

CLAUDIA CRISTINA TAKANO

GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS NA URETRA DE RATAS
CONSOANTE A PREENHEZ, TIPO DE PARTO E TRAUMA VAGINAL

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências

São Paulo
2006

Takano, Claudia Cristina

Glicosaminoglicanos sulfatados na uretra de ratas consoante a prenhez, o tipo de parto e trauma vaginal / Claudia Cristina Takano.--São Paulo, 2006.
xvi, 72f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação do Departamento de Ginecologia

Título em inglês: Glycosaminoglicans in urethra of rats according to pregnancy, delivery and vaginal trauma

1.Incontinência urinária de esforço 2.Matriz extracelular
3.Glicosaminoglicanos

CLAUDIA CRISTINA TAKANO

GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS NA URETRA DE RATAS
CONSOANTE A PREENHEZ, TIPO DE PARTO E TRAUMA VAGINAL

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Orientador
Prof Dr. Manoel J. B. C. Girão

Co-orientadores
Profª Drª Marair Gracio F. Sartori
Profª Drª Helena B. Nader

São Paulo
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA

CHEFE DO DEPARTAMENTO
PROF. DR. AFONSO CELSO P. NAZÁRIO

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROF. DR. VILMON DE FREITAS

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	iv
Lista de figuras.....	vii
Lista de gráficos.....	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xv
1 Introdução.....	1
2 Proposição.....	13
3 Casuística e Métodos.....	15
3.1 Casuística	16
3.2 Descrição dos procedimentos.....	17
3.3 Processamento do Material	20
3.4 Extração dos glicosaminoglicanos sulfatados.....	21
3.5 Caracterização e quantificação dos GAGs	21
3.6 Método Estatístico	24
4 Resultados.....	25
4.1 Considerações iniciais	26
4.2 Análise dos dados.....	26
5 Discussão	44
6 Conclusões.....	51
7 Anexos	53
8 Referências.....	58
9 Abstract.....	71

Dedicatória

Este trabalho é dedicado:

Aos meus pais,
José e Teruka,
às minhas irmãs Érica e Luciana,
e ao Marcelo,
por todo amor, carinho e
incentivo.

Ao Prof. Dr. Manoel João
Batista Castello Girão, pela
orientação deste trabalho e
pela participação
fundamental em minha
formação em Ginecologia. É
para mim um exemplo de
extrema dedicação,
competência e generosidade.

À Prof^a Dr^a Marair Gracio
Ferreira Sartori, agradeço
todo o apoio que sempre
recebi e sinto-me privilegiada
em contar com sua
orientação e incentivo.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Geraldo Rodrigues de Lima, pelo exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat; admiro sua competência e seriedade e agradeço o incentivo.

À Profa. Dra. Helena B. Nader, pela co-orientação deste trabalho. Seus conhecimentos e sua dedicação são fundamentais para a integração entre a Ginecologia e a Biologia Molecular.

Às Biomédicas Elsa Yoko Kobayashi e Marie Doki Nogueira e ao Dr. João Roberto Maciel Martins, meu agradecimento especial pela orientação e auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos amigos pós-graduandos Leonardo R. P. S. Bezerra, Eliana V.M. Zucchi e José Maria Ruano que com dedicação, afimco e bom humor, compartilharam todas as fases da elaboração deste trabalho, tornando-o possível.

Aos meus amigos do Setor de Uroginecologia e Cirurgia Vaginal da UNIFESP-EPM, pelo apoio em todos os momentos: Raquel M. Arruda, João Paulo Sartori, Sérgio B. Martins, Rodrigo de A. Castro, Emerson de Oliveira, Maíta Poli de Araújo, Mauro Suguita, Letícia M. de Oliveira, Zsuzsanna I. J. di Bella e Léa Mina Kati.

À todos os pós-graduandos do Setor de Uroginecologia, especialmente ao grupo B: Eliana, Emerson, Maíta, Simone, Allison, Andrea, Aline e Sheila.

À Enf^a Eliana Fonseca e às funcionárias Dirce e Luciene, pela ajuda nos momentos necessários.

À Dra Valderez B. Valero Lapchik, coordenadora do Biotério do Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular e à todos os funcionários, pelo inestimável auxílio durante a realização dos experimentos.

Às funcionárias do Departamento de Ginecologia Zélia Maria Gomes Macedo, Valéria Miranda dos Santos Medina, Felipe de Oliveira Taborda e especialmente à Karim Santos Martins, pela ajuda e atenção que sempre me dispensaram.

À Claudia G. N. Barsottini, agradeço o apoio e amizade e o auxílio na elaboração e formatação da tese.

Lista de figuras

Figuras

Figura 1 - Matriz extracelular de células animais.	5
Figura 2 - Unidade estrutural dos glicosaminoglicanos	7
Figura 3 - Fotografia do parto cesáreo	19
Figura 4 - Desenho esquemático representando a insuflação intravaginal com balão	19
Figura 5 - Fotografia do posicionamento do balão após a insuflação intravaginal.....	20
Figura 6 - Posicionamento das ratas na borda da bancada após a introdução do balão intravaginal.	20
Figura 7- Lâminas de eletroforese em gel de agarose dos GAGs da uretra	23

Lista de gráficos

Gráficos

Gráfico 1- Quantificação de GAGs totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1.....	28
Gráfico 2- Quantidade de dermatam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1.....	30
Gráfico 3 - Quantidade de heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1.....	32
Gráfico 4 – Quantidade de GAGs totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2.....	35
Gráfico 5 – Quantidade de dermatam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2.....	37
Gráfico 6 - Quantidade de heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2.....	39
Gráfico 7- Quantidade de GAGs totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados nos tempos 1 e 2.....	40
Gráfico 8 - Quantidade de dermatam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados nos tempos 1 e 2.....	42
Gráfico 9 – Quantidade heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados nos tempos 1 e 2.....	43

Lista de tabelas

Tabelas

Tabela 1- Constituição dos grupos estudados	17
Tabela 2 – Quantidade de GAGs totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1	27
Tabela 3 – Quantidade de dermatam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1	29
Tabela 4 – Quantidade de heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1	31
Tabela 5 - Quantidade de GAGs totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2	33
Tabela 6 – Quantidade de dermatam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2	36
Tabela 7 – Quantidade de heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2	38

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

AH	Ácido hialurônico
CS	Condroitim sulfato
DS	Dermatam sulfato
HS	Heparam sulfato
GAG	Glicosaminoglicanos
GAGs	Glicosaminoglicanos sulfatados
IUE	Incontinência Urinária de Esforço
MEC	Matriz extracelular

Resumo

Proposição: Analisar o perfil dos glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) na uretra de ratas nuligestas ou prenhas submetidas a cesárea, parto normal ou trauma simulado de parto com balão intravaginal, comparando os resultados obtidos após quatro dias e doze semanas dos procedimentos. **Métodos:** 110 ratas foram distribuídas em onze grupos: Grupos A1 e A2 - ratas nuligestas; Grupos B1 e B2 - ratas nuligestas submetidas a insuflação vaginal; Grupos C1 e C2 - ratas submetidas a cesárea; Grupos D1 e D2 - ratas submetidas a cesárea seguida de insuflação vaginal; Grupos E1 e E2 - ratas prenhas que evoluíram espontaneamente para parto vaginal; Grupo F - ratas sacrificadas no 20º dia de prenhez. Os animais dos grupos A1, B1, C1, D1 e E1 foram sacrificados após quatro dias e, os dos grupos A2, B2, C2, D2 e E2, após doze semanas dos procedimentos. Os GAGs condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS) foram extraídos por proteólise e determinados por densitometria após migração eletroforética em gel de agarose. **Resultados:** Observou-se maior expressão de DS em relação ao HS em todos os grupos. Detectou-se CS apenas no grupo de ratas prenhas (Grupo F). Na avaliação quatro dias após o trauma, observou-se que, nas ratas prenhas (Grupo F), houve quantidade maior de GAGs totais em relação às ratas dos grupos B1, C1, D1 e E1; maior quantidade de HS em comparação às ratas dos grupos A1, B1, C1, D1 e E1 e de DS em relação às do grupo E1. Na avaliação após doze semanas, observou-se quantidade maior de GAGs totais, DS e HS nas ratas do grupo cesárea com trauma (D2) em relação às dos grupos A2, B2, C2 e E2. **Conclusões:** Houve aumento da quantidade de GAGs totais, DS e HS na uretra de ratas submetidas a trauma com insuflação vaginal após cesárea em relação às ratas nuligestas com ou sem insuflação, ratas pós-cesárea sem insuflação e pós-parto natural, avaliadas doze semanas após o procedimento. Na análise quatro dias após os procedimentos não houve diferença na quantidade de GAGs entre todos os grupos, exceto pelo grupo de ratas prenhas, que apresentou quantidade significativamente maior de GAGs.

1 Introdução

A Sociedade Internacional de Continência define incontinência urinária como qualquer perda involuntária de urina. A forma mais comum é a incontinência urinária de esforço (IUE), que apresenta, como sintoma, queixa de perda involuntária de urina ao esforço, exercício, tosse ou espirro. Caracteriza-se pela observação urodinâmica de perda involuntária de urina durante aumento de pressão abdominal, na ausência de contração do detrusor (Abrams et al, 2002).

É uma afecção que leva a importantes repercussões sociais, emocionais e econômicas, com grande impacto na qualidade de vida da mulher (Diokno et al, 1986; Burgio et al, 1991; Roberts et al, 1998).

Dados de prevalência variam conforme a população estudada e a definição de incontinência urinária utilizada, mas estima-se que acometa no mínimo 15% das mulheres entre 20 e 60 anos. Em nosso meio, cerca de 10% das pacientes que procuram os ambulatórios de Ginecologia têm como queixa principal a perda urinária (Diokno et al, 1986; Ribeiro et al, 1990; Burgio et al, 1991; Foldspang et al, 1992; Wilson et al, 1996). Estes valores podem ainda estar subestimados pela relutância das mulheres em admitir este sintoma (Cardoso, 1999).

Estudos sobre o impacto econômico da incontinência urinária são escassos, e a maior parte realizada nos Estados Unidos, onde estima-se que os custos anuais cheguem a 26 bilhões de dólares (Fantl et al, 1996; Wagner, Hu, 1998).

A etiologia da incontinência urinária de esforço é multifatorial; dentre os fatores envolvidos destacam-se o trauma de parto, o envelhecimento e o hipoestrogenismo. Outros fatores etiológicos conhecidos são obesidade, tosse crônica, fumo e obstipação intestinal (Lin et al, 1998).

O mecanismo de continência depende basicamente de quatro fatores: mecanismo esfínteriano uretral intrínseco e extrínseco, posicionamento adequado do colo vesical, ancorado ao osso púbico (pelos ligamentos pubouretrais) e à parede lateral pélvica, e inervação intacta dessas estruturas (Summit et al, 2000).

Em outras palavras, Ulmstem (1997) afirma que a continência urinária depende da integridade das estruturas que mantêm a uretra e o colo vesical

em sua posição anatômica. Assim, segundo a teoria integral proposta por Petros e Ulmstem (1999), a tração ântero-superior da uretra, exercida pelos ligamentos pubo-uretrais, parede vaginal sub-uretral e músculos pubo-cocígeos, fecha a uretra prevenindo a perda urinária ao esforço. Se há lesão deste mecanismo, predomina a tração pósterio-inferior da uretra, exercida pelo músculo levantador do ânus. Desta forma, a uretra não é efetivamente fechada e ocorre a perda de urina durante o esforço.

Além da integridade destas estruturas, há fatores adicionais envolvidos na ftopatologia da IUE na mulher. Os defeitos na uretra, isto é, nos músculos, tecido conjuntivo, mucosa e vasos peri-uretrais, resultará em diminuição de seu tônus. Se os efeitos compensatórios das estruturas extra-uretrais não forem suficientes, ocorrerá perda urinária (Ulmstem, 1997; Petros, Ulmstem, 1999). Contribuem para a manutenção da pressão intra-uretral a musculatura estriada da uretra e do assoalho pélvico, os vasos da submucosa uretral e a musculatura lisa e tecidos conjuntivos uretral e para-uretral, sendo que cada um desses componentes é responsável por um terço da pressão intra-uretral (Rud et al, 1980).

Defeitos no tecido conjuntivo que une todas estas estruturas também podem levar ao fechamento inadequado da uretra. Recentes estudos têm demonstrado diferenças qualitativas e quantitativas no tecido conjuntivo de mulheres continentas e incontinentes (Ulmstem et al, 1987; Falconer et al, 1994). Além disso, o processo de envelhecimento e o hipoestrogenismo também podem causar deterioração deste tecido (Ulmstem, 1997).

Alterações da inervação têm impacto em muitas das estruturas descritas, podendo comprometer o tônus dos músculos do assoalho pélvico, e dos músculos estriado e liso do esfíncter uretral (Ulmstem, 1997).

O trauma de parto parece ser o principal fator envolvido no desenvolvimento da incontinência urinária de esforço. Vários autores encontraram associação entre IUE, gravidez e paridade (Foldspang et al, 1992; Viktrup et al, 1992; Rortveit et al, 2001; Rortveit et al, 2003).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado estreita relação entre múltiplos partos vaginais e IUE. Foldspang et al (1992), em estudo com 3114 mulheres, atribuíram a perda urinária aos partos vaginais em dois terços das mulheres incontinentes.

Rortveit et al (2001) encontraram forte associação entre IUE e paridade em estudo com 27.900 mulheres, com risco relativo de 2,2 no grupo de primíparas e de 3,3 no grupo de grandes múltiparas, com idade entre 20 e 34 anos. Analisando as mulheres consoante o tipo de parto, os mesmos autores encontraram risco maior de IUE entre as que tiveram apenas parto cesáreo, em comparação com as nuligestas, e risco ainda maior nas que tiveram apenas partos vaginais. Demonstraram, assim, que não só a gravidez, mas também o trauma de parto aumenta o risco de IUE (Rortveit et al, 2003).

Viktrup et al (1992), em estudo longitudinal com 305 mulheres, observaram 32% de IUE durante a gravidez, com remissão deste sintoma na maioria das mulheres após três meses. Entretanto, após 1 ano, 3% das mulheres apresentavam ainda incontinência urinária, sendo que em mais da metade o sintoma havia se iniciado após o parto.

Embora haja resultados controversos na literatura sobre a influência da duração do segundo estágio do trabalho de parto e do tamanho da circunferência cefálica no desenvolvimento da IUE, a ocorrência de lesão perineal, o uso de fórcepe e o parto de recém-nascidos macrossômicos parecem constituir fatores contribuintes adicionais (Dimpfl et al, 1992; Viktrup et al, 1992; Jackson et al, 1995; Dannecker, Anthuber, 2000).

Todas as estruturas envolvidas no mecanismo de continência podem ser lesadas pelo trauma de parto. Estudos tentando caracterizar estas alterações têm sido realizados por diversos autores. Assim, após partos vaginais observaram-se diminuição da pressão máxima de fechamento uretral e comprimento funcional da uretra (Van Geelen et al, 1982), maior mobilidade do colo vesical (Peschers et al, 1996) e denervação dos músculos do assoalho pélvico, comprovados por estudos neurofisiológicos e histomorfométricos (Snooks et al, 1984; Gilpin et al, 1989; Smith et al, 1989; Allen et al, 1990; Sultan et al, 1994)

Fator fundamental para a manutenção do mecanismo esfinteriano uretral é a estabilidade estrutural do tecido conjuntivo (DeLancey, 1994; Pregazzi et al, 2002), tanto na sua composição celular como nos componentes da matriz extracelular (Petros, Ulmsten, 1990; Norton, 1993; Falconer et al, 1998a e 1998b; Fitzgerald et al, 2000).

A matriz extracelular (MEC) é composta de moléculas protéicas alongadas que se unem formando estruturas fibrilares (colágeno e elastina) e moléculas que não formam fibrilas (fibronectina e laminina), além de um gel hidrofílico, semifluido de glicosaminoglicanos e proteoglicanos (Yurchenco e O'Rear, 1994; Robbins, 1999) (Figura 1).

