



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

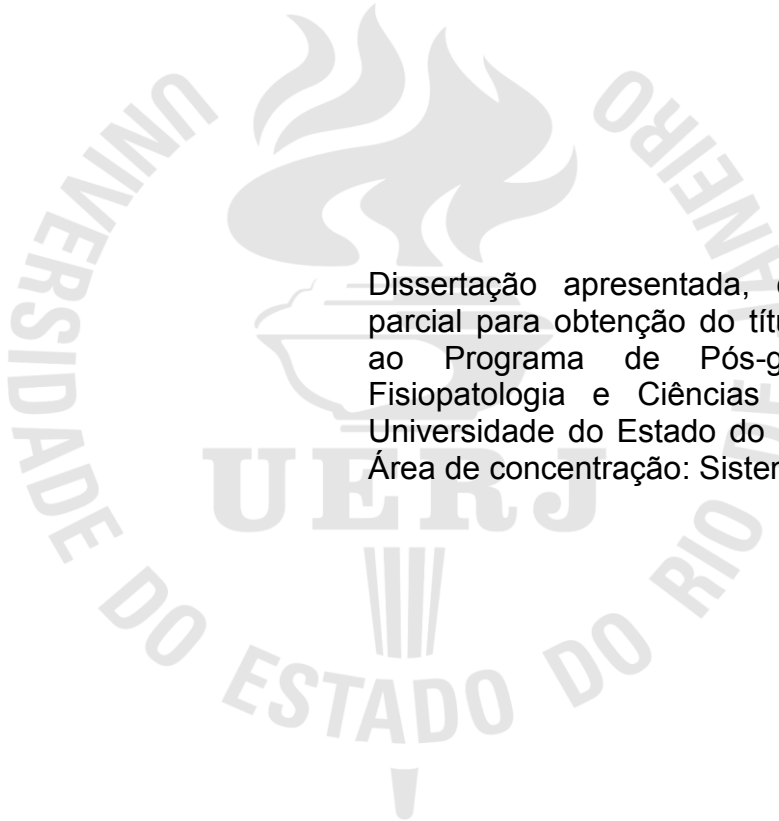
Suelen Freitas Costa

**Defeitos do tubo neural causam alterações estruturais no ureter?
Estudo em fetos humanos**

Rio de Janeiro
2013

Suelen Freitas Costa

Defeitos do tubo neural causam alterações estruturais no ureter? Estudo em fetos humanos



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

Orientador : Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Rio de Janeiro

2013

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

C837 Costa, Suelen Freitas.
Defeitos do tubo neural causam alterações estruturais no ureter? Estudo em fetos / Suelen Freitas. – 2013.
59 f.

Orientador: Luciano Alves Favorito.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Ureter – Teses. 2. Ureter - Embriologia. 3. Ureter – Anatomia e histologia. 4. Feto – Anatomia. 5. Anencefalia. I. Favorito, Luciano Alves. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 611.617

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

Assinatura

Data

Suelen Freitas Costa

Defeitos do tubo neural causam alterações estruturais no ureter? Estudo em fetos humanos

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

Orientador:

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. João Paulo M. de Carvalho
Hospital Federal Cardoso Fontes -

Rio de Janeiro

2013

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luciano pela oportunidade e por todos os ensinamentos e contribuições para este trabalho.

A todos os Professores do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, em especial Francisco Sampaio e Waldemar Costa, por estes anos de paciência e dedicação.

Aos colegas, alunos e técnicos da Unidade de Pesquisa Urogenital pela parceria durante a execução do projeto.

