



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

José Guimarães Gomes


**Estudo quantitativo da matriz extracelular e células do músculo liso de bexiga urinária
após traumatismo raquimedular**

Rio de Janeiro

2011

José Guimarães Gomes

Estudo quantitativo da matriz extracelular e células do músculo liso de bexigas urinária após traumatismo raquimedular.



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: Urogenital.

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Rio de Janeiro

2011

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

G633 Gomes, José Guimarães.

Estudo quantitativo da matriz extracelular e células do músculo liso de bexigas urinária após traumatismo raquimedular / José Guimarães Gomes. 2011. 42 f. : il.

Orientador: Waldemar Silva Costa.

Coorientador: Francisco José Barcellos Sampaio.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências cirúrgicas) –
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bexiga urinária hiperativa – Teses. 2. Matriz extracelular – Teses.
3 Hiperreflexia autônoma. I. Costa, Waldemar Silva. II. Sampaio,
Francisco José Barcellos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-091

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

Assinatura

Data

José Guimarães Gomes

Estudo quantitativo da matriz extracelular e células do músculo liso de bexigas urinária após traumatismo raquimedular

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

Aprovada em 27 de janeiro de 2011.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. André Cavalcante
Hospital Municipal Souza Aguiar - RJ

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

Prof. Dr. Márcio Antônio Babinski
Faculdade de Ciências Médicas - UFF

Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo
Universidade Federal Rural - UFRRJ

Rio de Janeiro

2011

RESUMO

GOMES, José Guimarães. *Estudo quantitativo da matriz extracelular e células do músculo liso de bexigas urinária após traumatismo raquimedular*. 2011, 38 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Lesões na inervação do trato urinário inferior ocasionado por traumatismo raquimedular afetam geralmente o músculo detrusor e o esfíncteres uretrais. Estas alterações acarretam problemas basicamente de incontinência urinária e aumento da pressão intravesical, decorrente deste traumatismo, trazendo consequências para o funcionamento do sistema urinário superior. Quantificar os elementos fibrosos da matriz extracelular e fibras musculares das bexigas neurogênicas hiper-reflexas comparando-as com bexigas normais. Foram utilizadas 6 amostras de bexigas neurogênicas de indivíduos que foram submetidos a cirurgia de reparação por cistoenteroplastia realizados pelo serviço de urologia do Hospital Municipal Souza Aguiar, estas amostras foram fixadas imediatamente em solução tamponada de formalina a 10%. O controle com amostras iguais as do estudo extraída de cadáveres cuja causa morte não relacionava-se ao sistema urogenital macroscopicamente. O material foi submetido as seguintes técnicas histoquímicas: H&E, van Gieson e Resorcina Fucsina resorcina de Weigert com prévia oxidação pela oxona. Imunohistoquímica: anti-elastina. A observação dos cortes corados pelo van Gieson demonstrou uma diminuição significativa do músculo liso de 13% e aumento do colágeno em 72% e as fibras do sistema elástico um aumento de 101%. **Conclusão.** Nas bexigas neurogênicas hiper-reflexas o músculo detrusor e os elementos fibrosos da matriz foram profundamente modificados. As fibras do sistema elástico foram as mais afetadas.

Palavras-chaves: Bexiga urinária, Estereologia, Matriz extracelular, Imunohistoquímica.

ABSTRACT

Lesions on lower urinary tract innervations caused by spinal cord injuries usually affect the detrusor muscle and urethral sphincter. Beside the smooth muscle fibers, the collagen fibers and elastic system fibers, fibrous components of the extracellular matrix of the bladder wall, are strongly related to vesicle bladder compliance. For this reason the aim of this work is to quantify the fibrous elements of the extracellular matrix and muscle fibers of the neurogenic bladder hyperreflexia. Samples of neurogenic bladder were obtained from six men who had previously undergone surgical repair. The control group samples (n=6) were similarly obtained from patients whose deaths were not related to the urogenital system. The samples were stained using the following histochemical techniques: H&E, Van Gieson, Weigert and Sirius Red. Sections stained with Sirius Red were observed under polarization light microscopy to characterize possible different kinds of collagen. Immunohistochemical technique was used to characterize and quantify the elastic system fibers. Quantification analysis was performed by stereological methods. An increase of 72% of the collagen was observed. Nevertheless, the most significant difference observed was the raising of 101% of the elastic system fibers. Contrary the smooth muscle fibers showed a decrease of 13%. In the neurogenic bladder with detrusor hyperreflexia the fibrous elements of the extracellular matrix and smooth muscle fibers were greatly modified. The elastic system fibers seem to be the most affected in this disease.

Key word: Urinary bladder, Stereology, Extracellular matrix, Immunohistochemistry.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa Sr^a Fátima Madi Gomes por sua paciência e pelas horas que fiquei ausente. Aos meus filhos, José Guimarães Gomes Júnior, Fabiana Guimarães Gomes e Vinícius Guimarães Gomes. A minha querida netinha Marcela Guimarães Monteiro ao meu genro Marcelo Monteiro de Barros e noras Gislene Amaro de Albuquerque, Priscila Monteiro Gonçalves. Sem a existência de vocês não seria possível, pois eu não teria fôças para terminar esta grande tarefa passando pelo que passei com relação a minha saúde buscando conciliar a atenção ao curso, a vocês e a vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Waldemar Silva Costa, pela orientação experimental.

Ao Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio, pelo permanente estímulo.

Ao Prof. Dr. André Guilherme Lagreca da C. Cavalcante, pela ajuda científica.

Ao Sr. CMG (FN-RM1) Ubiratan Barbosa Ribeiro dos Santos, pela assessoria na formatação.

A flor rescende o perfume, a luz dá brilho e calor, a voz nos canta um poema, a vida é convite ao amor. Da voz resta-nos promessas, a vida é uma grande ilusão, da flor o odor não se esquece, da luz sombra e solidão.

José Guimarães Gomes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análises estatísticos dos resultados das células do músculo liso.....	29
Tabela 2 - Análises estatísticos dos resultados das fibras do colágeno.....	31
Tabela 3 - Análises estatísticos dos resultados das fibras do sistema elástico.....	33

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Esquema da neurofisiologia da micção.....	16
Figura 2-	Sistema de teste M42.....	27
Figura 3-	Sistema de teste M42 sobre fotomicrografia do músculo liso.....	27
Figura 4 -	Fotomicrografia do detrusor de bexiga normal.....	30
Figura 5 -	Fotomicrografia do detrusor de bexiga neurogênica.....	30
Figura 6 -	Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana normal.....	32
Figura 7 -	Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana neurogênica.....	32
Figura 8 -	Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana normal.....	33
Figura 9 -	Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana neurogênica.....	34
Figura10-	Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana normal.....	34
Figura11-	Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana neurogênica.....	35

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVO	21
2	MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.1	Histoquímica	23
2.1.1	<u>Técnica de van Gieson</u>	23
2.1.2	<u>Técnica de Picro Sirius Red</u>	24
2.1.3	<u>Técnica de Resorcina-Fucsina de Weigert</u>	24
2.1.4	<u>Técnica de Imunohistoquímica</u>	24
2.2	Quantificação	26
2.3	Análise estatística	28
2.4	Aprovação do projeto em Conselho de Ética	28
3	RESULTADOS	29
3.1	Musculatura lisa (Detrusor)	29
3.2	Fibras do sistema colágeno	31
3.2.1	Análise qualitativo	31
3.3	Fibras do sistema elástico	33
4	DISCUSSÃO	36
4.1	Bexiga humana	36
4.2	Fibra muscular	36
4.3	Fibra do colágeno	37
4.4	Fibra do sistema elástico	37
5	CONCLUSÃO	39
6	REFERÊNCIAS	40
	APÊNDICE A – Submissão do trabalho à Neurology & Urodynamics	43
	APÊNDICE B - QUANTITATIVE STUDY OF EXTRACELLULAR MATRIX AND MUSCLE CELLS IN URINARY BLADDER AFTER SPINAL CORD INJURY	44
	ANEXO A – Aprovação do Projeto em Conselho de Ética	58

INTRODUÇÃO

O traumatismo raquimedular vem sendo responsável pelo atendimento de urgência com 3% das admissões nos serviços de politraumatologia. As pesquisas internacionais citam incidências de 40 a 50 casos novos por milhão de habitantes ao ano, sendo a equivalência no Brasil de 6000 casos por ano [1].

A violência nas áreas urbanas das grandes metrópoles encontra-se ligada a estas estatísticas, no entanto, a etiologia do trauma medular varia em função das características de cada região e o tipo de atividade populacional. Os homens, predominantemente são os mais atingidos ocorrendo em 65% dos casos e com média de idade 25 anos, dos quais 70% ficam paraplégicos e 30% tetraplégicos, destas lesões de etiologia traumática foram ocasionadas por armas de fogo (40%), automóveis (30%), mergulho em águas rasas (15%), queda de altura e outros (15%) [1].

A melhoria no atendimento hospitalar com unidades especializadas no tratamento deste tipo de trauma, e com avanço no acompanhamento urológico em longo prazo, reduziu drasticamente os índices de morbidade e mortalidade decorrentes de complicações do aparelho urinário. Em estudo multidisciplinar realizado no National Spinal Cord Injury Statistical Center, foram avaliadas as principais etiologias de reinternação nos portadores de bexigas neurogênicas por traumatismo raquimedular e estas reinternações eram por infecções urinárias recorrentes [2].

A educação no trânsito, medidas contra a violência e orientações quanto aos riscos das quedas e mergulhos são os principais meios de prevenção da lesão medular traumática que ocasiona significativo grau de morbimortalidade às vítimas e sérios problemas socioeconômico aos seus respectivos familiares.

O traumatismo raquimedular (TRM) é o principal agente externo causador de incapacidade motora da bexiga. Essas lesões alteram permanentemente, as funções desse órgão, causando disfunção vesical e criando ambiente para o desenvolvimento de processos infecciosos, tais como hematúrias e cistites [3, 4, 5].

Uma das causas da aludida disfunção é a bexiga neurogênica, que em fase inicial do trauma, comporta-se de forma hipotônica e posteriormente a denervação promove um espessamento da parede vesical e conseqüente perda de sua complacência [3, 4, 5, 6].

As disfunções urológicas, advindas de traumas medulares representam uma das mais significantes causas de mortalidade, mesmo com as mais avançadas tecnologias atualmente disponíveis [6, 8, 7, 8, 9].

A bexiga que sofreu interrupção de impulso neural devido a uma lesão medular, perde o controle pois este é realizado pelo sistema nervoso que coordena os mecanismos voluntários e involuntários da micção. O sistema de controle medular, encontra-se entre S2 e S4 (Núcleo de Onuf). Estudos em animais demonstraram que o reflexo da micção se dá através de feixes localizados no tronco encefálico rostral [3, 4, 7].

