RICARDO LUÍS VITA NUNES

**Influência da dieta hipercolesterolêmica na
remodelação do colágeno da matriz extracelular
da parede vesical em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Urologia

Orientador: Prof. Dr. Homero Bruschini

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nunes, Ricardo Luís Vita

Influência da dieta hipercolesterolêmica na remodelação do colágeno da matriz extracelular da parede vesical em ratos / Ricardo Luís Vita Nunes. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Urologia.

Orientador: Homero Bruschini.

Descritores: 1.Colesterol na dieta 2.Colágeno tipo I 3.Colágeno tipo III
4.Matriz extracelular 5.Bexiga urinária 6.Ratos Wistar

USP/FM/SBD-408/09

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria Regina Vita Nunes, e ao meu pai, Luiz Antonio Ricco Nunes, pelos quais tenho enorme orgulho e gratidão. Ela, pela sua força, coragem e apoio. Ele, pela generosidade, sabedoria e incansável dedicação.

À minha irmã, Maria Carolina Vita Nunes, pelos seus conselhos e incentivo.

À minha avó, Elza Nascimento Vita, pelo carinho e atenção.

À minha esposa, Nathalia Perazzo Tereran, grande amor da minha vida, que em todos os momentos retribuiu esse amor com incessante dedicação e cumplicidade, e que me deu a maior alegria da minha vida, meu filho Diego Perazzo Vita Nunes, hoje minha maior fonte de inspiração e força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Miguel Srougi pelos ensinamentos e oportunidades em toda minha formação urológica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Homero Bruschini, que sempre me incentivou, ensinou, abriu todas as portas possíveis e me serve de inspiração na minha caminhada acadêmica e profissional.

Ao Dr. Nelson Ileo Dias Montellato pelo carinhoso acolhimento, confiança e sincera amizade paternal.

Ao Dr. José Cury, o primeiro a me inserir na carreira acadêmica, à Dr^a. Katia Ramos Moreira Leite, Dr^a. Walcy Paganelli Rosolia Teodoro e Prof^a. Dr^a. Vera Luiza Capelozzi, pela paciência e valiosa contribuição para a concretização dessa tese.

Aos meus “fiéis escudeiros” Dr. Marcel Silveira e Karen Utsunomia e à Maria Luisa Guzzo, fundamentais e imprescindíveis, sem os quais não teria sido possível alcançar esse sucesso.

Aos meus sogros, Ari Tereran e Maria Cristina Perazzo Tereran, e ao meu cunhado, Fabio Perazzo Tereran, pela constante motivação.

Aos doutores Gustavo Borghesi, Roberto André Soler Mesquita, Zein Mohamed Sammour e João Paulo de Noronha Duprat Cardoso, amigos e conselheiros que, próximos ou à distância, sempre ofereceram seu apoio.

Agradeço a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo fundamental e precioso apoio e financiamento do projeto de pesquisa, sob o número de processo 07/58871-6.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de Gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Estrutura da parede vesical.....	3
1.2	Colágeno.....	5
1.3	Obstrução infravesical.....	8
1.4	Hipercolesterolemia	10
2	OBJETIVO	13
3	MÉTODOS	15
3.1	Animais	16
3.2	Plano de trabalho	17
3.3	Análise morfológica.....	22
3.4	Análise estatística	25
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Animais	28
4.2	Colesterol total	28
4.3	LDL-colesterol.....	30
4.4	Peso corporal	32
4.5	Análise morfológica.....	33
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÃO	50
7	ANEXOS	52
8	REFERÊNCIAS.....	59

Apêndices

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

C	- Complacência
CB	- Centro de Bioterismo
CT	- Colesterol total
DATL	- Dieta de alto teor lipídico
dL	- decilitros
DN	- Dieta normal
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>et al.</i>	- e outros
FELASA	- Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FGF	- <i>Fibroblast growth factor</i>
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G	- Gauges
g	- gramas
HE	- Hematoxilina-eosina
HDL	- <i>High density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
IC	- Intervalo de confiança
IL	- Interleucina
kg	- quilogramas
L	- litros
LDL	- <i>Low density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)
LIM	- Laboratório de Investigação Médica
MEC	- Matriz extracelular

mg	- miligramas
min	- minutos
mL	- mililitros
mm	- milímetros
mmol	- milimol
mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
OIV	- Obstrução infravesical
<i>outliers</i>	- animais fora do padrão
P	- Pressão
p	- significância
rpm	- rotações por minuto
TGF	- <i>Transforming growth factor</i>
T0	- Tempo inicial / basal
T10	- Tempo final / 10 semanas
V	- Volume
VLDL	- <i>Very low density lipoprotein</i> (lipoproteína de muito baixa densidade)
μm	- micrômetros
μm ²	- micrômetros quadrados
Δm	- Diferença média
°C	- graus Celsius
<	- menor que
=	- igual a
±	- mais ou menos
%	- porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proposta esquematizada do estudo.....	18
Figura 2. Evolução longitudinal do colesterol total (mg/mL) segundo a dieta	30
Figura 3. Evolução longitudinal do LDL-colesterol (mg/mL) segundo a dieta	31
Figura 4. Evolução longitudinal do peso corporal (g) segundo a dieta.....	33
Figura 5. Análise de microscopia do Picrosirius sob luz polarizada para fibras colágenas maduras e imaturas. A – Grupo 1; B – Grupo 2 e C – Grupo 3	35
Figura 6. Distribuição comparativa em “box-whisker plots” da quantidade de fibras maduras (μm) coradas pelo Picrosirius	37
Figura 7. Distribuição comparativa em “box-whisker plots” da quantidade de fibras imaturas (μm) coradas pelo Picrosirius.....	37
Figura 8. Análise do colágeno tipo I por meio de imuno-histoquímica	39
Figura 9. Distribuição comparativa em “box-whisker plots” da quantidade de colágeno tipo I (μm) pela imuno-histoquímica	40
Figura 10. Análise do colágeno tipo III por meio de imuno-histoquímica	41
Figura 11. Distribuição comparativa em “box-whisker plots” da quantidade de colágeno tipo III (μm) pela imuno-histoquímica	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Colesterol total (mg/mL) segundo a dieta	29
Tabela 2. LDL-colesterol (mg/mL) segundo a dieta	31
Tabela 3. Peso corporal (g) segundo a dieta	32
Tabela 4. Análise das fibras colágenas maduras (A) e imaturas (B) pela coloração Picrosirius vermelho	36
Tabela 5. Quantidade de colágeno tipo I na parede vesical por análise imuno-histoquímica	38
Tabela 6. Quantidade de colágeno tipo III na parede vesical por análise imuno-histoquímica	42

RESUMO

RESUMO

Nunes RLV. *Influência da dieta hipercolesterolêmica na remodelação do colágeno da matriz extracelular da parede vesical em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 67p.

Introdução: A bexiga é responsável em armazenar urina em volume adequado e de esvaziar seu conteúdo de forma plena. Suas propriedades miogênicas intrínsecas e viscoelásticas são as responsáveis por esta função. Disfunções vesicais podem ser decorrentes, dentre outras causas, de anormalidades intrínsecas da musculatura detrusora ou da composição de sua matriz extracelular (MEC). O colágeno corresponde a 50% do estroma vesical, possuindo importante papel na adaptação vesical a condições fisiopatológicas específicas. Os colágenos tipo I e III são os mais comuns, sendo o colágeno tipo III o primeiro a ser sintetizado em processos de reparação e fibrose. Diversas afecções como a obstrução infravesical (OIV) parcial crônica podem induzir estes processos através da remodelação da MEC e conseqüentemente alterar a função vesical. Acredita-se que a hipercolesterolemia também o faça, porém ainda não foi reproduzida tal associação a nível morfológico. O objetivo deste estudo é avaliar se dieta hipercolesterolêmica promove alterações estruturais vesicais em ratos, especialmente no que diz respeito à remodelação colágena.

Método: Foram utilizadas 45 ratas da raça Wistar, de quatro semanas de idade, divididas em três grupos: 1) controle com dieta comum padrão para roedores (DN); 2) modelo de OIV com DN e 3) controle com dieta de alto teor lipídico (DATL – 1,25% colesterol). Análise sérica do colesterol e fração LDL e medição do peso corporal foram realizadas em todos os animais inicialmente e no final do estudo. Com quatro semanas de estudo, as ratas dos grupos 1 e 3 foram submetidas à cirurgia simulada, enquanto os animais do grupo 2 foram efetivamente submetidos à cirurgia de OIV parcial. Após dissecação da uretra, fez-se uma ligadura parcial com Nylon 5-0, com um lúmen residual de aproximadamente 1 mm. Após seis semanas, todos os animais foram submetidos à remoção de suas bexigas e então sacrificados. Análise morfológica foi realizada através da coloração de Picrosirius vermelho e de imuno-histoquímica para os colágenos tipos I e III. As variáveis categóricas foram expressas em médias $\pm$ desvio padrão e a comparação entre grupos realizada pelo método ONEWAY-ANOVA e pela análise de comparações múltiplas de Tukey, quando houve diferença. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. **Resultados:** Este estudo demonstrou que a DATL em ratas Wistar proporcionou aumento significativo das taxas de LDL-colesterol ($p < 0,001$) e do peso corporal ($p = 0,017$) em relação a ratas alimentadas com DN no período de dez semanas. Além disto, induziu alterações morfológicas significativas da matriz extracelular, no que diz respeito à remodelação das fibras colágenas imaturas e do

colágeno tipo III em relação ao grupo controle ($p = 0,002$ e $p = 0,016$, respectivamente), de forma semelhante ao que ocorre no modelo experimental de OIV parcial crônica. **Conclusão:** A dieta hipercolesterolêmica administrada a ratas Wistar promoveu, além de aumento do peso corporal e elevação da fração LDL-colesterol, alterações significativas na composição colágena da MEC vesical.

Descritores: 1.Colesterol na dieta 2.Colágeno tipo I 3.Colágeno tipo III
4.Matriz extracelular 5.Bexiga urinária 6.Ratos Wistar.

