

HAMILTO AKIHISA YAMAMOTO

**ALTERAÇÕES ULTRA-ESTRUTURAIS INDUZIDAS PELA
INSTABILIDADE DO DETRUSOR EM COELHOS. AÇÃO DA
OXIBUTININA.**

**Faculdade de Medicina de Botucatu
Universidade Estadual Paulista
2004**

HAMILTO AKIHISA YAMAMOTO

**ALTERAÇÕES ULTRA-ESTRUTURAIS INDUZIDAS PELA
INSTABILIDADE DO DETRUSOR EM COELHOS. AÇÃO DA
OXIBUTININA.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bases Gerais da Cirurgia,
Área de Concentração em Motilidade e
Contratilidade de Orgãos, da Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista – UNESP, para obtenção
do Título de Doutor em Cirurgia.**

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Amaro

**Botucatu - SP
2004**

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Sussumu e Fusae, pelo apoio, compreensão, dedicação e aos ensinamentos, agradeço pela família que vocês construíram.

A minha querida esposa Érica, que desde o início vem acompanhando a minha trajetória, sempre apoiando e orientando nos momentos mais difíceis, privando das suas atividades para me ajudar, meu eterno agradecimento.

Aos meus irmãos, Etsuko, Mário, Kazue e Junka, aos cunhados, Euríco e Kenji e ao sobrinho Felipe sempre presentes e participantes na minha vida, me ajudando e apoiando, agradeço por tudo.

Á minha querida avó Tieno pelos conselhos, pela preocupação e dedicação em todos os momentos. Agradeço por estar sempre presente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho. Em especial:

Ao Prof. Dr. João Luiz Amaro pela amizade, ensinamento e compreensão, agradeço pela orientação, incentivo, paciência e a dedicação no desenvolvimento e na finalização dessa tese.

Ao Prof. Dr. Luigi Armando Paolo Vercesi, pelo auxílio e incentivo nos momentos difíceis deste trabalho.

Ao amigo Dr. Paulo Roberto Kawano e amiga Juliany Gomes Quitzan pela amizade, companheirismo e ajuda para concretização dessa etapa.

Ao Prof. Dr. Aparecido Donizete Agostinho, Prof. Dr. Carlos Alberto Monte Gobbo, Prof. Dr. Carlos Márcio Nóbrega de Jesus, Prof. Dra. Eliana Minalesi Rúbio, Prof. Dr. Fernando da Rocha Câmara, Prof. Dr. José Carlos de Souza Trindade, Prof. Dr. José Goldberg, Prof. Dr. Luiz Antônio Corrêa, Mestre Márcia Tenório Delneri e Prof. Dr. Oscar Eduardo Fugita pela minha formação médica, amizade e confiança.

À amiga Karina Tuma Balasteghin pela ajuda em todas as etapas do trabalho, pela paciência, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos R. Padovani, pela orientação estatística e análise dos resultados.

À Prof. Dr. Elisa Aparecida Gregório pela orientação e paciência no estudo de microscopia eletrônica.

Ao Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior pelo auxílio na microscopia eletrônica

À Prof. Célia Sforcin Guimarães que ajudou na correção gramatical e pelas aulas de inglês.

Ao Laboratório de Urologia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em especial ao Lucas, Lorival e Lindalva.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociência de Botucatu - UNESP em especial à Maria Helena pela ajuda do preparo das lâminas e no manuseio do microscópio eletrônico.

À Andréa e Jerusa pelo apoio, incentivo e amizade.

À FAPESP pelo auxílio financeiro que foi concedido a esse projeto.

À Apsen Farmacêutica S.A. pelo suporte para a realização desse trabalho.

Aos coelhos que deram a vida para o desenvolvimento do experimento.

A Deus...

“...pela oportunidade impar,

... por proporcionar alegria, paz, saúde e amor,

... pelos amigos, pela profissão,

... pela vida..... ”

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS.....	11
LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	17
RESUMO	20
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVO	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Casuística e Cuidados Gerais.....	37
3.2. Grupos Experimentais.....	37
3.3. Técnica de Obtenção de Instabilidade vesical	40
3.3.1. Anestesia.....	40
3.3.2. Procedimento cirúrgico	40
3.4. Sequência Experimental	43
3.5. Estudo Cistométrico	44
3.5.1. Técnica do estudo cistométrico	46
3.6. Exames Laboratoriais	51
3.6.1. Urina	51
3.6.2. Sangue	51
3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão	52
3.8. Métodos Estatísticos	54
4. RESULTADOS	56
4.1. Peso Corpóreo	57
4.1.1. Dados individuais do peso corpóreo (Kg) nos diferentes grupos experimentais e momentos	57
4.1.2. Análise do peso corpóreo	57
4.2. Peso da Bexiga	58
4.2.1. Dados individuais do peso da bexiga (g) nos diferentes grupos experimentais	58
4.2.2. Análise do Peso da Bexiga	58

4.3. Cistometria	58
4.3.1. Capacidade vesical máxima	58
4.3.1.a. Dados individuais da capacidade vesical (ml) nos diferentes grupos experimentais e momentos.....	59
4.3.1.b. Análise da capacidade vesical máxima	59
4.3.2. Pressão detrusora máxima	60
4.3.2.a. Dados individuais da pressão detrusora máxima nos diferentes grupos e momentos	60
4.3.2.b Análise da pressão detrusora máxima.....	60
4.3.3. Complacência vesical	61
4.3.3.a.Dados individuais da complacência vesical nos diferentes grupos experimentais e momentos	61
4.3.3.b. Análise da complacência vesical	61
4.3.4. Análise da contração involuntária do detrusor	61
.....	
4.4. Cultura de Urina	62
4.4.1. Dados individuais do resultado da cultura de urina nos diferentes grupos e momentos	62
4.4.2. Análise da cultura de urina	62
4.5. Creatinina Plasmática	63
4.5.1. Dados individuais da creatinina plasmática (mg/dl) nos diferentes grupos e momentos	63
4.5.2. Análise da creatinina plasmática	63
4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão	65
4.6.1. Análise ultra-estrutural da célula muscular da bexiga do grupo controle (G1)	65
4.6.2. Análise ultra-estrutural da célula muscular da bexiga do grupo com instabilidade do detrusor (G2)	70
4.6.3. Análise ultra-estrutural da célula muscular da bexiga do grupo com instabilidade do detrusor e oxibutinina intravesical (G3)	76
.....	
5. DISCUSSÃO	80

6. CONCLUSÕES	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
8. APÊNDICE	114
9. ANEXO	122

LISTAS DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

FIGURA 01	Exame cistométrico demonstrando a presença de contrações involuntárias do detrusor	39
FIGURA 02	Incisão abdominal e dissecação da bexiga	41
FIGURA 03	Ilustração da bexiga com ureteres dissecados e isolados	41
FIGURA 04	A - visão anterior da região do colo vesical com bracelete e no quadrante inferior esquerdo o detalhe do bracelete e B - visão posterior demonstrando a posição adequada dos ureteres em relação ao bracelete	42
FIGURA 05	Seqüência experimental G1 = grupo controle, G2 = instabilidade do detrusor, G3 = instabilidade do detrusor + oxibutinina, M1 = uma semana após a cirurgia, M2 = 30 dias após M1, C1, C2 e C3= cistometria + exames laboratoriais	44
FIGURA 06	Sistema de cistometria computadorizada Urobyte 5000	45
FIGURA 07	Sonda tipo balão retal. No quadrante superior esquerdo, detalhe da ponta da sonda	46
FIGURA 08	Ilustração do coelho sendo submetido ao estudo cistométrico	48
FIGURA 09	Traçado de um exame cistométrico normal. P1: Pressão Vesical, P2: Pressão Intra-abdominal, Pdet: Pressão do Detrusor	50
FIGURA 10	Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G1 (controle). Nota-se distribuição uniforme das células musculares (M) com espaços intercelulares bem definidos e simétricos (*). X 7750	66

FIGURA 11	Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G1 (controle). Nota-se junções intercelulares regulares (J) e intercaladas com áreas de <i>caveolae</i> com microvesículas homogêneas (C). X 17000	67
FIGURA 12	Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G1 (controle). Nota-se presença de mitocôndrias com densidade normal (seta) e áreas de <i>caveolae</i> com microvesículas homogêneas (C). X 31500	68
FIGURA 13	Característica ultra-estrutural normal das células musculares de coelho, presença do núcleo (N), mitocôndria (m), junções intercelulares (J) e área de <i>caveolae</i> (C) X 17.000	69
FIGURA 14	Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G2 (instabilidade do detrusor). Nota-se densidade heterogênea das células musculares (C). X 3250	71
FIGURA 15	Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G2 (instabilidade do detrusor). Nota-se aumento dos espaços intercelulares (*) e assimetria das junções intercelulares (J). X 5750 .	72
FIGURA 16	Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G2 (instabilidade do detrusor). Nota-se assimetria das junções intercelulares (J) e corpúsculo degenerativo (seta). X 9750	73
FIGURA 17	Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G2 (instabilidade do detrusor). Nota-se clarificação da matriz mitocondrial (seta). X 75500	74
FIGURA 18	Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo 2 (instabilidade do detrusor). Nota-se áreas de <i>caveolae</i> com microvesículas de tamanho heterogêneo(C). X 31500	75

- FIGURA 19** Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G3 (instabilidade do detrusor e oxibutinina intravesical). Nota-se distribuição homogênea dos espaços intercelulares (*). X 2450 77
- FIGURA 20** Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G3 (instabilidade do detrusor e oxibutinina intravesical). Nota-se núcleo (N) do miócito, espaços intercelulares simétricos e normais (seta), observou-se regularidade das junções intercelulares (J). X 9.750 78
- FIGURA 21** Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G3 (instabilidade do detrusor e oxibutinina intravesical). Nota-se retorno da densidade mitocondrial (seta) e áreas de *caveolae* com microvesículas homogêneas (C). X 13250 ... 79

TABELA 1	Média e desvio-padrão do peso do animal (kg) segundo os grupos estudados nos diferentes momentos.....	57
TABELA 2	Média e desvio padrão do peso da bexiga (g) segundo os grupos estudados	58
TABELA 3	Média e desvio padrão da capacidade vesical máxima (ml) segundo os grupos estudados nos diferentes momentos	59
TABELA 4	Média e desvio padrão da pressão detrusora máxima segundo os grupos estudados e nos diferentes momentos.....	60
TABELA 5	Média e desvio padrão da complacência vesical segundo os grupos estudados nos diferentes momentos	61
TABELA 6	Média da creatinina plasmática segundo os grupos estudados nos diferentes momentos.....	64
GRÁFICO 1	Distribuição da contração involuntária do detrusor segundo os grupos estudados no momento M2	62
GRÁFICO 2	Distribuição da infecção urinária segundo os grupos estudados no momento M2	63

LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

UNESP Universidade Estadual Paulista

FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

kg quilograma

g grama

mg miligrama

mg/dl miligrama por decilitro

mg/d miligrama por dia

ml mililitro

ml/min mililitro por minuto

ml/kg mililitro por quilograma

mg/ml miligrama por mililitro

cm centímetro

nM nanômetro

Fig figura

Tab tabela

Fr French

NaCl cloreto de sódio

pH logaritmo decimal do inverso da atividade dos íons hidrogênio numa solução

GAP junção comunicante intercelular

°C grau Celsius

% porcentagem

(-) menos

(+) mais

n° número

Å Angstroms

RESUMO

Alterações ultra-estruturais induzidas pela instabilidade do detrusor em coelhos. Ação da oxibutinina.

Introdução e Objetivos - A obstrução parcial da bexiga pode ocasionar instabilidade vesical. A oxibutinina intravesical pode melhorar os sintomas de urgência ou incontinência urinária, nos pacientes que não respondem ao tratamento ou apresentam efeitos colaterais importantes, com a oxibutinina oral. Este estudo teve como objetivo analisar as alterações ultra-estruturais na instabilidade vesical de coelhos tratados com oxibutinina intravesical.

Material e Métodos - Foram utilizados 15 coelhos machos, Norfolk distribuídos, de maneira aleatória, em 3 grupos experimentais, sendo cada grupo composto por 5 animais: Grupo I - Controle Clínico, Grupo II - Instabilidade vesical e Grupo III - Instabilidade vesical + oxibutinina intravesical. Nos grupos II e III os animais foram submetidos à técnica de obstrução parcial infravesical e foram incluídos os animais que desenvolveram contrações involuntárias do detrusor durante o estudo cistométrico. Nos coelhos do grupo III foi instilado oxibutinina intravesical na dose de 0,5mg/Kg uma vez por dia. Após 30 dias os animais foram submetidos à avaliação do peso corporal, peso da bexiga, exames laboratoriais (creatinina plasmática e cultura de urina), avaliação citométrica e estudo de microscopia eletrônica.

Resultados - O ganho de peso corporal médio nos grupos G1, GII e GIII foi estatisticamente significativo nos diferentes momentos. Após 30 dias o peso da bexiga dos animais do GII e GIII foi estatisticamente maior que o do grupo GI. Observamos infecção urinária em 80% dos casos no grupo GII, em 40% no grupo GIII e ausência no grupo controle. No grupo G III verificamos ausência de contrações involuntárias do detrusor em 80% dos casos no momento final. No estudo com microscopia eletrônica, observamos no grupo G1 uma distribuição uniforme das células musculares com espaços intercelulares bem definidos e próximos, junções intercelulares regulares e intercaladas com áreas de *caveolae* com microvesículas homogêneas e presença de mitocôndrias com densidade normal. No grupo GII, verificamos um aumento do espaço intercelular, alterações nas junções intercelulares, diminuição das áreas de *caveolae*, alteração da matriz mitocondrial e degeneração celular. No grupo GIII, tratado com oxibutinina intravesical, observou-se uma diminuição dos espaços intercelulares, simetria das junções intercelulares, áreas de *caveolae* com homogeneidade das microvesículas e retorno da densidade mitocondrial, ou seja, características semelhantes às do grupo controle.

Conclusões - As alterações ultra-estruturais foram evidentes após a instabilidade do detrusor e mais pronunciadas nos animais do grupo GII. Algumas das alterações observadas sugerem que um processo isquêmico esteja envolvido. Estes achados podem ser causadas pela instabilidade detrusora, visto que houve uma nítida melhora nos animais tratados com oxibutinina intravesical.

Abstract

Ultrastructural alterations observed in rabbits with detrusor instability: The action of oxybutynin.

Introduction and Objectives - Partial bladder outlet obstruction may develop detrusor instability (DI). Intravesical oxybutynin is known to improve clinical symptoms and urodynamic findings in these patients. The aim of this study was to perform electron microscopy study on bladder of rabbits with detrusor instability submitted or not to intravesical instillation of oxybutynin.

Materials e methods - 15 male Norfolk rabbits were randomly distributed into 3 groups: In group I (n=5), no surgical intervention was performed. In group II and III, detrusor instability was developed using a cable-tie located around the urethra and a 10 Fr urethral catheter urodynamic study was performed 1 week after the procedure. Only those animals that developed detrusor instability were included in the study (5 animals in each group). In group III, 0,5mg/Kg/d of oxybutinin was instilled inside the bladder during 30 days. After urodynamic study, animal and bladder weight, creatinin and urine culture were evaluated. All the animals were sacrificed and study electron microscopic evaluation was performed.

Results - In group I, urodynamic study showed no alteration. In group II and III, 100% and 20% of the animals presented DI at the end of the study. Urinary tract infection was present in 80% and 40% in groups II and III respectively. Average bladder weight after sacrifice was higher in groups II and III than in group I. Electron microscopy showed an increase in intercelular space, changes in cell junctions, reduced *caveolae* area and changes in the mitochondria with celular degeneration in group II. In group III there was a reduction in intercelular spaces, symmetric cell junction, homogeneity in *caveolae* areas and return to normal mitochondrial density, similarly seen in group I.

Conclusions - Ultrastructural changes were evident after DI and were more pronounced in those animals that did not use intravesical oxybutynin. Some of the observed changes suggest that an ischemia process may have been involved. The ultrastructural changes found may have been caused by the detrusor instability as we noticed a clear improvement in these changes when the oxybutynin was instilled into the bladder.

1. INTRODUÇÃO

A unidade funcional responsável pela continência urinária compreende bexiga, uretra e musculatura do assoalho pélvico. A bexiga tem a função de armazenar urina à baixa pressão, sem desconforto ou perdas urinárias, para depois esvaziar-se sem esforço ou resíduo urinário. Seu funcionamento adequado implica em contrações e relaxamentos dos músculos lisos e estriados que fazem parte da estrutura vésico-uretral (OLIVEIRA, 1995; NETTO JUNIOR & D'ANCONA, 2001) e num sinergismo do sistema nervoso central e periférico (WEIN, 1992).

A bexiga e a uretra recebem inervação aferente e eferente através do sistema nervoso autônomo (parassimpático e simpático). Os músculos estriados do assoalho pélvico e o esfíncter uretral externo recebem inervação via nervo pudendo (TANAGHO, 1992).

A atividade do músculo detrusor pode ser avaliada com o estudo urodinâmico. Nos casos de bexiga estável, não são observadas contrações involuntárias do detrusor mesmo com manobras provocativas, como mudança de decúbito, enchimento vesical rápido, tosse e barulho de água corrente (SAND & OSTERGARD, 1997). A instabilidade vesical é caracterizada no estudo urodinâmico pela presença de contrações involuntárias do detrusor (espontâneas e provocadas), de qualquer amplitude observadas durante a fase de enchimento vesical (INTERNATIONAL CONTINENCE SOCIETY

COMMITTEE, 1988). Pode ser motora quando se observa contração involuntária do detrusor no estudo urodinâmico ou sensorial quando o registro gráfico dessa contração não é observado, mesmo com manobras provocativas, porém a pessoa apresenta clínica de urgência ou imperiosidade miccional (D'ANCONA, 2001). A monitorização contínua da pressão vesical com urodinâmica ambulatorial, demonstra que a instabilidade vesical classificada como tipo sensorial, é em alguns casos, conseqüente na verdade, da falha na detecção de contração involuntária do detrusor na urodinâmica convencional (D'ANCONA, 2001). Quando a causa das contrações involuntárias do detrusor for por lesão neurológica, denomina-se hiperreflexia do detrusor (HAMPEL et al., 1997; SAND & OSTERGARD, 1997).

A instabilidade vesical pode ocasionar sintomas relacionados com o armazenamento vesical como aumento na freqüência, noctúria, urgência ou incontinência urinária (I Consenso Brasileiro - Incontinência urinária, uroneurologia e disfunções miccionais, 1999). Essas alterações são freqüentes na prática urológica, podendo ocorrer em ambos os sexos (JOLLYS et al., 1993; HOMMA et al., 1994; SCHATZL et al., 2001; KAKIZAKI et al., 2002). RESNICK e RUTCHIK (1998), estudando pacientes idosos institucionalizados, observaram incontinência urinária em 61% das mulheres e 59% dos homens. A instabilidade vesical é a causa mais comum de incontinência urinária nos

idosos, estando presente em 40% a 70% deles (COUILLARD & WEBSTER, 1995; ARTIBANI, 1997). WISE e CARDOZO (1992) observaram que a incontinência urinária esta associada à instabilidade vesical em 30% a 50% dos casos, podendo resultar em implicações psicossociais importantes (ELBADAWI et al., 1993c; BRADING, 1997) ou mesmo sexuais (ABRAMS & WEIN, 2000).

Vários fatores são relacionados com a instabilidade do detrusor: desnervação vesical (TURNER & BRADING, 1997; CHARLTON et al., 1999; MILLS et al., 2000; DRAKE et al., 2001), alterações das conexões elétricas intercelulares (KARL, 2003), aumento do número de nervos sensoriais vesicais subepiteliais (MOORE et al., 1992; BRADING, 1997), mudanças nos receptores muscarínicos (BOONE et al., 1999), aumento da liberação basal de acetilcolina (YOSHIDA et al., 2002), obstrução infravesical (LEVIN et al., 1990 e 1997; MALMQVIST et al., 1991; SJUVE et al., 1996), isquemia da parede da bexiga (GILL et al., 1988; TONG-LONG et al., 1988; LEVIN et al., 1997; AZADZOI et al., 1999), alterações mitocondriais (FLAMENG et al., 1980; SCHIRMER et al., 1997, LU et al., 2000), aumento de potássio intersticial (RUGGIERI et al., 1986; HOHLBRUGGER, 1996) e do cálcio intracelular (ZDERIC et al., 1996) e alteração da atividade contrátil muscular (COOLSAET et al., 1993).

