



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Jorge Luiz Alves Brollo

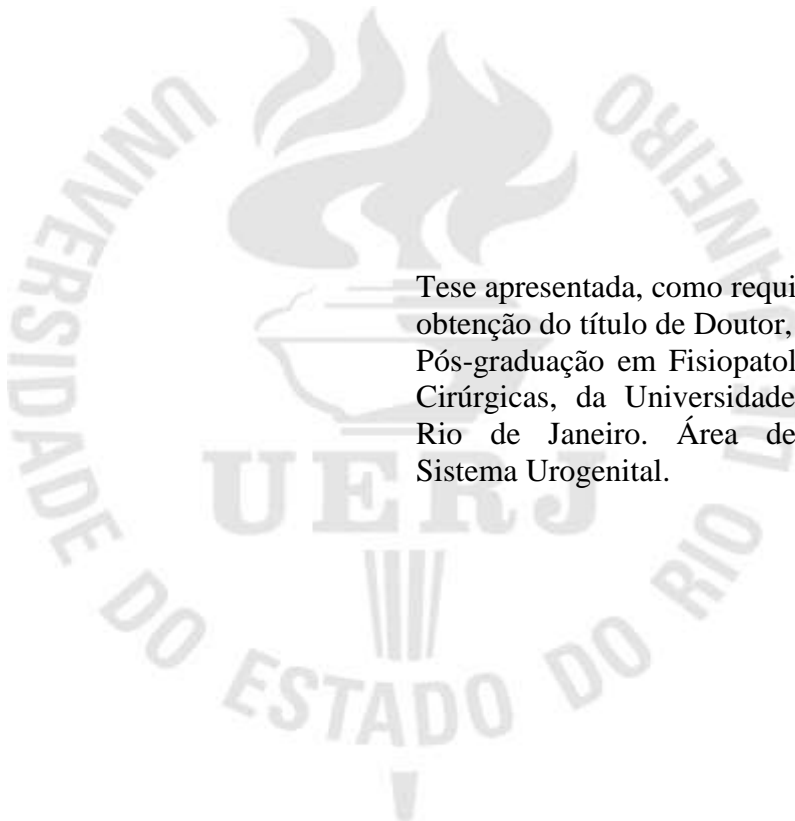
Análise da composição da matriz extracelular das camadas urotelial e muscular da bexiga de mulheres em diferentes idades

Rio de Janeiro

2011

Jorge Luiz Alves Brollo

**Análise da composição da matriz extracelular das camadas urotelial e muscular da
bexiga de mulheres em diferentes idades**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, 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. Luiz Eduardo Macedo Cardoso

Rio de Janeiro

2011

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

B867 Brollo, Jorge Luiz Alves.

Análise da composição da matriz extracelular das camadas urotelial e muscular da bexiga de mulheres em diferentes idades / Jorge Luiz Alves Brollo.- 2011.

34 f.

Orientador : Luiz Eduardo Macedo Cardoso.

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

1. Bexiga urinária - Teses. 2. Bexiga urinária - Músculos - Teses. 3. Colágeno - Teses. 4. Glicosaminoglicanas - Teses. 5. Urotélio - Teses. I. Cardoso, Luiz Eduardo Macedo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 611.621

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

Assinatura

Data

Jorge Luiz Alves Brollo

**Análise da composição do matriz extracelular das camadas urotelial e muscular da
bexiga de mulheres em diferentes idades**

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

Aprovado em ____ de _____ de _____.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Carlos Augusto Pais Cabral
Faculdade de Medicina de Petrópolis

Prof. Dr. Márcio Antônio Babinski
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Hildoberto Carneiro de Oliveira
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Francisco Sampaio
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2011

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso, pela orientação do trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Augusto Pais Cabral, pelo auxílio das técnicas de bioquímica.

À Dra. Helena Pazos, pelo auxílio nas técnicas histológicas.

Ao aluno de Iniciação Científica Alan Medeiros, pela confecção das lâminas histológicas.

RESUMO

BROLLO, Jorge Luiz Alves. *Análise da composição do matriz extracelular das camadas urotelial e muscular da bexiga de mulheres em diferentes idades*, 2010. 34f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A complacência da bexiga depende de músculos lisos, fibras colágenas, fibras elásticas e suas relações. O objetivo deste trabalho é determinar a composição da matriz extracelular em amostras de bexigas normais através de análise bioquímica de colágeno e glicosaminoglicanos em amostras obtidas de mulheres em diferentes grupos de idade, analisando separadamente as camadas urotelial e muscular. Avaliamos 17 amostras de bexiga divididas em três grupos: infância (N=5), menacme (N=6) e pós-menopausa (N=6). As bexigas foram analisadas para concentração de GAG total e colágeno e para análise qualitativa de GAG por eletroforese em gel de agarose. Na camada muscular, não houve diferença entre os grupos tanto para GAG quanto para colágeno. Na camada urotelial, a análise da concentração de colágeno não mostrou diferença entre os grupos, mas a concentração de GAG no grupo da pós-menopausa (0.21 ± 0.12 μg de ácido hexurônico/mg de tecido seco) apresentou diferença em relação aos grupos do menacme (1.78 ± 1.62 μg de ácido hexurônico/mg de tecido seco) e da infância (2.29 ± 1.32 μg de ácido hexurônico/mg de tecido seco). Nosso trabalho concluiu que a concentração de GAG está substancialmente diminuída na camada urotelial da bexiga de mulheres na pós-menopausa.

Palavras-chave: Bexiga. Camada muscular. Colágeno. Glicosaminoglicanos. Urotélio.

ABSTRACT

Bladder compliance is dependent on smooth muscle, collagen fibers, elastic fiber and their ratios. The luminal surface of the urothelium is covered by an adhering glycosaminoglycan (GAG) layer. The aim of this study was to determine the composition of the extracellular matrix (ECM) in normal samples of women bladders through biochemistry analysis of collagen and GAG on samples obtained from individuals from different age groups, analyzing separately the urothelial and muscular layers. We studied samples taken from bladders of 17 patients divided in three different groups: childhood (N=5), menacme (N=6) and menopause (N=6). Bladders were analyzed for total GAG and collagen concentration per mg dry tissue and for the contents of GAG species, as determined by agarose electrophoresis and reported as the percent of total sulfated GAG. In muscular layer, collagen and GAG concentration showed no difference between groups. In urothelial layer, collagen concentration showed no difference between groups but GAG concentration in menopause (0.21 ± 0.12 μg hexuronic acid /mg dry tissue) was different from menacme (1.78 ± 1.62 μg hexuronic acid /mg dry tissue) and childhood (2.29 ± 1.32 μg hexuronic acid /mg dry tissue). There was no difference between sulfated GAG in three groups. In conclusion, GAG concentration in urothelial layer was substantially lower in menopause women.