SUMMARY

Nunes RLV. *Influence of the hypercholesterolemic diet on the collagen remodeling of the bladder wall extracellular matrix in rats* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 67p.

Purpose: Preserved bladder function is defined as the adequate storage and emptying of its urinary content. Compliance is an important factor for these functions and is directly related to the extracellular matrix composition. Its abnormalities can lead to bladder dysfunctions. The collagen represents 50% of bladder stroma, playing an important role in the bladder adaptation to specific pathologic conditions. Types I and III collagens are the most prevalent in bladder wall whereas type III collagen is the first synthesized in reparation and fibrosis processes. Bladder outlet obstruction (BOO) promotes this process and hypercholesterolemia is also believed to create conditions for it, although no morphologic association has already been demonstrated. In this study we aimed to verify if hypercholesterolemic diet promotes structural bladder wall modifications, regarding the collagen remodeling.

Methods: Forty-five female heterogenic Wistar 4 weeks-old rats were divided into three groups: 1) control fed on a normal diet (ND); 2) BOO model fed on a ND and 3) control fed on a hypercholesterolemic diet (HCD – 1.25% cholesterol). Initially, serum cholesterol, LDL-cholesterol and body weight were measured. Four weeks later groups 1 and 3 underwent a sham operation while group 2 underwent a partial BOO operation. After the urethra was dissected a 5-zero nylon suture was passed and tied loosely around the urethra with a 22G needle besides it. Six weeks later the bladders of all animals were removed, serum cholesterol and LDL-cholesterol analysis was performed, body weight was measured and then they were sacrificed. Morphological analysis was performed by Picrosirius red staining and immunohistochemistry for types I and III collagen. Statistical analysis was done comparing groups by the Oneway-Anova method and Tukey multiple comparisons when needed. Significance was considered when $p < 0.05$.

Results: Wistar rats fed on a HC diet had a significant increase of LDL-cholesterol levels ($p < 0.001$) and body weight ($p = 0.017$), when compared to the control group fed on a normal diet in the period of ten weeks. Moreover, HC diet induced significant morphological alterations of the extracellular matrix of the bladder wall, regarding immature collagen fibers and type III collagen remodeling, when compared to the control group ($p = 0.002$ and $p = 0.016$, respectively), resembling the process promoted in the BOO model. **Conclusions:** A hypercholesterolemic diet in Wistar rats promoted, besides the body weight and LDL-cholesterol increase, morphological alterations of the bladder extracellular matrix, regarding collagen remodeling.

Descriptors: 1.Cholesterol, dietary 2.Collagen type I 3.Collagen type III 4.Extracellular matrix 5.Urinary bladder 6.Rats, Wistar

1 INTRODUÇÃO

A bexiga exerce a função de armazenar urina em volume socialmente adequado e de esvaziar seu conteúdo de forma plena por meio de ativação sincrônica de toda sua musculatura. O processo da micção envolve um circuito neurológico complexo no cérebro, medula espinhal e nervos periféricos, o qual coordena a atividade da musculatura lisa na bexiga e na uretra (Torrens, 1987; de Groat *et al.*, 1993; Yoshimura, de Groat, 1997). Esse circuito atua no modo “liga-desliga” a fim de alternar o funcionamento do trato urinário inferior entre os modos de armazenamento e esvaziamento.

As propriedades miogênicas intrínsecas e viscoelásticas da parede vesical, que envolvem os componentes celulares e extracelulares, são as responsáveis pela manutenção de baixas pressões durante o enchimento vesical. A complacência (C) vesical é definida como a alteração da pressão (P) intravesical em relação à alteração do volume intravesical (V). É calculada por meio da relação entre a alteração do volume e a correspondente alteração da pressão intravesical (Abrams *et al.*, 1988). Além disso, é necessário um estímulo neurológico para que uma contração muscular lisa imediata e sustentada promova micção efetiva.

As disfunções vesicais, tanto de armazenamento quanto de esvaziamento, ocorrem como resultado de uma grande variedade de desordens neurológicas, assim como de anormalidades miogênicas intrínsecas da musculatura detrusora ou de alterações na composição de

seu interstício. Para melhor entender sua complexidade, devemos analisar inicialmente a estrutura da parede vesical e os fatores que influem em suas modificações.

1.1 Estrutura da parede vesical

A superfície interna da bexiga é constituída pelo epitélio transicional, usualmente composto de seis camadas de células espessas e por uma membrana basal, nomeado urotélio. Internamente há a lâmina própria, que forma uma camada espessa de tecido conectivo fibroelástico, o qual proporciona distensibilidade à parede vesical. Essa camada é atravessada por inúmeros vasos sanguíneos e contém fibras de musculatura lisa dispostas em uma imprecisa *muscularis* mucosa.

Profundamente à lâmina própria temos a musculatura lisa da parede vesical, a musculatura detrusora, composta por grandes fibras musculares que formam feixes frouxamente entrelaçados e dispostos em camadas longitudinal interna, circular média e longitudinal externa. A conformação dessas fibras é configurada idealmente para favorecer o esvaziamento de um compartimento esférico como a bexiga. O colo vesical possui conformação diferente das três camadas musculares, inclusive com diferença entre os sexos, a fim de desempenhar seu papel de esfíncter urinário interno. O trígono vesical, por sua vez, constitui uma outra porção da parede vesical com uma conformação peculiar, constituída por uma camada

superficial derivada da musculatura ureteral, que se estende até o verumontanum; uma camada profunda que representa uma continuidade da bainha de Waldeyer até o colo vesical, e uma camada detrusora semelhante à supracitada (Brooks, 2002).

A espessura da camada muscular detrusora varia individualmente, sobretudo devido ao grau de distensão vesical decorrente de seu enchimento (Jequier, Rousseau, 1987).

As fibras musculares são separadas umas das outras por um tecido conjuntivo que contém vasos sanguíneos e linfáticos e nervos, chamado de matriz extracelular (MEC). Esta foi considerada durante muitos anos somente um suporte estrutural para os tecidos em virtude de sua grande proporção de fibras; no entanto, em vertebrados desempenha importantes funções como adesão, modulação, diferenciação, proliferação, expressão gênica e participação no comportamento celular. As propriedades específicas do tecido conjuntivo em cada órgão dependem da composição e proporção dos elementos da matriz extracelular necessários para o processo de interação entre as células, caracterizados pela determinação de uma MEC altamente específica para a função desempenhada por cada órgão (Gelse *et al.*, 2003).

Uma das mais importantes funções do tecido conjuntivo é participar ativamente dos processos de remodelamento e fibrose, que são resultantes da interação entre as células e os componentes da MEC, caracterizada pela mudança em sua constituição e, principalmente, na distribuição das fibras de colágeno.

1.2 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante do interstício, correspondendo a 25% das proteínas do organismo. Sua molécula é formada por três cadeias polipeptídicas, do tipo cadeia alfa, dispostas na forma de tripla hélice.

Existem cerca de vinte tipos diferentes de cadeias alfa (vinte genes diferentes), capazes de formar até mil diferentes tipos de colágeno, sendo que aproximadamente trinta e dois tipos já foram identificados. Os mais bem definidos são os I, II, III e IV. Os colágenos dos tipos I, II e III formam fibrilas de 20 a 300 nm de diâmetro, que se organizam em fibras visíveis à microscopia óptica, com espessura de até alguns micrômetros. O colágeno do tipo VI também é fibrilar e forma fibrilas finas que se interpõem entre feixes de fibrilas colágenas dos tipos I e III, associando-as (Pereira, 1993).

O metabolismo do colágeno nos tecidos normais envolve o equilíbrio entre sua biossíntese e sua degradação (Fleischmajer *et al.*, 1985). A síntese do colágeno compreende as seguintes etapas, resumidamente:

- 1) ativação dos genes das cadeias alfa, com síntese dos mRNA, regulada por fatores de crescimento (FGFa, TGF-beta, IL-1, entre outros);
- 2) síntese das cadeias alfa;
- 3) hidroxilação da prolina e da lisina;
- 4) associação das três cadeias alfa, formando assim a molécula de pró-colágeno;
- 5) glicosilação do pró-colágeno;
- 6) excreção deste através da membrana plasmática;
- 7) no meio extracelular, essas moléculas sofrem clivagem pelas peptidases;
- 8) as então formadas moléculas de colágeno associam-se formando as fibrilas colágenas;
- 9) as fibrilas formam ligações cruzadas transversais, entre

resíduos de lisina, que serão a base estrutural do colágeno; e 10) organização das fibrilas em fibras colágenas. Todo esse processo ocorre na dependência da ação dos fibroblastos (Cotran *et al.*, 1989; Pereira, 1993).

Outras proteínas compõem a MEC, como a elastina, os glicosaminoglicanos e as ditas proteínas não fibrosas, como fibronectina, laminina, tenascina, entactina e ondulina. As proteínas que compõem a MEC são renovadas constantemente pela degradação que ocorre a partir da ação de proteases específicas, as metaloproteases. As collagenases, a gelatinase, a elastase, as glicosidases e a estromelisina (que digere proteoglicanos) são exemplos de metaloproteases (Pereira, 1993).

1.2.1 Colágeno na parede vesical

Os principais constituintes do estroma vesical são o colágeno (em torno de 50%) e a elastina (2%), em uma matriz composta de proteoglicanos (Chancellor, Yoshimura, 2002). As principais células são os fibroblastos. As propriedades mecânicas passivas da parede vesical dependem das propriedades viscoelásticas do estroma e da musculatura detrusora relaxada. O estroma é considerado um tecido metabólico passivo, que ocupa o espaço entre os feixes musculares, vasos sanguíneos e nervos e que possui um importante papel na adaptação da bexiga a condições fisiopatológicas específicas (Macarak, Howard, 1999). Além disso, especula-se também a possibilidade de haver uma íntima relação entre as alterações na composição desse estroma com o crescimento e o funcionamento muscular.