Os principais objetivos do tratamento da instabilidade vesical são a preservação ou melhoria da drenagem do trato urinário, o controle das infecções urinárias e, se possível, a continência urinária, com melhora da qualidade de vida e inserção no meio social.

No tratamento clínico da disfunção miccional decorrente de alterações neurogênicas da bexiga como hiperreflexia e perda da complacência vesical, a oxibutinina por via oral e o cateterismo intermitente limpo vêm sendo utilizados há mais de três décadas (DIOKNO & LAPIDES, 1972; MULCAHY et al., 1977; BLENDER et al., 1989; GREENFIELD & FERA, 1991; WEESE et al., 1993), obtendo continência e manutenção da função do trato urinário em muitos pacientes.

O cateterismo intermitente limpo foi introduzido por LAPIDES et al., em 1972, podendo ser indicado em qualquer idade, sendo em geral bem aceito pelos pacientes. Após a lavagem das mãos e genital, lubrifica-se a sonda uretral com calibre apropriado à idade e a sondagem uretral é determinada pelos parâmetros clínicos e urodinâmicos, sendo normalmente realizada a cada 4 horas. Com isso reduzem-se as alterações funcionais e estruturais da distensão vesical, melhorando o fluxo sangüíneo e conseqüentemente as defesas contra a infecção urinária (OPTIZ et al., 1992).

O cloridrato de oxibutinina é uma amina terciária com ação anti-colinérgica, anti-espasmódica e anestésica local. Em sua ação farmacológica bloqueia o receptor colinérgico da musculatura detrusora, levando ao relaxamento, à diminuição do tônus vesical e à supressão das contrações involuntárias do detrusor e diminuindo a frequência das micções (FREDERICKS et al., 1975; LEVIN & WEIN, 1982). A oxibutinina tem também efeito analgésico local na bexiga (FREDERICKS et al., 1975) sendo esta ação duas vezes mais potente do que a da lidocaína (LISH et al., 1965).

A oxibutinina liga-se aos receptores muscarínicos subtipo 2 e 3, na musculatura detrusora humana (YAMAGUCHI et al., 1996), tendo 10 vezes mais seletividade para subtipo 3. Este receptor é o responsável pela atividade contrátil do detrusor e o subtipo 2 o regulador do relaxamento muscular (BOONE et al., 1999). Estes receptores são encontrados em diversos órgãos, podendo então os efeitos adversos da oxibutinina variar na dependência da sua distribuição.

A oxibutinina sofre metabolização no intestino e no fígado, realizada pelo citocromo P450 3A (YAICH et al., 1998), que tem alta concentração na parte proximal do intestino delgado e no cólon (PAINE et al., 1997) e o seu metabólito (N-desetiloxibutinina) é responsável pelos efeitos colaterais que ocorrem em 40% a 80% dos casos (MOISEY et al., 1980; CARDOZO et al.,

1987; MASSAD et al., 1992; LANDAU et al., 1995). Os principais sintomas adversos ou seja, sialosquese, constipação intestinal, retenção urinária, visão turva, sonolência e diarreia, frequentemente determinam a redução da dose ou a descontinuidade do tratamento (MOISEY et al., 1980; CARDOZO et al., 1987). Pode ocorrer ainda perda da eficácia da medicação a longo prazo (MACDIARMID, 2003).

No ser humano, o pico plasmático da oxibutinina ocorre 50 minutos após a administração oral, tem meia vida curta e baixa biodisponibilidade sistêmica, sendo a concentração sérica do N-desetiloxibutinina 4 a 10 vezes maior do que a da oxibutinina após ingestão oral (DAVILA et al., 2001).

A utilização da oxibutinina intravesical é uma opção terapêutica nos pacientes que não respondem ao tratamento oral ou que apresentaram efeitos adversos. Este tratamento é ideal em esquema de autocateterismo vesical e hiperreflexia detrusora. GREENFIELD & FERA (1991), utilizando oxibutinina intravesical, observaram boa aderência e aceitação pelos pais e pelas crianças que faziam autocateterismo.

A apresentação da oxibutinina em solução líquida, em frasco, eliminou a necessidade da manipulação do comprimido facilitando a sua aplicação intravesical e a aderência ao tratamento (BUYSE et al., 1998; AMARO et al., 2004).

O modo de atuação da droga na parede vesical e as alterações histopatológicas e ultra-estruturais, decorrentes da sua utilização, não estão, entretanto, bem estabelecidas (LANDAU et al., 1995). Na literatura, existem relatos de tratamento da disfunção miccional com a oxibutinina por via intravesical, onde não se observaram alterações na mucosa ou na parede vesical de ratas (BONNEY et al., 1993).

ELBADAWI et al. (1993d) e HOLM et al. (1995) referem alterações ultra-estruturais e mudanças morfológicas distintas na musculatura detrusora de pacientes com sintomas obstrutivos e com instabilidade vesical. A presença de junção de protusão e assimetria da junção intermediária foram encontradas em todos os casos de instabilidade vesical, caracterizando assim um padrão ultra-estrutural (ELBADAWI et al., 1993d).

Existem diferentes modelos experimentais de instabilidade vesical de causa obstrutiva, utilizando cobaia (MOSTWIN et al., 1991; WILLIAMS et al., 1993), coelho (BRENT & STEPHENS, 1975; MAYO & HINMAN, 1976) gato (LEVIN et al., 1992), cão (BRODERICK et al., 1994), porco (SIBLEY, 1985) e rato (LLUEL et al., 1998). Além disso, tem-se utilizado diferentes formas de obstrução parcial da bexiga, por meio de fio de sutura, faixa de silicone e anéis (LEVIN & WEIN, 1984; SIBLEY, 1985; GHONIEM et al., 1986; KATO et al., 1988 e 1990; MONSON et al., 1994; CANNING et al., 1995; KUO, 1996;

DAS et al., 1998; OHNISHI et al., 2000; LIEB et al., 1998; SCHRODER et al., 2001).

Poucos são os trabalhos que levaram em consideração o aparecimento de instabilidade vesical decorrente da obstrução parcial da bexiga (SIBLEY, 1985; MALMGREN et al., 1987, GRAY, 1997; KWAK & LEE, 1998; LLUEL et al., 1998; BALASTEGHIN et al., 2003). Até o momento não estão bem elucidadas as repercussões ultra-estruturais em um modelo de obstrução parcial da bexiga de coelhos com instabilidade vesical tratados com oxibutinina intravesical.

2. OBJETIVO

Nossa pesquisa teve como objetivo o estudo das alterações ultra-estruturais na bexiga do coelho e a avaliação da ação da oxibutinina intravesical utilizando um modelo experimental de instabilidade vesical descrito por BALASTEGHIN et al. em 2003.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística e Cuidados Gerais

Foram utilizados 15 coelhos machos da raça Norfolk fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu – Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas de 55 x 55 x 60 cm com 2 animais em cada uma, sendo a temperatura ambiente mantida em torno de 20°C.

Previamente ao início do experimento, os coelhos foram mantidos por uma semana no Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Urologia para adaptação e detecção de eventuais problemas clínicos. Os animais foram alimentados com ração nutricaoelhos^a e água “ad libitum”.

3.2. Grupos Experimentais

Após o período de observação, os animais foram distribuídos, por sorteio, em 3 grupos, sendo cada um composto de 5 coelhos.

^aFabricado pela Purina Nutrimentos Ltda.

Grupo 1 - Controle - Neste grupo não houve intervenção cirúrgica. Os animais serviram como modelo padrão de normalidade para avaliação dos parâmetros clínicos, cistométrico e ultra-estrutural.

Grupo 2 – Instabilidade vesical – Os animais foram submetidos à obstrução parcial da bexiga, utilizando-se a técnica de BALASTEGHIN et al. (2003) e foram considerados somente aqueles que desenvolveram contrações involuntárias do detrusor (Fig. 1).

Grupo 3 – Instabilidade vesical e oxibutinina intravesical - Neste grupo, foram incluídos os animais com instabilidade do detrusor, conforme técnica descrita para o grupo 2 e realizada instilação de oxibutinina intravesical (0,5 mg/ Kg) na forma líquida (1mg/ml)^b e diluída em 5 ml de solução salina, utilizando uma sonda vesical, 1x/dia durante 30 dias.

^b Fabricada pela Apsen do Brasil

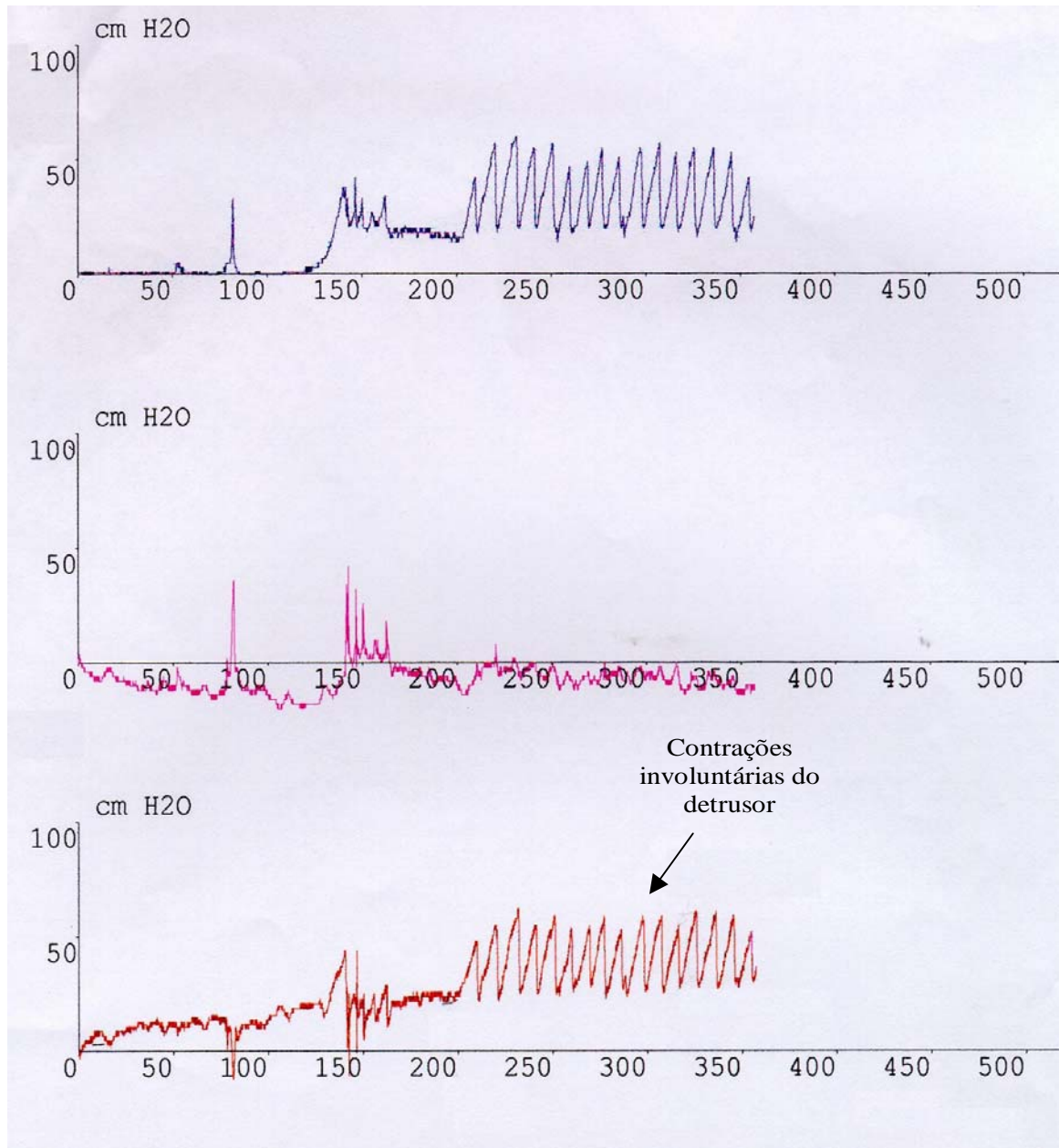


Figura 1: Exame cistométrico demonstrando a presença de contrações involuntárias do detrusor.

3.3. Técnica de Obtenção de Instabilidade Vesical (BALASTEGHIN et al., 2003)

3.3.1. Anestesia

Os animais, após jejum de 12 horas, receberam como medicação pré-anestésica, diazepam^c em solução salina a 0,1% por via intravenosa (diazepam 10 mg + 8 ml de NaCl 0,9%), na dose de 1 mg/kg. A seguir, efetuou-se a anestesia com a associação xilazina^d e ketamina^e em partes iguais, na dose de 0,25 ml/kg, por via intramuscular. Quando necessário, a anestesia foi reforçada com doses adicionais de 0,25 ml/kg.

3.3.2. Procedimento cirúrgico

Após anestesia, realizou-se tricotomia e anti-sepsia da parede abdominal com iodopovidine^f. Após a incisão mediana infra-umbilical efetuou-se dissecação da bexiga (Fig. 2). A seguir foram identificados e isolados os ureteres (Fig. 3).

^c Fabricado pelo Laboratório Cristália.

^d Fabricado pela Bayer.

^e Fabricado pela Parke-Davis.

^f Fabricado pela Made Care



Figura 2: Incisão abdominal e dissecação da bexiga.

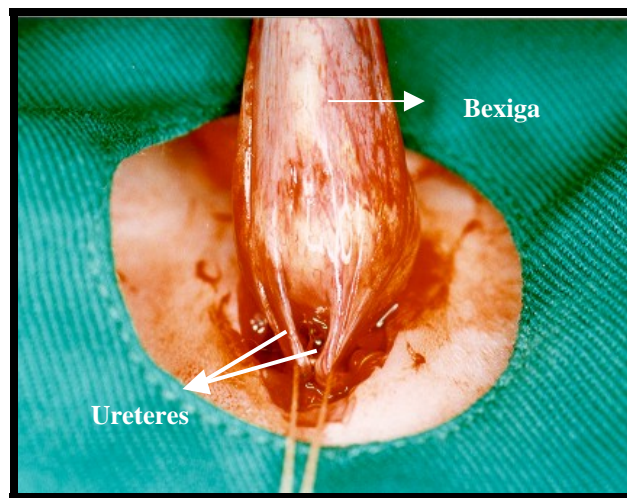


Figura 3: Ilustração da bexiga com ureteres dissecados e isolados.

A uretra foi cateterizada com sonda de Foley 10 Fr^g e, a seguir, colocou-se um bracelete ajustável de polietileno ao redor do colo vesical de forma a não comprimir a uretra e não englobar os ureteres (Fig. 4 – A, B e C).

^g Fabricado pela Krammer, Ind. e Comércio Ltda.

Em seguida, procedeu-se à sutura da parede abdominal com catgut cromado 4-0^h em 2 planos (parede muscular e pele).

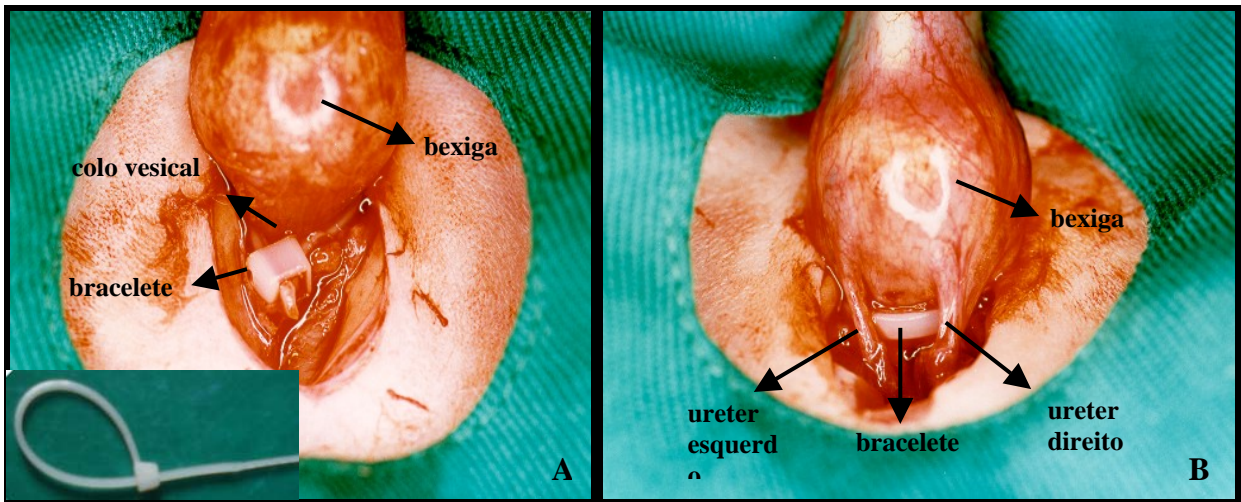


Figura 4: A - visão anterior da região do colo vesical com bracelete e no quadrante inferior esquerdo o detalhe do bracelete e B - visão posterior demonstrando a posição adequada dos ureteres em relação ao bracelete.

^h Fabricado pela Ethicon

3.4. Seqüência Experimental

Após o período de ambientação, os seguintes exames foram efetuados em todos os animais em diferentes momentos, antes da distribuição randomizada, (momento M1) e após 30 dias (momento M2): cultura de urina, creatinina plasmática e estudo cistométrico (Fig. 5).

O estudo cistométrico foi realizado em 2 diferentes momentos no grupo G1, o primeiro no momento inicial (M1) e o segundo após 30 dias no momento final (M2). Nos grupos G2 e G3 foram realizados 3 estudos cistométricos, o primeiro antes do procedimento cirúrgico, o segundo uma semana após o procedimento cirúrgico (M1), para selecionar os animais com contrações involuntárias do detrusor e o terceiro no momento final (M2). O sacrifício foi realizado com dose excessiva de pentobarbital sódicoⁱ, seguido de imediata remoção da bexiga para o preparo e avaliação ultra-estrutural.

ⁱ Hypnol 3% - Produzida pela Fontoveter

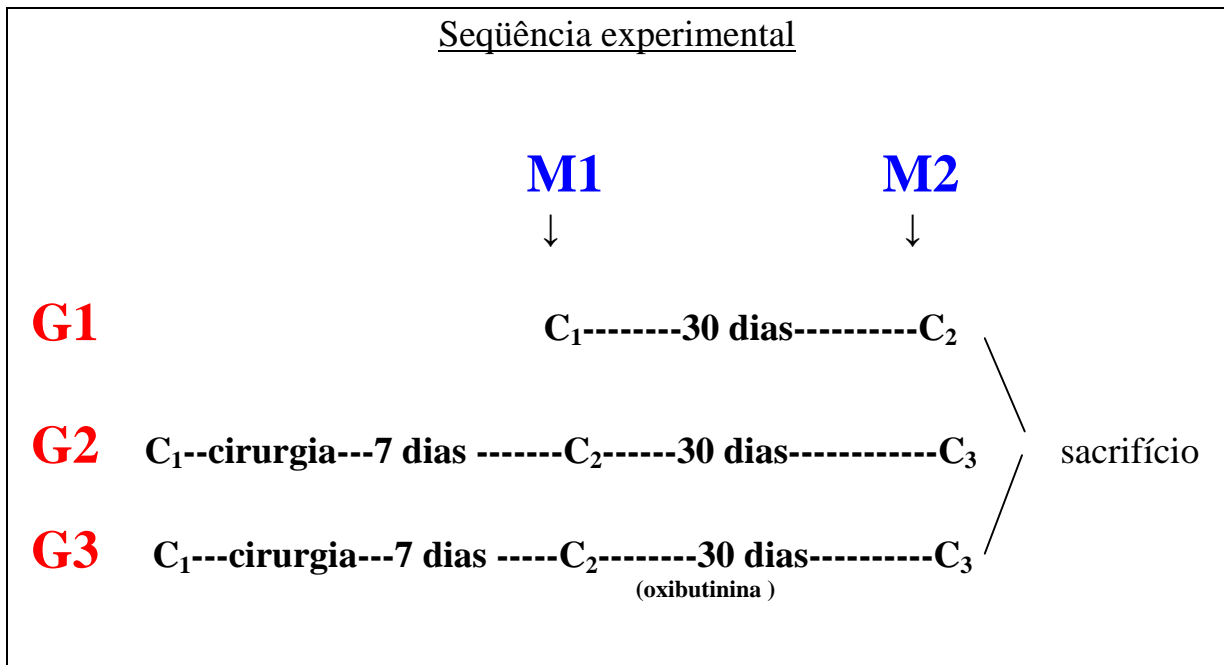


Figura 5: Seqüência experimental. G1 = grupo controle, G2 = instabilidade do detrusor, G3 = instabilidade do detrusor + oxibutinina intravesical, M1 = uma semana após a cirurgia, M2 = 30 dias após M1, C₁, C₂ e C₃ = cistometria + exames laboratoriais.