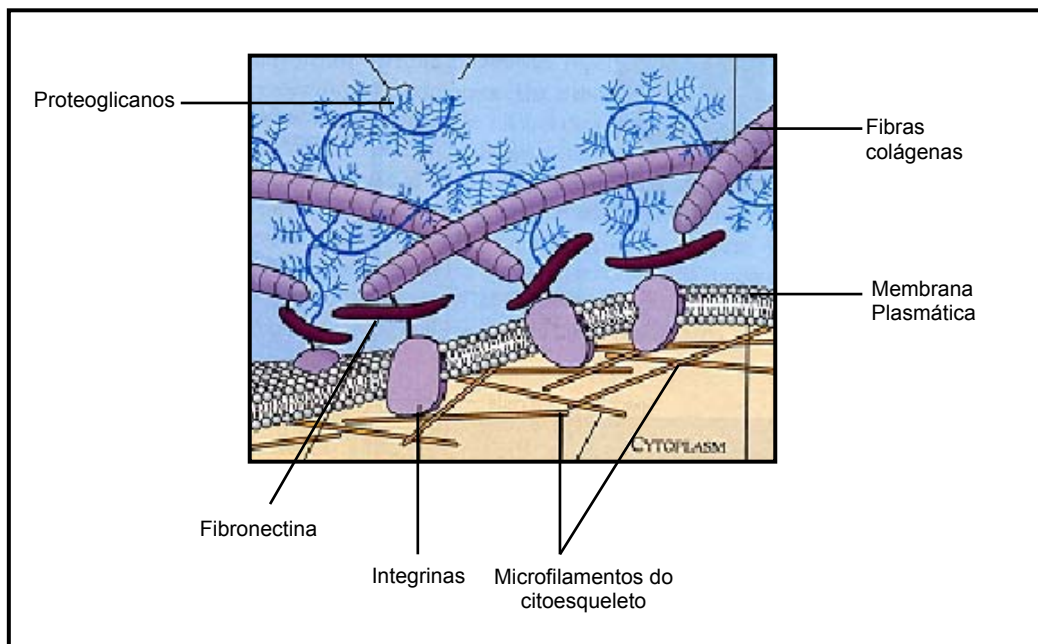


Figura 1 - Matriz extracelular de células animais. Adaptado de www.uwinnipeg.ca/celltour (2004).

A estrutura e distribuição dos componentes da matriz extracelular determinam as propriedades biomecânicas de um tecido (Robbins et al, 1999). A MEC desempenha, ainda, papel ativo e complexo na regulação do comportamento das células, influenciando diretamente os processos de diferenciação, migração, adesão, proliferação e modulação celular, entre outros (Alberts et al, 1997).

O colágeno e a elastina são responsáveis pelo arcabouço estrutural e elástico dos tecidos. A fibronectina contribui para a adesão entre a matriz extracelular e as células, enquanto a laminina participa da constituição da membrana basal. Os glicosaminoglicanos e os proteoglicanos formam um gel hidrófilo semifluido que permite a circulação de nutrientes, hormônios e outros mensageiros químicos nos tecidos conjuntivos (Robbins et al, 1999).

Os proteoglicanos são macromoléculas formadas por um esqueleto protéico ao qual estão covalentemente ligadas uma cadeia de polissacarídeos. Exercem inúmeras funções biológicas, dependendo do seu esqueleto protéico, da estrutura química do(s) glicosaminoglicano(s) covalentemente ligado(s), do número de cadeias, do grau de sulfatação e de sua localização. Atuam como organizadores teciduais, influenciam o crescimento celular e a maturação dos tecidos especializados, têm importante papel como filtro biológico, regulam a hidrólise do colágeno, afetam o crescimento e a invasão tumoral, entre outras funções. Alterações na organização dos proteoglicanos podem influenciar profundamente a organização dos tecidos (Esko, 1991).

Glicosaminoglicanos (GAG) são polímeros lineares de açúcares constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas, compostas por uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) e um açúcar não nitrogenado (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico ou D-galactose), unidos entre si por ligações glicosídicas. Estes polímeros possuem alta densidade de cargas negativas, conferidas pelos grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos e/ou grupamentos sulfatos (Dietrich, 1984).

Os glicosaminoglicanos diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não nitrogenado, quanto ao grau de sulfatação e à posição em que são sulfatados, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter e intradissacarídica (Dietrich, 1984; Esko, 1991; Bernfield et al, 1992; Couchman et al, 1993; Iozzo, 1998; Porcionatto et al, 1998 e 1999). Todos, com exceção do ácido hialurônico, encontram-se ligados covalentemente a um esqueleto protéico, formando assim os proteoglicanos (PG) (Esko, 1991).

Os principais glicosaminoglicanos são: condroitim 4-sulfato (CS), condroitim 6-sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS), heparina (Hep), queratam sulfato (QS) e ácido hialurônico (AH). Os glicosaminoglicanos estão representados na Figura 2 (Mathews et al, 1975; Dietrich, 1984; Kjellen, Lindahl, 1991).

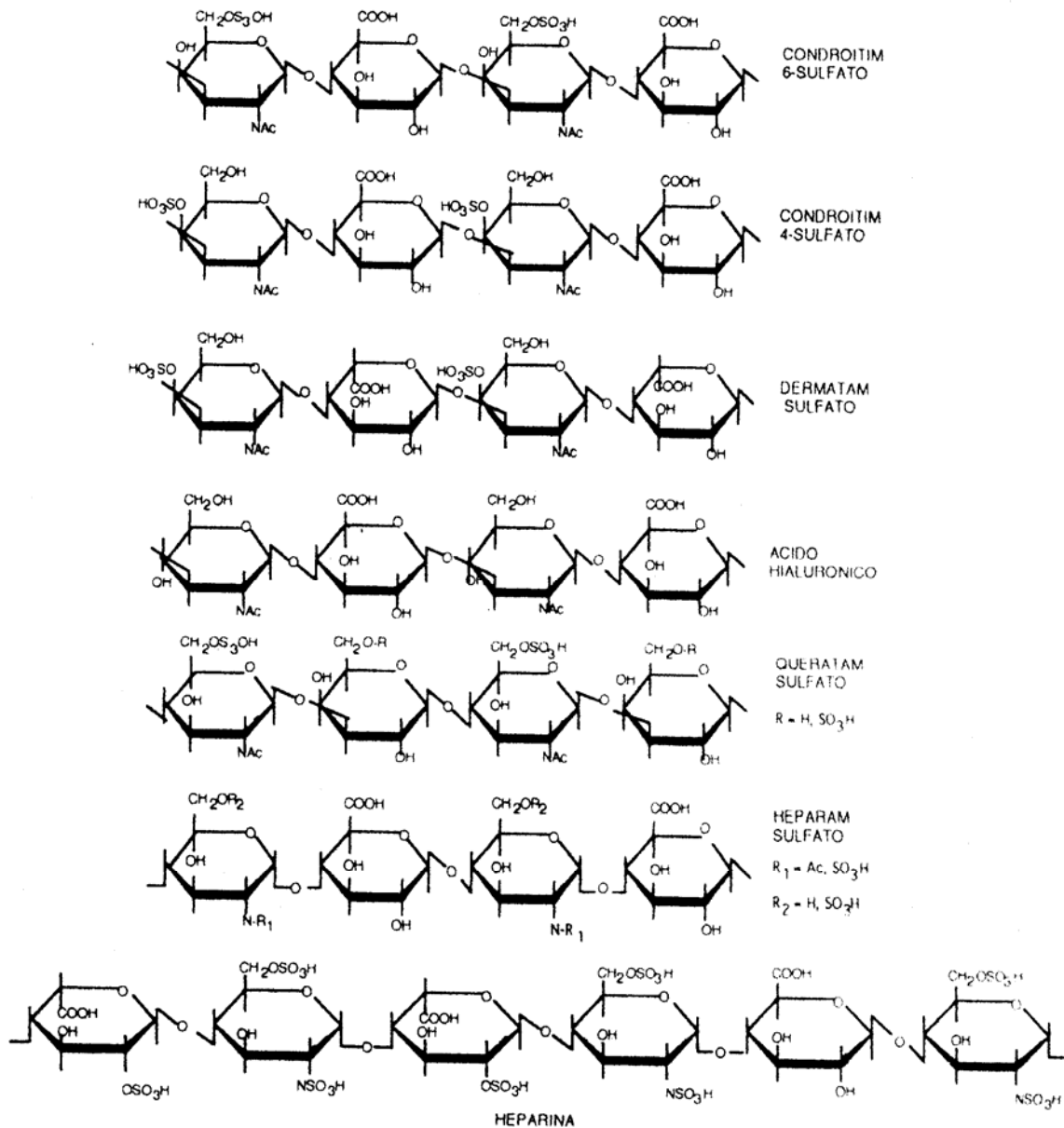


Figura 2 - Unidade estrutural dos glicosaminoglicanos

O ácido hialurônico é o único glicosaminoglicano que não apresenta éster de sulfato em sua estrutura e que não está covalentemente ligado a um esqueleto protéico. É normalmente encontrado em fluidos como o humor vítreo e o líquido sinovial, onde sua propriedade de reter água concede à matriz consistência de gel e a torna altamente resistente a forças compressivas (Jackson et al, 1982; Fraser, Laurent, 1997). Tem sido relacionado com a indução da agregação celular em diferentes tipos celulares e parece estar implicado, também, com a proliferação, migração e adesão celular (Fraser, Laurent, 1997).

O condroitim sulfato é o principal componente da matriz das cartilagens, correspondendo a 10% de seu peso seco. Acredita-se que sua função possa estar relacionada com a retenção de água, provavelmente envolvendo a manutenção da integridade dos tecidos sujeitos a altas pressões (Dietrich et al, 1978; Caplan, 1984; Dietrich, 1984; Peters et al, 1997; Wolanska et al, 1998; Bali et al, 2001). Na cartilagem, reduz a apoptose, aumenta a atividade anabólica dos condrócitos e limita a excessiva degradação da matriz, mantendo sua integridade. Estudos de diversos tecidos neoplásicos mostraram aumento de condroitim sulfato na matriz extracelular, porém, o significado desse incremento ainda não foi devidamente esclarecido (Dietrich et al, 1978; Dietrich et al, 1980, Dietrich, 1984; Jeronimo et al, 1994; Martins, 1996; Wolanska et al, 1998; Martins et al, 2000; Berto et al, 2001).

O dermatam sulfato encontra-se nos tecidos conjuntivos densos, como pele e tendões. Sua função relaciona-se à organização, velocidade de deposição e manutenção das fibrilas do colágeno, desempenhando papel importante na manutenção da integridade estrutural dos tecidos (Sampaio et al, 1981; Scott, Oxford, 1981; Brown, Vogel, 1989; Iozzo, 1998; Merle et al, 1999). Expresso na pele, é liberado em grandes concentrações durante o reparo de ferimentos, tornando-se particularmente importante na avaliação dos fatores de crescimento ativos na cicatrização de feridas (Penc et al, 1998).

O heparam sulfato está localizado nas membranas plasmáticas e na matriz extracelular (Dietrich, Armelin, 1978; Dietrich, Montes de Oca, 1978; Kanwar, Farquhar, 1979; Dietrich, 1984; Salmivirta et al, 1996), regulando as interações entre as células e o seu meio, importantes para o crescimento e o desenvolvimento normais e para a manutenção das funções celulares. Diversas evidências sugerem que desempenhe importante papel no reconhecimento e adesão celular, no controle do crescimento e na angiogênese (Dietrich et al., 1977; Dietrich, Armelin, 1978; Dietrich, 1984; Gambarini et al, 1993; Tovari et al, 1997; Wolanska et al, 1998; Porcionatto et al, 1999; Nurcombe et al, 2000; Wielenga et al, 2000; Franco et al, 2001; Moreira et al, 2004; Lopes et al, 2006).

Os elementos da matriz extracelular nos tecidos urogenitais de mulheres com incontinência urinária e prolapso genital têm sido avaliados em várias

publicações, sendo o colágeno o componente mais estudado (Rechberger et al, 1993; Bergman et al, 1994; Keane et al, 1998; Falconer et al, 1998a e 1998b; Takano et al, 2001; Barbiero et al, 2003).

Assim, alguns estudos revelaram alterações do colágeno, com diminuição da sua quantidade na fáscia véscico-vaginal (Rechberger et al, 1993), nos ligamentos útero-sacrais e redondo, na pele do períneo (Bergman et al, 1994) e no epitélio vaginal peri-uretral (Keane et al, 1997) de mulheres incontinentes. Falconer et al (1998a), ao contrário, encontraram maior quantidade de fibras colágenas no tecido conectivo para-uretral das mulheres incontinentes. Cumpre ressaltar que houve diferença entre os tecidos analisados e a população avaliada nestes estudos.

Em relação ao prolapso genital, Jackson et al (1996) registraram menor quantidade de colágeno no epitélio vaginal de mulheres no menacme com prolapso genital. Takano et al (2001) relataram menor proporção de colágeno no paramétrio de mulheres com prolapso uterino, tanto no menacme como na pós-menopausa. Não encontraram, porém, diferenças na cúpula vaginal. Já Barbiero et al (2003) não observaram diferenças significativas na quantidade de colágeno tipo I no paramétrio de mulheres com e sem prolapso uterino, na pré ou na pós-menopausa. Porém, verificaram alteração na disposição dessas fibras em pacientes com prolapso, que se achavam mais curtas, delgadas e dispostas de maneira desordenada.

Embora mais escassos, alguns estudos analisaram os proteoglicanos e glicosaminoglicanos sulfatados nos tecidos urogenitais (de Deus et al, 2003; Kati, 2004; Bezerra et al, 2004; Feldner et al, 2006; Mitrano, 2006,)

Em estudo experimental, De Deus et al (2003) notaram, na bexiga de ratas castradas, que a quantidade de GAGs totais e HS diminuiu, enquanto a de DS foi significativamente maior em relação às ratas não castradas. Mitrano, em 2006, descreveu diferenças nos tecidos vesical e uretral de ratas com a prenhez, com redução dos níveis de GAGs totais na bexiga e aumento dos GAGs totais na uretra ao final da prenhez.

Em estudo realizado em nosso meio, avaliando mulheres com prolapso genital, Kati (2004) observou que o estágio do prolapso uterino e o estado hormonal não alteraram a quantidade de GAGs totais, heparam sulfato e

dermatam sulfato no paramétrio e na cúpula vaginal. Já Bezerra et al (2004) encontraram menor quantidade de GAGs totais, condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato no tecido vaginal de mulheres na pós-menopausa, principalmente nos casos com prolapso genital em estádios avançados.

Em um dos poucos estudos relacionando a matriz extracelular e a incontinência urinária, Feldner et al (2006) analisaram a quantidade de glicosaminoglicanos no tecido peri-uretral de mulheres com e sem incontinência urinária. Detectaram maior quantidade de dermatan sulfato nas mulheres incontinentes.

Como se vê, os estudos demonstram que a incontinência urinária está relacionada com alterações teciduais na uretra, vagina, fâscias e músculos do assoalho pélvico. Não está, entretanto, definido o papel preciso da gravidez e do parto na sua etiopatogenia, não sendo possível atribuir a uma única causa o desenvolvimento da IUE em determinada paciente.

Existe, ainda, dificuldade de obtenção de material para avaliar os danos teciduais causados pelo trauma de parto em estudos com mulheres. Assim, as pesquisas em humanos têm sido limitadas a avaliações histopatológicas e neurofisiológicas dos tecidos adjacentes ao trato urogenital.

Nos últimos anos, alguns autores têm utilizado modelo animal de trauma de parto simulado. Este modelo, descrito inicialmente por Lin et al, em 1998, permite analisar os efeitos da prolongada dilatação e compressão vaginal nos tecidos neuro-muscular e conjuntivo.

Lin et al (1998) avaliaram as alterações funcionais, anatômicas, bioquímicas e histológicas do trato genito-urinário de ratas virgens quatro semanas após insuflação vaginal. Após o procedimento, os autores realizaram enchimento vesical em todas as ratas, e determinaram a capacidade vesical máxima pelo volume infundido até que houvesse saída de líquido pelo meato uretral. Realizaram então enchimento vesical com metade da capacidade vesical aferida e verificaram se ocorria perda de líquido pelo meato uretral, após provocarem espirro com colocação de uma extremidade do bigode da rata em sua narina. Concluíram que o trauma vaginal causou incontinência urinária em cerca de metade das ratas, além de aumento do hiato genital. Ocorreu também elevação das enzimas creatinofosfoquinase e desidrogenase láctica, alteração da forma e do tamanho das fibras musculares, necrose,

degeneração e alteração da relação fibras I/II do músculo levantador do ânus. Notaram, também, diminuição dos músculos lisos e estriados peri-uretrais e danos neurais, evidenciados por diminuição das células ganglionares no plexo neural póstero-lateral da vagina.

