MÁRCIA REGINA DUTRA DO VALLE

**Análise morfométrica das fibras colágenas e
reticulínicas na extrofia vesical**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo,
para obtenção de título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Urologia

Orientador: Prof. Dr. Amilcar Martins Giron

**São Paulo
2004**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Valle, Márcia Regina Dutra do

Análise morfométrica das fibras colágenas e reticulínicas na extrofia vesical /
Márcia Regina Dutra do Valle. -- São Paulo, 2003.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Urologia.

Orientador: Amílcar Martins Giron.

Descritores: 1.DOENÇAS DA BEXIGA/cirurgia 2.DOENÇAS DA BEXIGA/
patologia 3.ESTUDOS DE CASOS E CONTROLES 4.COLÁGENO/análise
5.RETICULINA/análise 6.COLORAÇÃO/métodos 7.INTERPRETAÇÃO
ESTATÍSTICA DE DADOS 8.ESTUDOS PROSPECTIVOS

USP/FM/SBD-485/03

1. Introdução

Com o advento da ultra-sonografia (US) e a obtenção de informações sobre a anatomia do feto, os urologistas têm se deparado, cada vez mais, com o diagnóstico antenatal de alterações morfológicas do trato urinário.

Dentre as malformações urológicas, destaca-se a extrofia vesical que pode ser detectada após a 20ª semana gestacional. Pelos exames seriados, a US sugere o diagnóstico devido a ausência de um fluido normal enchendo a bexiga bem como pela presença de massa de tecido ecogênico com protrusão na parede abdominal inferior do feto, diástase dos ramos do púbis e genitália diminuída (JAFJE *et al.*, 1980; MIRK *et al.*, 1986).

1.1 Generalidades

A incidência está estimada entre um em 30.000 e um em 50.000 nascidos vivos. Acomete duas vezes mais o gênero masculino que o feminino sendo que GEARHART (2001) demonstrou a proporção de 6:1 e 5:1 para gênero masculino e feminino respectivamente. O risco de recorrência familiar é raro, com probabilidade de um em 275 (IVES *et al.*, 1980); o risco de pacientes extrófcos virem a ter descendentes com a mesma malformação é de um em 70.000 nascidos vivos (SHAPIRO *et al.*, 1984).

É parte de um espectro de anomalias que envolvem não somente o trato urinário e o genital, mas também com muita frequência compromete as estruturas músculo-esqueléticas da parede abdominal inferior e pelve; ocasionalmente afeta o trato gastrointestinal terminal (GEARHART, 2001). (FIGURA 1)

FIGURA 1 - Apresentação clínica da extrofia vesical: o tamanho da bexiga é variável, a placa vesical pode ser elástica ou não, dependendo de interações como trauma com vestes, ação da temperatura e infecção

1.2 Etapas da Embriologia da Extrofia

A causa desta malformação é atribuída a uma falha no desenvolvimento da membrana cloacal que rompe (deiscência precoce) em virtude da não penetração do folheto mesodérmico. A membrana cloacal é uma camada bi-laminar situada na porção caudal do disco germinativo que ocupa a porção infra-umbilical da parede abdominal. Sabe-se que no desenvolvimento normal, a involução do mesênquima entre as camadas do ectoderma e do endoderma da membrana cloacal permite a fusão das estruturas medianas infra-umbilicais resultando na formação dos músculos abdominais e dos ossos da pelve. Após ocorrer a involução mesenquimatosa, de cima para baixo, o crescimento do septo uro-retal divide a cloaca em bexiga anteriormente e reto posteriormente. O septo uro-retal une a membrana cloacal no período anterior à perfuração deste para desenvolver os orifícios anal e uro-genital. Antes da perfuração, o par de tubérculos genital migra medialmente e faz fusão na linha média céfalo-caudal à membrana dorsal. (FIGURA 2)

A membrana cloacal está sujeita à ruptura prematura; dependendo da extensão do defeito infra-umbilical e do tempo em que esses eventos embriológicos ocorrerem, instalam-se diferentes variedades de anomalias extrólicas (com a mesma embriologia), que incluem a fissura vesical superior, extrofia vesical, extrofia de cloaca e epispádia (GEARHART, 2001). SLAUGHENOUPT *et al.* (1996), descrevem um modelo experimental em ovelhas gestantes, criando cirurgicamente a extrofia vesical clássica: os recém-nascidos apresentaram a parede vesical exposta em continuidade com a parede abdominal, útil para estudo e desenvolvimento de técnicas cirúrgicas.

FIGURA 2 - Diagrama de eventos embriológico e ruptura da membrana cloacal; que dão origem à extrofia vesical clássica (FONTE: CAMPBELL'S UROLOGY, 2002)

1.3 Tratamento

Não existe método ideal para o tratamento do complexo extrofia-epispádia vesical, devendo ser individualizado para cada paciente, baseado em parâmetros clínicos, radiológicos e urodinâmicos. Os procedimentos cirúrgicos propostos para a reconstrução devem oferecer: continência urinária adequada às atividades sociais do paciente, preservação da função renal e trato urinário superior, restabelecimento da anatomia da parede abdominal e dos genitais. ARAP *et al.* (1976 e 1980) desenvolveram programa denominado reconstrução completa da extrofia de bexiga no período de 1976 á 1982, procurando corrigir todos os problemas da anomalia:

- a) pequena capacidade vesical, por meio da ampliação com conduto colonico;
- b) utilização da bexiga na confecção de “ tubo muscular” com função “esfincteriana”;
- c) refluxo-vésico ureteral, por meio do reimplante em alça do cólon;

Resultados de séries como LEPOR; JEFFS (1983), ROSS; KAY (2000), e GEARHART *et al.* (1993 e 2001), POLI-MEROL *et al.*, (2002); condizem com o fechamento funcional precoce ao nascer. BOLDUC *et al.* (2002), confirmam a preservação da função renal dada pelo fechamento precoce bem sucedido.

O tamanho e a capacidade funcional do músculo detrusor são considerações importantes para tal. Correlações entre o tamanho

aparente da bexiga e o potencial da capacidade vesical não devem ser confundidos. Sabe-se que a pequena bexiga pode crescer e aumentar a sua capacidade mesmo na ausência da atividade esfíncteriana e com mínima resistência uretral ao fluxo urinário. A bexiga extrófica, que ao nascimento pode apresentar capacidade vesical pequena como, por exemplo, em torno de 5ml, mesmo assim, com adequada elasticidade e contratilidade do músculo detrusor, pode se desenvolver e adquirir capacidade suficiente após reconstrução cirúrgica do colo vesical. A reconstrução cirúrgica atual pode ser feita em uma etapa ou em estágios. GRADY; MITCHELL (1999) propõem a reconstrução primária no recém-nascido, tentando impor à bexiga uma refuncionalização precoce. Nenhuma tentativa é feita para reconstruir o colo vesical e justificam que não há necessidade de reimplante ureteral, pois nessa idade a bexiga é imatura. A reconstrução funcional em estágios compreende (GEARHART, 2001):

- 1º estágio: cistorrafia, alongamento peniano, plástica abdominal;

- 2º estágio: reconstrução do colo vesical e uretra posterior;

- 3º estágio: neouretroplastia e/ou clitoroplastia.

Vários autores estimaram que a fração de continência urinária era tanto maior quanto mais precoce e bem sucedido fosse realizado o fechamento funcional da bexiga, encontrando resultados semelhantes de continência urinária após reconstrução do colo vesical, pela técnica de Young-Dees-Leadbetter. LEPOR, JEFFS (1983), encontraram 86% de continência em 25 pacientes, com intervalo maior do que três horas ou um

episódio de incontinência ao dia. OESTERLING, JEFFS (1987), relatam que a continência urinária foi excelente em 92% dos pacientes do grupo sem tratamento prévio e em 55% no grupo daqueles com re-extrofia de bexiga. HUSMANN *et al.* (1989) referem 75% de continência nos pacientes sem tratamento prévio e também que, apenas 10% dos pacientes avaliados não desenvolveram boa capacidade vesical quando submetidos ao tratamento funcional no primeiro ano de vida. GIRON (1990), relata que houve continência urinária em 68% dos 25 pacientes avaliados não sendo necessário qualquer tipo de proteção ou fraldas e que 16% permaneceram parcialmente continentes, sendo necessário proteção diurna.

1.4 Histologia

1.4.1 Bexiga normal

O urotélio humano raramente é constituído por mais de sete camadas de células. A mucosa é formada por um epitélio de transição e por uma lâmina própria de tecido conjuntivo que varia do frouxo ao denso. Não há submucosa distinta, embora, como ocorre com o ureter, o tecido conjuntivo mais próximo do músculo, às vezes seja denominado submucosa. As células mais superficiais do epitélio de transição são responsáveis pela barreira osmótica entre a urina e os fluidos teciduais. Nestas células, a membrana plasmática em contato com a urina, é especializada, apresentando placas espessas separadas por feixes de membranas mais delgadas. Quando a bexiga se esvazia, a membrana se dobra nas regiões delgadas e as placas espessas se invaginam e se enrolam, formando

vesículas fusiformes que permanecem próximo à superfície celular. Ao se encher novamente, sua parede se distende e tem lugar um processo inverso ao descrito, com transformação das vesículas citoplasmáticas fusiformes em placas que se inserem na membrana, aumentando a superfície das células. Esta membrana plasmática especial é sintetizada no aparelho de Golgi e tem uma composição química peculiar: os cerebrosídeos constituem o principal componente da fração dos lipídeos polares. A túnica muscular é formada por uma camada longitudinal interna e uma circular. A partir da porção inferior do ureter, aparece uma camada longitudinal externa. Essas camadas musculares são mal definidas. Na parte proximal da uretra, a musculatura da bexiga forma o esfíncter interno da mesma. Revestindo a superfície externa da bexiga está presente uma túnica adventícia fibrosa, exceto a parte superior da bexiga que é coberta por túnica serosa (peritônio) constituída por uma camada de epitélio pavimentoso simples que repousa sobre uma pequena quantidade de tecido conjuntivo de sustentação. Além da inervação aferente, a bexiga recebe a inervação simpática, parassimpática, e também estão presentes células ganglionares autônomas na sua túnica adventícia (ROSS; ROMRELL, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). (FIGURA 3)

FIGURA 3 - Fragmento de bexiga em corte transversal (HE, aumento original x40)
(**FONTE:** DI FIORE, 1982)

Dentre os pacientes com bexiga de estrutura histológica normal, incluem-se os do grupo controle desse estudo, que apresentam diagnóstico de refluxo vésico-ureteral primário. Trata-se de uma anomalia congênita da junção uretero-vesical na qual a deficiência do músculo longitudinal do ureter intra-vesical resulta em um mecanismo valvular inadequado e o fator mais crítico para uma junção uretero-vesical competente é o comprimento do ureter submucoso relacionado ao seu diâmetro (CAMPBELL'S UROLOGY, 2002). Todos foram avaliados clinicamente e com exames complementares e classificados como assintomáticos do ponto de vista miccional.

1.4.2 Extrofia vesical

A mucosa exposta, freqüentemente mostra inflamações crônica e aguda com ulcerações e alterações metaplásicas no momento do fechamento cirúrgico. Metaplasia escamosa ou intestinal não é o evento mais comum ao nascimento e advém intensa e profundamente com o tempo de exposição da placa vesical. Grande porção do urotélio é composta de células transicionais, e pelo menos algumas anormalidades da mucosa são relatadas em todos os casos. Dentre as mudanças inflamatórias, as mais freqüentes são a infiltração celular de leucócitos, úlceras no urotélio e cistite folicular, seguida de cistite glandular e cística e fibrose da parede muscular. Dentre as metaplásicas ocorrem alterações escamosas (sempre com queratinização) e para epitélio intestinal glandular. Alterações primárias da musculatura não foram comprovadas e mesmo a desorganização significativa das fibras musculares é aparentemente incomum (MURPHY, 1994). (FIGURAS 4 e 5)

FIGURA 4 -Extrofia vesical: a parede apresenta poucos feixes musculares lisos (setas) e abundante tecido conjuntivo (PS, aumento original x100)

FIGURA 5 -Extrofia vesical: corte histológico de bexiga apresentando metaplasia escamosa do urotélio (seta) (PS, aumento original x100)

1.4.2.1 Colágeno tipo I

Na hibridização *in situ*, os experimentos revelaram que o colágeno tipo I era mais proeminente na lâmina própria da bexiga. O estudo imuno-histoquímico revelou que a distribuição do mesmo na bexiga era similar à expressão do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm), sendo encontrado na lâmina própria de maneira intensa. Havia uma pequena expressão de colágeno tipo I ao redor da musculatura lisa nos estágios iniciais (fetal) com aumento nas bexigas completamente desenvolvidas. Não se detectou deposição do mesmo no urotélio (YAO *et al.*, 1996).

1.4.2.2 Colágeno tipo III

Foi expresso de maneira consistente no urotélio vesical durante o desenvolvimento da bexiga (estágios maduros) sendo que em estágios precoces do desenvolvimento localizava-se na lâmina própria. A localização da proteína de depósito na bexiga era dentro das bandas musculares nas bexigas maduras, o que difere das de colágeno tipo I (YAO *et al.*, 1996).

1.4.2.3 Fisiologia vesical e colágeno

A fisiologia normal da bexiga depende de sua habilidade em armazenar urina a baixa pressão bem como produzir contrações efetivas e coordenadas para o seu esvaziamento (POLI-MEROL *et al.*, 2002). Colágeno e músculo são os elementos histológicos mais importantes envolvidos no funcionamento normal da bexiga (NELSON *et al.*, 1979; KIM *et al.*, 1991a; MURAKUMO *et al.*, 1995). O acúmulo de colágeno na camada muscular associa-se a alteração futura da complacência (EWALT *et al.*, 1992). Isto ocorre em várias condições patológicas e fisiológicas como em bexigas neurogênicas, uropatias obstrutivas (KIM *et al.*, 1991b), bem como na extrofia vesical (LAÍS *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 1996). Além disso, a pressão hidrostática é importante para estimular a proliferação celular, o crescimento vesical (BASKIN *et al.*, 1993a) e modificar o balanço pressórico com possíveis mudanças da camada muscular.

Na extrofia vesical, o papel da inter-relação entre colágeno e músculo já foi avaliado na literatura. LAÍS *et al.* (1996) compararam a quantidade de colágeno e músculo em diferentes períodos de reconstrução cirúrgica de pacientes extróficos e, concluíram que havia baixa porcentagem de músculo em todos os estágios de reconstrução comparados ao grupo controle. Concluíram, também, que a fração músculo/colágeno aumentava ao longo do tempo, e isso pode ser devido ao fechamento precoce e reconstrução do colo vesical. Embora a fração de colágeno diminuísse, nunca atingia os valores do grupo controle.

LEE *et al.* (1996) avaliaram a quantidade de colágeno e músculo em recém-nascidos com extrofia vesical, comparada ao grupo controle e encontraram que, nas bexigas extrólicas, havia aumento de colágeno e diminuição de músculo atingindo até três vezes a fração colágeno/músculo quando comparada ao grupo controle. Tais resultados condizem com PEPPAS *et al.* (1999) que estudaram a bexiga de pacientes extrólicos em diferentes estágios de reconstrução e observaram que existe alteração da fração colágeno/músculo em pacientes com extrofia vesical. Contudo, não observaram que o estágio de reconstrução influía na mudança da fração colágeno/músculo.

Embora os resultados de LAÍS *et al.* (1996) sejam diferentes em muitos aspectos quando comparados aos resultados de LEE *et al.* (1996) e PEPPAS *et al.* (1999), ambos confirmam um aumento na fração colágeno/músculo em pacientes com extrofia vesical no período neonatal resultante de um aumento do colágeno e diminuição do músculo.

2. Objetivos

a) - Quantificar as fibras colágenas e reticulínicas da matriz extracelular da parede vesical de pacientes com extrofia vesical comparativamente àqueles com refluxo vésico-ureteral (grupo controle).

b) - No grupo dos pacientes com extrofia vesical, analisar a modificação da fração colágeno/reticulina nos pacientes em estágios tardios do tratamento cirúrgico, comparativamente aos virgens de tratamento.

3. Casuística e Métodos

3.1 Casística

A amostra avaliada nesta pesquisa foi constituída de 17 pacientes, dos quais 11 do grupo em estudo (portadores de extrofia vesical), e seis do grupo controle (bexigas normais), acompanhados no período de Setembro/2001 a Setembro/2003 na Clínica Urológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Foram analisados, prospectivamente, 10 pacientes do gênero masculino e sete femininos, com idade variando de um mês a 18 anos, em vários estágios de reconstrução (de um a três procedimentos cirúrgicos).

A idade média dos pacientes portadores de extrofia vesical foi de 5,8 anos, sendo:

- três lactentes no primeiro estágio (cistorrafia associada ao alongamento peniano e abdominoplastia) (GIRON, 1990);
- oito pacientes no segundo estágio (correção da incontinência urinária por meio da técnica de Young Dees-Leadbetter) e neourethroplastia em meninos ou clitoroplastia em meninas. Um paciente após o segundo estágio necessitou de re-tubulização trigonal.

O grupo controle constou de pacientes cujas bexigas (tanto clinicamente como aos exames complementares), eram normais, sem perdas urinárias. A idade média foi de 3,8 anos, durante a correção cirúrgica de refluxo vésico-ureteral bilateral em cinco pacientes e megaureter em um.

A idade dos pacientes, gênero, data e número de cirurgias estão discriminados no QUADRO 1.

QUADRO 1 - DADOS GERAIS DOS PACIENTES ENVOLVIDOS NA CASUÍSTICA

PACIENTE N°	INICIAIS DOS PACIENTES	REGISTRO HOSPITALAR	GÊNERO	IDADE NA BIÓPSIA	DATA DA CISTORRAFIA	DATA DA BIÓPSIA	NÚMERO DE CIRURGIAS
1	V.A.P.	292813	F	4 anos	26/02/1997	04/09/2001	2
2	G.C.D.	2964940d	M	8 anos	21/01/1994	07/03/2002	2
3	G.F.F.A.S.	13438055B	M	3 meses	13/03/2002	13/03/2002	0
4	D.G.R.	3204052B	M	4 anos	11/02/1998	22/03/2002	2
5	F.B.A.	159526	M	13 anos	13/07/1989	27/06/2002	3
6	F.S.M.	3086951K	M	7 anos	14/10/1994	06/09/2002	2
7	F.S.	2370874G	M	18 anos	29/01/1985	09/05/2003	2
8	(RN) A.F.R.B.	1191478	F	1 mês	12/05/2003	12/05/2003	0
9	J.V.M.O.A.	3287690D	M	6 anos	15/03/1997	30/06/2003	2
10	A.M.S.N.	350039	F	4 anos	12/01/1999	21/07/2003	2
11	P.C.	1358730B	M	1 mês	22/08/2002	22/08/2003	0
12	T.M.G.C.D.	00345107	F	2 anos	-	14/12/2001	0
13	N.B.S.	6094782K	M	1 mês	-	19/04/2002	0
14	A.R.S.	13438534K	M	10 anos	-	16/04/2002	0
15	N.R.S.	1344715F	F	9 anos	-	13/09/2002	0
16	J.M.M.	360893	F	5 meses	-	15/09/2003	0
17	I.J.B.S.	6079003E	M	4 anos	-	19/09/2003	0

3.2 Métodos

Os tecidos coletados foram de espessura total da parede da cúpula vesical com tamanho de um centímetro de comprimento. Inicialmente, o material a ser examinado foi colocado em solução de formol tamponado (formaldeído a 10%) e mantido durante seis a 72 horas. A seguir foi colocado em álcool etílico a 70% onde permaneceu até ser processado no aparelho histotécnico, a fim de ser desidratado, diafanizado e incluído em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomos, obtendo-se secções seriadas de quatro micrômetros, posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para visão de conjunto do tecido na espessura total e pelo método tricômio de Picrossirius-Red (PS) e Reticulina (para quantificar o número de fibras colágenas e reticulínicas, respectivamente). As secções foram lidas em microscópio de luz polarizada na coloração Sirius Red (corante principal do Picrossirius-Red), porque há um aumento considerável da birrefringência do colágeno (que é a capacidade de brilhar contra um fundo escuro), isolando-o das demais estruturas (JUNQUEIRA *et al.*, 1979, 1983; PUCHTLER *et al.*, 1988; DAYAN *et al.*, 1989). (FIGURA 6)

FIGURA 6 - Fragmento de bexiga de paciente com extrofia vesical na coloração PS sob luz polarizada (aumento original x400)

Para quantificar as fibras colágenas e reticulínicas, foi utilizada a ocular de ciclóides com objetiva de 40 vezes, contando-se, em 10 campos consecutivos, qualquer fibra que tocasse ou transpusesse um ciclóide (FONSECA, 1983; GILPIN *et al.*, 1985; WIED *et al.*, 1989; USHIKI, 2002). (FIGURAS 7 e 8).

FIGURA 7 - Visão esquemática da ocular de ciclóides utilizada para análise morfométrica das fibras colágenas e reticulínicas

FIGURA 8 - Ocular de ciclóides em fragmento de bexiga de paciente com extrofia vesical. Toda fibra que tocava ou transpunha cada ciclóide, era quantificada (seta); na coloração PS sob luz polarizada (aumento original x400)

3.2.1 Análise estatística

Na análise descritiva, foram calculadas: distribuições numérica e percentual, média, mediana, mínimo, máximo, desvio-padrão).

Foi utilizado o teste t de Student, que avalia a diferença entre as médias do número de fibras colágenas e reticulínicas de cada grupo, aproximando-se do valor zero. Adotou-se como nível de significância a probabilidade de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

Na análise histológica às colorações de rotina HE, observou-se que a parede vesical dos pacientes com extrofia vesical era constituída predominantemente de tecido conjuntivo com poucas e delgadas bandas musculares lisas. No grupo controle, os feixes musculares eram bem desenvolvidos. (FIGURAS 9 e 10)

FIGURA 9 - Extrofia vesical: corte histológico de bexiga apresentando predomínio de tecido conjuntivo (seta preta) e pouco tecido muscular (setas amarelas) (PS, aumento original x25)

FIGURA 10 - Fragmento de bexiga de paciente do grupo controle com predomínio de tecido muscular (HE, aumento original x100)

Na coloração pelo PS e sob luz polarizada, observou-se que o número de fibras colágenas em pacientes com extrofia vesical era maior (mínimo de 919 e máximo de 2031) que em pacientes do grupo controle (mínimo de 156 e máximo de 577). (GRÁFICO 1 - FIGURA 11)

GRÁFICO 1 - NÚMERO DE FIBRAS COLÁGENAS EM PACIENTES COM EXTROFIA VESICAL E DO GRUPO CONTROLE

FIGURA 11 - Parede vesical corada pelo picro-sirius sob luz polarizada. (A) - Extrofia vesical - numerosas fibras colágenas refringentes; (B) Bexiga normal - escassas fibras colágenas refringentes entre as bandas musculares (A e B - aumento original x400)

Na coloração pela Reticulina, que individualiza as fibras reticulínicas que envolvem cada fibra muscular, observou-se um número menor de fibras reticulínicas nas bexigas de pacientes com extrofia vesical (mínimo de 21 e máximo de 383), comparativamente ao controle (mínimo de 1528 e máximo de 2183). (GRÁFICO 2 - FIGURA 12)

GRÁFICO 2 - NÚMERO DE FIBRAS RETICULÍNICAS EM PACIENTES COM EXTROFIA VESICAL E DO GRUPO CONTROLE

FIGURA 12 - Reticulina - (A) Extrofia vesical - abundante tecido colágeno (seta) e esparsos agregados reticulínicos em preto (cabeça da seta) correspondentes aos feixes musculares; (B) Bexiga normal - trama reticulínica (setas) abundante [aumento original x200 (A) e x100 (B)]

Nas bexigas do grupo controle, a análise histológica mostrou um grande número de bandas musculares bem desenvolvidas com um grande número de fibras reticulínicas.

A análise estatística mostrou diferença significativa ($p < 0,0001$) entre as médias dos grupos estudados, em relação ao número de fibras colágenas, bem como ao número de fibras reticulínicas. (GRÁFICOS 3 e 4)

GRÁFICO 3 - DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DO NÚMERO DE FIBRAS COLÁGENAS EM PACIENTES COM EXTROFIA VESICAL E DO GRUPO CONTROLE

$p_valor = 0,0001$

t de Student = -8,70

GRÁFICO 4 - DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DO NÚMERO DE FIBRAS RETICULÍNICAS EM PACIENTES COM EXTROFIA VESICAL E DO GRUPO CONTROLE

$p_valor = 0,0001$

t de Student = 15,64

Os dados da TABELA 1 mostram os resultados da análise estatística descritiva à contagem de fibras colágenas e reticulínicas nos grupos estudados.

TABELA 1 - RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS GRUPOS ESTUDADOS

Fibras	Grupo	Distribuição numérica	Média	Desvio Padrão	Mediana	Min.	Máx.
Colágenas	Controle	6	318,2	355	273,5	156,0	577,0
	Com extrofia	11	1416	163,7	1410	919	2031
Reticulínicas	Controle	6	1860	247	1892	1528	2183
	Com extrofia	11	172,7	128,7	160,0	21,0	383,0

Com relação aos pacientes com extrofia vesical comparados entre si, correlacionando o número de cirurgias e a quantidade de fibras colágenas e reticulínicas, os resultados obtidos demonstraram que há maior número de fibras colágenas e um menor número de fibras reticulínicas, em pacientes virgens de tratamento (pacientes nº 3, 8 e 11).

Ao contrário, os resultados dos pacientes em 2º estágio de tratamento cirúrgico (pacientes nº 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 e 10) demonstraram diminuição do número de fibras colágenas e aumento do número de fibras reticulínicas. (GRÁFICOS 5 e 6)

Contudo, as diferenças não se mostraram estatisticamente significantes.

GRÁFICO 5 - PACIENTES COM EXTROFIA VESICAL COMPARADOS ENTRE SI QUANTO AO NÚMERO DE CIRURGIAS E QUANTIDADE DE FIBRAS COLÁGENAS

GRÁFICO 6 - PACIENTES COM EXTROFIA VESICAL COMPARADOS ENTRE SI QUANTO AO NÚMERO DE CIRURGIAS E QUANTIDADE DE FIBRAS RETICULÍNICAS

5. Discussão

Na extrofia vesical há diferentes tipos de placa vesical: algumas já nascem pequenas, duras, rígidas e outras tornam-se assim com a idade, tempo de exposição a traumas, infecções e temperaturas inadequadas (fraldas). (LEE *et al.*, 1996) É importante estudar as mudanças de expressão da fração colágeno/reticulina da bexiga após o nascimento, pois pode-se inferir um prognóstico futuro quanto à sua capacidade de desenvolver parede elástica e complacência adequada (POLI-MEROL *et al.*, 2002).

NELSON *et al.* (1979) e NEWMAN, ANTONAKOPOULOS (1989) em estudo ultraestrutural da bexiga, verificaram que a bexiga fetal humana sofre uma série de mudanças no seu desenvolvimento durante a 13^a - 21^a semana de gestação, quando finalmente adquire o urotélio característico e uma camada muscular bem desenvolvida. FREEDEMAN *et al.* (1997) também avaliaram o desenvolvimento do músculo em fetos com bexigas normais e obstrutivas durante a gestação, por microscopia eletrônica, e observaram que a fração músculo/colágeno em pacientes do grupo controle foi a mesma que em pacientes com obstrução. BASKIN *et al.* (1993) e HABERSTROH *et al.* (1999) demonstraram uma resposta proliferativa de célula muscular em neonatos após exposição de pressão

hidrostática aumentada. Esses dados confirmam que a pressão é um importante estímulo para o desenvolvimento do músculo detrusor. SHAPIRO *et al.* (1991) encontraram altas porcentagens de reticulina em parede vesical de fetos e em recém-nascidos com bexigas normais. Tais resultados também são encontrados em nossa avaliação de pacientes do grupo controle (bexigas normais) onde o número de fibras reticulínicas foi maior que a dos pacientes com extrofia vesical, demonstrando diferença estatisticamente significativa.

KIM *et al.* (1991a) durante o estudo histológico de bexigas fetais sem evidências de disfunção do trato inferior avaliaram o desenvolvimento de fibras colágenas, reticulínicas e elastina, observando que há um aumento progressivo da espessura do músculo e que o conteúdo de colágeno diminui durante a gestação. A proporção colágeno/músculo era altamente variável, porém, diminuía durante o desenvolvimento fetal. De acordo com o grau de distensão da bexiga nestes fetos, ocorre o aumento crescente da espessura muscular (CORTIVO *et al.*, 1981, EWALT *et al.*, 1992, BASKIN *et al.*, 1994, KOO *et al.*, 1997, MACARAK; HOWARD, 1999).

Trabalhos demonstram que a reconstrução funcional precoce das bexigas com extrofia vesical pode influenciar na fração colágeno/reticulina e na aquisição de boa capacidade vesical. OESTERLING; JEFFS (1987) e LEPOR *et al.* (1992) preconizam a reconstrução em estágios já no período neonatal. HUSMANN *et al.* (1989) relatam que se a reconstrução vesical for realizada após o primeiro ano de vida haverá uma necessidade maior de ampliações vesicais do que se realizada precocemente.

LEPOR; JEFFS (1983) também enfatizam que a reconstrução funcional bem sucedida é fundamental para produzir continência futura nestes pacientes bem como para que possam adquirir capacidade vesical satisfatória. Nossos achados no presente estudo são semelhantes aos da literatura, com relação à reconstrução funcional precoce, e, embora os resultados não tenham obtido significância estatística, observamos que, em pacientes do 2º estágio de tratamento cirúrgico havia um aumento da capacidade vesical dado pela provável diminuição do número de fibras colágenas e aumento do número de fibras reticulínicas.

BAKA-JAKUBIAK (2000) realizou a reconstrução combinada do colo vesical, epispádia e uretroplastia num grupo selecionado de pacientes e obteve melhora na capacidade vesical. ARAP *et al.* (1976 e 1980) também verificaram melhora da continência relacionada ao aumento da capacidade vesical com aumento da função detrusora em pacientes submetidos à correção de epispádia incontinente. Autores como RANSLEY *et al.* (1995); GRADY, MITCHELL (1998 e 1999) também observaram boa continência urinária em pacientes com extrofia vesical quando submetidos ao fechamento completo primário no período neonatal.

DIAMOND *et al.* (1999) demonstraram que a maioria dos pacientes com extrofia vesical submetidos a fechamento vesical precoce apresentam uma dinâmica de enchimento normal antes da reconstrução do colo vesical, que pode levar a mudanças na complacência e estabilidade. Ademais, 25% dos pacientes extróficos analisados já podiam manter função detrusora normal após a reconstrução do colo vesical.

CAIONE *et al.* (2000) realizaram estudo em pacientes com fechamento precoce da bexiga com extrofia vesical associado ao realinhamento das estruturas musculares do períneo, circundando o colo vesical. Observaram melhores resultados relacionados ao crescimento da parede vesical e restabelecimento da atividade vésico-uretral coordenada.

USHIKI (2002) revisou os componentes da matriz extracelular do ponto de vista morfológico classificando os três tipos de fibras, baseados em estudo prévio de microscopia eletrônica. DIXON, GOSLING (1983) estudaram biópsias de bexigas normais, observando a presença de muscular mucosa em todas as regiões da bexiga urinária humana, é descontínua e consiste em bandas musculares organizadas irregularmente e compostas de células musculares com diâmetro pequeno.

AHERNE; DUNNILL (1982), FONSECA (1983) e GUNDERSSSEN *et al.*, (1988) descrevendo o método morfométrico (ou estereológico) obtiveram informações quantitativas em terceira dimensão de estruturas microscópicas, fundamentadas em observações feitas em cada secção. Em nosso estudo, pela utilização da ocular de ciclóides que é considerada a mais adequada para estruturas alongadas em distribuição preferencial, quando realizamos a contagem de fibras colágenas e reticulínicas, pudemos observar diferenças estatisticamente significativas.

A análise morfométrica da fração colágeno/reticulina realizada em alguns estudos clínicos de pacientes com extrofia (LEE *et al.*, 1996, PEPPAS *et al.* 1999) e estudo experimental em cordeiros com extrofia vesical, feitos por SLAUGHENHOUP *et al.* (1999), demonstraram um

aumento da fração de colágeno e diminuição de reticulina, conforme encontrado também em nosso estudo. LAIS *et al.* (1996), verificaram alterações morfométricas no músculo detrusor e diminuição nos componentes do colágeno da parede vesical de pacientes com extrofia vesical tratados.

Em pacientes com extrofia vesical virgens de tratamento o número de fibras colágenas foi maior do que em pacientes em estágios tardios de reconstrução. Sabe-se que esta fração colágeno/reticulina pode mudar a partir da reconstrução bem sucedida em estágios, bem como, do crescimento da bexiga conseqüente a diminuição do colágeno e aumento da reticulina progressivamente, conforme resultados obtidos em nossos pacientes e de LEE *et al.* (1996), LAIS *et al.* (1996) e PEPPAS *et al.* (1999).

SHAPIRO *et al.*, (1991) utilizaram a análise morfométrica em bexigas de pacientes com mielodisplasia observando aumento de tecido conjuntivo comparado ao controle. LEPOR *et al.*, (1992) também o fizeram determinando o efeito da idade em bexigas de pacientes portadores ou não de hiperplasia prostática benigna. Estudando a túnica muscular, puderam observar que o aumento relativo da fibrose do detrusor dada pela distribuição de tecido conjuntivo está relacionada à idade. GILPIN *et al.*, (1985), KIM *et al.*, (1991b) e INUI *et al.*, (1999); avaliaram alterações do tecido conjuntivo na parede vesical em pacientes com bexiga trabeculada ou com obstrução infravesical comparados ao grupo controle, observando que as células do músculo liso sofrem hipertrofia compensatória à obstrução, e que a infiltração de tecido conjuntivo nas bandas musculares do detrusor

que ocorre posteriormente à hipertrofia celular, podendo afetar negativamente na complacência bem como na contração muscular dessas bexigas. MACHADO *et al.*, (2000) em estudo realizado em coelhos, observaram alterações importantes na distribuição de tecido conjuntivo bem como no crescimento vesical, capacidade e complacência quando disfuncionalizadas, adquirindo-se boa recuperação após a refuncionalização.

A coloração de PS utilizada neste estudo, isolando o colágeno das demais estruturas através da sua bi-refringência, demonstrou ser um método simples, específico e sensível para identificação do mesmo, como dados de literatura (JUNQUEIRA *et al.*; 1979, 1982 e 1983; LOPEZ DE LEON, 1985; PUCHTLER *et al.*, 1988; DAYAN *et al.*, 1989), E também, pelo método da impregnação da prata, isolou-se a reticulina dada pela sua coloração negra (MURAKUMO *et al.*, 1995; MONTES, 1996), permitindo-nos encontrar diferenças quantitativas entre as fibras colágenas e reticulínicas nos grupos estudados.

CHARLTON *et al.*, (1999) utilizaram a análise morfométrica na coloração HE para analisar a alteração do músculo na parede vesical de pacientes com incontinência urinária, observando intenso aumento de tecido conjuntivo, conforme nossos achados.

Embora o número de pacientes estudados tenha sido reduzido, foi possível estabelecer relação entre reconstrução precoce da extrofia vesical e alteração da fração colágeno/reticulina; isto indica que: quanto mais precoce for a reconstrução da extrofia, talvez estas bexigas possam adquirir melhor complacência no futuro.

Os resultados obtidos no grupo de pacientes com extrofia vesical quando comparados entre si, em relação ao número de cirurgias e à quantidade de fibras colágenas e reticulínicas, sugerem diferença, ainda que estatisticamente não significativa. Seria necessário acompanhar os pacientes virgens de tratamento desta casuística, assim como futuros novos pacientes também virgens de tratamento, e realizar a análise morfométrica ao longo dos anos, no momento do segundo estágio de tratamento cirúrgico. Portanto, há interesse de se dar continuidade a este estudo.

6. Conclusões

a) - O número de fibras colágenas é significativamente maior na parede vesical de pacientes com extrofia vesical comparados ao grupo controle. O número de fibras reticulínicas é significativamente menor.

b) - Foram observadas diferenças no grupo de pacientes com extrofia vesical quando comparados entre si, em relação ao número de cirurgias e ao número de fibras colágenas e reticulínicas.

7. Referências Bibliográficas

1. AHERNE, W.A.; DUNNILL, M.S. **Morphometry**. London, Edward Arnold, 1982. p. 60-74.
2. ARAP, S.; GIRON, A.M.; de GÓES, G.M. Complete reconstruction of bladder exstrophy. **Urology**, v. 7(4), p. 413-6, 1976.
3. ARAP, S.; GIRON, A.M.; de GÓES, G.M. Initial results of the complete reconstruction of bladder exstrophy. **Urol. Clin. North Am.**, v. 7(2), p. 477-91, 1980.
4. ARAP, S.; NAHAS, W.C.; GIRON, A.M.; BRUSCHINI, H.; MITRE, A.I. Incontinent epispadias: surgical treatment of 38 cases. **J. Urol.**, v. 140(3), p. 577-81, 1988.
5. ATALA, A.; KEATING, M.A. Vesicoureteral reflux and megaureter. WALSH, P.C.; RETIK, A.B.; VAUGHAN Jr., E.D.; WEIN, A.J. **Campbell's Urology**, Philadelphia, Saunders, 8ª ed. 2002. v. 3, Cap. 59, p. 2053-116.

6. BAKA-JAKUBIAK, M. Combined bladder neck, urethral and penile reconstruction in boys with the exstrophy-epispadias complex. **B.J.U.Int.**, v. 86(4), p. 513-8, 2000.
7. BASKIN, L.S.; CONSTANTINESCU, S.; DUCKETT, J.W.; SNYDER, H.M.; MACARAK, E. Type III collagen decreases in normal fetal bovine bladder development. **J. Urol.**, v. 152(2 Pt 2), p. 688-91, 1994.
8. BASKIN, L.S.; HOWARD, P.S.; DUCKETT, J.W.; SNYDER, H.M.; MACARAK, E.J. Bladder smooth muscle cells in culture: identification and characterization. **J. Urol.**, v. 149(1), p. 190-7, 1993.
9. BASKIN, L.S.; HOWARD, P.S.; MACARAK, E. Effect of physical forces on bladder smooth muscle and urothelium. **J. Urol.**, v. 150(2), p. 601-7, 1993.
10. BOLDUC, S.; CAPOLICCHIO, G.; UPADHYAY J., BAGLI D. J.; KHOURY, A.E., McLORIE, G.A. The fate of the upper urinary tract in exstrophy. **J. Urol.**, v. 168(6), p. 2579-82, 2002.
11. BOSTWICK, D.G.; EBLE, J.N. **Urologic surgical pathology**. St. Louis, Mosby-Year Book, 1997. Cap. 4, p. 199-200.

12. CAIONE, P.; CAPOZZA, N.; LAIS, A.; MATARAZZO, E. Periurethral muscle complex reassembly for exstrophy-epispadias repair. **J. Urol.**, v. 164(6), p. 2062-6, 2000.
13. CHARLTON, R.G.; MORLEY, A.R.; CHAMBERS, P.; GILLESPIE, J.I. Focal changes in nerve, muscle and connective tissue in normal and unstable human bladder. **B.J.U. Int.**, v. 84(9), p. 953-60, 1999.
14. CORTIVO, R.; PAGANO, F.; PASSERRINI, G.; ABATANGELO, G.; CASTELLANI, I. Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. **Br. J. Urol.**, v. 53(2), p. 134-7, 1981.
15. DAYAN, D.; HISS, Y.; HIRSHBERG, A.; BUBIS, J.J.; WOLMAN, M. Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, v. 93(1), p. 27-9, 1989.
16. DEVEAUD, C.M.; MACARAK, E.J.; KUCICH, U.; EWALT, D.H.; ABRAMS, W.R.; HOWARD, P.S. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. **J. Urol.**, v. 160(4), p. 1518-27, 1998.
17. DI FIORI, M.S.H. **Novo atlas de histología**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 8ª ed. 1982. Bexiga - Lâmina 120. p. 241.