A bexiga neurogênica que sofre inibição, hiperativa (espástica), o esvaziamento acontece por reflexos incontroláveis, o enchimento desencadeia contrações que passam a ser interpretadas como urgência miccional, tornando a capacidade vesical reduzida [3, 6, 9].

Sendo o traumatismo medular o principal agente externo causador de incapacidade motora das vias urinárias, as complicações mais comuns e mais graves na bexiga pós-traumática são a infecção e a deterioração renal respectivamente. Elas são resultados de uma estase urinária residual com aumento da pressão vesical para as vias urinárias superiores [6, 7, 9, 10].

As lesões na inervação do trato urinário inferior afetam geralmente o músculo detrusor e o esfíncter uretral, acarretando problemas basicamente de incontinência urinária e aumento da pressão intravesical, que trazem consequências para o funcionamento do sistema urinário superior, como a hidronefrose e uma progressiva insuficiência renal [4, 6, 8, 9, 10].

O tratamento para esse tipo de bexiga tem como finalidade promover o esvaziamento vesical completo, preservar o bom funcionamento renal, evitar complicações, tais como, infecção urinária recorrente e insuficiência renal [3, 4, 6, 8, 9].

A parede da bexiga é composta por músculo liso (detrusor) e as fibras do colágeno e do sistema elástico, como componentes fibrosos da matriz extracelular, estão presentes na parede e encontram-se intimamente relacionadas com a complacência desse órgão [11, 12, 13].

O aumento descontrolado do colágeno e de outros constituintes da matriz extracelular é uma resposta tissular à injúria ocasionando a fibrose do órgão. Estudos prévios demonstraram que a síntese de colágeno está aumentada na fibrose pulmonar, na glomeruloesclerose e em outras patologias [12, 13, 14, 15].

As expressões de proteínas da matriz extracelular no detrusor foram avaliadas através de técnicas de imunohistoquímica durante o desenvolvimento embriológico de ratos. Os autores demonstraram que houve um aumento significativo de colágeno tipo III e elastina

após o nascimento, em relação ao período de vida intrauterina, podendo ser essas mudanças fatores importantes na complacência vesical [16].

A revisão da literatura mostrou que são poucos os trabalhos que estudaram as modificações dos diferentes elementos que compõem a parede vesical, o músculo detrusor e os elementos fibrosos da matriz extracelular em pacientes portadores de bexigas neurogênicas hiper-reflexas, ocasionadas por lesão medular, [12, 17, 18].

São escassos os trabalhos que estudaram as bexigas de pacientes com esse tipo de trauma, na fase crônica, utilizando método estereológico. A presente tese tenta preencher esta lacuna.

Anatomia da bexiga urinária

A bexiga urinária é um órgão muscular oco do sistema urinário, revestido internamente por um epitélio transicional denominado urotélio. Na parte abaixo adjacente ao urotélio, encontra-se a lâmina própria, que é uma camada de tecido conjuntivo subjacente onde ficam apoiados os tecidos epiteliais, a camada muscular e a camada adventícia ou serosa que é ricamente vascularizada e formada basicamente de tecido conjuntivo e abundância de fibras elásticas. [18, 19, 20, 21].

O tecido muscular da bexiga é constituído por fibras musculares lisas, formando feixes sem orientação definida, que se ramificam e se reúnem livremente, mudando de orientação, profundidade na parede e entrelaçando-se com outros feixes sob a forma de uma malha complexa, sem formar camadas distintas, o que permite o detrusor contrair-se, direcionando a urina à uretra durante a micção [18, 19, 20, 21, 22].

A musculatura da bexiga pode ser dividida em duas porções de acordo com as diferenças regionais da sua inervação simpática: a porção localizada acima dos orifícios dos ureteres denominado corpo vesical, que compreende sua maior parte, e a musculatura que incorpora o trígono e o colo vesical [6, 18, 19, 20].

O detrusor é formado por células musculares lisas, que se organizam em fascículos separados uns dos outros de forma incompleta, por septos compostos por fibras elásticas, colágenos, raros fibroblastos, vasos sanguíneos e terminações nervosas. É provável que a presença desses elementos revestindo os feixes musculares, seja responsável pela manutenção da arquitetura da parede vesical e pelas propriedades complacentes que permitem seu enchimento sem a elevação da pressão vesical [18, 19, 20, 22].

Fisiologia da micção

O funcionamento do sistema urinário inferior ocorre de forma coordenada entre a bexiga e a uretra. Sendo assim, na fase de enchimento a bexiga permanece relaxada e a musculatura uretral contraída, acontecendo o inverso na micção. Para que esse sincronismo aconteça é indispensável à interação de numerosos arcs e circuitos nervosos.

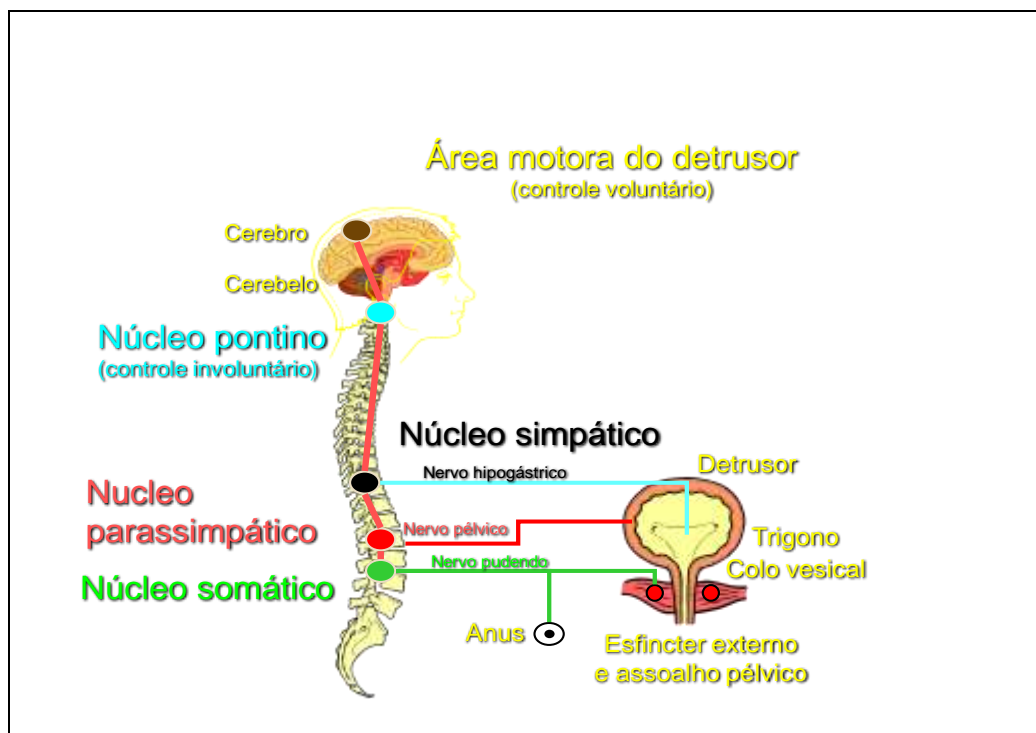


Figura 1 – Neurofisiologia da micção. Esquema modificado do trabalho de: Reuter VE. Urinary bladder, ureter and renal pelvis. In: Histology for Pathologists. Edited by S.S. Stenberg, Philadelphia: Lippincott Raven. 1997; 835-847.

Os neurônios motores da bexiga e da uretra estão localizados no seguimento sacral da medula espinhal (S2-S4) e são coordenados pelo centro pontino da micção e pelos núcleos da base do cérebro. Porém, o controle voluntário da micção se faz no córtex da face lateral do lobo frontal e a substância reticular ponto-mesencefálica, por sua vez, coordena a micção como um todo. Mas é o centro cortical que determina o início, o retardo e o término da micção [6, 7, 19].

O centro pontino da micção está localizado na região medial e dorso lateral da ponte Epônima, e sua lesão pode levar a retenção urinária. Sua estimulação aumenta a pressão

vesical, diminui a pressão uretral e diminui a atividade elétrica do assoalho pélvico. O relaxamento da uretra ocorre por inibição dos neurônios motores sacrais do esfíncter uretral [6, 7, 19, 20].

O centro esfíncteriano ou da continência, também encontra-se na ponte, sendo que através do trato retículo-espinal os impulsos chegam ao núcleo do nervo pudendo (Epônimo) na medula sacral. A estimulação deste núcleo aumenta a pressão uretral, e uma lesão neste corpo pode ocasionar incontinência urinária [6, 7, 19].

Os núcleos da base envolvidos com a micção são: putâmen, globo-pálido, núcleo caudado e as células da substância nigra. A principal função destes núcleos é modular o tônus do esfíncter uretral externo e sua disfunção pode ser vista na Doença de Parkinson, em que as alterações degenerativas dos neurônios diminuem a dopamina local, originando hiperatividade do detrusor [6, 7, 19, 20].

A função do tálamo na micção ainda não foi totalmente esclarecida, sabe-se que o núcleo ventral pósterolateral é responsável pela integração das informações entre os axônios sensoriais e o córtex [6, 19, 20].

O lobo límbico é composto pelo corpo amigdalóide, hipocampo e giro cíngulo. Sua estimulação facilita ou inibe a atividade da bexiga, influenciando a micção, o que pode ser notado pela vontade constante de urinar associada ao estresse ou nervosismo.

O hipotálamo está relacionado ao início do ato de urinar, a área pré-óptica envia fibras para o córtex cerebral e para o centro pontino da micção [6, 19, 20].

O cerebelo recebe informações sensoriais da bexiga e do assoalho pélvico, sendo importante na manutenção do tônus do assoalho pélvico e na coordenação entre contração do detrusor e relaxamento do esfíncter. O cerebelo participa também, ativamente da coordenação dos vários músculos envolvidos no ato da micção, mantendo o equilíbrio do corpo [6, 19, 20].

A musculatura lisa da bexiga, a região uretro-trigonal e a uretra proximal são inervadas por fibras do plexo-pélvico que está localizado profundamente na cavidade pélvica e é composto por fibras mescladas dos nervos pélvicos (parassimpático) e dos nervos hipogástricos (simpático). As fibras parassimpáticas originam-se na substância cinzenta da medula sacral (S2-S4), possuem vários gânglios próximos a bexiga e fibras pós-ganglionares curtas. Já os nervos hipogástricos (inervação simpática eferente) tem origem na região lateral da substância cinzenta da medula entre T10 e L2. O nervo pudendo que inerva o esfíncter uretral externo, tem sua origem no núcleo do nervo pudendo no corno ventral do segmento sacral da medula S2-S4. Todo controle somático (motor) dependente da vontade é exercido pelo nervo pudendo [6, 7, 19].