Keywords: Bladder. Muscular layer. Collagen. Glycosaminoglycans. Urothelium,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelos de formação embriológica do trígono.....	10
Figura 2	Fotomicrografias da parede vesical.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Colágeno da camada muscular.....	20
Tabela 2 – GAG da camada muscular.....	21
Tabela 3 – GAG sulfatados da camada muscular.....	21
Tabela 4 – Quantificação média de colágeno no urotélio.....	22
Tabela 5 – Quantificação média de GAG no urotélio.....	23
Tabela 6 – Análise qualitativa dos GAG sulfatados no urotélio.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- GAG – Glicosaminoglicanos
MEC – matriz extracelular
MMP – matriz metaloproteinases

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	OBJETIVO	15
2	MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1	Amostras de tecido	16
2.2	Extração do GAG	16
2.2.1	<u>Quantificação do GAG total</u>	17
2.2.2	<u>Determinação da concentração relativa dos GAG</u>	17
2.3	Quantificação do colágeno total	17
2.4	Histologia	17
2.5	Análise estatística	18
3	RESULTADOS	19
3.1	Histologia	19
3.2	Camada muscular	20
3.3	Camada urotelial	22
4	DISCUSSÃO	24
5	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30
	ANEXO 1- Comitê de ética em pesquisa	34

INTRODUÇÃO

A principal função da bexiga é a de agir como um órgão de armazenamento de curto tempo para a urina, enquanto mantém sua composição similar àquela gerada pelos rins [1].

A bexiga se desenvolve a partir do seio urogenital, que é um tubo endodermal derivado do intestino terminando com uma expansão caudal chamada cloaca. O septo urorretal subdivide a cloaca em seio urogenital anterior e canal anorretal posterior. Sua origem embriológica é comum ao do terço inferior da vagina e do restante do trato urinário [2, 3].

A origem e o papel do trígono da bexiga permanecem controversos: os ductos de Wolff se fundem com a cloaca e permanecem com o seio urogenital. Dessa forma, o trígono se formaria a partir dos ductos de Wolff enquanto o restante da bexiga se forma a partir do endoderma do seio urogenital [4].

Recentemente, alguns estudos sugerem que o trígono é formado predominantemente de células musculares lisas da bexiga, com contribuição limitada de fibras longitudinais do ureter [5].

Durante o desenvolvimento, o músculo liso se diferencia a partir do mesênquima da bexiga. Um sinal do epitélio é necessário para dar início a essa diferenciação [4].

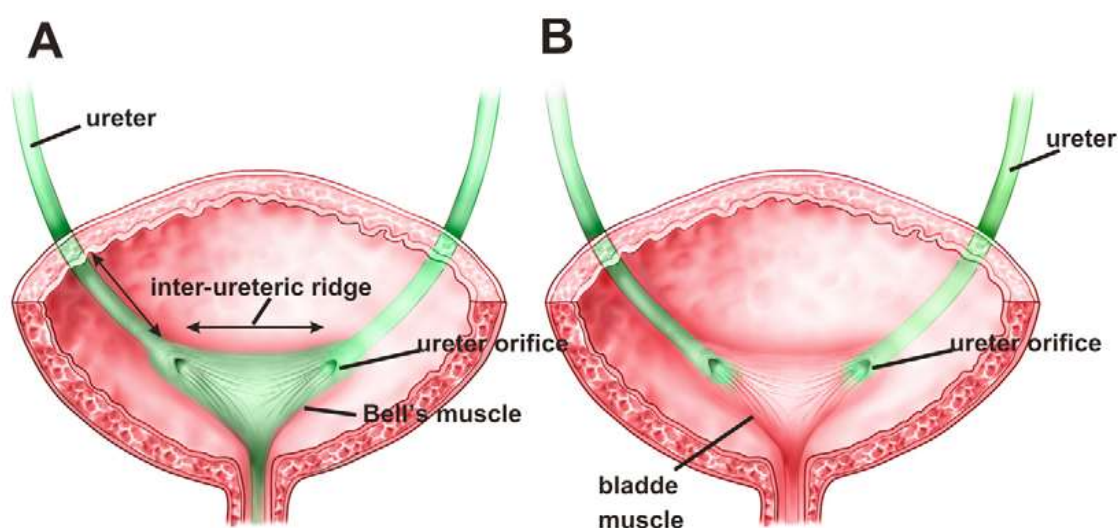


Figura 1 – Modelos de formação embriológica do trígono: A) Formado por parte do ureter, considerado independente da bexiga. B) Formado pelo músculo da bexiga com pequena contribuição do ureter – retirado de Vianna, 2007 [5].

A bexiga pode ser dividida em dois componentes principais: o corpo, localizado

entre os orifícios ureterais e a base consistindo no trígono, junção uretrovesical, detrusor e parede anterior da bexiga [6].

É composta de músculo liso e fibras colágenas. A complacência depende do balanço entre músculo liso, fibras colágenas e fibras elásticas [7].

A parede muscular é composta de músculo liso, o músculo detrusor, que é funcionalmente e estruturalmente diferente da musculatura do trígono e da uretra e é responsável pela contratilidade da bexiga. Normalmente, o espaço intracelular do músculo detrusor é mínimo. Miofilamentos e corpos densos estão encarregados da contração [6,7].

O urotélio refere-se a células especializadas que recobrem a pelve renal, ureter, bexiga e uretra em condições normais. É um epitélio transicional de origem endodermal, composto de três camadas com tipos celulares morfologicamente distintos. A camada basal, com células entre cinco e dez μm de diâmetro, a camada intermediária, com diâmetro de vinte μm e a camada superficial com células hexagonais (umbrella cells) que, na dependência do grau de estiramento da bexiga, alteram-se entre cinquenta e cento e vinte μm de diâmetro. A reposição de células se dá por fusão da camada basal para formar as células intermediárias e fusão das intermediárias para formar as umbrella cells [1, 8].

Enquanto as células da camada basal não têm aspectos consideráveis em sua morfologia, as umbrella cells têm dois aspectos únicos: a membrana apical é coberta por placas que são separadas por uma membrana plasmática. Essa membrana faz o folheto da membrana apical parecer mais grosso que o folheto interno. Além disso, o citoplasma tem densidade maior que a do citoplasma das vesículas que estão associadas com a rede de fibrilas finas [1, 9].

Recentemente, uma camada de células intersticiais com característica de miofibroblastos situadas imediatamente abaixo do urotélio foi identificada. O aumento no número de miofibroblastos é associado ao aumento da atividade espontânea da bexiga, como acontece na hiperatividade do detrusor [10].

O sistema contrátil envolve uma complexa interação entre as partes anatômicas e estruturais do trato urinário e o controle do sistema nervoso. Durante o enchimento as células musculares devem relaxar e alongar em um curto intervalo e tempo. Durante o esvaziamento, a geração de força e o encurtamento devem ser iniciados rapidamente e sincronicamente [6].