Kuo, em 2002, estudando ratas submetidas a trauma vaginal, concluiu que tanto o trauma único como o múltiplo promoveu lesão dos músculos e nervos peri-uretrais, ocasionando diminuição da pressão de perda nestas ratas em comparação ao grupo controle. Já Cannon et al, no mesmo ano, compararam a distensão vaginal intermitente, por tempo curto ou prolongado; encontraram apenas no último grupo diminuição da pressão de perda e significativa ruptura e afinamento das fibras musculares estriadas uretrais.

Poucos autores estudaram as alterações da insuflação vaginal em ratas prenhas. Sievert et al (2001) notaram aumento da taxa de incontinência urinária em ratas submetidas a insuflação após o parto, e em ratas submetidas à insuflação e ooforectomia, mas não em ratas após parto vaginal sem insuflação, com ou sem ooforectomia. Nestes mesmos grupos encontraram, também, alterações ultra-estruturais e imunohistoquímicas no músculo liso da uretra e da bexiga. Estas avaliações foram realizada 8 semanas após o trauma.

Resplande et al, em 2002, também estudaram os efeitos da insuflação vaginal associada à ooforectomia em ratas. Nove meses após os procedimentos observaram diminuição significativa da pressão máxima de fechamento uretral e aumento de células apoptóticas na submucosa uretral no grupo de estudo. Encontraram, também, à microscopia eletrônica do músculo liso uretral, alterações na forma das células, aumento do espaço intercelular com maior depósito de colágeno e degenerações mitocondriais.

Rocha, em 2004, comparou ratas virgens submetidas ou não a trauma vaginal, ratas após parto normal e parto cesáreo seguidos ou não de trauma vaginal, e ratas prenhas. Em todos os grupos em que houve parto normal ou insuflação vaginal, o autor observou, após quatro semanas, diminuição das fibras nervosas e musculares e aumento de fibras colágenas e elásticas da uretra.

Damaser et al (2003) compararam a pressão de perda e a degeneração nervosa uretral em ratas submetidas a distensão vaginal e lesão do pudendo (por meio de compressão direta). Nos dois grupos houve diminuição

significativa da pressão de perda, assim como maior quantidade de feixes nervosos com degeneração à microscopia eletrônica, quando comparados com o grupo controle. Concluíram que o nervo pudendo é vulnerável, podendo ser lesado durante o modelo de distensão vaginal com balão.

Bezerra (2006) comparou a quantidade de glicosaminoglicanos sulfatados e de ácido hialurônico na uretra de ratas prenhas, ratas nuligestas e pós cesárea submetidas ou não a insuflação vaginal, e ratas pós-parto vaginal. Observou quantidade maior tanto de GAGs como de ácido hialurônico no grupo de ratas prenhas, não havendo diferença entre os demais grupos. Esta avaliação foi realizada quatro dias após o trauma.

O modelo de trauma de parto simulado pode ser, portanto, valioso para o melhor entendimento das alterações envolvidas na fisiopatologia da incontinência urinária. Até o momento, foram avaliados por meio deste modelo, o surgimento da incontinência urinária, a diminuição da pressão de perda e da pressão máxima de fechamento uretral e as alterações em fibras musculares, colágenas e nervosas. Há, porém, escassez de estudos avaliando a matriz extracelular, em especial os glicosaminoglicanos sulfatados, que podem se constituir em importante fator envolvido na manutenção da continência. Tais fatos motivaram-nos a realizar este estudo.

2 Proposição

Analisar o perfil dos glicosaminoglicanos sulfatados (condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato) na uretra de ratas consoante a prenhez, o tipo de parto e o trauma simulado de parto com balão intravaginal após quatro dias e doze semanas.

3 Casuística e Métodos

3.1 Casuística

Este estudo foi realizado no setor de Uroginecologia e Cirurgia Vaginal da Disciplina de Ginecologia Geral do Departamento de Ginecologia e na Disciplina de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa desta instituição (Anexo 1).

Foram estudadas 110 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia) da colônia EPM - 1 Wistar, com peso entre 200 e 300 gramas, e cerca de 120 dias de vida, oriundas do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP-EPM e do biotério do Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular da UNIFESP-EPM.

Os animais foram confinados em gaiolas plásticas com tampa gradeada de metal, em temperatura ambiente de 22°C e iluminação artificial, sendo mantidos em fotoperíodo claro de 12 horas, intercalado com um período escuro de 12 horas, considerando-se o período de luz das 7 às 19 horas. Receberam alimentação (ração Labina-Purina, SP, BR) e água *ad libitum*.

Após um período de adaptação de sete dias, as fêmeas que iriam acasalar foram distribuídas em gaiolas com duas a três fêmeas para cada macho por um período de 48 horas. As fêmeas prenhas foram separadas.

Segundo Mandarim-de-Lacerda (1994), para estabelecer o tamanho da amostra a ser estudada, utilizando-se a regra da amostra progressiva, um mínimo de cinco animais por grupo seriam necessários para análise estereológica. Optamos por 10 animais por grupo devido a eventuais perdas durante a realização da pesquisa.

Os animais foram então distribuídos em grupos, da seguinte forma (Tabela 1):

- Grupo A (grupo controle): constituído por 20 ratas nuligestas. Dez ratas desse grupo foram sacrificadas com cerca de cinco meses de idade (Grupo A1) e dez foram sacrificadas com cerca de oito meses

de idade (Grupo A2). Estes períodos corresponderam à mesma idade de sacrifício das ratas dos demais grupos.

- Grupo B: constituído por 20 ratas nuligestas submetidas a trauma simulado de parto, sendo que dez foram sacrificadas quatro dias após o trauma (Grupo B1) e dez foram sacrificadas 12 semanas após o trauma (Grupo B2). Todas as ratas estavam na fase de estro, induzido pela presença de um macho vasectomizado na gaiola pelo período de três dias.
- Grupo C: constituído por 20 ratas submetidas a cesárea no 20º dia de prenhez, sendo que dez ratas foram sacrificadas quatro dias após a cesárea (Grupo C1) e dez ratas foram sacrificadas 12 semanas após a cesárea (grupo C2).
- Grupo D: constituído por 20 ratas submetidas a cesárea no 20º dia de prenhez, seguida de insuflação vaginal, sendo que dez ratas foram sacrificadas quatro dias após o procedimento (Grupo D1) e dez foram sacrificadas após 12 semanas (Grupo D2).
- Grupo E: constituído por 20 ratas que, após tempo normal de prenhez, tiveram parto natural, sendo que dez ratas foram sacrificadas quatro dias após o parto (Grupo E1) e dez ratas foram sacrificadas 12 semanas após o parto (Grupo E2).
- Grupo F: constituído por 10 ratas prenhas, sacrificadas no 20º dia de prenhez.

Tabela 1- Constituição dos grupos estudados

GRUPOS	20º dia de prenhez	tempo 1: 4 dias após o procedimento	tempo 2: 12 sem. após o procedimento
A- Nuligestas (controle)		A1	A2
B- Nuligestas com trauma		B1	B2
C- Cesárea		C1	C2
D-Cesárea com trauma		D1	D2
E- Parto natural		E1	E2
F- Prenhas	F		

3.2 Descrição dos procedimentos

3.2.1 - *Parto Natural* - as ratas deste grupo foram inicialmente acasaladas, seguindo a mesma sistemática das demais, entretanto, deixou-se que houvesse evolução natural da gestação para o parto espontâneo, sem nenhum tipo de intervenção. Todas tiveram a mesma duração da gestação em dias e também parto espontâneo no mesmo dia (+ou - 24 h). A duração média do parto foi de 1 h e 30 minutos, chegando a até 3h e 50 minutos. Os fetos tinham perímetro cefálico de 0,4 cm a 0,5 cm diâmetro e pesaram em média cinco gramas.

3.2.2 - *Parto cesáreo* - No 20º dia de prenhez, véspera da data provável do parto (Baker et al, 1979), 20 ratas foram submetidas a parto cesáreo por incisão longitudinal do abdome. Essa data foi estimada após o acasalamento programado, onde foi colocado um rato macho, em cada gaiola com três fêmeas, sendo as ratas separadas da gaiola uma vez que houvesse a visualização dos espermatozóides em microscópio após coleta do conteúdo vaginal das ratas. Considerou-se este o dia zero da gestação.

As ratas foram anestesiadas com xilazina (5mg/kg) e quetamina (30mg/kg) por via intraperitoneal. Realizou-se incisão abdominal até a cavidade peritoneal, identificando-se o útero gravídico, onde foram feitas duas pequenas incisões longitudinais de 1 cm, uma em cada corno uterino (Figura 3). Os fetos e as placentas foram retirados com leve expressão digital; o local da incisão uterina foi hemostasiado por leve compressão digital ou com pequenas cauterizações com pinça aquecida ao fogo (Baker et al, 1979). Procedeu-se, então, ao fechamento do abdome com fio de sutura cirúrgico de algodão. Nenhuma rata submetida a cesárea encontrava-se em trabalho de parto. Não houve óbito de nenhuma rata no transoperatório das cesáreas.

3.2.3 - *Trauma de parto simulado (insuflação de balão intra-vaginal)* - As ratas foram anestesiadas com a associação de Xilazina 5mg/kg e Quetamina 30mg/kg, por via intraperitoneal. Foi inserida uma sonda de Foley nº 10 na vagina (com a extremidade cortada) e insuflada com 5 ml de água destilada. Suturou-se a fúrcula vaginal com um ponto com fio de categute simples na para se evitar a expulsão do balão durante o procedimento. Na extremidade livre da sonda foi conectada um peso fixo de 100 gramas. As ratas foram colocadas na

extremidade de uma mesa numa posição ventral fixa, com os membros inferiores fletidos próximo ao abdome e com a sínfise púbica voltada para a borda da mesa (Figuras 4, 5 e 6). Após um período de três horas a sonda foi retirada sem que o balão fosse desinsuflado. As ratas permaneceram anestesiadas durante todo o procedimento até a retirada da sonda.

Nas ratas que foram submetidas a insuflação após a cesárea (Grupo D), o procedimento foi realizado logo após o parto, e nas ratas nuligestas (Grupo B) foi realizado com tempo de vida equivalente.



Figura 3 - Fotografia do parto cesáreo

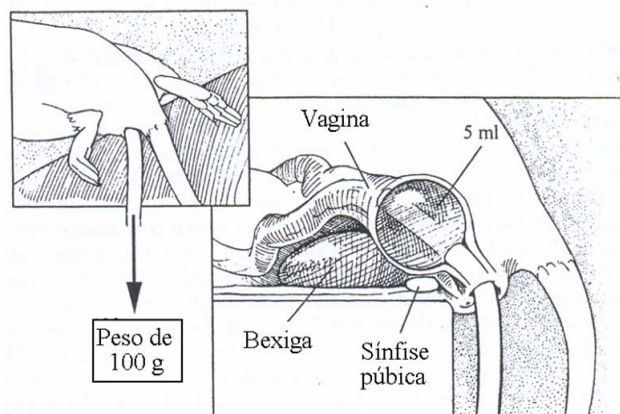


Figura 4 - Desenho esquemático representando a insuflação intravaginal com balão (simulação do trauma de parto). Notar o posicionamento intravaginal do balão insuflado e a sua relação com a sínfise púbica (Adaptado de Lin et al, 1998).



Figura 5 - Fotografia do posicionamento do balão após a insuflação intravaginal. Procedimento de sutura do hiato genital das ratas para manutenção do balão insuflado dentro da vagina por três horas



Figura 6 - Posicionamento das ratas na borda da bancada após a introdução do balão intravaginal. Notar o pequeno peso amarrado na extremidade das sondas e o contato da sínfise púbica dos animais à mesa.

3.3 Processamento do Material

As ratas foram sacrificadas por injeção letal de anestésico e exsanguinadas. A bexiga, a uretra e a vagina foram retiradas em bloco por incisão longitudinal do abdome. Após a extração, identificou-se a metade distal da uretra e realizou-se a sua secção. Os segmentos de uretra mediam cerca de 0,5 cm. Após a sua exérese, foram submetidos a lavagem com solução de PBS (Phosphate Buffered Solution), para remoção de resíduos de sangue. Logo após, foram fixados em solução de formaldeído a 2%.

3.4 Extração dos glicosaminoglicanos sulfatados

Os tecidos uretrais foram picotados em acetona (100%), à temperatura ambiente, e os fragmentos assim obtidos foram desidratados e delipidados com dez volumes de acetona e mantidos por 24 horas a 4° C.

O material seco (pó cetônico) foi pesado individualmente (Anexos 2 e 3). O pó cetônico foi submetido à proteólise por maxatase 4 mg/ml (protease alcalina p126 da Biocon do Brasil – Ind Ltda, RJ, Brasil) em tampão Tris-HCL 25 mM, pH 8,0, por toda a noite. Os contaminantes (ácidos nucléicos e peptídeos) foram precipitados com ácido tricloroacético a 90%, concentração final de 10% em banho de gelo por 10 minutos. O material foi centrifugado e o sobrenadante coletado.

Ao sobrenadante, adicionaram-se dois volumes de metanol para a precipitação dos glicosaminoglicanos, realizada a -20° C, durante 24 horas. O material foi então centrifugado e o precipitado que continha os GAGs foi ressuspenso em tampão acetato de sódio 0,05M, MgCl₂ 0,02M, pH 5,0, contendo desoxirribonuclease I (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, EUA) por 18 horas a 30°C, para a degradação do DNA que ainda contaminava a amostra.

3.5 Caracterização e quantificação dos GAGs

A identificação dos glicosaminoglicanos foi efetuada por eletroforese em gel de agarose e a quantificação por densitometria. O método de eletroforese em gel de agarose utilizado foi desenvolvido por Jaques et al (1968) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976).

As amostras foram secas e ressuspenso em água destilada na proporção aproximada de 4 µl para cada grama de pó cetônico.

Para a eletroforese em gel de agarose, alíquotas de 5 µl de cada amostra foram aplicadas em lâminas de gel de agarose a 0,55% (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA) com espessura de 0,2 cm em tampão 1,3-diaminopropano-acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0. A corrida eletroforética foi realizada em caixa refrigerada a 4°C, com diferença de potencial elétrico de 100V, durante cerca de uma hora ou até que se obtivesse a migração apropriada, indicada pelo corante vermelho de cresol.

A origem da eletroforese correspondeu ao pólo negativo, uma vez que os glicosaminoglicanos têm carga negativa e, portanto, migram para o pólo positivo. Na eletroforese em gel de agarose com tampão PDA, os glicosaminoglicanos são separados pela capacidade de interação com a diamina do tampão. Assim, os compostos que menos interagem com o diaminopropano têm maior migração eletroforética. Portanto, o tampão PDA discrimina, por ordem decrescente de mobilidade eletroforética, respectivamente, o condroitim sulfato (CS), o dermatam sulfato (DS) e o heparam sulfato (HS).

Após a corrida eletroforética, os glicosaminoglicanos foram precipitados no gel com cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônia) 0,1% por um período mínimo de duas horas. Após secagem sob calor e ventilação, o gel foi corado com solução de azul de toluidina a 0,1% em ácido acético a 1% e etanol a 50%, por cerca de 15 minutos. A seguir, o gel foi descorado na mesma solução sem o corante, e seco à temperatura ambiente.

A identificação de cada glicosaminoglicano sulfatado foi realizada comparando-se a migração eletroforética das amostras com a rede de padrões conhecidos e purificados: condroitim 4-sulfato extraído de cartilagem de baleia, condroitim 6-sulfato extraído de cartilagem de tubarão e dermatam sulfato extraído de mucosa intestinal bovina, obtidos da Seikagaku Kogyo Co (Tóquio-Japão); heparam sulfato de pulmão bovino (purificado na Disciplina de Biologia Molecular da UNIFESP-EPM, como descrito por Dietrich e Nader em 1974). (Figura 7).

Estes mesmos padrões foram utilizados para a determinação quantitativa dos compostos, pela densitometria a 525nm (densitômetro modelo CS-9000 da Shimadzu Corporation). Obteve-se, para cada composto, um valor em unidades densitométricas que foi convertido em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de GAGs no tecido seco, baseado no peso inicial do pó cetônico.