As fibras aferentes (sensorial) da bexiga e da uretra estão nas ramificações do plexo pélvico e atingem a medula espinal via nervos pélvicos ou hipogástricos. Dividem-se em dois grupos: I) Fibras nociceptivas, responsáveis pela sensibilidade dolorosa, chegam pelas raízes S2 à S4 à substância cinzenta pósterolateral, daí pelos tratos espinotalâmicos laterais atingem o tálamo e o córtex. II) Fibras propioceptivas, relacionadas à percepção da distensão vesical, originam-se no detrusor e seguem pelo plexo hipogástrico até T10 - L2 na medula, daí para a ponte e para o córtex [6, 7, 19].

Na fase de enchimento vesical, a continência é mantida pela complacência vesical associada à total inibição dos impulsos eferentes parassimpáticos e ativação dos eferentes simpáticos e somáticos. O córtex cerebral envia impulsos descendentes inibitórios para o centro pontino e para o nervo pélvico (parassimpático) relaxando o detrusor e impulsos excitatórios para o nervo hipogástrico (simpático) e nervo pudendo aumentando a resistência uretral [6, 7, 19].

Os impulsos aferentes vesicais ativam também os motoneurônios do núcleo do nervo pudendo aumentando a atividade tônica do esfíncter uretral e, por conseguinte, a resistência da uretra.

Na micção voluntária há queda da atividade dos músculos do assoalho pélvico e da pressão uretral, que precedem a contração do detrusor. Ocorre a liberação do centro pontino, que envia impulsos para a medula sacral, ativando neurônios parassimpáticos desencadeando, assim, a contração do detrusor [6, 7, 19].

Simultaneamente impulsos da ponte inibem motoneurônios pudendos (núcleos de Onuf) que inervam o esfíncter uretral estriado, relaxando-o. Iniciada a contração do detrusor, a descarga aferente gerada pela tensão na parede vesical reforça o reflexo miccional. O fluxo de urina pela uretra facilita o esvaziamento, pois também estimula a contração do detrusor. Quando a micção está chegando ao fim, o assoalho pélvico se contrai e eleva o colo vesical, que se fecha e a pressão do detrusor é reduzida [6, 7, 20].

Fisiopatologia da bexiga neurogênica no trauma medular.

Os fatores que determinam as bexigas neurogênicas são: congênitos, ocasionados por mielomeningoceles, agenesias sacrais, lipomeningoceles, diastematomielias e cistos medulares); adquiridas (por traumas central, medular e craniano, doenças degenerativas, inflamatórias e infecciosas); e as lesões neurológicas periféricas (traumáticas, cirúrgicas, radiológicas e mistas) [3, 7, 8].

Em condições normais, armazenamos urina e esvaziamos a bexiga sob controle voluntário, o armazenamento urinário em um reservatório com capacidade satisfatória para períodos adequados, baixa pressão de armazenamento, baixa resistência uretral e sinergicamente contraímos a musculatura de forma que permita a eliminação total da urina [6, 8].

Para que essas ações ocorram nessas condições, é absolutamente necessária a integridade do sistema neurológico que controla essas funções [6, 7, 8].

Um defeito na maturação neurológica pode permitir que micções involuntárias persistam na fase adulta. Por outro lado, doenças, lesões neurológicas ou envelhecimento podem alterar os centros neurológicos que medeiam a micção voluntária, permitindo o ressurgimento dos reflexos primitivos, ou remodelar os mecanismos com surgimento de novos circuitos reflexos [6, 7, 8].

Independente da causa que levou à lesão nervosa haverá interferência nos mecanismos próprios da bexiga, ocasionando modificações no seu funcionamento com grau variado de incontinência, com esvaziamento incompleto ou retenção urinária [6, 7, 8].

A urina é produzida pelos rins, passa pelos ureteres e é armazenada na bexiga. Quando cheia a bexiga os músculos se contraem e a urina é eliminada através da uretra. No momento em que o músculo da bexiga se contrai o esfíncter da uretra que também é um músculo, se relaxa para facilitar a saída da urina [6].

Normalmente ocorre um funcionamento sinérgico entre a bexiga e a uretra, ou seja, durante o enchimento, a musculatura da bexiga está relaxada para acomodar a urina proveniente dos rins, enquanto o músculo do esfíncter da uretra está contraído para evitar a saída da urina coletada na bexiga. Ao contrário, quando a bexiga se contrai para eliminar o seu conteúdo, o esfíncter relaxa para permitir a eliminação da urina [3, 4, 6].

Para isso acontecer normalmente, é preciso haver coordenação entre os músculos da bexiga e do esfíncter da uretra. Quando este trabalho não ocorre de maneira integrada, acontece o que se chama dissinergismo vesico-esfincteriano, situação que contribui para a ocorrência de complicações. Se a bexiga e o esfíncter se contraírem ao mesmo tempo, haverá um esforço maior da musculatura da bexiga para conseguir vencer a resistência do músculo da uretra [6].

Este esforço leva com o tempo, a um enfraquecimento da parede da bexiga e a formação de divertículos que acumulam urina residual, diminuindo a resistência a infecções, favorecendo a formação de cálculos e o refluxo de urina da bexiga para os rins, colocando em risco a função renal [6].

O cérebro e a medula espinhal são responsáveis pelo trabalho coordenado entre a bexiga e o esfíncter uretral garantindo o controle urinário. Uma lesão medular pode comprometer a comunicação entre o cérebro e o sistema urinário e a eliminação da urina armazenada na bexiga deixa de ser automática [3, 4, 5, 6].

Se a lesão for incompleta, é possível haver recuperação parcial ou até total com o tempo. Mas até que esta recuperação aconteça, a utilização de alguma técnica para esvaziar a bexiga pode ser necessária.

Dependendo do seguimento da lesão medular, a bexiga pode ter dois tipos de comportamento: a) Passa a acumular uma quantidade maior de urina do que antes da lesão medular porque os músculos da bexiga não se contraem mais e isto faz com que grande quantidade de urina fique retida dentro da bexiga, muito acima da capacidade normal – bexiga flácida, comum nas lesões medulares ao nível sacral (abaixo de T12); b) Passa a acumular uma quantidade menor de urina do que antes da lesão medular e os músculos da bexiga passam a ter contrações involuntárias com perdas frequentes de urina – bexiga espástica, comum nas lesões medulares acima do nível sacral (acima de T12) [3, 6].

As bexigas neurogênicas hiper-reflexas – bexiga espástica, é o motivo do presente trabalho.

1 OBJETIVO

Analisar a densidade volumétrica das células do músculo liso e dos elementos fibrosos da matriz extracelular de bexigas neurogênicas hiper-reflexas de portadores de traumatismo raquimedular crônicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A obtenção das amostras de pacientes portadores de bexigas neurogênicas hiper-reflexas, por traumatismo raquimedular acima de T 12, sem histórico de tratamento quimioterápico ou radiológico, por qualquer tipo de neoplasia. Foram utilizados 6 fragmentos da cúpula vesical de bexigas, extraídos com consentimento informado e autorização dos pacientes no ato da cirurgia de ampliação desse órgão com íleo pela cistoenteroplastia, pela equipe médica do Serviço de Urologia do Hospital Municipal Souza Aguiar – Rio de Janeiro. Todo o procedimento foi submetido e aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Esses pacientes em número de 6 e com idades variáveis, sofreram diversos tipos de acidentes, que os levaram ao traumatismo raquimedular, a saber: acidente automobilístico, perfuração por projétil de arma de fogo, queda de altura e mergulho em águas rasas.

Para o controle foram utilizadas amostragem idêntica num total de 6 fragmentos extraídos da cúpula vesical de bexigas de cadáveres macroscopicamente sem comprometimento com o sistema urogenital doado para o trabalho pelo Instituto Médico Legal de Nova Iguaçu. Conhecido pela sua sigla IML, é um instituto brasileiro responsável pelas autópsias e laudos cadavéricos para Polícias Científicas de um determinado Estado na área de Medicina Legal.

Foram estudados pacientes com diagnósticos de bexiga neurogênica secundária, relacionada a traumatismo raquimedular, toracolombar ou cervical, com tempo de evolução superior a três anos.

O dados urodinâmico demonstrou diminuição da complacência vesical em todos os pacientes com perda urinária associada. O tratamento prévio à abordagem cirúrgica foi por meio da utilização de cateterismo intermitente limpo, associado ao uso de anticolinérgicos. Nesse grupo, a cirurgia para ampliação vesical com íleo foi indicada pela incontinência urinária ou deterioração do trato urinário superior, e à alta pressão de perda >40 mm de H₂O mesmo com a utilização do tratamento clínico conservador.

No ato cirúrgico, foram extraídas amostras de fragmentos da cúpula vesical de bexigas de pacientes com idade média de 34 ± 7.04 anos, submetidos a procedimentos para a ampliação desse órgão. O controle foi composto por igual número de amostras de igual material, com média de idade de 33.5 ± 8.11 anos, obtido de cadáveres. Ambos os fragmentos foram fixados em formalina tamponada a 10%, com pH 7.2, enviados ao laboratório da Unidade de Pesquisa Urogenital, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. O material foi

processado para inclusão em parafina, foram feitos cortes de 5 micrômetro para cada técnica de coloração e observado em um microscópio Olympus BH 2, acoplado a uma câmera de vídeo Sony CCD, modelo DXC 151-A, com um aumento de 40X, uma grade de teste M-42, um microcomputador IBM, PC; softwares Excel e Grafphad v.4.

Os blocos obtidos foram submetidos a cortes de 5 μ m de espessura, obtendo-se 25 microcortes de cada amostra do controle e dos pacientes que foram submetidos a cirurgia que aceitaram participar do trabalho. Para a análise de histoquímica, eles foram desparafinados em xilol e hidratados em uma decrescente série de álcool etílico, chegando até a hidratação com água, e logo depois corados de acordo com as técnicas a serem estudadas. Foram utilizados campos aleatórios em cada fragmento analisado.

Os cortes corados por hematoxilina e eosina foram utilizados para verificar a integridade do tecido que foi incluso em parafina e a qualidade do microcorte e da amostra de tecido vesical (detrusor) por unidade de área com objetiva de 40x.

2.1 Histoquímica

Para a avaliação quantitativa do detrusor os cortes foram corados pelo método de van Gieson.

Para a avaliação quantitativa do colágeno, os cortes foram corados pela técnica de van Gieson. Para a avaliação qualitativa utilizou-se a técnica de Picrosirius sob luz polarizada.

Na avaliação quantitativa das fibras do sistema elástico, os cortes foram tratados pela técnica de Fucsina-Resorcina de Weigert, com prévia oxidação pela oxona, onde se evidenciam essas fibras [23].

2.1.1 Técnica de van Gieson

Existem algumas colorações para demonstração dos tecidos conjuntivos, a maioria na categoria dos tricrômicos. Coloração tricrômica é o termo geral para técnicas que evidenciam o músculo, fibras de colágeno, fibrina e eritrócitos. São utilizados três corantes, um dos quais usados como nuclear. Uma das colorações mais antigas é obtida pelo método de Van Gieson.