O controle consciente da função vesical aparece na primeira infância através de um complexo sistema de arcos reflexos no cérebro e na medula raquiana [11].

A integridade dos ligamentos pubouretrais, músculos pubococcígeos e do tecido

conjuntivo da fáscia endopélvica são importantes na continência urinária feminina [2].

Colágeno e fibras elásticas são os principais componentes da matriz extracelular (MEC). Estes elementos estão presentes na parede da bexiga e estão diretamente relacionados com a sua complacência [12].

Os fibroblastos estão envolvidos na regulação da síntese do colágeno e de outras proteínas da matriz extracelular em resposta à tensão mecânica. O aumento da tensão mecânica “estica” os fibroblastos com aumento coordenado da produção de colágeno e diminuição da produção de colagenase. O contrário também acontece: a redução da tensão mecânica causa colapso dos fibroblastos com redução da produção de colágeno e aumento da produção de matriz metaloproteinases (MMP) resultando na fragmentação do colágeno [13].

O estiramento é o estímulo relevante que regula o transporte através das membranas. Durante o estágio inicial de enchimento, as umbrella cells podem ter discretas funções nesta regulação. Mudanças no meio ambiente das umbrella cells alteram a coordenação do transporte iônico através das membranas. [14].

A superfície luminal do urotélio é recoberta por uma camada de glicosaminoglicanos (GAG). Esta camada permite que a bexiga minimize os efeitos da composição da urina durante o armazenamento [1].

Uma propriedade essencial à função normal da bexiga é que os constituintes normais da bexiga não podem comprometer as propriedades de barreira do urotélio. Assim, mudanças nas taxas fisiológicas de pH, cálcio ou uréia têm efeitos mínimos na barreira urotelial. Concentrações não fisiológicas dessas substâncias como aumento da uréia ou diminuição de cálcio aumentam a permeabilidade do urotélio mas, quando retornam aos valores normais, a permeabilidade retorna ao normal [1].

Os componentes majoritários da matriz extracelular, como colágenos, fibras elásticas, proteoglicanos e GAG desempenham um papel relevante nas propriedades biomecânicas e viscoelásticas da parede vesical, principalmente em relação à complacência desse tecido [15].

A biossíntese do colágeno e sua organização são moduladas pelos esteróides ovarianos e o hipoestrogenismo está associado a alterações no metabolismo do tecido conjuntivo. Estudos prévios identificaram receptores de estrogênio em tecido conjuntivo e células musculares lisas do trígono da bexiga, uretra, mucosa vaginal, músculo elevador do ânus e ligamento uterossacro [2].

O estrogênio estimula o crescimento, o fluxo sanguíneo e a retenção de água em

diversos órgãos sexuais e também influencia a diferenciação, maturação e função de vários tecidos incluindo o sistema nervoso central e periférico [16].

GAG são macromoléculas heteropolissacarídeas encontradas na matriz extracelular, altamente aniônicas responsáveis por inúmeras propriedades fisicoquímicas dos proteoglicanos, que são complexos glicoconjugados compostos por uma proteína central ligada a várias cadeias de GAG [17].

Os principais grupos de GAG distinguidos através dos seus resíduos são: Ácido hialurônico; Heparan sulfato; Queratan sulfato; Condroitin sulfato e Dermatan sulfato [18].

Os GAG são altamente hidrófilos e, devido a isto, ocupam um grande volume em relação a sua massa, formando um gel mesmo em baixas concentrações. Sua carga iônica altamente negativa atrai uma “nuvem” de cátions, que são osmoticamente ativos, carreando uma grande quantidade de água que irá embeber a matriz extracelular deixando-a como se fosse um gel. Esta particularidade capacitará a MEC a resistir a forças de compressão, facilitará a migração celular e promoverá a lubrificação necessária às articulações [18].

Os proteoglicanos e os GAG são importantes na determinação das propriedades biomecânicas dos tecidos. Sabe-se que estão envolvidos na determinação do diâmetro das fibras colágenas assim como na manutenção da hidratação dos tecidos, já que produzem um ambiente hidratado ao redor das células e no tecido conjuntivo [19, 20].

Além disso, as cadeias de GAG que recobrem a superfície urotelial são consideradas como um importante regulador da permeabilidade da parede vesical, e estão também associadas à inibição da aderência bacteriana e da formação de cálculos [21].

Como acontece em diversos órgãos e tecidos de indivíduos do sexo feminino, o desenvolvimento e o crescimento normal da bexiga também são afetados por hormônios sexuais.

Em ratas adultas que foram ooforectomizadas antes da puberdade, a composição da MEC vesical difere acentuadamente do padrão verificado nos animais controle [22]. Por outro lado, em investigação em que foram utilizadas amostras provenientes de adultos jovens, foram analisadas a composição de colágeno e GAG na camada urotelial de mulheres e foi demonstrado que não há diferenças significativas em relação ao mesmo tecido de homens [23]. Nesse caso, em que se analisou uma porção restrita da bexiga normal obtida de população com faixa etária estreita, o envolvimento de hormônios femininos na composição vesical é menos aparente. Entretanto, esses achados têm importantes implicações para o conhecimento da fisiopatologia da cistite intersticial e não

excluem a possibilidade de participação de hormônios femininos nessa doença.

O estrogênio afeta o conteúdo e o metabolismo do colágeno diferentemente na dependência da função do órgão envolvido. Durante a vida reprodutiva, a relação entre formação e degradação de colágeno permanece estável. Com o envelhecimento, o *turnover* de colágeno apresenta-se diminuído, assim, a concentração de colágeno aumenta após a menopausa em diversos tecidos e suas fibras aumentam em diâmetro. Esse processo acontece em associação à diminuição na relação proteoglicanos/ colágeno e dá origem a um tecido aumentado em resistência, porém diminuído em elasticidade [2].

Todos esses dados indicam que a MEC e hormônios femininos desempenham um importante papel tanto na função normal como na patologia da bexiga. No entanto, a composição da MEC vesical na mulher não é bem conhecida, sobretudo se considerarmos as camadas muscular e urotelial separadamente. Também não são conhecidas as possíveis diferenças nessa composição entre faixas etárias que apresentam diferentes perfis de hormônios sexuais circulantes, como a infância, a puberdade, e a pós-menopausa. Os poucos trabalhos sobre a composição de proteoglicanos e GAGs na bexiga de humanos utilizam apenas tecidos de adultos e não analisam separadamente os diferentes sexos [24, 25].