RESUMO

COSTA, Suelen Freitas. *Defeitos do tubo neural causam alterações estruturais no ureter? Estudo em fetos humanos*. 2013. 62f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Anencefalia é o defeito do tubo neural mais severo. A morfologia do ureter de fetos anencéfalos é desconhecida. O objetivo deste trabalho é analisar a estrutura do ureter de fetos humanos normais e anencéfalos (FHA). Nós estudamos 16 ureteres de 8 fetos sem anomalias congênitas (4 masculinos e 4 femininos) com idades entre 16 e 27 semanas pós concepção (SPC) e 14 ureteres de 7 FHA (4 masculinos e 3 femininos) com idades entre 19 e 33 SPC. Os ureteres foram dissecados e emblocados em parafina. Foram feitos cortes com 5 μm e depois corados com Tricrômico de Masson, para quantificação das células de músculo liso (CML) e determinação da área da luz do ureter, espessura e diâmetro. As amostras também foram coradas com Resorcina Fucsina de Weigert (para observação das fibras elásticas) e Vermelho de Picro Sirius com polarização e análise imunohistoquímica das fibras do colágeno tipo III. Os dados da quantificação do músculo foram expressos em densidade volumétrica (Vv-%). As imagens foram capturadas com microscópio Olympus BX51 e câmera Olympus DP70. A análise morfológica da área do lúmen, espessura e diâmetro foram feitas usando o software Image J. As médias foram comparadas usando o teste t não pareado ($p < 0.05$). O epitélio do ureter estava bem preservado em ambos os grupos, e não houve diferença entre os grupos. Não observamos fibras do sistema elástico em qualquer ureter analisados. Concentração de músculo liso (Vv) não diferiram significativamente ($p = 0,4413$) em FHA ($12\% \pm 1,628$) e grupo controle ($13,51\% \pm 0,9231$). A área de luz ureteral foi significativamente menor ($p = 0,0341$) em FHA ($6365\mu\text{m} \pm 1,282$), quando comparado ao grupo controle ($20,170 \pm 5,480$ mM). O diâmetro ureteral foi significativamente menor ($p = 0,0294$) em FHA ($166.7\mu\text{m} \pm 10,99$) quando comparado ao grupo controle ($240 \pm 26,6$ mM). A espessura ureteral foi significativamente menor ($p = 0,0448$) em FHA ($30.57\mu\text{m} \pm 2,034$), quando comparado ao grupo controle ($7,453 \pm 47.49\mu\text{m}$). Colágeno tipo III foi observado em maior quantidade nos ureteres da FHA. Alterações estruturais ureterais nos fetos anencéfalos foram significativas em nosso estudo. O ureter de fetos com anencefalia mostraram mais concentração de colágeno tipo III, menor diâmetro, área e espessura. Nervos ureterais em FHA podem ser modificados devido a lesão cerebral com conseqüente dano no controle dos nervos ureterais. Isto pode levar a alterações estruturais no ureter de fetos anencéfalos.

Palavras-chave: Ureter. Feto humano. Anencefalia.

ABSTRACT

Anencephaly is the most severe neural tube defect. Morphology of the ureter in anencephalic fetuses is unknown. The objective of this paper is to analyze the structure of the ureter in normal and anencephalic human fetuses (AHF). We studied 16 ureters from 8 fetuses without congenital anomalies (4 male and 4 female) aged 16 to 27 weeks post-conception (WPC) and 14 ureters from 7 AFH (4 male and 3 female) aged 19 to 33 WPC. The ureters were dissected and embedded in paraffin, from which 5 μ m thick sections were obtained and stained in Masson trichrome, to quantify smooth muscle cells (SMC) and to determine the ureteral lumen area, thickness and diameter. The samples were also stained in Weigert Resorcin Fuchsin (to observe elastic fibers) and Picro-Sirius Red with polarization and immunohistochemistry analysis of the collagen type III fibers to observe collagen. Stereological analysis of SMC was performed in sections. Data were expressed as volumetric density (Vv-%). The images were captured with Olympus BX51 microscopy and Olympus DP70 camera. The stereological analysis and the ureteral lumen area, thickness and diameter were done using the software Image Pro and Image J. Means were statistically compared using the unpaired t-test ($p < 0.05$). The ureteral epithelium was well preserved in the anencephalic and control groups without differences in the two groups. We did not observe elastic system fibers in any ureter analyzed. Smooth muscle concentration (Vv) did not differ significantly ($p=0.4413$) in AFH ($12\% \pm 1.628$) and control group ($13.51\% \pm 0.9231$). The ureteral lumen area was significantly smaller ($p=0.0341$) in AFH ($6365\mu\text{m}^2 \pm 1282$) when compared to control group ($20170 \mu\text{m}^2 \pm 5480$). The ureteral diameter was significantly smaller ($p=0.0294$) in AFH ($166.7\mu\text{m} \pm 10.99$) when compared to control group ($240 \mu\text{m} \pm 26.6$). The ureteral thickness was significantly smaller ($p=0.0448$) in AFH ($30.57\mu\text{m} \pm 2.034$) when compared to control group ($47.49\mu\text{m} \pm 7.453$). Type III collagen was observed in a higher quantity in ureters of AFH. Structural ureteral alterations in AFH were significant in our study. The ureter in fetuses with anencephalia showed more type III collagen concentration, smaller diameter, area and thickness. Ureteral nerves in AFH could be modified due to cerebral lesions with consequent brain control damage in ureteral nerves. This could lead to structural alterations in anencephalic ureter fetuses.