3.5. Estudo Cistométrico

No estudo cistométrico foram utilizados um sistema de cistometria computadorizada UROBYTE 5000 com interface, transdutor de membrana para pressão “SPECTROMED”, que possibilita determinações de (-) 300 a (+) 300 mmHg, um módulo de infusão com sistema de bombeamento peristáltico e um processador Pentium , monitor (Samsung) e impressora jato de tinta (DeskJet) (Fig. 6).



Figura 6: Sistema de cistometria computadorizada Urobyte 5000.

Para medir a pressão vesical utilizou-se sonda de 2 vias para cistomanometria 10 Fr^j.

Para a medida da pressão abdominal, foi utilizada sonda com balão que foi introduzida 2 cm além do orifício anal. Esta sonda foi construída a partir de uma sonda nasogástrica de Levine¹ 12 Fr (4 mm), e um tubo de polivinil 3 Fr (1,00 mm) introduzido na luz da sonda de Levine até atingir sua extremidade.

^j Produzida pela Neoplex

¹ Sondaplast MS-01580024

Na outra extremidade foi criado um sistema em Y que permitiu a circulação de líquido no interior do balão evitando a formação de bolhas de ar, que poderiam interferir na medida da pressão abdominal (Fig. 7), descrito por AMARO et al. (1997).

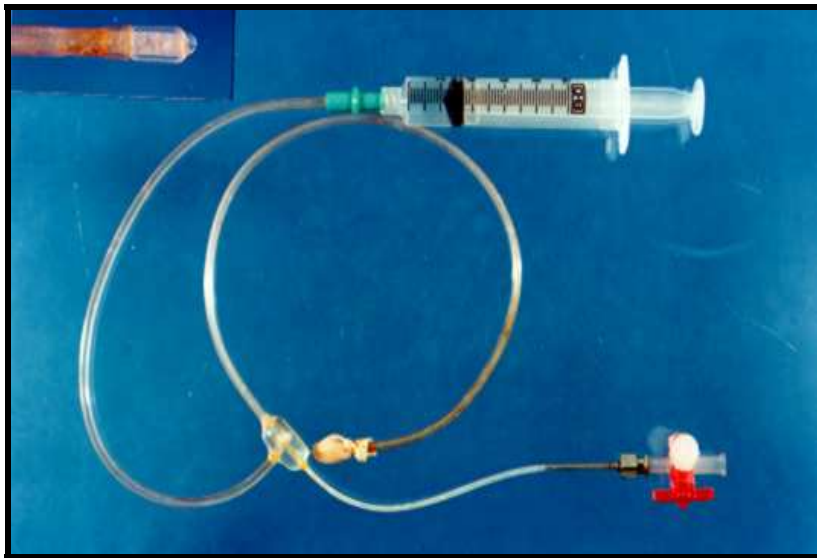


Figura 7: Sonda tipo balão retal. No quadrante superior esquerdo, detalhe da ponta da sonda.

3.5.1. Técnica do estudo cistométrico

Durante os exames os animais em vigília foram colocados em goteiras de madeira, com as patas anteriores e posteriores contidas por meio de fio de algodão cordonê. Após anti-sepsia da região do pênis com iodopovidine tópico

e lubrificação com xilocaína gel 2%^m, uma sonda de cistomanometria nº 10 Fr de 2 vias foi introduzida na bexiga para o esvaziamento vesical.

O balão retal, após lubrificação com xilocaína gel 2%, foi introduzido 2cm além da margem anal e conectado a uma torneira de 2 vias, injetando-se em uma das vias 0,4 ml de água destilada. A outra via foi conectada ao transdutor de pressão.

A sonda vesical foi conectada uma extremidade ao transdutor de pressão, e a outra conectada a uma bomba de infusão contínua (2 ml/min) (Fig. 8).

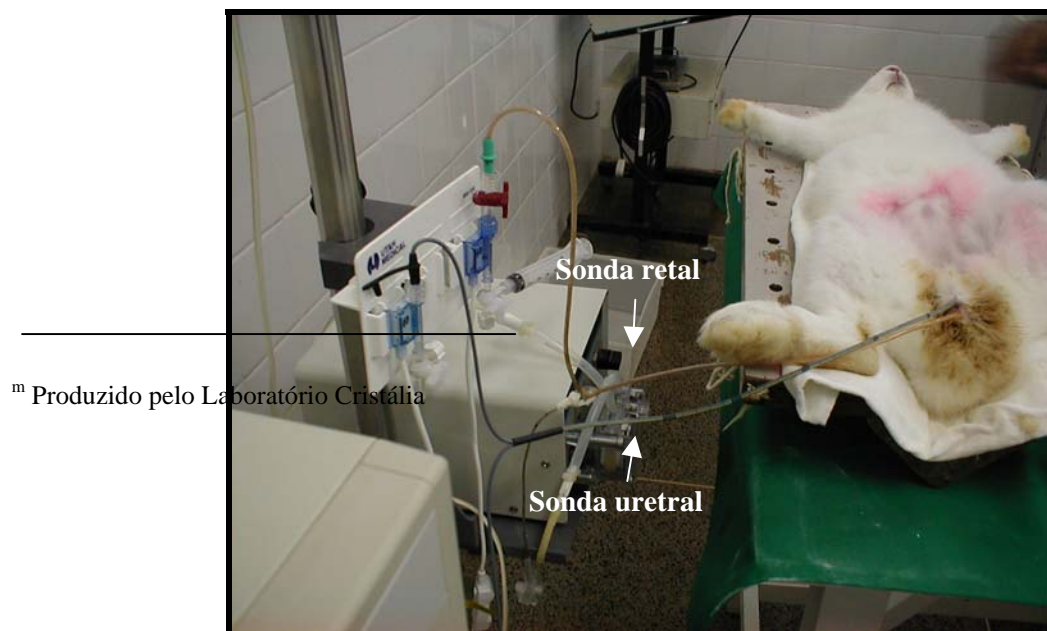


Figura 8: Ilustração do coelho sendo submetido ao estudo cistométrico.

Para testar o bom posicionamento das sondas, foi feita leve compressão no abdome, de maneira a obter-se uma curva de pressão abdominal, que foi transmitida para a bexiga obtendo-se a curva de pressão vesical.

A cistometria foi iniciada com infusão vesical contínua de 2 ml/min, procedendo-se as medidas simultâneas das pressões vesical e abdominal. Ao observarmos perda urinária ao redor da sonda vesical, o exame foi interrompido. Neste instante foram verificados a pressão vesical (P_{ves}), a pressão abdominal (P_{abd}) e o volume máximo infundido (Vol). A pressão detrusora foi obtida pela diferença da pressão abdominal (P_{abd}) e da pressão vesical (P_{ves}) na fase miccional (perda urinária), expressa como a pressão máxima do detrusor. A capacidade vesical máxima foi considerada aquela em que se atingiu o volume de enchimento suficiente para que ocorresse a micção (Fig. 9). A complacência vesical foi obtida pela equação: $(V_f - V_i)/(P_f - P_i)$, onde: V_f = volume final, V_i = volume inicial, P_f = pressão final e P_i = pressão inicial.

A instabilidade vesical foi caracterizada pela presença, no estudo cistométrico, de contrações involuntárias do detrusor, ocorrendo com baixo volume vesical, causando ou não perda urinária.

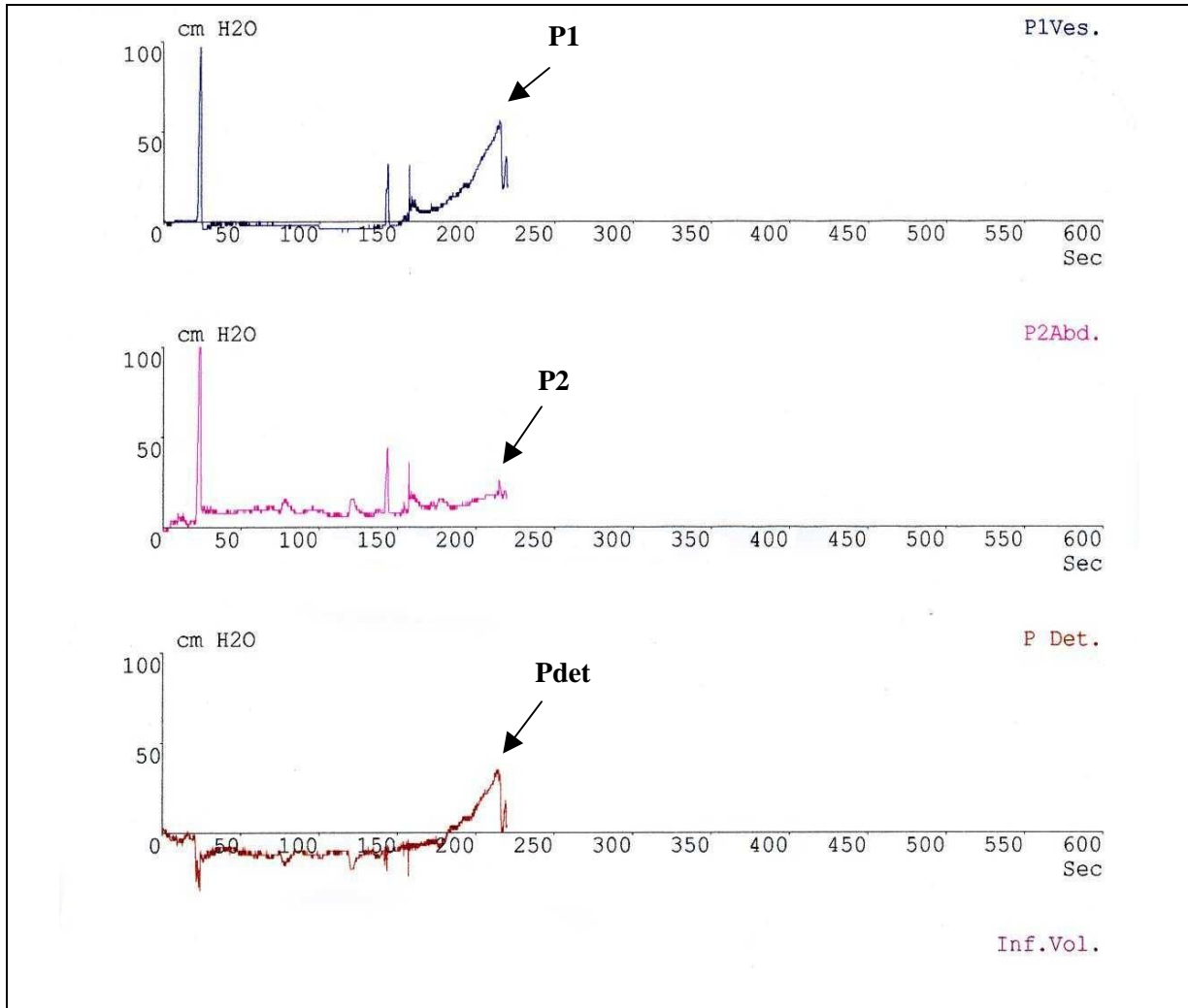


Figura 9: Traçado de um exame cistométrico normal. P1: Pressão Vesical, P2: Pressão Intra-abdominal, Pdet: Pressão do Detrusor

3.6. Exames Laboratoriais

3.6.1. Urina

Após anti-sepsia do pênis do coelho com iodopovidine tópico e colocação do campo oftálmico estéril, realizou-se o cateterismo vesical com sonda Foley nº 10 Fr. A urina, coletada em tubo estéril, foi enviada para cultura no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

3.6.2. Sangue

Após tricotomia da orelha do animal com lâmina de barbearⁿ do animal e instilação de álcool 70^o, puncionou-se a artéria com agulha 28 x 7^p, e obteve-se 4 ml de sangue por gotejamento em tubo de vidro seco. Após 15 minutos de repouso, ocorreu retração do coágulo. Em seguida o soro foi separado, utilizando-se a centrífuga IEKE modelo LC, em 2500 rotações por minutos por 10 minutos. O soro, identificado e congelado a -18^oC em freezer da marca Cònsul (Practice 240), foi utilizado na dosagem de creatinina plasmática.

ⁿ Produzida pela Super - Max

^o Produzida pela Áster Produtos Médicos Ltda

^p Produzida pela Becton Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda

3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Este estudo foi realizado em todos os animais no momento final (M2). Foram obtidos fragmentos do corpo da bexiga na porção ventral do corpo, após ter sido a mesma extraída do animal, com auxílio de lupa e lâminas inoxidáveis^q (de barbear), que foram imersos no fixador de glutaraldeído^r a 2,5% em tampão fosfato^s em 0,1 M com pH 7,2, por três horas e em seguida, pós-fixados em tetróxido de ósmio^t 1% no mesmo tampão por duas horas. Após essa dupla fixação, os fragmentos foram lavados em água durante 15 minutos, colocados em acetato de uranila^u a 0,5% por 2 horas e submetidos à desidratação com passagens em soluções de acetona (para análise) em concentrações crescentes (50%, 70%, 90% e 100%). O procedimento seguinte, a infiltração, foi iniciado com a mistura de araldite^v e acetona^w em partes iguais, durante 24 horas em temperatura ambiente. Uma vez incluído o material (emblocagem feita em araldite) os blocos foram removidos dos moldes e aparados com lâmina de barbear, sob lupa binocular.

^q Produzida pela Gillette

^r Produzida pela Merck

^s Produzida pela Merck

^t Produzida pela Sigma

^u Produzida pela Merck

^v Produzida pela Polysciences

^w Produzida pela Merck

Na microtomia (Leica RM 2165) foram obtidos cortes de 0,5 micrômetro de espessura com navalha de vidro. Os cortes foram colocados em lâmina histológica e corados com azul de toluidina^x a 1%, delimitando-se com o microscópio óptico (Leica DMLS) as áreas de interesse, para o posterior estudo de microscopia eletrônica. Os blocos contendo os segmentos foram aparados (trimagem), obedecendo-se à posição do material selecionado, e submetidos à ultramicrotomia com navalha de diamante, para obtenção de cortes finos com 500 a 800 Å de espessura (Leica Ultracut UCT). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e com citrato de chumbo^y, examinados e eletromicrografados no microscópio eletrônico Philips CM100 do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP.

^x produzida pela Carlo Erba

^y produzida pela Merck

3.8. Métodos Estatísticos

No estudo do peso do animal, capacidade vesical e complacência vesical utilizou-se a técnica de análise de variância para um modelo de medidas repetidas em 3 grupos de estudo, complementada com os respectivos testes de comparações múltiplas (ZAR, 1999).

O estudo do peso da bexiga nos diferentes grupos foi realizado por meio da técnica da análise de variância não paramétrico para um modelo de fator complementado com respectivo teste de comparações múltiplas (ZAR, 1999).

Quanto à ocorrência das contrações involuntárias do detrusor e infecção urinária, os resultados foram apresentados pela estatística gráfica envolvendo o gráfico de barras da porcentagem de ocorrência.

Para indicação das significâncias, foram consideradas letras minúsculas na comparação entre momentos, dentro do grupo. Letras maiúsculas para comparação entre grupos fixados o momento de avaliação.

A interpretação das letras deve ser feita de acordo com as instruções; duas médias seguida de uma mesma letra minúscula, não diferem ($p>0,05$) entre si quanto às respostas nos diferentes momentos, fixado o grupo e duas médias, seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula, não diferem ($p>0,05$) quanto às respostas entre grupos fixado o momento.

Todas as discussões estatísticas foram realizadas no nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Peso Corpóreo

4.1.1. Dados individuais do peso corpóreo (Kg) nos diferentes grupos experimentais, estão apresentados no Apêndice (Tab. A).

4.1.2. Análise do peso corpóreo.

A média do peso corporal no momento M1 foi de 2,17 Kg no grupo G1, de 2,52 Kg no G2 e de 2,40 Kg no G3. No momento M2 foi de 3,02 Kg no G1, de 2,96 Kg no G2, e de 3,00 Kg no G3 (Tab. 1). Foi observado um ganho significativo na média do peso corporal, sendo de 0,85 kg no G1, de 0,44 kg no G2 e de 0,60 kg no G3 nos diferentes momentos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tab. 1).

Tabela 1. Média e desvio-padrão do peso do animal (kg) segundo os grupos estudados nos diferentes momentos.

Grupo	M1	M2	Resultado do teste estatístico entre momentos
G1	2,17 ± 0,25 aA	3,02 ± 0,31 bA	p<0,05
G2	2,52 ± 0,51 aA	2,96 ± 0,39 bA	p<0,05
G3	2,40 ± 0,28 aA	3,00 ± 0,12 bA	p<0,05
Resultado do teste estatístico entre grupos	p>0,05	p>0,05	

4.2. Peso da Bexiga

4.2.1. Dados individuais do peso da bexiga (g) nos diferentes grupos experimentais, estão apresentados no Apêndice (Tab.B).

4.2.2. Análise do peso da bexiga.

No momento final (após 30 dias) a média do peso da bexiga nos grupos G2 e G3 foi estatisticamente maior do que a do grupo G1 (Tab. 2) ($p < 0,01$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G2 e G3 (Tab. 2).

Tabela 2. Média e desvio padrão do peso da bexiga (g) segundo os grupos estudados.

G1	G2	G3	Resultado do teste estatístico
$2,46 \pm 0,40$ A	$16,75 \pm 7,15$ B	$19,06 \pm 6,03$ B	$p < 0,01$

4.3. Cistometria

4.3.1. Capacidade vesical máxima (Vol_{max})

4.3.1.a. Dados individuais da capacidade vesical (ml) nos diferentes grupos experimentais, estão apresentados no Apêndice (Tab. C).

4.3.1.b. Análise da capacidade vesical máxima.

No momento M1 não houve diferença significativa entre os grupos na capacidade vesical máxima. No momento M2 os grupos G2 e G3 apresentaram um Vol_{Max} significativamente menor em relação ao grupo controle (Tab. 3). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G2 e G3 (Tab. 3).

Tabela 3. Média e desvio padrão da capacidade vesical máxima (ml) segundo os grupos estudados nos diferentes momentos.

Grupo	M1	M2	Resultado do teste estatístico entre momentos
G1	60,82 ± 15,68 aA	71,00 ± 22,49 aA	p>0,05
G2	32,85 ± 28,77 aA	22,05 ± 22,95 aB	p>0,05
G3	26,77 ± 13,13 aA	16,27 ± 12,87 aB	p>0,05
Resultado do teste estatístico entre grupos	p>0,05	p<0,01	

4.3.2. Pressão detrusora máxima (P_{detr}).

4.3.2.a. Dados individuais da pressão detrusora máxima nos diferentes grupos experimentais, estão apresentados no Apêndice (Tab. D).

4.3.2.b. Análise da pressão detrusora máxima.

No estudo da pressão detrusora máxima não houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos nos diferentes grupos (Tab. 4). Entretanto, observamos diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos G2 e G3 no momento M1 e no momento M2, houve diferença significante entre o grupo G2 com os grupos G1 e G3 (Tab. 4).

Tabela 4. Média e desvio padrão da pressão detrusora máxima segundo os grupos estudados nos diferentes momentos.

	M1	M2
G1	13,4 ± 5,68 aA	14,2 ± 4,14 aA
G2	25,0 ± 4,18 aB	23,0 ± 11,68 aB
G3	22,0 ± 9,72 aB	20,2 ± 9,83 aA

4.3.3. Complacência vesical (Compl.)

4.3.3.a. Dados individuais da complacência vesical nos diferentes grupos experimentais, estão apresentados no Apêndice (Tab. E).

4.3.3.b. Análise da complacência vesical.

No estudo de complacência vesical não houve diferença estatisticamente significativa, seja entre os grupos ou nos diferentes momentos estudados (Tab. 5).

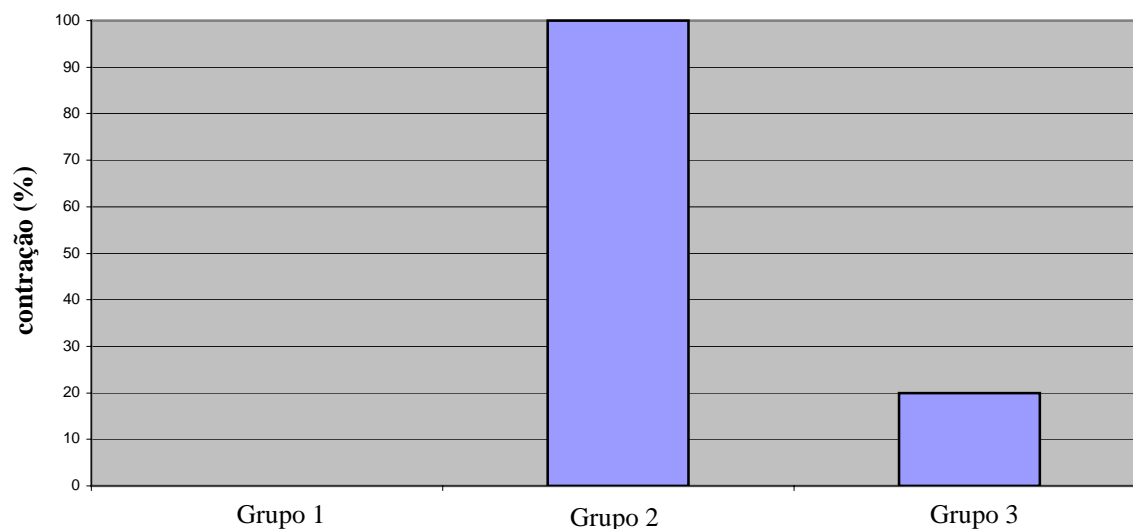
Tabela 5. Média e desvio padrão da complacência vesical segundo os grupos estudados e nos diferentes momentos.

Grupo	M1	M2	Resultado do teste estatístico entre momentos
G1	0,84 ± 0,76 aA	2,02 ± 0,79 aA	p>0,05
G2	0,87 ± 1,61 aA	1,29 ± 1,90 aA	p>0,05
G3	1,20 ± 0,74 aA	1,34 ± 2,79 aA	p>0,05
Resultado do teste estatístico entre grupos	p>0,05	p>0,05	

4.3.4. Análise da contração involuntária do detrusor.

Não ocorreu nenhuma contração involuntária do detrusor no grupo G1. No momento M2 ocorreram contrações involuntárias do detrusor em todos os animais do grupo G2 e em 20% no grupo G3 (Graf. 1).

Gráfico 1. Distribuição da contração involuntária do detrusor segundo os grupos estudados no momento M2



Obs.: o local com ausência de barra representa ausência de contração involuntária do detrusor.

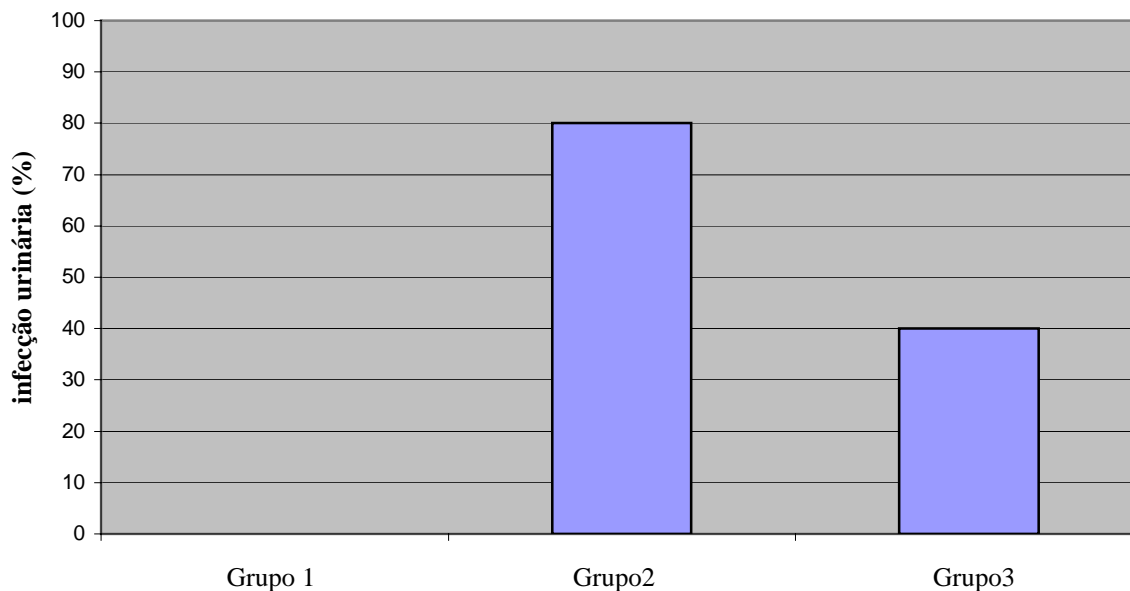
4.4. Cultura de Urina

4.4.1. Dados individuais da cultura de urina nos diferentes grupos e momentos, estão apresentados no Apêndice (Tab. F).

4.4.2. Análise da cultura de urina.

No momento M1 não houve infecção urinária nos grupos estudados. No momento M2, a cultura foi negativa em todos os animais do grupo G1, positiva em 4 casos (*Proteus*, *Bastonetes gram negativo*, *Enterococcus fecalis* e *Escherichia coli*) no grupo G2 e em 2 (*Escherichia coli* e *Enterococcus fecalis*) no grupo G3 (Graf. 2).

Gráfico 2. Distribuição da infecção urinária segundo os grupos estudados no momento M2



Obs.: o local com ausência de barra representa ausência de infecção urinária.

4.5. Creatinina plasmática

4.5.1. Dados individuais da creatinina plasmática (mg/dl) nos diferentes grupos experimentais, estão apresentados no Apêndice (Tab. G).

4.5.2. Análise da creatinina plasmática.

Os valores da creatinina plasmática em todos os animais nos momentos M1 e M2 foram normais (valor normal para coelho: 0,50 – 2,00mg/dl – FUDGE, 2000), sem diferença estatisticamente significativa seja entre grupos ou nos diferentes momentos estudados (Tab. 6).

Tabela 6: Média da creatinina plasmática segundo os grupos estudados nos diferentes momentos.

Grupo	M1	M2	Resultado do teste estatístico entre momentos
G1	0,87 ± 0,12aA	0,94 ± 0,10aA	p>0,05
G2	0,80 ± 0,14aA	0,94 ± 0,10aA	p>0,05
G3	1,01 ± 0,21aA	1,05 ± 0,24aA	p>0,05
Resultado do teste estatístico entre grupos	p>0,05	p>0,05	

4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão

4.6.1. Análise ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo controle (G1).

No estudo com microscopia eletrônica observamos em todos os animais do grupo G1 (controle), distribuição uniforme das células musculares com espaços intercelulares bem definidos e simétricos (Fig. 10), junções intercelulares regulares e intercaladas com áreas de *caveolae* com “microvesículas” homogêneas (Fig. 11), presença de mitocôndrias com densidade normal (Fig. 12), demonstrando características ultra-estruturais normais da célula muscular da bexiga de coelho (Fig. 13).

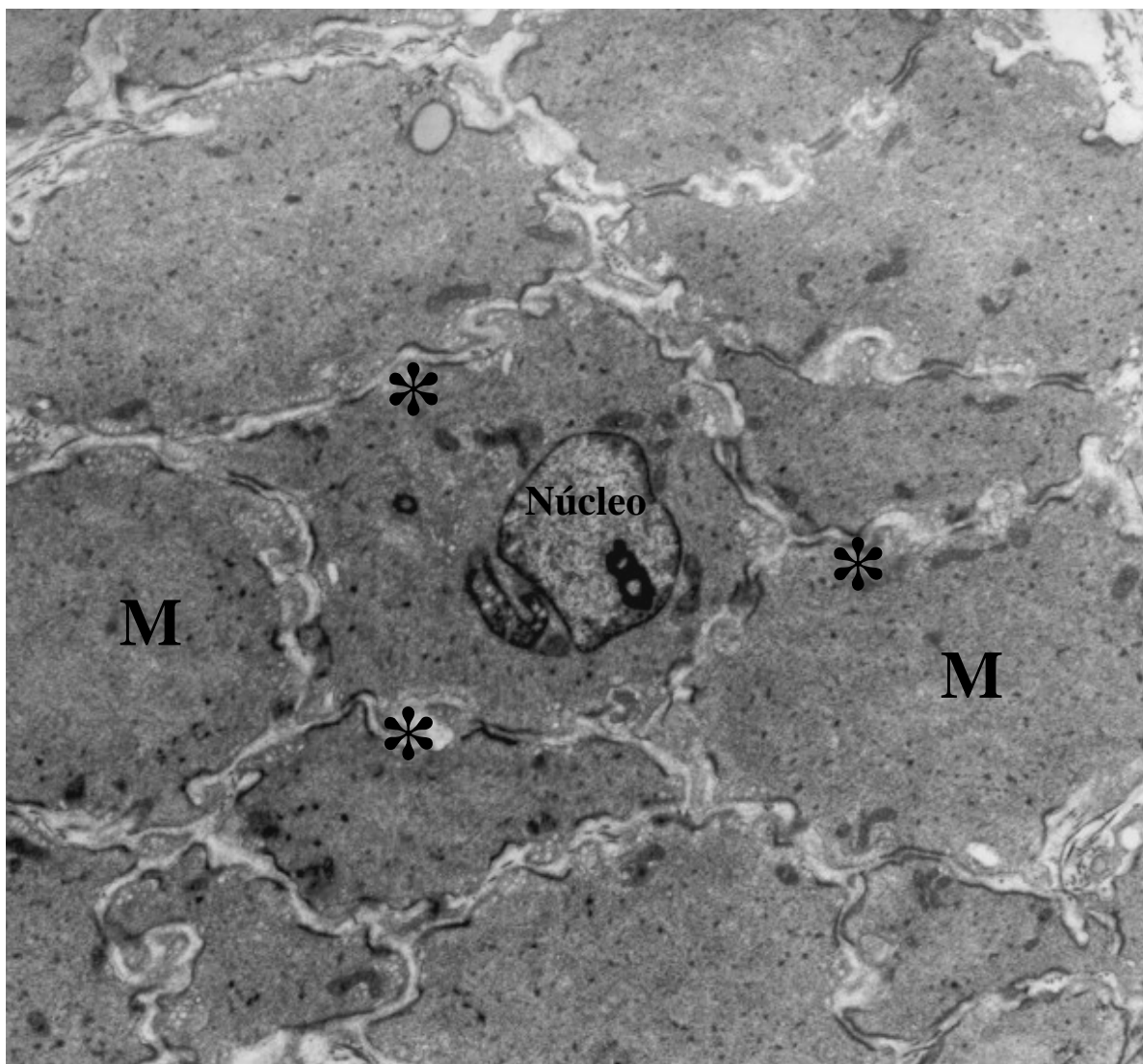


Figura 10: Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G1 (controle). Nota-se distribuição uniforme das células musculares (M) com espaços intercelulares bem definidos e simétricos (*). X 7750

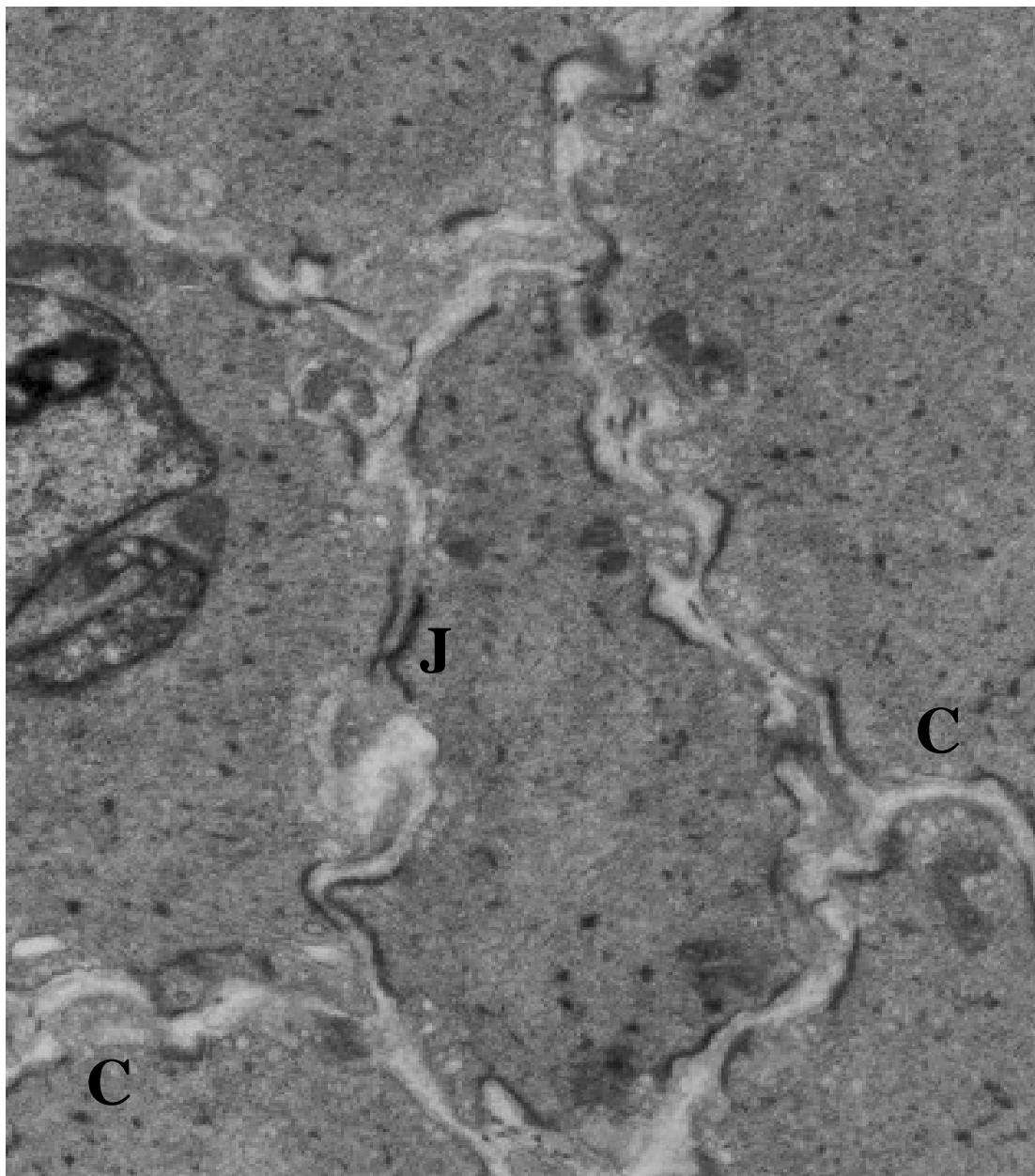


Figura 11: Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G1 (controle). Nota-se junções intercelulares regulares (J) e intercaladas com áreas de *caveolae* com microvesículas homogêneas (C). X 17000

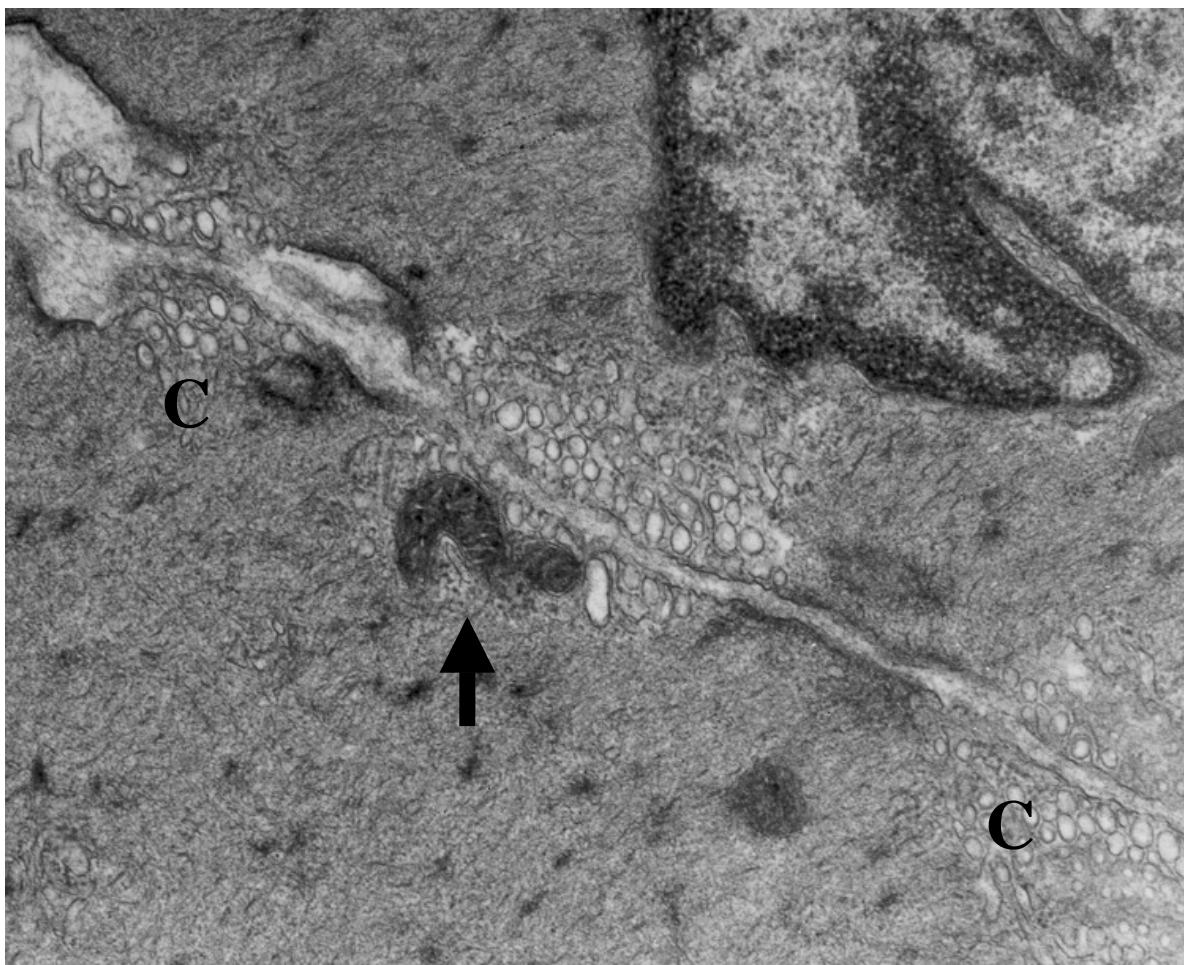


Figura 12: Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga do grupo G1 (controle). Nota-se presença de mitocôndrias com densidade normal (seta) e áreas de *caveolae* com microvesículas homogêneas (C). X 31500

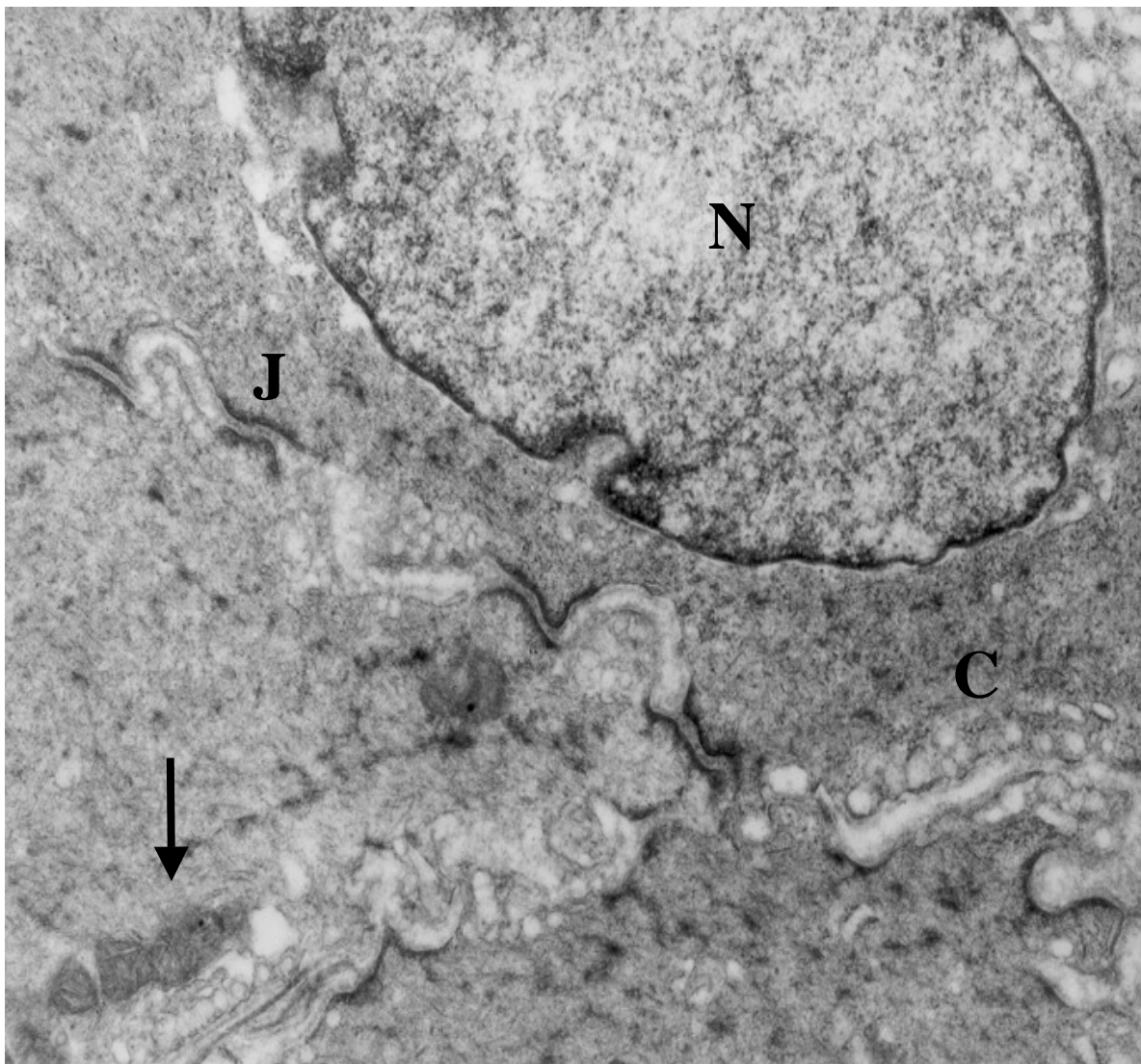


Figura 13: Característica ultra-estrutural normal das células musculares da bexiga. Nota-se núcleo (N), mitocôndria (seta), junções intercelulares (J) e área de *caveolae* (C). X 17.000

4.6.2. Análise ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo com instabilidade do detrusor (G2).

No grupo G2 (instabilidade vesical) verificamos em todos os animais com uma densidade heterogênea das células musculares (Fig. 14), aumento do espaço intercelular e assimetria das junções intercelulares com perda da regularidade (Fig. 15), presença de corpúsculo de degeneração (Fig. 16), clarificação da matriz mitocondrial (Fig. 17), diminuição das áreas de *caveolae* com microvesículas de tamanho heterogêneo (Fig. 18).

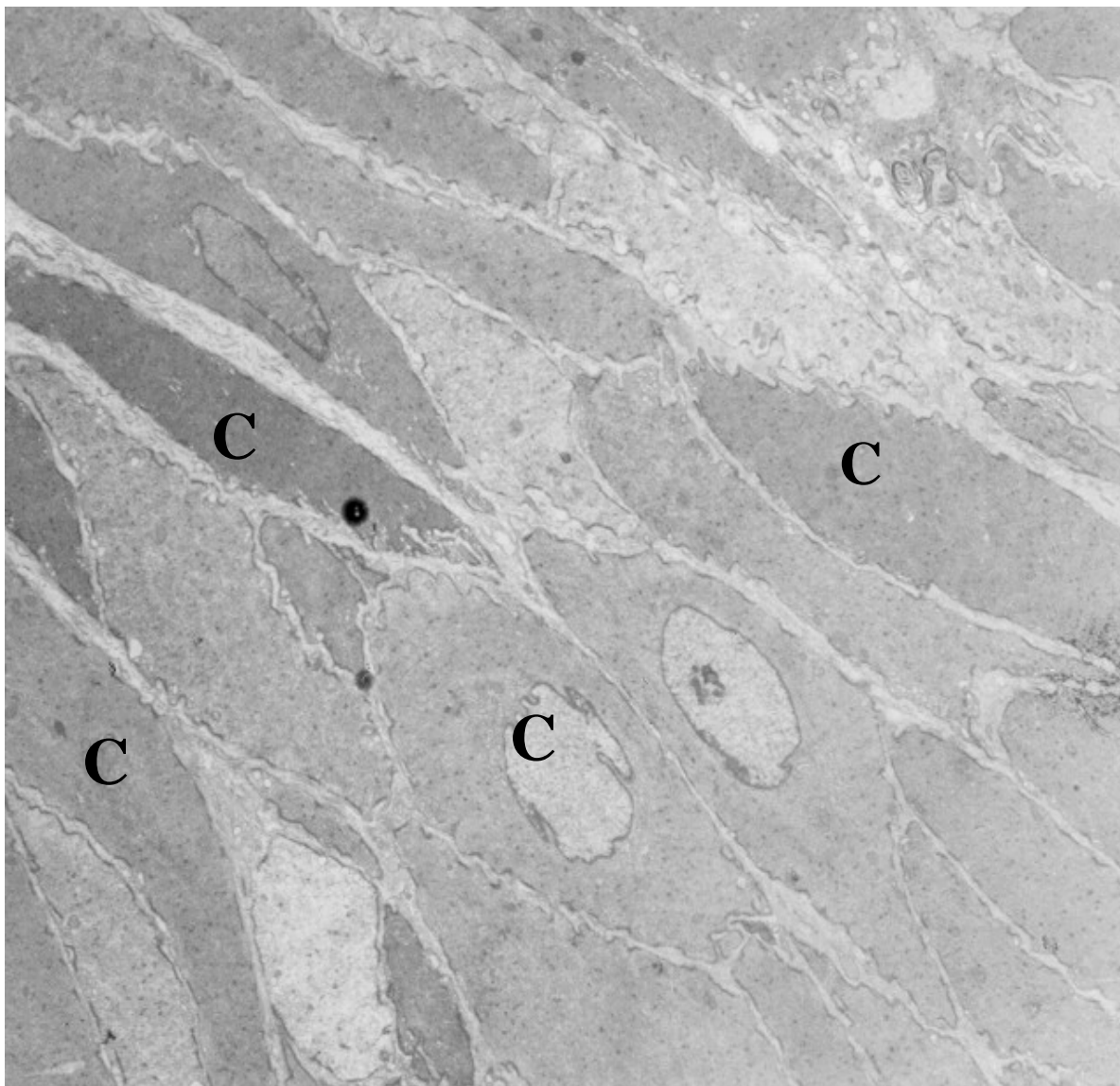


Figura 14: Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G2 (instabilidade do detrusor). Nota-se densidade heterogênea das células musculares (C). X 3250

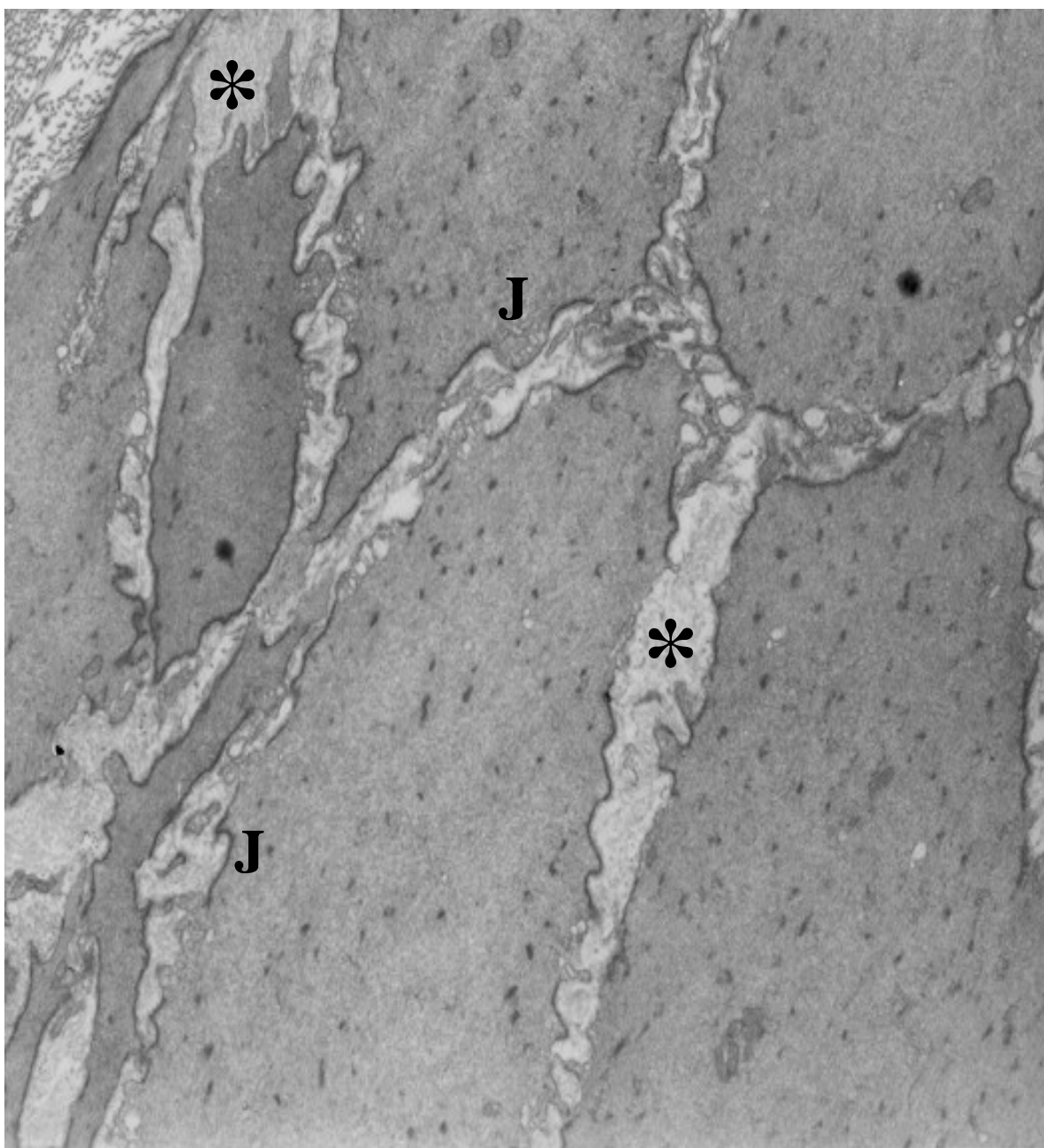


Figura 15: Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G2 (instabilidade do detrusor). Nota-se aumento dos espaços intercelulares (*) e assimetria das junções intercelulares (J). X 5750

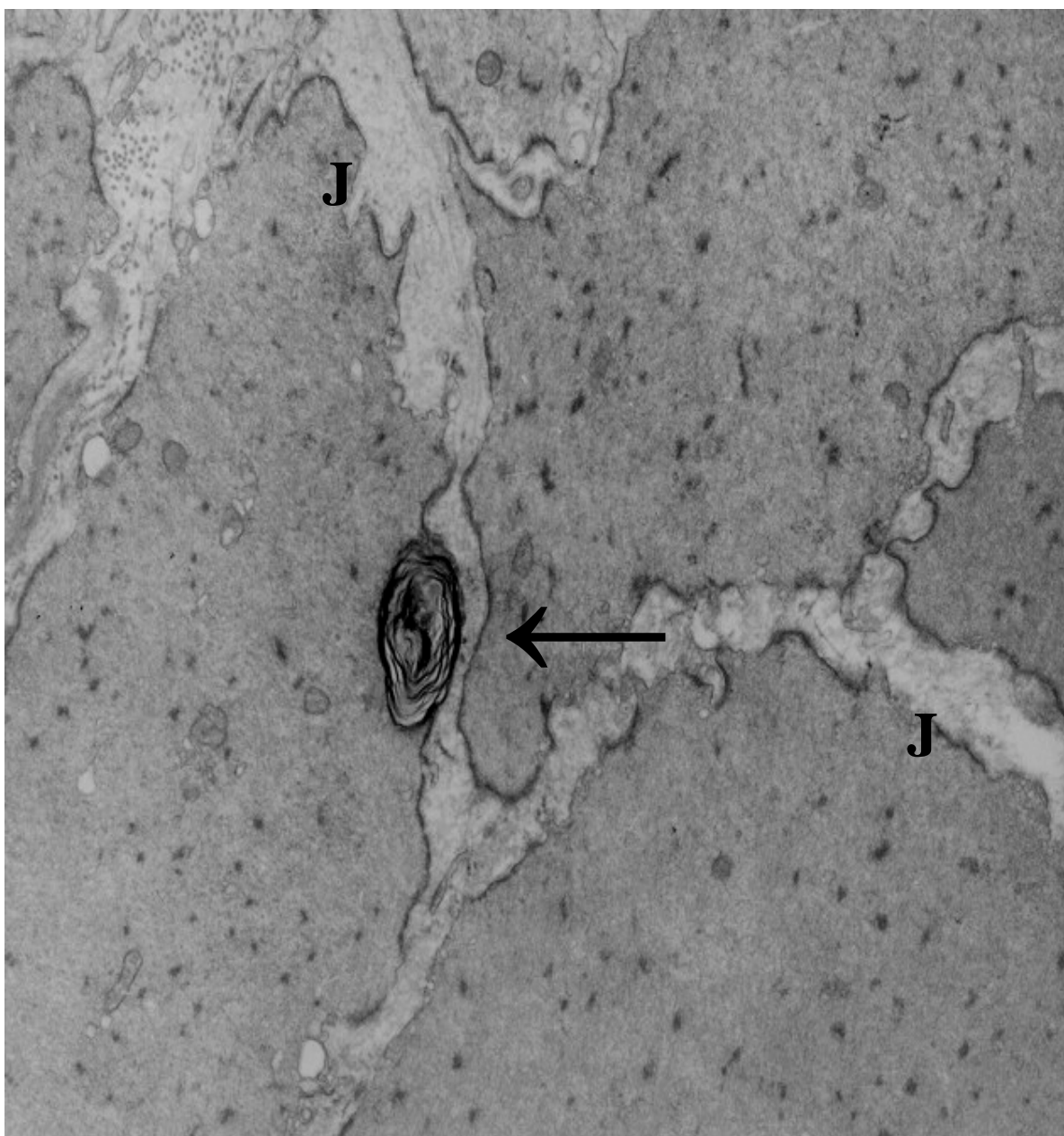


Figura 16: Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G2 (instabilidade do detrusor). Nota-se assimetria das junções intercelulares (J) e área com corpúsculo degenerativo (seta). X 9750

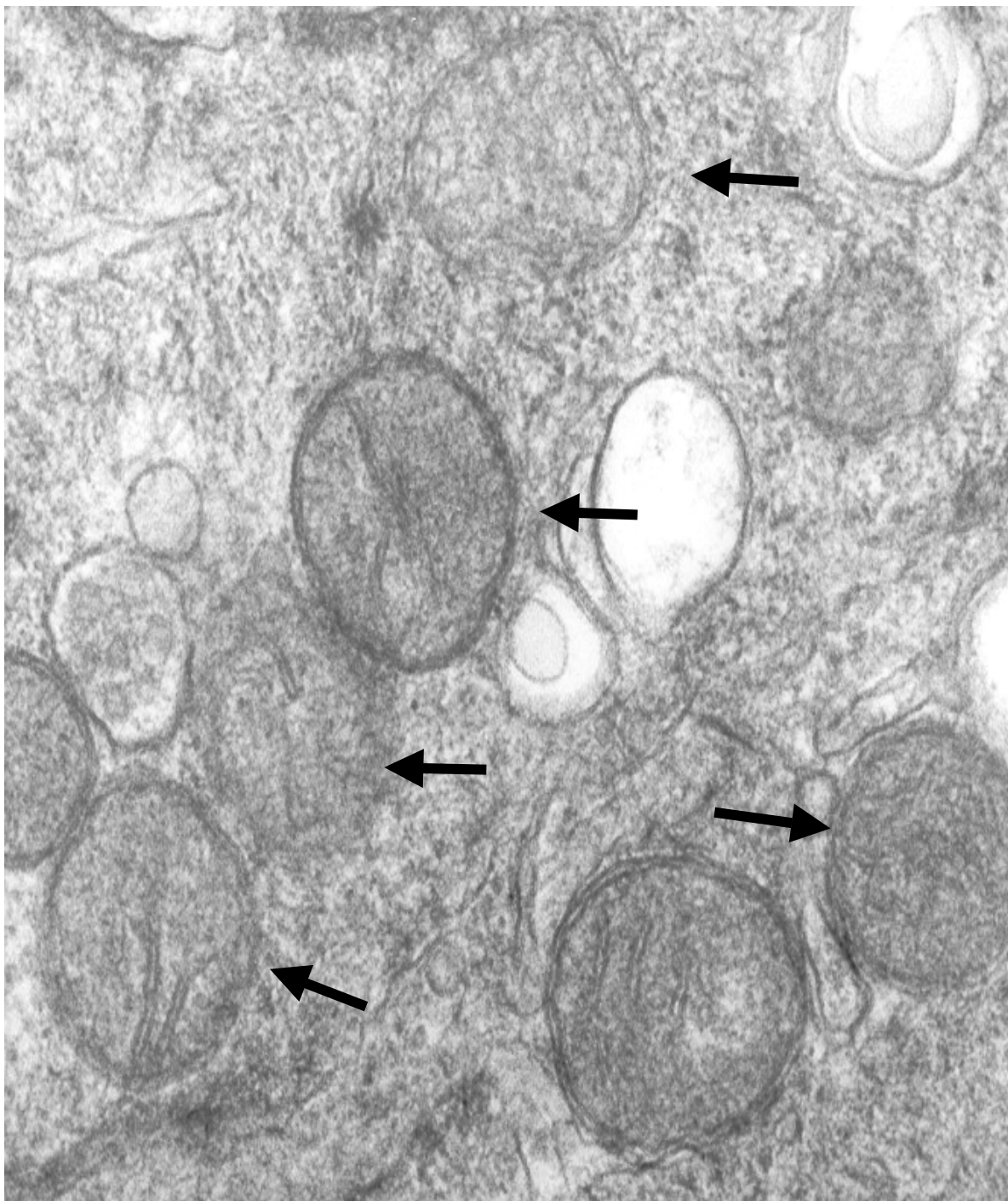


Figura 17: Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G2 (instabilidade do detrusor). Nota-se clarificação da matriz mitocondrial (seta).X 75500