1 OBJETIVO

Determinar composição da MEC em amostras normais de bexigas de mulheres através da análise bioquímica de colágeno e GAG em amostras obtidas de indivíduos de diferentes faixas etárias, variando de crianças a idosas, analisando separadamente as camadas muscular e urotelial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto em 12 de junho de 2008, conforme resolução n°. 196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos, com o n°. 1871-CEP/HUPE (ANEXO)

2.1 Amostras de tecido

Amostras da cúpula da bexiga foram obtidas durante autópsia de mulheres que tiveram morte acidental, que não apresentavam sinais de doença metabólica ou de alterações macroscópicas de vias urinárias, e cujo tempo post-mortem era inferior a 6 horas. Imediatamente após a excisão, as amostras foram fixadas em acetona por 48 horas e em seguida dissecadas para se obter as camadas urotelial e muscular [23]. Em amostras de parede de bexiga assim fixadas, a camada urotelial é facilmente destacável da camada muscular. Essas duas camadas de tecido, foram posteriormente clivadas em fragmentos de aproximadamente 3x3 mm e delipidadas por meio de duas a quatro trocas de 24 horas cada em clorofórmio:metanol (2:1, v/v), dependendo da quantidade de tecido adiposo no material. As amostras foram então secas em estufa à 60°C e pesadas em balança analítica.

As amostras foram reunidas nos seguintes grupos etários: (a) crianças pré-puberes – 5 amostras – 7 a 9 anos (média= 8,2) ; (b) menacme – 6 amostras – 18 a 28 anos (média=22,5) e (c) pós-menopausadas – 6 amostras – 67 a 88 anos (média= 75 anos).

2.2 Extração de GAG

A extração de GAG a partir de amostras de tecido foi feita de acordo com protocolo publicado anteriormente [26]. Resumidamente, o tecido delipidado e seco (30 a 160 mg) é incubado com papaína bicristalizada (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) em tampão acetato 100mM, pH 5.0, contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, por 24 horas, à 60°C. Após centrifugação, é adicionado cloreto de cetilpiridínio (CPC) ao sobrenadante para precipitação dos GAGs. As amostras são novamente centrifugadas e o complexo CPC-GAG no pellet é dissociado com NaCl 2M. Os GAGs são por fim precipitados ao se acrescentar dois volumes de etanol absoluto às amostras, que são então mantidas à 4°C por 24 horas. Após uma série de centrifugações e lavagens do *pellet*, obtém-se a preparação final de GAG total, a qual será utilizada nas análises subsequentes.

2.2.1 Quantificação de GAG total

A quantificação de GAG total foi feita por meio da dosagem do ácido hexurônico, utilizando o método do carbazol [27] e tendo glucurone lactone (Sigma) como padrão. A concentração de GAG no tecido vesical foi expressa em microgramas de ácido hexurônico por miligrama de tecido delipidado e seco.

2.2.2 Determinação da concentração relativa dos GAG

A quantidade relativa dos GAG sulfatados (condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato) foi determinada por eletroforese em gel de agarose a 0.5% em tampão 1,3-diaminopropano 50mM, pH 9.0 [28]. Após corrida a 80 V, o gel é fixado em brometo de N-Cetil-N,N,N-trimetilamônio 0.1% e corado em azul de toluidina 0.1%. A placa de eletroforese foi então digitalizada em scanner de mesa e a proporção de GAGs é determinada por densitometria das bandas usando o programa ImageJ versão 1.36 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). A identificação das bandas na placa de agarose foi feita com base na comparação com a migração de padrões de GAG comerciais (Sigma) e na susceptibilidade a degradações específicas por GAG-liases [26].

2.3 **Quantificação do colágeno total**

A concentração de colágeno total no tecido foi determinada pela dosagem do aminoácido hidroxiprolina. Amostras de tecido delipidado e seco foram primeiramente submetidas à hidrólise ácida em HCl 6N por 18 horas a 118°C como previamente descrito (Cabral et al., 2003), e a dosagem de hidroxiprolina foi então realizada segundo o método de Bergman e Loxley [29]. O resultado foi expresso em microgramas de hidroxiprolina por miligrama de tecido seco.

2.4 **Histologia**

Parte das amostras das camadas muscular e urotelial fixadas em acetona foram re-hidratadas em soro fisiológico por 12 horas a 4°C e em seguida fixadas em formol tamponado a 10%. As amostras foram processadas rotineiramente para inclusão em

parafina e então coradas pelo tricrômico de Masson. Esse procedimento foi utilizado para verificar a composição histológica das camadas vesicais em estudo.

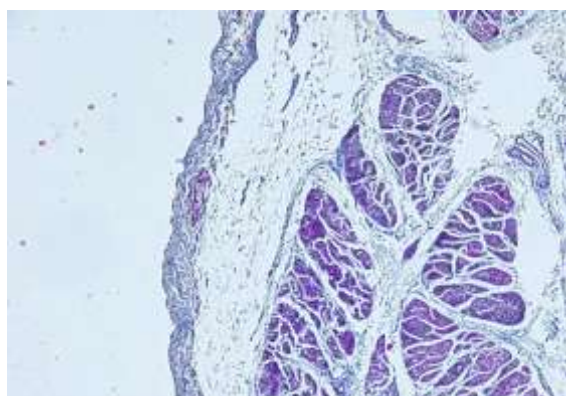
2.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão para cada um dos grupos etários. Variação dos parâmetros bioquímicos entre os grupos será determinada por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni para comparação múltipla de médias. A significância estatística foi considerada quando $p < 0.05$.

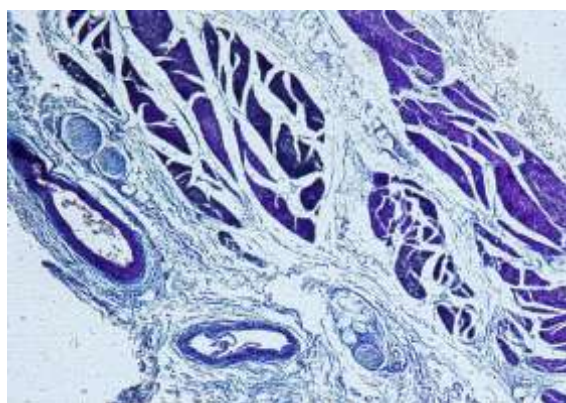
3 RESULTADOS

3.1 Histologia

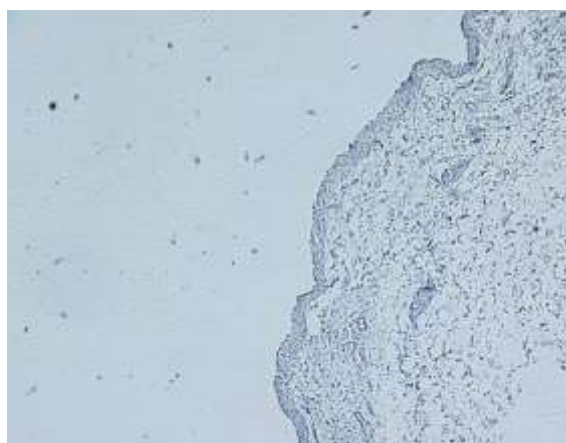
Foi utilizada a coloração pelo tricômico de Masson para verificação da integridade das camadas durante a dissecação (Figura 2).