Keywords: Ureter. Human fetuses. Anencephalia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A a D - Esquema evidenciando a obliteração e a recanalização do ureter durante o desenvolvimento embrionário	14
Figura 2 -	Bloco do sistema urogenital de um feto do segundo trimestre gestacional com duplicação completa do ureter esquerdo	15
Figura 3 -	Fetos femininos em bom estado de conservação e sem anomalias aparentes	17
Figura 4 -	Fetos anencéfalos	18
Figura 5 -	Demonstração da obtenção da medida do pé de um feto com auxílio de um paquímetro de precisão	18
Figura 6 -	Região retroperitoneal de um feto anencéfalo	19
Figura 7 -	Demonstração da mensuração da área do lúmen ureteral	20
Figura 8 -	Demonstração do método utilizado para o cálculo do diâmetro	22
Figura 9 -	Demonstração do método utilizado para o cálculo da espessura da parede do ureter	23
Figura 10 -	Demonstração do método utilizado para quantificação do músculo na parede do ureter	24
Figura 11 -	A a B - Fotomicrografia do epitélio ureteral de fetos do gupo controle e anencéfalo	27
Figura 12 -	A a C - Gráfico da área do lúmen, diâmetro e espessura do ureter de feto dos grupos anencéfalo e controle	28
Figura 13 -	A a B – Fotomicrografia evidenciando a diminuição na área da luz do ureter, no diâmetro e na espessura da parede do ureter no feto anencéfalo	29
Figura 14 -	Gráfico da quantificação de músculo no ureter de fetos dos grupos anencéfalo e controle	30
Figura 15 -	A a B - Fotomicrografia da musculatura do ureter de fetos do grupo controle e anencéfalo	31
Figura 16 -	Fotomicrografia de imunomarcção para elastina no ureter de fetos do grupo controle e anencéfalo	33

Figura 17 - A a D - Fotomicrografia da organização do colágeno no ureter 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores das médias e desvios-padrão das concentrações de hidroxiprolina por mg de tecido seco	35
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAB – Diamino-benzidina tetrahydrocloridro

HCL – Ácido clorídrico

µg – Micrograma

mg – Miligrama

SPC – Semana pós-concepção

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	EMBRIOLOGIA DO URETER	13
2	OBJETIVO GERAL	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Análise Morfológica	19
3.1.1	<u>Área do lúmen</u>	20
3.1.2	<u>Diâmetro e espessura</u>	21
3.1.3	<u>Densidade muscular</u>	24
3.1.4	<u>Elastina</u>	25
3.1.5	<u>Colágeno</u>	25
3.2	Análise Estatística	25
4	RESULTADOS	26
4.1	Epitélio	26
4.2	Área da Luz, diâmetro e espessura	28
4.3	Densidade muscular	30
4.4	Elastina	32
4.5	Colágeno	34
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO A - Comitê de ética em pesquisa	44
	ANEXO B – Protocolo para morfometria de fetos	45
	ANEXO C – E-mail com a submissão do artigo	46
	ANEXO D – Do neural tube defects lead to structural alterations in the human ureter? Study in anencephalic fetuses	47

INTRODUÇÃO

Os defeitos do tubo neural estão entre as anomalias mais comuns do sistema nervoso central, com uma incidência de 1:1000 [1]. A anencefalia é a anomalia mais grave do sistema nervoso central, resultante do não fechamento do tubo neural na base do crânio que ocorre entre a terceira e quarta semanas após a concepção, levando a um mal-desenvolvimento dos ossos que formam o crânio. O cérebro fica incompleto e o tecido cerebral remanescente permanece exposto. O encéfalo se apresenta sem parte ou sem todo o cérebro e o tecido encefálico remanescente é freqüentemente lesado pela exposição ao líquido amniótico [2].

A anencefalia é invariavelmente letal, mas alguns anencéfalos nascem vivos com cérebro rudimentar. A ausência de um cérebro funcional deixa os anencéfalos incapazes de ter consciência e de sentir dor, embora os reflexos do tronco cerebral possam ocasionar ações como respirar e ocasionalmente respostas ao som e ao toque. Anencéfalos recém-nascidos não são viáveis ou tratáveis e a sua sobrevivência é medida em horas ou dias [3].

A patogenia da anencefalia ainda é controversa. Uma falha no fechamento do tubo neural ou uma reabertura do tubo neural após o seu fechamento podem ser responsáveis pela origem da anencefalia. Alguns estudos sugerem que a anencefalia se origina da exencefalia, na qual o tecido cerebral não coberto pelas meninges, pelo crânio e pela pele é progressivamente destruído no útero [4].

A partir da análise histológica do tecido de fetos normais e anencéfalos, poderemos avaliar futuros métodos de substituição tecidual, em específico do trato urinário, com o objetivo de avaliar modelos de estudo ou doadores teciduais.

A utilização de órgãos de anencéfalos pode ser promissora, uma vez que a utilização do tecido destes poderia ajudar uma população específica conferindo uma sobrevivência a uma criança invariavelmente doente que, em última análise, seria um adulto produtivo [5,6]. No entanto, fetos anencéfalos não preenchem os critérios existentes para morte encefálica restando à utilização destes tecidos, ser uma decisão exclusiva dos familiares e das partes envolvidas [7].

Atualmente, no Brasil, tramita no congresso nacional um projeto de lei regulamentando o aborto e, conseqüentemente, a utilização dos tecidos de fetos anencéfalos ainda com parecer final a ser proferido pelo Supremo Tribunal Federal.

Produtos de fetos anencéfalos somente podem ser utilizados após a assinatura de um termo de consentimento dos pais e terem sido provenientes de um abortamento legal ou óbito neonatal [8].