2.1.2 Técnica Picro Sirius Red

Este método permite que os radicais sulfônicos do corante reajam com os grupamentos amínicos da lisina, um dos principais aminoácidos que compõem o colágeno, intensificando sua birrefringência. Quando observado sob luz polarizada o colágeno apresenta birrefringência com tons variando entre o vermelho e o amarelo que é o colágeno tipo I, e o verde que é o tipo III, sobre um fundo negro quando observados em microscópio com luz polarizada e objetiva de 40x para a análise qualitativa dos diferentes tipos de colágeno [23, 24, 27].

2.1.3 Técnica Resorcina – Fucsina de Weigert com prévia oxidação pela oxona

Técnica utilizada para coloração das fibras elásticas – numerosas técnicas têm sido desenvolvidas para a demonstração destas fibras sendo que as mais utilizadas são orceina Verhoeff, resorcina fucsina de Weigert. Nesta técnica, as fibras elásticas coram-se intensivamente, mas não de um modo seletivo, pois a reação das fibras com a eosina ou vermelho Congo podem ser atribuídos a ligação entre a proteína elastina e os corantes ácidos. A positividade ao ácido periódico de Schiff observada particularmente nas fibras finas e imaturas pode ser explicada pela presença de glicoproteínas associadas às fibras elásticas. As fibras elásticas possuem ligações de dissulfeto, que sofrem oxidação pelo permanganato nos métodos de Weigert, essas pontes dissulfeto, em parte derivados aniônicos do ácido sulfônico que são fortemente basofílicos e capazes de reagirem seletivamente com as soluções corantes utilizadas, apesar da técnica utilizar fucsina básica, um grande número de corantes catiônicos pode substituir a fucsina [23, 24].

2.1.4 Técnica de Imunohistoquímica

As fibras do sistema elástico foram evidenciadas pelo método da Avidina Biotina utilizando-se microscopia de luz para a identificação da marcação dos anticorpos antielastina na diluição de 1:100 (Monoclonal Anti-Elastin clone BA-4. Mouse Ascites Fluid. SIGMA.®).

Os cortes foram desparafinados em Xilol, hidratados em uma série decrescente de álcool etílico até a água e lavados em tampão fosfato tamponado (PBS) por cinco minutos. Em seguida, tratados por trinta minutos em temperatura ambiente com uma solução de

peróxido de hidrogênio a 3% em metanol para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Após esta etapa, serão lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos cada) e incubados em câmara úmida a 37° graus C por trinta minutos com soro de cabra a 1% em PBS. Na sequência, serão incubados em câmara úmida a 4° graus C por 12 a 14 horas com o anticorpo primário.

Para todos os anticorpos primários utilizados foram realizados simultaneamente, controles negativos, onde o anticorpo primário será substituído por PBS, e controles positivos, usando fragmentos de tecido que apresentam os antígenos pesquisados, conforme prévia descrição literária.

Após este período, os cortes foram lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos cada) e incubados em câmara úmida em temperatura ambiente por trinta minutos com o anticorpo secundário biotilado diluído em 1:100 em PBS.

A revelação foi feita com solução de 3,3, diamino-benzidina tetrahidroclorido (DAB) (Zymed Laboratórios, número do catálogo 002014 Carlsbad, CA, E.U.A.) a 0,1% em H₂O₂, lavados em água destilada, desidratado em uma serie crescente de etanol diafanizados em xilol e montados com Ethelan.

2.2 Quantificação

Foi utilizado o método estereológico para quantificar as fibras do sistema elástico, do colágeno e fibras musculares lisas.

O parâmetro estereológico empregado para estimar o conteúdo das fibras musculares, do colágeno e fibras do sistema elástico foi a densidade volumétrica (V_v), esse parâmetro é largamente utilizado em estereologia por ser bastante informativo tendo como objetivo determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes bidimensionais. Para isso vale-se da geometria e da estatística [25, 26].

Foram feitos cinco cortes de cada fragmento extraído da bexiga e avaliados cinco campos aleatórios em cada corte, totalizando 150 campos.

Para a quantificação do sistema elástico, colágeno e células do músculo liso aplicou-se o sistema-teste M42 sobre a tela de um microscópio Olympus BH 2, acoplado a uma câmera de vídeo Sony CCD, modelo DXC 151-A, com um aumento de 40X.

Foram calculadas as médias dos valores da densidade volumétrica para os grupos testes e controles em relação ao tecido muscular, fibras do sistema elástico e fibras do colágeno, posteriormente os resultados das contagens foram transferidos para uma planilha Excel.

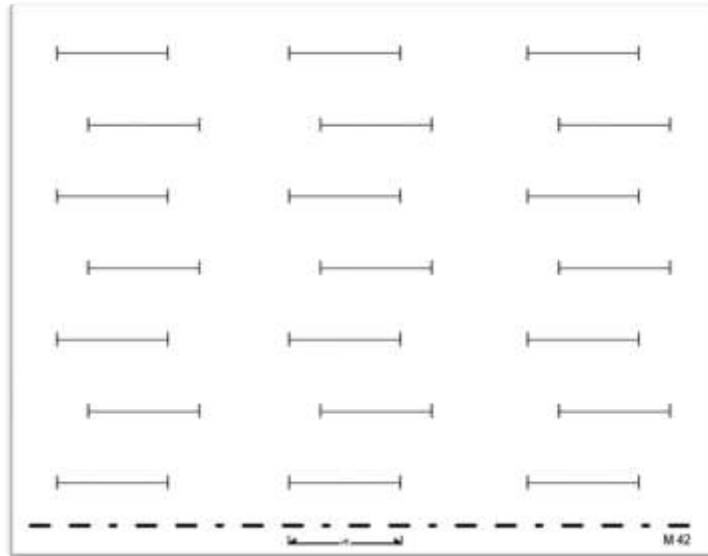


Figura 2 - Sistema teste M42 [25]

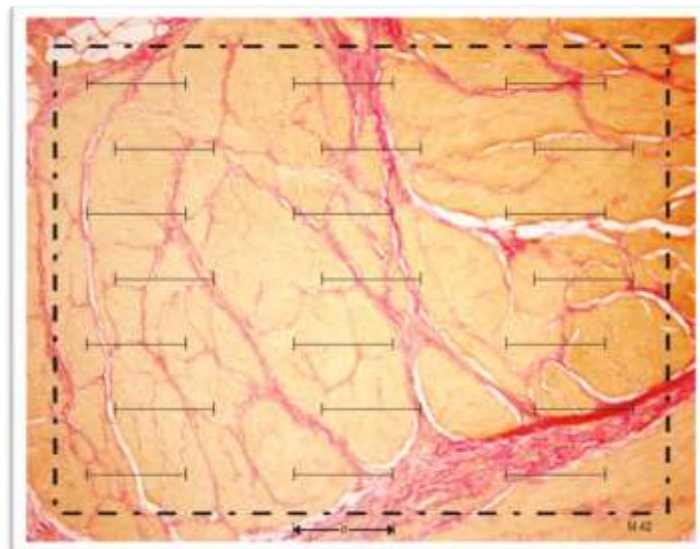


Figura 3 - Sistema teste M42 sobreposta a fotomicrografia corada pela técnica de van Gieson onde se observa as células do músculo liso (detrusor) em cor amarelo e as fibras do colágeno de cor vermelho .

2.3 Análise estatística

O Teste-T não pareado foi realizado para comprovar as médias nos 2 grupos com nível de significância com $p < 0,05$.

Foram calculadas as médias e desvios padrão nos 2 grupos e os resultados comparados através do teste T não pareado com nível de significância de $p < 0,05$. Toda a análise foi realizada no software GraphPhad v.4.

2.4 Aprovação do Projeto em Conselho de Ética

O projeto deste trabalho foi aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa, com Humanos, do Hospital Universitário Pedro Ernesto, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, conforme documento anexo.

3 RESULTADOS

3.1 Musculatura lisa – detrusor

Foram analisados 6 amostras extraídas de cadáveres e 6 de pacientes submetidos a cirurgia de ampliação da bexiga com íleo, todos maiores de idade, com traumatismo raquimedular em fase crônica.

Tabela 1: Análises estatísticos dos resultados das células do músculo liso em porcentagem.

Amostras: N=6	Músculo Liso: B. Controle	Músculo Liso: B. Neurogênica
Média	92.066 %	* 79.333 %
Desvio padrão	0.816	2.338
P. Valor:	P < 0.01	P < 0.01.

Os resultados da tabela mostram uma redução significativa da porcentagem da densidade volumétrica das células do músculo liso das bexigas neurogênicas quando comparadas com os resultados das amostras do controle.

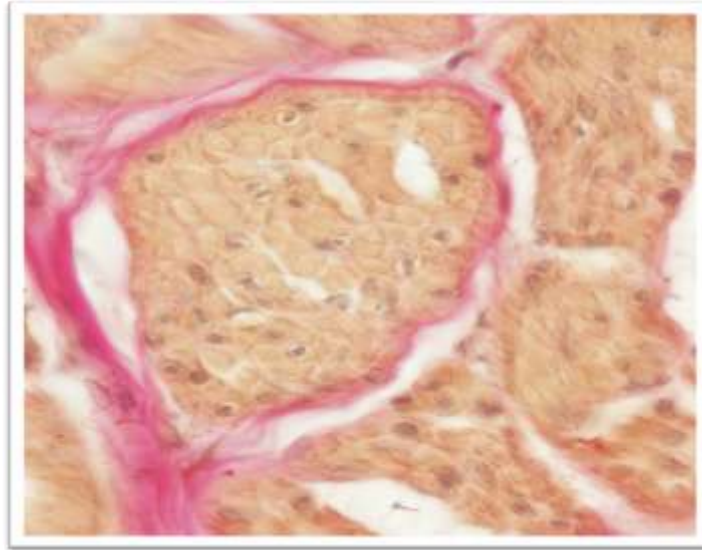


Figura 4 - Fotomicrografia do detrusor de bexiga humana normal. Técnica de van Gieson, os núcleos coram-se de azul a preto, as fibras de colágeno em vermelho e o citoplasma das células musculares de amarelo. Objetiva de 100X.