A



B



C

Figura 2 – Fotomicrografias de parede vesical. A – parede da bexiga. B- camada muscular C – urotélio. Coloração: Tricrômico de Masson – Aumento: 100x.

3.2 Camada muscular

A quantificação média de colágeno (Tabela 1) para o grupo de infância foi de $44,49 \pm 9,39$ μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco. Para o grupo de menacme, a quantificação foi de $37,27 \pm 9,4$ μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco.

Para o grupo de pós-menopausa, a quantificação média foi de $44,35\mu\text{g} \pm 9,07$ μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco.

Nossos resultados mostraram, em relação ao conteúdo de colágeno, que não houve diferença entre os grupos ($p=0,34$).

Colágeno na camada muscular

	Média e desvio padrão
Infância	$44,49 \pm 9,39$
Menacme	$37,27 \pm 9,40$
Pós-menopausa	$44,35 \pm 9,07$

Tabela 1 –Concentração média de colágeno de camada muscular de bexiga de mulheres na infância, no menacme e na pós-menopausa. A análise pela ANOVA ($p>0,05$) não mostrou diferença significativa entre os três grupos. Resultados expressos em μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco com média e desvio-padrão.

A concentração de GAG (Tabela 2) foi, em média, de $1,441 \pm 1,32$ μg de ácido hexurônico/ mg de tecido seco para o grupo de infância.

Para o grupo de menacme, a concentração de GAG foi, em média, de $0,85 \pm 1,03$ μg de ácido hexurônico/ mg de tecido seco.

Para o grupo de pós-menopausa, a concentração de GAG foi, em média, de $0,36 \pm 0,04$ μg de ácido hexurônico/ mg de tecido seco.

Não houve diferença ($p= 0,19$) entre os grupos.

GAG na camada muscular

	Média e desvio padrão
Infância	1,441 ± 1,32
Menacme	0,85 ± 1,03
Pós-menopausa	0,36 ± 0,04

Tabela 2 – concentração média de GAG da camada muscular de bexiga de mulheres na infância, no menacme e na pós-menopausa. A análise pela ANOVA ($p > 0,05$) não mostrou diferença significativa entre os três grupos. Resultados expressos em μg de ácido hexurônico/mg de tecido seco com média e desvio-padrão.

Para a camada muscular, a análise qualitativa dos GAG não demonstrou diferença entre os 3 grupos tanto para condroitin sulfato ($19,5 \pm 6,34\%$ vs. $21,04 \pm 6,28\%$ vs. $16,14 \pm 7,33\%$, $p > 0,05$), dermatan sulfato ($48,99 \pm 3,43\%$ vs. $44 \pm 2,51\%$ vs. $44,45 \pm 8,34\%$, $p > 0,05$) e heparan sulfato ($30,78 \pm 4,4\%$ vs $35,69 \pm 6,55\%$ vs. $39,38 \pm 13,38\%$, $p > 0,05$), respectivamente para infância, menacme e pós-menopausa (Tabela 3).

GAG sulfatados na camada muscular

	CS	DS	HS
Infância	19,5 ± 6,34	48,99 ± 3,43	30,78 ± 4,4
Menacme	21,04 ± 6,28	44 ± 2,51	35,69 ± 6,55
Pós-menopausa	16,14 ± 7,33	44,45 ± 8,34	39,38 ± 13,38

Tabela 3 – análise qualitativa dos GAG sulfatados da camada muscular de bexiga de mulheres na infância, no menacme e na pós-menopausa não mostrou diferença entre os grupos na análise pela ANOVA ($p > 0,05$) para condroitin sulfato (CS), dermatan sulfato (DS) e heparan sulfato (HS). Resultados expressos em porcentagem com média e desvio-padrão.

3.3 Camada urotelial

A quantificação média de colágeno (Tabela 4) para o grupo de infância foi de $78,89 \pm 8,45$ μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco. Para o grupo de menacme, a quantificação foi de $74,98 \pm 10,17$ μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco.

Para o grupo de pós-menopausa, a quantificação média foi de $77,08 \pm 12,34$ μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco.

Nossos resultados mostraram que, em relação ao conteúdo de colágeno, não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$).

Colágeno no urotélio

	Média e desvio padrão
Infância	$78,89 \pm 8,45$
Menacme	$74,98 \pm 10,17$
Pós-menopausa	$77,08 \pm 12,34$

Tabela 4 –Concentração média de colágeno do urotélio de bexiga de mulheres na infância, no menacme e na pós-menopausa. A análise pela ANOVA não mostrou diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Resultados expressos em μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco com média e desvio-padrão.

A concentração de GAG (Tabela 5) foi, em média, de $2,29 \pm 1,32$ μg de ácido hexurônico/ mg de tecido seco para o grupo de infância.

Para o grupo de menacme, a concentração de GAG foi, em média, de $1,78 \pm 1,62$ μg de ácido hexurônico/ mg de tecido seco.

Para o grupo de pós-menopausa, a concentração de GAG foi, em média, de $0,21 \pm 0,12$ μg de ácido hexurônico/ mg de tecido seco.

Houve significativa diminuição na concentração de GAG no grupo da pós-menopausa, com $p < 0,01$ quando comparado a infância e quando comparado ao de menacme ($p < 0,04$).

GAG no urotélio

	Média e desvio padrão
Infância	2,29 ± 1,32
Menacme	1,78 ± 1,62
Pós-menopausa	0,21 ± 0,12

Tabela 5 – concentração média de GAG de urotélio da bexiga de mulheres na infância, no menacme e na pós-menopausa. A análise pela ANOVA ($p < 0,03$) mostrou diferença significativa entre todos os grupos e o teste de Bonferroni mostrou diferença no grupo da pós-menopausa em relação ao grupo da infância ($p < 0,01$) e ao grupo do menacme ($p < 0,04$). Resultados expressos em μg de ácido hexurônico/ mg de tecido seco com média e desvio-padrão.

A análise qualitativa dos GAG não demonstrou diferença entre os 3 grupos tanto para condroitin sulfato (26,32% vs 17,49% vs. 19,04%, $p = 0,34$), dermatan sulfato (58% vs. 56,65% vs. 56,31%, $p = 0,97$) e heparan sulfato (15,66% vs. 25,83% vs. 27,28%, $p = 0,32$), respectivamente para infância, menacme e pós-menopausa (Tabela 6).

GAG sulfatados no urotélio

	CS	DS	HS
Infância	26,32 ± 8,21	58 ± 5,10	15,66 ± 4,52
Menacme	17,49 ± 2,14	56,65 ± 13,46	25,83 ± 15,35
Pós-menopausa	19,04 ± 9,10	56,31 ± 6,74	27,28 ± 2,63

Tabela 6 – análise qualitativa dos GAG sulfatados no urotélio da bexiga de mulheres na infância, no menacme e na pós-menopausa. A análise pela ANOVA ($p > 0,05$) não mostrou diferença significativa entre todos os grupos para condroitin sulfato (CS), dermatan sulfato (DS) e heparan sulfato (HS).