Apesar dos conflitos éticos, a literatura mostra vários trabalhos com a utilização de órgãos transplantados de fetos anencéfalos [9, 10, 11, 7]. A estrutura dos órgãos de anencéfalos é praticamente desconhecida onde, recentemente, pesquisas com a análise da morfologia da bexiga [12], dos rins [13] e do pênis [14] foram publicadas.

O uso da engenharia tecidual em ureter de fetos anencéfalos seria potencialmente útil nos casos de técnicas de reconstrução cirúrgica, especialmente com tecidos autólogos. Descreveremos a seguir alguns aspectos referentes à embriologia do ureter que serão importantes para o desenvolvimento de nosso estudo.

1 EMBRIOLOGIA DO URETER

O sistema coletor do rim e o ureter se originam a partir do broto uretérico, uma evaginação dorsal do ducto mesonéfrico, em torno do vigésimo oitavo dia pós-concepção [15,16]. O broto uretérico apresenta uma porção superior dilatada e uma porção inferior afilada. A porção dilatada do broto uretérico origina a pelve renal e a sua porção inferior origina o ureter [17].

Desde o início do seu desenvolvimento até o trigésimo quinto dia pós-concepção o ureter se encontra patente em toda a sua extensão [16]. No entanto, entre o trigésimo sétimo e o quadragésimo dia pós-concepção a luz do ureter se oblitera, ficando patente em sua porção média [16] (Figura 1). Após o quadragésimo dia a luz do ureter se estende rapidamente em direção cranial e caudal e novamente o ureter fica patente (Figura 1).

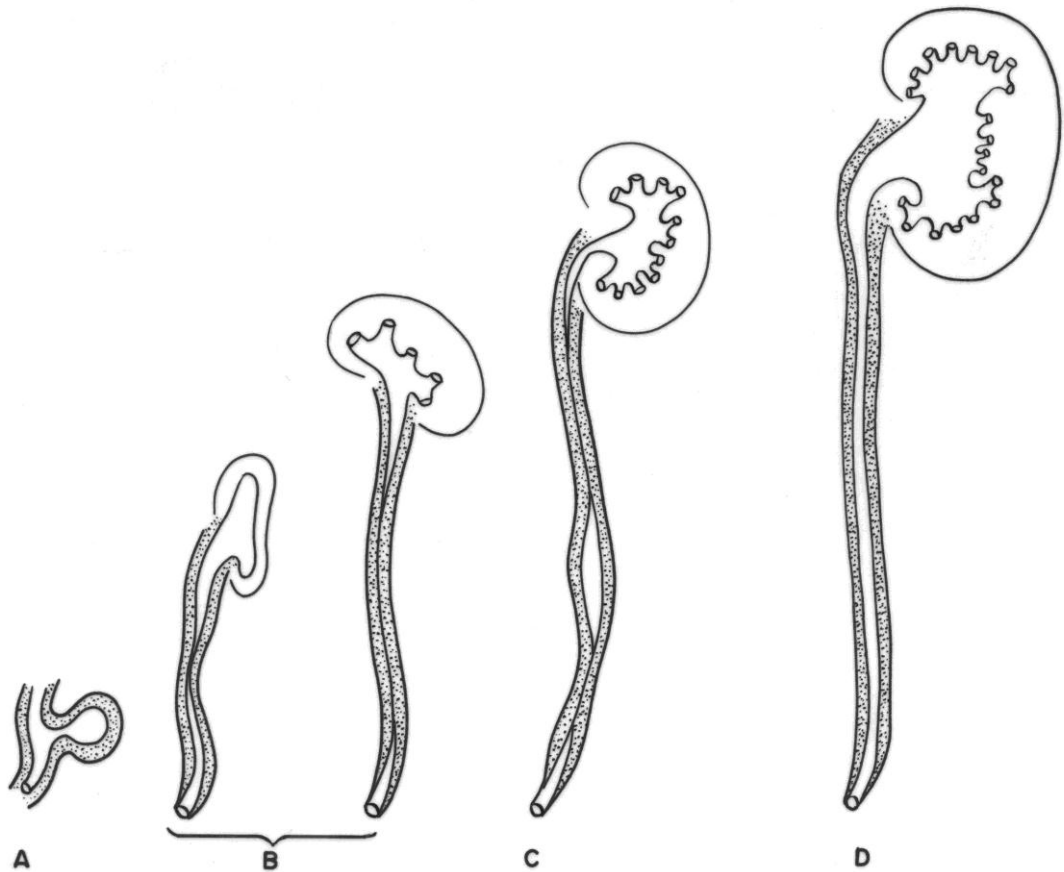


Figura 1 - Esquema evidenciando a obliteração e a recanalização do ureter durante o desenvolvimento embrionário. A) Broto uretérico se originando do ducto mesonéfrico, com 28 dias pós-concepção; B) Entre os dias 37 e 40 pós-concepção a luz do ureter é progressivamente obliterada C) A luz do ureter começa a ficar patente novamente, iniciando-se por sua porção média; D) Após o 40 dia pós-concepção a luz do ureter está novamente patente em toda a sua extensão.