As propriedades mecânicas e a função dos colágenos na parede vesical são bastante similares às apresentadas nos tendões, porém na bexiga as fibras colágenas suportam maior distensão. Essa habilidade de alterar sua tortuosidade faz das fibras colágenas um elemento indispensável para a capacidade viscoelástica vesical (Chancellor, Yoshimura, 2002).

Na bexiga, os colágenos tipo I, III e V são os mais comuns, sendo o colágeno tipo I o mais prevalente (Macarak *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1998).

As fibras do colágeno tipo I se dispõem de forma ondulada em “zigue-zague” e, quando submetidas a uma carga volumétrica, estiram-se a ponto de aumentarem seu comprimento em 3 a 5% (Chang *et al.*, 1998). Normalmente formam fibrilas heterotípicas com outros colágenos, especialmente com os tipos III e V, consistindo em obstáculo que limita a compatibilidade mútua entre os colágenos fibrilares (Teodoro, Yoshinari, 2009; Chanut-Delalande *et al.*, 2001; Ottani *et al.*, 2002).

O colágeno tipo III, que geralmente se localiza próximo ao tipo I, também é amplamente distribuído pela parede vesical. É responsável por formar as fibras reticulares, que respondem pela sustentação das células musculares, em associação à substância amorfa da MEC (Teodoro, Yoshinari, 2009). O colágeno tipo III parece sofrer mudanças conformacionais para acomodar o aumento de volume intravesical. Estimou-se que quando a bexiga encontra-se vazia, o colágeno tipo III do interstício vesical apresenta-se como uma malha de fibras frouxas e onduladas, sem seguir uma orientação uniforme e como se fossem molas dispersas. Conforme a bexiga se distende, essas fibras passam a se orientar

ortogonalmente ao urotélio e aos feixes musculares tornando-se bastante enroladas entre si. Ao atingir a capacidade vesical máxima, as fibras colágenas tipo III alongam-se e afinam-se, deslizando umas pelas outras, agrupadas bem juntamente e orientadas paralelamente ao urotélio. É o alongamento dessas “molas” colágenas do tipo III que capacita a bexiga a progressivamente suportar maiores volumes sob uma pressão constante à medida que o volume vesical aumenta (Chang *et al.*, 1998). O colágeno tipo III é o primeiro a ser sintetizado em processos de reparação, fibrose e desenvolvimento fetal e, de acordo com a função de cada órgão, ele é substituído pelo colágeno I (Teodoro, Yoshinari, 2009).

Um dos modelos mais utilizados para a indução de fibrose vesical experimental é o de obstrução infravesical parcial crônica.

1.3 Obstrução infravesical

O uso da obstrução infravesical crônica parcial em animais induz aumento da massa vesical e altera seu funcionamento. Dessa forma, promove aumento da frequência urinária, do volume residual e da pressão intravesical durante a micção, procurando reproduzir o que ocorre em seres humanos, assim, isso se constitui em estabelecido modelo experimental (Sutherland *et al.*, 1998; Gabella, Uvelius, 1999; Li *et al.*, 2006).

Na fase inicial da obstrução infravesical (OIV) crônica parcial, é observada uma hiperdistensão transitória da bexiga, iniciando-se os eventos

moleculares que levam à hipertrofia do músculo detrusor (Levin *et al.*, 1995; Levin *et al.*, 2005). Com a remodelação da parede vesical que ocorre em fase avançada da OIV, algumas bexigas tornam-se disfuncionais, e essas alterações caracterizam-se pela irreversibilidade (Uvelius *et al.*, 1991; Hanai *et al.*, 2002; Hanai *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003).

Evidências recentes demonstraram que a isquemia seguida de reperfusão é creditada como principal fator fisiopatológico das disfunções vesicais secundárias à obstrução parcial crônica, como a baixa complacência e hiperatividade detrusora. Isso ocorre a partir da indução de fibrose vesical, o que diminui a fração volumétrica da musculatura lisa da bexiga quando em estágio irreversível (Azadzo *et al.*, 1999a; Shabsigh *et al.*, 2000; Ghafar *et al.*, 2002; Levin *et al.*, 2003; Levin *et al.*, 2004). Presume-se, inclusive, que as lesões decorrentes da reperfusão sejam mais exuberantes que as causadas apenas pela isquemia (Bratslavsky, 2003).

A fibrose ocorre a partir de alterações estruturais da parede vesical na tentativa de se adaptar à obstrução com aumento da pressão intravesical para manutenção do fluxo urinário, decorrentes do aumento da deposição de colágeno em toda espessura vesical, principalmente à custa de colágeno tipo III, o que propicia diminuição da contratilidade e da capacidade viscoelástica da bexiga (Tekgul *et al.*, 1996; Gosling, 1997; Deveaud *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000; Strauss *et al.*, 2000).

A estimulação excessiva dos fibroblastos em resposta à lesão física ou a outros estímulos inflamatórios e de destruição do tecido, como os decorrentes do quadro obstrutivo, pode levar a uma ativação persistente do

processo de fibrose, com aumento da matriz extracelular, em especial do colágeno que é depositado independentemente do aumento do número dos fibroblastos (Teodoro, Yoshinari, 2009). Ao mesmo tempo, o aumento da deposição colágena acarreta ao maior presença de fatores de crescimento e citocinas no tecido em questão, caracterizando bem a função reparadora do colágeno (Gelse *et al.*, 2003)

O aumento da deposição do colágeno tipo III parece ser regulado pelo aumento simultâneo da transcrição de seu mRNA (Kaplan *et al.*, 1997). Esse processo de deposição inicia-se no urotélio e lâmina própria e estende-se para a camada muscular, enquanto a fibrose progride (Tekgul *et al.*, 1996).

As principais alterações macroscópicas da parede vesical são seu espessamento e a presença de trabeculações. Estas são causadas pela deposição de colágeno na MEC detrusora (Goslin, Dixon, 1980). Diversos fatores além da OIV parecem ser os promotores dessas alterações, geralmente por meio desse processo de fibrose. Entre eles temos a obesidade, o envelhecimento, o diabetes melito e a dislipidemia. Este último se subdivide em hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, sendo esta de particular interesse pela prevalência e atenção que desperta atualmente na saúde pública.

1.4 Hipercolesterolemia

A saúde pública mundial enfrenta desafios cada vez mais intensos, decorrentes dos processos de urbanização populacional, industrialização e

expansão tecnológica. Um deles, em maior evidência na atualidade e de relevante importância, é a hipercolesterolemia, um dos componentes da dislipidemia, afecção que acomete uma parcela cada vez maior de pessoas. A ocorrência da hipercolesterolemia é influenciada principalmente pelas mudanças de hábitos alimentares e pela qualidade e composição dos alimentos industrializados na atualidade.

As consequências da hipercolesterolemia são diversas e amplamente estudadas e sua importância deve ser ressaltada, uma vez que no Brasil a principal causa de mortalidade são as doenças do aparelho circulatório, as quais consistem em 31% das causas de óbito em adultos (Ministério da Saúde, 2000). Os dados de importantes estudos epidemiológicos, como o Multiple Risk Factor Intervention Trial e o Framingham Heart mostram uma relação entre o aumento nas concentrações séricas de colesterol e as taxas de eventos coronarianos agudos e de mortalidade da doença coronariana. Além disso, outros estudos sugerem que o nível de colesterol na infância seja um fator preditivo do nível de colesterol na vida adulta. O início da aterosclerose já na infância, pelo aumento do colesterol plasmático, seria potencializado no decorrer da vida por uma série de outros fatores, do que se infere a necessidade de ampla prevenção dos fatores de risco ainda na idade infanto-juvenil. Assim sendo, a dieta consiste em um dos principais fatores que podem ser alterados, tendo-se em vista tal prevenção (Santos *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2003; Grillo *et al.*, 2005).

Entretanto, a influência da hipercolesterolemia sobre o trato urinário permanece pouco explorada. A ocorrência de hipercolesterolemia induzida

por dieta em modelo experimental (Sérougne *et al.*, 1995; Asahina *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2007; Zulet *et al.*, 2007) relaciona-se com aumento prostático, hiperatividade detrusora e disfunção erétil (Son *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2007). Além disso, sugere-se que a aterosclerose induzida por hipercolesterolemia ocasionaria um quadro de isquemia crônica vesical, acelerando a remodelação vesical que ocorre após OIV, resultando em maior prejuízo à sua função.

Apesar de escassa, a literatura científica que aborda a relação de hipercolesterolemia e bexiga sugere possíveis alterações da função vesical, principalmente no que diz respeito a sua atividade muscular específica e a sua capacidade viscoelástica. No entanto, até o momento não há qualquer evidência científica que associe objetivamente alterações de dieta e modificações histológicas na estrutura da parede vesical.

2 OBJETIVO

Avaliar se dieta hipercolesterolêmica promove alterações na composição de colágeno da parede vesical em ratos.

3 MÉTODOS

Foi realizado estudo experimental na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), no período compreendido entre fevereiro de 2008 e junho de 2009, aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP, em 22 de agosto de 2007 (Apêndice I).

3.1 Animais

Foram utilizadas 45 ratas da linhagem heterogênica e raça Wistar, com idade de quatro semanas, fornecidas pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CB/FMUSP). Os animais foram criados em condições de barreiras para animais convencionais, segundo as referências da FELASA, separados por sexo (fêmeas) e colocados em gaiolas coletivas de polietileno, mantidos nas condições ambientais de temperatura constante, iluminação de 13 horas escuro e 11 horas claro. Todos os grupos tiveram acesso à água *ad libitum* e foram alimentados com sua respectiva ração, conforme será explicitado adiante.

3.1.1 Grupos

Os animais foram divididos em três grupos, a saber:

- Grupo 1 - controle com dieta comum para roedores;
- Grupo 2 - modelo de obstrução infravesical com dieta comum para roedores e
- Grupo 3 - controle com dieta de alto teor lipídico (DATL - 1,25% de colesterol - Rhoster Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil).

3.2 Plano de trabalho

Todos os grupos foram submetidos inicialmente à análise bioquímica dos níveis de colesterol total e sua fração de baixa densidade (LDL-colesterol) e medição do peso corporal no tempo inicial do estudo, sob anestesia geral. A partir de então foi introduzida a ração específica a cada grupo.

Após quatro semanas os animais dos grupos 1 e 3 foram submetidos à cirurgia simulada de obstrução infravesical parcial, enquanto os animais do grupo 2 foram efetivamente submetidos à cirurgia obstrutiva, sob os mesmos princípios anestésicos.

Ao alcançar a décima semana do estudo, os animais de todos os grupos foram reoperados para retirada de suas bexigas, novamente sob anestesia geral, realizadas a análise bioquímica e a medição do peso corporal e então sacrificados logo após o procedimento em câmara de gás carbônico. Todo esse processo foi realizado no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O material retirado foi enviado para análise morfológica da parede vesical, realizada nos Laboratórios de Investigação Médica de Urologia e de Reumatologia (LIM 55 e LIM 17, respectivamente).

Figura 1. Proposta esquematizada do estudo

3.2.1 Dieta

Os grupos 1 e 2 permaneceram alimentados com ração comercial padrão para roedores e o grupo 3 foi alimentado por meio da DATL (1,25% de colesterol) durante todo o estudo (Apêndice II).

3.2.2 Anestesia geral

Obtida com o uso de Xylazina (10mg/kg) e Ketamina (25mg/kg), administrados de forma intraperitoneal por punção em fossa ilíaca direita com agulha de insulina 27,5G ½”(13x3,8).

3.2.3 Coleta sanguínea

A amostra sanguínea foi obtida por meio de punção intracardiaca subxifoidal com agulha 20G. Foi coletado 0,5mL de sangue total, acondicionado em microtubos de 2mL, autoclavado e adicionado anticoagulante EDTA à concentração de 1mg/mL, a fim de se evitar a ocorrência de hemólises na coleta, as quais pudessem interferir nas reações bioquímicas (Yoshida *et al.*, 2000).

3.2.4 Testes bioquímicos

Para os exames bioquímicos, as amostras de plasma foram processadas por centrifugação (3.500 rpm / 15 min) do sangue total. Após a

coleta foram determinadas as análises dos lipídios necessários para pesquisa.

Os ensaios funcionais da LDL (Low Density Lipoprotein) e colesterol total (transferência de lipídeos) foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária – CB/FMUSP, onde as amostras passaram por processo de determinação analítica por espectrofotometria (Cobas Mira-Roche) com auxílio de *kits* semienzimáticos comerciais, padronizados para animais (Taconic Farms Inc, 2003).

As análises utilizadas para determinação de colesterol total - Método Enzimático COD/PAD - e para LDL - Método Homogêneo/Trinder, apresentam como fundamento a hidrólise do colesterol das lipoproteínas de alta densidade - HDL (High Density Lipoproteins) e muito baixa densidade (VLDL), pela reação das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase, mediante uma reação não formadora de cor.

O diagnóstico do LDL-colesterol foi determinado em mg/dL pelo auxílio da Fórmula de Friedewald: $LDL = CT - (HDL + VLDL)$, onde: CT (colesterol total), HDL (colesterol alta densidade), LDL (colesterol baixa densidade), em que VLDL (lipoproteína de baixa densidade) foi obtido pela divisão da concentração dos triglicérides por 5 (Friedewald *et al.*, 1972).

Para avaliarmos os efeitos da DATL nos níveis séricos de colesterol total e LDL-colesterol, foram comparados os resultados obtidos nos grupos 1 e 2 (dieta normal) com os do grupo 3.

3.2.5 Técnica cirúrgica

Os grupos 1 e 3 foram submetidos a uma primeira intervenção cirúrgica simulada de obstrução infravesical, sob anestesia geral. Por meio de laparotomia mediana longitudinal a uretra foi identificada e isolada, porém nenhuma obstrução foi realizada. Os dois grupos de ratas foram submetidos a reoperação após seis semanas, sob o mesmo princípio anestésico, para retirada de suas bexigas, sendo sacrificados logo após a intervenção em câmara de CO₂.

O grupo 2 foi submetido a um primeiro procedimento, também seguindo os mesmos princípios anestésicos, no qual foi provocada uma obstrução infravesical por modificação de técnica prévia (Steers *et al.*, 1991). Tal obstrução foi criada por meio da ligadura parcial da uretra proximal com fio inabsorvível de mononylon 5.0, sobre uma agulha 22G colocada paralelamente à uretra, proporcionando-se lúmen uretral residual de mais ou menos 1mm. A agulha era retirada imediatamente após a ligadura. As ratas desse grupo permaneceram obstruídas por seis semanas, momento no qual foram reoperadas para retirada de suas bexigas obstruídas e então sacrificadas, da mesma maneira como nos grupos anteriores.

3.2.6 Peso corporal

O peso corporal dos animais também foi controlado em cada etapa do processo, ou seja, no tempo inicial ou basal (T0) e no tempo final, após dez

semanas (T10). Foi determinado em balança de precisão APX-1502 (Denver Instruments), que detecta diferença de 0,01g e suporta um peso máximo de 1.500g. Nessa avaliação também os resultados dos grupos 1 e 2 foram integrados a fim de serem confrontados com o ganho de peso corporal dos animais do grupo 3.

3.2.7 Retirada das bexigas

Todas as bexigas foram retiradas distendidas com 1,5 mL de solução de formalina a 10% e mantidas fixadas em 20 mL dessa mesma solução em frasco coletor.

3.3 Análise morfológica

O material (bexiga) foi processado rotineiramente e emblocado em Paraplast (McCormick, Maarn, The Netherlands). Os cortes do material foram realizados transversalmente na espessura de 3µm em micrótomo convencional e eram referentes ao corpo vesical, em toda a sua circunferência, não sendo utilizados nem o trígono vesical nem o fundo vesical por terem sido manipulados durante os procedimentos cirúrgicos.

As lâminas foram coradas pelo Picrosirius vermelho para análise morfométrica da presença de colágeno ou submetidas a exame imuno-

histoquímico com anticorpos policlonais para avaliação específica dos colágenos I e III.

Para a imunodeteção dos colágenos tipo I e III, as amostras de bexigas foram montadas em lâminas com aminosilane (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, USA), imersas em xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Os sítios imunogênicos foram expostos pelo tratamento enzimático das amostras com pepsina bovina (10.000 UTD), à concentração de 4mg/mL em ácido acético 0,5 N, pH 2,2 por trinta minutos, a 37°C. Após sucessivas lavagens com PBS estas foram incubadas em 5% de leite desnatado diluído em tampão fosfato pH 7,0. As lâminas eram incubadas durante a noite, a 4°C, com anticorpos policlonais anticolágeno dos tipos I e III obtidos em coelhos e diluídos 1:50 e 1:100, respectivamente, em PBS. Em seguida, todas as lâminas foram lavadas várias vezes em PBS 0,05% de Tween 20 e incubadas por noventa minutos com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína) diluído 1:50 em PBS com 0,006% de azul de Evans. As lâminas foram novamente lavadas várias vezes em PBS 0,05% Tween 20 e montadas com glicerina tamponada (Teodoro *et al.*, 2003; Teodoro *et al.*, 2004).

A reação foi então visualizada em microscópio de fluorescência (Olympus BX 51, Japão), com aumento de 400 vezes e fotografada por máquina fotográfica Olympus Q color 5, sendo então inserida em computador Pentium 4 HT 133 MHz. A leitura morfométrica foi realizada por meio de programa Image Pro Plus – Optimas 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para Windows.

As lâminas coradas pelo Picrosirius foram analisadas no mesmo microscópio, equipado com um polarizador de luz acoplado ao analisador de imagem (Frohlich, 1986).

Tanto para a análise do Picrosirius vermelho quanto da imuno-histoquímica foram realizadas leituras de dez campos aleatórios diferentes para cada lâmina, havendo dois fragmentos circunferenciais da bexiga de cada animal por lâmina, obtendo-se então a média da amostra estudada. Nesse estudo, a parede vesical foi dividida em duas zonas estruturais distintas: a camada mucosa e a camada muscular detrusora. A primeira é definida como a área composta da membrana basal e lâmina própria e a segunda, como toda a faixa muscular até a serosa vesical. A leitura quantificou e qualificou apenas a área de interesse deste estudo, a camada muscular detrusora, especialmente sua MEC. Os vasos sanguíneos e os feixes nervosos do interstício não foram incluídos na análise.

Foram criadas máscaras no programa Image Pro Plus para cada análise realizada (tanto do Picrosirius vermelho para fibras grossas e para fibras finas quanto da imuno-histoquímica dos colágenos tipos I e III), utilizadas igualmente em todas as lâminas, a fim de se homogeneizarem as devidas seleções (Anexo 1).

Para análise do Picrosirius vermelho, o colágeno presente nos campos analisados foi medido pela seleção de tonalidades birrefringentes avermelhadas ou alaranjadas e amareladas ou esverdeadas, correspondentes às bandas colagênicas polarizadas de fibras grossas (maduras) e finas (imaturas), respectivamente (Puchtler et al., 1973;

Rich, Whittaker, 2005). A área de cada banda colagênica (μm^2) foi dividida pela área total estudada (μm^2), obtendo-se a densidade de fibras colágenas no fragmento de camada muscular estudado. A seguir, foi determinada a espessura média de cada campo estudado por meio de três valores, expressa em μm (Anexo 2), para eliminar qualquer viés decorrente da diferença da espessura entre os grupos, conforme proposto por Kim et al. (2000). Essa espessura foi então multiplicada pela densidade do respectivo campo, tendo como resultado final a quantidade total de fibras colágenas no segmento estudado, expressa em μm . De forma semelhante, na imuno-histoquímica, os colágenos I e III foram medidos por meio da seleção de tonalidades fluorescentes esverdeadas, cada um em sua devida lâmina preparada, e o resultado final foi expresso como descrito em relação ao Picrosirius vermelho.

3.4 Análise estatística

Todas as variáveis quantitativas avaliadas no estudo foram avaliadas para suposição de normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov. Como a suposição de normalidade foi satisfeita os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

As variáveis avaliadas longitudinalmente foram testadas através de uma análise de variância com medida repetida (ANOVA-MR). Nos casos em que houve resultado significativo prosseguiu-se a análise através da

construção de contrastes que permitiram localizar onde se encontravam as diferenças. Toda análise longitudinal foi realizada por meio do software SAS versão 9.1.3 (SAS Institute) com o uso do módulo PROC MIXED (Singer, Andrade, 2000).

Para as variáveis quantitativas avaliadas em um único instante, os grupos foram comparados através de análise de variância com um fator (ONEWAY-ANOVA). Para detectar onde se encontravam as diferenças, prosseguiu-se a análise por meio de comparações múltiplas pelo método de Tukey. Os dados foram processados por meio do software SPSS, versão 12.0.

Foram considerados como resultado estatisticamente significativo aqueles que apresentaram $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Animais

Um animal do grupo 2 morreu na oitava semana do estudo, totalizando então 44 ratas a serem analisadas. Nenhum dos outros animais apresentou qualquer intercorrência durante o estudo. Para a avaliação dos parâmetros bioquímicos e de peso corporal, os animais dos grupos 1 e 2 foram agrupados em um grupo denominado grupo dieta normal (DN) e comparados com os animais do grupo DATL (grupo 3). Apenas dezessete das vinte e nove ratas possíveis foram incluídas no grupo dieta normal, devido a problemas técnicos laboratoriais (perda do material da coleta sanguínea por armazenamento inadequado). Para a avaliação dos parâmetros morfológicos, foram comparados os três grupos descritos na seção “Métodos” separadamente.

4.2 Colesterol total

Quando comparado o grupo dieta normal (grupos 1 + 2, $n = 17$) com o grupo alimentado com DATL (grupo 3, $n = 15$), não foi observada diferença

estatística significativa nos níveis de colesterol total plasmático ao longo do estudo ($p = 0,376$). Ambos os grupos partiram de dosagem semelhante ($p = 0,462$) e terminaram o estudo sem diferença em seus valores ($p = 0,601$), conforme demonstrado na Tabela 1. A evolução longitudinal desses dados é demonstrada na Figura 2.

Tabela 1. Colesterol total (mg/mL) segundo a dieta

		Inicial	Final	<i>p</i>
Grupos 1 + 2 (DN)	N	17	17	
	Média	80,88	87,62	0,288
	Desvio- padrão	15,82	8,74	
Grupo 3 (DATL)	N	15	15	
	Média	85,67	91,00	0,427
	Desvio- padrão	24,22	21,20	
<i>p</i>		0,462	0,602	0,376

Figura 2. Evolução longitudinal do colesterol total (mg/mL) segundo a dieta

4.3 LDL-colesterol

Quando comparados os animais do grupo alimentado com dieta normal (grupos 1 e 2, $n = 17$) com os do grupo DATL (grupo 3, $n = 15$), observamos que esse último grupo apresentou um aumento estatisticamente significativo na dosagem do LDL-colesterol ($p = 0,041$). Partindo de dosagem semelhante no T_0 ($p = 0,368$), houve aumento no grupo 3 ao longo do tempo, enquanto nos grupos 1 + 2 a dosagem permaneceu praticamente estável, repercutindo em diferença estatística ($p < 0,001$) no final das dez semanas (Tabela 2). A Figura 3 demonstra a evolução longitudinal desses dados.

Tabela 2. LDL-colesterol (mg/mL) segundo a dieta

		Inicial	Final	<i>p</i>
Grupos 1 + 2 (DN)	N	17	17	0,963
	Média	48,41	48,15	
	Desvio-padrão	11,35	8,54	
Grupo 3 (DATL)	N	15	15	0,007
	Média	53,71	70,90	
	Desvio-padrão	22,34	20,36	
<i>p</i>		0,368	<0,001	0,041

Figura 3. Evolução longitudinal do LDL-colesterol (mg/mL) segundo a dieta

4.4 Peso corporal

Foi observado um aumento estatisticamente significativo no peso (g) dos animais do grupo DATL (grupo 3, $n = 15$) em comparação ao grupo dieta normal (grupos 1 + 2, $n = 17$) ($p = 0,017$). Apesar de partirem de peso semelhante ($p = 0,196$) no início do estudo, no grupo DATL houve aumento significativamente maior no decorrer das dez semanas em relação aos grupos 1 + 2, repercutindo em diferença estatística ao final do período (Tabela 3). A Figura 4 demonstra a evolução longitudinal desses dados.

Tabela 3. Peso corporal (g) segundo a dieta

		Inicial	Final	<i>p</i>
Grupos 1 + 2 (DN)	N	17	17	<0,001
	Média	83,24	239,77	
	Desvio-padrão	15,43	29,63	
Grupo 3 (DATL)	N	15	15	<0,001
	Média	94,47	281,47	
	Desvio-padrão	16,63	30,27	
<i>p</i>		0,196	<0,001	0,017

Figura 4. Evolução longitudinal do peso corporal (g) segundo a dieta

4.5 Análise morfológica

Foram retirados dessa avaliação, quando existiram, os *outliers* presentes tanto na análise de fibras maduras e imaturas pela coloração do Picrosirius quanto na imuno-histoquímica para os colágenos tipo I e III (Apêndice II).

A espessura média de cada grupo foi de $33,43 \pm 3,41 \mu\text{m}$ no grupo 1, $36,99 \pm 5,42 \mu\text{m}$ no grupo 2 e $33,71 \pm 6,54 \mu\text{m}$ no grupo 3. Embora nitidamente diferentes do ponto de vista descritivo, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p = 0,147$).

4.5.1 Coloração pelo Picrosirius

A análise da presença de fibras densas, representadas pela coloração vermelho-alaranjada e que sugerem presença de colágeno mais maduro, em especial do tipo I, revelou-se estatisticamente igual entre os três grupos ($p = 0,311$), conforme os dados apresentados na Tabela 4A. Por outro lado, a análise da presença de fibras finas, representadas pela coloração amarelo-esverdeada e que sugerem presença de colágeno imaturo e recente, em especial do tipo III, revelou diferença entre os três grupos ($p = 0,002$), em razão de um aumento significativo no grupo 3 em relação ao grupo 1 ($p = 0,002$, Δm 0,852 μm ; IC 95% 0,292 – 1,412). Foi nítida também a maior deposição dessas fibras nos animais do grupo 2, porém sua concentração não se apresentou estatisticamente diferente em relação ao grupo 1 ($p = 0,055$, Δm 0,560 μm ; IC 95% -0,010 – 1,130), nem ao grupo 3 ($p = 0,434$, Δm 0,292 μm ; IC 95% -0,862 – 0,278), conforme os dados apresentados na Tabela 4B. A Figura 5 ilustra claramente o padrão adquirido em cada grupo, enquanto as Figuras 6 e 7 apresentam as comparações gráficas entre os grupos.

Figura 5. Análise de microscopia do Picrosirius sob luz polarizada para fibras colágenas maduras e imaturas. A – Grupo 1; B – Grupo 2 e C – Grupo 3

Tabela 4. Análise das fibras colágenas maduras (A) e imaturas (B) pela coloração Picrosirius vermelho

A	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
N	15	13	15
Média (μm)	1,15	1,02	1,27
Desvio- padrão (μm)	0,46	0,37	0,41

B	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
N	15	14	15
Média (μm)	1,45	2,01	2,30
Desvio- padrão (μm)	0,40	0,79	0,65

Figura 6. Distribuição comparativa em “box-whisker plots” da quantidade de fibras maduras (μm) coradas pelo Picrosirius

Figura 7. Distribuição comparativa em “box-whisker plots” da quantidade de fibras imaturas (μm) coradas pelo Picrosirius

4.5.2 Imuno-histoquímica do colágeno tipo I

A análise imuno-histoquímica do colágeno tipo I revelou diferença significativa entre as médias dos três grupos ($p = 0,005$). A análise de comparações múltiplas de Tukey evidenciou que o grupo 2 apresentou quantidade estatisticamente maior de colágeno tipo I em comparação com o grupo 1 ($p = 0,003$, Δm 1,439 μm ; IC 95% 0,444 – 2,434). Os grupos 1 e 3 apresentaram-se semelhantes ($p = 0,225$, Δm 0,687 μm ; IC 95% -0,308 – 1,682), assim como os grupos 2 e 3 ($p = 0,170$, Δm 0,752 μm ; IC 95% -0,243 – 1,747). A Tabela 5 apresenta as médias de cada grupo, e a Figura 8 ilustra o resultado-padrão de cada grupo, enquanto a Figura 9 apresenta a comparação gráfica entre os grupos.

Tabela 5. Quantidade de colágeno tipo I na parede vesical por análise imuno-histoquímica

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
N	14	14	14
Média (μm)	2,52	3,96	3,21
Desvio- padrão (μm)	0,89	1,35	0,93

Figura 8. Análise do colágeno tipo I por meio de imuno-histoquímica
A – Grupo 1; B – Grupo 2 e C – Grupo 3

Figura 9. Distribuição comparativa em “box-whisker plots” da quantidade de colágeno tipo I (μm) pela imuno-histoquímica

4.5.3 Imuno-histoquímica do colágeno tipo III

A análise imuno-histoquímica demonstrou que a concentração de colágeno tipo III não foi homogênea entre os grupos ($p = 0,001$). A análise de comparações múltiplas de Tukey evidenciou que o grupo 2 apresentou quantidade estatisticamente maior de colágeno tipo III que o grupo 1 ($p = 0,002$, Δm 3,055 μm ; IC 95% 1,135 – 4,975), assim como o grupo 3 em relação ao grupo 1 ($p = 0,016$, Δm 1,559 μm ; IC 95% 0,262 – 2,857). Os grupos 2 e 3 apresentaram-se semelhantes ($p = 0,211$, Δm 1,496 μm ; IC 95% -0,586 – 3,577), conforme as médias da Tabela 6. A Figura 10 ilustra o resultado de cada grupo, enquanto a Figura 11 mostra a comparação gráfica entre os grupos.

Figura 10. Análise do colágeno tipo III por meio de imuno-histoquímica
A – Grupo 1; B – Grupo 2 e C – Grupo 3

Tabela 6. Quantidade de colágeno tipo III na parede vesical por análise imuno-histoquímica

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
N	14	14	15
Média (μm)	3,50	6,55	5,06
Desvio- padrão (μm)	0,95	2,55	1,69

Figura 11. Distribuição comparativa em “box-whisker plots” da quantidade de colágeno tipo III (μm) pela imuno-histoquímica

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a dieta de alto teor lipídico (1,25% de colesterol) em ratos proporcionou aumento significativo das taxas de LDL-colesterol e do peso corporal em relação a ratos alimentados com dieta comercial padrão para roedores no período de dez semanas. Além disso, induziu alterações morfológicas significativas da matriz extracelular, no que diz respeito à remodelação dos colágenos tipos I e III, de forma semelhante, porém não idêntica, ao que ocorre no modelo experimental de obstrução infravesical parcial crônica.

De modo surpreendente, a avaliação da dosagem de colesterol total plasmático não se revelou estatisticamente diferente entre os animais alimentados com DN e os animais alimentados com DATL ($81,7 \pm 8,7$ mg/dL x $91,0 \pm 21,2$ mg/dL, respectivamente; $p = 0,376$), em detrimento de estudo de Son *et al.* (2007) com modelo experimental semelhante, no qual o grupo controle apresentou, após oito semanas, dosagem de colesterol total plasmático de $70,7 \pm 8,6$ mg/dL, ao passo que, no grupo alimentado por dieta hipercolesterolêmica (1% de colesterol), esse valor foi de $108,9 \pm 9,5$ mg/dL ($p < 0,001$). Outro estudo mostrou aumento do nível de colesterol plasmático total no grupo alimentado por dieta hipercolesterolêmica (1% de colesterol) em relação ao grupo controle, por quatro semanas ($10,21 \pm 3,5$ x $2,65 \pm 0,62$ mmol/L, respectivamente; $p < 0,001$) (Zulet *et al.*, 1999). Entretanto, nesse caso foi administrado óleo de coco, o qual enriquece a

dieta hipercolesterolêmica, a fim de se solubilizar a absorção do colesterol e amplificar sua ação, assim como o fez Asahina *et al.* (2005) ao utilizar ração com 1% de colesterol emulsificada em óleo de oliva a 10%. Em ambos os estudos de Son *et al.* (2007) e Zulet *et al.* (1999) foram utilizados ratos machos da linhagem Sprague-Dawley, o que pode explicar a diferença nessa tendência de aumento dos níveis de colesterol total plasmático não verificado em nossas ratas Wistar. Essa possibilidade é defendida por Dietschy *et al.* (1993) em estudo que verifica a homeostase dos níveis de colesterol total e LDL-colesterol em diferentes espécies e em humanos. Da mesma forma, em estudo de Savolainen *et al.* (1991), foi avaliado o impacto da diferença de sexo na concentração plasmática de colesterol total em humanos, no qual se verificou que o sexo masculino é mais sensível do que o sexo feminino, em termos metabólicos, à dieta rica em colesterol. O presente estudo utilizou fêmeas em decorrência da possibilidade de o refluxo intraprostático no processo obstrutivo alterar de modo significativo a estrutura morfológica da parede vesical e por eventuais alterações prostáticas induzidas pela dieta. O fato do colesterol total não ter sido diferente entre os grupos pode também ser explicado por terem sido estudados animais jovens, de apenas quatro semanas de idade no início do estudo, que teriam uma menor probabilidade de alteração metabólica. Foram escolhidas ratas jovens neste estudo para minimização de qualquer viés proveniente do envelhecimento natural da bexiga com a idade avançada.

Os resultados em relação ao aumento da dosagem de LDL-colesterol após as dez semanas do presente estudo nos animais submetidos à DATL,

em comparação aos animais alimentados por DN ($70,9 \pm 20,4$ mg/dL x $48,2 \pm 8,5$ mg/dL, respectivamente; $p < 0,001$), foram concordantes com os outros estudos de indução de hipercolesterolemia por dieta em modelo experimental de ratos (Sérougne *et al.*, 1995; Asahina *et al.*, 2005; Zulet *et al.*, 2007), atendendo a expectativa de produzir alteração metabólica pela DATL.

No presente estudo, o peso corporal dos ratos alimentados por DATL foi significativamente maior que o apresentado pelos animais com DN ($281,5 \pm 30,3$ g x $239,8 \pm 29,6$ g, respectivamente; $p = 0,017$). Perfil semelhante foi observado nos estudos conduzidos por Sérougne *et al.* (1995), Guerra *et al.* (2007), Son *et al.* (2007) e Zulet *et al.* (2007).

Alterações funcionais da bexiga já foram previamente demonstradas em estudos com modelo experimental de hipercolesterolemia. Rahman *et al.* (2007) utilizaram ratos machos da linhagem Sprague-Dawley e, durante seis meses, os alimentaram com DATL (2% de colesterol), verificando, por meio de cistometria, que, ao final do período, esses animais apresentavam hiperatividade vesical em uma proporção significativamente maior que os controles ($p = 0,004$). Son *et al.* (2007) verificaram em ratos machos da linhagem Sprague-Dawley que, após os alimentarem com DATL (1% de colesterol) por oito semanas, estes apresentavam menor intervalo miccional ($p < 0,01$), menor volume urinado ($p < 0,05$), menor capacidade funcional ($p < 0,05$), maior ocorrência de contração detrusora espontânea ($p < 0,05$) e maior pressão detrusora basal ($p = 0,07$) que os controles. Todavia, ambos os estudos apenas inferem as possíveis causas da disfunção vesical

decorrente da DATL, como alterações do fluxo sanguíneo, como já proposto em estudo com modelo de isquemia vesical (Azadzi *et al.*, 1999b). O presente estudo limitou-se a avaliar preliminarmente alterações estruturais da bexiga, em especial a remodelação do colágeno da MEC vesical.

Alterações morfológicas decorrentes de dieta hipercolesterolêmica que possam influir na função vesical foram muito pouco estudadas ou especuladas até o momento na literatura científica. Rahman *et al.* (2007) observaram espessamento da parede vesical e aumento dos receptores purinérgicos nos ratos hipercolesterolêmicos. Já o estudo conduzido por Son *et al.* (2007) não identificou qualquer alteração morfológica vesical por meio das colorações HE e tricrômio de Masson. No entanto, estas não são colorações específicas para detecção de colágeno (Rich, Whittaker, 2005). Infere-se que a hipercolesterolemia pode potencializar o processo de fibrose, por meio do processo de arterioesclerose com consequente isquemia crônica da parede vesical, assim como ocorre com a OIV e também outras morbidades. É claro, porém, que o suposto processo desencadeado pela hipercolesterolemia diferencia-se do decorrente da OIV, visto que neste último ocorre a reperfusão após a isquemia, o que parece conferir um grau lesivo ainda maior ao tecido acometido (Bratslavsky, 2003).

A análise morfológica realizada neste estudo observou importantes diferenças na MEC da parede vesical entre os três grupos estudados. Quando avaliada a coloração por Picrosirius vermelho, observou-se comportamento semelhante na concentração de fibras grossas maduras entre os três grupos, representadas pela coloração vermelho-alaranjada e,

em tese, correspondentes ao colágeno tipo I ($p = 0,311$), enquanto a concentração de fibras finas imaturas, representadas pela coloração verde-amarelada e, em tese, correspondentes ao colágeno tipo III, foi significativamente maior no grupo alimentado por DATL que no grupo controle ($p = 0,002$). Nesse caso, o grupo modelo de OIV apresentou parâmetros semelhantes aos do grupo 3 ($p = 0,434$) e descritivamente diferentes do grupo controle, porém sem alcançar diferença estatística significativa ($p = 0,055$). Um fator de confusão a ser considerado é que, pela coloração por Picrosirius vermelho, não só as fibras colágenas podem ser representadas, uma vez que outros componentes da MEC podem apresentar uma fraca birrefringência e então aparecer como fibras esverdeadas (Rich, Whittaker, 2005). Além disso, a orientação da fibra pode alterar sua coloração e também sua quantificação (Chang *et al.*, 1998; Rich, Whittaker, 2005).

Para análise específica das concentrações de colágeno tipos I e III na MEC da camada detrusora, foi realizada imuno-histoquímica com anticorpos policlonais anticolágeno dos tipos supracitados. Em contraste ao resultado encontrado na análise da coloração por Picrosirius vermelho para fibras grossas sugestivas de colágeno tipo I, a imuno-histoquímica para esse tipo específico de colágeno detectou, por um lado, significativa diferença entre a concentração média dos três grupos ($p = 0,005$), à custa de uma significativa maior quantidade de colágeno I no grupo 2 em relação ao grupo 1 ($p = 0,003$). Por outro lado, a análise do colágeno tipo III foi significativamente maior nos grupos modelo de OIV e DATL em relação ao grupo controle ($p = 0,002$ e

$p = 0,016$, respectivamente), o que denota uma deposição aumentada desse tipo de colágeno nos animais alimentados por DATL, a exemplo do que ocorre no modelo de OIV.

Resumindo, os animais alimentados por DATL sofreram as alterações metabólicas esperadas, com aumento significativo do LDL-colesterol e peso corporal, quando em comparação aos animais alimentados por DN. Da mesma forma, a DATL provocou nesses ratos alterações morfológicas significativas em relação ao controle e que se aproximam das alterações apresentadas pela OIV em modelo experimental.

Os achados deste estudo justificam pesquisas futuras comparando-se ratos obstruídos alimentados por DATL e submetidos a exames funcionais da bexiga como cistometria e análises miccionais. Além disso, a possível interferência medicamentosa nesses resultados.

6 CONCLUSÃO

A dieta hipercolesterolêmica administrada a ratas Wistar, além do aumento do peso corporal e da elevação da fração LDL-colesterol, promoveu alterações estruturais da matriz extracelular vesical no que diz respeito à remodelação do colágeno.