4 DISCUSSÃO

A deficiência estrogênica causa atrofia dos epitélios do trato urogenital. Receptores de estrogênio foram demonstrados em vagina, uretra, bexiga e músculos do assoalho pélvico. Assim sendo, o estrogênio tem um efeito marcante no trato urinário [7]. Evidências epidemiológicas e estudos em animais demonstram que o estrogênio exerce um importante papel na proliferação celular em tecidos responsivos a este hormônio [8].

Nosso trabalho, então, procurou demonstrar como se comportaria a matriz extracelular da bexiga de mulheres em diferentes fases da vida, com diferentes perfis hormonais.

As alterações de atrofia urogenital aumentam com o aumento dos anos de pós-menopausa e são atribuídas, não só ao declínio dos níveis de estrogênio, como também à diminuição dos níveis de androgênio. Numerosos estudos demonstraram que a administração de estrogênio resulta em aumento da musculatura lisa da bexiga, levando a melhora das funções da mesma [30].

A bexiga é constituída principalmente de fibras musculares lisas e colágeno. A musculatura lisa é responsável pela contratilidade da bexiga e o colágeno é o maior componente da MEC das bexigas com perda de elasticidade. A complacência é dependente do músculo liso, colágeno, fibras elásticas e suas relações [7].

Yang et al. [7] mostraram, em ratas ooforectomizadas, degeneração da estrutura da bexiga com reversão destas alterações com a terapia de reposição estrogênica.

A influência do estrogênio no tecido conjuntivo pode ser dependente da regulação do metabolismo do colágeno. O estrogênio não somente estimula a biossíntese fibrilar do colágeno como também aumenta a síntese, secreção e atividade da matrizmetaloproteinase (MMP), que pode degradar numerosos componentes do tecido conjuntivo, incluindo o próprio colágeno [31].

Alguns estudos prévios mostraram que, em coelhos ooforectomizados, ocorria uma significativa atrofia do músculo liso e uma significativa hipertrofia após administração de estrogênio [32].

Valeri et al.[16], mostraram que o estradiol em altas concentrações reduziu a contratilidade de bexigas de ratos machos em resposta a estímulos elétricos ou farmacológicos.

Estudos experimentais demonstraram alterações estruturais na bexiga com o envelhecimento. Estas alterações incluíam a hipertrofia da musculatura lisa e aumento do

colágeno entre as células musculares além de mudanças nas concentrações relativas de colágeno I e III [33].

Estas alterações no conteúdo de colágeno não foram encontradas no nosso estudo, que não mostrou diferença significativa entre os grupos nas camadas urotelial ou muscular.

O aumento do estrogênio aumenta a atividade da MMP, que é responsável pela degradação dos componentes da matriz extracelular, como o colágeno e os proteoglicanos [34].

Sendo assim, seria esperado um conteúdo de colágeno diminuído em jovens, que possuiriam uma matriz sob estímulo estrogênico. Talvez haja uma alteração qualitativa, com concentrações diferentes para diferentes tipos de colágeno, o que poderia ter influência na complacência da bexiga.

Yang et al. [7] mostraram, através de estudos histológicos, hiperplasia de fibras colágenas e atrofia de músculo liso em ratas ooforectomizadas, mostrando que estas alterações poderiam interferir na transmissão elétrica, aumentando a instabilidade vesical, influenciando na contratilidade do músculo detrusor.

Há evidências que o músculo detrusor é caracterizado principalmente por receptores muscarínicos M2 e M3. O receptor M3 é o maior subtipo da bexiga, sendo responsável pela contração [36]. Matsumoto et al. [36], demonstraram que o tratamento de longo prazo com estrogênio diminui os receptores M3 no músculo detrusor e aumenta sua capacidade funcional. Esta ação do estrogênio poderia explicar a maior ocorrência de bexiga hiperativa na pós-menopausa.

O tratamento com estradiol aumenta a densidade do músculo liso e retorna a relação fibras musculares/ músculo liso a níveis normais, revelando a influência do estrogênio na função da bexiga, mediada pelos receptores de estrogênio [7].

Cayan et al. [30] demonstraram que a adição de testosterona ao estrogênio na terapia de reposição hormonal aumentava a capacidade e complacência da bexiga e também do conteúdo de músculo liso de ratas. Lin et al. [37], analisando bexigas de coelhos, concluíram que a testosterona pode ser tão importante quanto o estrogênio em controlar respostas contráteis da bexiga.

Hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa da bexiga podem ocorrer em resposta à obstrução urinária, como, por exemplo, na hiperplasia prostática benigna ou após descentralização em injúrias da medula espinal [6].

Alterações estruturais na parede da bexiga são comuns em obstruções uretrais, sendo a hiperplasia benigna da próstata uma das causas mais frequentes de obstrução em

humanos.

Kondo e Susset [38], não verificaram alterações no colágeno de bexiga de cachorros submetidos a obstrução infravesical. Uvelius et al. [39] descreveram diminuição do conteúdo de colágeno no músculo detrusor afetado pela obstrução infravesical. Contrariamente, Dixon et al. [40] mostraram aumento de colágeno em bexiga de porcos com a mesma patologia.

Rubinstein et al. [12] observaram aumento dos componentes do tecido conjuntivo como colágeno e fibras elásticas no músculo detrusor de bexigas de homens com obstrução infravesical.

Devido às suas interações com o colágeno e outros componentes da matriz extracelular, é possível que os GAG tenham participação nas propriedades de complacência da parede vesical.

Nossos resultados em relação ao GAG da camada muscular não mostraram diferença, mas apontam uma tendência a redução no grupo de pós-menopausa. As médias apontam para uma maior concentração de GAG na camada muscular na infância em relação à pré-menopausa (1,31 vs 0,35 μg de hidroxiprolina/mg de tecido seco), porém com valores muito heterogêneos.

Os GAG desempenham importante papel estrutural na matriz extracelular, regulando a permeabilidade e tendo uma função antiinflamatória na parede e na superfície da bexiga [41].

Em relação ao urotélio, nossos resultados não mostraram diferença entre os grupos para colágeno. Quanto ao GAG, houve diferença entre os grupos, com redução acentuada no grupo de idosas.

Nos estudos de bexigas de ratas castradas de Deus et al. [42], o hipoestrogenismo determinou menor conteúdo de glicosaminoglicanos sulfatados na bexiga, o que seria compatível com nossos resultados.

Siracusano et al., [43] analisando a excreção urinária de glicosaminoglicanos em mulheres com hiperatividade do detrusor, evidenciaram níveis significativamente menores quando comparadas a mulheres sem esta patologia, postulando ser este resultado consequência a uma possível isquemia da camada urotelial da bexiga secundária à hipercontratilidade muscular.