As anomalias de desenvolvimento do ureter ocorrem em cerca de 10% dos pacientes urológicos [18]. As anomalias mais comuns são as duplicações parcial e total, os orifícios ectópicos, as ureteroceles, a incompetência da junção uretero-vesical, causando o refluxo vésico-ureteral e as obstruções intrínsecas do ureter (Figura 2).

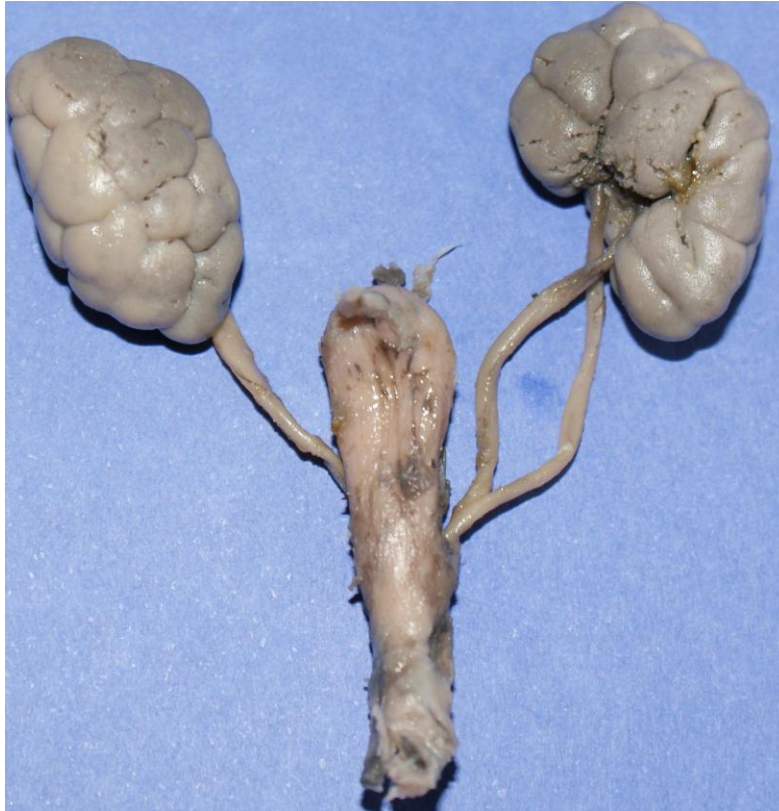


Figura 2 - Bloco do sistema urogenital de um feto do segundo trimestre gestacional com duplicação completa do ureter esquerdo.

As obstruções ureterais congênitas são mais freqüentes na junção pielo-ureteral e na junção uretero-vesical. Segundo Alcaraz [19] as obstruções ureterais congênitas podem ser divididas em dois grandes grupos: obstruções ureterais intrínsecas e obstruções da junção uretero-vesical. A obstrução da junção uretero-vesical ocorreria devido à persistência da membrana uretero-vesical (membrana de Chwalla) que oclui essa região temporariamente entre o trigésimo sétimo e o quadragésimo terceiro dia pós-concepção [20].

Com oito semanas pós-concepção o ureter é um tubo patente, no entanto sem musculatura lisa [16]. O desenvolvimento da camada muscular do ureter se inicia após a passagem de urina por essa estrutura, fato que estimularia a miogênese, o que ocorre em torno da décima segunda semana pós-concepção [16].

2 OBJETIVO

Estudos da estrutura do ureter fetal são escassos na literatura. A morfologia do ureter de fetos anencéfalos é desconhecida. O objetivo do presente estudo é comparar a morfologia do ureter de fetos anencéfalos através de métodos histológicos e bioquímicos com a finalidade de avaliar se o ureter de fetos anencéfalos é similar aos fetos sem anomalias, podendo ser utilizado no futuro como modelo para estudos biológicos e de transplante tecidual.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado na unidade de pesquisa Urogenital, e foi aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) com o protocolo número 2585/2010 (Anexo A).

Foram estudados 16 ureteres obtidos de 8 fetos sem anomalias (4 masculinos e 4 femininos) (Figura 3) e 14 ureteres de 7 fetos anencéfalos (4 masculinos e 3 femininos) (Figuras 4). Não observamos alterações aparentes do aparelho urogenital em nenhum dos fetos estudados. Todos os fetos estudados se encontravam em bom estado de conservação.



Figura 3 - A figura evidencia dois fetos femininos em bom estado de conservação e sem anomalias aparentes.



Figura 4 - A figura evidencia três fetos anencéfalos utilizados em nosso estudo.

A idade gestacional do feto foi determinada em semanas pós-concepção (SPC), de acordo com o critério de comprimento do maior pé. Foram feitas 3 medidas de cada um dos pés, direito e esquerdo (Figura 5). Em seguida foi feita a média entre as 3 medidas de cada um dos pés. Aquele que apresentou a maior média foi utilizado para determinação da idade gestacional.

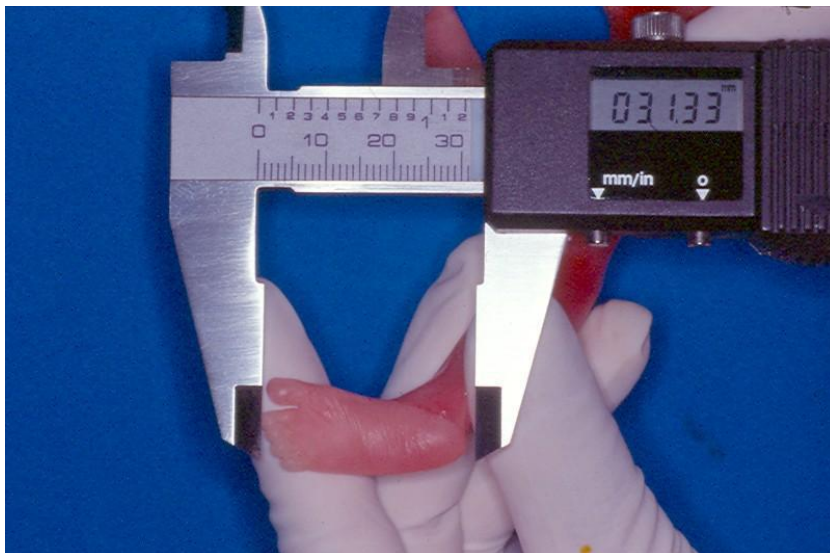


Figura 5 - A figura evidencia a obtenção da medida do pé de um feto com auxílio de um paquímetro de precisão.

Atualmente, o critério do comprimento do pé é considerado o parâmetro mais aceito para calcular a idade gestacional [21, 22, 23, 24, 25].

Os fetos foram também avaliados quanto comprimento vértice-cóccix e o peso do corpo imediatamente antes da dissecação, e todas as medidas foram tomadas pelo mesmo observador. Todos esses dados foram anotados em protocolo de pesquisa próprio (Anexo B)

Após as medidas, os fetos foram dissecados e os ureteres retirados (Figura 6).

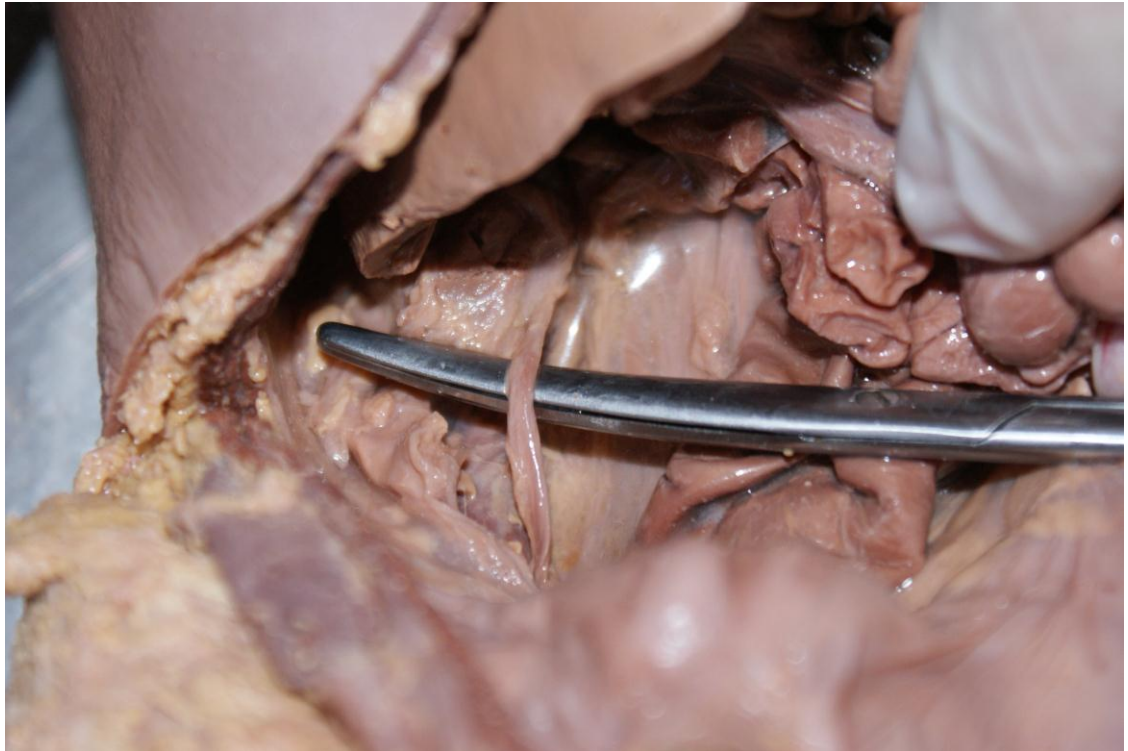


Figura 6 - A figura evidencia a região retroperitoneal de um feto anencéfalo com 30 semanas. Podemos observar o ureter direito dissecado.