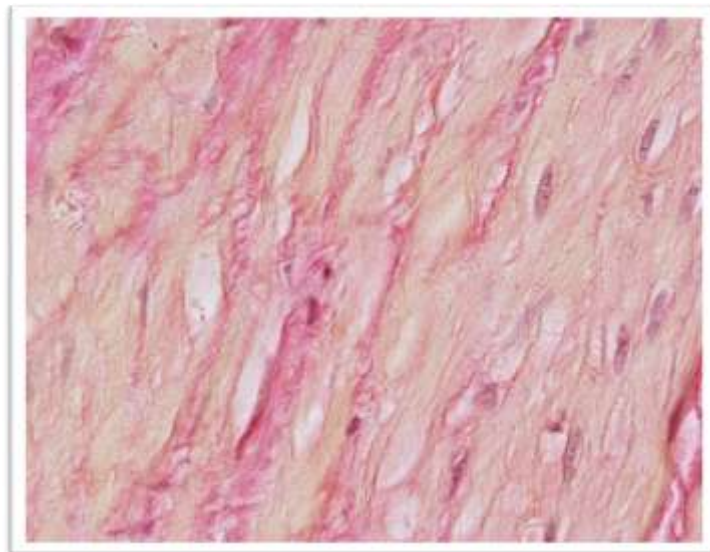


Figura 5 - Fotomicrografia do detrusor de bexiga humana neurogênica, corada pela técnica de **van Gieson**, os núcleos coram-se de azul a preto, as fibras de colágeno em vermelho e o citoplasma das células musculares de amarelo. Objetiva de 100X.

3.2 Fibras do sistema colágeno

Tabela 2. Análises estatísticas dos resultados das fibras do colágeno em porcentagem

Amostras: N=6	Colágeno: B. Controle.	Colágeno: B. Neurogênica.
Média	7.10	* 12.14
Desvio padrão	0.54	1.03
P. Valor	P< 0.01	P< 0.01

Os resultados da tabela mostram um aumento significativo no percentual da densidade volumétrica do colágeno das bexigas neurogênicas quando comparadas com os resultados das amostras do controle.

3.2.1 Análise qualitativo de fibras do colágeno

Para a análise qualitativa do colágeno utilizou-se a técnica de Picrosirius. Este método permite que os radicais sulfônicos do corante reajam com os grupamentos amínicos da lisina, um dos principais aminoácidos que compõem o colágeno, intensificando sua birrefringência. Quando observado sob luz polarizada o colágeno apresenta tons variando entre o vermelho e o amarelo, colágeno tipo I - e o verde colágeno tipo III, sobre um fundo negro.

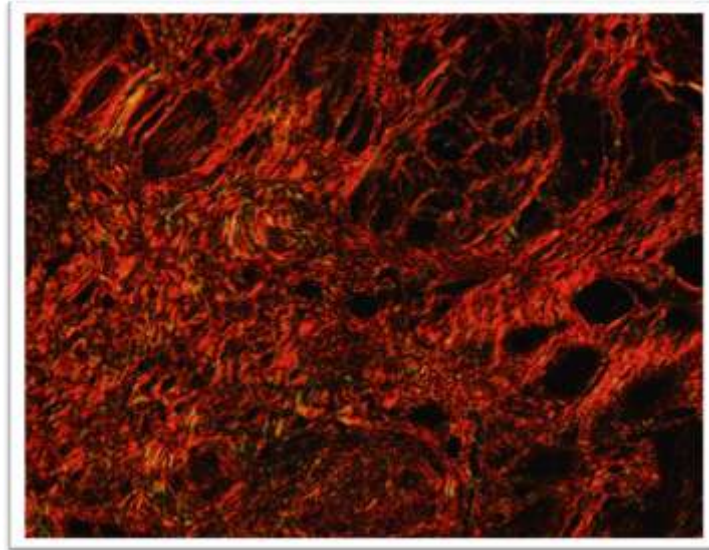


Figura 6 - Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana normal onde se observa predominância dos tons vermelhos sugerindo a presença de colágeno tipo I, quando analisadas por microscopia de luz polarizada. Técnica de Picrosirius. Objetiva de 40X.

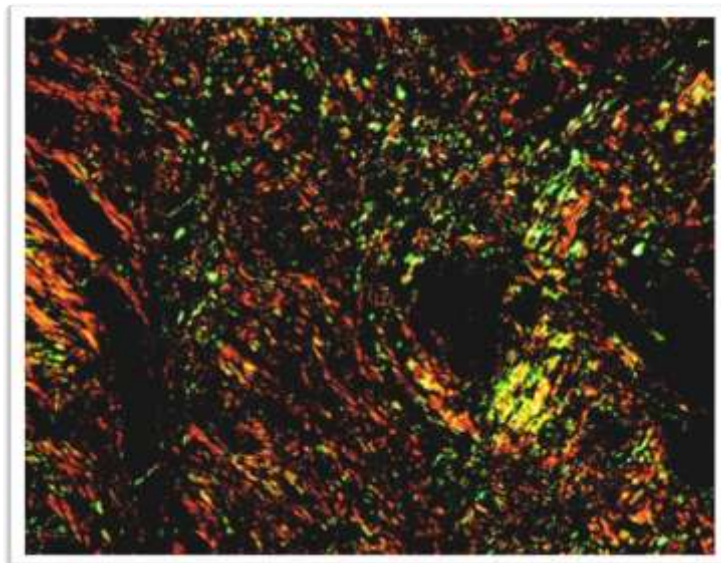


Figura 7 - Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana neurogênica. Técnica de Picrosirius observada sob luz polarizada mostrando predominância de tons verdes sugerindo a presença de colágeno tipo III. Objetiva de 40X.

3.3 Fibras do sistema elástico.

Tabela 3: Análises estatísticas dos resultados das fibras do sistema elástico em porcentagem

Amostras: N=6	Fibras elásticas: B. Controle	Fibras elásticas: B. Neurogênica
Média	13.27	* 26.78
Desvio padrão	0.59	1.60
P. Valor	P < 0.01	P < 0.01

A tabela mostra uma diferença estatística na porcentagem da densidade volumétrica das fibras do sistema elástico das bexigas neurogênicas quando comparadas com o controle. $P < 0.01$.

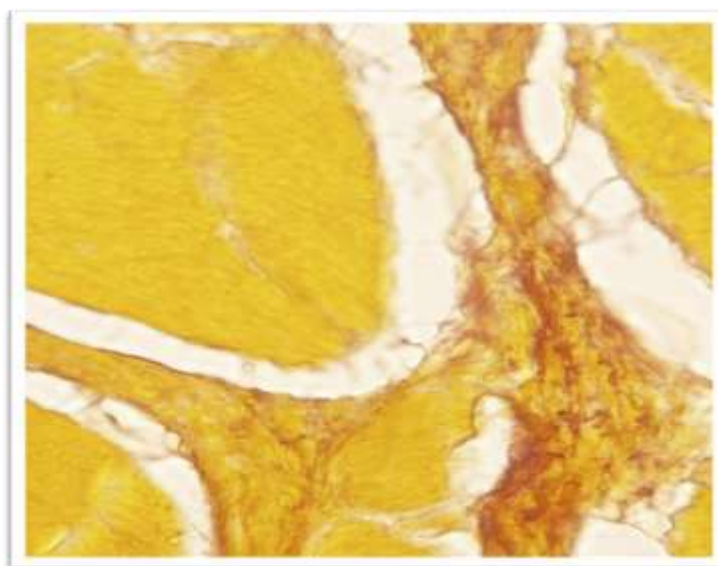


Figura 8 - Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana normal, corada pela técnica de Fucsina Resorcina de Weigert com prévia oxidação pela oxona. Objetiva de 40X, observa-se as fibras elásticas de cor marron na lâmina própria entre as fibras musculares lisas do detrusor.

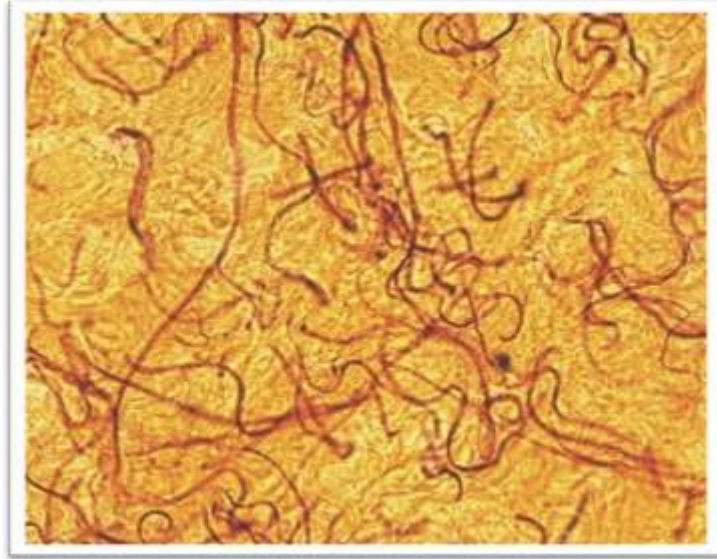


Figura 9 - Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana neurogênica, corada pela técnica de Fucsina Resorcina de Weigert com prévia oxidação pela oxona. Objetiva de 40X, observa-se enormes fibras elásticas de cor marron na lâmina própria.

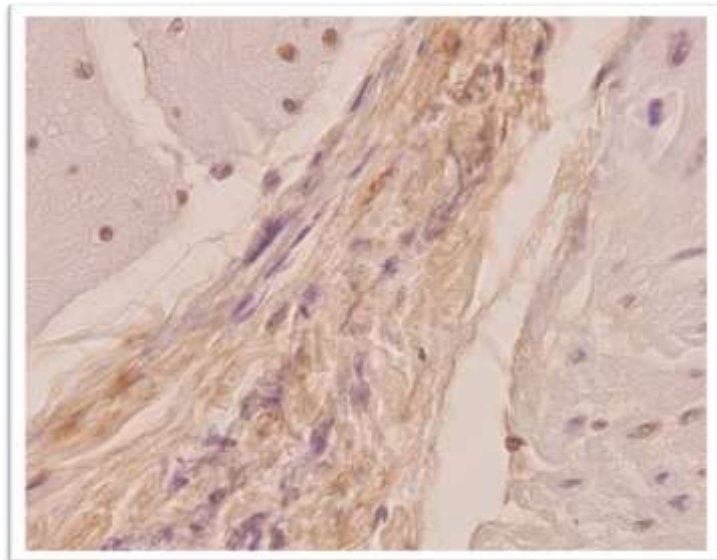


Figura 10 - Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana controle. Marcação das fibras elásticas pela antielastina. Objetiva de 100X, observa-se uma boa marcação dessas fibras em cor marron.