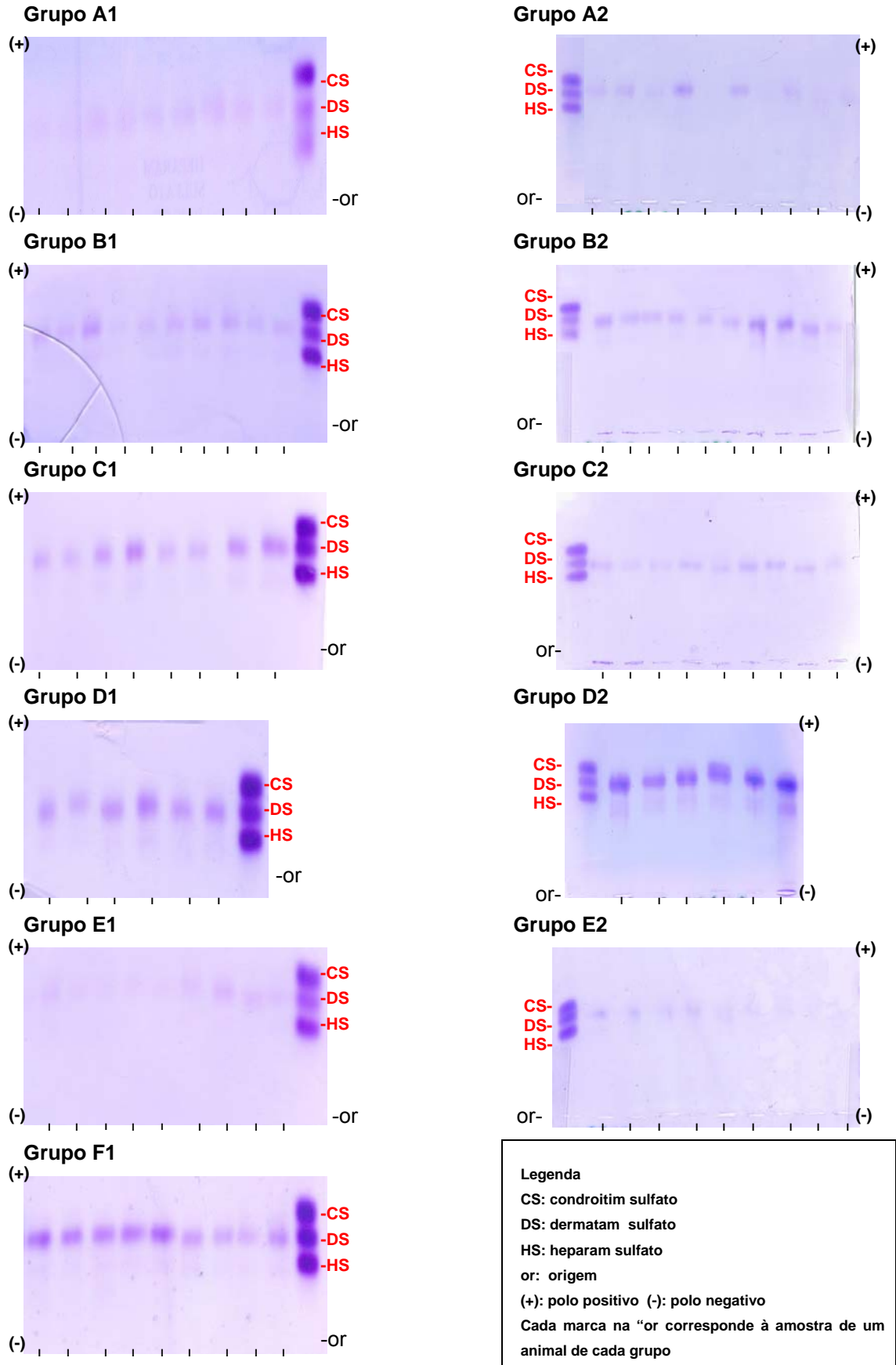


Figura 7- Lâminas de eletroforese em gel de agarose dos GAGs da uretra

3.6 Método Estatístico

Para compararmos a quantidade de glicosaminoglicanos totais, condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato na uretra entre os grupos, usamos a análise de variância (ANOVA), com o propósito de verificar a igualdade das médias entre os grupos avaliados, tanto no tempo 1 como no tempo 2. Quando houve significância estatística, complementou-se com o teste de comparações múltiplas de Tukey (Levin, 1987; Netter et al, 1996).

Para compararmos a quantidade de glicosaminoglicanos de cada grupo no tempo 1 e no tempo 2, utilizamos o teste de Mann Whitney.

O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 0,05 ou 5% ($p \leq 0,05$), assinalando-se com asterisco os valores significantes (Netter et al, 1996).

4 Resultados

4.1 Considerações iniciais

Dos dez animais de cada grupo, restaram ao final do estudo dez ratas no Grupo A1, dez no Grupo B1, oito no Grupo C1, seis no Grupo D1, dez no Grupo E1 e dez no Grupo F. Quanto às ratas sacrificadas após 12 semanas, restaram dez ratas no Grupo A2, dez no Grupo B2, nove no Grupo C2, seis no Grupo D2 e nove no Grupo E2.

Os casos perdidos deveram-se às mortes das ratas, que ocorreram no grupo pós-cesárea (C1,C2, D1 e D2) e uma morte no grupo pós-parto natural (E2).

4.2 Análise dos dados

As tabelas 2 a 7 mostram a quantidade GAGs totais, DS, HS encontrados nas amostras da uretra das ratas nos seus respectivos grupos.

Obteve-se o valor de GAGs totais pela somatória simples dos valores de DS, HS e CS encontrados. O composto DS encontrado em todos os grupos foi o que apresentou maior expressão. O composto HS foi encontrado em quase todas as amostras, em menor quantidade. O composto CS só foi encontrado no Grupo F (ratas prenhas) dentre todos os grupos estudados (Anexo 4).

O teste da análise de variância (ANOVA), complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey evidenciou:

4.2.1 Para os valores de glicosaminoglicanos na uretra dos grupos sacrificados no tempo 1 (4 dias após trauma):

- Quantidade maior de GAGs totais estatisticamente significativa no Grupo F (ratas prenhas) em relação aos Grupos B (nuligesta com trauma), C (cesárea), D (cesárea com trauma) e E (parto natural).
- Quantidade maior de DS estatisticamente significativa no Grupo F (ratas prenhas) em relação ao Grupo E (parto natural).
- Quantidade maior de HS estatisticamente significativa no Grupo F (ratas prenhas) em relação aos Grupos A (controle), B (nuligesta com trauma), C (cesárea), D (cesárea com trauma) e E (parto natural).

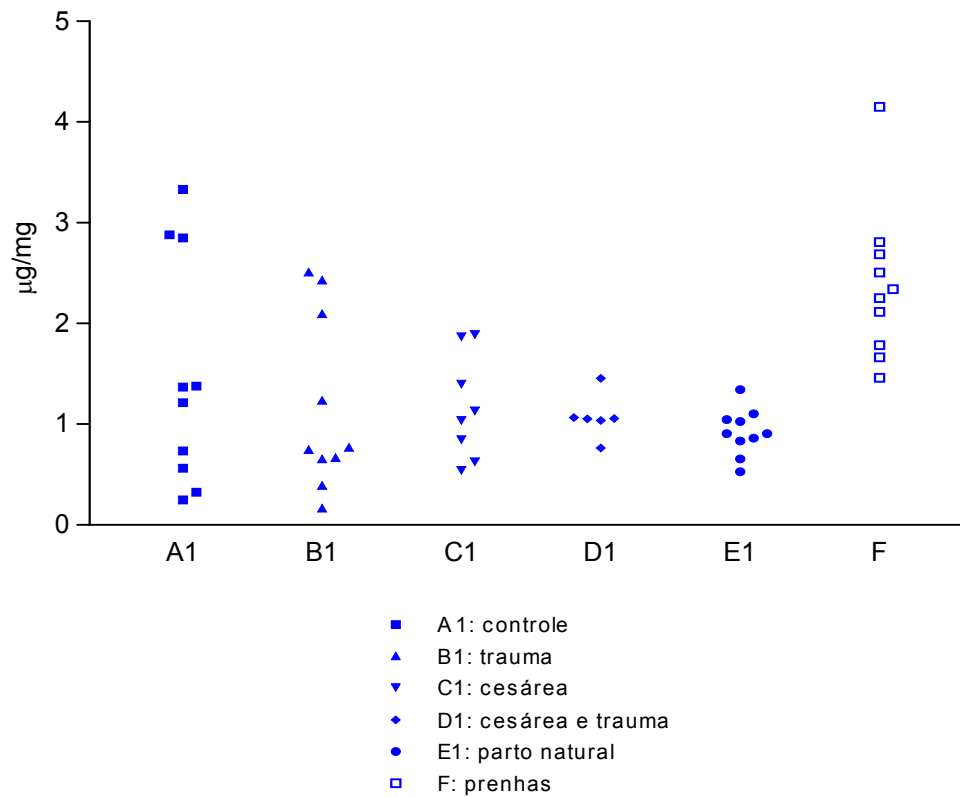
(tabelas 2, 3 e 4; gráficos 1,2 e 3)

Tabela 2 – Quantidade de GAGs totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1

Rata nº	GRUPOS					
	A1	B1	C1	D1	E1	F
1	1,38	2,43	1,89	1,06	1,05	2,25
2	3,33	0,75	1,87	0,76	0,65	2,12
3	2,85	2,10	1,04	1,04	0,83	1,66
4	0,73	0,17	0,54	1,45	0,53	2,34
5	0,33	0,39	1,40	1,05	1,03	1,78
6	2,88	0,67	1,13	1,05	0,86	2,51
7	1,21	1,24	0,85		0,91	4,15
8	1,37	2,51	0,63		1,34	2,81
9	0,25	0,77			1,10	2,69
10	0,56	0,66			0,91	1,46
Média	1,49	1,17	1,17	1,07	0,92	2,38
DP	1,13	0,86	0,52	0,22	0,23	0,76
EP	0,36	0,27	0,18	0,09	0,07	0,24

A1: controle B1: trauma C1: cesárea D1: cesárea e trauma E1: parto natural F: prenhas

Gráfico 1- Quantificação de GAGs totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1



Análise de Variância (ANOVA) A1 x B1 x C1x D1 x E1 x F

$p < 0,001$

Teste de comparações múltiplas de Tukey:

Grupos	Diferença	95% IC	p	
A1 = B1	0,3228	-0.6582 a 1.304	$P > 0.05$	
A1 = C1	0,3219	-0.7186 a 1.362	$P > 0.05$	
A1 = D1	0,4189	-0.7139 a 1.552	$P > 0.05$	
A1 = E1	0,5688	-0.4122 a 1.550	$P > 0.05$	
A1 = F	-0,8872	-1.868 a 0.09384	$P > 0.05$	
B1 = C1	-0,0009075	-1.041 a 1.040	$P > 0.05$	
B1 = D1	0,0961	-1.037 a 1.229	$P > 0.05$	
B1 = E1	0,246	-0.7350 a 1.227	$P > 0.05$	
B1 < F	-1,21	-2.191 a -0.2290	$P < 0.01$	significante
C1 = D1	0,09701	-1.088 a 1.282	$P > 0.05$	
C1 = E1	0,2469	-0.7936 a 1.287	$P > 0.05$	
C1 < F	-1,209	-2.250 a -0.1685	$P < 0.05$	significante
D1 = E1	0,1499	-0.9829 a 1.283	$P > 0.05$	
D1 < F	-1,306	-2.439 a -0.1733	$P < 0.05$	significante
E1 < F	-1,456	-2.437 a -0.4750	$P < 0.001$	significante

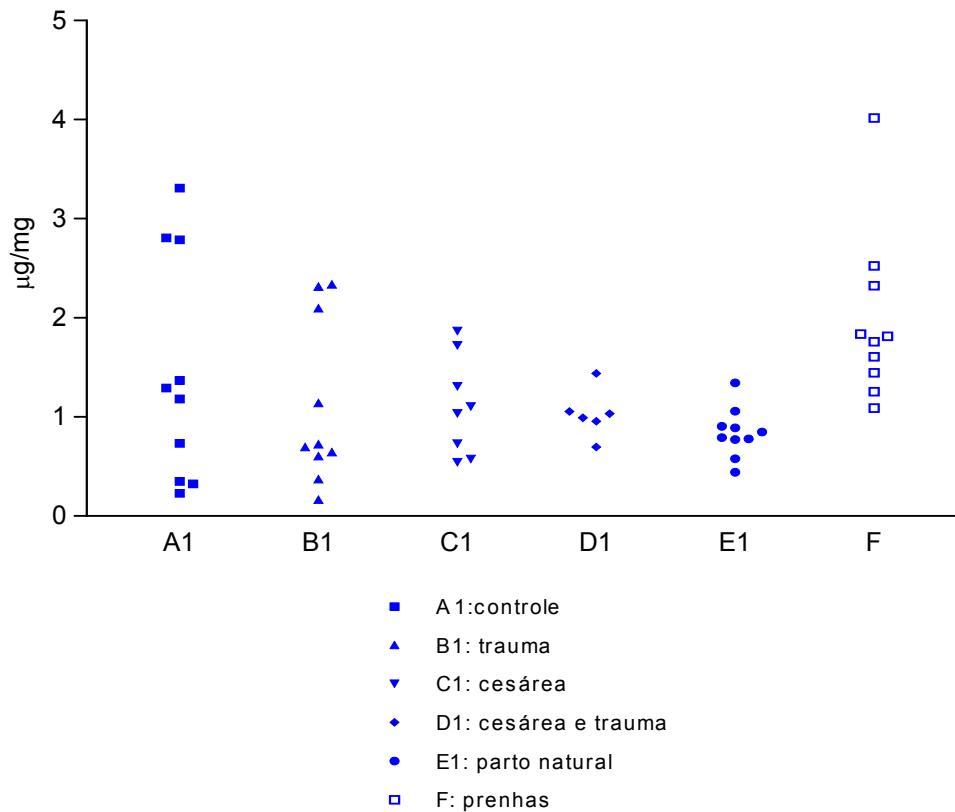
I.C: Intervalo de Confiança

Tabela 3 – Quantidade de dermatam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1

Rata nº	GRUPOS					
	A1	B1	C1	D1	E1	F
1	1,30	2,3	1,72	0,99	0,89	1,76
2	3,31	0,70	1,87	0,70	0,58	1,81
3	2,79	2,10	1,04	0,96	0,77	1,26
4	0,73	0,17	0,54	1,44	0,44	1,61
5	0,33	0,37	1,31	1,03	0,85	1,45
6	2,81	0,65	1,10	1,05	0,79	1,84
7	1,18	1,14	0,73		0,78	4,02
8	1,37	2,34	0,57		1,34	2,53
9	0,23	0,73			1,06	2,33
10	0,35	0,60			0,91	1,09
Média	1,44	1,11	1,11	1,03	0,84	1,97
DP	1,14	0,83	0,50	0,24	0,25	0,84
EP	0,36	0,26	0,18	0,10	0,08	0,27

A1: controle B1: trauma C1: cesárea D1: cesárea e trauma E1: parto natural F: prenhas

Gráfico 2- Quantidade de dermatam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1



Análise de Variância (ANOVA) A1 x B1 x C1 x D1 x E1 x F

$p = 0,027$

Teste de Comparações Múltiplas de Tukey

Grupos	Diferença	95% IC	p
A1 x B1	0,3288	-0.6649 a 1.322	$P > 0.05$
A1 x C1	0,3277	-0.7262 a 1.382	$P > 0.05$
A1 x D1	0,4107	-0.7366 a 1.558	$P > 0.05$
A1 x E1	0,5977	-0.3960 a 1.591	$P > 0.05$
A1 x F	-0,5291	-1.523 a 0.4645	$P > 0.05$
B1 x C1	-0,001065	-1.055 a 1.053	$P > 0.05$
B1 x D1	0,08196	-1.065 a 1.229	$P > 0.05$
B1 x E1	0,2689	-0.7247 a 1.263	$P > 0.05$
B1 x F	-0,8579	-1.852 a 0.1357	$P > 0.05$
C1 x D1	0,08302	-1.117 a 1.283	$P > 0.05$
C1 x E1	0,27	-0.7840 a 1.324	$P > 0.05$
C1 x F	-0,8569	-1.911 a 0.1971	$P > 0.05$
D1 x E1	0,187	-0.9604 a 1.334	$P > 0.05$
D1 x F	-0,9399	-2.087 a 0.2075	$P > 0.05$
E1 < F	-1,127	-2.121 a -0.1332	$P < 0.05$

significante

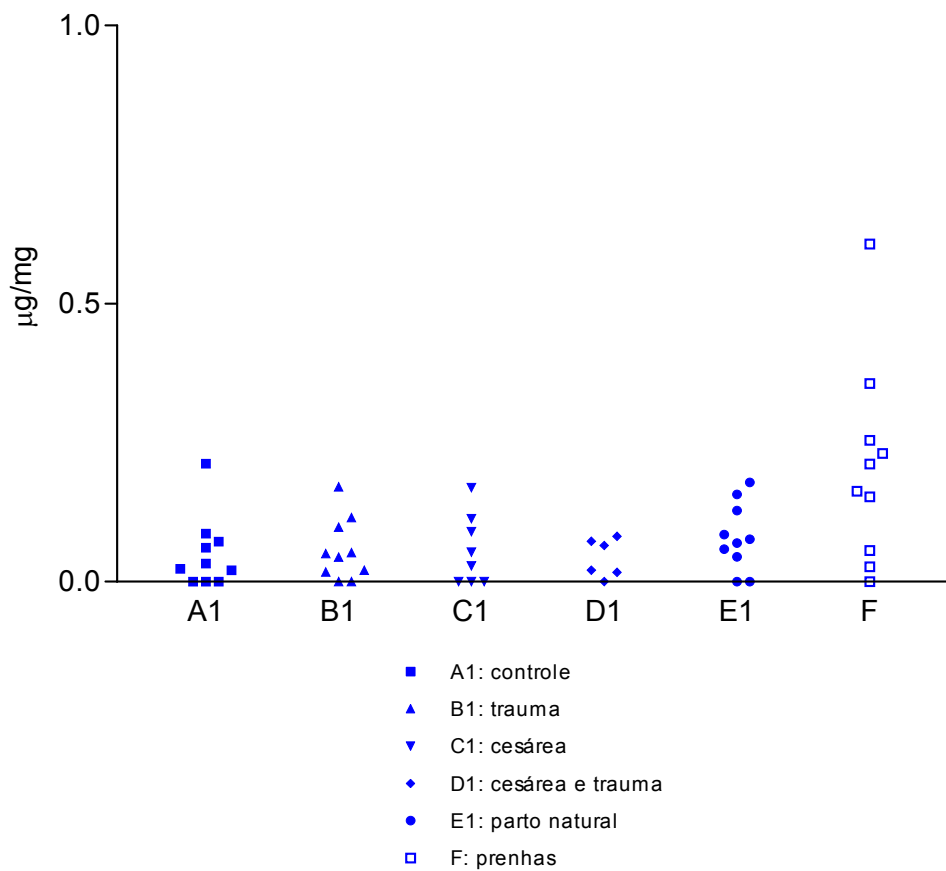
I.C: Intervalo de Confiança

Tabela 4 – Quantidade de heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1

Rata nº	GRUPOS					
	A1	B1	C1	D1	E1	F
1	0,09	0,11	0,17	0,07	0,16	0,05
2	0,02	0,05	0	0,06	0,08	0,15
3	0,06	0	0	0,08	0,06	0,23
4	0	0	0	0,02	0,09	0,36
5	0	0,02	0,09	0,02	0,18	0,25
6	0,07	0,02	0,03	0	0,07	0,61
7	0,03	0,10	0,11		0,13	0
8	0	0,17	0,05		0,00	0,21
9	0,02	0,04			0,04	0,03
10	0,21	0,05			0,00	0,16
Média	0,05	0,06	0,05	0,04	0,08	0,21
DP	0,06	0,05	0,06	0,03	0,06	0,18
EP	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,06

A1: controle B1: trauma C1: cesárea D1: cesárea e trauma E1: parto natural F: prenhas

Gráfico 3 - Quantidade de heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 1



Análise de Variância (ANOVA) A1x B1 x C1 x D1x E1 x F

p=0,003

Teste de Comparações Múltiplas de Tukey

	Diferença	95% IC	p	
A1 = B1	-0,00603	-0.1303 a 0.1183	P > 0.05	
A1 = C1	-0,005839	-0.1377 a 0.1260	P > 0.05	
A1 = D1	0,008155	-0.1354 a 0.1517	P > 0.05	
A1 = E1	-0,02892	-0.1532 a 0.09536	P > 0.05	
A1 < F	-0,1551	-0.2794 a -0.03080	P < 0.01	significante
B1 = C1	0,0001912	-0.1316 a 0.1320	P > 0.05	
B1 = D1	0,01419	-0.1293 a 0.1577	P > 0.05	
B1 = E1	-0,02289	-0.1472 a 0.1014	P > 0.05	
B1 < F	-0,1491	-0.2733 a -0.02477	P < 0.05	significante
C1 = D1	0,01399	-0.1361 a 0.1641	P > 0.05	
C1 = E1	-0,02308	-0.1549 a 0.1087	P > 0.05	
C1 < F	-0,1492	-0.2811 a -0.01743	P < 0.05	significante
D1 = E1	-0,03708	-0.1806 a 0.1064	P > 0.05	
D1 < F	-0,1632	-0.3067 a -0.01973	P < 0.05	significante
E1 < F	-0,1262	-0.2504 a -0.001883	P < 0.05	significante

IC: Intervalo de Confiança

4.2.2 Para os valores de glicosaminoglicanos na uretra dos grupos sacrificados no tempo 2 (12 semanas após o trauma):

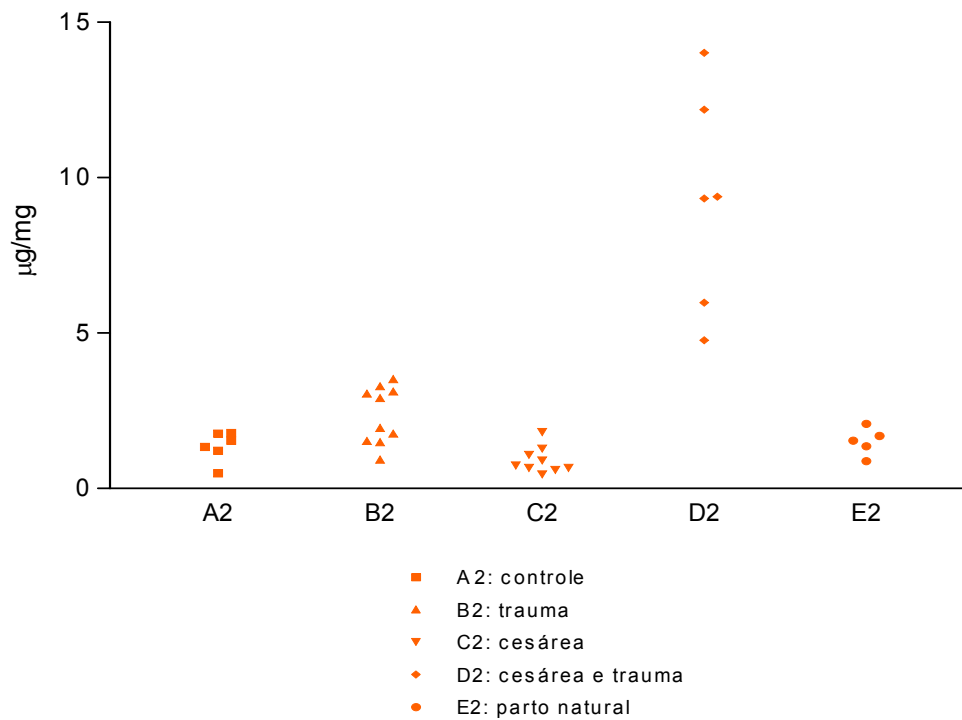
- Quantidade maior de GAGs totais estatisticamente significativa no Grupo D (cesárea com trauma) em relação aos Grupos A (controle), B (trauma), C (cesárea), e E (parto natural).
- Quantidade maior de DS estatisticamente significativa no Grupo D (cesárea com trauma) em relação aos Grupos A (controle), B (trauma), C (cesárea), e E (parto natural).
- Quantidade maior de HS estatisticamente significativa no Grupo D (cesárea com trauma) em relação aos Grupos A (controle), B (trauma), C (cesárea), e E (parto natural).

(tabelas 5, 6 e 7; gráficos 4, 5 e 6)

Tabela 5 - Quantidade de GAGs totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2

Rata nº	GRUPOS				
	A2	B2	C2	D2	E2
1	1,21	3,12	1,81	5,98	2,08
2	1,79	3,05	0,90	4,77	1,54
3	1,76	1,95	0,60	9,33	1,35
4	1,54	1,49	1,085	12,18	1,69
5	1,34	0,93	0,66	9,38	0,88
6	0,49	1,76	0,74	14,01	
7		3,52	1,28		
8		3,29	0,45		
9		2,91	0,66		
10		1,53			
Média	1,35	2,36	0,91	9,28	1,50
DP	0,48	0,92	0,42	3,52	0,44
EP	0,20	0,29	0,14	1,44	0,20
A2: controle	B2: trauma	C2: cesárea	D2: cesárea e trauma	E2: parto natural	

Gráfico 4 – Quantidade de GAGs totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2



Análise de Variância (ANOVA) A2 x B2 x C2 x D2x E2

$p < 0,0001$

Teste de Comparações Múltiplas de Tukey

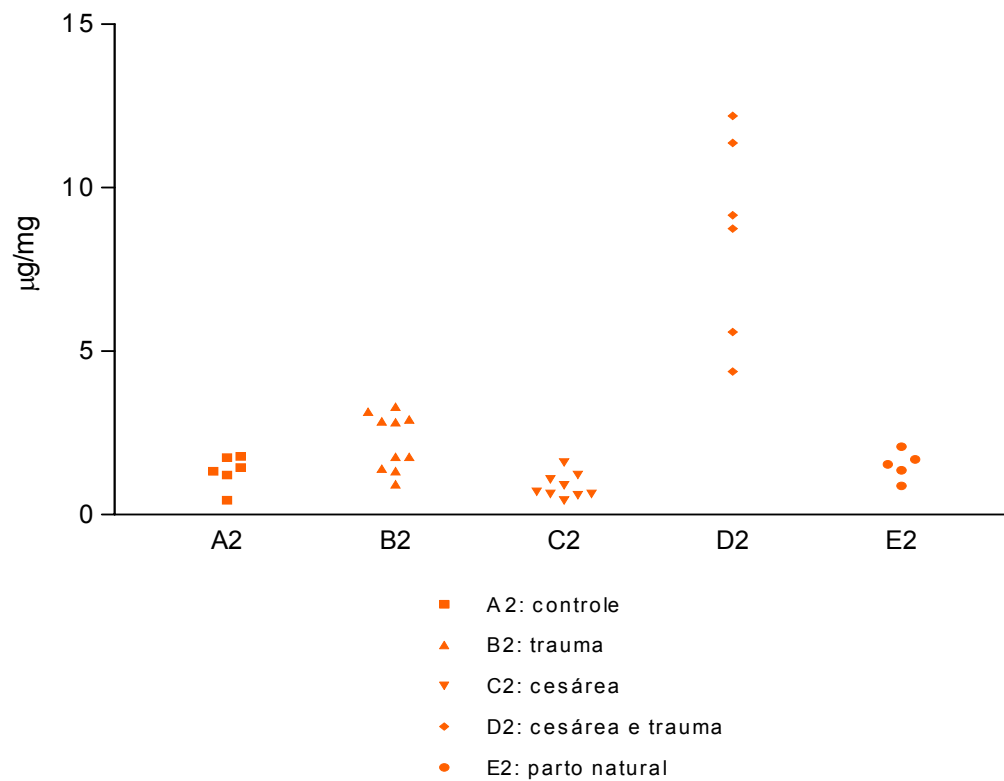
	Diferença	95% IC	p	
A2 = B2	-1,002	-3.297 a 1.294	$P > 0.05$	
A2 = C2	0,4443	-1.899 a 2.788	$P > 0.05$	
A2 < D2	-7,921	-10.49 a -5.354	$P < 0.001$	significante
A2 = E2	-0,1545	-2.847 a 2.538	$P > 0.05$	
B2 = C2	1,446	-0.5969 a 3.489	$P > 0.05$	
B2 < D2	-6,919	-9.215 a -4.624	$P < 0.001$	significante
B2 = E2	0,8471	-1.588 a 3.282	$P > 0.05$	
C2 < D2	-8,365	-10.71 a -6.022	$P < 0.001$	significante
C2 = E2	-0,5987	-3.079 a 1.881	$P > 0.05$	
D2 > E2	7,767	5.074 a 10.46	$P < 0.001$	significante

IC: Intervalo de Confiança

Tabela 6 – Quantidade de dermatam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2

Rata nº	GRUPOS				
	A2	B2	C2	D2	E2
1	1,21	2,85	1,60	5,58	2,08
2	1,79	2,82	0,90	4,37	1,54
3	1,75	1,76	0,60	8,95	1,35
4	1,44	1,33	1,08	11,37	1,69
5	1,33	0,93	0,63	9,15	0,88
6	0,44	1,76	0,70	12,20	
7		3,30	1,22		
8		3,15	0,43		
9		2,91	0,63		
10		1,41			
Média	1,33	2,22	0,86	8,57	1,50
DP	0,48	0,87	0,37	3,09	0,44
EP	0,20	0,27	0,12	1,26	0,20
A2: controle	B2: trauma	C2: cesárea	D2: cesárea e trauma	E2: parto natural	

Gráfico 5 – Quantidade de dermatam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2



Análise de Variância (ANOVA) A2 x B2 x C2 x D2x E2

$p < 0,0001$

Teste de Comparações Múltiplas de Tukey

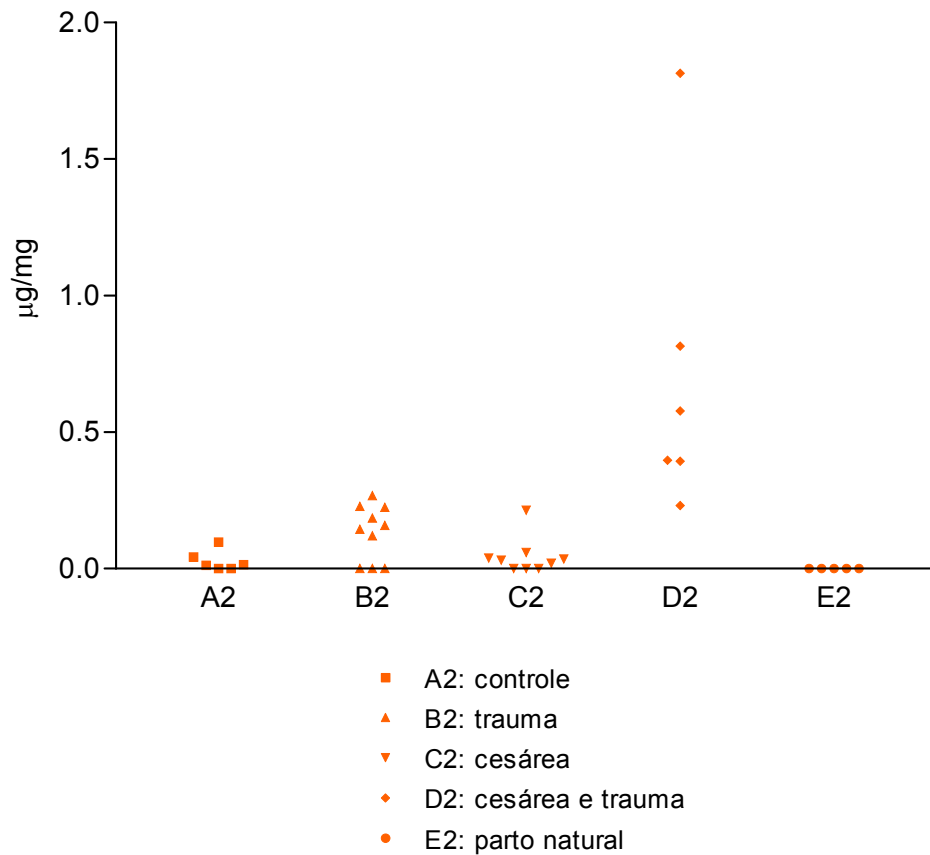
	Diferença	95% IC	p	
A2 = B2	-0,8965	-2.938 a 1.145	P > 0.05	
A2 = C2	0,4607	-1.623 a 2.544	P > 0.05	
A2 < D2	-7,244	-9.527 a -4.962	P < 0.001	significante
A2 = E2	-0,1822	-2.576 a 2.212	P > 0.05	
B2 = C2	1,357	-0.4592 a 3.174	P > 0.05	
B2 < D2	-6,348	-8.389 a -4.307	P < 0.001	significante
B2 = E2	0,7143	-1.451 a 2.880	P > 0.05	
C2 < D2	-7,705	-9.789 a -5.622	P < 0.001	significante
C2 = E2	-0,6429	-2.848 a 1.562	P > 0.05	
D2 > E2	7,062	4.668 a 9.456	P < 0.001	significante

IC= Intervalo de Confiança

Tabela 7 – Quantidade de heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2

Rata nº	GRUPOS				
	A2	B2	C2	D2	E2
1	0,00	0,27	0,21	0,40	0,00
2	0,00	0,23	0	0,40	0,00
3	0,02	0,19	0	0,58	0,00
4	0,10	0,16	0	0,81	0,00
5	0,01	0	0,04	0,23	0,00
6	0,04	0	0,04	1,81	
7		0,22	0,06		
8		0,14	0,02		
9		0	0,03		
10		0,12			
Média	0,03	0,13	0,04	0,70	0,00
DP	0,04	0,10	0,06	0,58	0,00
EP	0,01	0,03	0,02	0,24	0
A2: controle	B2: trauma	C2: cesárea	D2: cesárea e trauma	E2: parto natural	

Gráfico 6 - Quantidade de heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados no tempo 2



Análise de Variância (ANOVA) A2 x B2 x C2 x D2x E2

$p < 0,0001$

Teste de Comparações Múltiplas de Tukey

	Diferença	95% IC	P	
A2 = B2	-0,1051	-0.4664 a 0.2563	P > 0.05	
A2 = C2	-0,01639	-0.3852 a 0.3524	P > 0.05	
A2 < D2	-0,6766	-1.081 a -0.2726	P < 0.001	significante
A2 = E2	0,02777	-0.3960 a 0.4515	P > 0.05	
B2 = C2	0,08866	-0.2329 a 0.4102	P > 0.05	
B2 < D2	-0,5715	-0.9329 a -0.2102	P < 0.001	significante
B2 = E2	0,1328	-0.2505 a 0.5161	P > 0.05	
C2 < D2	-0,6602	-1.029 a -0.2914	P < 0.001	significante
C2 = E2	0,04416	-0.3462 a 0.4345	P > 0.05	
D2 > E2	0,7043	0.2806 a 1.128	P < 0.001	significante

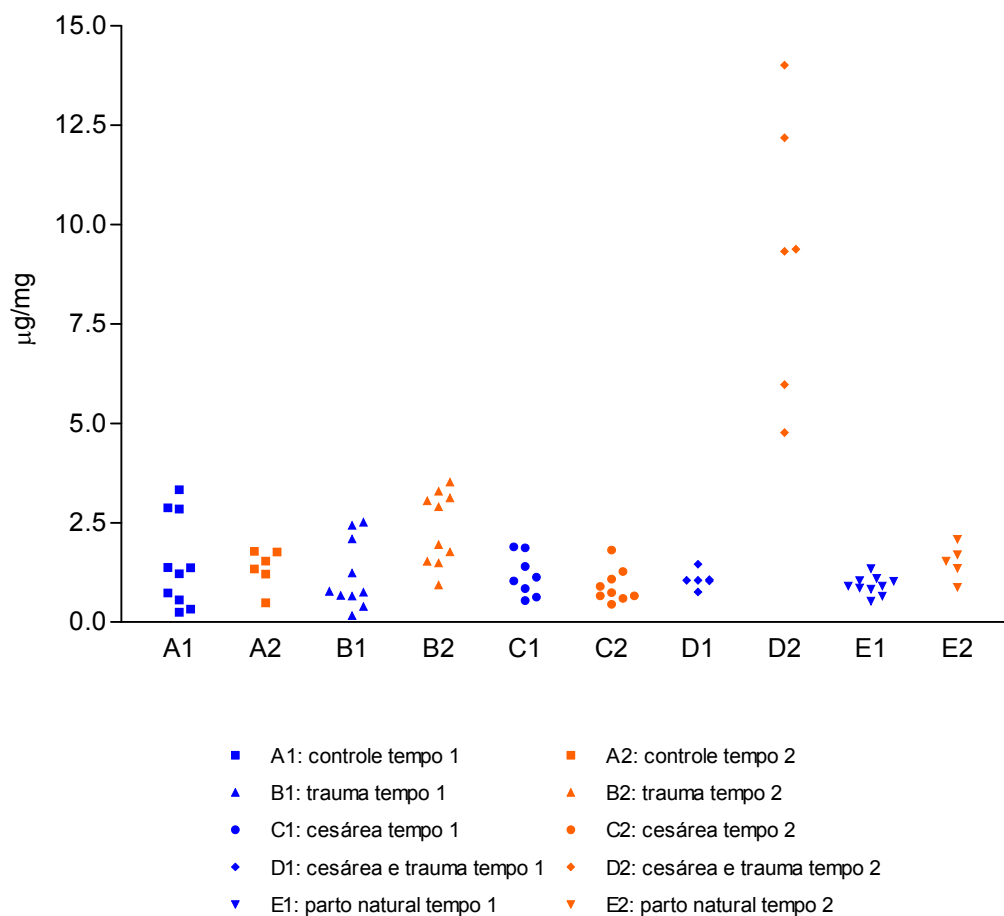
IC: Intervalo de Confiança

4.2.3 A comparação entre a quantidade de glicosaminoglicanos sulfatados na uretra de ratas sacrificadas no tempo 1 e tempo 2, por meio do teste de Mann-Whitney evidenciou:

- Quantidade de GAGs totais e dermatan sulfato significativamente maior nos Grupos B (nuligesta com trauma), D (cesárea com trauma) e E (parto natural) sacrificados no tempo 2 em relação ao tempo 1.
- Quantidade de HS significativamente maior no Grupo D (cesárea com trauma) sacrificados no tempo 2 em relação ao tempo 1.
- Não houve diferença estatisticamente significante na quantidade de GAGs totais e DS nos Grupos A (controle) e C (cesárea) sacrificados no tempo 1 e 2 .
- Não houve diferença significativa na quantidade de HS nos Grupos A (controle), B (nuligesta com trauma), C (cesárea) e E (parto natural) sacrificadas no tempo 1 e 2.

(gráficos 7, 8 e 9)

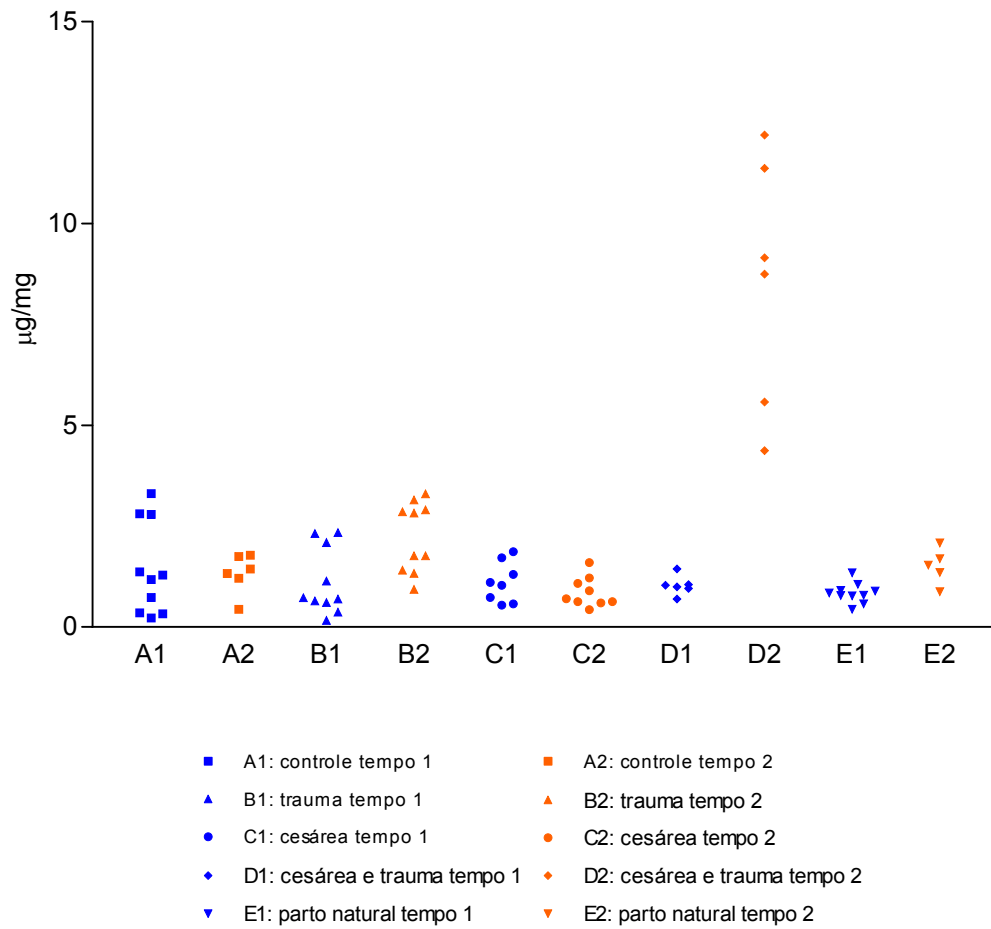
Gráfico 7- Quantidade de GAGs totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados nos tempos 1 e 2



Teste de Mann Whitney

	A1 x A2	B1 x B2	C1 x C2	D1 x D2	E1 x E2
p	0,875 (NS)	0,0089 *	0,3213(NS)	0,0022*	0,0193*

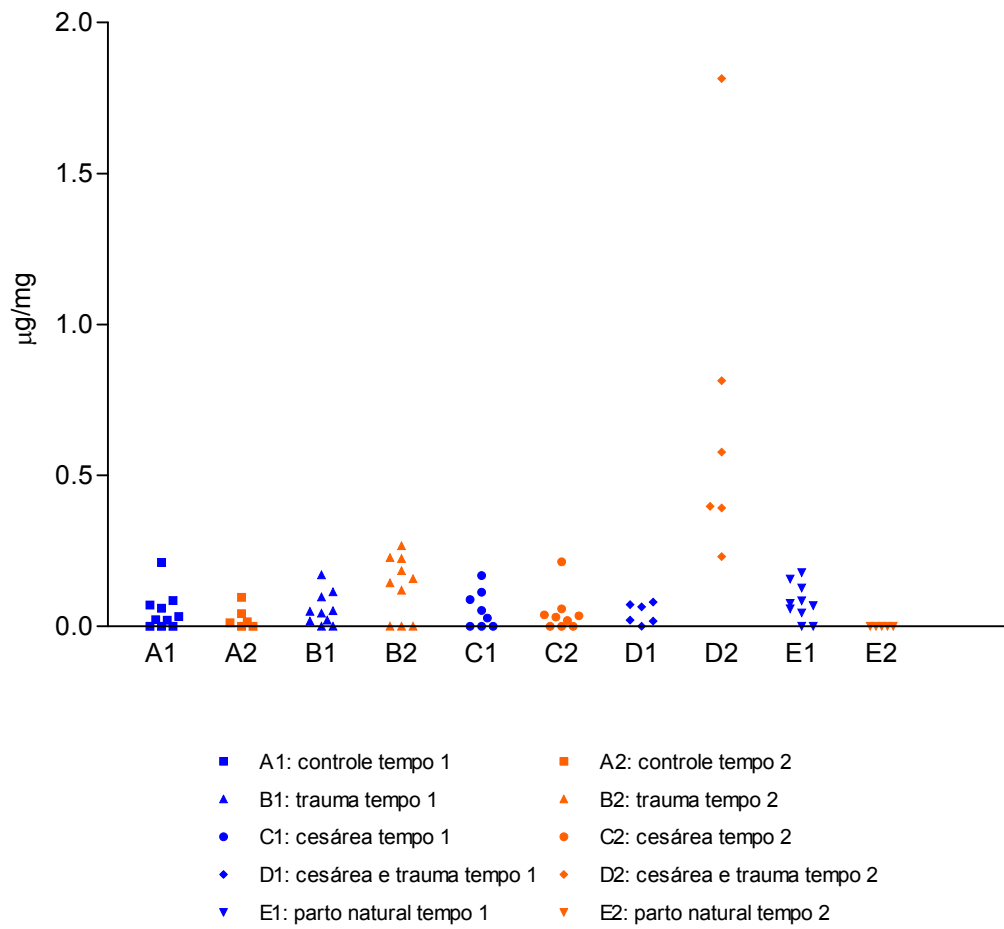
Gráfico 8 - Quantidade de dermatam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados nos tempos 1 e 2



Teste de Mann Whitney

	A1 x A2	B1 x B2	C1 x C2	D1 x D2	E1 x E2
p	0,635 (NS)	0,0089 *	0,3704(NS)	0,0022*	0,0080*

Gráfico 9 – Quantidade heparam sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretra de ratas nos grupos sacrificados nos tempos 1 e 2



Teste de Mann Whitney

	A1 x A2	B1 x B2	C1 x C2	D1 x D2
p	0,562 (NS)	0,1431(NS)	0,743(NS)	0,0022*

5 Discussão

A incontinência urinária feminina é um importante problema de saúde pública. O conhecimento de sua fisiopatologia é necessário para o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos, ou mesmo preventivos.

O trauma do parto vaginal é, provavelmente, o principal fator isolado envolvido em sua etiologia, pela associação de danos ao tecidos neuromuscular e conjuntivo (Retzky, Rogers, 1995; Thom et al, 1996; Cannon et al, 2002). Porém, embora a associação entre parto vaginal e incontinência esteja bem estabelecida, o preciso mecanismo que leva à incontinência permanece ainda incerto e depende de vários fatores.

A dificuldade de obtenção de material para avaliar os danos teciduais causados pelo trauma de parto tem limitado os estudos em humanos. O desenvolvimento de modelo animal de trauma vaginal que reproduza estas lesões tem adquirido importância para a melhor compreensão da fisiopatologia da IUE.

Nos últimos anos, informações relacionadas aos efeitos da gravidez, do trauma de parto, da lesão do nervo pudendo e da deprivação hormonal no mecanismo de continência têm sido obtidas por meio de estudos experimentais.

O modelo de insuflação vaginal em ratas, descrito por Lin et al (1998), permite a avaliação dos efeitos da prolongada dilatação e compressão dos tecidos urogenitais. Proposto originalmente por Lin et al (1998), foi modificado por Sievert et al (2001), que tentaram redirecionar os eixos de força para a uretra e a vagina, de forma que a isquemia provocada por pressão prolongada pudesse causar danos irreversíveis à uretra e ao músculo levantador do ânus, simulando o efeito do parto vaginal na mulher (Sievert et al, 2001).

Observou-se que o modelo animal de trauma promove dano ao mecanismo esfinteriano uretral, tanto do ponto de vista histológico como funcional. Foram observadas diminuição da pressão de perda e da pressão máxima de fechamento uretral, além de alterações em fibras musculares, colágenas e nervosas da uretra (Lin et al, 1998; Sievert et al, 2001; Cannon et al, 2002; Resplande et al, 2002; Margot et al, 2003; Damaser et al, 2003; Sievert et al, 2004).

Recentemente, alterações do tecido conjuntivo, em particular da matriz extracelular da uretra e das estruturas peri-uretrais têm sido implicadas na etiologia da incontinência urinária e do prolapso genital.

Modificações dos elementos da matriz extracelular foram relatadas nas mulheres com incontinência urinária. Registraram-se alterações dos seus componentes nos tecidos peri-uretrais de mulheres incontinentes, com aumento das fibras colágenas (Falconer et al, 1998a) e dos glicosaminoglicanos sulfatados (Feldner et al, 2006).

Contudo, entre as limitações destes estudos, está a impossibilidade de análise de amostras uretrais, realizando-se a retirada de tecidos para-uretrais. Embora os grupos estudados sejam homogêneos, as mulheres provavelmente apresentavam diferenças individuais quanto ao grau de prolapso genital, à idade e à paridade. O local da biópsia foi padronizado, porém, amostras separadas por milímetros podem representar tecidos de diferentes naturezas, conforme relatado pelos próprios autores (Feldner et al, 2006).

Além disso, estes estudos não avaliaram os tecidos ao longo do tempo, ou mesmo antes do trauma, pela dificuldade de realização de estudos prospectivos em mulheres. Não é possível, portanto, determinar se estas alterações da matriz extracelular são causa ou consequência do mecanismo que levou à incontinência urinária.