O metabolismo de GAG tecidual é afetado por estrogênios. Em ratas ooforectomizadas, a composição de GAG na bexiga e uretra está alterada, porém a administração de TRH a esses animais restabelece as concentrações teciduais normais [42].

Por outro lado, se a ooforectomia é feita antes da puberdade, a restrição hormonal leva a importantes alterações na composição da matriz extracelular vesical com rigidez da parede, o que pode ter efeitos marcantes sobre a função da bexiga [22].

Quando estimulado apropriadamente, o urotélio pode sofrer grande crescimento, particularmente durante processos de reparação e carcinogênese. Mais de 90% dos cânceres de bexiga situam-se no urotélio. Muitas evidências ligam o estrogênio à carcinogênese da bexiga. Altos níveis de receptores β de estrogênio foram encontrados em carcinoma de células transitórias da bexiga humana. Também, a estrogenização neonatal de ratos machos aumenta a expressão de receptores β de estrogênio e induz a carcinogênese urogenital [8].

Outros estudos mostraram que a incontinência urinária [44, 45] e o câncer [25] estão igualmente associados a modificações na MEC da parede vesical. Disfunções na MEC urotelial, por sua vez, têm sido implicadas na patogenia da cistite intersticial [46], uma doença que tem incidência muito maior em mulheres do que em homens.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a formação de cálculos é inibida pela presença de GAG [47]. Isto explica, por exemplo, o fato de que crianças têm baixa incidência de urolitíase, já que estas, quando comparadas a adultos, excretam quantidades bem maiores de GAG urinários [48].

Mitrano et al. [49] observaram que a concentração de GAG da parede da bexiga de ratas aumentava com a progressão da gestação. Este aumento poderia explicar a incidência não alterada de urolitíase na gravidez, embora essa condição seja acompanhada de fatores que aumentam o risco para a formação de cálculos, como estase urinária, desidratação, hipercalcúria, e hiperuricosúria [50].

O proteoglicano predominante no urotélio normal é o decorin, que parece ter um papel chave na organogênese e em interações entre mesênquima e epitélio [51].

Nossos resultados em relação aos GAG sulfatados não evidenciaram diferenças entre os grupos para condroitin sulfato, dermatan sulfato e heparan sulfato, com predomínio de dermatan sulfato tanto na camada muscular quanto na urotelial.

Kyker, [52] analisando a distribuição de condroitin sulfato em vários modelos de danos uroteliais mostrou que o urotélio normal liga-se muito pouco ao condroitin sulfato, ao contrário do urotélio danificado.

Devido às suas inúmeras limitações principalmente no que concerne às questões éticas, a bexiga humana é frequentemente estudada somente em condições patológicas, principalmente em casos de câncer. Os estudos em bexigas normais geralmente são

realizados em animais experimentais. Este foi um estudo preliminar de avaliação bioquímica de bexigas humanas normais, sendo necessários novos estudos para conclusões definitivas.

5 CONCLUSÕES

Os glicosaminoglicanos da camada urotelial estão substancialmente diminuídos na bexiga de mulheres na pós-menopausa.

REFERÊNCIAS

- 1) Lewis SA. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Jun;278(6):F867-74.
- 2) Trabucco E, Soderberg M, Cobellis L, Torella M, Bystrom B, Ekman-Ordeberg G, et al. Role of proteoglycans in the organization of periurethral connective tissue in women with stress urinary incontinence. *Maturitas*. 2007 Dec 20;58(4):395-405.
- 3) Tanaka ST, Ishii K, Demarco RT, Pope Jc, Brock JW, 3rd, Hayward SW. Endodermal origin of bladder trigone inferred from mesenchymal-epithelial interaction. *J Urol*. Jan;183(1):386-91.
- 4) Cao M, Liu B, Cunha G, Baskin L. Urothelium patterns bladder smooth muscle location. *Pediatr Res*. 2008 Oct;64(4):352-7.
- 5) Viana R, Batourina E, Huang H, Dressler GR, Kobayashi A, Behringer RR, et al. The development of the bladder trigone, the center of the anti-reflux mechanism. *Development*. 2007 Oct;134(20):3763-9.
- 6) Andersson KE, Pehrson R. CNS involvement in overactive bladder: pathophysiology and opportunities for pharmacological intervention. *Drugs*. 2003;63(23):2595-611.
- 7) Yang X, Li YZ, Mao Z, Gu P, Shang M. Effects of estrogen and tibolone on bladder histology and estrogen receptors in rats. *Chin Med J (Engl)*. 2009 Feb 20;122(4):381-5.
- 8) Teng J, Wang ZY, Jarrard DF, Bjorling DE. Roles of estrogen receptor alpha and beta in modulating urothelial cell proliferation. *Endocr Relat Cancer*. 2008 Mar;15(1):351-64.
- 9) Kreplak L, Fudge D. Biomechanical properties of intermediate filaments: from tissues to single filaments and back. *Bioessays*. 2007 Jan;29(1):26-35.
- 10) Sui GP, Wu C, Roosen A, Ikeda Y, Kanai AJ, Fry CH. Modulation of bladder myofibroblast activity: implications for bladder function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Sep;295(3):F688-97.
- 11) Burnett AL. Nitric oxide control of lower genitourinary tract functions: a review. *Urology*. 1995 Jun;45(6):1071-83.
- 12) 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.
- 13) Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol*. 2008 May;144(5):666-72.
- 14) Yu W, Khandelwal P, Apodaca G. Distinct apical and basolateral membrane requirements for stretch-induced membrane traffic at the apical surface of bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell*. 2009 Jan;20(1):282-95.

- 15) 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.
- 16) Valeri A, Brain KL, Young JS, Sgaragli G, Pessina F. Effects of 17beta-oestradiol on rat detrusor smooth muscle contractility. *Exp Physiol*. 2009 Jul;94(7):834-46.
- 17) Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:609-52.
- 18) Zubay G. Studies on the lead-catalyzed synthesis of aldopentoses. *Orig Life Evol Biosph*. 1998 Feb;28(1):13-26.
- 19) Pinheiro MC, Mora OA, Caldini EG, Battlehner CN, Joazeiro PP, Toledo OM. Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy. *Cell Biol Int*. 2005 Jun;29(6):458-71.
- 20) Hurst RE, Moldwin RM, Mulholland SG. Bladder defense molecules, urothelial differentiation, urinary biomarkers, and interstitial cystitis. *Urology*. 2007 Apr;69(4 Suppl):17-23.
- 21) Dell JR, Butrick CW. Multimodal therapy for painful bladder syndrome/interstitial cystitis. *J Reprod Med*. 2006 Mar;51(3 Suppl):253-60.
- 22) Cabral CA, Sampaio FJ, 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 Dec;170(6 Pt 1):2512-6.
- 23) Maroclo MV, Pereira SD, Sampaio FJ, Cardoso LE. Urinary glycosaminoglycan excretion during the menstrual cycle in normal young women. *J Urol*. 2005 May;173(5):1789-92.
- 24) Hurst RE, Zebrowski R. Identification of proteoglycans present at high density on bovine and human bladder luminal surface. *J Urol*. 1994 Nov;152(5 Pt 1):1641-5.
- 25) De Klerk DP, Human HJ, De Klerk JN. The effect of 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 beta-diol and 17 beta-estradiol on the adult and immature chacma baboon prostate. *Prostate*. 1985;7(1):1-12.
- 26) Cardoso LE, Erlich RB, Rudge MC, Peracoli JC, Mourao PA. A comparative analysis of glycosaminoglycans from human umbilical arteries in normal subjects and in pathological conditions affecting pregnancy. *Lab Invest*. 1992 Nov;67(5):588-95.
- 27) Taylor K A, Buchanan-Smith JG: A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Anal Biochem* 1992; 201: 190-196.
- 28) Dietrich CP, Dietrich SM. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem*. 1976 Feb;70(2):645-7.

