



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Gisele Silva Ribeiro

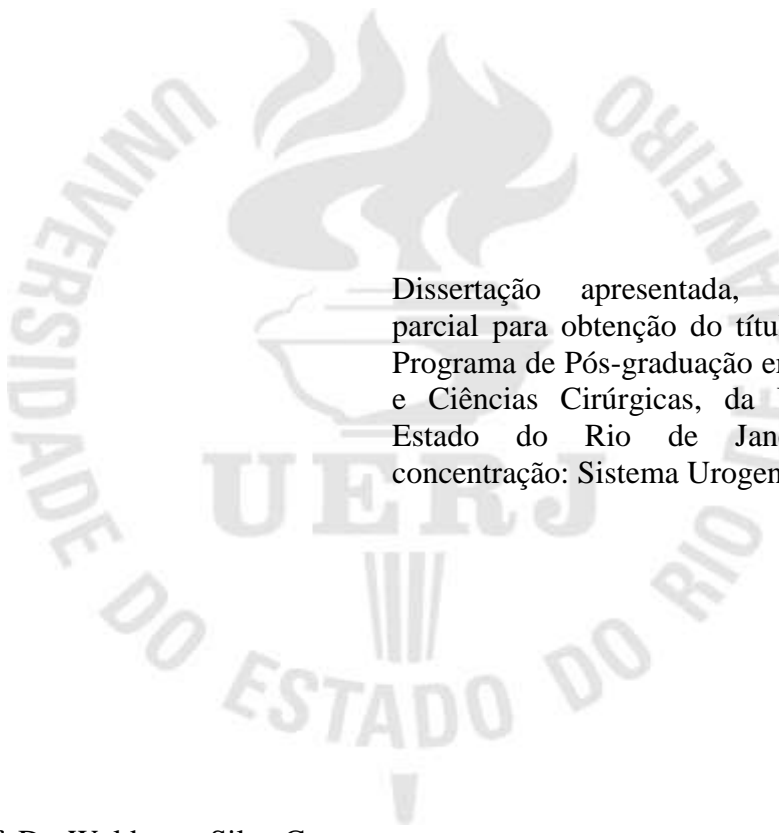
**Estudo estrutural e bioquímico da bexiga de ratos após tratamento com
altas doses de corticosterona**

Rio de Janeiro

2010

Gisele Silva Ribeiro

Estudo estrutural e bioquímico da bexiga de ratos após tratamento com altas doses de corticosterona



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Coorientador: Prof.^a Dra. Célia Martins Cortez

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R484 Ribeiro, Gisele Silva.
Estudo estrutural e bioquímico da bexiga de ratos tratamento
com altas doses de corticosterona / Gisele Silva Ribeiro.- 2010.
58 f.

Orientador : Waldemar Silva Costa.

Coorientadora : Célia Martins Cortez.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

Bibliografia: f. 47-54.

1. Bexiga urinária - Teses. 2. Bexiga urinária - Anatomia & histologia - Teses. 3. Corticosterona - Teses. 4. Ratos como

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Gisele Silva Ribeiro

Estudo estrutural e bioquímico da bexiga de ratos após tratamento com altas doses de corticosterona

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Aprovada em 01 de Dezembro de 2010.

Orientador:

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Célia Martins Cortez
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Diogo Benchimol de Soza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Maurício Alves Chagas
Universidade Federal Fluminense-UFF

Rio de Janeiro

2010

AGRADECIMENTOS

Ao professoror Luiz Eduardo de Macedo Cardoso, chefe Laboratório de Bioquímica da Matriz Extracelular pela orientação da técnica de dosagem do colágeno total

À aluna de iniciação científica Suelen Costa Freitas, pela ajuda na realização das técnicas realizadas.

Ao aluno de iniciação científica Alan A. Medeiros Ferreira de Souza, pela ajuda na técnica para dosagem de colágeno total.

Ao aluno de doutorado Jorge Medeiros Junior, pela ajuda na técnica de imunofluorescência.

RESUMO

RIBEIRO, Gisele Silva. *Estudo estrutural e bioquímico da bexiga de ratos após tratamento com altas doses de corticosterona* 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O objetivo deste trabalho foi analisar as alterações estruturais e bioquímicas na parede da bexiga resultante do tratamento crônico de ratos pré-púberes com altas doses de corticosterona. Foram estudados 26 ratos Wistar divididos em quatro grupos: T30 foi tratado com corticosterona até 29 dias de idade e morto no dia 30. T65 recebeu o mesmo tratamento, mas foi morto com 65 dias. Cada grupo tinha seu próprio controle (C30 e C65). Os animais foram tratados com injeções intraperitoneais diárias de corticosterona (2 mg/100g peso corporal) entre o 7º e 29º dias de vida. As bexigas foram removidas e processadas para inclusão em parafina. Foram estudados os seguintes elementos da parede vesical: Colágeno, músculo liso, fibras do sistema elástico, densidade vascular e do epitélio. Estes parâmetros foram analisados por métodos morfométricos, imunofluorescência e bioquímica. A densidade vascular na lâmina foi reduzida em 40% ($p < 0,05$) no grupo T65. A organização do colágeno foi alterada em T30 e T65, apesar da concentração de colágeno total não ser alterada. O grupo T65 teve um aumento de fibras do sistema elástico. Não houve diferença na altura e na densidade de células epiteliais entre os grupos. Quanto à densidade de fibras musculares lisas, observamos um aumento de 19% ($p < 0,05$) no grupo T65. A administração de corticosterona na fase pré-púbere provoca modificações estruturais na bexiga de ratos afetando de modo significativo o substrato morfológico sob qual repousa a fisiologia vesical. Foi observado também que estas modificações normalmente aparecem num tempo mais longo após o término do tratamento.

Palavras-chave: Bexiga. Corticosterona. Morfometria. Pré-pubertal. Ratos.

ABSTRACT

The aim of this work was to analyze the structural and biochemical changes on the bladder wall resulting from the chronic treatment of prepubertal rats with high doses of corticosterone. This study included 26 male Wistar rats assigned to four groups: T30 was treated with corticosterone until 29 days of age and killed at day 30, while T65 group received the same treatment but was killed at day 65. Each group had its own control group (C30 and C65). For treated animals, daily intraperitoneal injections of corticosterone (2 mg/100g body weight) were administered between 7th and 29th day of life. Bladders were removed and collagen, smooth muscle, elastic fibers system, vascular density and epithelium were analyzed by morphometrical methods, immunofluorescence, and biochemistry. Vascular density in lamina propria was reduced by 40% ($p < 0.05$) in group T65. Collagen organization was altered in T30 and T65, although total collagen concentration was unchanged. The T65 group had an increase in elastic system fibers. There was no difference in epithelial height and cell density between the groups. Concerning the smooth muscle fibers density we observed a 19% increase ($p < 0.05$) in the T65 group. Our results show that prepubertal administration of corticosterone induces structural modifications in the bladder of rats.

Keywords: Bladder. Corticosterone. Morphometry. Prepubertal. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Atuação do eixo hipotálamo-hipófise adrenal.....	9
Figura 2 – Fotomicrografia da parede da bexiga.....	12
Figura 3 – Injeção intraperitoneal com corticosterona	15
Figura 4 – Dissecção da bexiga.....	16
Figura 5 – Fotomicrografia da parede da bexiga.....	17
Figura 6 – Campo recortado da figura 5 demonstrando a área a ser quantificada.....	18
Figura 7 – Fotomicrografia mostrando a mensuração do epitélio vesical.....	19
Figura 8 – Fotomicrografia exemplificando a área do epitélio recortada para a quantificação.....	20
Figura 9 – Fotomicrografia da parede da bexiga demonstrando a camada muscular.....	20
Figura 10 – Fotomicrografia da parede da bexiga com a grade de cem pontos sobreposta.....	21
Figura 11 – Fotomicrografia da parede da bexiga mostrando a área da quantificação da densidade vascular.....	25
Figura 12 – Fotomicrografia mostrando a densidade muscular dos quatro grupos analisados.....	27
Figura 13 – Fotomicrografia do epitélio vesical dos quatro grupos analisados.....	29
Figura 14 – Fotomicrografia do epitélio recortado dos quatro grupos analisados.....	31
Figura 15 – Fotomicrografia da imunofluorescência caracterizando as fibras dos sistema elástico.....	32
Figura 16 – Fotomicrografia caracterizando as fibras colágenas.....	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1–	Densidade vascular 30 dias.....	24
Gráfico 2–	Desidade vascular 65 dias.....	24
Gráfico 3–	Densidade muscular 30 dias.....	26
Gráfico 4–	Densidade muscular 65 dias.....	26
Gráfico 5–	Espessura do epitélio da bexiga 30 dias.....	28
Gráfico 6–	Espessura do epitélio da bexiga 65 dias.....	28
Gráfico 7–	Densidade do epitélio da bexiga 30 dias.....	30
Gráfico 8–	Densidade do epitélio da bexiga 65 dias.....	30
Gráfico 9–	Colágeno total da bexiga 30 dias.....	34
Gráfico 10	Colágeno total da bexiga 65 dias.....	34
Gráfico 11	Peso dos animais 30 dias.....	35
Gráfico 12	Peso dos animais 65 dias.....	35

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	9
1	OBJETIVO	13
2	MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1	Animais e grupos	14
2.2	Administração com comcorticosterona	15
2.3	Dissecção	15
2.4	Análise histológica	16
2.5	Análise morfométrica	16
2.5.1	<u>Densidade vascular</u>	17
2.5.2	<u>Espessura do epitélio</u>	18
2.5.3	<u>Densidade celular do epitélio</u>	19
2.5.4	<u>Densidade de músculo</u>	21
2.6	Análise bioquímica	21
2.7	Identificação das fibras do sistema elástico	21
2.8	Análise qualitativa do colágeno	22
2.9	Peso dos animais	22
2.10	Análise estatística	23
3	RESULTADOS	24
4	DISCUSSÃO	36
5	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39
	APÊNDICE – Artigo	43
	ANEXO – Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais	58

INTRODUÇÃO

O córtex adrenal secreta um grupo de hormônios chamados de corticosteróides. Estes hormônios são todos sintetizados a partir do esteróide colesterol e têm formulas químicas diferentes. Estes corticosteróides são divididos em três grupos: glicocorticóides, mineralocorticóides e androgênios. (1).

Os glicocorticóides (GCs) são produzidos e secretados pelo córtex da adrenal. Eles têm papel importante em diversos órgãos e sistemas e participam na regularização e adaptação a situações de estresse (2). Os GCs induzem ativação da neoglicogênese hepática resultando no aumento da circulação de aminoácidos e enzimas, convertendo aminoácidos em glicose. O aumento de aminoácidos na circulação deriva do catabolismo protéico e inibição da síntese de proteínas em quase todos os tecidos (muscular, adiposo, linfóide e tecido conjuntivo e na pele), exceto síntese hepática (3).

Fisiologia do Glicocorticóide

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal começa com a liberação do hormônio liberador da corticotropina originado dos núcleos paraventriculares do hipotálamo liberado na circulação portal da hipófise (4)(Figura 1).

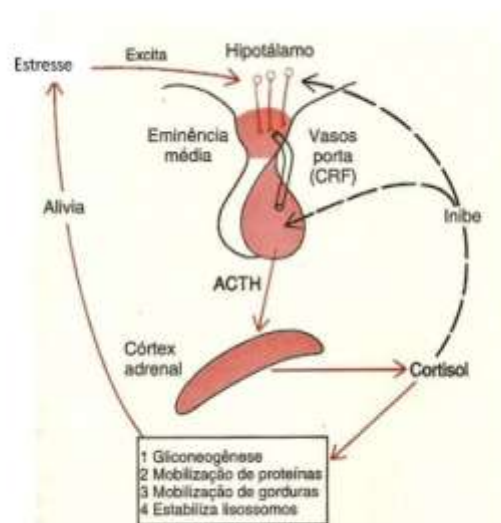


Figura 1: Esquema da atuação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. (Guyton & Hall, 1997).

Os GCs possuem a função de preparar o organismo para desafios fisiológicos ou ambientais e são muito importantes para a consolidação da resposta ao estresse(5).

O estresse repetido pode atuar como um fator desencadeante de várias patologias, uma vez que os hormônios liberados nesta situação estão diretamente ligados à regulação do sistema imunológico (6).

Os GCs, principalmente a corticosterona no rato e o cortisol em humanos, são os efetores do eixo hipotálamo-hipofise-adrenal e participam no controle da homeostase e da resposta do organismo aos estressores.(7).

A hipersecreção de cortisol é resultado da ativação do eixo-hipotálamo-hipófise-adrenal, sendo o primeiro hormônio a responder a situações de estresse (8).