O nosso estudo teve como objetivo a análise dos glicosaminoglicanos sulfatados na uretra de ratas submetidas ao modelo de trauma vaginal, avaliando-os precoce e tardiamente. Esta comparação ao longo do tempo não foi realizada em nenhum outro estudo. Seguimos as padronizações do modelo conforme descrito por Lin et al (1998), com as modificações introduzidas por Sievert et al, em 2001.

Optamos por comparar o trauma em ratas prenhas com o trauma em ratas nuligestas, visto que as alterações induzidas pela própria prenhez poderiam levar a respostas diversas ao trauma vaginal. Analisamos, assim, ratas que foram submetidas a insuflação vaginal logo após à cesárea. Comparamos com ratas nuligestas não submetidas a trauma, com a mesma idade, e ratas em que foi realizado parto cesárea no 20º dia de prenhez, antes do trabalho de parto. Analisamos também um grupo de ratas sacrificadas no

20º dia de prenhez. Ratas que evoluíram para parto natural, que habitualmente não leva a trauma vaginal significativo, constituíram o último grupo.

Segundo Baker et al (1979), a distócia no trabalho de parto das ratas é evento raro, dados estes corroborados pelo nosso estudo que não encontrou nenhum caso de distócia.

Nos grupos avaliados quatro dias após o trauma ou após o parto, observamos quantidade maior de dermatam sulfato, seguida de heparam sulfato, encontrado em quantidade menor, e não presente em todas as amostras. Não foi observada presença de condroitim sulfato nestes grupos.

Quanto às ratas prenhas, observou-se que o GAG predominante também foi o dermatam sulfato, seguido do heparam sulfato. O condroitim sulfato foi encontrado apenas neste grupo. A análise estatística revelou quantidade significativamente maior de Gags totais nas ratas prenhas em relação aos grupos nuligesta com trauma, cesárea, cesárea com trauma e parto normal. A quantidade de heparam sulfato também foi significativamente maior neste grupo em relação à todos os outros. A quantidade de DS também foi maior nas ratas prenhas, porém significativo apenas quando comparado com o grupo de parto natural.

Nossos resultados demonstram que há uma alteração do perfil de glicosaminoglicanos com a prenhez, e que o trauma vaginal realizado durante a prenhez não altera, em uma avaliação precoce, os glicosaminoglicanos da uretra. Os GAGs parecem retornar aos valores anteriores à prenhez rapidamente, já que não há diferença entre o grupo controle e os grupos avaliados quatro dias após o parto.

Estes resultados estão de acordo com os relatados por Mitrano (2006), que também observaram aumento dos GAGs totais e dermatam sulfato da uretra com a evolução da prenhez. A autora sugere que este aumento possa alterar a complacência dos tecidos, gerando matriz extracelular com maior resistência às forças compressoras, com conseqüente prevenção da IUE no final da gravidez. Entretanto, as informações conhecidas até o momento não nos permitem explicar o exato papel desta alteração no mecanismo de continência uretral, já que encontramos também aumento de glicosaminoglicanos sulfatados no tecido peri-uretral de mulheres incontinentes (Feldner et al, 2006).

A análise realizada doze semanas após o trauma demonstrou resultados diferentes da avaliação efetuada após quatro dias. Da mesma forma, os GAGs encontrados foram o dermatam sulfato e o heparam sulfato, com predomínio do primeiro. Ao compararmos os resultados de cada grupo nas avaliações precoce e tardia, observamos que nos grupos de nuligestas submetidas à insuflação vaginal, cesárea com insuflação e parto natural, houve aumento do dermatam sulfato e dos GAGs totais na avaliação após 12 semanas em relação à análise após quatro dias. Nos grupos controle e cesárea não houve diferença estatística nos dois tempos. Portanto, pudemos verificar que o trauma vaginal, tanto pela insuflação como pelo parto natural, aumentam a quantidade de glicosaminoglicanos na uretra após 12 semanas.

Porém, quando analisamos todos os grupos sacrificados com doze semanas entre si, observamos que as quantidades de GAGs totais, de dermatam sulfato e heparam sulfato foram significativamente maiores no grupo em que foi realizada a insuflação vaginal durante a prenhez (grupo cesárea com trauma) em relação a todos os outros.

Estes dados nos surpreenderam e permitiram interessantes observações. Houve alteração no perfil dos glicosaminoglicanos apenas quando o trauma foi provocado durante a prenhez, e somente no grupo avaliado tardiamente. Portanto, parece ocorrer uma alteração na síntese de GAGs como resposta tecidual tardia ao trauma.

Além disso, pudemos observar que um trauma realizado na vagina, de alguma forma compromete também a uretra, alterando a sua matriz extracelular.

Quanto a este aspecto, estes dados confirmam os relatados por Cannon et al (2002), em estudo utilizando o mesmo modelo de trauma vaginal. Estes autores observaram ruptura e afinamento das fibras musculares estriadas uretrais quatro dias após o trauma, e sugeriram que a isquemia uretral causada pela insuflação vaginal poderia explicar estes achados. Postularam também que quadro semelhante poderia ocorrer na uretra de mulheres em trabalho de parto com segunda fase prolongada.

Alterações uretrais também foram relatadas por Resplande et al em 2002, avaliando ratas nove meses após trauma vaginal associado à ooforectomia. Encontraram maior índice de apoptose na submucosa uretral,

além de alterações na forma do músculo liso uretral e aumento do espaço intercelular, com maior depósito de fibras colágenas. Os autores não encontraram estas alterações, especificamente a apoptose, no tecido vaginal, o que os intrigou. Notamos, porém, que os autores associaram o trauma de parto com a ooforectomia, não analisando estes efeitos separadamente. Podemos supor que estas alterações sejam conseqüentes à insuflação vaginal, e não ao hipostrogenismo, visto que não há alterações na vagina. É provável que estes dois tecidos se comportem de maneira diferente em resposta ao trauma.

Rocha (2004) realizou estudo semelhante ao nosso, analisando a uretra de ratas prenhas, ratas virgens e ratas após parto natural e cesárea submetidas ou não a insuflação vaginal. Realizou, após quatro semanas, análise histomorfométrica para quantificação de fibras colágenas, musculares e elásticas, e reação imunohistoquímica para avaliação das terminações nervosas. Encontrou diminuição das fibras nervosas e musculares e aumento de fibras colágenas nos grupos em que houve insuflação vaginal ou parto natural, em relação aos grupos de ratas prenhas, virgens e submetidas a cesárea. O aumento da proporção colágeno/fibra muscular observada no estudo é resultado, segundo o autor, da infiltração de tecido conjuntivo na uretra secundário ao trauma, o que pode comprometer o mecanismo de continência urinária.

Comparando com nossos resultados, observamos que o trauma parece alterar a matriz extracelular da uretra, levando a aumento tanto da quantidade dos glicosaminoglicanos como das fibras colágenas.

Os estudos da matriz extracelular em tecidos humanos são escassos, mas demonstram alterações similares em mulheres com IUE. Falconer et al (1998b) encontraram aumento de proteoglicanos no tecido peri-uretral de mulheres incontinentes na pós-menopausa. Em nosso meio, Feldner et al (2006) registraram quantidade maior de GAGs no tecido peri-uretral de mulheres incontinentes quando comparadas com as continentas.

Observamos que o aumento dos GAGs ocorreu após a insuflação uretral intensa e prolongada, sendo o dermatam sulfato o GAG encontrado em maior quantidade.

Estas alterações só foram observadas na avaliação após doze semanas. Sabemos que apesar da alta prevalência de IUE durante a gravidez e

puerpério, a maioria das mulheres têm remissão dos sintomas após alguns meses. Provavelmente o mecanismo da incontinência nesses casos estaria relacionado a outros fatores, como mecânico e hormonal durante a gravidez, e lesão neuro-muscular após o parto. Estas lesões possivelmente podem ser total ou parcialmente resolvidas, sendo que a incontinência vai persistir ou aparecer em apenas algumas mulheres (Viktrup et al, 1992). Nestes exemplos, a alteração da matriz extracelular por nós observada pode ter alguma implicação.

O dermatam sulfato influencia a fibrilogênese, a organização e aumenta a estabilidade das fibras colágenas. Pode, ainda, ter participação na resistência e elasticidade dos tecidos, sendo geralmente liberado em grandes concentrações durante o reparo de ferimentos. O seu aumento pode estar relacionado à diminuição da complacência dos tecidos, como ocorre na fibrose (Penc et al, 1998).

Nosso estudo permite-nos atribuir ao trauma de parto um aumento nos glicosaminoglicanos sulfatados da uretra. Esta alteração poderia levar a prejuízo das propriedades mecânicas deste tecido, comprometendo, desta forma, o mecanismo de continência urinária. Certamente, há muitos outros fatores envolvidos neste complexo mecanismo, ainda por serem melhor estabelecidos.

Embora na mulher o assoalho pélvico seja submetido à distribuição de forças completamente diferente do modelo animal, acreditamos que as informações adquiridas com este estudo podem ser úteis para o melhor entendimento da patogenia da incontinência urinária. Futuramente, estes conhecimentos poderão ser utilizados para o tratamento precoce, ou até mesmo preventivo da incontinência urinária de esforço.

6 Conclusões

Os resultados permitem-nos concluir:

I- Para os valores de glicosaminoglicanos sulfatados na uretra dos grupos sacrificados quatro dias após o trauma vaginal:

Não houve diferença na quantidade de GAGs totais, DS e HS entre os grupos de ratas nuligestas com ou sem trauma vaginal, ratas pós-parto cesáreo com ou sem trauma vaginal, e ratas pós-parto natural. Houve menor quantidade de GAGs nestes grupos em relação ao grupo de ratas prenhas.

II- Para os valores de glicosaminoglicanos sulfatados na uretra dos grupos sacrificados doze semanas após o trauma vaginal:

Houve aumento da quantidade de GAGs totais, DS e HS na uretra de ratas submetidas a trauma vaginal após parto cesáreo em relação às ratas nuligestas com ou sem trauma vaginal, ratas pós-cesárea sem trauma e pós-parto natural.

III- Comparando-se os resultados das avaliações realizadas quatro dias e doze semanas após o trauma vaginal:

Houve aumento de GAGs totais e de DS nos grupos nuligesta com trauma, cesárea com trauma e parto natural na avaliação de doze semanas em relação à avaliação de quatro dias.

Houve aumento de HS no grupo cesárea com trauma na avaliação de doze semanas em comparação à avaliação de quatro dias.

7 Anexos

Anexo 1- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM para o projeto temático geral onde se inclui o trabalho



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 14 de maio de 2004.
CEP 0475/04

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) CLAUDIA CRISTINA TAKANO
Disciplina/Departamento: Ginecologia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Efeitos do trauma de parto simulado e de hormônios estrogênicos em vagina, bexiga e uretra de ratas adultas".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme estabelecido pelo CEP/UNIFESP, são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Apresentar primeiro relatório parcial em **10/novembro/2004**.
3. Apresentar primeiro relatório parcial em **09/maio/2005**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa".

Anexo 2- Peso seco em gramas do pó cetônico da uretra das ratas dos grupos sacrificados quatro dias após o trauma

GRUPOS						
Ratas n°	A1	B1	C1	D1	E1	F
1	0,0023	0,0016	0,0039	0,0043	0,0046	0,0028
2	0,0016	0,0019	0,0029	0,0032	0,0038	0,0036
3	0,0016	0,0019	0,0018	0,0050	0,0040	0,0040
4	0,0027	0,0032	0,0020	0,0027	0,0065	0,0023
5	0,0023	0,0025	0,0023	0,0018	0,0065	0,0028
6	0,004	0,0026	0,0030	0,0026	0,0058	0,0021
7	0,0033	0,0021	0,002	0,0024	0,0054	0,0013
8	0,002	0,0015	0,0026	0,0031	0,0036	0,0019
9	0,0047	0,0022			0,0049	0,0016
10	0,0034	0,0030			0,0050	0,0028

Anexo 3- Peso seco em gramas do pó cetônico da uretra das ratas dos grupos sacrificados doze semanas após o trauma

GRUPOS					
Ratas nº	A2	B2	C2	D2	E2
1	0,0022	0,002	0,0022	0,0039	0,0017
2	0,0025	0,0016	0,0021	0,0029	0,002
3	0,003	0,0018	0,0027	0,0018	0,002
4	0,0027	0,0024	0,0021	0,002	0,002
5	0,0018	0,0021	0,002	0,0023	0,0018
6	0,0029	0,0017	0,005	0,003	
7		0,003	0,0023		
8		0,0026	0,0033		
9		0,0017	0,0032		
10		0,0018			

Anexo 4- Quantificação de condroitim sulfato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) na uretras de ratas sacrificadas no 20^o dia de prenhez

Rata n ^o	CS
1	0,437
2	0,145
3	0,176
4	0,376
5	0,084
6	0,061
7	0,132
8	0,068
9	0,333
10	0,210
Média	0,273
DP	0,149
EP	0,047

8 Referências

Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardization Sub-committee of the International Continence Society. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187(1): 116-26.

Alberts B, Bray D, Lewis Y, Raff M, Robert K, Watson YD. Junções celulares, adesão celular e a matriz extracelular: A matriz extracelular de animais. In: *Biologia Molecular da Célula*. 3a ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997; p.959-1006.

Allen RE, Hosker GL, Smith AR, Warrell DW. Pelvic floor damage and childbirth: a neurophysiological study. *Br J Obstet Gynaecol* 1990; 97:770-9.

Bali JP, Cousse H, Neuzil E. Biochemical basis of the pharmacological action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 31(1): 58-68.

Baker HJ; Lindsey JR; Weisbroth HS. The laboratory rat - biology and disease. New York : Academic Press, 1979. v.1, cap. 8, p.169-192.

Barbiero EC, Sartori MGF, Girão MJBC, Baracat ECB, Rodrigues de Lima G. Analysis of type I collagen in the parametrium of women with and without uterine prolapse, according to hormonal status. *Int Urogynecol J* 2003; 14:331-4.

Bergman A, Elia G, Cheung D, Perelman N, Nimni ME. Biochemical composition of collagen in continent and stress urinary incontinent women. *Gynecol Obstet Invest* 1994; 37(1): 48-51.

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, et al Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8:365-93.

Berto AGA, Oba SM, Michelacci YM, Sampaio LO. Galactosaminoglycans from normal myometrium and leiomyoma. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 633-37.

Bezerra, LRPS - Influência da gestação e do parto no perfil do ácido hialurônico e dos glicosaminoglicanos sulfatados da uretra de ratas [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2006.

Bezerra LR, Feldner PC, Kati L M, Girão MJ, Sartori MG, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Nader HB, Dietrich CP. Sulfated glycosaminoglycans of the vagina and perineal skin in pre- and postmenopausal women, according to genital prolapse stage. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2004; 15(4): 266-71.

Brown DC, Vogel KG. Characteristics of the in vitro interaction of a small proteoglycan (PG II) of bovine tendon with type I collagen. *Matrix* 1989; 9:468-78.

Burgio KL, Matthews KA, Engel BT. Prevalence, incidence and correlates of urinary incontinence in healthy, middle-aged women. *J Urol* 1991; 146(5): 1255-9.

Cannon TW, Ferguson C, Wojcik EM, Saraga S, et al. Effects of vaginal distension on urethral anatomy and function. *BJU Int* 2002; 90:403–7.

Caplan AJ. Cartilage. *Sci Amer* 1984; 251:82-90.

Cardoso L. Role of estrogens in the treatment of female urinary incontinence. *J Am Geriatr Soc* 1999; 38: 326-32.

Couchman JR, Abrahamson DR, McArthy KJ. Basement membrane proteoglycans and development. *Kidney Int* 1993; 43(1): 79-84.

Damaser M, Broxton-King C, Ferguson C, Kim FJ, Kerns JM. Functional and neuroanatomical effects of vaginal distention and pudendal nerve crush in the female rat. *J Urol* 2003; 170: 1027-31.

Dannecker C, Anthuber C. The effects of childbirth on the pelvic-floor. *J Perinat Med* 2000; 28(3): 175-84.

De Deus JM, Girão MJ, Sartori MG, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Nader HB, Dietrich CP. Glycosaminoglycan profile in bladder and urethra of castrated rats treated with estrogen, progestogen, and raloxifene. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(6): 1654-9.

