Crônica=Inflamação crônica; Hepitelial= hiperplasia epitelial;

0=dado inexistente; 1=sim; espaço em branco=não