18. DIAMOND, D.A.; BAUER, S.B.; DINLENC, C.; HENDREN, W.H.;
PETERS, C.A.; ATALA, A.; KELLY, M.; RETIK, A.B. Normal
urodynamics in patients with bladder exstrophy: are they
achievable? **J. Urol.**, v. 162(3 Pt 1), p. 841-5, 1999.
19. DIXON, J.S.; GOSLING, J.A. Histology and fine structure of the
muscularis mucosae of the human urinary bladder. **J. Anat.**, v.
136(2), p. 265-71, 1983.
20. EWALT, D.H.; HOWARD, P.S.; BLYTH, B.; SNYDER, H.M.;
DUCKETT, J.W.; LEVIN, R.M.; MACARAK, E.J. Is lamina propria
matrix responsible for normal bladder compliance? **J. Urol.**, v.
148(2 Pt 2), p. 544-9, 1992.
21. FONSECA, M.C. Métodos estereológicos em morfometria citológica.
Medicina (Lisboa), v. 2, p. 7-23, 1983.
22. FREEDMAN, A.L.; QURESHI, F.; SHAPIRO, E.; LEPOR, H.;
JACQUES, S.M.; EVANS, M.I.; SMITH, C.A.; GONZALEZ, R.;
JOHNSON, M.P. Smooth muscle development in the obstructed
fetal bladder. **Urology**, v. 49(1), p. 104-7, 1997.

23. GEARHART, J.P. Exstrophy, epispadias, and other bladder anomalies. WALSH, P.C.; RETIK, A.B.; VAUGHAN Jr., E.D.; WEIN, A.J. **Campbell's Urology**, Philadelphia, Saunders, 2002. 8ª ed. v. 3, Cap. 61, p. 2136-96.
24. GEARHART, J.P. The bladder exstrophy-epispadias-cloacal exstrophy complex. GEARHART, J.P.; RINK, R.C.; MOURIQUAND, P.D.E. **Pediatric urology**, Philadelphia, W. B. Saunders, 2001. Cap. 32, p. 511-46.
25. GEARHART, J.P.; PEPPAS, D.S.; JEFFS, R.D. The failed exstrophy closure: strategy for management. **Br. J. Urol.**, v. 71(2), p. 217-20, 1993.
26. GILPIN, S.A.; GOSLING, J.A.; BARNAD, R.J. Morphological and morphometric studies of the human obstructed, trabeculated urinary bladder. **Br.J.Urol.**, v. 57 (5), p. 525-9, 1985.
27. GIRON, A.M. **Reconstrução da extrofia vesical em estágios: tratamento da incontinência urinária por meio da tubulização uretrotrigonal**. Tese (Livre-Docência), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1990.
28. GRADY, R.W.; MITCHELL, M.E. Complete primary repair of exstrophy. **J. Urol.**, v. 162(4), p. 1415-20, 1999.

29. GRADY, R.W.; MITCHELL, M.E. Complete primary repair of exstrophy. Surgical technique. **Urol. Clin. North Am.**, v. 27(3), p. 569-78, 2000.
30. GRADY, R.W.; MITCHELL, M.E. Newborn exstrophy closure and epispadias repair. **World J. Urol.**, v.16(3), .p. 200-4,. 1998.
31. GUNDERSEN, H.J.; BAGGER, P.; BENDTSEN, T.F.; EVANS, S.M.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F.B.; VESTERBY, A.; WEST, M.J. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96(10), p. 857-81, 1988.
32. GUNDERSEN, H.J.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F.B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96(5), p. 379-94, 1988.

33. HABERSTROH, K.M.; KAEFER, M.; RETIK, A.B.; FREEMAN, M.R.; BIZIOS, R. The effects of sustained hydrostatic pressure on select bladder smooth muscle cell functions. **J. Urol.**, v. 162(6), p. 2114-8, 1999.
34. HUSMANN, D.A.; McLORIE, G.A.; CHURCHILL, B.M. Closure of the exstrophic bladder: an evaluation of the factors leading to its success and its importance on urinary continence. **J. Urol.**, v. 142(2 Pt 2), p. 522-4, 1989.
35. INUI, E.; OCHIAI, A.; NAYA, Y.; UKIMURA, O.; KOJIMA, M. Comparative morphometric study of bladder detrusor between patients with benign prostatic hyperplasia and controls. **J. Urol.**, v. 161(3), p. 827-30, 1999.
36. JAFFE, R.; SCHOENFELD, A.; OVADIA, J. Sonographic findings in the prenatal diagnosis of bladder exstrophy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 162(3), p. 675-8, 1990.
37. JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1999. Cap. 19, p. 330-1.
38. JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Pricrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, v. 11(4), p. 447-55, 1979.

39. JUNQUEIRA, L.C.; MONTES, G.S.; MARTINS, J.E.; JOAZEIRO, P.P.
Dermal collagen distribution. A histochemical and ultrastructural study. **Histochemistry**, v. 79(3), p. 397-403, 1983.
40. JUNQUEIRA, L.C.; MONTES, G.S.; SANCHEZ, E.M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, v. 74(1), p. 153-6, 1982.
41. KAPLAN, E.P.; RICHIER, J.C.; HOWARD, P.S.; EWALT, D.H.; LIN, V.K.
Type III collagen messenger RNA is modulated in non-compliant human bladder tissue. **J. Urol.**, v. 157(6), p. 2366-9, 1997.
42. KIM, K.M.; KOGAN, B.A.; MASSAD, C.A.; HUANG, Y.C. Collagen and elastin in the normal fetal bladder. **J. Urol.**; v. 146(2 Pt 2), p. 524-7, 1991a.
43. KIM, K.M.; KOGAN, B.A.; MASSAD, C.A.; HUANG, Y.C. Collagen and elastin in the obstructed fetal bladder. **J. Urol.**, v. 146(2 Pt 2), p. 528-31, 1991b.
44. KOO, H.P.; HOWARD, P.S.; CHANG, S.L.; SNYDER, H.M.; DUCKET, J.W.; MACARAK, E.J. Developmental expression of interstitial collagen genes in fetal bladders. **J. Urol.**, v. 158(3 Pt 1), p. 954-61, 1997.

45. LAI, J.Y.; YOON, C.Y.; YOO, J.J.; WULF, T.; ATALA, A. Phenotypic and functional characterization of in vivo tissue engineered smooth muscle from normal and pathological bladders. **J. Urol.**, v. 168(4 Pt 2), p. 1853-7, 2002.
46. LAIS, A.; PAOLOCCI, N.; FERRO, F.; BOSMAN, C.; BOLDRINI, R.; CAIONE, P. Morphometric analysis of smooth muscle in the exstrophy-epispadias complex. **J. Urol.**, v. 156(2 Pt 2), p. 819-21, 1996.
47. LANDAU, E.H.; JAYANTHI, V.R.; CHURCHILL, B.M.; SHAPIRO, E.; GILMOUR, R.F.; KHOURY, A.E.; MACARAK, E.J.; McLORIE, G.A.; STECKLER, R.E.; KOGAN, B.A. Loss of elasticity in dysfunctional bladders: urodynamic and histochemical correlation. **J. Urol.**, v. 152(2 Pt 2), p. 702-5, 1994.
48. LEE, B.R.; PERLMAN, E.J.; PARTIN, A.W.; JEFFS, R.D.; GEARHART, J.P. Evaluation of smooth muscle and collagen subtypes in normal newborns and those with bladder exstrophy. **J. Urol.**, v. 156(6), p. 2034-6, 1996.
49. LEPOR, H.; JEFFS, R.D. Primary bladder closure and bladder neck reconstruction in classical bladder exstrophy. **J. Urol.**, v. 130(6), p. 1142-5, 1983.

50. LEPOR, H.; SUNARYADI, I.; HARTANTO, V.; SHAPIRO, E.
Quantitative morphometry of the adult human bladder. **J. Urol.**, v. 148(2 Pt 1), p. 414-7, 1992.
51. LOPEZ DE LEON, A.; ROJKIND, M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin embedded sections. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 33(8), p. 737-43, 1985.
52. MACARAK, E.J.; HOWARD, P.S. The role of collagen in bladder filling. In. BASKIN, L.S.; HOWARD, P. S. **Advances in bladder research**. New York. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. 1999. Cap. 17, p. 215-23.
53. MACHADO, M.G.; YOO, J.J.; ATALA, A.. Defunctionalized bladders: effects before and after refunctionalization in an animal model. **J. Urol.**, v. 164(3 Pt 2), p. 1002-7, 2000.
54. MIRK, P.; CALISTI, A.; FILENI, A. Prenatal sonographic diagnosis of bladder exstrophy. **J. Ultrasound Med.**, v. 5(5), p. 291-3, 1986.
55. MONTES, G.S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell. Biol. Int.**, v. 20(1), p. 15-27, 1996.

56. 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.**, v. 154(1), p. 251-6, 1995.
57. MURPHY, W.M. Diseases of the urinary bladder, urethra, ureters and renal pelvis. MURPHY, W.M. **Urological pathology**. Philadelphia. W. S. Saunders. 1994. Cap. 2 p. 34-147.
58. NELSON, C.E.; CROFT, W.A.; NILSSON, T. Characterization of different regions of the normal human urinary bladder by means of scanning electron microscopy. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, v. 13(1), p. 23-9, 1979.
59. NEWMAN, J.; ANTONAKOPOULOS, G.N. The fine structure of the human fetal urinary bladder. Development and maturation. A light, transmission and scanning electron microscopic study. **J. Anat.**, v. 166, p. 135-50, 1989.
60. OESTERLING, J.E.; JEFFS, R.D. The importance of a successful initial bladder closure in the surgical management of classical bladder exstrophy: analysis of 144 patients treated at the Johns Hopkins Hospital between 1975 and 1985. **J. Urol.**, v. 137(2), p. 258-62, 1987.

61. PEPPAS, D.S.; TCHETGEN, M.B.; LEE, B.R.; JEFFS, R.D.;
GEARHART, J.P. A quantitative histological analysis of the
bladder in classical bladder exstrophy in various stages of
reconstruction utilizing color morphometry. In. GEARHART, J.P.;
MATHEWS, R. **The Exstrophy-Epispadias complex**. New York,
Kluwer Academic/ Plenum Publisher, 1999. Cap. 7, p. 41-7.
62. PIERARD, G.E. Sirius red polarization method is useful in visualize
the organization of connective tissues but not the molecular
composition of their fibrous polymers. **Matrix**, v. 9(1), p. 68-71,
1989.
63. POLI-MEROL, M.L.; WATSON, J.A.; GEARHART, J.P. New basic
science concepts in the treatment of classic bladder exstrophy.
Urology, v. 60(5), p. 749-55, 2002.
64. PUCHTLER, H.; MELOAN, S.N.; WALDROP, F.S. A picro-dye
reactions for collagens quantitative? Chemical and histochemical
considerations. **Histochemistry**, v. 88, p. 243-56, 1988.
65. RANSLEY, P.G.; KAJBAFZADEH, A.M.; QUINN, F.M. Radical single
stage reconstruction in failed exstrophy. **J. Urol.**, v. 154(2Pt2), p.
868-70, 1995.

66. ROSS, M.H.; ROMRELL, L.J. **Histologia: texto e atlas**. Madrid, Médica Panamericana, 1993. Cap 19, p. 545-8.
67. SARTORI, M.G.F.; GIRÃO, M.J.B.; SIMÕES, M.J.; SARTORI, J.P.; BARACAT, E.C.; RODRIGUES DE LIMA, G. Quantitative evaluation of collagen and muscle fibers in the lower urinary tract of castrated and under-hormone replacement female rats. **Clin. Exp. Obstet. Gynecol.**, v. 23(2), p. 92-6, 2001.
68. SHAPIRO, E.; BECICH, M.J.; PERLMAN, E.; LEPOR, H. Bladder wall abnormalities in myelodysplastic bladders: a computer assisted morphometric analysis. **J. Urol.**, v. 145(5), p. 1024-9, 1991.
69. SHAPIRO, E.; LEPOR, H.; JEFFS, R.D. The inheritance of the exstrophy-epispadias complex. **J. Urol.**, v. 132(2), p. 308-10, 1984.
70. SLAUGHENHOUP, B.L.; MATHEWS, R.I.; PEPPAS, D.S.; GEARHART, J.P. A large animal model of bladder exstrophy: observations of bladder smooth muscle and collagen content. **J. Urol.**, v. 162(6), p. 2119-22, 1999.
71. USHIKI, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 65(2), p. 109-26, 2002.

72. WIED, G.L.; BARTELS, P.H.; BIBBO, M.; DYTCH, H.E. Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. **Hum. Pathol.**, v. 20(6), p. 549-71, 1989.
73. YAO, L.Y.; TEKGUL, S.; KIM, K.K.; LI, H.; MITCHELL, M.E.; CARR, M. C. Developmental regulation of collagen differential expression in the rabbit bladder. **J. Urol.**, v. 156(2 Pt 2), p. 565-70, 1996.