No estudo de Kavitha *et al*, 2006 foi avaliado os efeitos do excesso da corticosterona simulando uma condição de estresse. Verificou-se que há uma alteração sobre a esteroidogênese nas células de Leydig. A co-administração de hormônio luteinizante com a corticosterona não preveniu a queda da testosterona sérica e a atividade da enzima na célula de Leydig, sugerindo a dominância dos efeitos inibitórios do excesso de corticosterona(9).

O estresse repetido pode atuar como um fator desencadeante de várias patologias, uma vez que os hormônios liberados nesta situação estão diretamente ligados à regulação do sistema imunológico(6).

No estudo de (Qin 2003) foi verificado que os níveis de GCs elevados produzem uma hipersensibilidade colorretal que causa ativação dos neurônios da medula lombossacra, e esta seria a correlação com alterações na bexiga urinária(10).

Demir *et al*, 2007 (11),observaram que a exposição a diferentes condições de estresse, tem um efeito importante sobre a morfologia da bexiga de ratos, induzindo ao dano epitelial, degeneração do urotélio, com acúmulo de neutrófilos e aumento do número de mastócitos na mucosa e camada muscular, com significativa lesão tecidual da bexiga e diminuição do tecido contrátil

Terapêutica com os glicocorticóides

Os GCs têm um elevado grau de regulação atuando na diferenciação celular e especificidade em vários tecidos. Mas o excesso de GCs pode exercer efeitos negativos sobre o crescimento corporal, influenciando negativamente a proliferação celular (12). Além disso, também foi sugerido que os CGs podem acelerar o processo de envelhecimento (8). A exposição precoce aos GCs pode também acelerar ou retardar a maturação funcional orgânica, dependendo da dose e do tempo de exposição. Os dados obtidos por Seckl, (13) sugerem que exposições farmacológicas e fisiológicas na fase pré-natal ao excesso de GC são capazes de causar doenças cardiovasculares, neuroendócrinos e metabólicas na vida adulta.

Em ambas as fases pré-natal e puberal, os GCs ajudam no crescimento normal do organismo e na formação e maturação dos órgãos genitais, funcionando em conjunto com hormônios tireoidianos, androgênios adrenais e os hormônios sexuais (14, 15). No entanto, a exposição em excesso aos GCs inibe a secreção espontânea de tais hormônios (16-18).

Em trabalho anterior (19), foi encontrado, através de avaliação morfométrica, alterações importantes no diâmetro médio dos neurônios do gânglio cervical de ratos tratados com GC durante o período de oito dias pós-natal. Outros estudos também mostram que o GC presente no microambiente celular é um determinante crítico na diferenciação morfológica e bioquímica celular (20).

Tratamentos prolongados com altas doses de GC simulam uma condição de estresse crônico, e uma longa exposição a um estressor, provoca reações adicionais como o aumento da liberação de GC a partir do córtex adrenal (21).

No tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica no adulto é realizado o uso prolongado de corticóide sistêmico para melhorar a qualidade de vida desses pacientes e diminuir os sintomas(22).

Assim como é realizado no adulto, crianças e lactentes se beneficiam com o uso prolongado de GC minimizando as complicações da asma brônquica e rinite alérgica, diminuindo os distúrbios causados pela doença e melhorando assim a função respiratória (23, 24).

Bexiga Urinária

A bexiga urinária é um órgão muscular oco que recolhe a urina produzida pelos rins e funciona como um reservatório temporário (25). É constituída por mucosa (revestida por epitélio de transição), camada muscular e adventícia.

O epitélio da bexiga é do tipo epitélio de transição, estratificado, essencialmente impermeável a sais e água. Apresenta de seis a mais camadas quando a bexiga está vazia. Na bexiga distendida são observadas três camadas. (26). Nas células do epitélio, a membrana em contato com a urina é especializada, apresentando placas espessas separadas por faixas de membrana mais delgadas. Quando a bexiga se esvazia, a membrana se dobra nas regiões delgadas e as placas espessas se invaginam e se enrolam, formando vesículas fusiformes, que permanecem próximo a superfície celular.(27) .Essas camadas repousam sobre uma membrana basal composta de matriz extracelular (colágeno, glicoproteínas) (25). Além da membrana basal existe a lâmina própria, que é composta por tecido conjuntivo que varia de frouxo a denso.

O detrusor é o músculo liso da parede da bexiga e se dispõe em três camadas: longitudinal interna, circular e longitudinal externa, entretanto essas camadas são mal definidas (26).

A túnica adventícia é formada por colágeno e fibras elásticas. Esses elementos se fundem gradualmente ao tecido conjuntivo frouxo que circunda os vasos (28)(Figura 2).

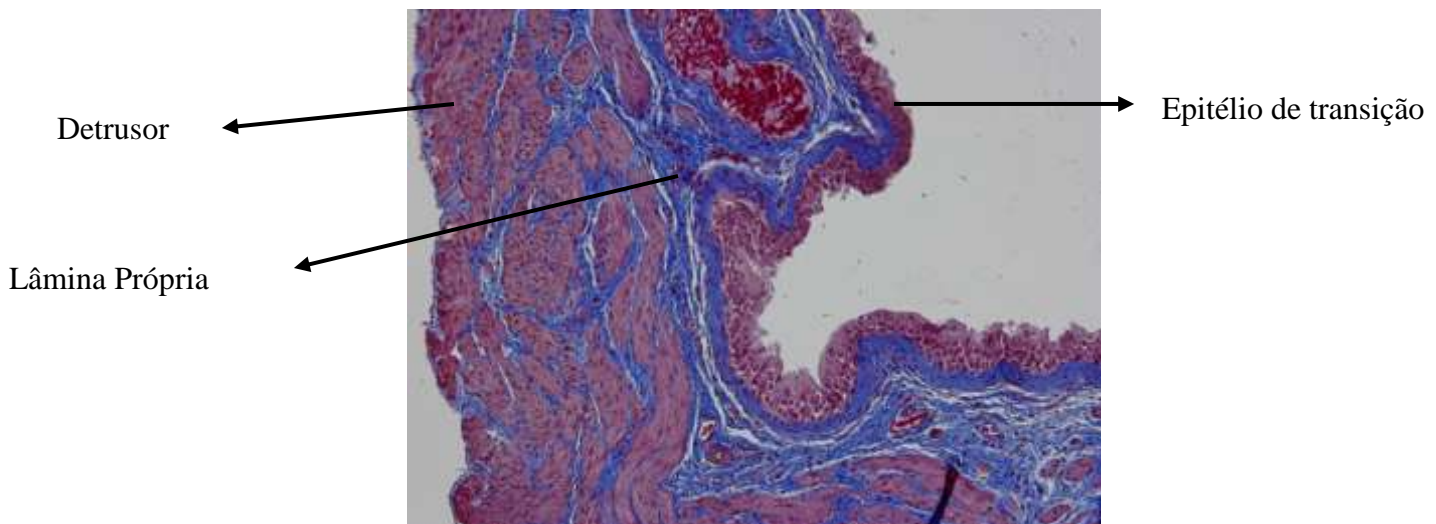


Figura 2: Fotomicrografia da parede da bexiga. Coloração Tricromico de Masson. 200x.

1 OBJETIVO

Altas doses de GC são usadas para prevenir ou tratar inflamações em recém nascidos com doença pulmonar crônica. São descritos efeitos a curto prazo da ação dos GCs como sangramento no estomago, aumento da pressão sanguínea e pouca tolerância a glicose. No entanto existem poucos estudos mostrando os efeitos dos GCs(29) na bexiga e a longo prazo. Além disso, existem evidências que o câncer de bexiga aumenta entre os receptores de órgãos de transplantados os quais são tratados com altas doses de GC(30). Todavia não se sabe se outros grupos de pacientes tratados com GC por via oral estão sob o mesmo risco Por isso o objetivo do presente trabalho foi analisar e caracterizar estrutural e bioquímicamente, em curto e médio prazo, as possíveis alterações na bexiga de ratos machos na fase prépuberal resultante dos efeitos do tratamento crônico com doses suprafisiológicas de corticosterona.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O Projeto foi realizado na Unidade de Pesquisa Urogenital, e foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) com o protocolo número CEA/250/2008.

2.1 Animais e grupos

O estudo utilizou 26 ratos Wistar recém-nascidos machos. Os animais foram mantidos com suas mães durante todo o período de tratamento. Só filhotes machos, foram utilizados no estudo. Os ratos foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (25 ± 1 ° C) e com ciclo claro-escuro artificial (12 horas cada) e as mães foram alimentadas com ração padrão e água *ad libitum* (Nuvital®, Nuvilab Ltd, Curitiba, PR, Brasil).

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

T30, n = 6- animais tratados e sacrificados no 30º dia pós-natal.

C30, n = 5- grupo controle 30 dias.

T65, n = 7- animais tratados e sacrificados no 65º dia pós-natal

C65, n = 8- grupo controle 65 dias.

No final do experimento, os animais foram mortos como recomendado pelas normas de ética em experimentação animal adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2 Administração da corticosterona

Foi administrada injeção diária de corticosterona Sigma ® (2 mg/100 g de peso corporal) por via intraperitoneal, sendo alternado o lado do abdômen a ser aplicado a cada dia. O horário de aplicação foi de 8 às 10 h sete dias na semana durante 22 dias (Figura.3).



Figura 3: Aplicação intraperitoneal com corticosterona. Sigma ® (2 mg/100 g de peso corporal).

2.3 Dissecção

No 30° e 65° dia de vida os animais foram mortos por sobredose anestésica (Thiopentax® - Cristália). A bexiga foi retirada e clivada para as respectivas análises procedendo-se imediatamente a fixação em formalina tamponada 10% (pH 7.4) em seguida, o material foi processado para inclusão em paraplast para análise histológica. (Figura 4).

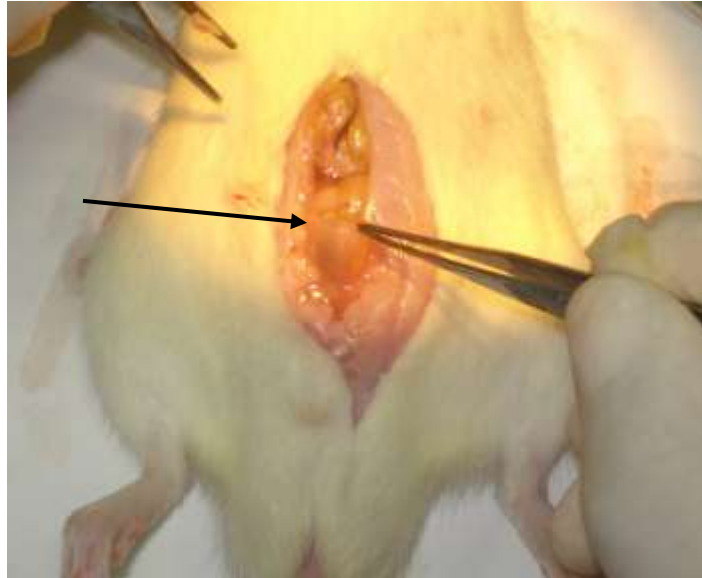


Figura 4: Dissecção da bexiga. A seta indica a sua localização.

2.4 Análise histológica

Foram analisados os seguintes parâmetros: densidade vascular, espessura do epitélio vesical, densidade celular do epitélio, densidade de área das fibras musculares lisas, fibras do sistema elástico, colágeno e peso dos animais.

O material foi processado para inclusão em paraplax e em seguida foram feitos cortes de 5 μ m de espessura com intervalos de 50 μ m entre os cortes. Os cortes foram corados pelas seguintes técnicas histológicas: Vermelho de Picrosirius para caracterizar a presença de diferentes tipos de colágeno e Tricrômico de Masson para avaliar a densidade dos vasos sanguíneos por área, densidade de músculo por área, altura epitelial e densidade celular do epitélio.

2.5 Análise morfométrica

De cada fragmento da bexiga foram selecionados 5 cortes e de cada corte foram analisados 5 campos aleatórios perfazendo um total de 25 campos analisados por bexiga. Os

cortes foram observados em um microscópio de luz Olympus acoplado a uma câmara de vídeo marca Olympus, sendo a imagem dos campos microscópicos transmitida para um monitor. As imagens foram digitalizadas em aumentos de 200x, 400x e 1000x utilizando o software Image Pro express e analisadas através do software ImageJ versão 1.42; (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

2.5.1 Densidade vascular

Para o cálculo da densidade vascular foram usados cortes corados pelo Tricrômico de Masson. Os cortes foram analisados com um aumento de 200x sendo utilizada apenas a área da lâmina própria, isto é, a área compreendida entre o epitélio e o músculo detrusor. A densidade vascular foi obtida através da contagem do número total de vasos em uma determinada área da lâmina própria, selecionada e previamente medida com o auxílio de uma ferramenta do programa ImageJ. O número obtido foi dividido pela área selecionada resultando no número de vasos por μm^2 . (Figuras 5 e 6). Não foram diferenciadas artérias e veias. As áreas analisadas de cada corte foram semelhantes.

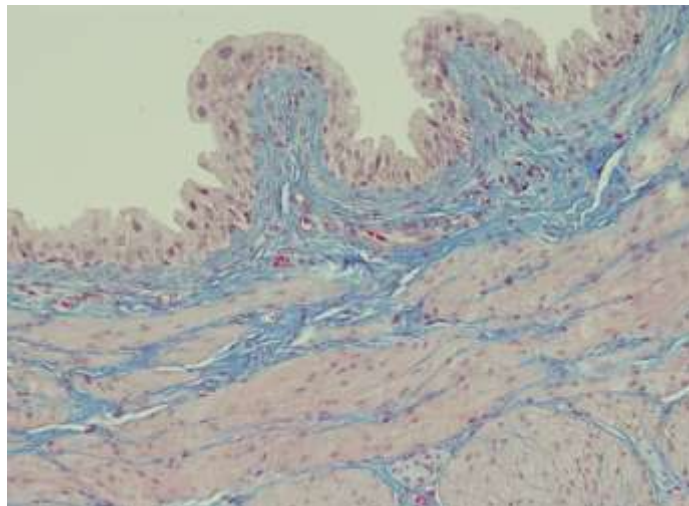


Figura 5: Fotomicrografia da bexiga mostrando a parede do órgão. Coloração Tricrômico de Masson. 200x.

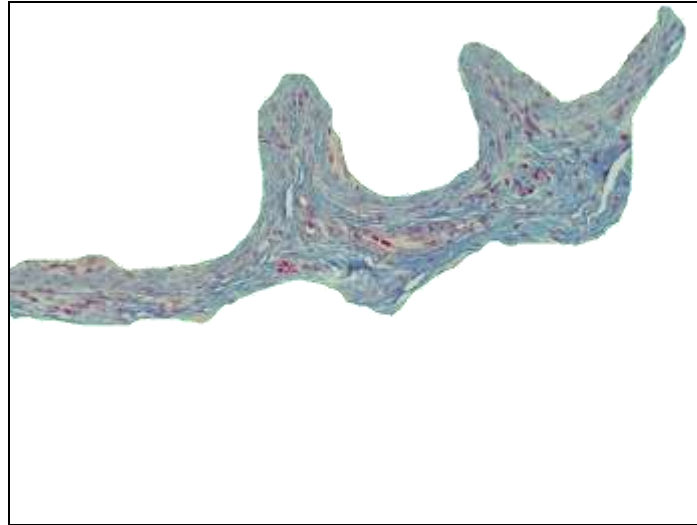


Figura 6: Mesmo campo da figura 4.mostrando a área a ser realizada a quantificação dos vasos sanguíneos. Tricrômico de Masson. 200x.

2.5.2 Espessura do epitélio vesical

A altura do epitélio foi medida em cortes com aumento de 1000 X e em 25 campos diferentes. Foram feitas 10 medidas por campo num total de 250 medidas por animal. Para a aferição das medidas foi utilizado o programa ImageJ. A altura do epitélio foi expressa em μm (Figura 7).

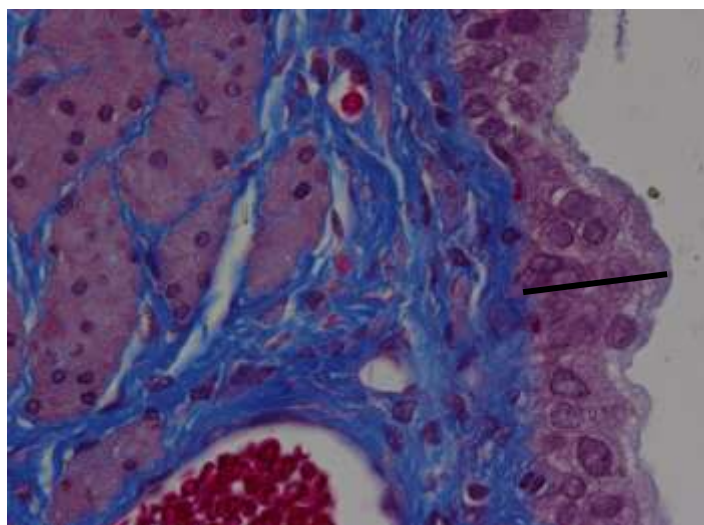


Figura 7: Fotomicrografia de bexiga mostrando o epitélio vesical. Tricrômico de Masson 1000x.

2.5.3 Densidade celular do epitélio

Densidade celular foi estimada pela contagem de núcleos em uma área contínua previamente delineada do epitélio, através de uma função específica do programa ImageJ. Os resultados foram expressos em número de núcleos por mm². (Figura 8).

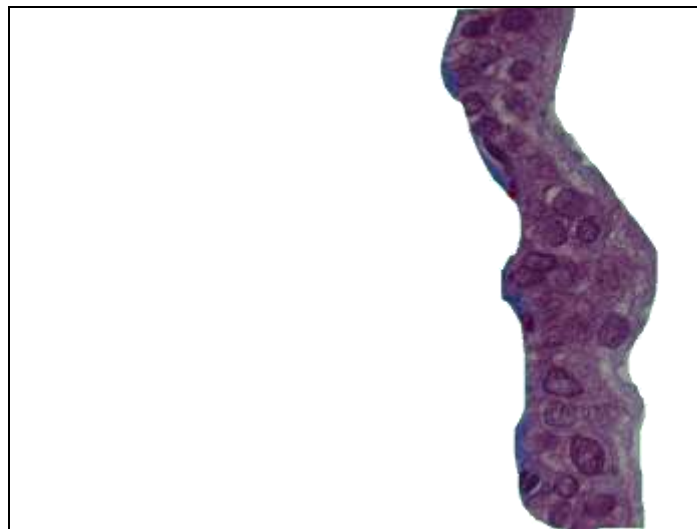


Figura 8: Fotomicrografia exemplificando a área epitelial recortada da figura 7 para posterior quantificação celular. Tricômico de Masson. 1000x.

2.5.4 Densidade de músculo

A densidade muscular foi aferida superpondo-se um sistema teste de 100 pontos na parede da bexiga. Foram utilizadas imagens com aumento de 200X. Os resultados foram

expressos em porcentagem, calculado pelo número de pontos superpostos na camada de músculo liso. (Figura 9 e 10). Para a realização das medidas foi utilizado o software ImageJ.

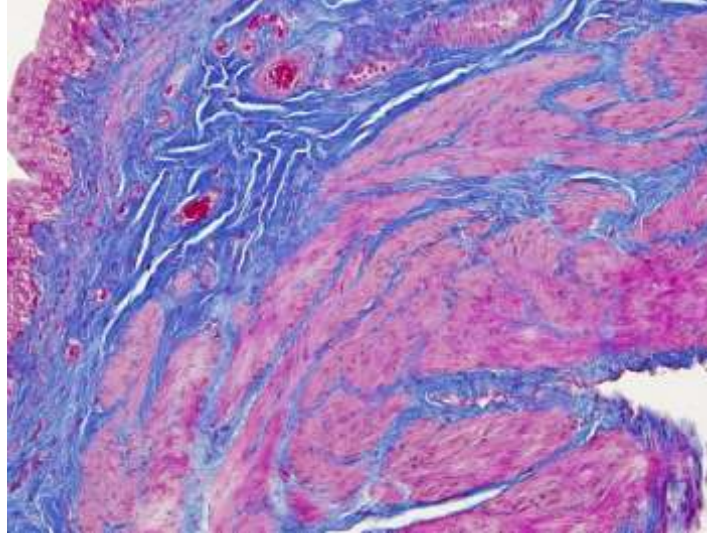


Figura 9: Fotomicrografia da parede da bexiga. Tricrômico de Masson. 200x.

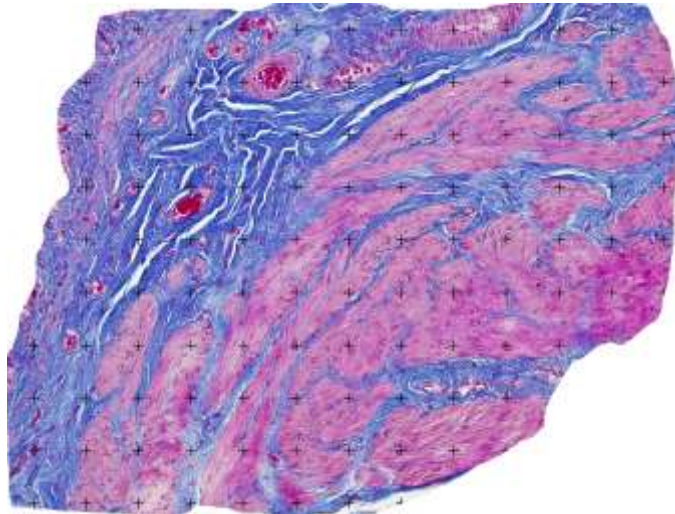


Figura 10: Fotomicrografia da parede da bexiga com sobreposição da grade de 100 pontos. Tricrômico de Masson. 200x.

2.6 Análise bioquímica

A análise foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Matriz Extracelular da Unidade de Pesquisa Urogenital – UERJ. A concentração do colágeno total da bexiga foi determinada pela dosagem colorimétrica de hidroxiprolina. De 5 a 14 mg de tecido seco e delipidado foi hidrolisado em 6N HCl por 18 horas a 118°C como previamente descrito(31). A dosagem foi realizada nos hidrolisados neutralizados usando o método da cloramina T (32) e os resultados foram expressos em µg de hidroxiprolina por mg de tecido seco e delipidado.

2.7 Identificação das fibras do sistema elástico

Foi realizada a técnica imunofluorescência indireta para identificação das fibras do sistema elástico. Foi utilizado anticorpo primário *Rabbit polyclonal to elastin* (Abcam, número do catálogo AB21610 Cambridge, MA, U.S.A) em concentração 1:50. Foram utilizados bloqueios para grupamentos aldeídicos com soluções de Cloreto de amônio 50 mM e glicina à 2% por 30 minutos cada. Após sucessivas lavagens com PBS pH 8.0, foram realizados bloqueios para sítios inespecíficos com a utilização de PBS albumina sérica bovina (BSA) 3% e leite desnatado a 10% . O anticorpo primário foi incubado overnight a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados em banhos sucessivos de PBS pH 8.0. Posteriormente foi realizado o bloqueio com PBS BSA 3 % 15 minutos e retirado sem lavagem prévia e incubado com o anticorpo secundário fluorescente *Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG* (Invitrogen, número de catálogo A-11001 Camarillo, CA, E.U.A) na concentração 1:100 por 1 hora em temperatura ambiente, logo após foram realizadas 3 banhos de 5 min em PBS pH 8.0, e para evidenciar o núcleos das células foi utilizado *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride* (DAPI) (Invitrogen, número do catálogo D1306, Camarillo, CA, E.U.A) por 15 min, novamente o material foi lavado com 3 banhos de 5 min de H2O destilada. Os cortes foram colocados em solução de azul de Evans por 10 min e montado utilizando o *Slowfade antifade kit* (Invitrogen, número de catálogo S2828, Camarillo, CA, E.U.A) Todas as micrografias foram capturadas por uma câmera DP71 acoplada ao microscópio BX51 com fontes de luz convencional e de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão).

2.8 Análise qualitativa do colágeno

Os cortes foram corados pelo Vermelho de Picrossírius para evidenciar possíveis diferentes tipos de colágeno (33). Os cortes foram observados sob luz polarizada.

2.9 Peso dos animais

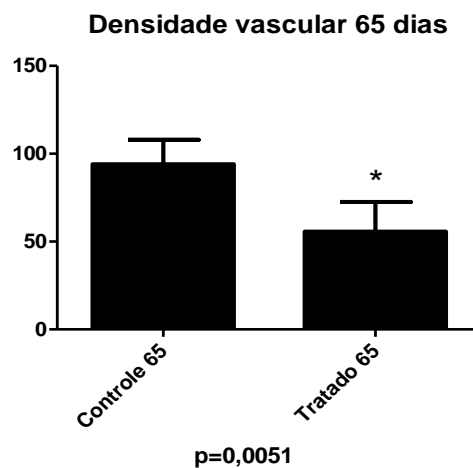
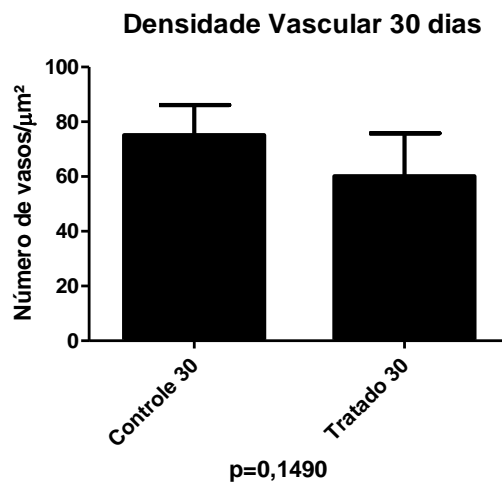
O peso dos animais foi verificado todos os dias do experimento através de balança de precisão.

2.10 Análise estatística

Foi utilizado teste t de student através do programa GraphPad Prim 5, considerando-se significância de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

A densidade de vasos foi significativamente reduzida no grupo T65 quando comparado com o grupo C65 por 40,83% (94.12 ± 13.86 vasos/ μm^2 x 55.69 ± 16.89 vasos/ μm^2 , respectivamente; $p = 0,0015$) (Gráficos 1 e 2) e (Figura13)



Gráficos 1 e 2: Densidade vascular da lâmina própria da bexiga do grupos C30, T30, C65 e T65. Os dados são representados como média \pm desvio padrão. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando teste t. Foram considerados significativos os resultados com valor de $p \leq 0.05$.

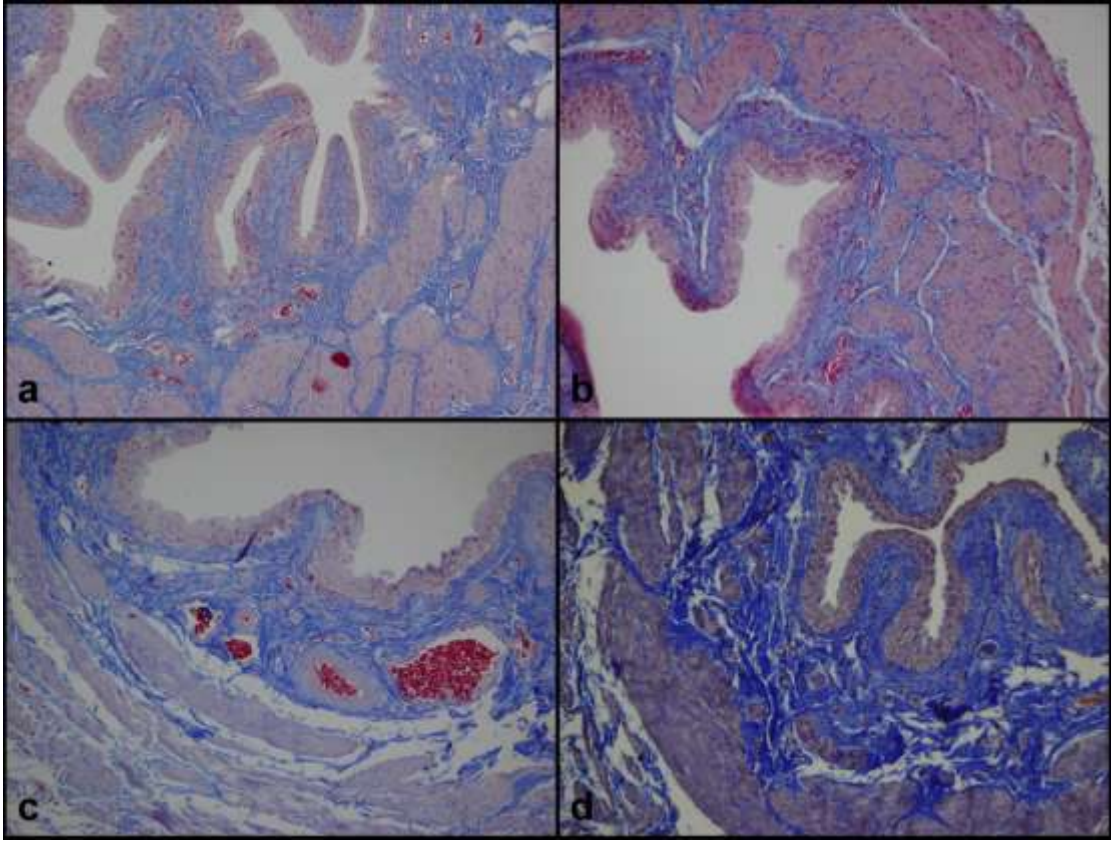
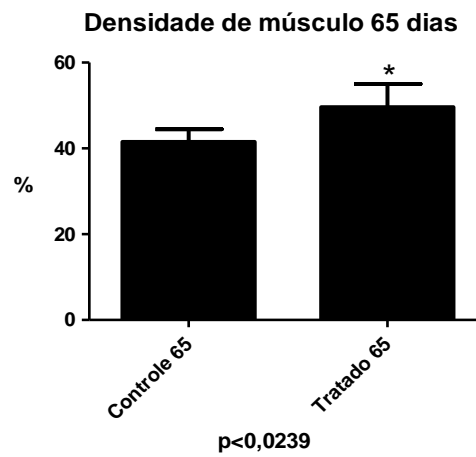
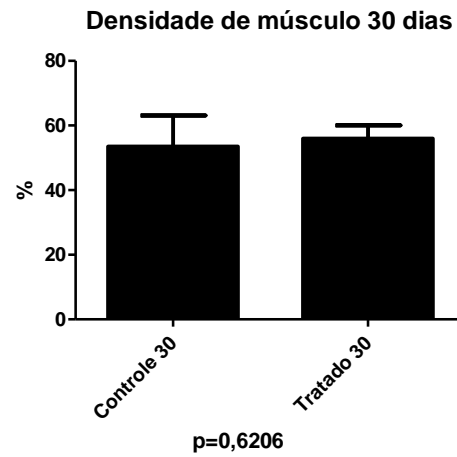


Figura 11: Fotomicrografia da parede da bexiga de rato mostrando a área avaliada para densidade vascular. A- Controle 30dias, B- Tratado 30dias, C- Controle 65 dias e D- Tratado 65 dias. Tricrômico de Masson 200x.

Densidade muscular

A densidade muscular apresentou um aumento de 19.4% no grupo de 65 dias tratado com corticosterona em comparação ao seu controle ($41.53 \pm 2.94\%$ x $49.60\% \pm 5.423$, respectivamente; $p=0.0239$). Não houve diferença no grupo de 30 dias (Gráficos 3 e 4) e (Figura 12).



Gráficos 3 e 4: Densidade de músculo liso dos grupos C30, T30, C65 e T65. Os dados são representados como média \pm desvio padrão. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando teste t. Foram considerados significativos os resultados com valor de $p \leq 0.05$.

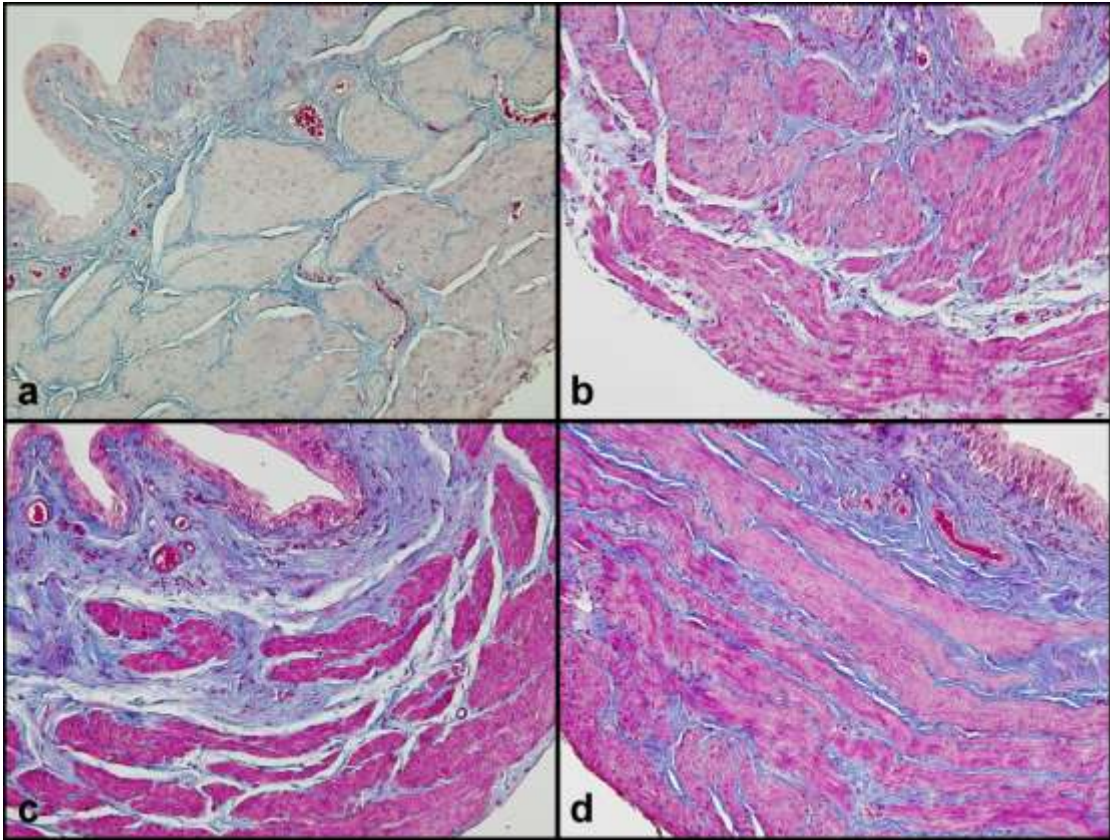
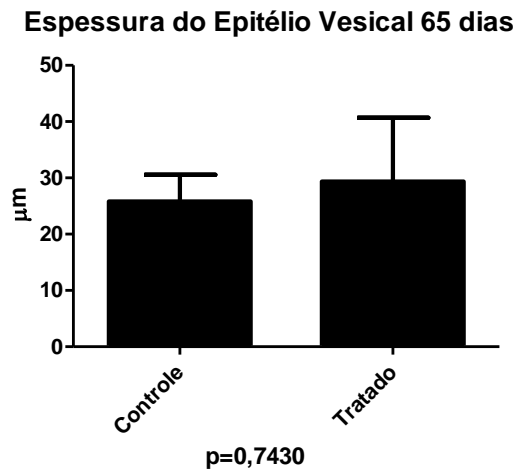
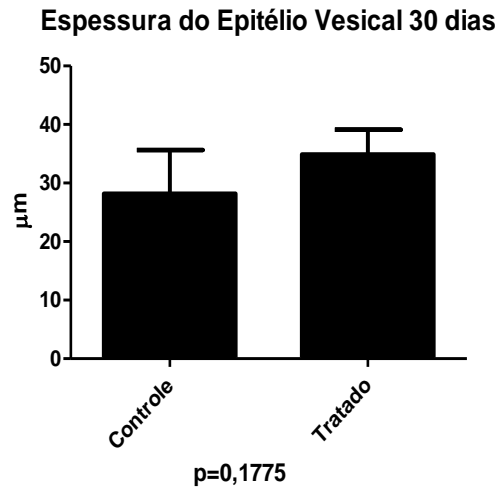


Figura 12.:Densidade muscular. A-Control 30 dias, B tratado 30 dias, C-Control 65 dias e D-Tratado 65 dias. Tricrômico de masson 200x.

Espessura epitelial

Não houve diferença nos grupos 30 e de 65 dias em relação à espessura do epitélio vesical ($p > 0,05$) (Gráficos 5 e 6) e (Figura 12).



Gráficos 5 e 6: Espessura do epitélio nos grupos de 30 e 65 dias. Os dados são expressos com média±desvio padrão. Os resultados foram analisados pelo teste t de Student não apresentando diferença. $P > 0,05$.

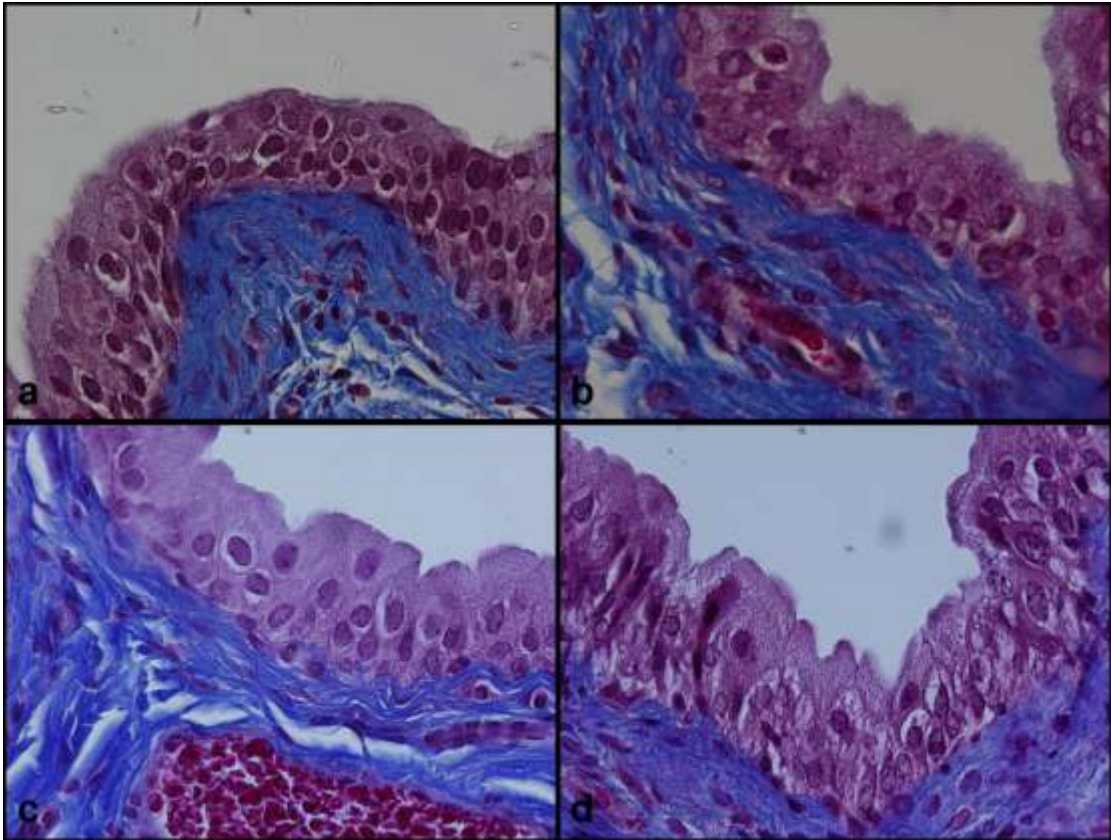
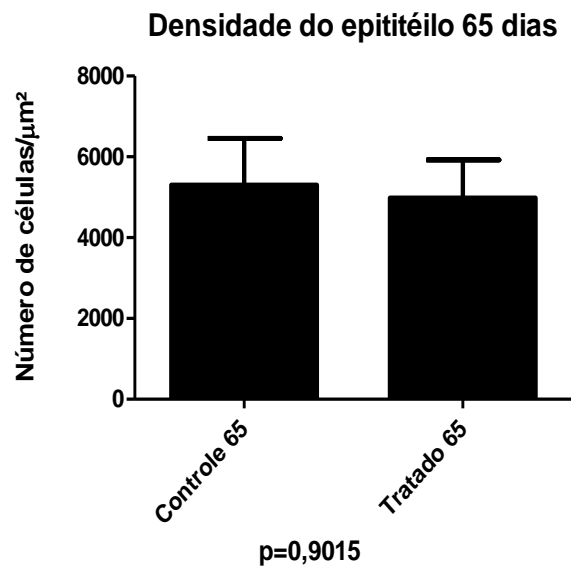
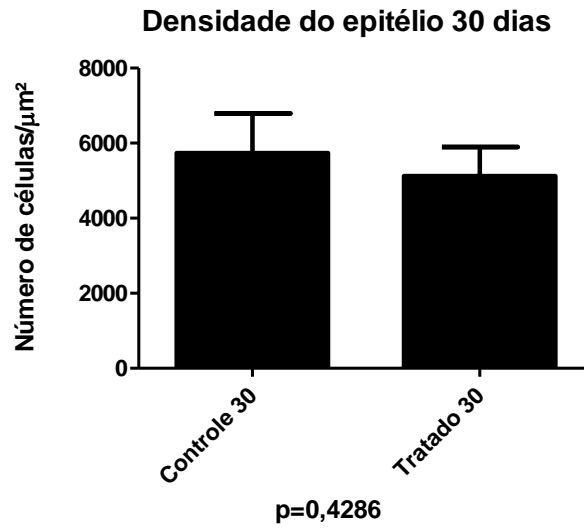


Figura 13: Fotomicrografia mostrando epitélio vesical. A Controle 30dias, B Tratado 30dias, C Controle 65 dias e D Tratado 65 dias. Tricrômico de Masson 1000x.

Densidade celular do epitélio

A densidade celular do epitélio não apresentou diferença entre os grupos ($p>0,05$) (Gráficos 7 e 8) e (Figura 14).



Gráficos 7 e 8: Análise da densidade celular do epitélio. Os dados são expressos com média \pm desvio padrão. Os resultados foram analisados pelo teste t de Student não apresentando diferença. $P > 0,05$.

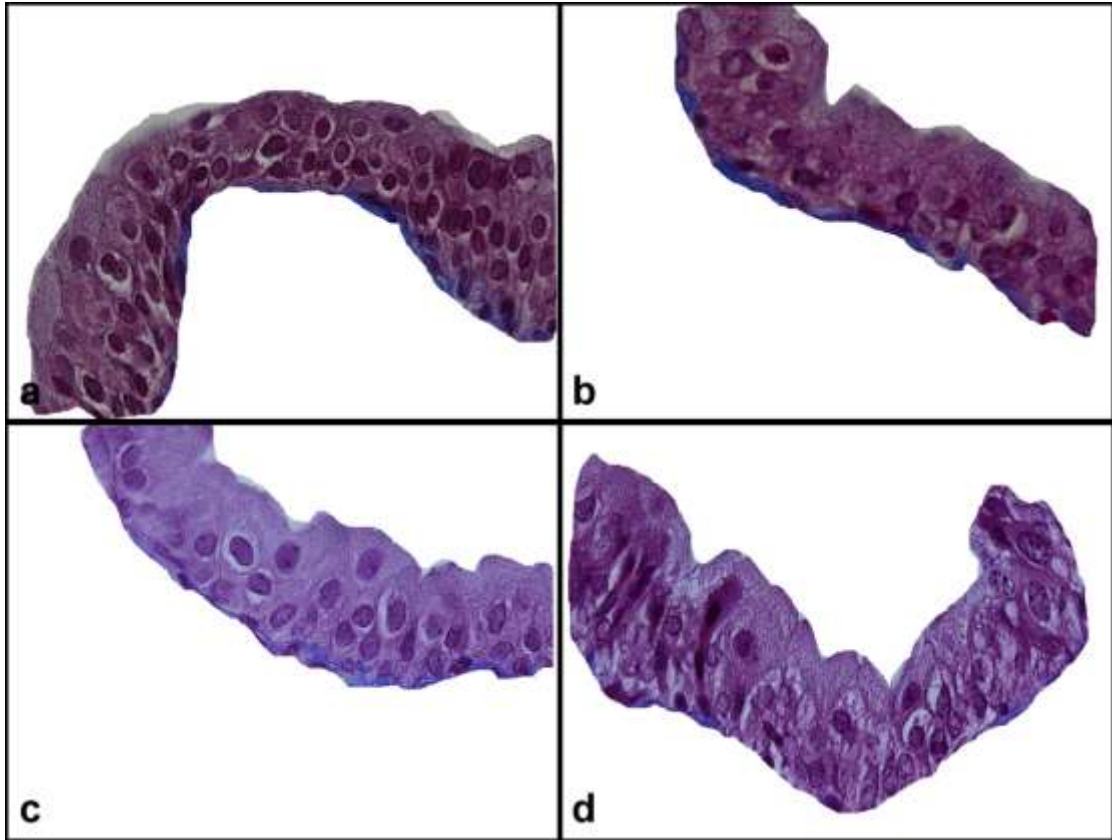


Figura 14: Área do epitélio vesical recordada para a quantificação do número de núcleos. A- Controle 30 dias, B- Tratado 30 dias, C- Controle 65 dias e D- Tratado 65 dias. Tricrômico de Masson 1000x.

Imunofluorescência das fibras do sistema elástico

Na análise das fibras do sistema elástico por imunofluorescência não observamos diferença no grupo de 30 dias quando comparado ao grupo controle. No grupo de 65 dias houve aumento das fibras elásticas no grupo dos animais T65 quando comparados ao seu grupo controle C65 (Figura 15).

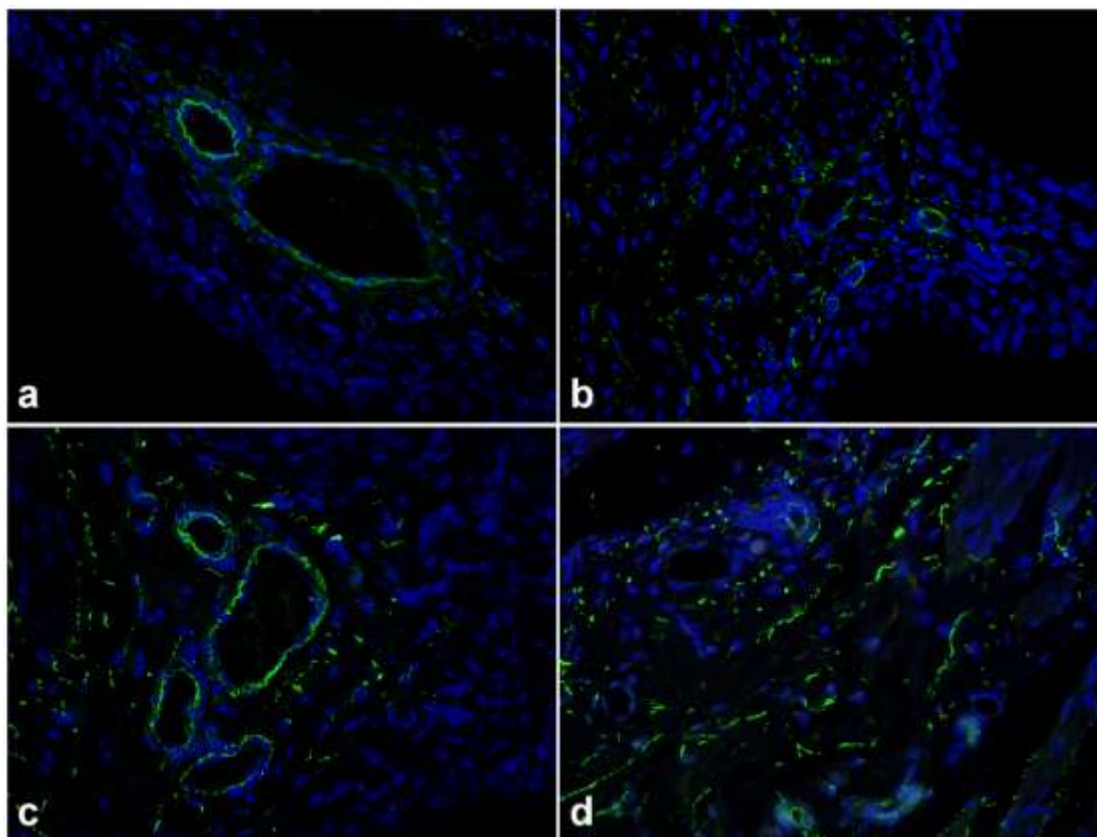


Figura 15: Fotomicrografia de imunofluorescência caracterizando as fibras do sistema elástico. A- Controle 30 dias, B-Tratado 30 dias, C-Controle 65dias e D-Tratado 65 dias.

Análise qualitativa do colágeno

A análise do colágeno pelo Vermelho de Picrossírius e observado sob luz polarizada mostrou uma nítida predominância da cor vermelha nos animais do grupo controle. Nos animais tratados particularmente no grupo T65 aparece uma grande quantidade de fibras de cor verde. (Figura 16).

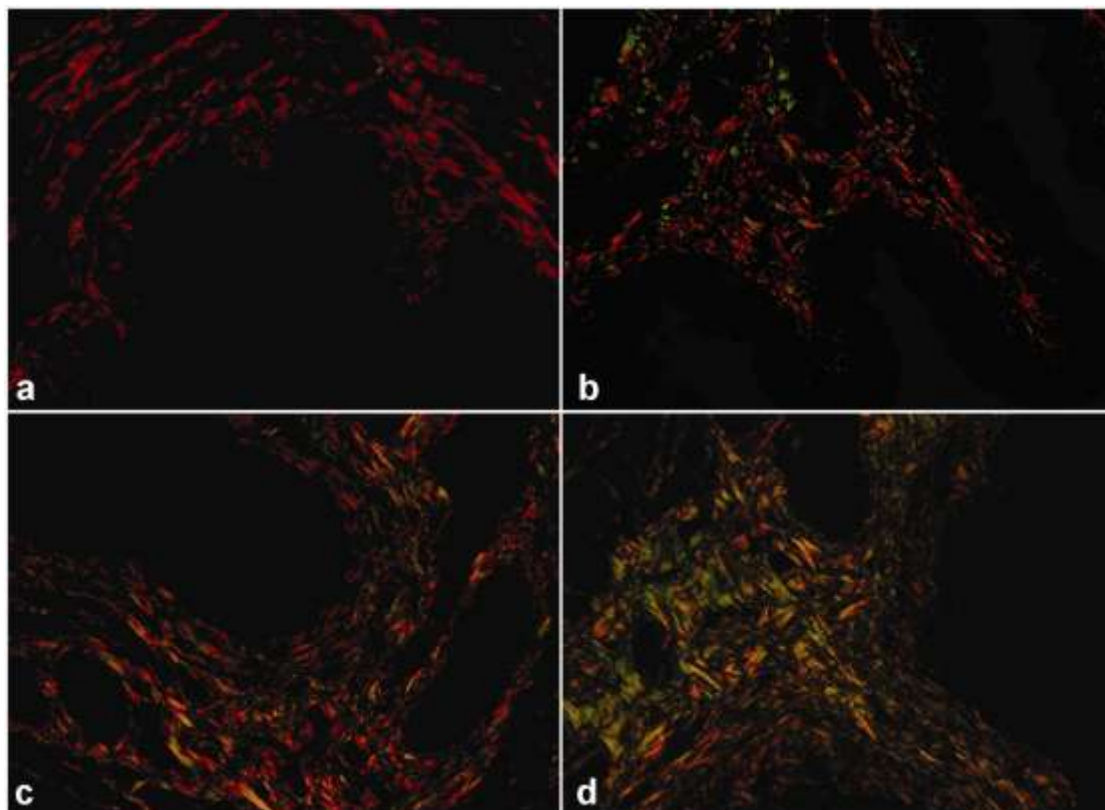
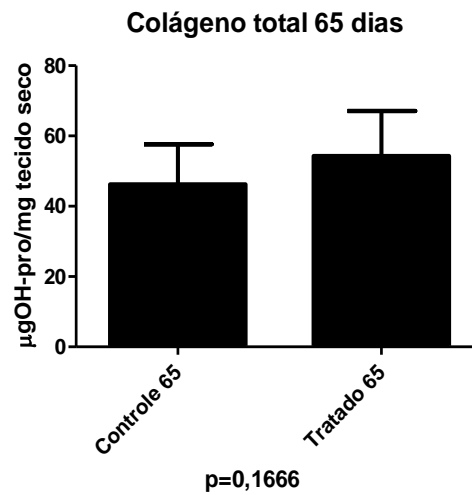
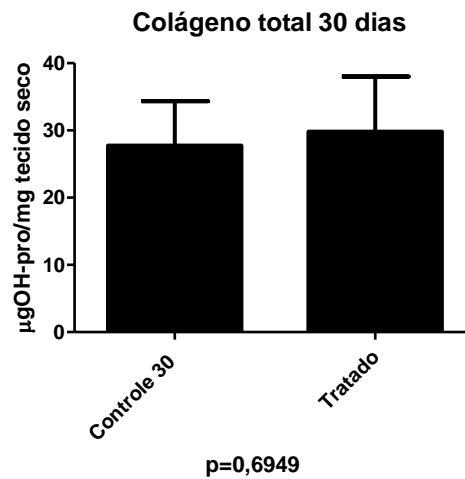


Figura 16: Análise das fibras colágenas. A-Controle 30 dias, B-Tratado 30 dias, C- Controle 65 dias e D- Tratado 65 dias. Vermelho de Picrosírius 400x.

Colágeno Total

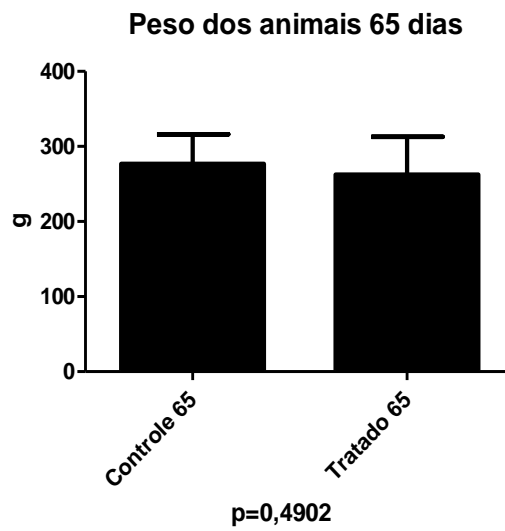
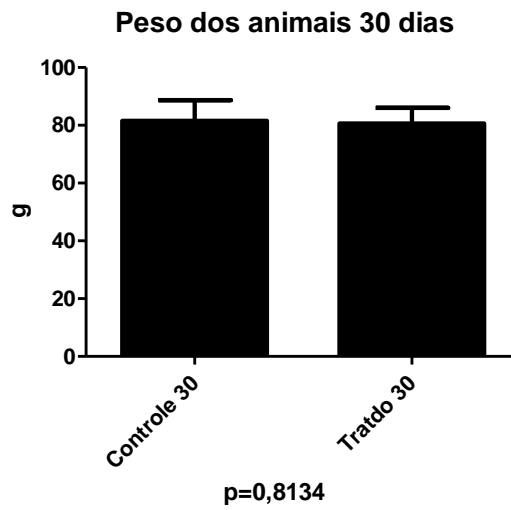
A concentração de colágeno total na bexiga, obtida pela análise bioquímica demonstrou não haver diferença entre os grupos (Gráficos 9 e 10).



Gráficos 9 e 10: Análise do colágeno através da dosagem da hidroxiprolina. Os dados são expressos com média±desvio padrão. Os resultados foram analisados pelo teste t de Student não apresentando diferença. $P > 0,05$.

Peso dos animais

Não foram observadas diferenças no peso final entre os grupos controle e tratado, após 30 e 65 dias (Gráficos 11 e 12).



Gráficos 11 e 12: Peso dos animais ao final do experimento. Os dados são expressos com média±desvio padrão. Os resultados foram analisados pelo teste t de Student não apresentando diferença. $P > 0,05$.

4 DISCUSSÃO

Glicocorticóides como a dexametasona são amplamente utilizados no tratamento de várias doenças (29, 34). O excesso de GC, no entanto, leva a alterações em vários órgãos e tecidos como a pele, ossos, músculos e cérebro (8, 35). No entanto, existem poucos relatos sobre o impacto do GC na bexiga. Para caracterizar os possíveis efeitos de GC na bexiga, foram utilizadas doses supra-fisiológicas de corticosterona em ratos pré-púberes e foram avaliados os efeitos da droga na parede da bexiga a curto e médio prazo. Foi observada uma mudança na vascularização da lâmina própria da bexiga caracterizada por uma diminuição significativa no número de vasos sanguíneos nos animais tratados. No entanto, estas alterações só foram observadas nos animais após 65 dias de vida. Portanto, podemos supor que essas mudanças se manifestam apenas em um período mais tardio após o tratamento. O mecanismo da disfunção vesical induzido pela isquemia não é conhecido. Uma vez que a diminuição do fluxo sanguíneo e complacência vesical estão fortemente correlacionadas, isto pode levar a diversas alterações fisiológicas e estruturais (36).

As propriedades mecânicas da parede da bexiga dependem da resistência, viscosidade e elasticidade do músculo detrusor e do tecido conjuntivo (37). Um aumento anormal do detrusor ocorre frequentemente na bexiga, com a obstrução parcial e promove uma hipertrofia progressiva da musculatura lisa e mudanças no colágeno e fibras do sistema elástico (38). No presente trabalho, o GC promoveu um aumento de 19% na densidade do músculo detrusor. Este crescimento do músculo também foi observado somente nos animais com 65 dias caracterizando mais uma vez o efeito tardio da droga.

As fibras colágenas e elásticas são os principais componentes da matriz extracelular. Eles estão presentes na parede da bexiga e estão intimamente relacionadas com o complacência (39).

A bexiga reage a períodos de alta pressão, aumentando a sua complacência através da interação entre o colágeno jovem e a síntese das fibras elásticas(40). Um aumento anormal na quantidade de fibras colágenas e elásticas ocorre mais comumente em doenças congênitas ou adquiridas como uropatia obstrutiva, possivelmente levando a uma perda de resistência e elasticidade da parede da bexiga (41).

A análise por microscopia de fluorescência mostrou que as fibras do sistema elástico apresentaram uma maior marcação na lâmina própria do grupo tratado após 65 dias, sugerindo uma diminuição da distensibilidade e da complacência da bexiga nos animais tratados com corticosterona.

A quantificação do colágeno realizada pela análise bioquímica demonstrou não haver diferença entre os grupos. No entanto, a observação qualitativa por microscopia de luz polarizada nos cortes corados pelo vermelho de picrisírius (33) mostraram diferentes cores na lâmina própria da bexiga. Os resultados mostraram uma predominância da cor verde, observada nos cortes de grupos de 30 e 65 dias tratados com corticosterona, e uma predominância da cor vermelha observada nos cortes dos grupos controle. Existe, portanto, uma clara diferença entre os tipos e organização do colágeno presente nos cortes. Essa diferença de cor nos permite supor que nos grupos tratados, um tipo de colágeno, possivelmente colágeno tipo III, é predominante em relação a outro tipo de colágeno, que é caracterizado por uma cor que varia do avermelhado ao laranja, que é predominante no grupo controle, e é geralmente associado com o tipo de colágeno I. Parece, portanto, que o estroma vesical passou por uma significativa alteração, com um processo ativo de formação de colágeno no grupo tratado.

O tratamento com GC durante a gravidez reduz o peso ao nascer em modelos animais, incluindo primatas e seres humanos (13). De acordo com Frank e Roberts (42) há um significativo efeito inibitório sobre o peso corporal observado nos ratos prematuros cujas mães foram tratadas com dexametasona 0,2 mg / kg / dia por 48 horas antes do parto. Entretanto, o tratamento no período pré-púbere não parece ter afetado o peso dos animais.

Dietrich *et al.* (30) levantam a possibilidade de um risco aumentado de câncer de bexiga por uso sistêmico de GC e um potencial papel na etiologia e imunologia do câncer de próstata. É possível que uma análise ultra-estrutural e molecular possa trazer mais provas para a afirmação de Dietrich sobre o câncer de bexiga com o uso de GC.

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram uma diminuição significativa da densidade vascular na lâmina própria da bexiga, um aumento na fluorescência da elastina e da densidade de músculo liso, além de um predomínio do colágeno tipo III nos animais tratados com GC. Todas essas mudanças após o tratamento GC foram observadas apenas em animais com 65 dias. Assim, é possível concluir que a administração de corticosterona na fase pré-púbere provoca modificações estruturais na bexiga de ratos afetando de modo significativo o substrato morfológico sob qual repousa a fisiologia vesical. Foi observado também, que estas modificações normalmente aparecem num tempo mais longo após o término do tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Guyton MD, Hall JE. Os Hormônios Adrenocorticais. In: Guyton MD, Hall JE, editors. *Tratado de Fisiologia Médica* 9ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 871.
2. Faria CD, Longui CA. Molecular aspects of glucocorticoid sensitivity. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 Dec;50(6):983-95.
3. Rhoades RA, Tanner GA. *Medical Physiology* In: Williams W, editor. Philadelphia: Lippincott; 2003 *Medical Physiology*. p. 32-4.
4. Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, Miller AH. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol.* 2005;18(1):41-78.
5. Sorrells SF, Sapolsky RM. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun.* 2007 Mar;21(3):259-72.
6. Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 2000 Oct;57(10):925-35.
7. Habib KE, Gold PW, Chrousos GP. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001 Sep;30(3):695-728; vii-viii.
8. Pratsinis H, Tsagarakis S, Zervolea I, Stathakos D, Thalassinos N, Kletsas D. The unexpected anabolic phenotype and extended longevity of skin fibroblasts after chronic glucocorticoid excess. *Dose Response.* 2006;4(2):133-44.
9. Kavitha TS, Parthasarathy C, Sivakumar R, Badrinarayanan R, Balasubramanian K. Effects of excess corticosterone on NADPH generating enzymes and glucose oxidation in Leydig cells of adult rats. *Hum Exp Toxicol.* 2006 Mar;25(3):119-25.
10. Qin C, Greenwood-Van Meerveld B, Myers DA, Foreman RD. Corticosterone acts directly at the amygdala to alter spinal neuronal activity in response to colorectal distension. *J Neurophysiol.* 2003 Mar;89(3):1343-52.
11. Demir A, Onol FF, Ercan F, Tarcan T. Effect of cold-induced stress on rat bladder tissue contractility and histomorphology. *Neurourol Urodyn.* 2007;26(2):296-301.
12. Rosmond R, Bjorntorp P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity as a predictor of cardiovascular disease, type 2 diabetes and stroke. *J Intern Med.* 2000 Feb;247(2):188-97.
13. Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol.* 2004 Nov;151 Suppl 3:U49-62.
14. Meyer JS. Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiol Rev.* 1985 Oct;65(4):946-1020.

15. Crump CJ, Chevins PF. Prenatal stress reduces fertility of male offspring in mice, without affecting their adult testosterone levels. *Horm Behav.* 1989 Sep;23(3):333-43.
16. Ohyama T, Sato M, Niimi M, Hizuka N, Takahara J. Effects of short- and long-term dexamethasone treatment on growth and growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH)-GH-insulin-like growth factor-I axis in conscious rats. *Endocr J.* 1997 Dec;44(6):827-35.
17. Newcomer JW, Craft S, Askins K, Hershey T, Bardgett ME, Csernansky JG, et al. Glucocorticoid interactions with memory function in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology.* 1998 Jan;23(1):65-72.
18. Mastorakos G, Zapanti E. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neuroendocrine regulation of food intake and obesity: the role of corticotropin releasing hormone. *Nutr Neurosci.* 2004 Oct-Dec;7(5-6):271-80.
19. Cortez CM, CW, Babinski MA, and Chagas MA. Morphometrical and stereological analysis of the superior cervical ganglion of *Rattus Norvegicus* submitted to chronic treatment with cortisol. *Int J Morphology* , . 2003;21:211-6.
20. Smith J, Fauquet M. Glucocorticoids stimulate adrenergic differentiation in cultures of migrating and premigratory neural crest. *J Neurosci.* 1984 Aug;4(8):2160-72.
21. Cima I, Corazza N, Dick B, Fuhrer A, Herren S, Jakob S, et al. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *J Exp Med.* 2004 Dec 20;200(12):1635-46.
22. Ismail T. Exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. . *Med J Malaysia* 2009 64(3):250-5; quiz 6.
23. Mastalerz L, Kumik J. Antileukotriene drugs in the treatment of asthma. *Pol Arch Med Wewn.* 2010. Mar;120(3):103-8.
24. Nino G, MM. G. Current concepts on the use of glucocorticosteroids and beta-2-adrenoreceptor agonists to treat childhood asthma. *Curr Opin Pediatr* 2010;22(3):290-5.
25. Chancellor MB, Yashimura N. Physiology and pharmacology of the bladder and urethra. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, editors. *Campbell's Urology.* Philadelphia: WB Saunders; 2002. p. 831-86.
26. Ross MH, Pawlina W. *Histologia texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. ; 2008. p. 651-87.
27. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 371-89.
28. Gundersen HJ, 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 May;96(5):379-94.

29. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW. Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(1):CD001146.
30. Dietrich K, Schned A, Fortuny J, Heaney J, Marsit C, Kelsey KT, et al. Glucocorticoid therapy and risk of bladder cancer. *Br J Cancer*. 2009 Oct 20;101(8):1316-20.
31. Cabral. C, Sampaio FJ. and Cardoso LE. 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.
32. Bergman I, Loxley R. The determination of hydroxyproline in urine hydrolysates. *Clin Chim Acta*. 1970 Feb;27(2):347-9.
33. Montes GS, Junqueira LC. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86 Suppl 3:1-11.
34. Zhang C, Mattern J, Haferkamp A, Pfitzenmaier J, Hohenfellner M, Rittgen W, et al. Corticosteroid-induced chemotherapy resistance in urological cancers. *Cancer Biol Ther*. 2006 Jan;5(1):59-64.
35. Zervolea I, Pratsinis H, Tsagarakis S, Karavitaki N, Stathakos D, Thalassinou N, et al. The impact of chronic in vivo glucocorticoid excess on the functional characteristics of human skin fibroblasts obtained from patients with endogenous Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2005 Jun;152(6):895-902.
36. Kershen RT, Azadzi KM, Siroky MB. Blood flow, pressure and compliance in the male human bladder. *J Urol*. 2002 Jul;168(1):121-5.
37. 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 Aug;148(2 Pt 2):544-9.
38. 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 Jan-Feb;33(1):33-9; discussion 9-41.
39. Cortivo R, Pagano F, Passerini G, Abatangelo G, Castellani I. Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. *Br J Urol*. 1981 Apr;53(2):134-7.
40. Wognum S, Schmidt DE, Sacks MS. On the mechanical role of de novo synthesized elastin in the urinary bladder wall. *J Biomech Eng*. 2009 Oct;131(10):101018.
41. Collado A, Batista E, Gelabert-Mas A, Corominas JM, Arano P, Villavicencio H. Detrusor quantitative morphometry in obstructed males and controls. *J Urol*. 2006 Dec;176(6 Pt 1):2722-8.

42. Frank L, Roberts RJ. Effects of low-dose prenatal corticosteroid administration on the premature rat. *Biol Neonate*. 1979;36(1-2):1-9.

APÊNDICE - Artigo**EFFECTS OF CHRONIC TREATMENT WITH CORTICOSTERONE ON BLADDER OF PREPUBERTAL RATS WISTAR.**

Ribeiro, Gisele Silva¹; Cardoso, Luiz Eduardo de Macedo¹; De Souza, Diogo Benchimol¹; Cortez, Célia Martins²; Silva, Dílson²; Costa, Waldemar Silva^{1*}; Sampaio, Francisco José Barcellos¹.

1- Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ, Brazil

2- Laboratory for Research in Biomembranes and Neuronal Networks, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence author:*Waldemar Silva Costa****wcosta@gmail.com****Av. 28 de setembro, 87, fundos. Vila Isabel.****Rio de Janeiro, RJ, Brazil.****20551-030**

Running Title: EFFECTS OF CORTICOSTERONE ON BLADDER OF RATS.

Key words: Bladder; Corticosterone; Morphometry; Prepubertal; Rats.

ABSTRACT

PURPOSE

The aim of this work was to analyze the structural and biochemical changes on the bladder wall resulting from the chronic treatment of prepubertal rats with high doses of corticosterone.

MATERIALS AND METHODS

This study included 26 male Wistar rats assigned to four groups: T30 was treated with corticosterone until 29 days of age and killed at day 30, while T65 group received the same treatment but was killed at day 65. Each group had its own control group (C30 and C65). For treated animals, daily intraperitoneal injections of corticosterone (2 mg/100g body weight) were administered between 7th and 29th day of life. Bladders were removed and collagen, smooth muscle, elastic fibers system, vascular density and epithelium were analyzed by morphometrical methods, immunofluorescence, and biochemistry.

RESULTS

Vascular density in lamina propria was reduced by 40% ($p < 0.05$) in group T65. Collagen organization was altered in T30 and T65, although total collagen concentration was unchanged. The T65 group had an increase in elastic system fibers. There was no difference in epithelial height and cell density between the groups. Concerning the smooth muscle fibers density we observed a 19% increase ($p < 0.05$) in the T65 group.

CONCLUSION

Our results show that prepubertal administration of corticosterone induces structural modifications in the bladder of rats.

INTRODUCTION

Glucocorticoids (GC) regulate with a high degree of specificity cellular differentiation in several tissues, but GC excess can exert negative effects on body growth, negatively influencing cell proliferation (12). Furthermore it was also suggested that GC can accelerate the aging process (8). Early exposure to GC can accelerate or delay the functional organic maturation, depending on the dose and exposure time. Data obtained by Seckl (13) suggests that both pharmacological and physiological prenatal exposures to GC excess are able to cause cardiovascular, neuroendocrine and metabolic disorders in the adult life. At both prenatal and pubertal phases, GC helps normal body growth and the formation and maturation of genital organs, functioning together with thyroidian hormones, adrenal androgens and sexual hormones (14, 15). However, exposure to excess GC inhibits spontaneous secretion of such hormones (16-18).

In previous work (19, 43), we found, using morphometrical evaluation, important alterations in the mean diameter of cervical ganglion neurons from GC-treated rats during the postnatal eight days. Other studies also show that GC present in the cellular microenvironment is a critical determinant of cellular morphological and biochemical differentiation (20).

It was also observed that prolonged use of GC is associated with risk of developing some diseases such as cancer. There is evidence that bladder cancer increases among organ transplant recipients which are treated with high doses of GC. However, it is not known whether other groups of patients, as for example, those receiving oral GC, are under the same risk (30).

High doses of GC are used to prevent or treat inflammation in newborn babies with chronic lung disease. Despite short-term side effects, such as bleeding from the stomach or

bowel, higher blood pressure and difficulty tolerating glucose, there are little studies concerning long-term complications (44).

The aim of this work was to analyze and characterize structural and biochemical short and medium term changes resulting from effects of treatment with high doses of corticosterone on bladder in a rat model.

MATERIALS AND METHODS

Twenty six newborn male Wistar rats were used in this study. The animals were kept with their mothers during all treatment period. Only male pups were used in the study. The rats were kept in a room with controlled temperature (25 ± 1 C) and with artificial dark–light cycle (lights on from 7:00 am to 7:00 pm) and mothers were fed standard rat food and water ad libitum. The rats were weighed daily until the day of death. All experiments were done according to the Brazilian law for scientific use of animals, and this project was formally approved by the Animal Care and Use Committee of the Biology Institute of State University of Rio de Janeiro.

The rats were randomly assigned into four groups, treated animals sacrificed on 30th postnatal day (T30, n=6) and respective control group (C30, n=5), treated animals sacrificed on 65th postnatal day (T65, n=7) and respective control group (C65, n=8).

Animals from the groups T30 and T60 received intraperitoneal injections of corticosterone Sigma[®] (2 mg/100g of body height) daily. Treatment was administrated from the 7th to the 29th day after conception (22 days of treatment). The injections were always performed in the morning, between 8:00 and 10:00 am, according to previously established protocols (9).

Animals from groups C30 and C60 were kept in the same conditions, with the exception of the intraperitoneal injections of corticosterone.

At 30 (T30 and C30) or 65 (T65 and C65) days of life, rats were sacrificed by anesthetic overdose and the bladder was dissected under magnification, weighted and fixed by immersion in 10% formaldehyde solution (pH 7.4).

Specimens were processed for paraplast embedding and sectioned to obtain 5 μm slices which were stained by different methods as follows. Picrosirius red stained slices were used to distinguish different types of collagen (33). Masson's trichrome stained slices were analysed for smooth muscle density, blood vessels density and epithelial height and cellular density.

Smooth muscle density in the bladder wall was estimated by superimposing a 100 points grid with over the previously outlined bladder wall (with all of its layers) with software ImageJ. Images with final magnification of 200X were used for this purpose. Results were expressed as percentage, calculated by the number of points which superimpose smooth muscle layer.

The blood vessels density was assessed only in the lamina propria of the bladder, which was defined as the loose connective tissue between the urothelial basement membrane and the inner edge of the detrusor layer. Using the ImageJ software version 1.42 (NIH, Bethesda, Maryland, USA) in sections captured at a final magnification of X200, a continuous segment of lamina propria was outlined and its surface area was measured. Thus, the number of blood vessels in the outlined segment of lamina propria was counted and divided the previously measured area of this segment. For each animal, a total of 25 evenly spaced segments of lamina propria were used for these quantifications. Results were expressed as number of blood vessels per mm^2 .

The epithelial height and cellular density were measured at a final magnification of X1000 in 25 different fields per animal using a calibrated ImageJ program. Epithelial height, expressed in μm , was measured in 10 different locations per field, resulting in 250 measures per animal. Cellular density was estimated by counting nuclei in a previously outlined continuous area of epithelium using a specific function of the ImageJ program, and the results were expressed as number of nuclei per mm^2 .

Also, elastic fibers were assessed in anti-elastin indirect immunofluorescence labeled slices. Antigen retrieval was carried out prior to incubating the sections with the primary antibody by treating dewaxed sections with a ready-made pepsin solution (Digest-All Kit, solution 3, Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The primary antibody used was rabbit polyclonal anti-elastin (ab21610, Abcam, Cambridge, MA, USA). And secondary antibody was Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (A11008, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

All micrographs were captured by a DP71 camera coupled to BX51 microscope with conventional and fluorescence light sources (Olympus, Tokyo, Japan).

For biochemical analysis, a small fragment of the bladder was fixed in cold acetone and kept in this fixative for 24 h at 4° C. The samples were then finely minced and submitted to two changes of 24 h each in 40 mL of chloroform:methanol (2:1, v/v) at room temperature. The solvent was then decanted, and after incubation at 60°C for 30 min, a preparation of dry and defatted bladder tissue was obtained and weighed. The concentration of total collagen in the tissue was determined by a colorimetric hydroxyproline assay. Thus, 5–14 mg of dry, defatted bladder were hydrolysed in 6M HCL for 18 h at 118°C as previously described (45). The assay was then carried out in the neutralized hydrolysates using a chloramin T method (32). Results were expressed as micrograms of hydroxyproline per milligram of dry, defatted bladder.

The Student's-t-test was used for mean comparisons. In all cases, significance was set at a probability value of 0.05. All analyzes were performed using GraphPad Prism software.

RESULTS

Blood vessels density was significantly reduced in group T65 when compared to C65 by 40.83% ($p=0.0015$). In animals sacrificed with 30 days, we found a non statistically significant reduction in the treated animals.

Smooth muscle density increased by 19.4% in the T65 group in comparison to C65 ($p=0.0239$). Differences among T30 and C30 were not statistically significant, although treated group showed a small increase.

The analysis of the elastic system fibers by immunofluorescence showed an increasing in elastic fibers in the treated animals T65 when comparing to its control group C65 (Figure 1).

The analysis of collagen in picrosirius red stained sections observed under polarization microscopy showed that treated animals (both 30 and 65 days old) had a more homogenous distribution of red and green colored collagen fibers which indicates the presence of different types of collagen (Figure 2).

The concentration of total collagen in bladder obtained by biochemical analysis showed no significant difference among the groups.

Regarding epithelial height and cellular density no difference was found between the groups studied.

No differences in the final weight were observed between control and treated groups after 30 and 65 days.

All numerical data are presented in tables 1 and 2.

DISCUSSION

GC such as dexamethasone are widely used in the treatment of several diseases (29, 34). GC excess, however, leads to alterations in various organs and tissues such as skin, bones, muscles and brain (8, 35). However there are few reports regarding the impact of GC on the bladder. To characterize possible effects of GC on the bladder, we used supraphysiological doses of corticosterone in prepubertal rats and assessed the effects of the drug in the short and medium term in the bladder wall. We observed a change in the vascularization of the bladder lamina propria characterized by a significant decrease in the number of blood vessels in treated animals. However these changes were only observed in animals after 65 days of life. Therefore, we can assume that these changes will manifest themselves only in a medium period after the treatment. The mechanism of bladder dysfunction induced by ischemia is not known. Since the decreased in the blood flow and bladder compliance are strongly correlated, this could lead to several physiological and structural changes (36).

The mechanical properties of the bladder wall depend on the resistance, viscosity and elasticity of the detrusor muscle and connective tissue (37). GC promoted a 19% increasing in detrusor muscle density. This growth of the muscle was also seen only in animals with 65 days. An abnormal increase in the detrusor occurs frequently in the bladder with partial obstruction and includes progressive hypertrophy of smooth muscle and changes in collagen and elastic fibers system (38).

The collagen and elastic fibers are the main components of the extracellular matrix. They are present in the bladder wall and are closely related to bladder compliance (39). Wognum *et al.* (40) showed that the bladder responds to periods of high pressure by increasing their compliance through the interaction between the young collagen and the

elastic fibers synthesis. An abnormal increase in the amount of collagen and elastic fibers occurs most commonly in congenital or acquired disease as in obstructive uropathy, possibly leading to a loss of strength and elasticity of the bladder wall (41).

The fluorescence microscopy analysis showed that the elastic system fibers showed a higher labeling in the lamina propria of the treated groups after 65 days, suggesting a decrease in distensibility and bladder compliance in animals treated with corticosterone.

Collagen quantification performed by biochemical analysis showed no difference between groups. However, the qualitative observation by polarizing microscopy in the sections stained by picosirius red (33) showed different colors on the lamina propria of the bladder. These results permits to suppose, by the predominance of green color, observed in sections from groups of 30 and 65 days treated with corticosterone, and the predominance of red color observed in the sections from control groups, that there is a clear difference between the types and organization of collagen present in the sections. In the treated groups, one type of collagen, possibly collagen type III, is predominant in relation to another type of collagen that is characterized by a color ranging from reddish to orange, which is predominant in the control group and is usually associate with collagen type I. It seems therefore that the vesical stroma is undergoing a significant turnover, with an active process of collagen formation in the treated group.

Treatment with GC during pregnancy reduces birth weight in animal models including primates and humans (13). According to Frank and Roberts (42) there is a significant inhibitory effect on body weight observed in premature rats whose mothers were treated with dexamethasone 0.2 mg / kg / day for 48 hours before delivery. However, treatment in the prepubertal period does not seem to affect the weight of the animals.

Dietrich *et al.* (30) raise the possibility of an increased risk of bladder cancer by systemic use of GC and a potential role in the etiology of immunological etiology of prostate

cancer. It is possible that an ultrastructural and molecular analysis can bring further evidence for the Dietrich claim concerning the bladder cancer by the use of GC.

Summarizing our results, we showed a significant decrease of the vascular density in bladder lamina propria, an increase in elastin fluorescence and smooth muscle density and a predominance of collagen type III in animals treated with GC. All these changes after GC treatment were observed only in animals aged 65 days. Thus we can conclude that prepubertal administration of corticosterone induces structural modifications in the bladder of rats.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.

REFERENCES

- Bergman I. and Loxley R. (1970). The determination of hydroxyproline in urine hydrolysates. *Clin Chim Acta* 27, 347-349.
- Cabral C.A., Sampaio F.J. and Cardoso L.E. (2003). 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* 170, 2512-2516.
- Collado A., Batista E., Gelabert-Mas A., Corominas J.M., Arano P. and Villavicencio H. (2006). Detrusor quantitative morphometry in obstructed males and controls. *J Urol* 176, 2722-2728.

- Cortez C.M., Costa W.S., Babinski M.A. and Chagas M.A. (2003). Morphometrical and stereological analysis of the superior cervical ganglion of *rattus norvegicus* submitted to chronic treatment with cortisol. *Int J Morphology* 21, 221-226.
- Cortivo R., Pagano F., Passerini G., Abatangelo G. and Castellani I. (1981). Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. *Br J Urol* 53, 134-137.
- Crump C.J. and Chevins P.F. (1989). Prenatal stress reduces fertility of male offspring in mice, without affecting their adult testosterone levels. *Horm Behav* 23, 333-343.
- Dietrich K., Schned A., Fortuny J., Heaney J., Marsit C., Kelsey K.T. and Karagas M.R. (2009). Glucocorticoid therapy and risk of bladder cancer. *Br J Cancer* 101, 1316-1320.
- Ewalt D.H., Howard P.S., Blyth B., Snyder H.M., 3rd, Duckett J.W., Levin R.M. and Macarak E.J. (1992). Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? *J Urol* 148, 544-549.
- Frank L. and Roberts R.J. (1979). Effects of low-dose prenatal corticosteroid administration on the premature rat. *Biol Neonate* 36, 1-9.
- Halliday H.L., Ehrenkranz R.A. and Doyle L.W. (2009). Late (>7 days) postnatal corticosteroids for chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD001145.
- Halliday H.L., Ehrenkranz R.A. and Doyle L.W. (2010). Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD001146.
- Kavitha T.S., Parthasarathy C., Sivakumar R., Badrinarayanan R. and Balasubramanian K. (2006). Effects of excess corticosterone on NADPH generating enzymes and glucose oxidation in Leydig cells of adult rats. *Hum Exp Toxicol* 25, 119-125.

- Kershen R.T., Azadzoï K.M. and Siroky M.B. (2002). Blood flow, pressure and compliance in the male human bladder. *J Urol* 168, 121-125.
- Mastorakos G. and Zapanti E. (2004). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neuroendocrine regulation of food intake and obesity: the role of corticotropin releasing hormone. *Nutr Neurosci* 7, 271-280.
- Meyer J.S. (1985). Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiol Rev* 65, 946-1020.
- Montes G.S. and Junqueira L.C. (1991). The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86 Suppl 3, 1-11.
- Newcomer J.W., Craft S., Askins K., Hershey T., Bardgett M.E., Csernansky J.G., Gagliardi A.E. and Vogler G. (1998). Glucocorticoid interactions with memory function in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 23, 65-72.
- Ohyama T., Sato M., Niimi M., Hizuka N. and Takahara J. (1997). Effects of short- and long-term dexamethasone treatment on growth and growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH)-GH-insulin-like growth factor-I axis in conscious rats. *Endocr J* 44, 827-835.
- Pratsinis H., Tsagarakis S., Zervolea I., Stathakos D., Thalassinos N. and Kletsas D. (2006). The unexpected anabolic phenotype and extended longevity of skin fibroblasts after chronic glucocorticoid excess. *Dose Response* 4, 133-144.
- Rosmond R. and Bjorntorp P. (2000). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity as a predictor of cardiovascular disease, type 2 diabetes and stroke. *J Intern Med* 247, 188-197.
- Rubinstein M., Sampaio F.J. and Costa W.S. (2007). Stereological study of collagen and elastic system in the detrusor muscle of bladders from controls and patients with infravesical obstruction. *Int Braz J Urol* 33, 33-39; discussion 39-41.

- Seckl J.R. (2004). Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 151 Suppl 3, U49-62.
- Smith J. and Fauquet M. (1984). Glucocorticoids stimulate adrenergic differentiation in cultures of migrating and premigratory neural crest. *J Neurosci* 4, 2160-2172.
- Wognum S., Schmidt D.E. and Sacks M.S. (2009). On the mechanical role of de novo synthesized elastin in the urinary bladder wall. *J Biomech Eng* 131, 101018.
- Zervolea I., Pratsinis H., Tsagarakis S., Karavitaki N., Stathakos D., Thalassinos N. and Kletsas D. (2005). The impact of chronic in vivo glucocorticoid excess on the functional characteristics of human skin fibroblasts obtained from patients with endogenous Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 152, 895-902.
- Zhang C., Mattern J., Haferkamp A., Pfitzenmaier J., Hohenfellner M., Rittgen W., Edler L., Debatin K.M., Groene E. and Herr I. (2006). Corticosteroid-induced chemotherapy resistance in urological cancers. *Cancer Biol Ther* 5, 59-64.

Table 1. Numerical data from rats control (C30) and treated with corticosterone (T30) and sacrificed with 30 days old.

	C30	T30	P value
Body weight (g)	81.5 ± 7.241	80.62 ± 5.399	> 0.05
Smooth muscle density (%)	53.53 ± 9.593	55.93 ± 4.078	> 0.05
Blood vessels density (b.v./mm ²)	75.16 ± 10.96	60.10 ± 15.66	> 0.05
Epithelial height (µm)	28.19 ± 7.469	34.90 ± 4.207	> 0.05
Epithelial cellular density (nuclei/mm ²)	5736 ± 1056	5122 ± 775	> 0.05
Total collagen (µg OH-pro/mg d.t.)	27.74 ± 6.595	29.81 ± 8.202	> 0.05

Data expressed as mean ± SD; b.v.: blood vessels; OH-pro: hydroxyproline; d.t.: dry tissue.

Table 2. Numerical data from rats control (C65) and treated with corticosterone (T65) and sacrificed with 65 days old.

	C65	T65	P value
Body weight (g)	276.7 ± 39.33	262.6 ± 50.37	> 0.05
Smooth muscle density (%)	41.53 ± 2.94	49.60 ± 5.423	0.0239
Blood vessels density (b.v./mm ²)	94.12 ± 13.86	55.69 ± 16.89	0.0015
Epithelial height (µm)	25.8 ± 4.768	29.34 ± 11.35	> 0.05
Epithelial cellular density (nuclei/mm ²)	5304 ± 1155	4984 ± 939.4	> 0.05
Total collagen (µg OH-pro/mg d.t.)	46.24 ± 11.37	54.31 ± 12.80	> 0.05

Data expressed as mean ± SD; b.v.: blood vessels; OH-pro: hydroxyproline; d.t.: dry tissue.

Submission

ANEXO - Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/250/2008** sobre "**Efeitos do estresse crônico sobre o sistema urogenital de ratos Wistar**", sob a responsabilidade de **Waldemar Silva Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **11/11/2008**. Este certificado expira em **11/11/2012**.

Rio de Janeiro, 11 de Novembro de 2008.

Prof. Israel Felzenszwalb

CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8

Prof. Patricia Cristina Lisboa

CEA/IBRAG/UERJ

Prof^ª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof^ª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8