DeLancey JOL. Structural support of the urethra as it relates to Stress Urinary Incontinence: The hammock hypothesis. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:1713–20.

Dietrich CP. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Braz J Med Biol Res* 1984; 17(1): 5-15.

Dietrich CP, Armelin HA. Sulfated mucopolysaccharides from normal Swiss 3T3 cell line and its tumorigenic mutant ST1: possible role of chondroitin sulfates in neoplastic transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 84(3): 794-801.

Dietrich CP, Montes de Oca H. Surface sulfated mucopolysaccharides of primary and permanent mammalian cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978; Feb 28; 80(4): 805-12.

Dietrich CP, Sampaio LO, Toledo OM, Cassaro CM. Cell recognition and adhesiveness: a possible biological role for the sulfated mucopolysaccharides. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 75(2): 329-36.

Dietrich CP, Sampaio LO, Montes de Oca H, Nader HB. Role of sulfated mucopolysaccharides in cell recognition and neoplastic transformation. *An Acad Brasil Ciênc* 1980; 52: 179-186.

Dimpfl T, Hesse U, Schussler B. Incidence and cause of postpartum urinary stress incontinence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992; 43(1): 29-33.

Diokno AC, Brock BM, Brown MB, Herzog AR. Prevalence of urinary incontinence and other urological symptoms in the noninstitutionalized elderly. *J Urol* 1986; 136(5): 1022-5.

Esko JD. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3:805-16.

Falconer C, Blomgren B, Johansson O, Ulmsten U, Malmstrom A, Westergren-Thorsson G, Ekman-Ordeberg G. Different organization of collagen fibrils in stress-incontinent women of fertile age. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998a; 77(1):87-94.

Falconer C, Ekman-Ordeberg G, Blomgren B, Johansson O, Ulmsten U, Westergren-Thorsson G, Malmstrom A. Paraurethral connective tissue in stress-incontinent women after menopause. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998b; 77(1): 95-100.

Falconer C, Ekman-Ordeberg G, Ulmsten U. Decreased collagen synthesis in stress-incontinent women. *Obstet Gynecol* 1994; 84: 583-6.

Fantl JA, Newman DK, Colling J. Urinary Incontinence Guideline Panel, March 1996. Urinary incontinence in adults: clinical practice guideline. AHCPR Pub. No. 92-0038. Rockville MD: Agency for Health Care Policy and Research, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services.

Feldner Jr PCM, Kati LM, Sartori MG, Baracat EC, Rodrigues de Lima G., Nader HB, Dietrich C, Girão MJBC. Sulfated glycosaminoglycans of the periurethral tissue in women with and without stress urinary incontinence, according to genital prolapse stage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 126(2): 250-4.

Fitzgerald, MP, Mollenhauer J, Hale DS, Benson JT, Brubaker L. Urethral collagen morphologic characteristics among women with genuine stress incontinence. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 1565-74.

Foldspang A, Mommsen S, Lam GW, Elving L. Parity as a correlate of adult female urinary incontinence prevalence. *J Epidemiol Community Health* 1992; 46(6):595-600.

Franco CR, Rocha HA, Trindade ES, Santos IA, Leite EL, Veiga SS, Nader H B, Dietrich CP. Heparan sulfate and control of cell division: adhesion and proliferation of mutant CHO-745 cells lacking xylosyl transferase. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 971-75.

Fraser JR, Laurent UB, Laurent TC. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 1997; 242(1): 27-33.

Gambarini AG, Miyamoto CA, Lima GA, Nader HB, Dietrich, CP. Mitogenic activity of acidic fibroblast growth factor is enhanced by highly sulfated oligosaccharides derived from heparin and heparan sulfate. *Mol Cell Biochem* 1993; 124(2): 121-9.

Gilpin AS, Gosling JA, Smith AR, Warrell DW. The pathogenesis of genitourinary prolapse and stress incontinence of urine. A histological and histochemical study. *BR J Obstet Gynaecol* 1989; 96:15-9.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:609-52.

Jackson SR, Avery NC, Tarlton JF, Eckford SD, Abrams P, Bailey AJ. Changes in metabolism of collagen in genitourinary prolapse. *Lancet* 1996; 347:1658-61.

Jackson S, Barry C, Davies G. Duration of second stage of labour and epidural anaesthesia: effect on subsequent urinary symptoms in primiparous women. *Neurourol Urodyn* 1995; 14: 498-499.

Jackson GW, James DF. The hydrodynamic resistance of hyaluronic acid and its contribution to tissue permeability. *Biorheology* 1982; 19(1/2): 317-30.

Jeronimo SM, Sales AO, Fernandes MZ, Melo FP, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Glycosaminoglycan structure and content differ according to the origins of human tumors. *Braz J Med Bio Res* 1994; 27: 2253-8.

Kanwar Y S, Farquhar M G. Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(3):1303-7.

Kati, LM. Glicosaminoglicanos sulfatados no paramétrio e fórnice vaginal no prolapso uterino, no menacme e na pós-menopausa [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2004

Keane DP, Sims TJ, Abrams P, Bailey AJ. Analysis of collagen status in premenopausal nulliparous women with genuine stress incontinence. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 994-998.

Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 443-475.

Kuo H C. Effects of vaginal trauma and oophorectomy on the continence mechanism in rats. *Urol Int* 2002; 69(1):36-41.

Levin J. Estatística aplicada a ciências humanas. 2ª ed. São Paulo: Harbra; 1987; p. 175-92.

Lin A S, Carrier S, Morgan D M, Lue T F. Effect of simulated birth trauma on the urinary continence mechanism in the rat. *Urology* 1998; 52(1): 143-51.

Lopes CC, Dietrich CP, Nader HB. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res.* 2006 Feb;39(2):157-67. Epub 2006 Feb 2.

Mandarim-de-Lacerda CA. Manual de Quantificação Morfológica: Morfometria, Alometria, Estereologia. 2º ed. 1994.

Martins, JRM. Estrutura anômala do condroitim sulfato urinário de pacientes com câncer: possível marcador para o diagnóstico de neoplasias. [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 1996.

Martins JRM, Gadelha ME, Fonseca S M, Sampaio LO, De L Pontes PA, Dietrich CP, Nader HB. Patients with head and neck tumors excrete a chondroitin sulfate with a low degree of sulfation. A new tool for diagnosis and follow-up of cancer therapy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122: 115-18.

Mathews HB, Anderson MW. Effect of chlorination on the distribution and excretion of polychlorinated biphenyls. *Drug Metab Dispos* 1975; 3(5):371-80.

Merle B, Durussel L, Delmas PD. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycans side chain. *J Cell Biochem* 1999; 75:538.

Mitrano PGG. Avaliação da expressão dos glicosaminoglicanos na bexiga e na uretra de ratas durante e após a prenhez [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2006.

Moreira CR, Lopes CC, Cuccovia IM, Porcionatto MA, Dietrich CP, Nader HB. Heparan sulfate and control of endothelial cell proliferation: increased synthesis during the S phase of the cell cycle and inhibition of thymidine incorporation induced by ortho-nitrophenyl-beta-D-xylose. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Aug 4;1673(3):178-85.

Netter J, Wasferman W, Kutner MH. Applied linear statistical models: regression, analysis of variance and experimental designs. 3ª ed. Homewood: Richard D. Irving; 1996; p.1181.

Norton PA. Pelvic floor disorders: the role of fascia and ligaments. *Clin Obstet Gynecol* 1993; 36:926-38.

Nurcombe V, Smart CE, Chipperfield H, Cool SM, Boill YB, Hondermarck H. The proliferative and migratory activities of breast cancer cells can be differentially regulated by heparan sulfates. *J Biol Chem* 2000; 275(39): 30009-18.

Penc SF, Pomahac B, Winkler T, Dorschner RA, Eriksson E, Herdon M, Gallo R L. Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J Biol Chem* 1998; 273(43): 28116-21.

Peschers U, Schaer G, Anthuber C, Delancey JO, Schuessler B. Changes in vesical neck mobility following vaginal delivery. *Obstet Gynecol* 1996; 88(6): 1001-6.

Peters CA, Freeman MR, Fernandez CA, et al. Dysregulated proteolytic balance as the basis of excess extracellular matrix in fibrotic disease. *Am J Physiol* 1997; 272:1960.

Petros PE, Ulmsten UI. An integral theory of female urinary incontinence. Experimental and clinical considerations; *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1990; 153:7-31.

Porcionatto MA, Moreira C R, Lotif C F, Armelin H A, Dietrich C P, Nader H B. Stimulation of heparan sulfate proteoglycan synthesis and secretion during G1 phase induced by growth factors and PMA. *J Cell Biochem* 1998; 70(4): 563-72.

Porcionatto MA, Nader H B, Dietrich C P. Heparan sulfate and cell division. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(5): 539-44.

Pregazzi R, Sartore A, Troiano L, et al. Post-partum urinary symptoms: prevalence and risk factors. *Obstet Gynecol* 2002; 103:179-82.

Rechberger T, Donica H, Baranowski W, Jakowicki J. Female urinary stress incontinence in terms of connective tissue biochemistry. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1993; 49: 187-91.

Resplande J, Gholami SS, Graziottin TM, Rogers R, Lin C, Leng W, Lue TF – Long-term effect of ovariectomy and simulated birth trauma on the lower urinary tract of female rats. *J Urol*. 2002; 168: 323-30.

Retzky S S, Rogers R M Jr. Urinary incontinence in women. *Clin Symp* 1995; 47(3): 2-32.

Ribeiro RM, Guidi, H.G.C; Anzai, R.Y. Incontinência urinária de esforço: diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Med* 1990; 47: 553-61.

Robbins SL, Cotran R.S, Kumar VK. Extracellular matrix and cell-matrix interactions. In: Robbins SL, Cotran RS (eds.): *Robbins Pathologic Basis of Diseases*. 6a ed. W.B. Saunders Company, 1999; p.99-105.

Roberts RO, Jacobsen SJ, Rhodes T, Reilly WT, Girman CJ, Talley NJ, Lieber MM. Urinary incontinence in a community-based cohort: prevalence and healthcare-seeking. *J Am Geriatr Soc* 1998;6:467-72.

Rocha, MA. Estudo histomorfométrico e imunohistoquímico da uretra de ratas adultas após diferentes formas de parto [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina; 2004.

Rortveit G, Daltveit A K, Hannestad Y S, Hunskaar S. Norwegian EPINCONT study. Urinary incontinence after vaginal delivery or cesarean section. *NEJM* 2003; 348:900–7.

Rortveit G, Hannestad YS, Daltveit AK, Hunskaar S. Age- and type-dependent effects of parity on urinary incontinence: the Norwegian EPINCONT study. *Obstet Gynecol* 2001; 98:1004–10.

Rud T, Andersson KE, Asmussen M, Hunting A, Ulmsten U. Factors mainting the intraurethral pressure in women. *Invest Urol* 1980; 17: 343-7.

Salmivirta M, Lidholt K, Lindahl U. Heparan sulfate: a piece of information. *FASEB J* 1996; 10(11): 1270-9.

Sampaio LO, Dietrich CP. Changed of acid mucopolysacaccharides and mucopolysacaccharidases during fetal development. *J Biol Chem* 1981; 256:9205-10.

Sievert K D, Bakircioglu E, Tsai T, Nunes L, Lue TF. The effect of labor and/or ovariectomy on rodent continence mechanism-the neuronal changes. *World J Urol* 2004; 22(4): 244-50.

Sievert K D, Bakircioglu E, Tsai T, Dahms ES, Nunes L, Lue TF. The effect of simulated birth trauma and/or ovariectomy on rodent continence mechanism. Part I: functional and structural change. *J Urol* 2001; 166: 311-317.

Scott JE, Oxford CR. Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the D band in the gap region. *Biochem J* 1981;197:213-16.

Smith ARB, Hosker GL, Warrell DW. The role of partial denervation of the pelvic floor in the aetiology of genitourinary prolapse and stress incontinence of urine. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96:24-28.

Snooks SJ, Setchell M, Swash M, Henry M M. Injury to innervation of pelvic floor sphincter musculature in childbirth. *Lancet* 1984;.2:546-50.

Sultan AH, Kamm MA, Hudson CN. Pudendal nerve damage during labour: prospective study before and after childbirth. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101:22-8.

Summit R, Bent A, Ostergard D. The pathophysiology of genuine stress incontinence. *Int Urogynecol J* 1990; 1: 12-7.

Takano CC, Girão MJBC, Sartori MGF, Simões MJ. Analysis of collagen in parametrium and vaginal apex of women with and without uterine prolapse. *Int Urogynecol J*. 2002;13: 342-5.

Thom DH, van den Eeden SK, Brown JS. Evaluation of parturition and other reproductive variables as risk factors for urinary incontinence in later life. *Obstet Gynecol* 1997; 90:983–8.

Tovari J, Paku S, Raso E, Pogany G, Kovalszky I, Ladanyi A, Lapis K, Timar J. Role of sinusoidal heparan sulfate proteoglycan in liver metastasis formation. *Int J Cancer* 1997; 71(5): 825-31.

Ulmsten U. Some reflections and hypotheses on the pathophysiology of female urinary incontinence. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; Supplement 76: 166: 3-8.

Ulmsten U, Ekman G, Giertz G, Malmström A. Different biochemical composition of connective tissue in continent and stress incontinent women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1987; 66: 455-7.

Van Geelen JM, Lemmens WAJG, Eskes TKAB, Martin Ch B The urethral pressure profile in pregnancy and after delivery in healthy nulliparous women. *Am J Obstet Gynaecol* 1982; 144:636–649.

Viktrup L, Lose G, Rolff M, Barfoed K. The symptom of stress incontinence caused by pregnancy or delivery in primiparas. *Obstet Gynecol* 1992; Jun;79(6): 945-9.

Wagner TH, Hu TW. Economic costs of urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 1998; 9(3):127-8.

Wielenga VJ, Van der Voort R, Taher TE, Smit L, Beuling EA, Van Krimpen C, Spaargaren M, Pals ST. Expression of c-Met and heparan-sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer. *Am J Pathol* 2000; 157(5): 1563-73.

Wilson P D, Herbison R M, Herbison G P. Obstetric practice and the prevalence of urinary incontinence three months after delivery. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103(2): 154-61.

Wolanska M, Sobolewski K, Drozdewicz M, Bankowski E. Extracellular matrix components in uterine leiomyoma and their alteration during the tumour growth *Mol Cell Biochem* 1998; 189:145-52.

Yurchenco PD, O'Rear JJ: Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 674: 81.

9 Abstract

Objective: This study was undertaken to evaluate the sulfated glycosaminoglycan (GAGs) profile in the urethra of adult female rats that had a cesarean section, vaginal delivery or intravaginal ballooning by comparing the results 4 days and 12 weeks after the procedures. **Methods:** 110 rats were divided into 11 groups. Groups A1 and A2: nuliparous rats; Groups B1 and B2: nuliparous rats that had vaginal ballooning; Group C1 and C2: primiparous rats that had cesarean section without vaginal ballooning; Groups D1 and D2: primiparous rats that had cesarean section followed by vaginal ballooning; Groups E1 and E2: primiparous rats that had vaginal delivery and Group F: pregnant rats sacrificed on the 20th day. Groups A1, B1, C1, D1 and E1 were sacrificed four days after the procedures and groups A2, B2, C2, D2 and E2 were sacrificed 12 weeks after the procedures. Thereafter, the urethras of the animals were removed and processed to yield a dry powder from which the GAGs content was determined by densitometry following agarose gel electrophoresis. **Results:** Dermatan sulfate (DS) was the predominant glycosaminoglycan in all groups. Chondroitin sulfate (CS) was found only in group F (pregnant rats). In the evaluation four days after the procedures, results showed a significant increase in total GAGs in group F when compared to groups B1, C1, D1 and E1; a significant increase in HS in group F when compared to groups A1, B1, C1, D1 and E1; and a significant increase in DS in group F when compared to group E1. The evaluation 12 weeks after the procedures indicated a significant increase in total GAGs, DS and HS in group D2 when compared to groups A2, B2, C2 and E2. **Conclusions:** There was a significant increase in total GAGs, DS and HS in the urethra of rats that had cesarian section plus intravaginal ballooning in the evaluation 12 weeks after the procedures, in comparison with nuliparous rats with or without ballooning, primiparous rats that had vaginal delivery and rats that had cesarian section without ballooning. The evaluation 4 days after the procedures showed no difference in the level of GAGs between all the groups, except for the group of pregnant rats, which showed a significant increase of GAGs.