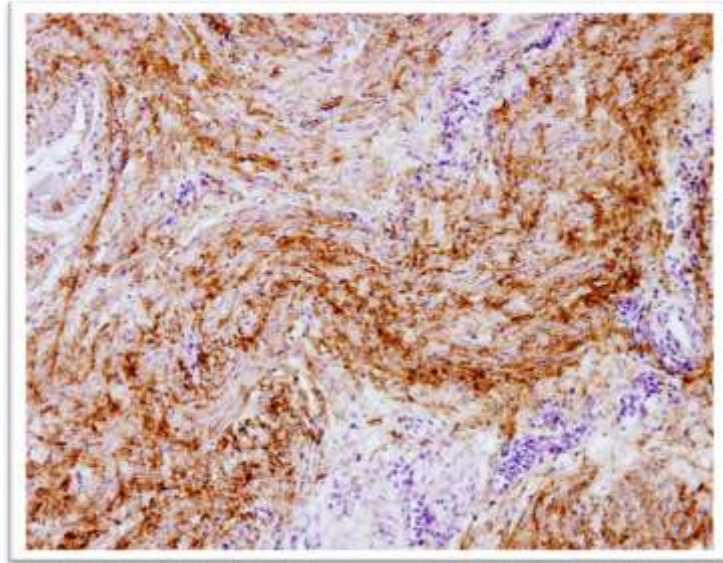


Figura 11 - Fotomicrografia da lâmina própria de bexiga humana neurogênica. Marcação pelo anticorpo antielastina. Objetiva de 100X, observa-se intensa marcação das fibras do sistema elástico de cor morron.

4 DISCUSSÃO

4.1 Bexiga humana

A bexiga humana normal já foi estudada e comparada com bexigas das mais diferentes etiologias: obstrução infra-vesical tanto por hiperplasia prostática benigna quanto por estenose uretral, bexiga hipocontrátil e hipocomplacente do idoso e as alterações vesicais encontradas na mielomeningocele [12, 13, 17, 28].

Trabalhos referentes a bexigas hiper-reflexas em pacientes adultos, portadores de traumatismo raquimedular na fase crônica, são escassos . O trabalho se propõe a contribuir para preencher esta lacuna.

4.2 Fibra muscular

Os resultados mostraram uma diminuição na densidade das fibras musculares em relação às bexigas do grupo controle.

A diminuição da complacência está clinicamente associada a sintomas de frequência miccional, deterioração do jato urinário, intermitência, resíduo urinário aumentado e falência do músculo detrusor [3, 6, 7, 8].

Observa-se nos resultados analisados uma redução de 13,86 % na densidade volumétrica das fibras musculares em relação às bexigas do grupo controle. Esses achados parecem estar coerentes com os sintomas clínicos, e se referem à fase crônica do trauma. Essa redução poderia ser o resultado da degeneração dos neurônios motores decorrente da lesão medular com consequente atrofia das fibras musculares lisas [3, 4, 6, 7].

Gloeckner (2002) e Nagatomi (2005) mostraram que ratos submetidos à lesão medular após 10 dias, aumentavam a complacência vesical devido a uma hipertrofia de sua camada muscular. Esses resultados mostraram mais uma vez, que tanto o colágeno quanto o músculo apresentaram comportamentos diferentes nas fases agudas e crônicas [29, 30].

Essas observações sobre os diferentes elementos constitutivos da parede vesical permitem caracterizar o substrato morfológico explicando a complacência da bexiga urinária nas bexigas neurogênicas hiper-reflexas.

4.3 Fibras do colágeno

As alterações observadas em relação ao colágeno mostraram ser de ordem quantitativa e qualitativa. A quantificação do colágeno nas bexigas neurogênicas hiper-reflexas indicou um aumento de 72,9% em relação ao grupo controle. Este aumento parece ocorrer preferencialmente entre os feixes musculares do detrusor. Além disso, nos cortes corados pelo Picro Sirius Red, a parede vesical observada sob luz polarizada mostrou que a cor vermelho-alaranjado predominante nas bexigas do grupo controle é substituída pela cor verde, que passa ser predominante nas bexigas neurogênicas. Essa modificação de cor é um indicativo do tipo de colágeno predominante que passa a ser possivelmente o colágeno tipo III [22, 23, 26, 27].

Nagatomi (2004) avaliou os comportamentos viscoelásticos comparando bexiga de ratos normais com bexigas de ratos com lesão induzida da medula espinhal. O trabalho de Nagatomi (2004) mostrou que a concentração de colágeno encontrava-se diminuída nos ratos com lesão medular [31].

Esses resultados, mesmo considerando-se o fato de que o trabalho foi feito em ratos, parecem indicar uma diferença no comportamento do colágeno. Quando se compara à fase aguda, estudada por Nagatomi (2004) à fase crônica, após um tempo sempre superior a três anos, a quantidade de colágeno diminui no primeiro caso e aumenta no segundo [31].

Os dados encontrados em nosso estudo sugerem que este acúmulo de tecido conjuntivo altere de modo significativo a complacência da musculatura vesical acarretando modificações na estabilidade do músculo detrusor.

O aumento percentual do colágeno observado no presente estudo, sugere a natureza fibrótica das bexigas neurogênicas acarretando como consequência a micção intermitente observada nesses pacientes [6, 7, 11, 14, 15].

4.4 Fibras do sistema elástico

Nagatomi (2004) mostrou que a concentração de elastina era significativamente maior nas bexigas após lesão na medula espinhal quando comparadas com as bexigas normais [31].

Um aumento significativo do percentual das fibras do sistema elástico em 101,8% observado no presente trabalho mostrou que as fibras elásticas apresentam tanto no rato quanto no homem, comportamento semelhante na fase aguda e na fase crônica.

Este resultado corrobora a observação clínica que indivíduos com bexiga neurogênica hiper-reflexa, apresentam micção intermitente [4, 6, 18].

Estas observações sobre os diferentes elementos constitutivos da parede vesical permitem caracterizar o substrato morfológico que explica a complacência da bexiga urinária nas bexigas neurogênicas hiper-reflexas.

Na bexiga neurogênica hiper-reflexa crônica, o sistema elástico parece ser o mais afetado. No entanto, todos os elementos analisados apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle.

5 CONCLUSÃO

Em todos os elementos analisados houve uma diferença estatística entre as bexigas do grupo controle e as neurogênicas.

As células do músculo liso apresentou uma diminuição na porcentagem da densidade volumétrica quando comparado com as do controle.

A porcentagem da densidade volumétrica das fibras do colágeno estavam aumentada significativamente com relação ao controle.

E as fibras do sistema elástico teve um aumento significativo na porcentagem de sua densidade volumétrica quando comparado com o controle. Observamos além do aumento uma desorganização dessas fibras, inclusive pelo método de marcação pelo anticorpo antielastina.

REFERÊNCIAS

1. Kwan I, Bunn F, Roberts I: Spinal immobilisation for trauma patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001; (2). CD002803.
2. Cadenas DD, Hoffman JM, Kirshblun S, McKinley W: Etiology and incidence of rehospitalization after traumatic spinal cord injury: amulticenter analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2004; 85: 1757- 63.
3. Gimenez MM, Fontes SV, Fukujima MM: Physiotherapeutic procedures for vesical sphincter disorder in patients with spinal cord trauma – a narrative bibliographic review. 2005; 13: 34-38.
4. Chartier-Kastler E, Ayoub N, Even-Schneider A, Richard F, Soler JM, Denys P. Neurogenic bladder: pathophysiology of the disorder of compliance. *Prog Urol* 2004; 14 (4): 472-8.
5. Herrera JJ, Haywood-Watson RJ 2nd, Grill RJ: Acute and chronic deficits in the urinary bladder after spinal contusion injury in the adult rat. *J Neurotrauma.* 2010; feb.27 (2): 423-31.
6. Walsh, Retik, Vaughan, Wein: *Campbell's Urology.* Philadelphia Saunders. 2002; vol. 2: 1305-06.
7. de Groat WC, Yoshimura N: Changes in afferent activity after spinal Cord injury. *Neurourol Urodyn.* 2010; 29 (1): 63-76.
8. Bruschini H, Truzzi JC: Bexiga neurogênica: classificação, diagnóstico e tratamento. In: Schor N, Srougi M. *Nefrologia e Urologia Clínica.* São Paulo. 1998; 205-10.
9. Gandolpho I, Heilberg IP, Cuppoloni MM: *Atualização em Infecções Urinárias; Bexiga Neurogênica.* São Paulo. Moreira Jr. 1995.
10. Yamauti AY: Cuidados de enfermagem em pacientes portadores de lesão medular. In: Greve JMD. Casalis MEP. Barros Filho Tep. *Diagnóstico e tratamento da lesão da medula espinhal.* São Paulo: Roca. 2001.
11. Deveaud CM, Macarak EJ, Kucick U, Ewalt DH, Abrams WR, Howard PS. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. *J Urol.* 1998; 160 (4): 1518-27.
12. Susset JG, Servot-Viguiier D, Lamy F, Madernas P, Black R: Collagen in 155 human bladder. *Invest. Urol.* 1978; 16: 204.
13. Cortivo R, Pagano F, Passerini G, Abatangelo G, Castellani I: Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. *Brit. J. Urol.* 1981; 53 (2): 134 -137.

14. KuChn, Boldt J, King t, Cruch E, Vertio T, Mcdonald J: An imunohistochemical stady of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *An Ver. Respir. Dis.* 1989; 140: 1693.
15. Peten E, Striker L, Carome M, Elliotte S, Yang CW, Strker G: The crontribution of increased collagen syntesis to human glomerulosclerosis: A quantitative analysis of $\alpha 2IV$ collagen mRNA expression by competitive polymerase chain reation. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1571.
16. Smeulders N, Woolf AS, Wilcox DT: Extracellular matrix protein expression during mouse detrusor development. *J. Pediatric. Surg.* 2003; 38: 1-12.
17. Oliver J, Wiseman Claran M, Brady, Iqbal F, Hussain Procar Dasgupta, Hilary Watt, Clare J, Fowler and David N, Landon: The ultrastructure and pacients with detrusor hyperreflexia. *J Urol.* 2002; 168: 2040-2045.
18. German K, Bedwani J, Davies J, Brading AF, Stephenson TP: Physiological and morphometric studies into the pathophysiology of detrusor hyperreflexia in neuropathic patients. *J Urol.* 1995; 153: 1678-1683.
19. Murakumo M, Ushiki T, Abe K, Matsumura K, Shinno Y, Koyanagi T: Three-dimensional arrangement of collagen and elastin fibers in the human urinary bladder: a scanning electron microscopic study. *J Urol.* 1995; 154: 251-256.
20. Reuter VE: Urinary bladder, ureter and renal pelvis. In: *Histology for Pathologists.* Edited by S.S. Stenberg, Philadelphia: Lippincott Raven. 1997; 835-847.
21. Gleason DM, Bottaccini MR, Byrne J: Review of current physical and hydrodynamic concepts and their impact on urodynamics. *Neurourol. Urodyn.* 1987; 6: 1-9.
22. Elbadawi A: Functional anatomy of the organs of micturition. *Urol. Clin. North, Am.* 1996; 23: 177-210.
23. Junqueira LCU, CarneiroMontes GS, Sanchez EM: The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry.* 1982; 74: 153.
24. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems *Cell Biology International.* 1996; vol. 20: No. 1, 15–27.
25. Weibel ER: *Stereological Methods Pratical Methods for Biological Morphometry.* Vol. 1. London, Academic Press. 1979; 415.
26. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75: 469-486.

27. Pierard GE: Sirius Red polarization method is useful to visualize the organization of connective tissues but not the molecular composition of their fibrous polymers. *Matrix*. 1989; 9: 68-71.
28. Janzen J, Bersch U, pietsch-Breitfeld B: urinary bladder biopsies in spinal cord injured patients. 2001; 39: 568-70.
29. Gloeckener DClaire, Michael S, Sacks, Matthew O, Fraser, George T, Somogyi, William C, de Groat, Michael B, Chancellor: Passive Biaxial Mechanical Properties of the Rat Bladder Wall After Spinal Cord Injury. *The Journal of Urology*. 2002; 167: 2247-2252.
30. Nagatomi JK, Khashayar Toosi, Jonathan S, Grashow, Michael B, Chancellor, Michael S, Sacks: Quantification of Bladder Smooth Muscle Orientation in Normal and Spinal Cord Injured Rats. *Annals of Biomedical Engineering*. 2005; vol. 33: 1078-1089.
31. Nagatomi J, Gloeckner DClaire, Michael B, Chancellor, William C, de Groat, Michael S, Sacks: Changes in the Biaxial Viscoelastic Response of the Urinary Bladder following Spinal Cord Injury. *Annal of Biomedical Engineering*. 2004; 32: 1409-1419.

APÊNDICE A



Neurourology & Urodynamics

EJL Account | Instructions & Forms | Log Out | Your Profile Page

[Main Menu](#) → [Submitting Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Andre Cavalcanti

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Neurourology and Urodynamics*.

Manuscript ID: NAU-10-0306

Title: QUANTITATIVE STUDY OF EXTRACELLULAR MATRIX AND MUSCLE CELLS IN URINARY BLADDER AFTER SPINAL CORD INJURY

Authors: Gomes, Jose
Cavalcanti, Andre
Costa, Waldemar
Cardoso, Luiz
Sampaio, Francisco

Date Submitted: 09-Dec-2010

[Print](#) [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.5.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2010. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

[Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) [Privacy Policy](#) [Contact Us](#) [Get Help Now](#)

APÊNDICE B –**QUANTITATIVE STUDY OF EXTRACELLULAR MATRIX AND MUSCLE CELLS
IN URINARY BLADDER AFTER SPINAL CORD INJURY**

Autores: Gomes, José; Cavalcante, Andre; Costa, Waldemar; Cardoso, Luiz; Sampaio, Francisco.

Rio de Janeiro

2011

Aims: Lesions on lower urinary tract innervations caused by spinal cord injuries usually affect the detrusor muscle and urethral sphincter. In addition to smooth muscle cells fibers, the collagen fibers and elastic system fibers, fibrous components of the extracellular matrix of the bladder wall, are also strongly related to vesicle bladder compliance. Thus the aim of this study was to quantify the fibrous components of the extracellular matrix and muscle fibers in cases of neurogenic bladder secondary to trauma. **Method.** Samples of neurogenic bladder were obtained from six men aged 34 ± 7.04 years who had previously undergone surgical repair following spinal cord injury. The control group samples ($n=6$) were obtained from individuals aged 33.5 ± 8.11 years who died of accidents. The samples were stained using the following histochemical techniques: H&E, Van Gieson and Sirius Red. Sections stained with Sirius Red were observed under polarization light microscopy to reveal different kinds of collagen. Immunohistochemical technique was used to characterize and quantify the elastic system fibers. Quantification analysis was performed by stereological methods. **Results:** In neurogenic bladder patients was an increase of 72% ($p < 0.01$) of the collagen was observed, while elastic fibers were increased by 101% ($p < 0.01$) in contrast, smooth muscle was decreased by 13% ($p < 0.01$). **Conclusion** In the neurogenic bladder with detrusor hyperreflexia the fibrous elements of the extracellular matrix and smooth muscle fibers were greatly modified. The elastic system fibers seem to be the most affected in this disease.

Key word: urinary bladder, stereology, extracellular matrix, immunohistochemistry.

Introduction

Bladder function is controlled by the nervous system which in turn coordinates the mechanisms of voluntary and involuntary micturition. The spinal control of micturition is between S2 and S4. Animal studies indicate that reflex voiding is performed through fibers located in the rostral brainstem ¹. Several neurological diseases cause vesico-sphincter dysfunction. Spinal cord injury is the main external agent causing motor impairment of the bladder. Traumatic spinal cord injury permanently alters the functions of the human bladder causing bladder dysfunction, hematuria and cystitis ².

The type of dysfunction varies with the level and extent of spinal cord injury. Neurogenic bladders can be flaccid and are subdivided into reflex neurogenic bladder and autonomous neurogenic bladder which are divided into paralytic sensory-motor and paralytic motor neurogenic bladder ³.

The lesions in the innervation of the lower urinary tract usually affect the detrusor muscle and urethral sphincter. The consequences of these alterations include mainly urinary incontinence and increase bladder pressure, which adversely affect the functioning of the superior urinary system leading to hydronephrosis and progressive renal insufficiency ^{4,3}.

Collagen and elastic system fibers are major fibrous components of the vesical extracellular matrix, and are closely associated with bladder compliance ^{5,6}. It has been shown that there is a significant increase in the expression of extracellular matrix proteins in the detrusor after birth when compared with the period of intrauterine life. Immunohistochemical techniques showed an increase in type III collagen and elastin, which highlight the importance of these molecules in bladder compliance ⁷.

On the other hand, the anomalous increase of collagen and other constituents of the extracellular matrix is a tissue response to injury and can lead to organ fibrosis. Previous studies in organs, other than the bladder, showed that collagen synthesis is increased in

pulmonary fibrosis in the glomerular sclerosis and other pathologies^{8,9,10}. A review of the literature showed that there are few studies showing changes of the different elements that make up the bladder wall i.e. the detrusor muscle and the fibrous elements of the extracellular matrix particularly in patients with bladder hyperreflexia caused by spinal cord injury^{11,12}. Because these patients undergo repair surgery shortly after trauma, the long-term effects a neurogenic dysfunction would have on the human bladder wall are not known. Notably, there are no studies showing changes in the neurogenic bladder wall after a period of a three years.

The clinical treatment of neurogenic bladder aims to achieve complete bladder emptying, ensure proper kidney function as well as to prevent complications i.e.: recurrent urinary tract infections and renal failures allowing the social and professional inclusion of the patient³. It is therefore interesting for these goals are achieved to determine, through quantitative and qualitative methods, the possible changes in the detrusor muscle and in the fibrous components of the extracellular matrix, collagen and elastic system fibers.

The aim of this study was therefore to determine possible changes in those elements in hyper-reflex neurogenic bladders in adults caused by chronic spinal cord injury above the autonomic sacral plexus and over three years.

MATERIAL AND METHODS

Patients with neurogenic bladder secondary to spinal-cord injury due to thoraco-lumbar or cervical trauma were enrolled in this study. The trauma occurred at least three years before the beginning of the study, and urodynamic investigation revealed decreased bladder compliance in all patients associated with urinary incontinence. The treatment prior to surgery was the use of clean intermittent catheterization associated with anticholinergics (oxybutynin). In this group of patients surgery for bladder augmentation with ileum was carried out due to the presence of urinary incontinence and upper urinary tract deterioration associated with high pressure loss (> 40 mm H₂O), even using conservative treatment.

Neurogenic bladder samples were obtained from six male patients aged 34 ± 7 (mean \pm SD) years who underwent the above surgical repair. Vesical tissue samples were collected from the dome during bladder augmentation with ileum. Controls consisted of macroscopically normal bladders obtained during necropsy of six individuals aged 33.5 ± 8 years who had died of accidents. All bladder samples were fixed in 10% buffered formalin and processed for paraffin embedding.

Histochemical techniques. Observation, characterization and quantification of smooth muscle and collagen and elastic system fibers were performed on sections using Van Gieson, and Picrosirius Red stains.

Immunohistochemistry: The elastic system fibers were evidenced and quantified by the Avidin Biotin method using the anti-elastin (Elastin Monoclonal Anti-clone BA-4. Mouse Ascites Fluid. SIGMA. ®), as previously described (Pinheiro et al, 2000).

To quantify the detrusor muscle, collagen, and elastic system fibers it was used the stereological method already described^{13,14}. The stereological parameter used was the volume density (V_v) We analyzed five sections of each bladder, and five random fields were

analyzed in each section, totaling 125 fields per sample. Quantification was made using a test system M42. The images were obtained on an Olympus BH 2 microscope coupled to a Sony CCD video camera, model DXC 151-a, with a magnification of 400X.

We used the two-tailed unpaired t test to compare the group means and statistical significance was set at $P < 0.05$. The statistical program was the Graf Pad V 4.

RESULT

The stereological analysis showed a significant difference between control and neurogenic bladder in all parameters analyzed. (Table 1)

In relation to collagen there was an increase of 72.9% ($p < 0.01$) in neurogenic bladder. The qualitative analysis of collagen after staining by Picrosirius and observed under polarized light showed a predominance of green color in neurogenic bladders (fig. 1B). In the control group we observed a predominance of red color featuring different types of collagen (Fig. 1A).

The elastic system fibers was increased by 101, 8% ($p < 0.01$) in neurogenic bladder patients compared to controls (figs 2A and 2B, respectively).

The quantification of detrusor muscle fibers showed a decrease of 13.86% ($p < 0.01$) in neurogenic bladders.

DISCUSSION

The normal human bladder has been studied and compared with bladders from different etiologies: bladder outlet obstruction as benign prostatic hyperplasia as urethral stenosis, hypocontractile and hipocomplacente bladder in the elderly and urinary bladder lesions found in myelomeningocele^{9, 15, 12}. Specifically on hyper-reflex bladders in adult patients suffering from spinal cord injuries, few studies in the literature was found^{15, 12, 11}. Notably, there is no data yet on bladder wall organization after a period of three or more years of neurogenic bladder hyperreflexia caused by spinal cord injury. The study aims to contribute towards filling this gap.

The changes observed in relation to collagen were shown to be quantitative and qualitative. The quantification of collagen in neurogenic bladders hyper-reflex showed an increase of 72.9% compared to the control group. This increase seems to occur preferentially between detrusor muscle bundles. In sections stained with Picrosirius and observed under polarized light showed that the predominant red color observed in the control group was replaced by the green color predominant in neurogenic bladders. This color change is indicative of the predominant type of collagen that becomes possibly collagen type III¹⁶. The increase in green color seems to confirm that the quantitative data showing an increase of collagen even after a considerable period of time¹⁷, assessed the visco-elastic behavior of rat normal bladder compared with bladders of rats with induced spinal cord injury. The study showed that the collagen concentration was decreased in rats with spinal cord injury. These results, even considering the fact that the work was done in mice, seem to indicate a difference in the behavior of collagen. In the acute phase there is a collagen decrease whereas in the chronic phase there is markedly increase. The data obtained in our study suggest that this accumulation of connective tissue can change significantly the complacency of the bladder causing changes in the stability of the detrusor muscle. The increased percentage of

collagen observed in this study showed the characteristic of fibrotic neurogenic bladders. This feature could have resulted in intermittent urination observed in patients with spinal cord injury^{9,8}.

A significant increase in elastic system fibers in 101.8% observed in this study confirms the clinical observation that individuals with neurogenic bladder have intermittent urination⁹.

The decrease in compliance is clinically associated with symptoms of urinary frequency, deterioration of the urinary stream, intermittency, increased residual urine and failure of the detrusor muscle^{6,18,2}. The results of this study showed a reduction of 13.86% in volume density of muscle fibers compared to control group. These findings seem consistent with clinical symptoms. It should be noted that they refer to the chronic phase of trauma, with over three years. This reduction could be the result of motor neuron degeneration resulting from spinal cord injury with consequent atrophy of smooth muscle cells^{1,18,19}, showed that rats with spinal cord injury after 10 days increased the bladder compliance due to a hypertrophy of their muscle layer. These results seem to show that both the collagen and muscle presented different behavior in acute and chronic phases.

Conclusion. In the chronic hyper reflex neurogenic bladder the elastic system fibers seems to be the most affected. However, all elements analyzed showed significant difference compared with the control group. These observations about the different components of the bladder wall allow to characterize the morphological substrate that contribute to explains the complacency of the urinary bladder in neurogenic bladder hyperreflexia.

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

- 1 – de Groat WC, Yoshimura N. Changes in afferent activity after spinal cord injury. *NeuroUrol Urodynam* 2010; 29 (1): 63-76.
- 2 – Herrera JJ, Haywood-Watson RJ. Acute and chronic deficits in the urinary bladder after spinal contusion injury in the adult rat. *J Neurotrauma* 2010; 27 (2): 423-31.
- 3 – Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ. *Cambell's Urology*. Philadelphia Saunders, vol. 2; 2002. p. 1306.
- 4 – Chartier-Kastler E, Ayoub N, Even-Schneider A, Richard F, Soler JM, Denys P. Neurogenic bladder: pathophysiology of the disorder of compliance. *Prog Urol* 2004; 14 (4):472-8.
- 5 - Susset JG, Servot-Viguiet D, Lamy F, Madernas P, Black R. Collagen in 155 human bladder. *Invest Urol* 1978; 16 (3): 204-6
- 6 - Cortivo R, Pagano F, Passerini G, Abatangelo G, Castellani I. Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. *Brit J Urol* 1981; 53 (2): 134 -137.
- 7 – Smeulders N, Woolf A S, Wilcox DT. Extracellular matrix protein expression during mouse detrusor development. *J Pediatric Surg* 2003; 38: 1-12.
- 8 - Kuhn C, Boldt J, King T, Cruch E, Vartio T, McDonald J. An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *An. Ver Respir Dis* 1989; 140: 1693.
- 9 - Peten E, Striker L, Carome M, Elliotte S, Yang CW, Strker G. The contribution of increased collagen synthesis to human glomerulosclerosis: A quantitative analysis of $\alpha 2IV$ collagen mRNA expression by competitive polymerase chain reaction. *J. Exp. Med* 1992; 176: 1571.
- 10 - Deveaud CM, Macarak EJ, Kucick U, Ewalt DH, Abrams WR, Howard PS. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. *J Urol* 1998; 160(4):1518-27.

- 11 - Oliver J, Wiseman Claran M, Brady, Iqbal F, Hussain Procar Dasgupta, Hilary watt, Clare J, Fowler and David N, Landon. The ultrastructure and patients with detrusor hiperreflexia. *J Urol* 2002; 168: 2040-2045.
- 12 - Janzen J, Bersch U. Pietch-Breitfield B. Urinary bladder biopsies in spinal cord injured patients 2001; 39: 568-70.
- 13 - Weibel ER. *Stereological Methods Pratical Methods for Biological Morphometry*. Vol. 1. London, Academic Press 1979; p. 415.
- 14 - Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75:469-486.
- 15- German K, Bedwani J, Davies J, Brading AF, Stephenson TP. Physiological and morphometric studies into the pathophysiology of detrusor hyperreflexia in neuropathic patients. *J Urol* 1995; 153: 1678-1683.
- 16 - Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems *Cell Biology International*1996; vol. 20, No. 1, 15–27.
- 17 - Nagatomi J, Gloeckner DC, Chancellor MB, deGroat WC, Sacks MS. Changes in the Biaxial Viscoelastic Response of the Urinary Bladder following Spinal Cord Injury. *Annals of Biomedical Engineering* 2004; vol: 32. P. 1409-1419.
- 18 - Gloeckener DC, Sacks MS, Fraser MO, Somogyi GT, de Groat WC, Chancellor MB. Passive Biaxial Mechanical Properties of the Rat Bladder Wall After Spinal Cord Injury. *The Journal of Urology* 2002; vol: 167. P.2247-2252.
- 19 - Nagatomi J, Toosi KK, Grashow JS, Chancellor MB, Sacks MS. Quantification of Bladder Smooth Muscle Orientation in Normal and Spinal Cord Injured Rats. *Annals of Biomedical Engineering* 2005; p. 1078-1089.

Legends

Figure 1 - Organization of collagen as seen in Sirius red-stained sections photographed under polarized light. Panels B and A show representative bladder sections from the neurogenic and control group respectively. Note that in the control group there is a predominance of red-orange colors, whereas in neurogenic bladder patients a greenish color prevails. X400.

Figure 2 – A) Photomicrograph of elastic fibers in the control group. Immunohistochemistry for anti-elastin. X 400 B) Photomicrograph of elastic fibers in neurogenic bladder. Immunohistochemistry for anti-elastin. X400.

Table I: Volumetric densities of smooth muscle and extracellular matrix elements of normal bladders and neurogenic bladders hyper-reflex. Figures are mean \pm SD from six patients and from six normal bladders.

	Smooth muscle n=6		Collagen n=6		Elastic fibers n=6	
	Normal	Neurogenic	Normal	Neurogenic	Normal	Neurogenic
Mean	92.06 \pm 0.81	*79.33 \pm 2.33	7.01 \pm 0.5	*12.13 \pm 2.9	13.26 \pm 0.52	*26.78 \pm 2.61
SD						

P < 0,01

SD = Standard deviation

* = Statistical difference, p < 0.01

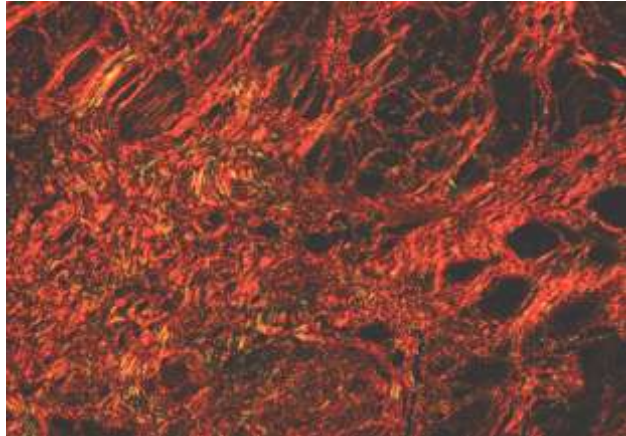


Fig. 1A

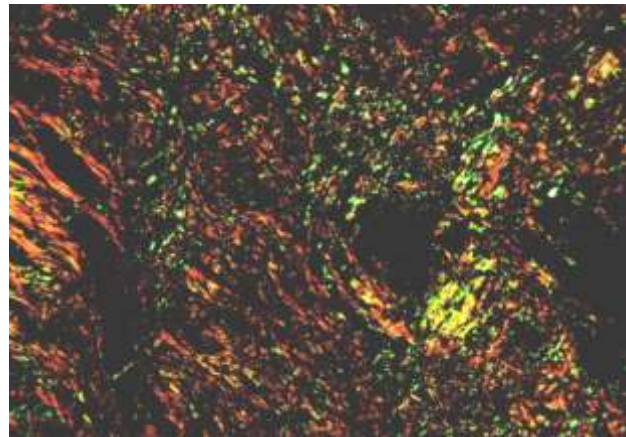


Fig. 1B

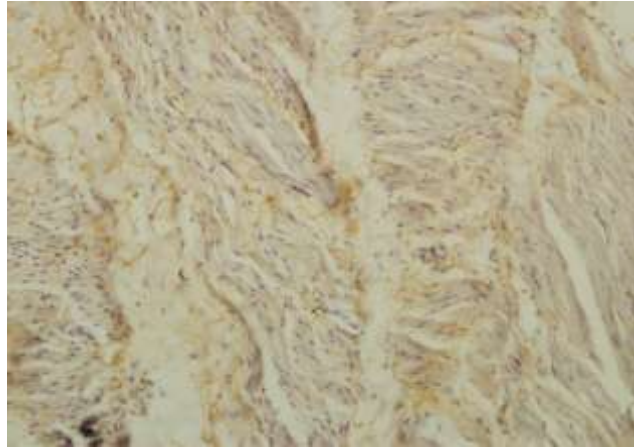


Fig. 2A

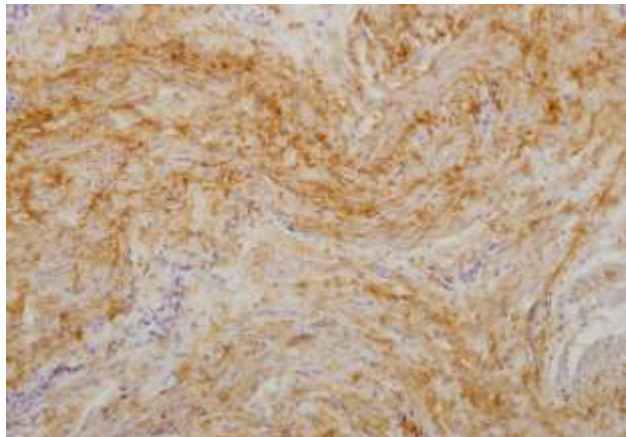


Fig. 2B

ANEXO A - Aprovação do Projeto em Conselho de Ética

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



Rio de Janeiro, 04 de junho de 2007

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Aut. José Guimarães Gomes
Orient. Prof. Waldemar Silva Costa

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1738-CEP/HUPE) "AVALIAÇÃO DE BEXIGAS NEUROGÊNICAS HIPER-REFLEXAS DE PACIENTES COM TRAUMATISMO RAQUIMEDULAR (TRM)" 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. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
COMITE DE ETICA EM PESQUISA
HUPE/ UERJ

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2587-6353 - FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br