- 29) Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxiprolin. *Anal Biochem.* 1963 35:1961- 5.
- 30) Cayan F, Tek M, Balli E, Oztuna S, Karazindiyanoğlu S, Cayan S. The effect of testosterone alone and testosterone + estradiol therapy on bladder functions and smooth muscle/collagen content in surgically menopause induced rats. *Maturitas.* 2008 Jul-Aug;60(3-4):248-52.
- 31) Rechberger T, Skorupski P. The controversies regarding the role of estrogens in urogynecology. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45 Suppl 1:S17-21.
- 32) Aikawa K, Sugino T, Matsumoto S, Chichester P, Whitbeck C, Levin RM. The effect of ovariectomy and estradiol on rabbit bladder smooth muscle contraction and morphology. *J Urol.* 2003 Aug;170(2 Pt 1):634-7.
- 33) Rodrigues AA, Jr., Suaid HJ, Tucci S, Jr., Fazan VP, Foss MC, Cologna AJ, et al. Long term evaluation of functional and morphological bladder alterations on alloxan-induced diabetes and aging: experimental study in rats. *Acta Cir Bras.* 2008;23 Suppl 1:53-8; discussion 8.
- 34) Collins JM, Ramamoorthy K, Da Silveira A, Patston P, Mao JJ. Expression of matrix metalloproteinase genes in the rat intramembranous bone during postnatal growth and upon mechanical stresses. *J Biomech.* 2005 Mar;38(3):485-92.
- 35) An JY, Yun HS, Lee YP, Yang SJ, Shim JO, Jeong JH, et al. The intracellular pathway of the acetylcholine-induced contraction in cat detrusor muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2002 Dec;137(7):1001-10.
- 36) Matsumoto M, Watanabe T, Miyagawa I. Effects of long-term estradiol treatment on the contractile response to muscarine and muscarinic receptor subtypes in the bladder of aged female rats. *Biomed Res.* 2007 Dec;28(6):309-14.
- 37) Lin WY, Rehfuß A, Whitbeck C, Juan YS, Chichester P, Mannikarottu A, et al. Effect of letrozole on urinary bladder function in the female rabbit. *BJU Int.* 2007 Dec;100(6):1391-5.
- 38) Kondo A, Susset JG. Viscoelastic properties of bladder. II. Comparative studies in normal and pathologic dogs. *Invest Urol.* 1974 May;11(6):459-65.
- 39) Uvelius B, Mattiasson A. Detrusor collagen content in the denervated rat urinary bladder. *J Urol.* 1986 Nov;136(5):1110-2.
- 40) Dixon JS, Gilpin CJ, Gilpin SA, Gosling JA, Brading AF, Speakman MJ. Sequential morphological changes in the pig detrusor in response to chronic partial urethral obstruction. *Br J Urol.* 1989 Oct;64(4):385-90.
- 41) Budak YU, Huysal K, Guray A. Urinary glycosaminoglycan excretion in patients with primary nocturnal enuresis. *Ital J Pediatr.* 2010 36(1):13.

- 42) de Deus JM, Girao MJ, Sartori MG, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Nader HB, et al. Glycosaminoglycan profile in bladder and urethra of castrated rats treated with estrogen, progesterone, and raloxifene. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Dec;189(6):1654-9.
- 43) Siracusano S, Cucchi A, Ciciliato S, Lampropoulou N, Vittur F. Urinary levels of glycosaminoglycans in patients with idiopathic detrusor overactivity. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2009 Dec;20(12):1477-80.
- 44) Ulmsten U, Falconer C. Connective tissue in female urinary incontinence. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1999 Oct;11(5):509-15.
- 45) Chen BH, Wen Y, Li H, Polan ML. Collagen metabolism and turnover in women with stress urinary incontinence and pelvic prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2002;13(2):80-7; discussion 7.
- 46) Dell JR, Butrick CW. Multimodal therapy for painful bladder syndrome/interstitial cystitis. *J Reprod Med*. 2006 Mar;51(3 Suppl):253-60.
- 47) Hesse A, Wuzel H, Vahlensieck W. Significance of glycosaminoglycans for the formation of calcium oxalate stones. *Am J Kidney Dis*. 1991 Apr;17(4):414-9.
- 48) Miyake O, Yoshimura K, Tsujihata M, Yoshioka T, Koide T, Takahara S, et al. Possible causes for the low prevalence of pediatric urolithiasis. *Urology*. 1999 Jun;53(6):1229-34.
- 49) Mitrano P, Nogueira MD, Feldner PC, Jr., Castro RA, Sartori MG, Nader HB, et al. Metabolic profile of glycosaminoglycans in bladder and urethra of female rats during and after pregnancy. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. Feb;21(2):241-6.
- 50) Swanson SK, Heilman RL, Eversman WG. Urinary tract stones in pregnancy. *Surg Clin North Am*. 1995 Feb;75(1):123-42.
- 51) Hurst RE, Moldwin RM, Mulholland SG. Bladder defense molecules, urothelial differentiation, urinary biomarkers, and interstitial cystitis. *Urology*. 2007 Apr;69(4 Suppl):17-23.
- 52) Kyker KD, Coffman J, Hurst RE. Exogenous glycosaminoglycans coat damaged bladder surfaces in experimentally damaged mouse bladder. *BMC Urol*. 2005;5:4.

ANEXO 1 - Comitê de ética em pesquisa

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



Rio de Janeiro, 10 de setembro de 2008

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof^a. Patrícia Maria C. O. Duque
Para: Aut. Jorge Luiz A. Brollo
Orient. Prof. Luiz Eduardo de M. Cardoso

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1871-CEP/HUPE) " ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR NAS CAMADAS UROTELIAL E MUSCULAR DA PAREDE VESICAL EM MULHRES DE DIFERENTES IDADES " aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof^a. Patrícia Maria C. O. Duque
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa