

Armando Polido Júnior

**ALTERAÇÕES DO COLÁGENO E DO SISTEMA
ELÁSTICO INDUZIDAS PELA HIPERATIVIDADE
DO DETRUSOR EM COELHOS. Ação da oxibutinina**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Adj. João Luiz Amaro
Co-Orientador: Prof. Adj. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso

Botucatu - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Polido Júnior, Armando.

Alterações do colágeno e do sistema elástico induzidas pela hiperatividade do detrusor em coelhos. Ação da oxibutinina / Armando Polido Júnior. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, Botucatu, 2009.

Orientador: João Luiz Amaro

Assunto CAPES: 40102009

1. Colágeno - Efeito fisiológico - Estudos experimentais 2. Bexiga - Doenças - Efeito das drogas

CDD 616.62

Palavras-chave: Coelho; Colágeno; Obstrução parcial da bexiga; Oxibutinina intravesical; Sistema elástico

Epígrafe

*Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!*

(Fernando Sabino – “O encontro marcado”)

Dedicatória

Aos meus pais Armando e Maria Helena, pelo exemplo de vida, responsabilidade, honestidade e carinho. Agradeço a presença constante e a família que construíram em 50 anos de casamento.

À minha bela esposa Carla, pelo nosso amor e eterna companhia. Obrigado pelo carinho, dedicação, ajuda e incentivo neste e em todos os momentos que compartilhamos juntos em nossas vidas. Uma rosa que cultiva o amor, a cultura, a família ...

Aos meus queridos filhos Bruno e Pedro, luzes de nossa família. Agradeço a especial existência de vocês cativando nossas mentes e direcionando nossas vidas para uma maravilhosa jornada.

Aos meus irmãos Anderson, Helder e Grácie, pela cumplicidade, lealdade e amizade. Agradeço ao apoio e incentivo nos momentos importantes de minha vida.

Ao meu avô Eugênio, que marcou presença em minha vida como exemplo para os mais belos direcionamentos que um ser possa trilhar.

A Deus que por Sua presença, sabedoria e bondade, delineando o nosso universo, nos tem incentivado a caminhar na linha da verdade, aperfeiçoando a arte real e suprema do pensamento.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Adj. João Luiz Amaro

Primeiramente, agradeço a sua presença como mestre e amigo, abrindo as portas para o ensino e estendendo os braços para o convívio. Obrigado pela orientação, paciência e dedicação no desenvolvimento e realização deste trabalho. Mais uma importante etapa de minha vida com sua participação de forma grandiosa. Junto à honestidade e caráter de um homem existe uma preciosa família, agradeço a sua esposa Carmem e seus filhos Lucas e Marcelo, por proporcionarem a harmonia que reflete no trabalho e nos relacionamentos.

Ao Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Coordenador da Unidade de Pesquisa Urogenital, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ. Grande incentivador da pesquisa, conhecimento e ensino médico. Agradeço por proporcionar-me a oportunidade e realização de um estágio nessa Unidade de Pesquisa e os laços efetivados com o Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Ao Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Estrutura e Ultra-estrutura da Unidade de Pesquisa Urogenital da UERJ. Agradeço por sua inestimável atenção e acolhimento junto ao serviço da UERJ, assim como pelas orientações das técnicas histomorfométricas de quantificação do tecido conjuntivo.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso

Responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Bioquímica da Matriz Extracelular da Unidade de Pesquisa Urogenital da UERJ. Agradeço pela sua dedicação, auxílio e orientações na realização desse trabalho e da técnica bioquímica para quantificação do colágeno.



Agradecimientos

Este trabalho foi realizado com o esforço conjunto e participação de vários colegas, amigos e funcionários. Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a sua realização.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano, pela amizade, dedicação e ajuda em momentos importantes deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Padovani, docente do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências – UNESP, pela orientação e análise estatística dos resultados.

Aos amigos Prof. Dr. Aparecido Donizete Agostinho e Prof. Dr. José Carlos de Souza Trindade Filho, pela amizade, participação e incentivo, nesta e em outras etapas importantes de minha vida.

Ao Prof. Dr. José Carlos de Souza Trindade, Prof. Dr. Luigi Armando Paolo Vercesi e Prof. Dr. Luis Antônio Correa, pela grande dedicação ideológica ao ensino médico e presença marcante em nossa formação.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Monte Gobbo, Prof. Dr. Carlos Márcio Nóbrega de Jesus, Prof. Dr. Fernando da Rocha Câmara, Prof. Dr. Hamillto Akihissa Yamamoto, Prof. Dr. José Goldberg, e Prof. Dr. Oscar Eduardo Hidetoshi Fugita, pela formação médica, dedicação e confiança.

Aos amigos e alunos da Iniciação Científica da Faculdade de Medicina de Botucatu, José Mateus da Costa, Tânia Munhoz e Débora Cristina Baldacin, pela inestimável ajuda e dedicação durante as etapas de quantificação histomorfométrica deste trabalho. Alunos que, orgulhosamente, exemplificam a nossa Universidade.

Ao amigo Bruno Felix, aluno de Pós-Graduação da UERJ – Unidade de Pesquisa Urogenital, pela excelente receptividade, dedicação e ajuda em etapas importantes deste trabalho.

Ao Sr. Carlos e Sra. Maria Bernadete Andreucci, pela dedicação à família e atenção especial aos netos, incentivando a educação e a cultura, como forma de engrandecer os pensamentos e os bons costumes.

Aos meus amigos e irmãos, Eleno Shibata Brandão e Ivan Carlo de M. Linjardi, pela inestimável amizade, presença e ajuda nesta importante etapa de minha vida.

Ao laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina - UNESP, em especial ao funcionário José Lucas de Carvalho, pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto e companheirismo nas atividades.

Às funcionárias do Departamento de Urologia Andréia G. Chiamente e Gláucia G. Chiamente, pela ajuda, incentivo e dedicação.

À equipe de trabalho da Seção de Pós – Graduação pela gentileza, atenção e profissionalismo, em especial à Regina Célia Spadin, Lilian Cristina N. B. Nunes, Nathanael P Salles, Andréia P. L. Devidé e à coordenadora Janete A. N. Silva.

A todos os funcionários da Biblioteca - UNESP, pela excelente atenção, simpatia e profissionalismo.

Às funcionárias do Instituto de Urologia de São Carlos, Cleusa dos Santos Silva, Cláudia Regina Messias e Mirian C. da Costa Dorinho, pelo profissionalismo, atenção e dedicação aos pacientes durante a minha ausência.

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

A todos os animais que participaram da execução deste experimento, meu agradecimento e respeito.

Nota Explicativa

A forma de apresentação desta dissertação de mestrado segue uma nova orientação do coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, com o objetivo de facilitar sua publicação em revista científica. Está dividida em dois capítulos e um anexo. O primeiro capítulo versa sobre revisão de literatura, e o segundo foi escrito de acordo com as normas internacionais de publicação em periódicos.

O capítulo 1º corresponde à revisão da literatura a respeito da hiperatividade do detrusor, modelos experimentais de obstrução parcial da bexiga, ação da oxibutinina, colágeno e fibras do sistema elástico na parede vesical.

O capítulo 2º refere-se ao trabalho para publicação, com o título: “Alterações do colágeno e do sistema elástico induzidas pela hiperatividade do detrusor em coelhos. Ação da oxibutinina”.

No anexo é mostrado: informações para autores da revista a ser publicada.

Tal proposta visa ao aprendizado do pós-graduando em redação de artigos científicos e divulgação do conhecimento, contemplando, assim, os objetivos finais dos programas de pós-graduação.

Sumário

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	19
1- INTRODUÇÃO	20
2- MODELOS EXPERIMENTAIS DE OBSTRUÇÃO E HIPERATIVIDADE DO DETRUSOR.....	22
3- FUNÇÃO DA BEXIGA E AÇÃO DA OXIBUTININA.....	24
3.1- Mecanismo de ação e farmacocinética da oxibutinina.....	24
3.2- Oxibutinina Intravesical	27
4- COMPOSIÇÃO ESTRUTURAL DA PAREDE VESICAL	29
4.1- Colágeno.....	31
4.1.1- Distribuição do colágeno na bexiga	32
4.1.2- Expressões e comportamento do colágeno na bexiga.....	33
4.2- Fibras do Sistema Elástico.....	37
4.2.1- Distribuição das fibras do sistema elástico na bexiga.....	38
4.2.2- Importância das fibras do sistema elástico na bexiga.....	39
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO II – MANUSCRITOS	54
MANUSCRITO 1 – ALTERAÇÕES DO COLÁGENO E DO SISTEMA ELÁSTICO INDUZIDAS PELA HIPERATIVIDADE DO DETRUSOR EM COELHOS. AÇÃO DA OXIBUTININA.....	54
RESUMO	56
INTRODUÇÃO.....	59
MATERIAIS E MÉTODOS	61
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
FIGURAS E TABELAS	78

MANUSCRITO 2 – COLLAGEN AND ELASTIC SYSTEM CHANGES INDUCED BY DETRUSOR OVERACTIVITY IN RABBITS. THE ACTION OF OXYBUTYNIN.....	84
ABSTRACT.....	86
INTRODUCTION.....	88
MATERIALS AND METHODS.....	90
RESULTS.....	95
DISCUSSION.....	98
CONCLUSIONS.....	103
REFERENCES.....	104
FIGURES AND TABLES.....	107
ANEXO _____	113
Anexo 1 – Informações para autores do International Braz J Urol.....	114

*C
a
p
í
t
u
l
o

9*

Revisão de Literatura

1- INTRODUÇÃO

A bexiga e a uretra, partes integrantes do trato urinário inferior (TUI), funcionam como uma unidade para o desempenho de funções complexas que necessitam de adequada coordenação de neurônios autônomos periféricos, somáticos e do Sistema Nervoso Central (SNC). Essas funções desenvolvem-se em duas fases distintas e compreendem o armazenamento de urina (fase de enchimento) e a micção (fase de esvaziamento) ^{1,2}. Desta forma, o armazenamento de urina deve ser sob baixa pressão, sem desconforto e sem perdas (fase de enchimento), e a micção deve ocorrer sem grandes esforços e sem resíduo urinário (fase de esvaziamento). Essas fases implicam em contrações e relaxamentos sinérgicos de músculos lisos e estriados que fazem parte da estrutura vésico –uretral ^{3,4}.

Durante a fase de enchimento vesical, a pressão intraluminal deve permanecer abaixo de 10 cm de água e assim manter a complacência da bexiga ⁵. A função intrínseca do tecido muscular da bexiga e as propriedades de viscosidade e elasticidade dos componentes celulares e extracelulares têm grande importância nesta manutenção ^{6,7}. Por outro lado, é fundamental a integridade do sistema neurológico para a contração rápida e sustentada da musculatura lisa que acompanha o esvaziamento vesical.

Na obstrução infra vesical ou nos casos de bexiga neurogênica, pode ocorrer uma falha nessas funções da bexiga, o que pode acarretar complicações

urológicas como infecção, refluxo vésico ureteral, deterioração do trato urinário superior e, finalmente, alteração da função renal ⁸.

A bexiga hiperativa, que pode ser decorrente seja pelo envelhecimento ou pela obstrução parcial da bexiga, pode ocasionar sintomas como freqüência, noctúria e urgência, acompanhados ou não de incontinência urinária, gerando, ainda, implicações psicossociais importantes. É denominada bexiga hiperativa neurogênica quando ocorre em pacientes portadores de neuropatia ^{9,10}.

A hiperatividade do detrusor é caracterizada no estudo urodinâmico pela presença de contrações involuntárias, de qualquer amplitude, observadas durante a fase de enchimento vesical, podendo ser espontânea ou provocada, parcialmente suprimível ou não. Entretanto, se houver lesão neurológica, é definida como hiperatividade detrusora neurogênica ^{11,12,13}.

A hiperatividade do detrusor pode estar associada à obstrução infravesical. Em um estudo prospectivo, utilizando urodinâmica em pacientes na faixa etária de 60 anos, os quais apresentavam sintomas do trato urinário inferior, observou-se que 68% tinham obstrução urinária, e mais da metade desses apresentavam hiperatividade do detrusor ¹⁴.

O tratamento da bexiga hiperativa visa à preservação da função do trato urinário, assim como da complacência vesical, o controle das infecções urinárias e, ainda, se possível, da continência urinária, com melhora da qualidade de vida.

A hiperatividade do detrusor pode estar relacionada com a hipertrofia celular^{10,15,16}, aumento do depósito de colágeno e fibras do sistema elástico na parede vesical^{9,10,17,18} e alteração na inervação intrínseca^{18,19,20,21,22}.

Modelos experimentais são importantes na obtenção de obstrução parcial da bexiga e desenvolvimento de hiperatividade do detrusor^{23,24}.

Na literatura, existem relatos de resultados favoráveis no tratamento da disfunção miccional com a aplicação de oxibutinina por via intravesical; entretanto, o modo de atuação da droga na parede da bexiga e as alterações histomorfométricas decorrentes de sua utilização não estão bem estabelecidos^{25,26,27}.

2- MODELOS EXPERIMENTAIS DE OBSTRUÇÃO E HIPERATIVIDADE DO DETRUSOR

Diferentes modelos experimentais de obstrução parcial infravesical foram descritos, utilizando vários animais: cobaia²⁸, coelho^{29,30}, gato³¹, cão³², porco³³ e rato³⁴. A obstrução parcial da bexiga foi realizada de diferentes formas: fios de sutura ao redor do colo vesical^{35,36}, retalho da fáscia do músculo reto abdominal³⁷, injeção de gordura autóloga no colo vesical³⁸, tubo de polietileno²³ e faixa de silicone³⁹ colocados ao redor do colo vesical, e bracelete ajustável de polietileno²⁴.

Alguns trabalhos, além de caracterizarem as mudanças funcionais e estruturais da bexiga com obstrução parcial, também levaram em consideração o desenvolvimento de contrações involuntárias do detrusor.

Malmgren *et al*⁴⁰, em 1987, obtiveram contrações involuntárias em ratos obstruídos, utilizando o modelo com fio de sutura comparado ao grupo controle. Gray⁴¹, em 1997, observou o desenvolvimento de contrações involuntárias do detrusor em 89% dos animais obstruídos contra 12% dos animais do grupo controle. Outros autores também verificaram a ocorrência de contrações involuntárias em ratos obstruídos^{34,42}.

Alguns desses modelos experimentais de obstrução parcial da bexiga são difíceis de serem reproduzidos. Em nossa experiência, em alguns desses casos, observou-se o deslocamento do cateter de polietileno ou da faixa de silicone, ocasionando falha na obstrução da bexiga e assim o não aparecimento das contrações involuntárias do detrusor. Por outro lado, quando eram realizados pontos de sutura nas extremidades desses cateteres, para evitar sua mobilização, em muitos casos observou-se uma obstrução excessiva, que causou litíase vesical ou a morte do animal²⁴.

Assim, a utilização de um bracelete ajustável de polietileno permite não somente a padronização da obstrução parcial, como ainda o aparecimento da hiperatividade do detrusor em 93% dos casos²⁴.

3- FUNÇÃO DA BEXIGA E AÇÃO DA OXIBUTININA

3.1- Mecanismo de ação e farmacocinética da oxibutinina

O trato urinário inferior recebe inervação de fibras adrenérgicas, colinérgicas e purinérgicas. Existem dois componentes importantes relacionados com a contração do detrusor. O principal componente é a neurotransmissão colinérgica mediada pela acetilcolina, e o segundo é a neurotransmissão purinérgica mediada pela adenosina trifosfato ⁴³. Sabe-se que os neurônios parassimpáticos pós-ganglionares são a maior fonte de acetilcolina na bexiga ⁴⁴. Em outros estudos, tem sido demonstrada outra fonte de acetilcolina na bexiga ⁴⁵. Esta fonte de acetilcolina não-neuronal é, provavelmente, derivada das células uroteliais, e a sua liberação ocorre após o estiramento das fibras musculares vesicais ou ainda durante o envelhecimento fisiológico ⁴⁶.

A acetilcolina, liberada na junção neuro-muscular, liga-se aos receptores muscarínicos, aumentando a permeabilidade da membrana pós-sináptica aos cátions sódio e potássio, causando despolarização e, conseqüentemente, contração muscular, sendo inativada por hidrólise. Existem cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5). A bexiga humana é dotada de receptores M2 e M3, sendo aproximadamente 80% do subtipo M2 ^{47,48}.

A contração do detrusor é mediada principalmente pelo receptor M3, porém, o bloqueio exclusivo deste receptor não impede a contração vesical. Os receptores muscarínicos também estão presentes na glândula salivar, no trato gastrointestinal, no córtex cerebral e no coração, sendo responsáveis pelos efeitos

colaterais dos anticolinérgicos como boca seca, obstipação, retenção urinária, sonolência, visão turva e raramente refluxo gastroesofágico^{47,49,50}.

O cloridrato de oxibutinina é uma amina terciária de baixo peso molecular, hidrossolúvel, com alta biodisponibilidade após sua ingestão. Apresenta ação relaxante do músculo vesical devido ao efeito anticolinérgico por bloqueio competitivo dos receptores parassimpáticos muscarínicos, tendo 10 vezes mais seletividade para o subtipo M3^{50,51}.

Outras 2 ações podem também ser atribuídas à oxibutinina, como o efeito espasmolítico direto sobre o músculo detrusor, provavelmente pelo antagonismo do cálcio, sendo esta ação cerca de 500 vezes menor que a anterior, e o efeito anestésico local, sendo que a contribuição deste sobre a atividade detrusora é pouco conhecida, mas parece ser mais importante após administração intravesical^{50,52}.

Park *et al*²⁷ observaram que a oxibutinina inibe a proliferação e reprime a expressão genética das células musculares lisas na bexiga. Demonstraram, assim, haver uma diminuição de 40% na síntese de ácido desoxiribonucleico (DNA) depois do estiramento mecânico das células musculares lisas da bexiga de ratos, submetidas à oxibutinina²⁷.

A oxibutinina sofre metabolização no intestino e no fígado, realizada pelo citocromo P450 3A⁵³, que tem alta concentração na parte proximal do intestino delgado e no cólon⁵⁴. O principal metabólito ativo produzido é o N-desetyl-oxibutinina, que apresenta a mesma atividade anticolinérgica do

cloridrato de oxibutinina, e, provavelmente, é o responsável pelos efeitos colaterais que ocorrem em 40% a 80% dos casos^{50,55,56,57}.

No ser humano, o pico plasmático da oxibutinina ocorre cerca de 50 minutos após a administração oral, tem meia vida curta, sendo a concentração sérica do N-desetyl-oxibutinina 4 a 10 vezes maior do que a da oxibutinina após ingestão oral^{56,58}. Enquanto que, após aplicação intravesical ou transdérmica, esta relação é apenas 1 a 1,5 vezes maior, o que parece justificar a menor incidência de efeitos colaterais na via intravesical^{58,59}.

Yamamoto *et al*⁶⁰ demonstraram que a utilização de oxibutinina intravesical em coelhos com hiperatividade do detrusor protegeu os animais contra as alterações ultra-estruturais da camada muscular.

A bexiga tem função de reservatório para urina hipertônica, sendo relativamente impermeável à água; entretanto, possui um sistema de transporte ativo de íons. Já foi demonstrado que drogas anticolinérgicas são absorvidas pelo epitélio vesical, atingindo o músculo detrusor e a circulação sistêmica^{59,61}. Essa absorção não é influenciada pelo pH urinário, presença de infecção urinária ou hipertrofia do músculo detrusor⁵⁹. Ainda não está esclarecido se a principal ação da oxibutinina intravesical se faz por ação direta no músculo detrusor ou por ação sistêmica após absorção. Os dados disponíveis na literatura fornecem pontos conflitantes até o momento^{50,52,59,62}.

3.2- Oxibutinina Intravesical

O uso da oxibutinina, por via oral, no tratamento da bexiga hiperativa e/ou nos casos com complacência vesical diminuída tem sido bem documentado como terapêutica efetiva^{63,64}. Um dos tratamentos mais utilizados nos casos de hiperatividade detrusora neurogênica é a associação de cateterismo intermitente limpo e anticolinérgico oral, obtendo-se a continência e preservação da função do trato urinário em um grande número de pacientes^{65,66}.

O cateterismo intermitente limpo foi introduzido por Lapidès *et al*⁶⁷, em 1972, podendo ser indicado em qualquer idade. O procedimento reduz alterações funcionais e estruturais da bexiga, melhora o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, as defesas contra a infecção urinária⁶⁸.

Uma grande limitação do uso da oxibutinina oral é a alta incidência de efeitos colaterais devido à sua ação anticolinérgica, o que leva à interrupção do tratamento em até 43% dos pacientes⁶⁹. A administração intravesical tem se mostrado efetiva em muitos casos, com melhor tolerabilidade do que a via oral para o tratamento da bexiga hiperativa^{56,70}.

A Oxibutinina por via intravesical, intrarectal, intravaginal ou transdérmica tem sido administrada em ensaios clínicos com o objetivo de evitar o primeiro passo do metabolismo hepático e gastrointestinal dessa droga, com diminuição dos efeitos colaterais e aumento também de sua efetividade^{59,62,70,71,72,73}.

A grande maioria dos pacientes com hiperatividade do detrusor que podem se beneficiar da administração intravesical de oxibutinina são pacientes com bexiga neurogênica e lesão medular, ou crianças com mielomeningocele ou mielodisplasia que já estão realizando cateterismo intermitente limpo ⁷⁴. Trabalhos demonstram que pacientes incontinentes com o tratamento oral apresentaram continência completa em 50% e continência parcial em 30% dos casos quando foram tratados com oxibutinina intravesical, observando-se, também, boa aderência e aceitação pelos pais e crianças que estavam em regime de autocateterismo ^{75,76}.

A administração da oxibutinina por via intravesical foi introduzida por Charles Brender em 1989 ⁷⁰. A nova apresentação na forma líquida, em frasco, eliminou a necessidade da manipulação do comprimido, facilitando a sua aplicação e, conseqüentemente, a aderência ao tratamento ⁷⁷.

Esta via de administração mostrou-se segura, não apresentando lesão do tecido vesical e não aumentando a suscetibilidade para infecção do trato urinário ^{25,78}.

4- COMPOSIÇÃO ESTRUTURAL DA PAREDE VESICAL

O tecido conjuntivo ou matriz extracelular é um importante e vital elemento estrutural do trato urinário. Em sua composição, incluem-se, pelo menos, as quatro principais classes de macromoléculas: colágeno, fibras do sistema elástico, proteoglicano e glicoproteína⁷⁹.

O Colágeno e as fibras do sistema elástico, os componentes mais importantes do tecido conjuntivo, estão presentes em toda a parede da bexiga e são intimamente relacionados com a complacência vesical^{80,81}. Estudos prévios têm demonstrado particular atenção às alterações estruturais e quantitativas do tecido conjuntivo da camada muscular vesical em certas condições como envelhecimento⁸², neuropatia⁸³, obstrução infravesical⁸⁴ e hiperatividade do detrusor²⁰. O aumento do colágeno e outros componentes da matriz extracelular ocorrem como uma resposta tecidual a um dano e podem levar à fibrose de um órgão, como já observado na fibrose pulmonar⁸⁵, na esclerose glomerular⁸⁶ e em outras patologias.

As propriedades mecânicas da parede vesical dependem da elasticidade do músculo detrusor e do tecido conjuntivo^{6,7,87}. Um aumento anormal na quantidade de colágeno e fibras do sistema elástico ocorre, comumente, na maioria das uropatias congênitas e adquiridas, e pode levar à perda da elasticidade da parede vesical ou, ainda, à perda da complacência vesical^{7,20,80}.

A parede da bexiga contém células musculares que devem permanecer relaxadas durante a fase de enchimento vesical e contraírem quando estiver repleta. Ambos os elementos de elasticidade, como as fibras elásticas, ou de resistência à tração, o colágeno, contribuem para o desenvolvimento adequado dessas funções. Os elementos elásticos permitem à bexiga retornar ao seu volume inicial após o esvaziamento, enquanto o colágeno previne e protege, durante a fase de enchimento, do estiramento excessivo das fibras musculares, evitando sua ruptura. A bexiga é capaz de sustentar grandes tensões biaxiais (200-300%) em contraste com a modesta tensão uniaxial sofrida pelo tendão (3-5%)⁸⁸. Assim, pode resistir a alterações mecânicas sem lesões estruturais irreversíveis. Tal fato sugere que o arranjo fisiológico das fibras colágenas e a associação com elementos celulares e fibras elásticas da bexiga são bastante elaborados^{88,89}.

Há cerca de 15 anos, Ewalt *et al*⁸¹ já estudavam a regulação das proteínas da matriz extracelular, com ênfase principal no colágeno e na elastina, na tentativa de trazerem substratos para estudos futuros e poderem elucidar qual seria o comportamento desses elementos quando houvesse melhora da complacência vesical⁸¹.

Recentemente, Collado *et al*⁹⁰ estudaram o diâmetro das células musculares do detrusor e a razão entre o tecido conjuntivo e a musculatura lisa em pacientes com obstrução infravesical, retenção urinária aguda e um grupo controle não obstruído. O autor encontrou um aumento no diâmetro das células musculares do detrusor e fibrose nas bexigas com obstrução⁹⁰. Esse estudo está de acordo com outro trabalho⁹¹, que encontrou um aumento de colágeno e fibras do sistema elástico na musculatura detrusora de pacientes com obstrução infravesical, quando comparados com controles, a partir de um estudo estereológico⁹¹.

4.1- Colágeno

Os colágenos são uma família de proteínas estruturais que representam um papel crucial na estrutura e função do tecido conjuntivo. Existem aproximadamente 20 tipos diferentes de colágeno. Cada molécula de colágeno é composta por três cadeias polipeptídicas, chamadas de cadeias alfas, as quais giram uma ao redor da outra, com uma configuração helicoidal. Essas cadeias são estabilizadas por outros aminoácidos, como prolina e hidroxiprolina, e por pontes de hidrogênio, formando, assim, ligações estáveis. Cada cadeia alfa é codificada por um gene separadamente. A conformação dessas cadeias irá prover uma diversidade de notáveis propriedades mecânicas e funcionais desses tecidos^{92,93}.

Os colágenos tipos I, II e III são referidos como colágenos fibrosos e são os tipos mais freqüentemente encontrados na matriz extracelular⁸¹. O colágeno tipo I, o mais comum, é encontrado, principalmente, nos ligamentos, nas fâscias e nos tendões. Forma as fibras grossas e fortes, conferindo resistência à estrutura que as contêm, predominando nos tecidos conjuntivos mais densos que são menos distensíveis. O tipo II é encontrado, principalmente, nas cartilagens, dando força, mas não flexibilidade ao tecido, e, geralmente, não é encontrado na bexiga. O colágeno tipo III predominaria em tecidos que requerem maior flexibilidade, formando as fibras mais finas e organizadas. Geralmente, é encontrado junto com o tipo I, em proporções variadas, em tecidos como pele, aorta, pulmão, bexiga, útero e está presente também nas fâscias e ligamentos. A magnitude e natureza de suas interações e definitiva influência na complacência e resistência à tração são pouco conhecidas^{88,94,95,96}.

4.1.1- Distribuição do colágeno na bexiga

Murakumo *et al*⁹⁷ descreveram o arranjo tridimensional das fibras de colágeno na bexiga humana através da microscopia eletrônica de varredura com métodos de digestão química. A descrição foi realizada para as três principais camadas: mucosa, muscular e serosa. Os achados sugeriram que cada camada tem uma propriedade mecânica diferente e age com diferentes papéis na função de armazenamento e esvaziamento vesical, contribuindo também para sua complacência⁹⁷.

A camada mucosa é dividida de acordo com o arranjo das fibras de colágeno. A região superficial, com uma densa camada de fibras de colágenos entrelaçados que, provavelmente, agem como um suporte para o epitélio transicional, podendo protegê-lo também de uma distensão excessiva, além de dar um possível suporte a vasos e nervos da região e proteger contra forças externas. A região média, constituída de feixes de fibras de colágenos entrelaçados, de 2,1 a 6,2 micrometros de diâmetro, com espaço entre os feixes e com alinhamento em várias direções, que suportam as forças mecânicas. A porção mais profunda, logo abaixo da muscularis mucosa, apresenta-se mais larga e consiste de uma frouxa rede de feixes de colágenos que parecem como fios trançados, capazes de acomodar uma ampla variação de estiramento ou compressão^{97,98}.

Na camada muscular, os fascículos de musculatura lisa são firmemente cobertos com lâminas de colágeno, sendo separados de outros

fascículos por camadas de colágeno e fibras de elastina. Estes achados indicam que cada fascículo pode mover-se independentemente como uma unidade contráctil, o que os protege de grandes distensões. Entretanto, é importante observar que os fascículos musculares vizinhos são conectados uns aos outros por feixes de colágeno ondulados, o que mantém a posição original dos fascículos apesar da contração e distensão da parede vesical. Cada célula muscular lisa em um fascículo é acomodada por fina camada de fibras de colágeno, sendo que as fibras que envolvem uma célula, freqüentemente, estendem-se para participar de outra célula, o que suporta movimentação sincronizada das células musculares lisas adjacentes dentro dos fascículos^{97,99}.

A camada serosa consiste de feixes ondulados de colágeno empilhados em uma região laminar, os quais são intercalados por células adiposas. Tal arranjo, provavelmente, permite que a camada serosa se expanda e contraia em coordenação com a movimentação da camada muscular, além de poder proteger a bexiga contra uma grande distensão⁹⁷.

4.1.2- Expressões e comportamento do colágeno na bexiga

Os fatores que controlam a síntese de colágeno no desenvolvimento fisiológico da bexiga e durante processos patológicos ainda não estão bem definidos. O estímulo pode ser multifatorial, incluindo hormônios, fatores de crescimento e sinais provenientes da matriz extracelular^{88,100}.

Nos casos de hiperatividade do detrusor neuropática ou idiopática, ocorrem alterações teciduais focais, sendo que, nos decorrentes de processos obstrutivos, essas alterações estruturais da bexiga são mais homogêneas^{18,80,101}.

A intensidade das alterações da parede vesical que ocorrem devido ao fator obstrutivo está diretamente correlacionada com o tempo de obstrução. A deposição de colágenos tipo I e III é também mais rápida no processo obstrutivo quando comparada ao envelhecimento fisiológico da bexiga^{8,102}.

Tekgul *et al*⁸, em estudo com coelhos, utilizando hibridização “in situ” e imunohistoquímica, demonstraram um significativo aumento do colágeno nas bexigas obstruídas.

Por outro lado, estudos realizados por Kim *et al*^{103,104}, em 1991, demonstraram uma diminuição da concentração relativa de colágeno em relação à camada muscular em fetos com obstrução infravesical, enfatizando a importância da diferenciação do tipo de colágeno.

Uvelius & Mattiasson⁸⁹ também demonstraram, utilizando a dosagem de hidroxiprolina que, durante o processo de hipertrofia muscular, a concentração de colágeno diminuiu. Observaram, ainda, que o nível de colágeno e o peso do detrusor permaneceram estáveis em 2 diferentes períodos da obstrução (6 e 16 semanas), indicando que, possivelmente, a hipertrofia celular pode se estabilizar após um certo período de obstrução.

Outros estudos mais recentes, utilizando grupo controle, confirmam, em casos com obstrução infravesical, um aumento da camada detrusora e da deposição de colágeno^{90,105,106}.

A proporção de colágenos tipos I e III em um tecido pode ser dependente do estágio evolutivo tecidual, patologias, processo de envelhecimento e/ou alterações funcionais. O colágeno tipo III predomina nas estruturas fetais recém-formadas e nas fases iniciais da cicatrização de uma lesão. Esse tipo de colágeno tem sido referido, algumas vezes, como fetal ou colágeno embriogênico⁸⁸. Porém, pode estar aumentado na parede das bexigas na fase de envelhecimento fisiológico ou ainda nas bexigas parcialmente obstruídas⁸.

Diferentes autores têm demonstrado que a deposição do colágeno inicia-se na lâmina própria e estende-se para camadas mais profundas da parede vesical durante o processo obstrutivo^{8,81}.

Estudos histológicos e bioquímicos têm mostrado que em bexigas não complacentes ocorre uma deposição anormal de matriz extracelular proteica na camada muscular da parede vesical^{7,81,83,107,108,109}. Ewalt *et al*¹⁰⁷ observaram em bexiga humana não complacente, utilizando uma técnica de degradação de cianogen para quantificar colágeno, um aumento de 33% na quantidade de colágeno tipo III, quando comparado com controles normais. Em outro estudo, Deveaud *et al*¹⁰⁹ demonstraram que, embora o total de colágeno determinado pela análise de hidroxiprolina estava aumentado em 10% nas bexigas não complacentes, o colágeno tipo III, quantificado por imunoenensaio, estava

aumentado em 49% dos casos. Esse aumento preferencial no colágeno tipo III leva a um aumento na proporção entre colágeno tipo III : tipo I nas bexigas obstruídas quando comparadas com controles normais ¹⁰⁹. O acúmulo de colágeno III com alteração na proporção tipo III : I também tem sido demonstrado em outras doenças envolvendo processo de fibrose, como cardiomiopatia isquêmica ¹¹⁰ e um modelo de fibrose pós irradiação de musculatura esquelética ¹¹¹. Entretanto, na fibrose em outros órgãos tem sido descrito um aumento no colágeno tipo I, como nas fibroses pulmonares e hepáticas crônicas ^{112,113}.

Estudo recente sugere que na disfunção vesical pós-obstrução parcial da bexiga de ratos ocorreu um aumento do colágeno tipo III ¹¹⁴.

Os trabalhos têm demonstrado que, embora o colágeno seja usualmente produzido pelos fibroblastos, estes não seriam suficientemente numerosos para produzir um aumento do colágeno nas diferentes camadas da parede vesical ¹⁰². Entre os feixes musculares, seja das bexigas normais ou nas hipertróficas, o colágeno, em grande parte, é sintetizado pelos fibroblastos. Porém, na deposição entre as fibras musculares lisas, onde os fibroblastos seriam raros, demonstrou-se haver células musculares lisas com função semelhante ao fibroblasto, ou seja, com capacidade de produzir ativamente colágeno ^{81,88,102}. Um aumento na produção pode ser uma expressão da alteração na diferenciação da célula muscular associada com fatores moduladores, como envelhecimento ou

quadro obstrutivo, ocorrendo transformação de uma função contrátil amadurecida para uma função fenotípica imatura secretora¹⁰².

Existem evidências do aumento do colágeno tipo III nas disfunções miccionais decorrentes do processo obstrutivo infravesical. O estudo do tempo da reversibilidade desse processo obstrutivo, a fim de que não ocorram danos estruturais, e a correlação com o quadro clínico seriam importantes tendo em vista os diferentes tratamentos propostos.

4.2- Fibras do Sistema Elástico

As fibras do sistema elástico são importantes componentes da matriz extracelular encontrados em diferentes órgãos, para os quais provêm elasticidade e alguma resistência biomecânica. Assim, essas fibras têm um importante papel para a matriz, principalmente em órgãos que mudam a forma sob condições fisiológicas, como por exemplo, a bexiga, a uretra e o pulmão^{115,116}.

Três tipos de fibras compõem esse sistema elástico: oxitalânicas, elaunínicas e elásticas. As fibras oxitalânicas são formadas exclusivamente por microfibrilas, as fibras elaunínicas por microfibrilas e elastina em pouca quantidade e as fibras elásticas por uma grande quantidade de elastina com microfibrilas^{115,116,117}. Estas fibras são amplamente distribuídas entre os vários tipos de tecido conjuntivo, particularmente onde a elasticidade é requerida^{115,118}.

Todos os três tipos de fibras do sistema elástico são corados quando o tecido é oxidado com oxona, antes de ser corado pelo método resorcina – fucsina de Weigert^{119,120}. Caso contrário, sem ocorrer esta oxidação prévia, somente as fibras elásticas e elaunínicas seriam coradas¹²¹.

O correto conhecimento das variações quantitativas do sistema elástico na matriz extracelular, durante um processo patológico evolutivo na bexiga, é importante para determinar a melhor avaliação e terapia dos casos envolvidos.

4.2.1- Distribuição das fibras do sistema elástico na bexiga

As fibras elásticas, geralmente, se apresentam como filamentos espiralados ou retificados corados por uma resorcina-fucsina ou aldeído-fucsina. Seu diâmetro é de aproximadamente 0,2 a 1,5 micrometros, e às vezes, ramificam-se para formar uma grossa rede em tecido conjuntivo frouxo, ou mesmo uma lâmina elástica, quando as fibras se fundem¹²².

Murakumo *et al*⁹⁷, utilizando microscopia eletrônica, estudaram a distribuição das fibras de elastina na mucosa, muscular e serosa vesical. Observaram uma quantidade pequena na região da mucosa, constituindo um tecido frouxo, que daria sustentabilidade aos vasos sanguíneos⁹⁷. Na muscular, as fibras de elastina são distribuídas longitudinalmente ao feixe muscular, principalmente na superfície dos fascículos musculares, formando um tecido frouxo na serosa⁹⁷.

Por outro lado, Ewalt *et al*⁸¹, utilizando imunohistoquímica, em estudo com bexigas humanas normais, demonstraram intensa localização de elastina na lâmina própria e distribuição modesta na camada detrusora.

4.2.2- Importância das fibras do sistema elástico na bexiga.

As fibras do sistema elástico têm uma atividade importante na complacência tecidual, principalmente em órgãos que mudam sua forma sob condições fisiológicas, como a bexiga e a uretra^{115,116}.

A fáscia transversal dos pacientes com hérnia inguinal direta apresenta alterações estruturais das fibras elásticas maduras e elaunínicas, responsáveis pela elasticidade, e redução da densidade de fibras oxitalânicas, responsáveis pela resistência¹²³.

Diferentes autores têm demonstrado o aumento do sistema elástico na parede vesical, seja durante o envelhecimento fisiológico, ou durante os processos obstrutivos^{80,104}.

Estudos em crianças e adultos com dilatação ureteral têm demonstrado aumento do tecido elástico, provavelmente para compensar a elevada pressão interna causada pelo fator obstrutivo. A reversão desse processo pode restabelecer a morfologia tecidual normal^{80,124}.

Outro estudo, avaliando bexigas de fetos humanos com obstrução infravesical, observou um aumento no número e espessura das fibras elásticas¹⁰³. Esses fatores podem alterar a elasticidade da bexiga^{80,103}.

Recentemente, alguns ensaios clínicos controlados têm demonstrado aumento de tecido conjuntivo e fibras do sistema elástico no detrusor de pacientes com hiperplasia benigna da próstata e obstrução infra vesical^{91,125}.

Ewalt *et al*⁸¹, utilizando imunohistoquímica com anticorpos policlonais para elastina humana, em estudo com bexigas humanas não complacentes, demonstraram que a quantidade de elastina era praticamente invariável na lâmina própria, enquanto havia intensa localização na camada detrusora, em comparação com bexigas normais.

Charlton *et al*¹⁸, avaliando bexigas humanas com hiperatividade idiopática ou neuropática, utilizando método histoquímico, observaram aumento da elastina não somente entre os feixes musculares, mas também a presença dentro das fibras, em contraste com bexigas normais.

Poucos trabalhos avaliaram a expressão gênica para elastina. Djavan *et al*¹²⁶, utilizando uma análise competitiva de transcriptase reversa, demonstraram uma diminuição significativa na elastina mRNA nas bexigas não complacentes, sugerindo uma baixa regulação transcricional do gene elastina.

Estudos adicionais são necessários para identificar alterações e mecanismos regulatórios que possam ser bloqueados a fim de impedir a deterioração das propriedades estruturais da parede vesical, seja pelo envelhecimento fisiológico ou disfunções vesicais.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Mundy AR, Stephenson TP, Wein AJ. Urodynamics principles, practice and application. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994.
2. Groat WC, Steers WD. Central regulation of micturition and sexual function. In: Spyer RM, Loewy A, editors. Central Regulation of autonomic functions. Oxford: Oxford University Press; 1990. p. 310-33.
3. Netto Junior R, D'Ancona CAL. Aplicações clínicas da urodinâmica. 3rd ed. São Paulo: Atheneu; 2001.
4. Abrams P. Uroflowmetry. In: Abrams P, editor. Urodynamics. 2nded. Londres: Springer Verlag; 1997. p. 20-39.
5. Klevmark B. Motility of the urinary bladder in cats during filling at physiologic rates: I: Intravesical pressure patterns studied by a new method of cystometry. *Acta Physiol Scand.* 1974; 90: 565-77.
6. Kondo A, Susset JG. Vesicoelastic properties of the bladder. Comparative studies in normal and pathologic dogs. *Invest Urol.* 1979; 11: 459-65.
7. Landau EH, Jayanthi VR, Churchill BM, Shapiro E, Gilmour RF, Khoury AE, et al. Loss of elasticity in dysfunctional bladders: urodynamic and histochemical correlation. *J Urol.* 1994; 152: 702-5.
8. Tekgul S, Yoshino K, Bagli D, Carr MC, Mitchell ME, Yao LY. Collagen types I and III localization by in situ hybridization and immunohistochemistry in the partially obstructed young rabbit bladder. *J Urol.* 1996; 156 Suppl 2: 582-6.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references.[homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003[last updated 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 240p.

9. 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*. 1993; 150: 1650-6.
 10. Brading AF. A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology*. 1997; 50 Suppl 6A: 57-67.
 11. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the standardization sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn*. 2002; 21: 167-78.
 12. Wein AJ, Rovner ES. Definition and epidemiology of overactive bladder. *Urology*. 2002; 60 (5 Suppl 1): 7-12.
 13. Lima CLM. Preparo do paciente para o estudo urodinâmico. In: D’Ancona CAL, Rocha FET, editors. *Manual de Urodinâmica*. São Paulo: Planmark; 2007. p. 25-8.
 14. Hyman M, Groutz A, Blaivas J. Detrusor instability in men: correlation of lower urinary tract symptoms with urodynamic findings. *J Urol*. 2001; 166: 550-2.
 15. Malone-Lee J. Is detrusor instability and hypertrophy a smooth-muscle disease of the lower urinary tract? *Lancet*. 1996; 348: 1395.
 16. Amaro JL, Balasteghin KT, Padovani CR, Montenegro R. Structural alterations of the bladder induced by detrusor instability. Experimental study in rabbits. *Int Braz J Urol*. 2005; 31: 579-86.
 17. Monson FC, Wein AJ, Eika B, Murphy M, Longhurst PA. Stimulation of DNA synthesis in rabbit bladder wall after partial outlet obstruction and acute overdistension. *Neurourol Urodyn*. 1994; 13: 51-61.
 18. Charlton RG, Morley AR, Chambers P, Gillespie JJ. Focal changes in nerve, muscle and connective tissue in normal and unstable human bladder. *BJU Int*. 1999; 84: 953-60.
-

-
19. Moore KH, Gilpin SA, 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.
 20. Elbadawi A, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. III. Detrusor overactivity. *J Urol.* 1993; 150:1668-80.
 21. Smet PJ, Moore KH, Joनावicius 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.
 22. Mills IW, Greeland JE, McMurray G, Mccoy R, Ho KM, Noble JG, et al. 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.
 23. 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.
 24. Balasteghin KT, Nardo AM, Amaro JL, Padovani CR. Experimental model of bladder instability in rabbits. *Int Braz J Urol.* 2003; 29: 62-7.
 25. Landau EH, Fung LCT, Thorner PS, Mittelman MW, Jayanthi VR, Churchill BM, et al. Histologic studies of intravesical oxybutynin in rabbit. *J Urol.* 1995; 153: 2022-4.
 26. Amaro JL, Vercesi LA, Goldberg J, Agostinho AD, Trindade Filho JCS, Gobbo CAM. Oxibutinina intravesical. *J Bras Urol.* 1997; 23: 25-7.
 27. Park JM, Bauer SB, Freeman MR, Peters CA. Oxybutynin chloride inhibits proliferation and suppresses gene expression in bladder smooth muscle cells. *J Urol.* 1999; 162 (3-II): 1110-4.
 28. Mostwin JL, Karim OMA, VanKoeveringe G, Brooks EL. The guinea pig as a model of gradual urethral obstruction. *J Urol.* 1991; 145: 854-8.
-

-
29. Brent L, Stephens FD. The response of smooth muscle cells in the rabbit urinary bladder to outflow obstruction. *Invest Urol.* 1975; 12: 494-502.
 30. Mayo ME, Hinman F. Structure and function of the rabbit bladder altered by chronic obstruction or cystitis. *Invest Urol.* 1976; 14: 6-9.
 31. 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: 939-43.
 32. Broderick GA, Longhurst PA, Juniewicz PE, Wein AJ, Levin RL. A novel canine model of partial outlet obstruction secondary to prostatic hypertrophy. *World J Urol.* 1994; 12: 245-8.
 33. Sibley GNA. The psychological response of the detrusor muscle to experimental bladder out flow obstruction in the pig. *Br J Urol.* 1987; 60: 332-6.
 34. Lluel P, Duquenne C, Martin D. Experimental bladder instability following bladder outlet obstruction in the female rat. *J Urol.* 1998; 160: 2253-7.
 35. Levin RM, High J, Wein AJ. The effect of short-term obstruction on urinary bladder function in the rabbit. *J Urol.* 1984; 132: 789-91.
 36. Schroder A, Chichester P, Barry A, Penelope K, Longhurst A, Lieb J, et al. Effect of chronic bladder outlet obstruction on blood flow of the rabbit bladder. *J Urol.* 2001; 165: 640-6.
 37. Das AK, Horan P, Leggett RE, Levin RM. Use of abdominal fascia to create parcial outlet obstruction in rabbits. *Neurourol Urodyn.* 1998; 17: 231-9.
 38. Canning DA, Seibold J, Saito M, Zderic SA, Snyder HM, Duckett JW, et al. Use of injectable fat to obstruct the urethra in rabbits. *Neurourol Urodyn.* 1995; 14: 259-67.
 39. Kato K, Wein A, Kitada S, Haugaard N, Levin RM. The functional effect of mild outlet obstruction on the rabbit urinary bladder. *J Urol.* 1988; 140: 880-4.
-

-
40. 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.
 41. Gray M. Progressive changes in detrusor function with bladder outlet obstruction. *J Urol.* 1997; 158: 1-3.
 42. Kwak TI, Lee JG. Inhibitory effects of propiverine, atropine, and oxybutinin on bladder instability in rats with infravesical outlet obstruction. *Br J Urol.* 1998; 82: 272-7.
 43. Yoshida M, Homma Y, Inadome A. Age-related changes in cholinergic and purinergic neurotransmission in human isolated bladder smooth muscle. *Eep Gerontol.* 2001; 36: 99-109.
 44. Andersson KE, Chapple C, Wein A. The basis for drug treatment of the overactive bladder. *Worl J Urol.* 2001; 19: 294-8.
 45. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther.* 1998; 77: 59-79.
 46. Yoshida M, Miyamae K, Iwashita H, Otani M, Inadome A. Management of detrusor dysfunction in the elderly: changes in acetylcholine and adenosine triphosphate release during aging. *J Urol.* 2004; 63 Suppl 3A: 17-23.
 47. Andersson KE. The importance of the cholinergic system in neurourology. *Eur Urol.* 1998; 34 Suppl 1: 6-9.
 48. Martins Filho J, D'Ancona CAL, Netto Junior NR. Tratamento da hiperreflexia do detrusor com cloridrato de oxibutinina por via oral e intravesical. *Urogin Uroginecol.* 2002; 5: 42-51.
 49. Bauer SB. The effects and challenges of bladder outlet obstruction. *J Urol.* 2000; 163: 3.
 50. Yarker YE, Goa KL, Fitton A. Oxybutynin: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic use in detrusor instability. *Drugs & Aging.* 1995; 6: 243-62.
-

-
51. Yamaguchi O, Shishido K, Tamura K, Ogawa T, Fugimura T, Ohtsuka M. Evaluation of mRNAs encoding muscarinic receptor subtypes in human detrusor muscle. *J Urol*. 1996; 156:1208-13.
 52. Madersbacher H, Knoll M. Intravesical application of oxybutynin: mode of action in controlling detrusor hyperreflexia. *Eur Urol*. 1995; 28: 340-4.
 53. 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.
 54. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 283: 1552-62.
 55. 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.
 56. Massada CA, Kogan BA, Trigo-Rocha FE. The pharmacokinetics of intravesical and oral oxybutynin chloride. *J Urol*. 1992; 148: 595-7.
 57. Jonville AP, Dutertre JP, Autre E, Barbellion M. Adverse effects of oxybutynin chloride (Ditropan). Evaluation of the official survey of Regional Pharmacovigilance Centers. *Therapie*. 1992; 47: 389-92.
 58. 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.
 59. Buyse G, Waldek K, Verpoorten C, Bjork H, Casaer P, Andersson KE. Intravesical oxybutynin for neurogenic bladder dysfunction: less systemic side effects due to reduced first pass metabolism. *J Urol*. 1998; 160: 892-6.
 60. Yamamoto HA. Alterações ultra-estruturais induzidas pela instabilidade do detrusor em coelhos: ação da oxibutinina [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2004.
-

61. Steers WD. Physiology and pharmacology of the bladder and urethra. In: Walsh PC, Retnik AB, Vaughan Jr ED, Wein AJ, editors. Campbell's Urology. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1998. p. 870-915.
 62. Stasi SM, Giannantoni A, Navarra P, Capelli G, Storti L, Porena M, et al. Intravesical oxybutynin: mode of action assessed by passive diffusion and electromotive administration with pharmacokinetics of oxybutynin and n-desethyl oxybutynin. *J Urol.* 2001; 166: 2232-6.
 63. Gupta SK, Sathyan G, Lindemulder EA, Ho PL, Sheiner LB, Aarons L. Quantitative characterization of therapeutic index: application of mixed-effects modeling to evaluate oxybutynin dose-efficacy and dose-side effect relationships. *Clin Pharmacol Ther.* 1999; 65: 672-84.
 64. Birns J, Luccari E, Malone-Lee JG. A randomized controlled trial comparing the efficacy of controlled-release oxybutynin tablets (10 mg once daily) with conventional oxybutynin tablets (5 mg twice daily) in patients whose symptoms were stabilized on 5 mg twice daily of oxybutynin. *BJU Int.* 2000; 85: 793-8.
 65. Mulcahy JJ, James HE, Mc Roberts JW. Oxybutynin chloride combined with intermittent clean catheterization in the treatment of myelomeningocele patients. *J Urol.* 1977; 118: 95-6.
 66. Bauer SB. Neurogenic dysfunction of the lower urinary tract in children. In: Walsh PC, Retnik AB, Vaughan Jr ED, Wein AJ, editors. Campbell's Urology. 7thed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1998. p.2019-53.
 67. Lapidus J, Diokono AC, Silber SJ. Clean intermittent self-catheterization in the treatment of urinary tract disease. *J Urol.* 1972; 107: 458-61.
 68. 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.
 69. Kaplinsk R, Greenfield S, Wan J, Fera M. Expanded follow up of intravesical oxybutynin chloride use in children with neurogenic bladder. *J Urol.* 1996; 156: 753-6.
 70. Brendler CB, Radebaugh LC, Mohler JL. Topical oxybutynin chloride for relaxation of dysfunctional bladders. *J Urol.* 1989; 141: 1350-2.
-

-
71. Radziszewski P, Borkowski A. Therapeutic effects of intrarectal administration of oxybutynin. *Wiad Lek.* 2002; 55: 691-8.
 72. Chou EC, Whitbeck C, Borow A, Burden O, Levin RM. Inhibition of hyperreflexia by vaginally administered oxybutynin: a novel rabbit model. *J Urol.* 2004; 171: 958-62.
 73. Dmochowski RR, Starkman JS, Davila GW. Transdermal drug delivery treatment for overactive bladder. *Int Braz J Urol.* 2006; 32: 513-20.
 74. Lose G, Norgaard JP. Intravesical oxybutynin for treating incontinence resulting from an overactive detrusor. *BJU Int.* 2001; 87: 767-73.
 75. Szollar SM, Lee SM. Intravesical oxybutynin for spinal cord injury patients. *Spinal Cord.* 1996; 34: 284-7.
 76. Greenfield SP, Fera M. The use of intravesical oxybutynin chloride in children with neurogenic bladder. *J Urol.* 1991; 146: 532-4.
 77. 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): 1084-7.
 78. Kasabian NG, Vlachiots JD, Lais A, Klumpp B, Kelly MD, Siroky MB, et al. The use of intravesical oxybutynin chloride in patients with detrusor hypertonicity and detrusor hyperreflexia. *J Urol.* 1994; 151: 944-5.
 79. Yao LY, Tekgul S, Kim KK, Li H, Mitchell ME, Carr MC. Developmental regulation of collagen differential expression in the rabbit bladder. *J Urol.* 1996; 156 Suppl 2: 565-70.
 80. Cortivo R, Pagano F, Passerini G, Abatangelo G, Castellani I. Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. *Br J Urol.* 1981; 53: 134-7.
 81. Ewalt DH, Howard PS, Blyth B, Snyder HM 3rd, Duckett JW, Levin RM, et al. Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? *J Urol.* 1992; 148: 544-9.
-

-
82. Elbadawi A, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. II. Aging detrusor: normal versus impaired contractility. *J Urol.* 1993; 150: 1657-67.
 83. Shapiro E, Becich MJ, Perlman E, Lepor H. Bladder wall abnormalities in myelodysplastic bladders: a computer assisted morphometric analysis. *J Urol.* 1991; 145: 1024-9.
 84. Elbadawi A, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. IV. Bladder outlet obstruction. *J Urol.* 1993; 150: 1681-95.
 85. Kuhn C, Boldt J, King T, Crouch E, Vartio T, Macdonald J. An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140:1693-703.
 86. Peten E, Striker L, Carome M, Elliott S, Yang CW, Striker G. The contribution of increased collagen synthesis to human glomerulosclerosis: A quantitative analysis of alpha21V collagen mRNA expression by competitive polymerase chain reaction. *J Exp Med.* 1992; 176: 1571-6.
 87. Susset JG, Servot-Viguiere D, Lamy F, Madernas P, Black R. Collagen in 155 human bladders. *Invest Urol.* 1978; 16: 204-6.
 88. Koo HP, Howard PS, Chang SL, Snyder HM, Duckett JW, Macarak EJ. Developmental expression of interstitial collagen genes in fetal bladders. *J Urol.* 1997; 158: 954-61.
 89. Uvelius B, Mattiasson A. Collagen content in the rat urinary bladder subjected to intravesical outflow obstruction. *J Urol.* 1984; 132: 587-90.
 90. Collado A, Batista E, Gelabert-Más A, Corominas JM, Arañó P, Villavicencio H. Detrusor quantitative morphometry in obstructed males and controls. *J Urol.* 2006; 176: 2722-8.
 91. Rubinstein M, Sampaio FJ, Costa WS. Stereological study of collagen and elastic system in the detrusor muscle of bladders from controls and patients with infravesical obstruction. *Int Braz J Urol.* 2007; 33: 33-41.
-

-
92. Nimmi ME. Collagen: structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues. *Semin Arthritis Rheum.* 1983; 13: 1-86.
 93. Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991; 5: 2814-23.
 94. Bornstein P, Sage H. Structurally distinct collagen types. *Ann Rev Biochem.* 1980; 49: 957-1003.
 95. Burgeson RE. New collagens, new concepts. *Ann Rev Cell Biol.* 1988; 4: 551-77.
 96. Bergman A, Elia G, Cheung D, Perelman N, Nimmi ME. Biochemical composition of collagen in continent and stress urinary incontinent women. *Gynecol Obstet Invest.* 1994; 37: 48-51.
 97. Murakumo M, Ushiki T, Abe K, Matsumura K, Shinno Y, Koyanagi T. Three-Dimensional arrangement of collagen and elastin fibers in the human urinary bladder: a scanning electron microscopic study. *J Urol.* 1995; 154: 251-6.
 98. Levy BJ, Wight TN. Structural changes in the aging submucosa: new morphologic criteria for the evaluation of the unstable human bladder. *J Urol.* 1990; 144: 1044-55.
 99. Murakumo M, Ushiki T, Koyanagi T, Abe K. Scanning electron microscopic studies of the smooth muscle cells and their collagen fibrillar sheaths in empty, distended and contracted urinary bladders of the guinea pig. *Arch Histol Cytol.* 1993; 56: 441-9.
 100. Bornstein P, Sage H. Regulation of collagen gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1989; 37: 67-106.
 101. Elbadawi A. Pathology and pathophysiology of detrusor in incontinence. *Urol Clin North Am.* 1995; 22: 499-512.
 102. Al-Motabagani MA. Age-related changes in the urinary bladder of the female albino rats. *Int J Morphol.* 2005; 23: 309-16.
-

-
103. Kim KM, Kogan BA, Massad CA, Huang YC. Collagen and elastin in the obstructed fetal bladder. *J Urol.* 1991; 146: 528-31.
 104. Kim KM, Kogan BA, Massad CA, Huang YC. Collagen and elastin in the normal fetal bladder. *J Urol.* 1991; 146: 524-7.
 105. Kim JC, Yoon JY, Seo SI, Hwang TK, Park YH. Effects of partial bladder outlet obstruction and its relief on types I and III collagen and detrusor contractility in the rat. *Neurourol Urodyn.* 2000; 19: 29-42.
 106. Inui E, Kojima M, Inaba M, Iwata T, Ochiai A, Naya Y, et al. Histological changes in bladder detrusor in benign prostatic hyperplasia: significant correlation with bladder hypertrophy and compliance. *J Urol.* 1999; 161 Suppl 4: 234.
 107. Ewalt DH, Constantinescu SC, Bellon G, Borel JP, Snyder HM, Duckett JW, et al. Increased collagen type III in the neurogenic non-compliant bladder. *J Urol.* 1992; 147:438-40.
 108. Kaplan EP, Richier JC, Howard PS, Ewalt DH, Lin VK. Type III collagen messenger RNA is modulated in non-compliant human bladder tissue. *J Urol.* 1997; 157: 2366-9.
 109. Deveaud CM, Macarak EJ, Kucich U, Ewalt DH, Abrams WR, Howard PS. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. *J Urol.* 1998; 160: 1518-27.
 110. Mukherjee D, Sen S. Alteration of collagen phenotypes in ischemic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1991; 88: 1141-6.
 111. Wegrowski J, Lafuma C, Lefaix JL, Daburon F, Robert L. Modification of collagen and noncollagenous proteins in radiation-induced muscular fibrosis. *Exp Mol Pathol.* 1988; 48: 273-85.
 112. Seyer JM, Hutcheson ET, Kang AH. Collagen polymorphism in idiopathic chronic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 1976; 57:1498-507.
 113. Seyer JM, Hutcheson ET, Kang AH. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *J Clin Invest.* 1977; 59: 241-8.
-

-
114. Inaba M, Ukimura O, Yaoi T, Kawauchi A, Fushiki S, Miki T. Upregulation of heme oxygenase and collagen type III in the rat bladder after partial bladder outlet obstruction. *Urol Int.* 2007; 78: 270-7.
 115. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci.* 2002; 115: 2817-28.
 116. Bastos AL, Silva EA, Costa WS, Sampaio FJB. The concentration of elastic fibres in the male urethra during human fetal development. *BJU Int.* 2004; 94: 620-3.
 117. Maia RS, Babinski MA, Chagas MA, AbiduFigueiredo M, Costa WS, Sampaio FJB. Concentration of elastic system fibers in the corpus cavernosum, corpus spongiosum, and tunica albuginea in the rabbit penis. *Int J Impot Res.* 2006; 18: 121-5.
 118. Kierzenbaum AL. *Histology and cell biology: an Introduction to Pathology.* Philadelphia: Mosby; 2002.
 119. Montes GS. Structural biology of the fibres of the of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int.* 1996; 20: 15-27.
 120. Battlehner CN, Caldini EG, Pereira JCR, Luque EH, Montes GS. How to measure the increase in elastic system fibres in the lamina propria of the uterine cervix of pregnant rats. *J Anat.* 2003; 203: 405-18.
 121. Weigert C. Über eine Method zur Färbung elastischer Fasern. *Zentralbl Allg Path Anat.* 1898; 9: 289-92.
 122. Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol.* 2002; 65: 109-26.
 123. Rodrigues Junior AJ, Rodrigues CJ, Cunha ACP, Yoo J. Quantitative analysis of collagen and elastic fibers in the transversalis fascia in direct and indirect inguinal hernia. *Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo.* 2002; 57: 265-70.
 124. Pagano F, Passerine G, Cortivo R, Daga-Gordini D, Abatangelo G. The elastic component of normal and dilated ureters in children: chemical and histochemical characterisation. *Br J Urol.* 1976; 48:13-17.
-

- 125.** Inui E, Ochiai A, Nasa Y, Ukimura O, Kojima M. Comparative morphometric study of bladder detrusor between patients with benign prostatic hyperplasia and controls. *J Urol.* 1999; 161: 827-30.

 - 126.** Djavan B, Lin V, Kaplan EP, Richier JC, Shariat S, Marberger M, et al. Decreased elastin gene expression in noncompliant human bladder tissue: a competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *J Urol.* 1998; 160: 1658-62.
-

*C
a
p
í
t
u
l
o*

99

Manuscrito 1

Alterações do colágeno e do sistema elástico induzidas pela hiperatividade do detrusor em coelhos.

Ação da oxibutinina

AUTORES: **ARMANDO POLIDO JÚNIOR**, Pós-Graduando, Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, Brasil.

JOSÉ MATEUS DA COSTA, graduando em Medicina, Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, Brasil.

TÂNIA MUNHOZ, graduando em Medicina, Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, Brasil.

FRANCISCO JOSÉ SAMPAIO, Professor Titular, Unidade de Pesquisa Urogenital, Faculdade de Medicina, UERJ, Rio de Janeiro, Brasil.

LUIZ EDUARDO DE MACEDO CARDOSO, Professor Adjunto, Unidade de Pesquisa Urogenital, Faculdade de Medicina, UERJ, Rio de Janeiro, Brasil.

JOÃO LUIZ AMARO, Professor Adjunto, Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, Brasil.

CORRESPONDÊNCIA: Armando Polido Júnior

Instituto de Urologia de São Carlos, Avenida Dr. Carlos Botelho nº 1222,

Vila Pureza, CEP – 13561-003, São Carlos, São Paulo, Brasil.

Telefone / Fax: 00 55 (16) 3372-7163, E-mail: armandopj@terra.com.br

Sem conflitos de interesse.

RESUMO

Objetivos: O presente estudo tem como objetivo avaliar as alterações histopatológicas e histomorfométricas do colágeno e das fibras do sistema elástico na bexiga, utilizando um modelo experimental de hiperatividade do detrusor (HD) em coelhos com obstrução parcial da bexiga (OPB) submetidos à oxibutinina intravesical. **Materiais e Métodos:** Quarenta e cinco coelhos machos Norh Folk, pesando em média 2207,4 g, foram divididos, de forma randomizada, em 3 grupos. Grupo I (GI): controle clínico (n=15), sem intervenção cirúrgica; os outros animais foram submetidos à OPB, no momento M0, utilizando uma técnica previamente descrita por Balasthegin. Desses animais, 29 desenvolveram HD, avaliada por estudo cistométrico uma semana após a cirurgia, no momento M1, e foram divididos, de forma randomizada, em grupo GII (n=14) e grupo GIII - OPB + oxibutinina intravesical (n=15, 0.5 mg/kg peso corporal, diariamente por 28 dias). Um animal foi excluído por não ter desenvolvido HD. Creatinina sérica, cultura de urina e estudo cistométrico foram realizados em todos os animais, uma semana após OPB (M1) e 4 semanas após M1 (M2), quando os animais foram sacrificados. O diâmetro das fibras musculares foram medidas nas secções de bexigas coradas com HE e determinadas em μm . As secções foram também coradas pela técnica de Picro-Sirius Red para evidenciar colágeno e pela Fuccina Resorcina de Weighert para caracterizar as fibras do sistema elástico. As análises morfométricas foram realizadas utilizando os programas Pro- Image Plus e

Image J. A concentração bioquímica de colágeno na parede da bexiga foi determinada por uma análise da hidroxiprolina e expressa como μg de hidroxiprolina por mg de tecido seco e delapidado. **Resultados:** Após 4 semanas, o peso da bexiga foi significativamente maior nos animais de GII e GIII quando comparados com GI (9.61 ± 5.36 e 6.00 ± 2.18 vs 2.35 ± 0.55 , respectivamente). Nos animais obstruídos, tratados com oxibutinina intravesical, observou-se um peso da bexiga significativamente menor em relação aos que não receberam a droga. A creatinina manteve níveis normais. O estudo cistométrico revelou que a capacidade vesical foi significativamente maior no GII em M2 comparado à M1 ($35,13 \pm 13,60$ vs $54,53 \pm 22,77$), não ocorreu diferença significativa nos outros dois grupos. A pressão máxima do detrusor não mostrou diferença estatística entre os grupos e nos diferentes momentos. A complacência vesical foi significativamente maior nos animais utilizando oxibutinina intravesical no momento M2 comparado com M1. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos GI e GII nos diferentes momentos. No momento M2, foram detectadas contrações involuntárias do detrusor (CID) em todos os animais de GII, em 47% de GIII e nenhum de GI. A fibra muscular foi significativamente mais espessa no grupo obstruído (GII) em relação aos GI e GIII ($180.2 \pm 33.2 \mu\text{m}$ vs. $126.8 \mu\text{m} \pm 27.3$ and $133.1 \mu\text{m} \pm 41.2$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos GI e GIII. A densidade do colágeno foi significativamente maior no grupo controle quando comparado aos grupos GII e GIII ($461.807,1 \pm 118.695,3 \mu\text{m}^2$ vs. $269.637,9 \mu\text{m}^2 \pm 147.046,2$ and $292.879,7$

$\mu\text{m}^2 \pm 106.548,9$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos GII e GIII. O percentual de fibra do sistema elástico foi significativamente maior nos grupos GII e GIII quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos GII e GIII. A concentração bioquímica do colágeno no GIII não diferiu do grupo GII. Porém, comparando estes dois grupos com o GI (59.93 ± 11.84) observou-se que a OPB causou uma diminuição de aproximadamente 18% na concentração de colágeno ($p < 0.05$). **Conclusões:** A oxibutinina intravesical parece proteger a bexiga contra as alterações funcionais decorrentes da HD e OPB, assim como prevenir alterações do colágeno e fibras do sistema elástico.

PALAVRAS CHAVE: Coelho; Colágeno; Obstrução parcial da bexiga; Oxibutinina intravesical; Sistema elástico.

INTRODUÇÃO

A bexiga hiperativa (BH) pode ser ocasionada por diversos fatores como obstrução parcial da bexiga, envelhecimento ou por patologias neurológicas. É caracterizada clinicamente por sintomas como freqüência, noctúria e urgência, acompanhados ou não de incontinência urinária, podendo ter implicações psicossociais importantes e repercussões para o trato urinário superior (1). Ao exame urodinâmico, é freqüente a presença de hiperatividade do detrusor (HD), como estimado em mais de 50% dos homens com obstrução parcial da bexiga secundária à hiperplasia benigna da próstata e sintomas de BH(2).

O cateterismo intermitente limpo associado à oxibutinina intravesical tem sido utilizado com eficiência para o tratamento da HD, principalmente em pacientes que apresentam efeitos colaterais importantes decorrentes do uso de anticolinérgicos orais e que já necessitem do cateterismo intermitente, como portadores de bexiga neurogênica e lesão medular, ou crianças com mielomeningocele (3). A oxibutinina age bloqueando os receptores muscarínicos, associado ainda a um efeito relaxante direto da musculatura detrusora e anestésico local, diminuindo assim a freqüência das contrações involuntárias do detrusor e, conseqüentemente, melhorando os sintomas da BH (4). A administração intravesical de oxibutinina pode minimizar seus efeitos colaterais

melhorando sua efetividade clínica, embora as alterações histomorfométricas decorrentes de sua utilização não estejam bem estabelecidas (5,6).

Alterações morfológicas frequentemente estão associadas à obstrução parcial da bexiga (OPB) incluindo progressiva hipertrofia da musculatura lisa da bexiga, assim como mudanças relacionadas ao colágeno e fibras do sistema elástico (7,8,9).

As propriedades mecânicas da parede vesical dependem da resistência, viscosidade e elasticidade do músculo detrusor e do tecido conjuntivo. Os componentes mais importantes do tecido conjuntivo são o colágeno e as fibras do sistema elástico, e estão relacionados com a complacência vesical (8,10). Um aumento anormal na quantidade de colágeno e fibras do sistema elástico ocorre comumente na maioria das uropatias obstrutivas congênitas ou adquiridas, podendo levar à perda da resistência e da elasticidade da parede da bexiga, evoluindo para uma fibrose tecidual (10,11). O resultado final deste aumento é a complacência reduzida, diminuição da capacidade vesical e a alta pressão de armazenamento, o que pode estar associado com a ocorrência de hiperatividade do detrusor (2,12).

O presente estudo tem como objetivo avaliar as alterações histopatológicas e histomorfométricas do colágeno e fibras do sistema elástico na bexiga, utilizando um modelo experimental de HD em coelhos com OPB submetidos à oxibutinina intravesical.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais. Após aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal na Universidade Estadual Paulista, 45 coelhos machos North Folk, pesando entre 1700g e 3200g, foram aleatoriamente divididos em três grupos. Grupo 1 (GI, n=15), neste grupo não houve intervenção cirúrgica, os animais foram utilizados como controle clínico, cistométrico e parâmetros estruturais de normalidade. Os animais restantes foram submetidos à obstrução parcial da bexiga, no momento M0 (Fig.1), utilizando uma técnica previamente descrita (13). Basicamente, um bracelete ajustável de polietileno foi implantado por cirurgia aberta ao redor do colo da bexiga sem compressão da uretra, previamente cateterizada com um cateter 10 Fr Foley, removido após o procedimento. Para o procedimento cirúrgico foi realizada anestesia geral com ketamine e xylazine intramuscular. Destes animais, 29 desenvolveram hiperatividade do detrusor (HD), verificada por estudo cistométrico realizado uma semana após a intervenção cirúrgica, no momento M1 (Fig. 1), e foram aleatoriamente divididos em grupo 2 (GII, n=14) e grupo 3 (GIII, n=15). Um animal foi excluído, por não ter desenvolvido HD.

Uma semana após o procedimento cirúrgico (M1) os animais de GIII começaram a receber instilação intravesical de 0.5 mg/Kg de oxibutinina líquida, uma vez, diariamente por 4 semanas. A bexiga era esvaziada com um cateter 10

Fr, que era imediatamente removido após a instilação da droga. A oxibutinina permanecia na bexiga até a ocorrência de esvaziamento espontâneo.

Cultura de urina, creatinina sérica, e cistometria foram realizadas em todos os animais uma semana após o procedimento cirúrgico (M1) e 5 semanas após a cirurgia (M2). Animais com cultura de urina positiva em M1 foram tratados com 1 mg/Kg/dia de trimethropim intramuscular.

Avaliação cistométrica. Foi realizada utilizando um sistema de urodinâmica computadorizada Urobyte™ 5000. Durante o exame, os animais em vigília foram colocados em goteiras de madeira, com os membros contidos por fio de algodão. A pressão intravesical foi medida com um cateter duplo lúmen de 10 Fr e a pressão intra-abdominal com um cateter retal com balão; no início do procedimento a urina foi coletada em tubo estéril para cultura. O estudo cistométrico foi realizado conforme previamente publicado (6,13). A capacidade máxima da bexiga, a pressão máxima do detrusor e a complacência da bexiga foram determinadas para cada coelho. Foi considerada HD quando observadas contrações involuntárias do detrusor com baixo volume vesical, causando ou não perda urinária simultânea.

Os animais foram sacrificados após 5 semanas da cirurgia (M2), as bexigas foram removidas e imediatamente pesadas utilizando uma balança de precisão digital. Após a remoção das bexigas, o material foi fixado em solução de formalina tamponada 10% durante 48 a 72 horas, e subseqüentemente submetido a processamento histológico de rotina para inclusão em parafina.

Quantificação Morfométrica. Os blocos de parafina com tecido de bexiga foram seccionados com espessura de 5 μm , obtendo secções transversais da parede da bexiga. Estas secções foram coradas com as técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) para a realização da medida das fibras musculares, Picrosirius red para evidenciar o colágeno (14) e a Resorcina-Fucsina de Weigert com prévia oxidação com oxona 10% para caracterizar as fibras do sistema elástico (15).

Após secção da bexiga e fixação da lâmina em HE, as imagens foram digitalizadas com um aumento final de 250 vezes utilizando uma câmara vídeo acoplada a um microscópio óptico (LEICA DMLB) e um microcomputador com tela do monitor colorida. A medida transversal da fibra muscular (μm) foi realizada em cinco campos randomizados utilizando o programa de morfometria Pro-Image Plus.

Para a quantificação das fibras de colágeno, após secção da bexiga e fixação das lâminas pela técnica de Picrosirius Red, as imagens foram digitalizadas com um aumento final de 100 vezes utilizando uma câmara vídeo acoplada a um microscópio óptico (LEICA – DMLB). Foram analisados quatro campos randomizados para cada animal e foi medida a área da superfície ocupada pelas fibras de colágeno (μm^2), em cada campo, utilizando o programa de morfometria Pro-Image Plus.

Na avaliação das fibras do sistema elástico, após secção de 3 diferentes áreas da bexiga e fixação das lâminas com Resorcina-Fucsina de Weigert, foram

analisados, de forma randomizada, 3 campos da lâmina própria e outros 3 da camada muscular, totalizando 18 campos em cada animal. As imagens dos campos foram digitalizadas com um aumento final de 1000 vezes utilizando uma câmera vídeo acoplada a um microscópio óptico (LEICA). O software Image J versão 1.4 (NIH, Bethesda, USA) foi usado para gerar uma grade de 100 pontos-cruzes, os quais foram sobrepostos a fotografia previamente digitalizada. A densidade de área das fibras do sistema elástico foi quantificada pela contagem de pontos obtidos no sistema (*test-grid system*) e expressa como percentagem do espaço referência, conforme descrito (16).

Determinação Bioquímica da concentração de colágeno. Inicialmente, as amostras de tecido da bexiga foram fixadas em acetona por 24 horas a 4°C. Em seguida, o tecido foi clivado em fragmentos menores (aproximadamente 2x2 mm), os quais foram delipidados em duas trocas de 24 horas cada em solução de clorofórmio-metanol (2:1, volume/volume), em temperatura ambiente. O solvente foi decantado e após incubação a 60°C por 30 minutos foi obtido o preparado seco e delipidado da bexiga, que foi pesado (17). Entretanto, não foi possível recuperar material suficiente para análise em 2 animais do grupo controle, em 3 do grupo GII e em 2 do GIII, devido desgaste e irregularidade do material, permanecendo, então, estes grupos com 13, 11 e 13 animais, respectivamente. Aproximadamente 10 a 20 mg de cada amostra de tecido seco e delipidado foram submetidas a hidrólise ácida em 1 ml de HCL 6N por 18 horas a 118°C, em tubos de ensaio lacrados. O hidrolisado foi então diluído por adição

de 5.7 ml de água destilada e neutralizado com 1 ml de NaOH 6N. Resíduos insolúveis foram removidos por centrifugação a 3.000 rotações por 15 minutos. A hidroxiprolina foi analisada neste hidrolisado, segundo método colorimétrico. Os valores da concentração de colágeno no tecido de bexiga foram expressos em μg (microgramas) de hidroxiprolina por mg de tecido seco e delipidado, o processo técnico foi realizado conforme descrito anteriormente(17).

Análise Estatística. O estudo da associação da cultura de urina e também das contrações não inibidas, nos diferentes grupos, no início e no final da avaliação, foi realizado pelo teste de Mac Nemar. Foi utilizada a técnica da análise de variância para o modelo com um fator, complementada com o teste de Tukey para as comparações múltiplas entre pares de médias. O coeficiente de correlação linear de Pearson foi utilizado para a associação entre pares de variáveis. O *one-way* ANOVA também foi utilizado para a comparação de medidas entre grupos independentes, na avaliação da hidroxiprolina, assim como o teste de Bonferroni para comparações *pairwise* planejadas. Diferenças foram consideradas significativas para valor de $p < 0,05$ (18).

RESULTADOS

O peso corpóreo dos animais aumentou significativamente em todos os grupos no momento M2, não ocorrendo diferença significativa entre os grupos neste momento.

A obstrução parcial da bexiga (Grupos II e III) causou um aumento significativo do seu peso, quando comparado aos animais não obstruídos (Grupo I – 2,35 g, $p < 0,05$). Nos animais obstruídos, que receberam oxibutinina intravesical, notou-se um peso vesical significativamente menor em comparação aos que não receberam a droga (6,0 g vs. 9,61 g, $p < 0,05$).

A creatinina plasmática se manteve dentro dos níveis de normalidade, não ocorrendo alterações significativas após os procedimentos realizados.

Infecção urinária não esteve presente em nenhum animal do GI, mas esteve presente em 80% no grupo GII e em 40% no GIII, no momento M1. No M2, dos animais do GI 13% tiveram infecção de urina, em 93% no GII e em 87% no GIII. Houve um aumento significativo de infecção urinária no grupo GIII (47%).

No grupo GII (com obstrução), a capacidade vesical máxima foi significativamente maior no momento final (M2) em relação ao M1 ($54,53 \pm 22,77$ ml vs. $35,13 \pm 13,60$ ml, $p < 0,01$). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nos diferentes momentos (Tab.1)

Na pressão máxima do detrusor não houve diferença estatística significativa entre os grupos nos diferentes momentos.

A complacência vesical foi significativamente maior nos animais com OPB tratados com oxibutinina intravesical (GIII) no momento M2 quando comparado com M1 ($7,19 \pm 4,20$ vs. $4,67 \pm 3,33$ ml/cmH₂O). Não houve diferença estatística entre os grupos GI e GII nos diferentes momentos (Tab.2).

No momento M2 foi detectada contração involuntária do detrusor (CID) em todos os animais de GII, em 47% de GIII e nenhum de GI ($p < 0,05$).

A fibra muscular foi significativamente mais espessa no grupo obstruído (GII) em relação aos grupos GI e GIII ($180,2 \pm 33,2$ μm vs. $126,8 \mu\text{m} \pm 27,3$ e $133,1 \mu\text{m} \pm 41,2$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos GI e GIII.

A densidade de colágeno foi significativamente maior nos animais do grupo controle em relação aos grupos GII e GIII ($461807,1 \pm 118695,3$ μm^2 vs. $269637,9 \mu\text{m}^2 \pm 147046,2$ e $292879,7 \mu\text{m}^2 \pm 106548,9$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos GII e GIII.

A concentração bioquímica de colágeno foi significativamente menor nos grupos GII e GIII em comparação com GI (Fig.2).

O percentual de fibras do sistema elástico seja na lâmina própria ou na camada muscular foi significativamente menor no grupo GI em relação aos grupos GII e GIII (Tab. 3, Fig. 3).

Na análise da associação linear entre as variáveis, observamos uma correlação negativa entre a concentração de colágeno comparado ao percentual de fibra elástica, seja na lamina própria ou na camada muscular, e espessura da fibra muscular (coeficiente da correlação = -0,349, -0,457 e -0,417, respectivamente, $p < 0,05$). Houve uma correlação positiva entre o percentual de fibras do sistema elástico da lâmina própria e da camada muscular (coeficiente da correlação = 0,849, $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

No processo evolutivo de um paciente portador de HD secundária a uma OPB ou neuropatia, pode ocorrer progressiva perda da complacência vesical, diminuindo a capacidade e aumentando a pressão de armazenamento vesical (10,11,12). Assim, o tratamento seja do quadro obstrutivo ou da hiperatividade do detrusor deve ocorrer o mais precoce possível, antes da evolução para um processo de fibrose da bexiga.

Na análise do peso corporal dos animais houve um ganho de peso adequado em todos os grupos, demonstrando, assim, não ter havido interferência dos diferentes procedimentos realizados no desenvolvimento dos animais.

Neste experimento, após 4 semanas, o peso da bexiga foi significativamente maior nos animais dos grupos GII e GIII em relação ao GI. Entretanto, observamos um peso significativamente menor no grupo tratado com oxibutinina intravesical (GIII) em relação ao não tratado (GII). Demonstrando assim um possível efeito protetor da utilização da oxibutinina intravesical, tendo em vista que houve, também, desaparecimento da CID em 53% dos animais do GIII. O aumento do peso da bexiga tem sido descrito como uma alteração freqüente também em outros trabalhos com OPB, podendo estar relacionado ao aumento na espessura da parede vesical resultante de edema, dependendo do período de obstrução, e ainda pelas alterações do tecido conjuntivo e camada muscular, devido a hipertrofia e hiperplasia (6,7).

A creatinina sérica em nosso estudo esteve dentro de valores normais, nos diferentes grupos e momentos. Este fato demonstra que a função renal não foi comprometida nem devido aos procedimentos cirúrgicos ou alterações morfológicas e funcionais da bexiga.

O aumento significativo de infecção urinária no grupo GIII, sugere que a OPB e a manipulação pela passagem da sonda, para aplicação da oxibutinina intravesical, são prováveis fatores de risco para infecção urinária. Todos os animais foram tratados previamente com trimethopim intramuscular, a fim de evitar interferência deste fator na análise funcional e estrutural da bexiga. Embora estudo anterior tenha mostrado que a alteração do pH urinário e a presença de infecção não influenciem na absorção da droga (19).

O estudo cistométrico mostrou aumento significativo da capacidade vesical máxima no grupo GII, quando comparados M1 e M2, decorrente provavelmente do processo obstrutivo, como demonstrado também por Matsumoto et al (20), após 3 semanas de obstrução parcial da bexiga.

No presente trabalho, não observamos alteração significativa da pressão máxima do detrusor entre os diferentes momentos nos grupos estudados. Quanto à complacência vesical, a mesma foi significativamente maior nos animais submetidos à oxibutinina intravesical (GIII) no momento M2 em relação ao M1, devido à ação protetora da droga (3).

Após 4 semanas de tratamento com oxibutinina intravesical (M2) as contrações involuntárias do detrusor desapareceram em 57% dos animais em

GIII, demonstrando a efetividade da oxibutinina intravesical. Em M2, todos os animais mantiveram CID no GII, sugerindo que este é um bom modelo experimental de HD.

Na avaliação histomorfométrica foi observado que a espessura da fibra muscular estava aumentada em aproximadamente 42%, comparando os animais do GII com GI. Este achado está de acordo com os relatos de outros estudos (6,7). No GIII, a espessura das fibras musculares não foi diferente do grupo controle, sugerindo uma boa resposta ao tratamento com oxibutinina intravesical.

Trabalhos realizados por Uvelius & Mattiasson (7), assim como por Kim et al (21), demonstraram que em ratos com OPB foi observada diminuição na concentração de colágeno na parede vesical. Esta observação está de acordo com o presente estudo que também observou uma diminuição na concentração de colágeno na bexiga, tanto pela avaliação na dosagem de hidroxiprolina, quanto pela quantificação histomorfométrica, nos grupos GII e GIII. Kim et al (21) demonstraram uma diminuição do colágeno total da bexiga após desobstrução. Em nosso estudo, nos animais tratados com oxibutinina intravesical (GIII) a concentração de colágeno manteve-se semelhante ao grupo GII, embora a espessura das fibras musculares tenham sido semelhante ao grupo controle.

Cortivo et al (10) avaliando a bexiga de pacientes com OPB observaram um aumento no tecido elástico. Desta forma este estudo está de acordo com nossa série, que mostrou um aumento do tecido elástico na lâmina própria e camada muscular nos grupos GII e GIII. Por outro lado, outros autores

estudando pacientes com neuropatia e perda de complacência vesical mostraram um aumento na quantidade de colágeno e do tecido elástico (8,12). Em outros estudos, utilizando pacientes com quadro avançado de OPB devido hiperplasia benigna da próstata, observou-se um aumento na concentração de colágeno e fibras do sistema elástico (9,11).

Inui et al (22) estudando pacientes com hiperplasia benigna da próstata, sugerem que a obstrução incipiente da bexiga leva a uma redução do tecido conjuntivo em relação a camada muscular, porém, este aumenta tardiamente. Demonstrando haver uma correlação entre o tecido conjuntivo e o tempo de OPB (22).

Em nossa série, utilizando coelhos com OPB e HD sem alteração de complacência vesical, após 4 semanas, observamos uma diminuição na concentração de colágeno e aumento das fibras do sistema elástico, nos grupos obstruídos. Notamos no estudo da associação linear das variáveis uma correlação negativa entre o colágeno e as fibras elásticas, demonstrando que o aumento das fibras elásticas foi associado à diminuição do colágeno. Este fato deve-se provavelmente à maior necessidade de adaptação da bexiga frente ao processo obstrutivo e à função do sistema elástico.

No grupo GIII, houve uma melhora funcional da bexiga após a utilização da oxibutinina intravesical, demonstrando uma diminuição da espessura das fibras musculares em relação ao grupo não tratado com a droga,

provavelmente decorrente do desaparecimento das contrações involuntárias do detrusor.

Estudos adicionais são necessários para o melhor conhecimento das variações quantitativas na matriz extracelular durante a disfunção miccional devido aos processos obstrutivos da bexiga, assim como dos seus mecanismos regulatórios. A utilização de medicamentos, que bloqueiem este processo evolutivo, pode permitir a inversão ou mesmo interrupção à deterioração das propriedades estruturais da parede vesical.

CONCLUSÕES

A oxibutinina intravesical parece proteger a bexiga contra as alterações funcionais e estruturais da BH associada à OPB, assim como prevenir alterações do colágeno e das fibras do sistema elástico. Estudos futuros serão importantes para confirmar esses dados e avaliar a ação da oxibutinina intravesical em bexigas com baixa complacência e maior tempo de obstrução.

REFERÊNCIAS

1. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U et al: The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the standardization sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn.* 2002; 21:167-78.
 2. Hyman M, Groutz A, Blaivas J: Detrusor instability in men: correlation of lower urinary tract symptoms with urodynamic findings. *J Urol.* 2001; 166(2): 550-2.
 3. Lose G, Norgaard JP: Intravesical oxybutynin for treating incontinence resulting from an overactive detrusor. *BJU Int.* 2001; 87(9):767-73.
 4. Yarker YE, Goa KL, Fitton A: Oxybutynin: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic use in detrusor instability. *Drugs & Aging.* 1995; 6:243-62.
 5. Landau EH, Fung LCT, Thorner PS, Mittelman MW, Jayanthi VR, Churchill BM et al: Histologic studies of intravesical oxybutynin in the rabbit. *J Urol.* 1995; 153 (6):2022-4.
 6. Amaro JL, Balasteghin KT, Padovani CR, Montenegro R: Structural alterations of the bladder induced by detrusor instability. Experimental study in rabbits. *Int Braz J Urol.* 2005; 31 (6):579-86.
 7. Uvelius B, Mattiasson A: Collagen content in the rat urinary bladder subjected to intravesical outflow obstruction. *J Urol.* 1984; 132:587.
 8. Ewalt DH, Howard PS, Blyth B, Snyder HM3rd, Duckett JW, Levin RM et al: Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? *J Urol.* 1992; 148 (2 pt 2):544-9.
 9. Rubinstein M, Sampaio FJ, Costa WS: Stereological study of collagen and elastic system in the detrusor muscle of bladders from controls and patients with infravesical obstruction. *Int Braz J Urol.* 2007; 33 (1):33-41.
-

10. Cortivo R, Pagano F, Passerini G, Abatangelo G, Castellani I: Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. *Br J Urol.* 1981; 53 (2):134-7.
 11. Collado A, Batista E, Gelabert-Más A, Corominas JM, Arañó P, Villavicencio H: Detrusor quantitative morphometry in obstructed males and controls. *J Urol.* 2006; 176(6):2722-8.
 12. Landau EH, Jayanthi VR, Churchill BM, Shapiro E, Gilmour RF, Khoury AE et al: Loss of elasticity in dysfunctional bladders: urodynamic and histochemical correlation. *J Urol.* 1994; 152:702-5.
 13. Balasteghin KT, Nardo AM, Amaro JL, Padovani CR: Experimental model of bladder instability in rabbits. *Int Braz J Urol.* 2003; 29:62-7.
 14. Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM: The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry.* 1982; 74:153-6.
 15. Weigert C: Über eine Method zur Färbung elastischer Fasern. *Zentralbl Allg Pathol Anat.* 1898; 9:289-92.
 16. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K et al: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988; 96:379-94.
 17. Cabral CAP, Sampaio FJB, Cardoso LEM: Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycan and collagen as a consequence of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J Urol.* 2003; 170:2512-6.
 18. Zar JH: *Biostatistical analysis.* 4th ed. New Jersey, Prentice-Hall. 1999.
 19. Buyse G, Waldek K, Verpoorten C, Bjork H, Casaer P, Andersson KE: Intravesical oxybutynin for neurogenic bladder dysfunction: less systemic side effects due to reduced first pass metabolism. *J Urol.* 1998; 160:892-6.
-

20. Matsumoto S, Chichester P, Kogan BA, Levin RM: Structural and vascular response of normal and obstructed rabbit whole bladders to distension. *Urology*. 2003; 62:1129-33.
 21. Kim JC, Yoon JY, Seo SI, Hwang TK, Park YH: Effects of partial bladder outlet obstruction and its relief on types I and III collagen and detrusor contractility in the rat. *Neurourol Urodyn*. 2000; 19(1):29-42.
 22. Inui E, Ochiai A, Nasa Y, Ukimura O, Kojima M. Comparative morphometric study of bladder detrusor between patients with benign prostatic hyperplasia and controls. *J Urol*. 1999; 161:827-30.
-

FIGURAS E TABELAS

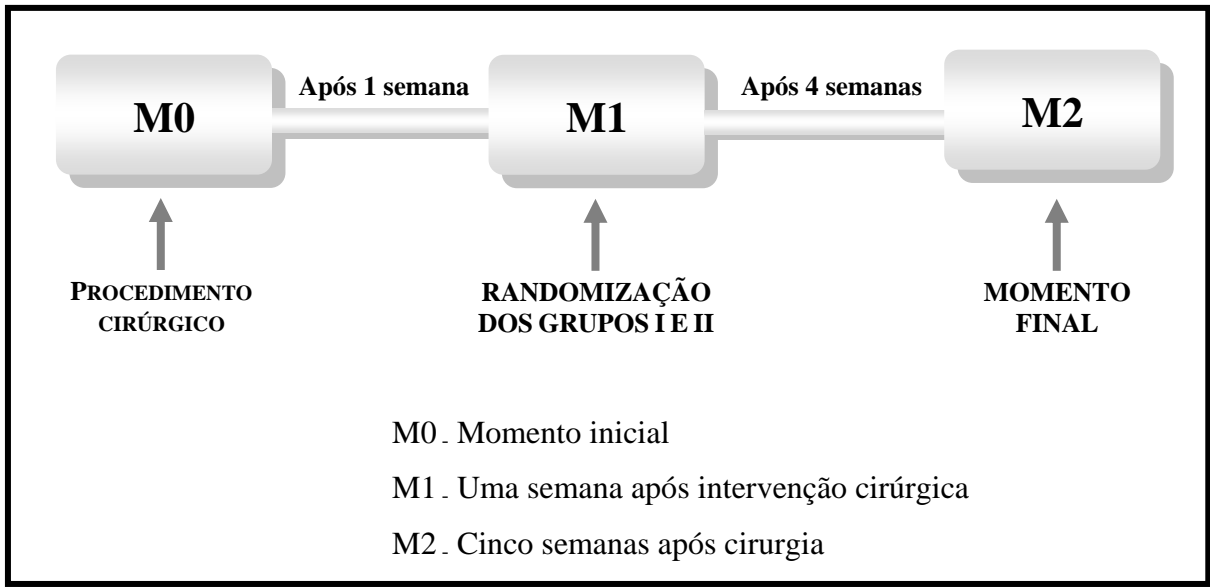


Figura 1 – Diferentes momentos do estudo experimental.

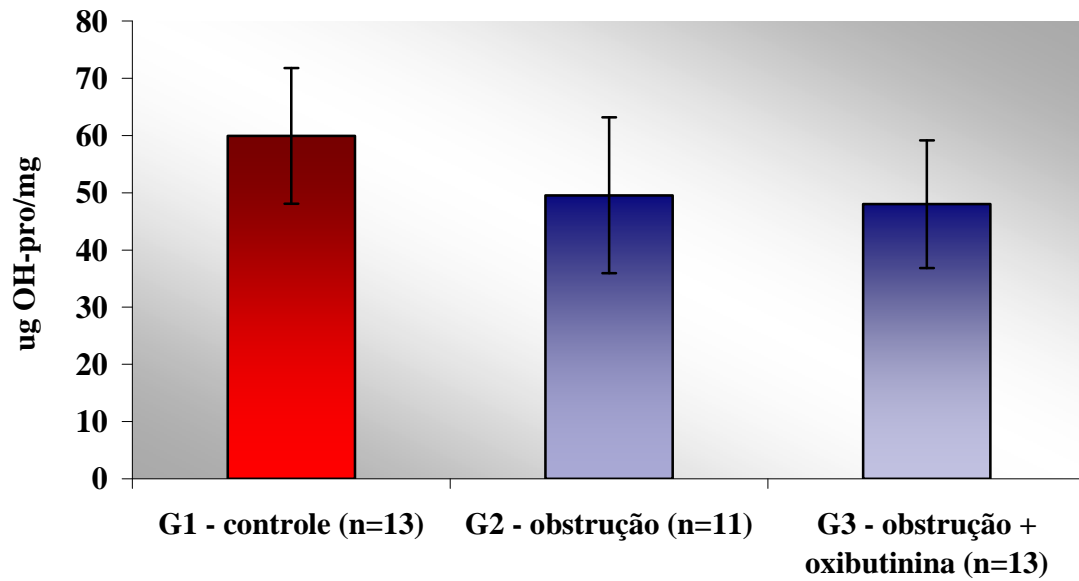


Figura 2- Concentração vesical de colágeno, expressa como μg de hidroxiprolina por mg de tecido seco, após 4 semanas de tratamento (M2). Média e desvio padrão segundo o grupo.

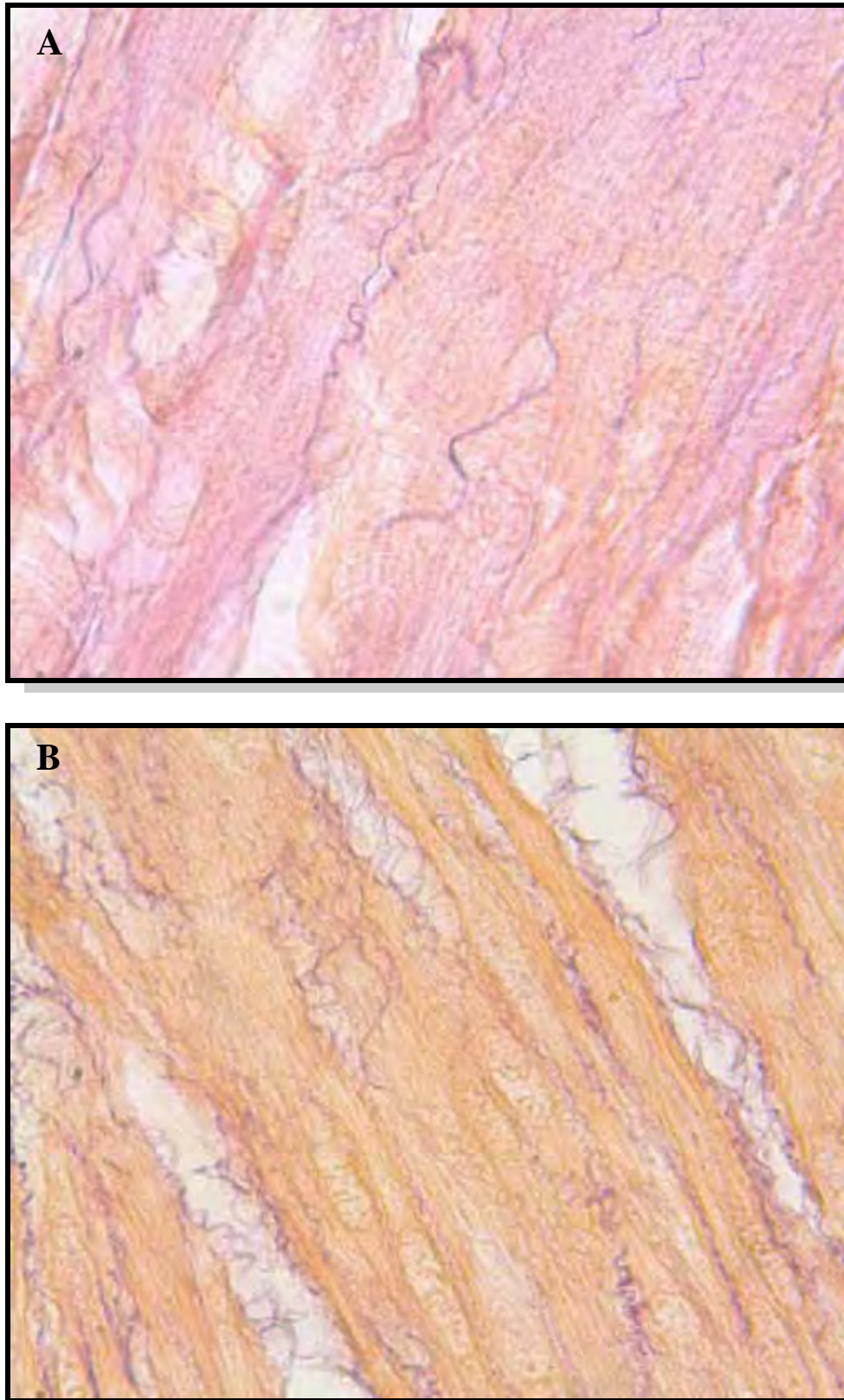


Figura 3: Coloração de Resorcina - Fucsina de Weigert da secção de detrusor demonstrando a quantidade de fibras elásticas no grupo controle (A) e nos animais com obstrução parcial da bexiga (grupo GII) (B), x1000.

Tabela 1: Capacidade vesical máxima (ml) nos 3 grupos experimentais nos diferentes momentos. Diferentes letras maiúsculas indicam que os grupos foram significativamente diferentes em um mesmo momento ($p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas indicam que os momentos foram significativamente diferentes em um mesmo grupo.

Grupo	M1	M2	Resultado do teste estatístico entre os momentos
GI	36,13 ± 24,78 Aa	42,33 ± 21,01 Aa	p>0.05
GII	35,13 ± 13,60 Aa	54,53 ± 22,77 Ab	p<0.05
GIII	49,87 ± 17,02 Aa	51,40 ± 22,73 Aa	p>0.05
Resultado do teste estatístico entre os grupos	p>0.05	p>0.05	

Tabela 2: Complacência vesical (ml/cmH₂O) nos 3 grupos experimentais nos diferentes momentos. Diferentes letras maiúsculas indicam que os grupos foram significativamente diferentes em um mesmo momento ($p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas indicam que os momentos foram significativamente diferentes em um mesmo grupo.

Grupo	M1	M2	Resultado do teste estatístico entre os momentos
GI	2,79 ± 1,47 Aa	3,40 ± 1,71 Aa	p>0.05
GII	2,81 ± 2,10 Aa	2,83 ± 1,67 Aa	p>0.05
GIII	4,67 ± 3,33 Aa	7,19 ± 4,20 Ab	p<0.05
Resultado do teste estatístico entre os grupos	p>0.05	p>0.05	

Tabela 3: Média e desvio padrão do percentual (%) de fibras do sistema elástico (FSE) na lâmina própria (LP) e camada muscular (CM) nos diferentes grupos no momento M2. Diferentes letras maiúsculas indicam que os grupos foram significativamente diferentes em um mesmo momento ($p < 0,05$).

	GI (n=15)	GII (n=14)	GIII (n=15)	Resultado do teste estatístico
FSE na LP	15,3±3,4 A	26,2±6,1 B	24,5±5,1 B	$p < 0,05$
FSE na CM	13,9±3,3 A	27,9±6,4 B	28,2±4,5 B	$p < 0,05$

*C
a
p
í
t
u
l
a*

Manuscrito 2

*Collagen and elastic system
changes induced by detrusor
overactivity in rabbits.*

The action of oxybutynin

99

AUTHORS: **ARMANDO POLIDO JÚNIOR**, Post Graduate Department of Urology, School of Medicine, UNESP, Botucatu, Brazil.

JOSÉ MATEUS DA COSTA, Student of Medicine, Department of Urology, School of Medicine, UNESP, Botucatu, Brazil.

TÂNIA MUNHOZ, Student of Medicine, Department of Urology, School of Medicine, UNESP, Botucatu, Brazil.

FRANCISCO JOSÉ SAMPAIO, Full - Professor, Urogenital Research Unit, School of Medicine, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil.

LUIZ EDUARDO DE MACEDO CARDOSO, Associate - Professor, Urogenital Research Unit, School of Medicine, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil.

JOÃO LUIZ AMARO, Associate Professor, Department of Urology, School of Medicine, UNESP, Botucatu, Brazil.

CORRESPONDENCE : Armando Polido Júnior

Instituto de Urologia de São Carlos, Avenida Dr.

Carlos Botelho nº 1222,

Vila Pureza, CEP – 13561-003

São Carlos, São Paulo, Brasil

Telefone / Fax: 00 55 (16) 3372-7163

E-mail: armandopj@terra.com.br

No conflict of interest

ABSTRACT

Objectives: The present study aims to evaluate the histopathological and histomorphometric changes of collagen and fibers of the elastic system in the bladder, using an experimental model of detrusor hyperactivity (DH) in rabbits with partial bladder outlet obstruction (PBOO) that underwent intravesical oxybutynin. **Material and Methods:** Forty-five North Folk male rabbits, weighting on average 2,207.4 g, were randomly divided into 3 groups. Group GI: controls (n=15), in which there was no surgical intervention; the remaining animals were submitted to PBOO, at M0 moment, as previously described by Balasteghin. 29 of the animals developed DH, verified by a cystometric study conducted one week after surgery, at M1 moment, and were randomly divided into group GII (n=14) and group GIII - PBOO + intravesical oxybutynin (n=15, 0.5 mg/kg body weight, daily for 28 days). One animal was excluded because it did not develop DH. Serum creatinine, urine culture, and cystometric study were performed on all animals one week after PBOO (M1) and 5 weeks after PBOO (M2), when the animals were sacrificed. Diameter of muscle fiber was measured on HE-stained bladder sections and is given in μm . Sections were also stained by Picro-Sirius Red technique for evidencing collagen and by Weigert's Fuchsin-Resorcin for characterizing the elastic system fibers. The morphometric analyses were carried out using the program Pro- Image Plus and Image J. The biochemical collagen concentration in the bladder wall was determined by a hydroxyproline assay and was expressed as μg hydroxyproline per mg dry, defatted tissue. **Results:** After 4 weeks, bladder weight was significantly higher in animals from GII and GIII as compared to GI (9.61 ± 5.36 and 6.00 ± 2.18 vs 2.35 ± 0.55 , respectively). In the obstructed animals, which received intravesical

oxybutynin, a significantly lower bladder weight was noted when compared to those that did not receive the drug. Creatinine levels remained normal throughout. Cystometric study revealed that vesical capacity was significantly higher in GII at M2 compared to M1 (35.13 ± 13.60 vs 54.53 ± 22.77), no statistical difference was observed between GI and GIII groups. Maximum detrusor pressure showed no statistical difference between M1 and M2 for all groups. Bladder compliance was significantly higher in animals using intravesical oxybutynin in moments M2 as compared to M1. There was no statistical difference in groups GI and GII in different moments. In moment M2, all animals of GII was detected detrusor involuntary contraction (DIC), in 47% at GIII and none in GI. The muscle fiber was significantly thicker in the obstructed group (GII) with regards to GI and GIII ($180.2 \pm 33.2 \mu\text{m}$ vs. $126.8 \mu\text{m} \pm 27.3$ and $133.1 \mu\text{m} \pm 41.2$). There was no statistically significant difference between the GI and GIII groups. The collagen density was significantly higher in the control group animals with relation to the groups GII and GIII ($461,807.1 \pm 118,695.3 \mu\text{m}^2$ vs. $269,637.9 \mu\text{m}^2 \pm 147,046.2$ and $292,879.7 \mu\text{m}^2 \pm 106,548.9$). There was no statistically significant difference between the GII and GIII groups. Elastic fibers quantification (area density) was significantly higher in GII and GIII as compared to control group. Collagen biochemical concentration in GIII was not different from that of GII (48.00 ± 11.16 vs 49.56 ± 13.63). However, comparing these two groups against G1 (59.93 ± 11.84) showed that BOO caused a ~18% decrease in vesical collagen content ($p < 0.05$). **Conclusions:** The intravesical oxybutynin seems to protect the bladder against functional alterations due to PBOO as well as to prevent collagen and elastin alteration.

KEY WORDS: Rabbit; Collagen; Partial bladder outlet obstruction; Intravesical oxybutynin; Elastic system.

INTRODUCTION

Overactive bladder (OAB) can be caused by several factors such as partial bladder obstruction, aging or neurological diseases. It is clinically characterized by symptoms such as frequency, nocturia and urgency, with or without urinary incontinence, and may involve important psychosocial implications, including repercussions on the upper urinary tract (1). Urodynamic study often indicate detrusor hyperactivity (DH), as estimated in more than 50% of men with partial bladder outlet obstruction (PBOO), due to benign prostatic hyperplasia and OAB symptoms (2).

The clean intermittent catheterization associated with intravesical oxybutynin has been used efficiently for the treatment of DH, especially in patients with significant side effects from the use of oral anticholinergic and already requiring intermittent catheterization, as patients with neurogenic bladder and spinal cord injury, or children with myelomeningocele (3). Oxybutynin has been shown to block the muscarinic receptors in the bladder, also related to a direct relaxing effect of the detrusor muscle and local anesthetic, thereby reducing the frequency of involuntary detrusor contractions and thus improving the OAB symptoms (4). The administration of intravesical oxybutynin can decrease adverse effects, hence improving its clinical effectiveness, although histomorphometric changes resulting from their use are not well established (5,6).

Morphological alterations are often associated with partial bladder outlet obstruction (PBOO), including progressive hypertrophy of the smooth bladder muscle, and changes related to collagen and fibers of the elastic system (7,8,9).

The mechanical properties of the bladder wall depend on the resistance, viscosity and elasticity of the detrusor muscle and connective tissue. The most important components of the connective tissue are the elastic system fibers and collagen, and related to vesical compliance (8,10). An abnormal increase in the amount of collagen and fibers of the elastic system commonly occurs in most congenital or acquired obstructive uropathy, possibly leading to a loss of strength and elasticity of the bladder wall, hence developing into a tissue fibrosis (10,11). The end result of such increase is low compliance, reduced bladder capacity and high storage pressure, which may be related to the occurrence of detrusor hyperactivity (2,12).

This study aims to evaluate the histopathological and histomorphometric changes of collagen and fibers of the elastic system in the bladder, using an experimental model of DH in rabbits with PBOO that underwent intravesical oxybutynin.

MATERIALS AND METHODS

Animals. After approval by the Ethics Commission in Animal Experiments in the Universidade Estadual Paulista, 45 North Folk male rabbits, weighing between 1700g and 3200g, were randomly divided into three groups. Group 1 (GI, n=15), there was no surgical intervention for this group; the animals were used as clinical control, cystometric and structural parameters of normality. The remaining animals were submitted to partial bladder outlet obstruction, at M0 (Fig.1), using a previously described technique (13). First, a polyethylene adjustable bracelet was implanted by open surgery around the bladder neck, without pressing the urethra, previously catheterized with a 10 Fr Foley catheter and removed after the procedure. For the surgical procedure, intramuscular ketamine and xylazine general anesthesia was performed. 29 of the animals developed detrusor hyperactivity (DH), verified by a cystometric study conducted one week after surgery, at M1 moment (Fig. 1), and were randomly divided into group 2 (GII, n=14) and group 3 (GIII, n=15). One animal was excluded because it did not develop DH.

One week after surgery (M1) the GIII animals began to receive intravesical instillation of 0.5 mg/kg of liquid oxybutynin, once a day for 4 weeks. The bladder was emptied with a 10 Fr catheter, which was promptly removed after drug instillation. The oxybutynin remained in the bladder until spontaneous emptying.

Urine culture, serum creatinine, and cystometric evaluation were performed in all animals one week after surgery (M1) and 5 weeks after surgery (M2). Animals with positive urine culture at M1 were treated with 1 mg/kg/day of intramuscular trimethopim.

Cystometric Evaluation. This was performed using the Urobyte™ 5000 computerized urodynamics system. During examination the vigil animals were placed in wooden cages, with the extremities held by cotton strings. The intravesical pressure was measured with a 10 Fr double lumen catheter and the intra-abdominal pressure by means of a rectal balloon catheter, at the beginning of the procedure the urine was collected in a sterile tube for culture. The cystometric study was conducted as previously published (6,13). The maximum bladder capacity, maximum detrusor pressure and bladder compliance were determined for each rabbit. DH was considered when involuntary detrusor contractions with low vesical volume were observed, causing or not simultaneous urinary loss.

The animals were sacrificed 5 weeks after surgery (M2), the bladders were removed and weighed immediately using a precision digital scale. After removing the bladders, the material was fixed in buffered formalin solution of 10% for 48 to 72 hours, and subsequently submitted to routine histologic processing for inclusion in paraffin.

Morphometric Quantification. The paraffin blocks with the bladder tissue were cut in 5 µm thickness, obtaining cross-sections of the bladder wall.

These sections were stained using the Hematoxylin and Eosin (HE) techniques to measure the muscle fibers, Picrosirius red to indicate the collagen (14) and Weigert's Resorcinol-Fuchsin with prior oxone 10% oxidation to characterize the elastic system fibers (15).

After sectioning the bladder and stained using HE, the images were scanned at x250 using a video camera coupled to an optical microscope (LEICA DMLB) and a computer with a colored monitor screen. The transversal measure of the muscle fiber (μm) was performed in five random fields using the Pro-Image Plus morphometry program.

For the quantification of the collagen fibers, after sectioning the bladder and attained by the Picrosirius Red method, the images were scanned (x100) using a video camera coupled to an optical microscope (LEICA - DMLB). Four random fields were analyzed for each animal and the surface area occupied by collagen fibers in each field (μm^2) was measured, using the Pro-Image Plus morphometry program.

In the assessment of the elastic system fibers, after sectioning 3 different areas of the bladder and stained using the Weigert's Fuchsin- Resorcin, 3 fields of the lamina propria and 3 others from the muscle layer were randomly analyzed, totaling 18 fields in each animal. The field images were scanned (x1,000) using a video camera coupled to an optical microscope (LEICA). The Image J version 1.4 software program (NIH, Bethesda, USA) was used to generate a grid of 100 points-crosses, which were juxtaposed to the previously

scanned photograph. The area density of the elastic system fibers was quantified by the number of points obtained in the system (test-grid system) and expressed as a percentage of the reference space, as described (16).

Biochemical determination of the collagen concentration. First, the bladder tissue samples were fixed in acetone for 24 hours at 4C. Then, the tissue was cleaved into smaller pieces (approximately 2x2 mm), which were defatted in two 24-hour changes each in chloroform-methanol solution (2:1, volume/volume), at room temperature. The solvent was decanted and after incubation at 60°C for 30 minutes the dry and defatted preparation of the bladder was obtained, which was then weighed (17). However, it was not possible to recover enough material to analyze in 2 animals of the control group, 3 animals of the GII and 2 of the GIII , because of the material's wear and irregularity, thus remaining groups of 11 and 13 animals, respectively. Approximately 10 to 20 mg of each dry and defatted tissue sample were subjected to acid hydrolysis in 1 ml of HCl 6N for 18 hours at 118°C, in sealed test tubes. The hydrolysis was then diluted by adding 5.7 ml of distilled and neutralized water with 1 ml NaOH 6N. The insoluble residues were removed by centrifugation at 3,000 rpm for 15 minutes. The hydroxyproline was analyzed in this hydrolyzate, in agreement with the colorimetric method. The values of the collagen concentration in the bladder tissue were expressed as µg (micrograms) of hydroxyproline per mg of dry and defatted tissue; the technical process was conducted as aforementioned (17).

Statistical Analysis. The study of the urine culture combination and also of the non-inhibited contractions in the different groups, at the beginning and end of the evaluation, was performed with the Mac Nemar test. The one-factor analysis of variance (ANOVA) mode was used, together with the Tukey test for multiple comparisons between all pairs of averages. The Pearson correlation coefficient was used for the association between pairs of variables. The one-way ANOVA was also used to compare measures between independent groups, in the assessment of hydroxyproline, as well as Bonferroni's test for planned pairwise comparisons. Differences were considered significant for $p < 0.05$ value (18).

RESULTS

The animals' body weight increased significantly in all groups at M2 and at this time there was no significant difference between groups.

The PBOO (Groups II and III) caused a significant weight increase of the bladder, when compared to the non-obstructed animals (Group I - 2.35 g, $p < 0.05$). In the obstructed animals, which received intravesical oxybutynin, a significantly lower bladder weight was noted when compared to those that did not receive the drug (6.0 g vs. 9.61 g, $p < 0.05$).

The plasmatic creatinine remained within the normal levels, without any significant changes after the performed procedures.

Urinary tract infection was not found in any animal of GI, but was present in 80% of group GII and 40% in GIII, at M1.

At M2, 13% of the GI animals had urinary tract infection, 93% in GII and 87% in GIII. There was a significant urinary infection increase in group GIII (47%).

In group GII (with partial obstruction), the maximum bladder capacity was significantly higher at the last moment (M2) with relation to M1 (54.53 ± 22.77 ml vs. 35.13 ± 13.60 ml, $p < 0.01$). There was no statistically significant difference between the groups at different times (Tab.1)

For the maximum detrusor pressure there was no statistically significant difference between groups at different times.

The bladder compliance was significantly higher in animals with partial bladder outlet obstruction treated with intravesical oxybutynin (GIII) at M2, when compared to M1 (7.19 ± 4.20 vs. 4.67 ± 3.33 ml/cmH₂O). There was no statistical difference between the GI and GII groups at different times (Table 2).

At M2 involuntary detrusor contraction (IDC) was detected in all the animals of GII, in 47% of GIII and none in GI ($p < 0.05$).

The muscle fiber was significantly thicker in the obstructed group (GII) with regards to GI and GIII (180.2 ± 33.2 μm vs. $126.8 \mu\text{m} \pm 27.3$ and $133.1 \mu\text{m} \pm 41.2$). There was no statistically significant difference between the GI and GIII groups.

The collagen density was significantly higher in the control group animals with relation to the groups GII and GIII ($461,807.1 \pm 118,695.3$ μm^2 vs. $269,637.9 \mu\text{m}^2 \pm 147,046.2$ and $292,879.7 \mu\text{m}^2 \pm 106,548.9$). There was no statistically significant difference between the GII and GIII groups.

The biochemical collagen concentration was significantly lower in groups GII and GIII, when compared to GI (Fig.2).

The percentage of the elastic system fibers, whether in the lamina propria or in the muscle layer, was significantly lower in the GI group compared to GII and GIII (Tab.3, Fig.3).

In the linear association analysis between variables, we observed a negative correlation between the collagen concentration when compared to the percentage of elastic fiber, whether in the lamina propria or the muscle layer and muscle fiber thickness (the correlation coefficient = -0.349, -0.457 and -0.417, respectively, $p < 0.05$). There was a positive correlation between the percentage of elastic system fibers of the lamina propria and the muscle layer (the correlation coefficient = 0.849, $p < 0.05$)

DISCUSSION

The onset and progression of DH in a patient, which is second to a partial bladder obstruction or neuropathy, can cause gradual loss of bladder compliance, hence reducing the capacity and increasing the storage bladder pressure (10,11,12). Accordingly, the treatment for obstruction or for detrusor hyperactivity should occur as early as possible, before progressing to a bladder fibrosis process.

In the analysis of the animals' body weight there was an adequate weight gain in all groups, thus demonstrating that there was no interference from the different procedures performed regarding the animals' development.

In this experiment, after 4 weeks, the bladder weight was significantly higher in the animals of groups GII and GIII with regards to GI. However, we observed a significantly lower weight in the group treated with intravesical oxybutynin (GIII) compared to the untreated group (GII). Thus demonstrating that intravesical oxybutynin has a possible protective effect, in view of the fact that IDC also disappeared in 53% of the animals in GIII. Increased weight of the bladder has also been described as a frequent change in other studies on partial bladder obstruction, and may be related to an increased bladder wall thickness due to edema, depending on the length of time of obstruction, and also to changes in the conjunctive tissue and muscle layer, due to hypertrophy and hyperplasia (6,7).

In our work the serum creatinine was within normal values in the different groups and moments. This fact shows that the renal function was not compromised due to the surgical procedures or due to morphological and functional changes of the bladder.

The significant urinary infection increase in group GIII suggests that the PBOO and manipulation of the catheter to apply intravesical oxybutynin are probable risk factors for urinary tract infection. All animals were treated with intramuscular trimethoprim to avoid the interference of this factor in the functional and structural analysis of the bladder. Although a previous study has shown that the change in urinary pH and the presence of infection do not influence the absorption of the drug (19).

The cystometric study showed significant increase of the maximum bladder capacity in group GII, when compared to M1 and M2, probably due to the obstruction process, as also demonstrated by Matsumoto et al (20), after 3 weeks of partial bladder obstruction.

In this study, no significant change in the maximum detrusor pressure was found between the different moments in the groups. As for bladder compliance, it was significantly higher in animals subjected to intravesical oxybutynin (GIII) at M2 when compared to M1, due to the protective action of the drug (3).

After 4 weeks of treatment with intravesical oxybutynin (M2) involuntary detrusor contractions disappeared in 57% of the animals in GIII,

demonstrating the effectiveness of intravesical oxybutynin. At M2, all the animals retained IDC in GII, thus suggesting that this is a good experimental model of DH.

In the histomorphometric assessment, it was observed that the muscle fiber thickness had increased by approximately 42%, comparing the animals of GII to GI. This finding is in line with the information reported by other studies (6,7). In GIII, the thickness of the muscle fibers was not different from the control group, suggesting a good response to the treatment with intravesical oxybutynin.

Studies by Uvelius & Mattiasson (7) and by Kim et al (21) showed that in rats with PBOO, a decreased collagen concentration in the bladder wall was observed. Such observation is in agreement with the present study that also noted a decreased collagen concentration in the bladder, both for assessment of the hydroxyproline dosage, as well as by the histomorphometric quantification in groups GII and GIII.

Kim et al (21) showed a decrease in total bladder collagen after desobstruction. In our study, for the animals treated with intravesical oxybutynin (GIII), the concentration of collagen remained similar to that of group GII, although the muscle fiber thickness was similar to that of the control group.

Evaluating the bladder of patients with PBOO, Cortivo et al (10) observed an increase in the elastic tissue. Thus, that study is consistent with our series, which showed an increase of the elastic tissue in the lamina propria and

muscle layer in groups GII and GIII. On the other hand, other authors (8,12) after studying patients with neuropathy and loss of bladder compliance, showed an increase in the amount of collagen and elastic tissue. In other studies, using patients with advanced PBOO due to benign prostatic hyperplasia, an increase in concentrations of collagen and elastic system fibers was observed (9,11).

Inui et al (22), studying patients with benign prostatic hyperplasia, suggest that an incipient bladder obstruction leads to a reduction of the connective tissue in relation to the muscle layer, however, this usually increases later. Thus, demonstrating a correlation between the connective tissue and the obstruction duration (22).

In our series, using rabbits with partial bladder outlet obstruction and DH without bladder compliance change, a collagen concentration decrease and an increase of the elastic system fibers was observed after 4 weeks in the obstructed groups.

In the study of linear association between variables, we observed a negative correlation between the collagen and elastic fibers, demonstrating that the increase of elastic fibers was related to the reduction of collagen. This is probably due to the bladder's considerable need to adapt, given the obstruction process, as well as the function of the elastic system.

There was a functional bladder improvement in the GIII group after using intravesical oxybutynin, showing a decrease in the muscle fiber thickness,

when compared to the group not treated with the drug, probably due to the disappearance of involuntary detrusor contractions.

Further studies are needed for a better understanding of the quantitative changes in the extracellular matrix during voiding dysfunction due to obstructive bladder dysfunction, as well as their regulatory mechanisms. The use of drugs that block this developing process may enable reversal or even interruption of the deterioration of the structural properties of the bladder wall.

CONCLUSIONS

Intravesical oxybutynin seems to protect the bladder against functional and structural changes of OAB associated to PBOO, and also prevent changes of the collagen and elastic system fibers. Future studies will be important to confirm these data and to assess the effect of intravesical oxybutynin in bladders with low compliance and longer obstruction time.

REFERENCES

1. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U et al: The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the standardization sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn.* 2002; 21:167-78.
 2. Hyman M, Groutz A, Blaivas J: Detrusor instability in men: correlation of lower urinary tract symptoms with urodynamic findings. *J Urol.* 2001; 166(2): 550-2.
 3. Lose G, Norgaard JP: Intravesical oxybutynin for treating incontinence resulting from an overactive detrusor. *BJU Int.* 2001; 87(9):767-73.
 4. Yarker YE, Goa KL, Fitton A: Oxybutynin: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic use in detrusor instability. *Drugs & Aging.* 1995; 6:243-62.
 5. Landau EH, Fung LCT, Thorner PS, Mittelman MW, Jayanthi VR, Churchill BM et al: Histologic studies of intravesical oxybutynin in the rabbit. *J Urol.* 1995; 153 (6):2022-4.
 6. Amaro JL, Balasteghin KT, Padovani CR, Montenegro R: Structural alterations of the bladder induced by detrusor instability. Experimental study in rabbits. *Int Braz J Urol.* 2005; 31 (6):579-86.
 7. Uvelius B, Mattiasson A: Collagen content in the rat urinary bladder subjected to intravesical outflow obstruction. *J Urol.* 1984; 132:587.
 8. Ewalt DH, Howard PS, Blyth B, Snyder HM3rd, Duckett JW, Levin RM et al: Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? *J Urol.* 1992; 148 (2 pt 2):544-9.
 9. Rubinstein M, Sampaio FJ, Costa WS: Stereological study of collagen and elastic system in the detrusor muscle of bladders from controls and patients with infravesical obstruction. *Int Braz J Urol.* 2007; 33 (1):33-41.
-

10. Cortivo R, Pagano F, Passerini G, Abatangelo G, Castellani I: Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. *Br J Urol.* 1981; 53 (2):134-7.
 11. Collado A, Batista E, Gelabert-Más A, Corominas JM, Arañó P, Villavicencio H: Detrusor quantitative morphometry in obstructed males and controls. *J Urol.* 2006; 176(6):2722-8.
 12. Landau EH, Jayanthi VR, Churchill BM, Shapiro E, Gilmour RF, Khoury AE et al: Loss of elasticity in dysfunctional bladders: urodynamic and histochemical correlation. *J Urol.* 1994; 152:702-5.
 13. Balasteghin KT, Nardo AM, Amaro JL, Padovani CR: Experimental model of bladder instability in rabbits. *Int Braz J Urol.* 2003; 29:62-7.
 14. Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM: The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry.* 1982; 74:153-6.
 15. Weigert C: Über eine Method zur Färbung elastischer Fasern. *Zentralbl Allg Pathol Anat.* 1898; 9:289-92.
 16. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K et al: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988; 96:379-94.
 17. Cabral CAP, Sampaio FJB, Cardoso LEM: Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycan and collagen as a consequence of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J Urol.* 2003; 170:2512-6.
 18. Zar JH: *Biostatistical analysis.* 4th ed. New Jersey, Prentice-Hall. 1999.
 19. Buyse G, Waldek K, Verpoorten C, Bjork H, Casaer P, Andersson KE: Intravesical oxybutynin for neurogenic bladder dysfunction: less systemic side effects due to reduced first pass metabolism. *J Urol.* 1998; 160:892-6.
-

20. Matsumoto S, Chichester P, Kogan BA, Levin RM: Structural and vascular response of normal and obstructed rabbit whole bladders to distension. *Urology*. 2003; 62:1129-33.
 21. Kim JC, Yoon JY, Seo SI, Hwang TK, Park YH: Effects of partial bladder outlet obstruction and its relief on types I and III collagen and detrusor contractility in the rat. *Neurourol Urodyn*. 2000; 19(1):29-42.
 22. Inui E, Ochiai A, Nasa Y, Ukimura O, Kojima M. Comparative morphometric study of bladder detrusor between patients with benign prostatic hyperplasia and controls. *J Urol*. 1999; 161:827-30.
-

FIGURES AND TABLES

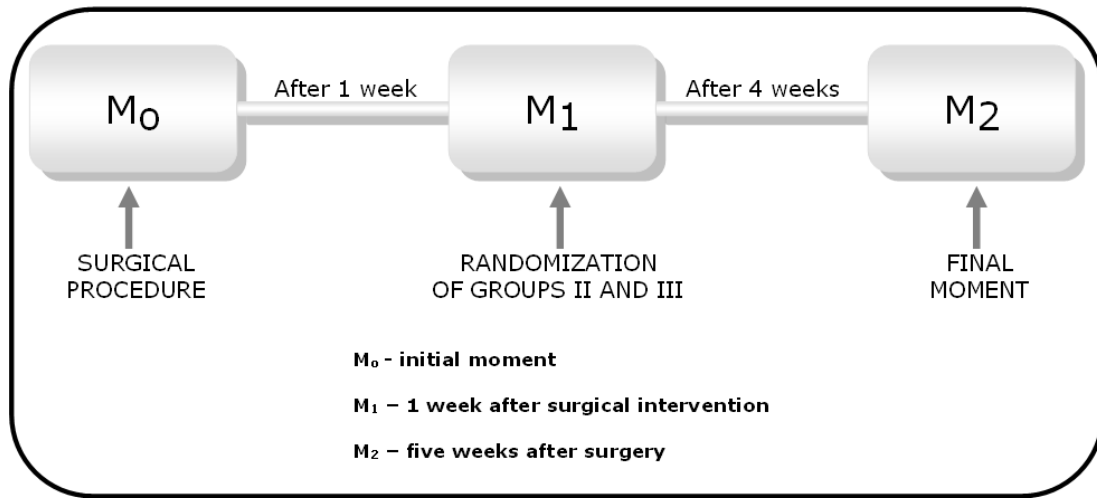


Figure 1: Different moments of the Experimental Study.