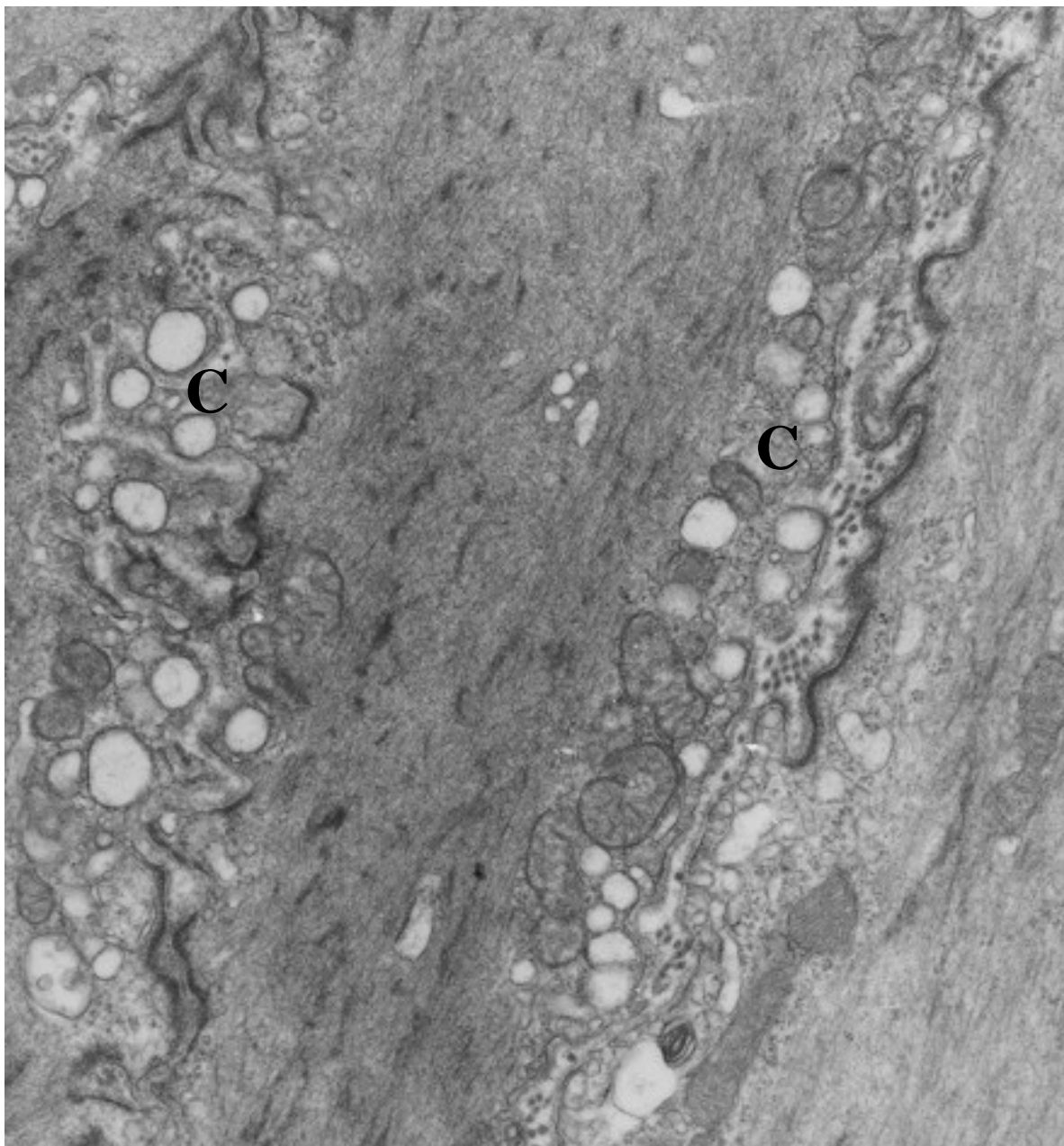


Figura 18: Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo 2 (instabilidade do detrusor). Nota-se áreas de *caveolae* com microvesículas de tamanho heterogêneo(C). X 31500

4.6.3. Análise ultra-estrutural da célula muscular da bexiga do grupo com instabilidade do detrusor e oxibutinina intravesical (G3).

No grupo G3 (Instabilidade do detrusor e oxibutinina intravesical) observamos as semelhanças das características ultra-estruturais do grupo G1, como a distribuição homogênea das células musculares, mas com densidade heterogênea e com os espaços intercelulares regulares (Fig. 19), retorno da simetria das junções intercelulares (Fig. 20), com as áreas de *caveolae* com homogeneidade das microvesículas e retorno da densidade mitocondrial quando comparado ao grupo G2 (Fig. 21).

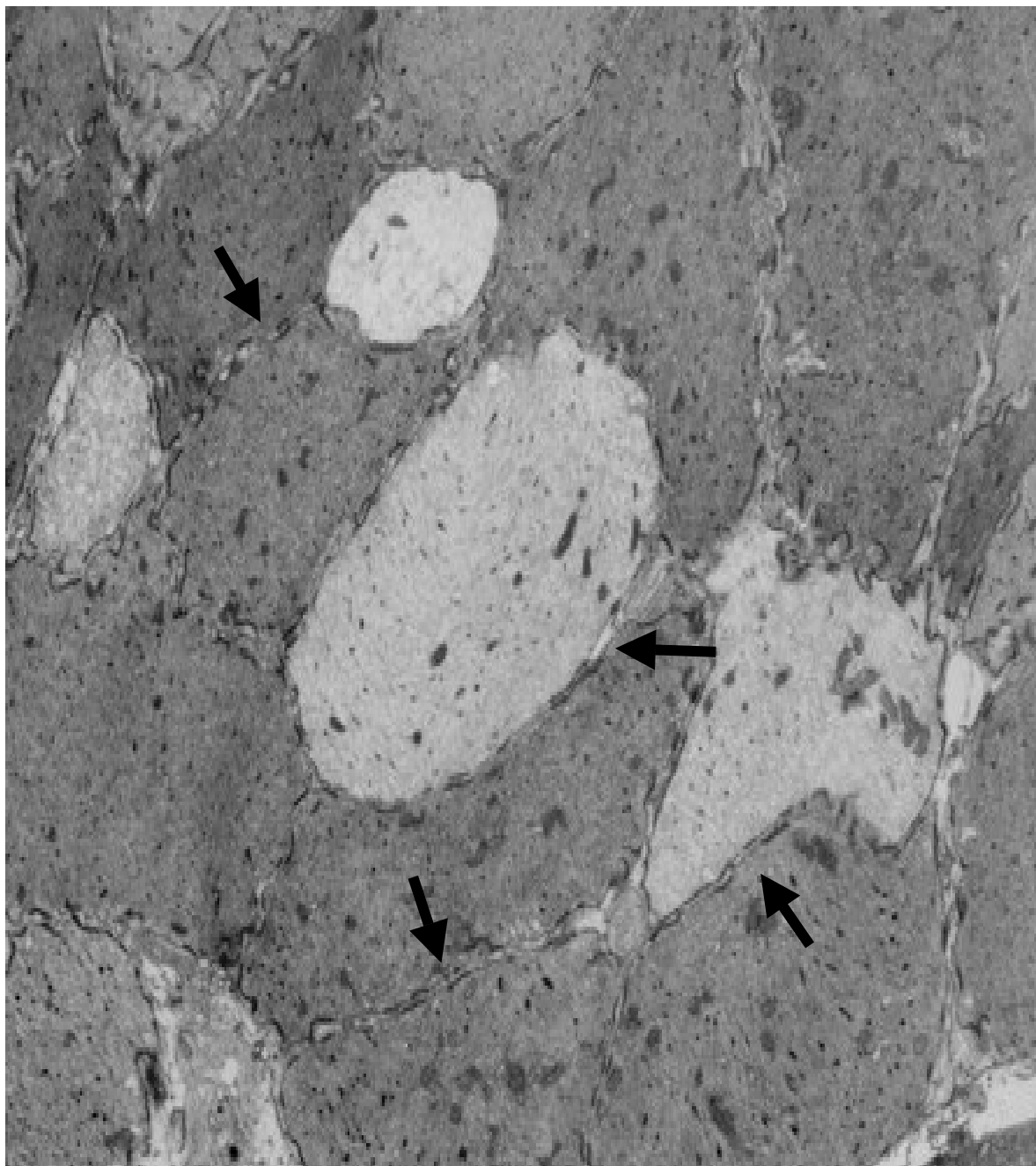


Figura 19: Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G3 (instabilidade do detrusor e oxibutinina intravesical). Nota-se distribuição homogênea dos espaços intercelulares (seta). X 2450

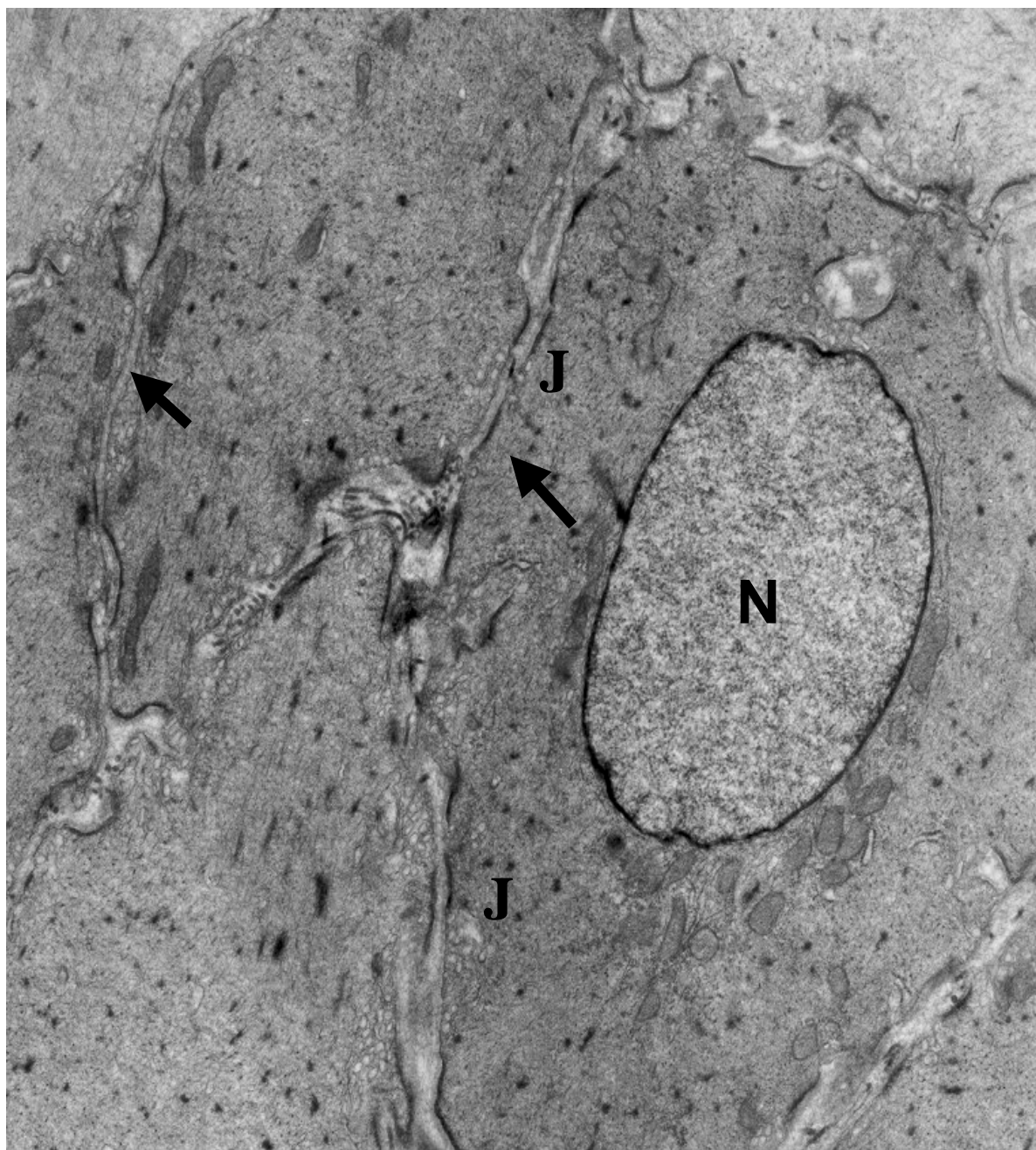


Figura 20: Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga no grupo G3 (instabilidade do detrusor e oxibutinina intravesical). Nota-se núcleo (N) do miócito, espaços intercelulares simétricos e normais (seta), observa-se regularidade das junções intercelulares (J). X 9.750

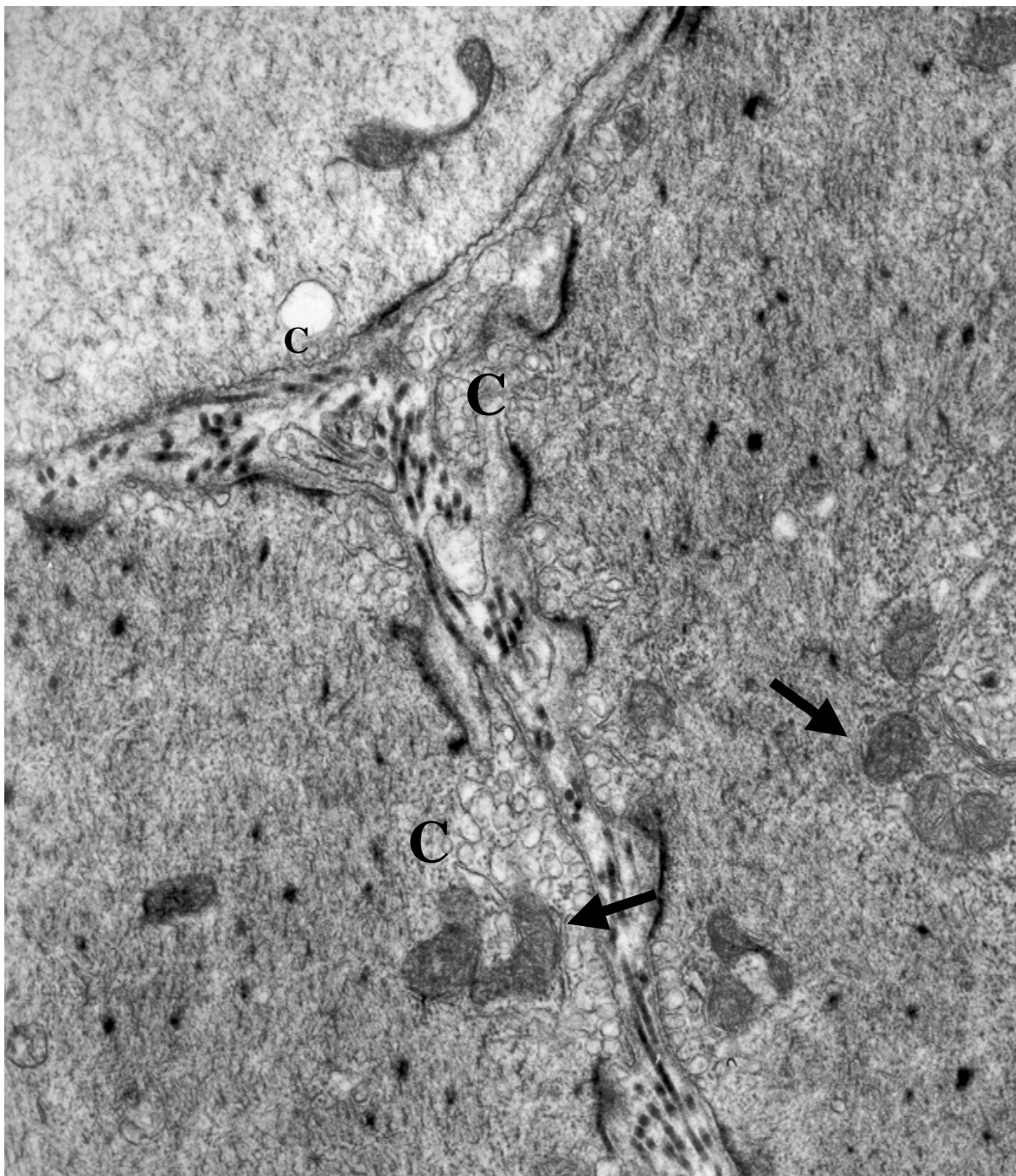


Figura 21: Corte ultra-estrutural da camada muscular da bexiga do grupo G3 (instabilidade do detrusor e oxibutinina intravesical). Nota-se retorno da densidade mitocondrial (seta) e áreas de *caveolae* com microvesículas homogêneas (C). X 13250

5. DISCUSSÃO

A utilização de modelo experimental com animal, na avaliação das alterações ultra-estruturais decorrente da instabilidade vesical e da ação da oxibutinina intravesical, é adequada, permitindo se elucidar as possíveis alterações devido a disfunção vesical (SIBLEY et al., 1997; LLUEL et al., 1998). Com esta finalidade, diferentes autores têm utilizado o coelho como modelo experimental (LEVIN et al., 1994 e 2000; GOSLING et al., 2000).

Em nosso experimento, o ganho significativo de peso corporal observado em todos os grupos deve estar relacionado ao desenvolvimento normal desses animais durante o período de experimento. Não houve diferença estatisticamente significativa, entre os grupos, nos momentos M1 e M2, podendo inferir que o procedimento cirúrgico não influenciou no ganho de peso adequado dos animais estudados.

Em nossa série, no momento M2 (após 30 dias) observou-se o peso da bexiga estatisticamente maior nos grupos G2 e G3 em relação ao grupo G1. O aumento do peso da bexiga é uma alteração freqüente descrita nos diferentes modelos de obstrução parcial da bexiga (NIGRO et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2003). Este fato decorre do aumento de espessura da parede vesical (ZYDERIC et al., 1996; GOSLING et al., 2000; LEVIN et al., 2000), conseqüente a hipertrofia e hiperplasia celular (PAMPINELLA et al., 1997).

No estudo cistométrico, observamos uma capacidade vesical máxima significativamente menor nos grupos G2 e G3 em relação ao grupo G1. Pode este fato estar relacionado à presença de contrações involuntárias do detrusor observada em nosso modelo experimental.

Por outro lado, MATSUMOTO et al., em 2003, relataram após 3 semanas de obstrução parcial da bexiga aumento na capacidade vesical máxima. Entretanto, este autor não levou em consideração a presença ou não de contrações involuntárias do detrusor, podendo justificar os resultados divergentes em relação ao nosso estudo.

A pressão detrusora máxima (P_{det}), no momento M1, nos grupos G2 e G3 foi significativamente maior em relação ao grupo G1. Demonstrando que a P_{det} pode ser um parâmetro adequado para indicação de obstrução parcial da bexiga em coelhos, assim como ocorre em humanos (BUYSE et al., 1998; NIGRO et al., 1999). No momento M2, observamos um aumento significativo da P_{det} do grupo G2 em relação aos grupos G1 e G3, mostrando que no grupo G3 a oxibutinina intravesical diminuiu a amplitude da contração do detrusor.

Em relação à complacência vesical apesar da menor capacidade vesical máxima nos grupos G2 e G3 não observamos diferenças estatisticamente significativa entre os grupos e nos diferentes momentos. No momento final (M2), no grupo G3 (instabilidade do detrusor e oxibutinina intravesical)

observou-se em 80% dos animais houve o desaparecimento das contrações involuntárias do detrusor mostrando a efetividade da oxibutinina intravesical no tratamento da instabilidade vesical.

Em relação à infecção urinária, observou-se incidência de 80% no grupo G2 e 40% no grupo G3. Esta menor incidência de infecção urinária no grupo G3 pode ter sido em consequência do desaparecimento das contrações involuntárias do detrusor observado em 80% dos casos do grupo G3.

Observamos valores normais de creatinina plasmática e ausência de diferença estatisticamente significativa seja entre os grupos ou nos diferentes momentos. Demonstrando que não houve comprometimento da função renal seja pelo procedimento cirúrgico ou pela alteração morfofuncional da parede vesical.

Em humanos, a coleta de material para análise ultra-estrutural da musculatura do detrusor necessita de uma biópsia. As técnicas utilizadas, via transabdominal ou transuretral, e o local da biópsia não influenciam esta avaliação (HOLM et al., 1996). Entretanto, MATSUMOTO et al. (2003), observaram aumento da espessura na região ventral da serosa vesical em coelhos com obstrução infravesical. Em nosso experimento, os fragmentos de musculatura foram coletados da posição ventral do corpo vesical.

A patogênese da instabilidade vesical pode estar relacionada a vários fatores: alteração do nervo que contém o polipeptídeo intestinal vasoativo e sua concentração no detrusor (KINDER & MUNDY, 1987); aumento dos nervos sensoriais no suburotélíio (MOORE et al., 1992); mudanças na inervação intrínseca (MOORE et al., 1992; ELBADAWI et al., 1993 a,b; SMET et al., 1997); aumento da densidade dos nervos subepiteliais que contém CGRP (Peptídeo relacionado com gene calcitonina) e substância P (SMET et al., 1997) e aumento da conexão elétrica intercelular (KARL, 2003).

Observamos no grupo com instabilidade vesical (G2) corpúsculos degenerativo sugerindo desnervação por possível lesão de célula nervosa. Alguns autores acreditam que esta desnervação pode acarretar uma hipersensibilidade à acetilcolina explicando desta maneira a gênese da instabilidade do detrusor (TURNER & BRADING, 1997; CHARLTON et al., 1999; MILLS et al., 2000). A avaliação ultra-estrutural é importante para determinar a integridade dos axônios e o conteúdo das vesículas sinápticas (ELBADAWI et al., 1993e). LANDAM et al. (2004), entretanto, avaliando as fibras nervosas na musculatura detrusora em pacientes obstruídos e não obstruídos, não observaram diferença significativa.

A liberação basal de acetilcolina de fonte neural e não neural (urotélíio) tem sido demonstrada na musculatura detrusora humana (YOSHIDA et al.,

2002). O estiramento da musculatura vesical e o envelhecimento da bexiga aumentam a liberação da acetilcolina, contribuindo para a hiperatividade do detrusor (ANDERSSON & YOSHIDA, 2003).

Em nosso estudo, a instabilidade vesical foi obtida com um modelo de obstrutivo parcial da bexiga. No grupo G2 (instabilidade do detrusor), observamos alterações ultra-estruturais como junções intercelulares irregulares, corpúsculos degenerativos e clarificação das mitocôndrias, sugerindo lesões isquêmicas e nervosas, ausentes no grupo controle e diminuídas nos animais tratados com oxibutinina intravesical. A obstrução infravesical pode levar as alterações do detrusor freqüentemente associadas à desnervação progressiva e à hipertrofia da parede vesical, pode ainda ocorrer alterações a nível celular e molecular das proteínas cito-esquelética e contrátil, da função mitocondrial e das atividades enzimáticas (LEVIN et al., 1990 e 1997, MALMQVIST et al., 1991; SJUVE et al., 1996).

A obstrução parcial da bexiga diminui a perfusão sangüínea vesical (BRADING, 1997). Experimentalmente, a isquemia vesical produz mudanças significativas na função vesical (GILL et al., 1988; TONG LONG et al., 1988 LEVIN et al., 1997). AZADZOI et al. (1999), provocando isquemia moderada da bexiga com redução de 40 a 60% do fluxo sangüíneo vesical, observaram hiperatividade detrusora, e na isquemia severa verificaram intensa e difusa

alteração estrutural com redução da amplitude e contratilidade detrusora. A isquemia induz mudanças celular e molecular na bexiga e tem se mostrado semelhante aos casos induzidos pela obstrução parcial da bexiga (LEVIN et al., 1997). A alteração da função detrusora de causa isquêmica pode ocasionar lesão mitocondrial (LU et al., 2000). Em nosso trabalho observamos, no grupo G2, clarificação das mitocôndrias, possivelmente conseqüente à lesão isquêmica originada pela instabilidade vesical não tratada.

A reperfusão após hiperdistensão leva a peroxidação lipídica e à formação de malondealdeído, com liberação de radicais alterando a contratilidade e reatividade detrusora (ZHAO et al., 1997; LIN et al., 1995). A produção de radicais livres na instabilidade vesical, pelo ciclo isquemia/reperfusão deve ser maior por haver inúmeras contrações involuntárias do detrusor.

A lesão mitocondrial diminui a produção de energia e a contratilidade detrusora em coelhos (FLAMENG et al., 1980; SCHIRMER et al., 1997). A ruptura da membrana mitocondrial interna e externa determina a irreversibilidade da lesão isquêmica (FLAMENG et al., 1980). A intensidade da lesão mitocondrial poderia estar relacionada a severidade da obstrução miccional (SCHÄFER, 1995). LU et al. (2000), posteriormente, confirmaram

estes achados, demonstrando uma forte correlação entre a lesão mitocondrial e gravidade da obstrução vesical.

Nós observamos que no grupo G2, ocorreram alterações na densidade mitocondrial, com clarificação por edema da matriz, entretanto, estas alterações não foram observadas no grupo controle e no tratado com oxibutinina. Houve persistência de contrações involuntárias do detrusor em um caso no grupo 3, questiona-se que apesar de ter sido apenas uma observação, a correlação das contrações involuntárias com as alterações ultra-estrutural, uma vez que notamos características ultra-estruturais normais neste animal.

As junções de protusão, denominadas junções GAP (ELBADAWI et al,1993a) existentes na membrana celular, são locais de propagação elétrica com baixa resistência, permitindo passagem de íons do sarcoplasma de uma célula para outra (HENDERSON, 1975; GABELLA, 1981 e 1990). No grupo G2 observamos assimetria e afastamento das membranas celulares, prejudicando o processo de comunicação intercelular que é importante no funcionamento vesical.

Diferentes autores demonstraram haver um padrão ultra-estrutural na musculatura vesical nos casos de instabilidade detrusora caracterizado por aumento da distância intercelular, perda ou redução da junção intermediária e presença das junções de protusão (ELBADAWI et al., 1993c; TSE et al., 2000;

KORTMANN et al, 2000). Por outro lado, foi observado em pacientes com obstrução infravesical, não ter ocorrido alterações específicas na microscopia eletrônica ou adicionais em relação à urodinâmica (HOLM et al., 2003).

O metabólito da oxibutinina, responsável pelo efeito colateral é a N-desetiloxibutinina. A via intravesical evita a passagem do sistema digestivo e hepático, com conseqüente menor produção deste metabólito (BUYSE et al., 1998; DAVILA et al., 2001). A concentração desse metabólito, na via oral, corresponde de 4 a 10 vezes a da oxibutinina (DOUCHAMPS et al., 1988), enquanto que nas vias intravesical e transdérmica, apenas de 1 a 1,5 vezes (BUYSE et al., 1998; DAVILA et al., 2001). Isto justifica a menor incidência de efeitos colaterais na via intravesical.

Vários autores (MASSAD et al., 1992; MADERSBACHER & KNOLL, 1995; BUYSE et al., 1998) observaram grande variação individual no nível de oxibutinina e N-desetiloxibutinina na administração oral e também na intravesical.

BLENDER et al. (1989) observaram 92% de sucesso no tratamento da incontinência em 12 pacientes tratados com oxibutinina intravesical, como aumento da capacidade vesical, diminuição da pressão vesical e nenhum efeito colateral. WEESE et al. (1993) em 55% de 42 pacientes obtiveram melhora da continência e urgência. BUYSE et al. (1998) em estudo de 2 anos com

oxibutinina intravesical, verificaram que 87% de 15 crianças, preferiram o tratamento intravesical ao oral.

DAVILA et al. (2001) compararam o uso, durante 6 semanas, de oxibutinina transdérmica (1,3 mg/dia) com o uso oral (2,5 mg/dia) e observaram equivalência terapêutica no que se refere à incontinência urinária, mas com incidência de efeito colateral (boca seca) muito mais freqüente na administração oral (94% X 38%). Esses autores concluíram que a oxibutinina transdérmica é uma inovação terapêutica importante no tratamento da urge-incontinência urinária.

LEVIN et al. (2003), em seu trabalho com 30 coelhas, avaliaram a utilização da oxibutinina transvaginal com a oral e concluíram que a via de administração vaginal é eficiente, pois aumenta a capacidade vesical, melhora a complacência e diminui a pressão intravesical e que a administração oral tem o efeito semelhante à dose média do transvaginal com menor efeito. Pode-se optar por utilização transvaginal com significativas vantagens à oral considerando-se o nível sérico, duração da ação e diminuição dos efeitos colaterais (SCHRODER et al., 2001; LEVIN et al., 2003).

Em nossa série notamos que houve desaparecimento das contrações em 80% dos casos, demonstrando que a oxibutinina foi efetiva no tratamento das contrações involuntárias do detrusor.

A urodinâmica é aceita atualmente como método de escolha para avaliação da disfunção do trato urinário inferior, e o critério diagnóstico de instabilidade vesical foi estabelecido por ABRAMS et al. (1988). Por outro lado, a interpretação do estudo urodinâmico pode ser difícil, mesmo para os especialistas (KORTMANN et al., 2000) e existem várias desvantagens como a de não ser realizada de uma forma fisiológica, ser dependente do examinador, da colaboração do paciente e do equipamento. Há ainda influência do fluxo de infusão, da temperatura e da composição do líquido infundido, além de riscos iatrogênicos. Em vista desses fatores, o diagnóstico pode ser duvidoso (TSE et al., 2000).

ELBADAWI et al. (1993c) introduziram um diagnóstico ultra-estrutural na instabilidade vesical em que ocorreram diminuições das junções intermediárias e junções de protusão.

ELBADAWI e YALLA, comentando o trabalho de TSE et al. de 2000, consideram que a biópsia vesical de rotina para avaliação da disfunção miccional, não deve ser realizada, pois é mais invasiva do que o estudo urodinâmico. Atualmente, com o aumento do interesse e da experiência dos patologistas e a utilização desse método na prática clínica, a biópsia vesical vem sendo indicada. Estudos e acompanhamento clínico (evolução diagnóstica)

desses pacientes são necessários, mas há uma certa superioridade na avaliação ultra-estrutural no acompanhamento de 5 anos.

Os achados ultra-estruturais encontrados no grupo controle e as alterações das células juncionais do grupo com obstrução parcial de bexiga, estão de acordo com a literatura (ELBADAWI et al., 1993c). Entretanto, as alterações ultra-estruturais encontradas no grupo G2 são provavelmente pela diminuição da irrigação da parede vesical, secundárias às contrações involuntárias do detrusor, uma vez que não foram verificadas alterações no grupo tratado com oxibutinina intravesical.

Apesar do grupo G3 ter sido tratado com oxibutinina intravesical, observamos a persistência de instabilidade vesical em um animal, porém a avaliação ultra-estrutural de todos foi semelhante à do grupo controle. Portanto, a sua utilização intravesical melhora o padrão ultra-estrutural. Há, entretanto, necessidade de mais estudos para avaliar quais os principais fatores relacionados com a instabilidade vesical e saber por que um animal, apesar da melhora ultra-estrutural, continua com contrações involuntárias do detrusor.

6. CONCLUSÃO

Nos animais tratados com oxibutinina intravesical (grupo G3) observou-se: características ultra-estruturais semelhantes ao grupo controle (G1), demonstrando a ação protetora e a efetividade da oxibutinina intravesical no tratamento das contrações involuntárias do detrusor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrams P, Blaivas JG, Stanton SL, Andersen JT. The standardisation of terminology of lower urinary tract function. The International Continence Society Committee on Standardisation of Terminology. Scand J Urol Nephrol 1988;114: 5-19.

Abrams P, Wein AJ. Overactive bladder and its treatments. Urology 2000; 55: 1-2.

Amaro JL, Curi PR, Viciany H, Trindade JCS. Ampliação vesical utilizando dura-máter e pericárdio bovino. Estudo comparativo em coelhos. J Bras Urol 1997; 23 : 88-92.

Amaro JL, Yamamoto HA, Gregório EA, Fugita OEH, Kawano PR, Goldberg J. Ultrastructural alterations observed in rabbits with partial bladder outlet obstruction: the role of oxybutinin. J Urol 2004; 171: 141, abstract 529.

Andersson KE, Yoshida M. Antimuscarinics and the overactive detrusor – which is the main mechanism of action? Eur Urol 2003; 43: 1-5.

Artibani W. Diagnosis and significance of idiopathic overactive bladder. Urology 1997; 50: 25-32.

Azadzoï KM, Tarcan T, Kozlowski R, Krane RJ, Siroky MB. Overactivity and structural changes in the chronically ischemic bladder. *J Urol* 1999; 162: 1768-78.

Balasteghin KT, Nardo AM, Amaro JL, PAdovani CR. Experimental model of bladder instability in rabbits. *Int Br J Urol* 2003; 29: 62-67.

Blender CB, Radebaugh LC, Mohler JL. Topical oxybutynin chloride for relaxation of dysfunctional bladders. *J Urol* 1989; 141: 1350-2.

Bonney WW, Robinson RA, Thobald RJ Jr. Topical effect of intravesical oxybutynin. *J Urol* 1993; 150: 1522-5.

Boone T, Chapple CR, Payne CK. The diagnosis and treatment of urge incontinence. In: *Proceedings of the 94th Annual meeting; 1999; Texas.*

Brading AF. A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology* 1997; 50: 56-67.

Brent L, Stephens FD. The response of smooth muscle cells in the rabbit urinary bladder to outflow obstruction. *Invest Urol* 1975; 12: 494-502.

Broderick GA, Longhurst PA, Juniewicz PE, Wein AJ, Levin RM. A novel canine model of partial outlet obstruction secondary to prostatic hypertrophy. *World J Urol* 1994; 12: 245-8.

Buyse G, Verpoorten C, Vereecken R, Casaer P. Intravesical application of a stable oxybutynin solution improves therapeutic compliance and acceptance in children with neurogenic bladder dysfunction. *J Urol* 1998;160 (3-II): 1084-1087.

Canning DA, Seibold J, Saito M, Zderic SA, Snyder HM, Duckett JW, Levin RM. Use of injectable fat to obstruct the urethra in rabbits. *Neurourol. Urodyn* 1995; 14: 259-67.

Cardozo LD, Cooper D, Versi E. Oxybutynin chloride in the management of idiopathic detrusor instability. *Neur Urodynam* 1987; 6: 256, Abstract 88.

Charlton RG, Morley AR, Chambers P, Gillespie JJ. Focal changes in nerve, muscle and connective tissue in normal and unstable human bladder. *Br J Urol Int* 1999; 84: 953-960.

Coolsaet BL, Van Duyl WA, Van Os-Bossagh P, De Bakker HV. New concepts in relation to urge and detrusor activity. *Neurourol Urodyn* 1993; 12: 463-471.

Couillard DR, Webster GD. Detrusor instability. *Urol Clin North Am* 1995; 22: 593-612.

D'ancona CAL. Diagnóstico da incontinência urinária na mulher. In: D'ancona CAL, Netto Junior NR, editors. *Aplicações clínicas da urodinâmica*. São Paulo: Atheneu 2001. p. 139-143.

Das AK, Horan P, Leggett RE, Levin RM. Use of abdominal fascia to create partial outlet obstruction in rabbits. *Neurourol Urodyn* 1998; 17: 231-9.

Davila GW, Daugherty CA, Sanders SW: Transdermal oxybutynin study group. A short-term, multicenter, randomized double-blind dose titration study of the efficacy and anticholinergic side effects of transdermal compared to immediate release oral oxybutynin treatment of patients with urge urinary incontinence. *J Urol* 2001; 166: 140-5.

Diokno AC, Lapidus J. Oxybutynin: a new drug with analgesic and anticholinergic properties. *J Urol* 1972; 108: 307-9.

Douchamps J, Derenne F, Stockis A, Gangji D, Juvent M, Herchuelz A. The pharmacokinetics of oxybutynin in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1988; 35: 515-20.

Drake MJ, Mills IW, Gillespie JJ. Model of peripheral autonomous modules and a myovesical plexus in normal and overactive bladder function. *Lancet* 2001; 358: 401-3.

Elbadawi A. Ultrastructure of vesicourethral innervation. I. Neuro-effector and cell junctions in the male internal sphincter. *J Urol* 1993a; 128: 180-8.

Elbadawi A, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. I. Methods of a prospective ultrastructural/urodynamic study and overview of the findings. *J Urol* 1993b; 150: 1650-56.

Elbadawi A, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. II Aging detrusor: normal versus impaired contractility. *J Urol* 1993c; 150: 1657-67.

Elbadawi A, Yalla SV and Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. III. Detrusor overactivity. *J Urol* 1993d; 150: 1668-80.

Elbadawi A. Functional pathology of urinary bladder muscularis the new frontier in diagnostic uropathology. *Semin Diagn Pathol* 1993e; 10: 314-54.

Flameng W, Borges M, Daenen W, Stalpaert G. Ultrastructural and cytochemical correlates of myocardial protection by cardiac hypothermia in man. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980; 79: 413-24.

Fredericks CM, Anderson GF, Kreulen DL. A study of the anticholinergic and antispasmodic activity of oxybutynin (Ditropan) on rabbit detrusor. *Invest Urol* 1975; 12: 317-9.

Fudge AM. *Laboratory Medicine*, ed WB Saunders, 2000.

Gabella G. Structure of smooth muscles. In: E. Bülbbring E, Brading AF, Jones AW, Tomita T, editors. *Smooth muscle: An assessment of current knowledge*. Austin: University of Texas Press; 1981. cap.1, p. 1-46.

Gabella G. General aspects of the fine structure of smooth muscles. In: Motta PM, editor. *Ultrastructure of smooth muscle*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1990. cap.1, p. 1-22.

Ghoniem GM, Regnier CH, Biancani P, Johnson L, Susset JG. Effect of vesical outlet obstruction on detrusor contractility and passive properties in rabbits. *J Urol* 1986; 135: 1284-9.

Gill, HS, Monson FC, Wein AJ, Ruggieri MR, Levin RM. The effects of short-term in-vivo ischemia on the contractile function of the urinary bladder. *J Urol* 1988; 139: 1350-4.

Gosling JA, Kung LS, Dixon JS, et al. Correlation between the structure and function of the urinary bladder following partial outlet obstruction. *J Urol* 2000; 163: 1349–1356

Gray M. Progressive change in detrusor function with bladder outlet obstruction. *J Urol* 1997; 158: 1-3.

Greenfield SP, Fera M. The use of intravesical oxybutynin chloride en children with neurogenic bladder. *J Urol* 1991; 146: 532-4.

Hampel C, Wienhold D, Benken N, Eggersmann C, Truroff JW. Definition of overactive bladder and epidemiology of urinary incontinence. *Urology* 1997; 50: 4-14.

Henderson RM. Cell to cell contacts. In: Daniel EE, Paton DM, editors. *Methods in pharmacology: smooth muscle*. New York: Plenum Press; 1975. v. 3, cap. 2, p. 47-77.

Hohlbrugger G. Leaky urothelium and/or vesical ischemia enable urinary potassium to cause idiopathic urgency/frequency syndrome and urge incontinence. *Int Urogynecol* 1996; 7: 242-55.

Holm NR, Horn T, Hald T. Bladder wall in ageing and obstruction. *Scand J Urol Nephrol* 1995; 29: 45-9.

Holm NR, Horn T, Elbadawi A, Skjoldby B, Nordling J. A new technique for detrusor biopsy and its applicability in the ultrastructural study and diagnosis of voiding dysfunction. *Br J. Urol* 1996; 77: 785-91.

Holm NR, Horn T, Smedts F, Nordling J, Rossette J. The detrusor muscle cell in bladder outlet obstruction – ultrastructural. *Scand J Urol Nephrol* 2003; 37: 309-15.