3.1 Análise Morfológica

O ureter foi separado das outras estruturas e fixado em formalina tamponada 10%. Realizou-se processamento histológico de rotina para inclusão em parafina e, em seguida foram feitos cortes de 5 μ m de espessura. Foram analisados a área da luz do ureter, o tecido muscular, o colágeno, e a elastina através de métodos histoquímicos e imunohistoquímicos.

Os cortes foram corados com Hematoxilina-eosina para verificar a integridade do material. Foi utilizado o Tricrômico de Masson para quantificar o tecido muscular e para determinar a área da luz do ureter e Vermelho de Picro Sirius com polarização para observação dos diferentes tipos de colágeno.

Os cortes foram observados em um microscópio de luz Olympus acoplado a uma câmara de vídeo marca Olympus, sendo a imagem dos campos microscópicos transmitida para um monitor. As imagens foram digitalizadas em aumentos de 40x e 400x utilizando o software Image Pro express e analisadas através do software ImageJ versão 1.42; (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Foram capturados 25 campos de cada feto, e esses campos foram analisados através do programa ImageJ.

3.1.1 Área do lúmen

Para o cálculo da área luminal do ureter foram usados cortes corados pelo Tricrômico de Masson. Os cortes foram analisados com um aumento de 40x. A área do lúmen foi obtida através da ferramenta “freehand selections” do programa ImageJ (Figura 7).

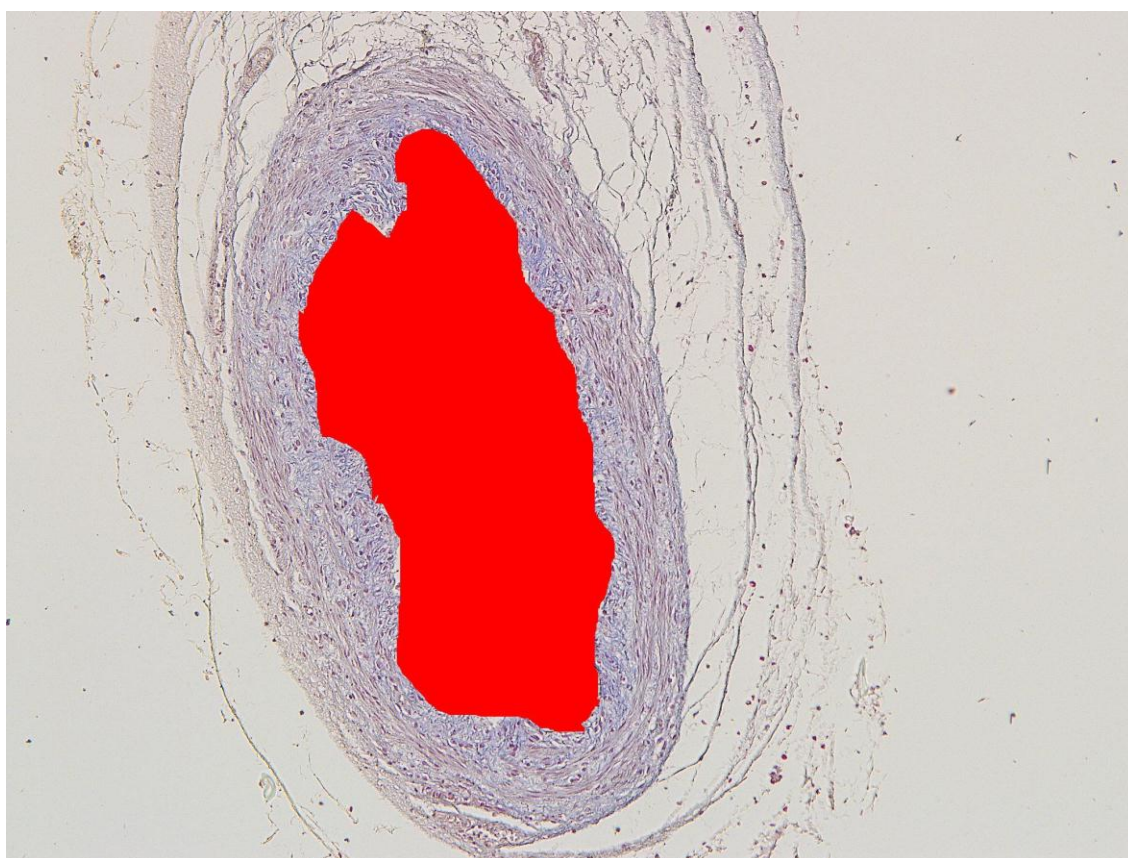


Figura 7 - A figura demonstra a mensuração da área do lúmen ureteral. A área em vermelho representa a área do lúmen do ureter que foi calculada. Fotomicrografia de ureter de feto sem anomalia corado com Tricrômico de Masson,40x.