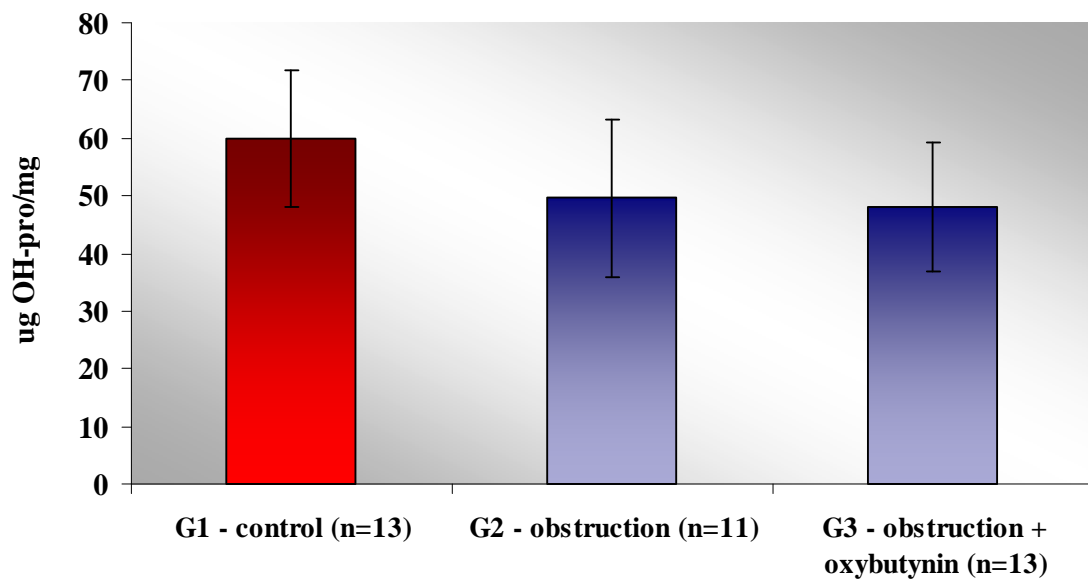


Figure 2: Concentration of bladder collagen, expressed as μg of hydroxyproline per mg of dry tissue after 4 weeks of treatment (M2). Mean and standard deviation according to the group.

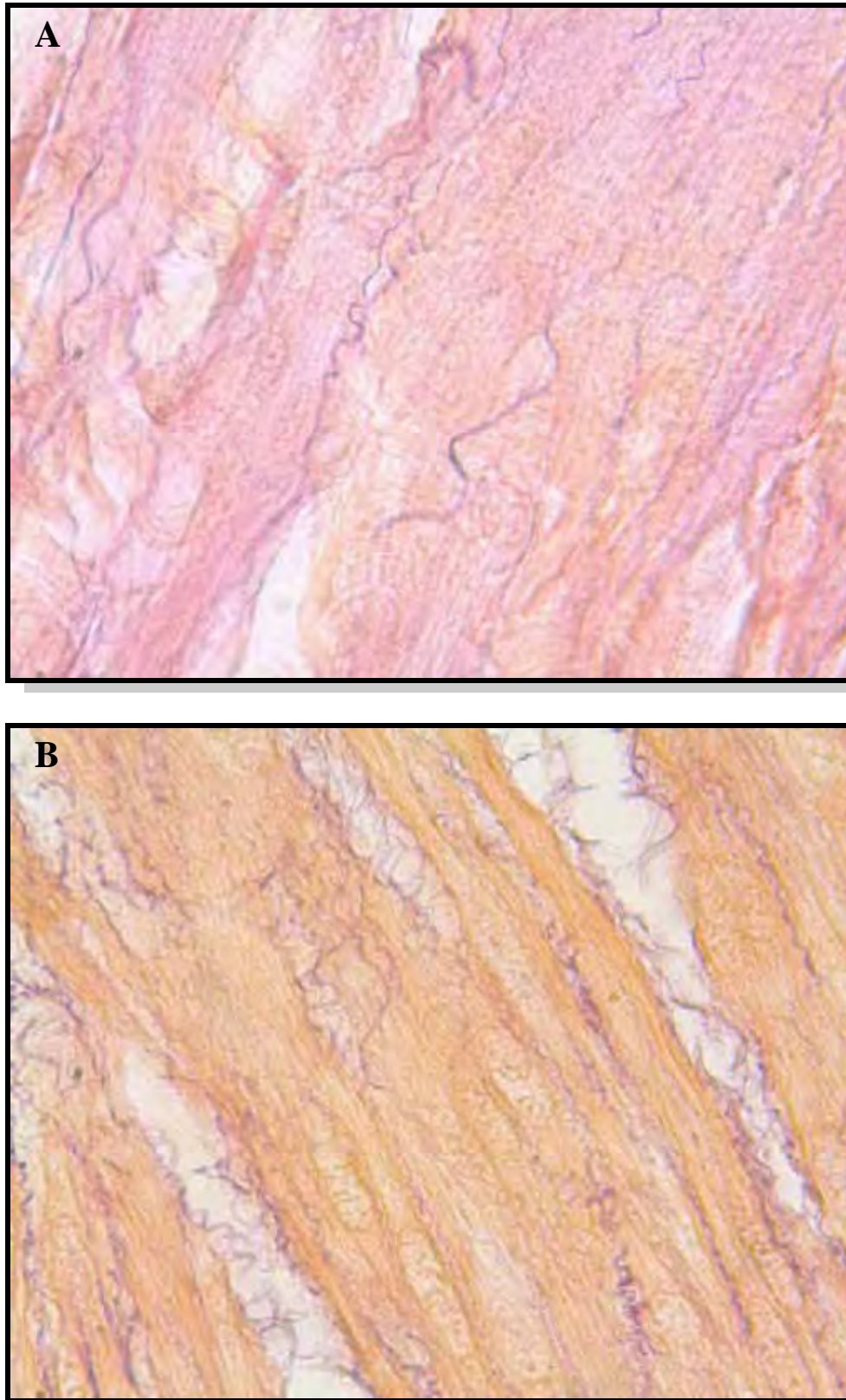


Figure 3: Weigert's Fuchsin- Resorcin staining of the detrusor demonstrating the amount of elastic fibers in control group (A) and animals with partial bladder outlet obstruction (grupo GII) (B), x1000.

Table 1: Maximum cystometric capacity (ml) in 3 different experimental groups at different moments. Different upper case letters indicate when the groups were significantly different at the same moment ($p < 0.05$). Different lower case letters indicate when the moments were significantly different in the same group.

Group	M1	M2	Result of statistical test between moments
GI	36.13 ± 24.78 Aa	42.33 ± 21.01 Aa	p > 0.05
GII	35.13 ± 13.60 Aa	54.53 ± 22.77 Ab	p < 0.05
GIII	49.87 ± 17.02 Aa	51.40 ± 22.73 Aa	p > 0.05
Result of statistical test between groups	p > 0.05	p > 0.05	

Table 2: Vesical compliance (ml/ cmH₂O) in 3 different experimental groups. Different upper case letters indicate when groups were significantly different at the same moment ($p < 0.05$). Different lower case letters indicate when the moments were significantly different in the same group.

Group	M1	M2	Result of statistical test between moments
GI	2.79 ± 1.47 Aa	3.40 ± 1.71 Aa	p > 0.05
GII	2.81 ± 2.10 Aa	2.83 ± 1.67 Aa	p > 0.05
GIII	4.67 ± 3.33 Aa	7.19 ± 4.20 Ab	p < 0.05
Result of statistical test between groups	p > 0.05	p > 0.05	

Table 3: Mean and standard deviation of percentage (%) of the elastic system fiber (ESF) in the lamina propria (LP) and muscle layer (ML) in different groups at M2. Different upper case letters indicate when the groups were significantly different at the same time ($p < 0.05$).

	GI (n=15)	GII (n=14)	GIII (n=15)	Result of the statistical test
FSE in LP	15.3±3.4 A	26.2±6.1 B	24.5±5.1 B	$p < 0,05$
FSE in CM	13.9±3.3 A	27.9±6.4 B	28.2±4.5 B	$p < 0,05$

Anexa

Anexo 1 – Informações para autores do International Braz J Urol

International Braz J Urol

INFORMATION FOR AUTHORS

Manuscripts submitted for publication should be sent to:

Dr. Francisco J. B. Sampaio
Editor, International Braz J Urol

by: E-mail with attached text files and figures to the e-mail below: submission@brazjurol.com.br

Manuscripts must be written in current English. Non-native speakers should ask a native specialist in medical English for checking the grammar and style. Either American or British English may be used but should be consistent throughout the manuscript.

A submission letter signed by all authors must accompany each manuscript. This letter must state that: a)- the paper or portion thereof have not been previously published and are not under consideration by another Journal, b)- that all authors have contributed to the information or material submitted for publication, and that all authors have read and approved the manuscript, c)- that the authors have no direct or indirect commercial financial incentive associated with publishing the manuscript, d)- that the source of extra-institutional funding, specially that provided by commercial companies, is indicated. After accepted for publication, the manuscript will become property of the **International Braz J Urol**.

Conflict of Interest – Any conflict of interest, mainly financial agreement with companies whose products are alluded to in the paper, must be clearly disclosed when submitting a manuscript for review. If accepted, a disclosure will be published in the final manuscript.

The requirements for authorship and the general rules for preparation of manuscripts submitted to the **International Braz J Urol** are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, *Ann Intern Med*, 126: 36-47, 1997). An electronic version of the Uniform Requirements is available on various websites, including the International Committee of Medical Journal Editors web site: www.icmje.org.

In response to the concerns of the editors of scientific medical journals with ethics, quality and seriousness of published articles, a Committee on Publication Ethics (COPE) was established in 1997 and a guideline document was published. The **International Braz J Urol**

signed, approved, and follows the COPE guidelines. The Editor strongly encourages the authors to carefully read these guidelines before submitting a manuscript (www.publicationethics.org.uk/guidelines or www.brazjurol.com.br, vol. 26 (1): 4-10, 2000).

Peer Review – All submissions are subject to editorial review. Typically, each manuscript is anonymously forwarded by the Editor to 3 Reviewers (at least 2). If the Editor receives conflicting or inconclusive revisions, the manuscript is always sent to 1 or 2 additional Reviewers before the Editor's decision. If considered necessary by the Editor or by the Reviewers, statistical procedures included in the manuscript will be analyzed by a statistician.

The **International Braz J Urol** contains six sections: **Clinical Urology, Surgical Technique, Pediatric Urology, Urological Neurology, Investigative Urology, and Urological Survey**. The articles should be written in English official orthography.

Abbreviations should be avoided, and when necessary must be specified when first time mentioned. Unusual expressions may not be used. A list of references must be provided at the end of the manuscript.

Every manuscript submitted to publication should have a cover page containing the title, short title (up to 50 characters), authors and institution. Up to six key words should be provided. These words should be identical to the medical subject headings (MeSH) that appear in the Index Medicus of the National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

One of the authors should be designated as correspondent and the complete correspondence address, telephone and fax numbers and E-mail should be provided.

If any financial support has been provided, the name of the institution should be mentioned.

Original Articles, Pediatric Urology and Urological Neurology: Original articles should contain a Cover Page, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, Tables and Legends, each section beginning in a separate page and numbered consecutively. Original articles should cover contemporary aspects of Urology. The manuscript text should contain no more than 2500 words, excluding the Abstract. The number

Information for Authors - *continued*

of authors is limited to five. References should contain no more than 20 citations, including the most important articles on the subject. Articles not related to the subject must be excluded.

Review and State of the Art: Review and State of the Art articles are accepted for publication upon Editorial Board's request only. A Review Article is a critical analysis of the most recent published manuscripts dealing with a urological topic. A State of the Art article is the view and experience of a recognized expert in the topic. An abstract must be provided.

Surgical Technique: These manuscripts should present new surgical techniques or instruments and should contain Introduction, Surgical Technique, Comments and up to five References. An abstract must be provided.

Investigative Urology: The aim of this section is the publication of experimental studies on Basic Sciences applied to urology. The sections of the manuscript are the same of Original Articles.

Urological Survey: Will be published upon the Editor decision.

Letters to the Editor: The letter should be useful for urological practice and must not exceed 500 words. They will be published according to the Editorial Board evaluation.

ILLUSTRATIONS

The illustrations should not be sent merged in the text. They should be sent separately, in the final of the manuscript.

- 1) The number of illustrations should not exceed 10 per manuscript.
- 2) Check that each figure is cited in the text.
- 3) The legends must be sent in a separate page.
- 4) The legends of histological illustrations should contain the histological technique and the final magnification.
- 5) The International Braz J Urol encourages color reproduction of illustrations wherever appropriate.

6) All histological illustrations should be supplied in color.

ELECTRONIC SUBMISSION

1) Do not embed the figures in the text, but supply them as separate files.

2) For Submitting Photographs Electronically, please:

Supply photographs as TIFF (preferable) or JPG files. The TIFF or JPG should be saved at a resolution of 300 dpi (dots per inch) at final size.

If scanned, the photographs should be scanned at 300 dpi, with 125mm width, saved as TIFF file and in grayscale, **not embed in Word or PowerPoint.**

3) For Submitting Line Artwork Electronically please note that:

Line drawings must be supplied as EPS files (give an EPS extension, e.g. Fig01 eps)

Use black text over light to mid grey and white text over dark grey or black shades.

Use lower case for all labeling, except for initial capitals for proper nouns and necessary mathematical notation. Centre each file on the page and save it at final size with the correct orientation. We recommend a minimum final width of 65 mm, but note that artwork may need to be resized and relabeled to fit the format of the Journal.

4) IMPORTANT - Avoid - Do Not

- a) **DO NOT** embed the images in the text; save them as a separate file
- b) **DO NOT** supply artwork as a native file. Most illustration packages now give the option to "save as" or export as EPS, TIFF or JPG
- c) **DO NOT** supply photographs in PowerPoint or Word. In general, the files supplied in these formats are at low resolution (less than 300 dpi) and unsuitable for publication.
- d) **DO NOT** use line weights of less than 0.25 point to create line drawings, because they will not appear when printed.

TABLES: The tables should be numbered with Arabic numerals. Each table should be typed on a single page, and a legend should be provided for each table. Number tables consecutively and cite each table in text in consecutive order.

Information for Authors - *continued*

REFERENCES: The References should be numbered following the sequence that they are mentioned in the text. The references should not be alphabetized. They must be identified in the text with Arabic numerals in parenthesis. Do not include unpublished material and personal communications in the reference list. If necessary, mention these in the body of the text. Self-citations should be kept to a minimum. For abbreviations of journal names refer to the "List of Journals Indexed in Index Medicus" (<http://www.nlm.nih.gov>). The authors must present the references according to the following examples; the names of **all authors** must be included; when exist more than six authors, list the first six authors followed by **et al.** The **initial** and the **final** pages of the reference should be provided:

Papers published in periodicals:

- Paterson RF, Lifshitz DA, Kuo RL, Siqueira Jr TM, Lingeman JE: Shock wave lithotripsy monotherapy for renal calculi. *Int Braz J Urol.* 2002; 28:291-301.
- Holm NR, Horn T, Smedts F, Nordling J, de la Rossete J: Does ultrastructural morphology of human detrusor smooth muscle cell characterize acute urinary retention? *J Urol.* 2002; 167:1705-9.

Books:

- Sabiston DC: Textbook of Surgery. Philadelphia, WB Saunders. 1986; vol. 1, p. 25.

Chapters in Books:

- Penn I: Neoplasias in the Allograft Recipient. In: Milford EL (ed.), *Renal Transplantation*. New York, Churchill Livingstone. 1989; pp. 181-95.

The *Int Braz J Urol* has the right of reject inappropriate manuscripts (presentation, number of copies, subjects, etc.) as well as proposes modifications in the original text, according to the Referees' and Editorial Board opinion.

THE EDITORS SUGGEST THE AUTHORS TO OBSERVE THE FOLLOWING GUIDELINES WHEN SUBMITTING A MANUSCRIPT:

The **Ideal Manuscript** may not exceed 2500 words.

The **Title** must be motivating, trying to focus on the objectives and content of the manuscript.

Introduction must exclude unnecessary information. It should briefly describe the reasons and objective of the paper.

Materials and Methods should describe how the work has been done. It must contain sufficient information to make the study reproducible. The statistical methods have to be specified.

The **Results** should be presented using Tables and Figures whenever possible. Excessive Tables and Figures must be avoided. The tables should not be repeated on the text.

The **Discussion** must comment only the results of the study, considering the recent literature.

Conclusions must be strictly based on the study findings.

References should contain no more than 20 citations, including the most important articles on the subject. Articles not related to the subject must be excluded.

The Abstract must contain up to 250 words and must conform to the following style: Purpose, Materials and Methods, Results and Conclusions. Each section of the manuscript must be synthesized in short sentences, focusing on the most important aspects of the manuscript. **The authors must remember that the public firstly read only the Abstract, reading the article only when they find it interesting.**

NOTE:

Recent issues of the *International Braz J Urol* must be observed concerning the presentation form of the manuscript.

International Braz J Urol

MANUSCRIPT CHECKLIST

The authors should observe the following checklist before submitting a manuscript to the **International Braz J Urol**

- The sequence of manuscript arrangement is according to the Information for Authors.
- The Article is restricted to about 2,500 words and 5 authors.
- The place where the work was performed is not mentioned on the text, enabling blind review.
- Standard abbreviations were avoided and are defined when first used and are consistent throughout the text.
- Generic names are used for all drugs. Trade names are avoided.
- Normal laboratory values are provided in parenthesis when first used.
- The references were presented according to the examples provided in the Information for Authors. The references were numbered consecutively, following the sequence that they are mentioned in the text. They were identified in the text using Arabic numeral in parenthesis. The names of all authors were provided. When exist more than six authors, list the first six authors followed by et al. The initial and the final pages of the reference should be provided.
- The staining technique and the final magnification were provided for all histological illustrations. The histological illustrations are supplied in color.
- Legends were provided for all illustrations, tables, and charts. All tables and charts were printed in separate pages and referred to in the text. All illustrations were labeled and their top was indicated on the reverse side. All illustrations and tables are cited in the text.
- An Abstract was provided for all type of articles. The length of the Abstract is about 250 words.
- A corresponding author with complete address, telephone, Fax, and E-mail are provided.
- A submission letter and a disclosure form, signed by all authors, are included.
- The authors should included written permission from publishers to reproduce or adapt a previously published illustrations or tables.
- Conflict of Interest** – Any conflict of interest, mainly financial agreement with companies whose products are alluded to in the paper, is clearly disclosed in the manuscript.
- Check that each figure is cited in the text. The illustrations are not merged in the text.**
- The photographs are supplied as TIFF or JPG files and saved at a resolution of 300 dpi (dots per inch) at final size
- The photographs should be scanned at 300 dpi, with 125mm width, saved as TIFF file and in grayscale. **not embed in Word or PowerPoint.**
- A list of abbreviations is provided.