Homma Y, Imajo C, Takahashi S, Kawabe K, Aso Y. Urinary symptoms and urodynamics in a normal elderly population. *Scand J Urol Nephrol* 1994; 157: 27-30.

International Continence Society Committee on Standardisation of Terminology. The standardisation of terminology of lower urinary tract function. *Neurourol Urodyn* 1988; 7: 403.

Jollys JV, Jollys JC, Wilson J. Does sexual equality extend to urinary symptoms?. *Neurourol Urodyn* 1993; 12: 391-392.

Kakizaki H, Matsuura S, Mitsui T, Ameda K, Tanaka H, Koyanagi T. Questionnaire analysis on sex difference in lower urinary tract symptoms. *Urology* 2002; 59: 58-62.

Karl, EA. Storage and voiding symptoms: pathophysiologic aspects. *Urology* 2003; 62: 3-10.

Kato K, Wein AJ, Kitada S, Haugaard N, Levin RM. The functional effect of mild outlet obstruction on the rabbit urinary bladder. *J Urol* 1988; 140: 880-4.

Kato K, Monson FC, Longhurst PA, Wein AJ, Hauggard N, Levin RM. The functional effects of long-term outlet obstruction on the rabbit urinary bladder. *J Urol* 1990; 143: 600-6.

Kinder RB, Mundy AR. Pathophysiology of idiopathic detrusor instability and detrusor hyper-reflexia. An in vitro study of human detrusor muscle. *Br J Urol* 1987; 60: 509-515.

Kortmann BB, Sonke GS, Wijkstra H, Nordling J, Kallestrup E, Holm NR, et al. Intra and inter investigator variation in the analysis of pressure-flow studies in men with lower urinary tract symptoms. *Neurourol Urodyn* 2000; 19: 221-32.

Kuo HC. Recovery of bladder function after relief of mild outlet obstruction of different durations in rabbits. *J Formos Med Assoc* 1996; 95: 469-73.

Kwak TI, Lee JG. Inhibitory effects of propiverine, atropine and oxybutynin on bladder instability in rats with infravesical outlet obstruction. *Br J Urol* 1998; 82: 272-7.

Landam M, Maake C, Lehmann T, Hauri D, John H. Impact of bladder outlet obstruction on detrusor innervation. *J Urol* 2004; 171: 354.

Landau EH, Fung LCT, Trorner PS, Mittelman M W, Jayanthi VR, Churchill BM, McLorie GA, Steckler RE, Khoury AE. Histologic studies of intravesical oxybutynin in the rabbit. *J Urol* 1995; 153: 2022-2024.

Lapides J, Diokono AC, Silber SJ. Clean intermittent self – catheterization in the treatment of urinary tract disease. *J Urol* 1972; 107: 458-61.

Levin RL, Longhurst PA, Barasha B, McGuire EJ, Elbadawi A, Wein AJ. Studies on experimental bladder outlet obstruction in the cat. Long term functional effects. *J Urol* 1992; 148: 939.

Levin RM, Wein AJ. Direct measurement of the anticholinergic activity of a series of pharmacological compounds on the canine and rabbit urinary bladder. *J Urol* 1982; 128: 396-8.

Levin RM, Wein AJ. Effects of chronic partial obstruction of the rabbit urinary bladder. *J Urol* 1984; 131: 220.

Levin RM, Longhurst PA, Monson FC, Kato K, Wein AJ. Effect of bladder outlet obstruction on the morphology, physiology and pharmacology of the bladder. *Prostate* 1990; (supl 3): 9-26.

Levin RM, Monson FC, Longhurst PA, et al. The rabbit as a model of urinary bladder function. *Neurourol Urodyn* 1994; 13: 119–136.

Levin RM, Levin SS, Zhao Y. Cellular and molecular aspects of bladder hypertrophy. *Eur Urol* 1997; 32: 15-21.

Levin RM, Haugaard N, O'Connor L, Buttyan R, Das A, Dixon JS, Goslin JA. Obstructive response of human bladder to BPH vs. rabbit bladder response to partial outlet obstruction: a direct comparison. *Neurourol Urodyn* 2000; 19: 609-29.

Levin RM, Whitbeck C, Borow A, Burden O, Leggett RE. Effectiveness of vaginally administered oxybutynin on rabbit bladder function. *Urology* 2003; 61: 1273-7.

Lieb JJ, Chichester P, Kogan B, Das AK, Leggett RE, Schroder A, Levin RM. Rabbit urinary bladder blood flow changes during the initial stage of partial obstruction. *J Urol* 1998; 160: 1390-7.

Lin AT, Chen MT, Yang CH, Chang LS. Blood flow of the urinary bladder: effects of outlet obstruction and correlation with bioenergetic metabolism. *Neurourol Urodyn* 1995; 14: 285-92.

Lish PM, Labudde JA, Peters EL, Robbins SI. Oxybutinin – a musculotropic antispasmodic drug with moderate anticholinergic action. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1965; 156: 467-88.

Lluel P, Duquenne C, Martin D. Experimental bladder instability following bladder outlet obstruction in the female rat. *J Urol* 1998; 160: 2253-2257.

Lu SH, Wei YH, Chang LS, Lin ATL, Chen KK, Yang AH. Morphological and morphometric analysis of human detrusor mitochondria with urodynamic correlation after partial bladder outlet obstruction. *J Urol* 2000; 163: 225-29.

MacDiarmid SA. Overactive bladder: improving the efficacy of anticholinergics by dose escalation. *Curr Urol Rep* 2003; 4: 446-51.

Madersbacher H, Knoll M. Intravesical application of oxybutynine: mode of action in controlling detrusor hyperreflexia. Preliminary results. *Eur Urol* 1995; 28: 340-4.

Malmgren A, Sjogreen C, Uvelius B, Mattiasson A, Andersson KE, Andersson PO. Cystometrical evaluation of bladder instability in rats with infravesical outflow obstruction. *J Urol* 1987; 137: 1291-4.

Malmqvist U, Arner A, Uvelius B. Contractile and cytoskeletal proteins in smooth muscle during hypertrophy and its reversal. *Am J Physiol* 1991; 260: 1085-93.

Massad CA, Kogan BA, Trigo-Rocha FE. The pharmacokinetics of intravesical and oral oxybutynin chloride. *J Urol* 1992; 148: 595-7.

Matsumoto S, Chichester P, Kogan BA, Levin RM. Structural and vascular response of normal and obstructed rabbit whole bladders to distension. *Urology* 2003; 62: 1129-31.

Mayo ME, Hinman F. Structure and function of the rabbit bladder altered by chronic obstruction or cystitis. *Invest Urol* 1976; 14: 6-9.

Mills IW, Greenland JE, McMurray G, McCoy R, Ho KMT, Noble JG, Brading AF. Studies of the pathophysiology of idiopathic detrusor instability: the physiological properties of the detrusor smooth muscle and its pattern of innervation. *J Urol* 2000; 163: 646-51.

Moisey CU, Stephenson TP, Blender CB. The urodynamic and subjective results of treatment of detrusor instability with oxybutynin chloride. *Br J Urol* 1980; 52: 472-5.

Monson FC, Wein AJ, Eika B, Murphy M, Levin RM. Stimulation of DNA synthesis in rabbit bladder wall after partial outlet obstruction and acute overdistension. *Neurourol Urodyn* 1994; 13: 51-61.

Moore KH, Gilpin AS, Dixon JS, Richmond DH, Sutherst JR. Increase in presumptive sensory nerves of the urinary bladder in idiopathic detrusor instability. *Br J Urol* 1992; 70: 370-2.

Mostwin JL, Karim OM, Van KG, Brooks EL. The guinea pig as a model of gradual urethral obstruction. *J Urol* 1991; 145: 854-8.

Mulcahy JJ, James HE, McRoberts JW. Oxybutinin chloride combined with intermittent clean catheterization in the treatment of myelomeningocele patients. *J Urol* 1977; 118: 95-6.

Netto Junior R, D'Ancona CAL. Aplicações clínicas da urodinâmica. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2001.

Nigro DA, Haugaard N, Wein AJ, Levin RM. Metabolic basis for contractile dysfunction following chronic parcial bladder outlet obstruction in rabbit. *Mol Biol Biochem* 1999; 200: 1-6.

Ohnishi N, Horan P, Levin SS, Levin RM. Intermittent catheterization limits rabbit bladder dysfunction in response to partial outlet obstruction *J Urol* 2000; 163: 292-5.

Oliveira RP. Neurofarmacologia In: D'Ancona CAL, Netto Junior NR. Aplicações clínicas da urodinâmica. Campinas: Cartgraf; 1995. p. 15-46.

Optiz JL, Thorsteinsson G, Schutt AH, Barret DM, Olson PK. Bexiga e intestino neurogênicos. Reabilitação. princípios e práticas. São Paulo: Manole; 1992. p. 571-81.

Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD, Thummel KE. Characterisation of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 1552-62.

Pampinela F, Roelofs M, Castelucci E, Passerine-Glazel G, Pagano F, Sartore S. Time-dependent remodeling of the bladder wall in growing rabbits after partial outlet obstruction. *J Urol* 1997; 157: 677-82.

I Consenso Brasileiro: incontinência urinária, uroneurologia, disfunções miccionais. Sociedade Brasileira de Urologia – SBU, São Paulo; 1999. p. 45-53.

Resnick MI, Rutchik SD. The epidemiology of incontinence in the elderly. *Br J Urol* 1998: 1-4.

Ruggieri MR, Hanno PM, Samadzadeh S, Johnson EW, Levin RM. Heparin inhibition of increased bacterial adherence following overdistension, ischemia and partial outlet obstruction of the rabbit urinary bladder. *J Urol*, 1986; 136: 132-5.

Sand PK, Ostergard DR. Detrusor instability. In: Sand PK, Ostergard DR, editors. *Urodynamics and the evaluation of female incontinence*. London: Springer 1997; p. 74-7.

Schafer W. Analysis of bladder-outlet function with the linearized passive urethral resistance relation, linPURR, and a disease-specific approach for grading obstruction: from complex to simple. *World J Urol* 1995; 13: 47-58.

Schatzl G, Temml C, Waldmuller Thurridl T, Haidinger G, Madersbacher S. A comparative cross-sectional study of lower urinary tract symptoms in both sexes. *Eur Urol* 2001; 40: 213-9.

Schirmer U, Hemmer W, Lindner KH, Anhaupl T, Wieser T. Ultrastructural alterations in the right and left ventricular myocardium following multiple low energy endocardial countershocks in anesthetized dogs. *Pacing Clin Electrophysiol* 1997; 20: 79-87.

Schroder A, Chichester P, Barry A, Penelope K, Longhurst A, Lieb J Anurag K, Levin RM. Effect of chronic bladder outlet obstruction on blood flow of the rabbit bladder. *J Urol* 2001; 165: 640-6.

Sibley GNA. An experimental model of detrusor instability in the obstructed pig. *Br J Urol* 1985; 57: 292-8.

Sibley GNA. Developments in our understanding of detrusor instability. *Br J Urol* 1997; 80: 54-61.

Sjuve R, Haase H, Morano I, et al. Contraction kinetics and myosin isoform composition in smooth muscle from hypertrophied rat urinary bladder. *J Cell Biochem* 1996; 63: 86-93.

Smet PJ, Moore KH, Jonavicius J. Distribution and colocalization of calcitonin gene-related peptide, tachykinins, and vasoactive intestinal peptide in normal and idiopathic unstable human urinary bladder. *Lab Invest* 1997; 77: 37-49.

Tanagho EA. Anatomy of the lower urinary tract, In: Walsh PC, Reti KAB, Vaughan Jr ED, Wirn AJ. *Campbells urology*. 6th ed. Philadelphia: Saunders 1992. p. 40.

Tong-Long LA, Wein AJ, Gill HS, Levin RM. Functional effect of chronic ischemia on the rabbit urinary bladder. *Neurol Urodyn* 1988; 7: 1.

Tse V, Wills E, Szonyi G, Khadra MH. The application of ultrastructural studies in the diagnosis of bladder dysfunction in a clinical setting. *J Urol* 2000; 163: 535-9.

Turner WH, Brading AF. Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Pharmacol Ther* 1997; 75: 77-110.

Weese DL, Roskamp DA, Leach GE, Zimmern PE. Intravesical oxybutynin chloride: experience with 42 patients. *Urology* 1993; 41: 527-30.

Wein AJ. Neuromuscular Dysfunction of the lower urinary tract. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan Jr ED, Wein AJ, editors. *Campbell's Urology*. Philadelphia, Saunders; 1992. p.573-642.

Williams JH, Turner WH, Sainsbury GM, Brading AF. Experimental model of bladder outflow tract obstruction in the guinea pig. *Br J Urol* 1993; 71: 543-54.

Wise BG, Cardozo LD. The urge syndrome. *Curr Obstet Gynecol Diag Treat* 1992; 2: 105-10.

Yaich M, Popon M, Medard Y, Aigrain EJ. In-vitro cytochrome P450 dependent metabolism of oxybutynin to N-desethyloxybutynin in humans. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 449-51.

Yamaguchi O, Shishido K, Tamura K, Ogawa T, Fujimura T, Ohtsuka M. Evaluation of mRNAs encoding muscarinic receptor subtypes in human detrusor muscle. *J Urol* 1996; 156: 1208-1213.

Yoshida M, Inadome A, Murakami S, Miyamae K, Iwashita H, OTAN M, et al. Effects of age and muscle stretching on acetylcholine release in isolated human bladder smooth muscle. *J Urol* 2002; 167: 40, abstract 160.

Zar JH. *Biostatistical analysis*, 4 ed. Prentice – Hall, New Jersey, 1999; p663.

Zderic SA, Levin RM and Wein AJ. Voiding function and dysfunction: A relevant anatomy, physiology and pharmacology and molecular biology. In: Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, et al. *Adult and Pediatric Urology* (3rd ed ed.), Mosby Year Book Medical, Chicago; 1996. p. 1159–1219.

Zhao Y, Levin SS, Wein AJ, Levin RM. Correlation of ischemia/reperfusion or partial outlet obstruction-induced spectrin proteolysis by calpain with contractile dysfunction in rabbit bladder. *Urology* 1997; 49: 293-300.

8. APÊNDICE

TABELA A: Dados individuais do peso corpóreo (Kg) do coelho nos diferentes grupos experimentais e momentos.

PESO CORPÓREO (Kg)		
Momentos	M1	M2
Animal	Grupo G1	
1	2,60	3,50
2	2,10	2,93
3	2,00	3,10
4	2,15	2,92
5	2,00	2,65
Animal	Grupo G2	
1	2,60	2,80
2	2,00	2,50
3	2,00	2,80
4	2,90	3,20
5	3,10	3,50
Animal	Grupo G3	
1	2,10	3,00
2	2,30	3,00
3	2,20	2,80
4	2,70	3,10
5	2,70	3,10

TABELA B: Dados individuais do peso da bexiga (g) nos diferentes grupos experimentais

PESO DA BEXIGA (g)	
Momentos	M2
Animal	Grupo G1
1	2,62
2	2,93
3	2,14
4	2,15
5	2,46
Animal	Grupo G2
1	24,20
2	12,68
3	19,04
4	16,75
5	9,91
Animal	Grupo G3
1	16,61
2	19,06
3	12,97
4	25,02
5	19,40

TABELA C: Dados individuais da capacidade vesical (ml) do coelho nos diferentes grupos experimentais e momentos.

CAPACIDADE VESICAL MÁXIMA		
Momentos	M1	M2
Animal	Grupo G1	
1	60,82	86,47
2	61,42	41,50
3	30,07	45,11
4	46,42	71,00
5	61,05	82,65
Animal	Grupo G2	
1	21,37	7,42
2	24,15	21,30
3	32,85	22,05
4	67,95	30,37
5	78,90	24,00
Animal	Grupo G3	
1	26,77	14,47
2	14,77	40,20
3	13,95	37,12
4	32,25	16,27
5	40,20	14,77

Errata:

Tabela D: Dados individuais da pressão detrusora máxima nos diferentes grupos experimentais e momentos.

		Pressão detrusora máxima (Kg)	
Momentos		M1	M2
Animal		Grupo G1	
1		6	8
2		17	12
3		15	16
4		20	18
5		8	17
Animal		Grupo G2	
1		21	20
2		25	13
3		24	17
4		32	22
5		23	43
Animal		Grupo G3	
1		33	17
2		25	33
3		25	11
4		8	28
5		19	12

TABELA E: Dados individuais da complacência vesical do coelho nos diferentes grupos experimentais e momentos.

COMPLACÊNCIA VESICAL			
Momentos	M1		M2
Animal		Grupo G1	
1	1,84		1,87
2	0,84		2,02
3	0,33		2,25
4	1,28		3,38
5	0,83		1,80
Animal		Grupo G2	
1	1,33		0,67
2	0,54		4,26
3	0,64		1,29
4	0,87		1,68
5	3,75		0,46
Animal		Grupo G3	
1	1,20		1,03
2	0,61		1,34
3	1,99		6,18
4	0,51		1,36
5	1,34		0,61

TABELA F: Dados individuais do resultado da cultura de urina do coelho nos diferentes grupos e momentos.

UROCULTURA		
Momentos	M1	M2
Animal	Grupo G1	
1	Negativa	Negativa
2	Negativa	Negativa
3	Negativa	Negativa
4	Negativa	Negativa
5	Negativa	Negativa
Animal	Grupo G2	
1	Negativa	<i>Proteus</i>
2	Negativa	<i>Bastonetes Gram Negativo</i>
3	Negativa	Negativa
4	Negativa	Negativa
5	Negativa	<i>Escherichia coli</i>
Animal	Grupo G3	
1	Negativa	Negativa
2	Negativa	<i>Escherichia coli</i>
3	Negativa	<i>Enterococcus faecalis</i>
4	Negativa	Negativa
5	Negativa	Negativa

TABELA G: Dados individuais da creatinina plasmática (mg/dl) do coelho nos diferentes grupos experimentais e momentos.

CREATININA PLASMÁTICA		
Momentos	M1	M2
Animal	Grupo G1	
1	0,91	0,97
2	0,82	1,09
3	0,70	0,82
4	0,87	0,88
5	1,03	0,92
Animal	Grupo G2	
1	0,85	0,86
2	0,66	0,88
3	0,71	1,01
4	0,75	0,78
5	1,03	1,16
Animal	Grupo G3	
1	1,37	0,97
2	0,82	0,94
3	0,90	0,92
4	1,00	0,95
5	0,96	1,49

9. ANEXO

ANEXO 1: Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal

 <p>Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu</p> <p>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br <small>Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 28/04/99</small></p>	 <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">    </div> <p style="color: red; font-size: small;">Comissão de Ética em Experimentação Animal</p>
<h1 style="color: green; margin: 0;">CERTIFICADO</h1>	
<p><i>CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 166 sobre o projeto de pesquisa intitulado “Alterações ultra estruturais da bexiga induzida pela obstrução parcial de coelhos tratados com oxibutina intravesical”, sob a responsabilidade de Hamilton Akihissa Yamamoto, com a colaboração do Professor Doutor João Luiz Amaro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os coelhos são provenientes de Biotério convencional, sem condições de emitir atestado de Sanidade.</i></p> <p><i>Projeto Aprovado Ad’Referendum em 05 de março de 2.001 e Referendado em 04 de abril de 2.001.</i></p> <p><i>Em 18 de outubro de 2.004 foi autorizado a substituição de autores de Karina Tuma Balasteghin para o Dr. Hamilton Akihissa Yamamoto</i></p>	
 <p>Profª Drª Norma Sueli P. Modolo <i>Presidente da CEEA</i></p>	 <p>Alberto Santos Capelluppi <i>Secretário da CEEA</i></p>

ANEXO 2: Composição da Oxibutinina Intravesical (1,0mg/ml) fornecida pela Apsen do Brasil.

-pH 4,2 – 4,5

-Oxibutinina, HCL: 0,02 Kg

-Álcool 96⁰: 0,100L

-Água purificada: 200,00L

-Excipientes: parabeno, acetato de sódio, ácido cítrico, propilenoglicol.