7 ANEXOS

ANEXO 1

MÁSCARAS DE LEITURA PARA QUANTIFICAÇÃO

A criação de máscaras para cada tipo de leitura, ou seja, fibras colágenas maduras e imaturas pela coloração de Picrosirius e colágenos tipo I e III por imuno-histoquímica, totalizando quatro máscaras distintas, visou minimizar possíveis vieses de aferição, que poderiam ser decorrentes de seleções diferentes para cada elemento a ser analisado. Com isto, a cada lâmina o mesmo tipo de fibra foi selecionado para a quantificação.

A seguir estão demonstrados alguns exemplos de máscaras na coloração pelo Picrosirius e na imuno-histoquímica.

Segmento de lâmina corada pelo Picrosirius

Seleção das fibras colágenas maduras representadas por fibras vermelho-alaranjadas

Seleção da área total analisada (camada muscular da parede vesical)

Segmento de lâmina corada pelo Picrosirius

Seleção das fibras colágenas imaturas representadas por fibras verde-amareladas

Seleção da área total analisada (camada muscular da parede vesical)

Segmento de lâmina de imuno-histoquímica para colágeno tipo I ou III

Seleção das fibras de colágeno tipo I ou III representadas por fibras verdes fluorescentes

Seleção da área total analisada (camada muscular da parede vesical)

ANEXO 2

DETERMINAÇÃO DA ESPESSURA

Para a determinação da espessura foram considerados três segmentos ao longo de cada campo, obtendo-se, assim, a espessura média do fragmento estudado.

A partir da leitura dos dez campos, obteve-se a espessura média de cada lâmina correspondente.

A seguir apresentam-se alguns exemplos desta medição nas lâminas coradas tanto pelo Picrosirius quanto pela imuno-histoquímica para os colágenos tipo I e III:

Nos exemplos acima, de fragmentos de lâminas coradas pelo Picrosirius, é possível identificar um fragmento com espessura variável (A) e outro com espessura aproximadamente homogênea (B). De qualquer forma, três valores de pontos diferentes foram obtidos a fim de determinar a espessura média de cada campo.

Nos exemplos C e D, de fluorescência de lâminas de imuno-histoquímica para os colágenos III e I, respectivamente, observa-se nitidamente que a medição da espessura em cada ponto compreendeu apenas a camada muscular, não sendo consideradas a camada mucosa e a lâmina própria.

8 REFERÊNCIAS

Abrams PH, Blaivas JG, Stanton SL, Andersen JT. Standardization of lower urinary tract function. *Neurourol Urodyn*. 1988;7:403-26.

Asahina M, Sato M, Imaizumi K. Genetic analysis of diet-induced hypercholesterolemia in exogenously hypercholesterolemic rats. *J Lipid Res*. 2005;46(10):2289-94.

Azadzoï KM, Tarkan T, Siroky MB, Krane RJ. Atherosclerosis-induced chronic ischemia causes bladder fibrosis and non compliance in rabbits. *J Urol*. 1999a;161:1626-35.

Azadzoï KM, Tarkan T, Kozłowski R, Krane RJ, Siroky MB. Overactivity and structural changes in the chronically ischemic bladder. *J Urol*. 1999b;162(5):1768-78.

Bratslavsky G, Kogan BA, Matsumoto S, Aslan AR, Levin RM. Reperfusion injury of the rat bladder is worse than ischemia. *J Urol*. 2003;170(5):2086-90.

Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In: Walsh PC edition. *Campbell's urology*, 8th ed. Philadelphia, Pennsylvania; 2002. pp 58-62.

Chancellor MB, Yoshimura N. physiology and pharmacology of the bladder and urethra. In: Walsh PC edition. *Campbell's urology*, 8th ed. Philadelphia, Pennsylvania; 2002. pp 839-40.

Chang SL, Howard PS, Koo HP, Macarak EJ. Role of type III collagen in bladder filling. *Neurourol Urodyn*. 1998;17:135.

Chanut-Delalande H, Fichard A, Bernocco S, Garrone R, Hulmes DJS, Ruggiero F. Control of heterotypic fibril formation by collagen V is determined by chain stoichiometry. *J Biol Chem*. 2001;276:24352-9.

Cotran RS, Kumar V, Robbins, SL. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins, SL. Robbins patologia estrutural e funcional. Inflamação e reparo. 4ª edição. Traduzido por Acioly DM. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1989. pp 66-7.

Deveaud CM, Macarak EJ, Kucich U, Ewalt DH, Abrams WR, Howard PS. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. *J Urol*. 1998;160(4):1518-27.

de Groat WC, Booth AM, Yoshimura N. Neurophysiology of micturition and its modification in animal models of human disease. In: Maggi CA edition. *The Autonomic Nervous System*. London, Harwood Academic; 1993. pp 227-290.

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res*. 1993;34:1637-59.

Fleischmajer R, et al. Biology, chemistry and pathology of collagen. *Ann NY Acad Sci*. 1985;460:1.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499-502.

Frohlich MW. Birefringent objects visualized by circular polarization microscopy. *Stain Technol*. 1986;61:139-43.

Gabella G, Uvelius B. Structural changes in the rat bladder after acute outlet obstruction. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 1999;201:32-7.

Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1531-46.

Ghafar MA, Anastasiadis AG, Olsson LE, Chichester P, Kaplan SA, Buttyan R, Levin RM. Hypoxia and an angiogenic response in the partially obstructed rat bladder. *Lab Invest.* 2002;82(7):903-9.

Gosling JA, Dixon JS. Structure of trabeculated detrusor smooth muscle in cases of prostatic hypertrophy. *Urol Int.* 1980;35(5):351-5.

Gosling JA. Modification of bladder structure in response to outflow obstruction and ageing. *Eur Urol.* 1997;32(Suppl 1):9-14.

Grillo LP, Crispim SP, Siebert AN, Andrade ATW, Rossi A, Campos IC. Perfil lipídico e obesidade em escolares de baixa renda. *Rev Bras Epidemiol.* 2005;8(1):75-81.

Guerra RL, Prado WL, Cheick NC, Viana FP, Botero JP, Vendramini RC, Carlos IZ, Rossi EA, Damaso AR. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. *Lipids Health Dis.* 2007;6(1):16.

Hanai T, Matsumoto S, Ohnishi N, Kurita T. Partial outlet obstruction of the rat bladder induces a stimulatory response on proliferation of the bladder smooth muscle cells. *Int Urol Nephrol.* 2002;34(1):37-42.

Hanai T, Ma FH, Matsumoto S, Park YC, Kurita T. Serial changes of smooth muscle cell phenotypes in rat urinary bladder following partial outflow obstruction. *Adv Exp Med Biol.* 2003;539:293-6.

Jequier S, Rousseau O. Sonographic measurements of the normal bladder wall in children. *AJR.* 1987;149:563-6.

Kaplan EP, Richier JC, Howard PS, Ewalt DH, Lin VK. Type III collagen messenger RNA is modulated in non-compliant human bladder tissue. *J Urol*. 1997;157(6):2366-9.

Kim JC, Yoon JY, Seo SI, Hwang TK, Park YH. Effects of partial bladder outlet obstruction and its relief on types I and III collagen and detrusor contractility in the rat. *Neurourol Urodyn*. 2000;19(1):29-42.

Levin RM, Monson FC, Haugaard N, Buttyan R, Hudson A, Roelofs M, Sartore S, Wein AJ. Genetic and cellular characteristics of bladder outlet obstruction. *Urol Clin North Am*. 1995;22:263-83.

Levin RM, O'Connor LJ, Leggett RE, Whitbeck C, Chichester P. Focal hypoxia of the obstructed rabbit bladder wall correlates with intermediate decompensation. *Neurourol Urodyn*. 2003;22(2):156-63.

Levin R, Chichester P, Levin S, Buttyan R. Role of angiogenesis in bladder response to partial outlet obstruction. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2004;215:37-47.

Levin RM, Reed TP, Whitbeck C, Chichester P, Damaser M. Effect of strip length on the contractile dysfunction of bladder smooth muscle after partial outlet obstruction. *Urology*. 2005;66(3):659-64.

Li L, Qiu G, Hao P, Song B. Effect of partial bladder outlet obstruction on detrusor compliance, excitability and contractility in rats. *Scand J Urol Nephrol*. 2006;40(4):293-9.

Macarak EJ, Ewalt D, Baskin L, et al. The collagens and their urological implications. *Adv Exp Med Biol*. 1995;385:173.

Macarak EJ, Howard PS. The role of collagen in bladder filling. *Adv Exp Med Biol*. 1999;462:215.

Masson LF, McNeill G, Avenell A. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1098–111.

Ministério da Saúde. Secretaria de Informática. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. *Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM)*. Brasília/DF: MS; 1996-2000.

Ottani V, Martini D, Franchi M, Ruggeri A, Raspanti M. Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron.* 2002;33:587-96.

Pereira FEL. Degenerações. Morte celular. Alterações do interstício. In: Brasileiro-Filho G, Pereira FEL, Pittella JEH, Bambirra EA, Barbosa AJA. *Bogliolo patologia geral*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1993. pp 64-8.

Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with Picrosirius red FBA. *Beitr Pathol.* 1973;150:174-87.

Rahman NU, Phonsombat S, Bochinski D, Carrion RE, Nunes L, Lue TF. An animal model to study lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction: the hyperlipidaemic rat. *BJU Int.* 2007;100(3):658-63.

Rich L, Whittaker P. Collagen and Picrosirius red staining: A polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci.* 2005;22:97-104.

Santos DR. III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretrizes de prevenção da aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* 2001;77(3):1-48.

Savolainen MJ, Rantala M, Kervinen K, Jarvi L, Suvanto K, Rantala T, Kesaniemi YA. Magnitude of dietary effects on plasma cholesterol concentration: role of sex and apolipoprotein E phenotype. *Atherosclerosis*. 1991;86:145–52.

Sérougne C, Felgines C, Férézou J, Hajri T, Bertin C, Mazur A. Hypercholesterolemia induced by cholesterol- or cystine-enriched diets is characterized by different plasma lipoprotein and apolipoprotein concentrations in rats. *J Nutr*. 1995;125(1):35-41.

Shabsigh A, Hayek OR, Weiner D, Saidi J, Kaplan SA, Kiss A, Burchardt M, Buttyan R, Levin RM. Acute increase in blood flow to the rat bladder subsequent to partial bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn*. 2000;19(2):195-206; discussion 206-8.

Singer JM, Andrade DF. Analysis of longitudinal data. In: Sen PK, Rao CR. *Handbook of statistics: Bio-environmental and public health statistics*. Amsterdam: North Holland; 2000. v.18. pp 115-60.

Son H, Lee SL, Park WH, Park K, Park S, Kang MS, Kim DY, Kim SW, Paick JS. New unstable bladder model in hypercholesterolemia rats. *Urology*. 2007;69(1):186-90.

Strauss L, Paranko J, Salmi S, Streng T, Launonen A, Morris N, Lakkakorpi J, Makela S, Santti R. Distribution of collagen XII and XIV in the bladder wall of the male rat with outlet obstruction. *J Urol*. 2000;163(4):1304-8.

Steers WD, Kolbeck S, Creedon D, Tuttle JB. Nerve growth factor in the urinary bladder of the adult regulates neuronal form and function. *J Clin Invest*. 1991;88(5):1709-15.

Sutherland RS, Baskin LS, Kogan BA, Cunha G. Neuroanatomical changes in the rat bladder after bladder outlet obstruction. *Br J Urol*. 1998;82(6):895-901.

Tekgul S, Yoshino K, Bagli D, Carr MC, Mitchell ME, Yao LY. Collagen types I and III localization by in situ hybridization and immunohistochemistry in the partially obstructed young rabbit bladder. *J Urol*. 1996;156:582-6.

Teodoro WR, Witzel SS, Velosa AP, Shimokomaki M, Abrahamsohn PA, Zorn TM. Increase of interstitial collagen in the mouse endometrium during decidualization. *Connect Tissue Res*. 2003;44(2):96-103.

Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, Sonohara S, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Architectural remodeling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract*. 2004;200(10):681-91.

Teodoro WR, Yoshinari NH. Estrutura e função do tecido conjuntivo. In: Martins MA, Carrilho FJ, Alves VAF, Castilho EA, Cerri GG, Wen CL (Org.), 1ª edição. *Clínica Médica*. Barueri: Manole; 2009, vol. 5, pp 528-36.

Torrens MJ. The physiology of the lower urinary tract. In: Torrens MJ, Morrison JB, editors. *Human physiology*. Berlin: Springer-Verlag; 1987, p 333.

Uvelius B, Lindner P, Mattiasson A. Collagen content in the rat urinary bladder following removal of an experimental infravesical outlet obstruction. *Urol Int*. 1991;47(4):245-9.

Xie D, Odrionic SI, Wu F, Phippen AM, Donatucci CF, Annex BH. A mouse model of hypercholesterolemia-induced erectile dysfunction. *J Sex Med*. 2007;4:898-907.

Yoshida HS, Spinelli MO, Guedes R, Cruz RJ, Damy SB, Takano JO, de Tolosa EMC. Hematologic values of inbred strains A/SNELL, BALB/c, C57BL/6 and outbred swiss. *Rev Bras Med Vet.* 2000;22(3).

Yoshimura N, de Groat WC. Neural control of the lower urinary tract. *Int J Urol.* 1997; 4:111.

Yu G, Bo S, Xiyu J, Enqing X. Effect of bladder outlet obstruction on detrusor smooth muscle cell: an in vitro study. *J Surg Res.* 2003;114(2):202-9.

Zulet MA, Barber A, Garcin H, Higuieret P, Martínez JA. Alterations in carbohydrate and lipid metabolism induced by a diet rich in coconut oil and cholesterol in a rat model. *Vascul Pharmacol.* 2007;46(6):412-8.

APÊNDICES

APÊNDICE I

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 22.08.07, **APROVOU alteração no modelo experimental de coelhos para ratos** no Protocolo de Pesquisa nº 385/06, intitulado: **"INFLUÊNCIA MEDICAMENTOSA E DIETÉTICA NO DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES DA MATRIZ DETRUSORA EM MODELO EXPERIMENTAL SUBMETIDO À OBSTRUÇÃO CRÔNICA VESICAL"** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**, que será tese de Doutorado do aluno **Ricardo Luis Vita Nunes**, tendo como orientador **Prof.Dr. Homero Bruschini**

CAPPesq, 27 de agosto de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

APÊNDICE II

DIETAS

A seguir, estão apresentadas as formulações das dietas utilizadas no experimento.

- **Ração comercial padrão para roedores** – estabelecida nesse estudo como dieta normal (DN):

Nuvilab CR-1

Composição do Produto: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos.

Níveis de Garantia por Quilograma do Produto: umidade (máx) 12,50%; proteína bruta (mín) 22%; extrato etéreo (mín) 4,50%; matéria mineral (máx) 10%; matéria fibrosa (max) 8%; cálcio (máx) 1,40%; fósforo (mín) 0,80%.

Enriquecimento por Quilograma do Produto:

Vitaminas: Vitamina A 12.000,00 UI; vitamina D3 1.800,00 UI; vitamina E 30,00 mg; vitamina K3 3,00 mg; vitamina B1 5,00 mg; vitamina B2 6,00 mg; vitamina B6 7,00 mg; vitamina B12 20,00 mcg; niacina 60,00 mg; ácido pantotênico 20,00 mg; ácido fólico 1,00 mg, biotina 0,05 mg; colina 600,00 mg.

Microelementos Minerais: Ferro 50,00 mg; zinco 60,00 mg; cobre 10,00 mg; iodo 2,00 mg; manganês 60,00 mg; selênio 0,05 mg; cobalto 1,50 mg.

Aminoácidos: Lisina 100,00 mg; metionina 300,00 mg.

Aditivos: Antioxidante 100,00 mg.

- **Dieta de alto teor lipídico** (DATL)

Dieta AIN-93M modificada – 1,25% de colesterol

Composição do produto: amido de milho (36,32%), caseína (14%), amido dextrinizado (15,50%), sacarose (10%), óleo de soja (4%), celulose (5%), *mix* mineral AIN-93M (3,50%), *mix* vitamínico AIN-93 (10%), L-cistina (0,18%), colesterol (1,25%), bitartarato de colina (0,25%) e tert-butilhidroquinona (0,0008%).

APÊNDICE III

OUTLIERS

O *box-plot* é um modo de descrever graficamente os dados numéricos dos grupos através de cinco informações: a amostra mínima, o quartil inferior (25%), a mediana (50%), o quartil superior (75%) e a amostra máxima. Pode indicar também qualquer resultado que se encontre acima ou abaixo de 1,5 vezes o alcance interquartil (AIQ – diferença entre os quartis inferior e superior), caracterizando um dado totalmente fora do padrão esperado e distante dos outros dados, podendo ser considerado um erro de medição e chamado de *outlier*. Os *outliers* podem ser discretos, quando entre 1,5 e 3 vezes o AIQ, ou extremos, quando maiores que três vezes o AIQ.

A ocorrência de *outliers* em grandes amostras pode ser esperada; entretanto, considerar estes dados fora do padrão pode gerar uma estatística “ingênua” e enganosa. Por exemplo, se considerarmos a temperatura de 10 itens em um ambiente e a maioria se apresentar entre 20-25°C, mas um forno estar a 175°C, a mediana representará melhor a amostra do que a média, que estará com um valor maior tendencioso.

Embora controversa, a exclusão de um ou mais *outliers* é aceitável quando o modelo de medição empregado e a distribuição usual dos dados são bem conhecidos.

No presente estudo, a provável causa da ocorrência de *outliers* na análise morfológica se deve ao fato de que, ao serem cortados os blocos parafinados pelo micrótomo em fatias de 3 μm , qualquer mínima diferença nesse corte acarretará em maior ou menor coloração que os outros cortes, interferindo na sua avaliação.

Na análise morfológica preliminar deste estudo foram verificados os seguintes *outliers* :

- análise de fibras maduras pela coloração de Picrosirius: um animal do grupo 2 (valor de 2,38 μm);
- análise do colágeno tipo I pela imuno-histoquímica: um animal do grupo 1 (5,68 μm) e um animal do grupo 3 (5,91 μm), e
- análise do colágeno tipo III pela imuno-histoquímica: um animal do grupo 1 (6,74 μm).

A análise das fibras imaturas pela coloração de Picrosirius já não apresentava qualquer *outlier*, então não foi necessário refazê-la.

A seguir a representação dos dados da avaliação preliminar antes da retirada dos *outliers*:

Avaliação preliminar das fibras maduras pela coloração do Picrosirius com presença de outlier extremo no grupo 2. Apesar de optado pela sua retirada, a comparação entre grupos não sofreu alterações ($p = 0,651$ na avaliação preliminar e $p = 0,311$ na avaliação sem o outlier).

Avaliação preliminar do colágeno tipo I através de imuno-histoquímica com presença de outliers extremos nos grupos 1 e 3. Após a retirada dos outliers, manteve-se a diferença entre as médias dos grupos ($p = 0,035$ na avaliação preliminar e $p = 0,005$ na avaliação sem os outliers), em ambas situações dependente da comparação entre os grupos 1 e 2 ($p = 0,027$ e $p = 0,003$, respectivamente).

Avaliação preliminar do colágeno tipo III através de imuno-histoquímica com presença de outlier extremo no grupo 1. Após a retirada deste, manteve-se a diferença entre as médias dos grupos ($p = 0,002$ na avaliação preliminar e $p = 0,001$ na avaliação sem o outlier), porém neste caso, além da diferença encontrada entre os grupos 1 e 2 ($p = 0,004$ e $p = 0,002$), foi detectada diferença significativa entre os grupos 1 e 3 ($p = 0,058$ na avaliação preliminar e **$p = 0,016$** na avaliação sem o outlier).