3.1.2 Diâmetro e espessura

Para a análise do diâmetro e da espessura da parede foram usados cortes corados pelo Tricrômico de Masson. Os cortes foram analisados com um aumento de 40x. O diâmetro foi obtido através da ferramenta “Straight line selections” do programa ImageJ. Foram feitas 2 medidas de modo que estas se encontram próximas ao centro. E depois foi feita a média das medidas (Figura 8).



Figura 8 - A figura evidencia o método utilizado para o cálculo do diâmetro. As linhas em verde representam as medidas que foram calculadas para obtenção da média. Fotomicrografia do ureter de feto sem anomalia corado com Tricrômico de Massom, 40x.

Para a mensuração da espessura da parede foram feitas 10 medidas distribuídas por toda a extensão do material. E depois feita a média para obtenção do resultado (Figura 9).

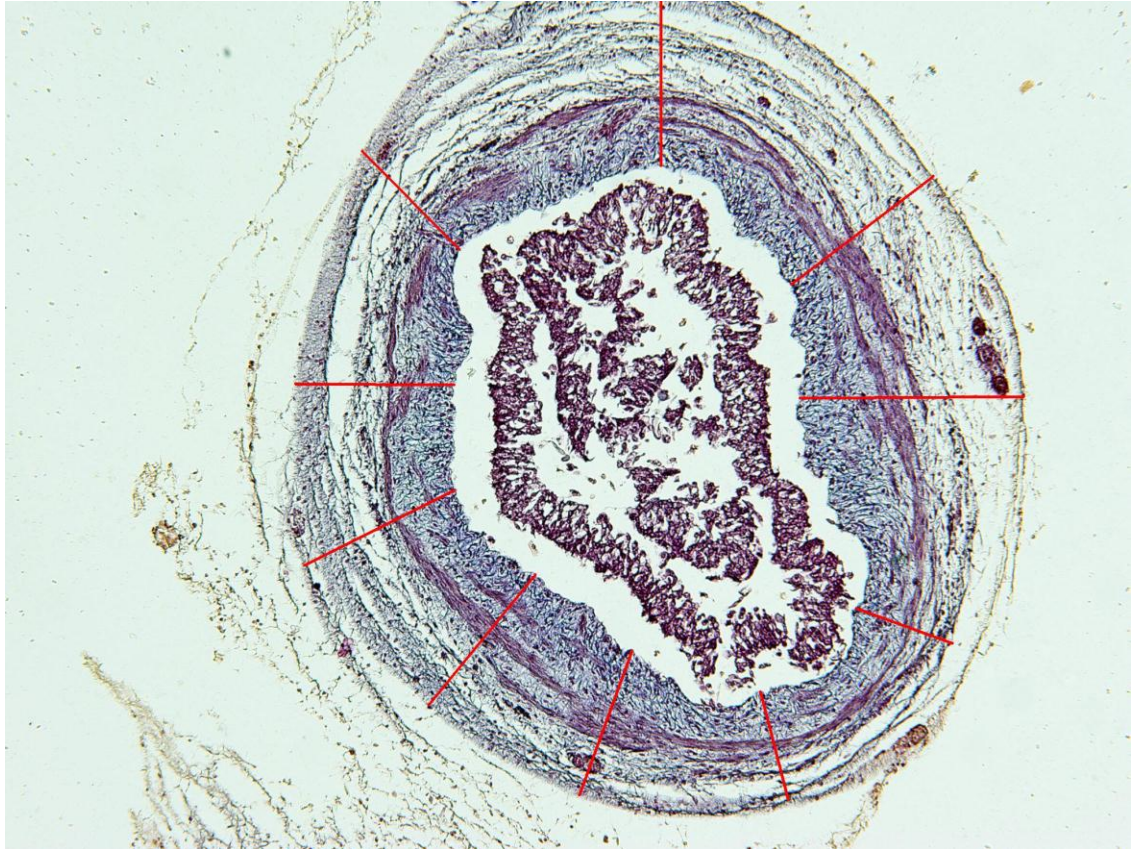


Figura 9 - A figura evidencia o método utilizado para o cálculo da espessura da parede do ureter. As linhas em vermelho representam as medidas que foram calculadas para obtenção da média. Fotomicrografia do ureter de feto sem anomalia corado com Tricrômico de Masson, 40x.

3.1.3 Densidade muscular

Para o cálculo da densidade muscular foram usados cortes corados pelo Tricrômico de Masson. Os cortes foram analisados com um aumento de 400x. A densidade muscular foi obtida através da contagem da área de músculo na parede do ureter. Essa contagem foi feita através de uma ferramenta do software Image J, a grade de 100 pontos onde era quantificada toda área muscular que passava pelo quadrante superior direito das cruzes. (Figura 10)

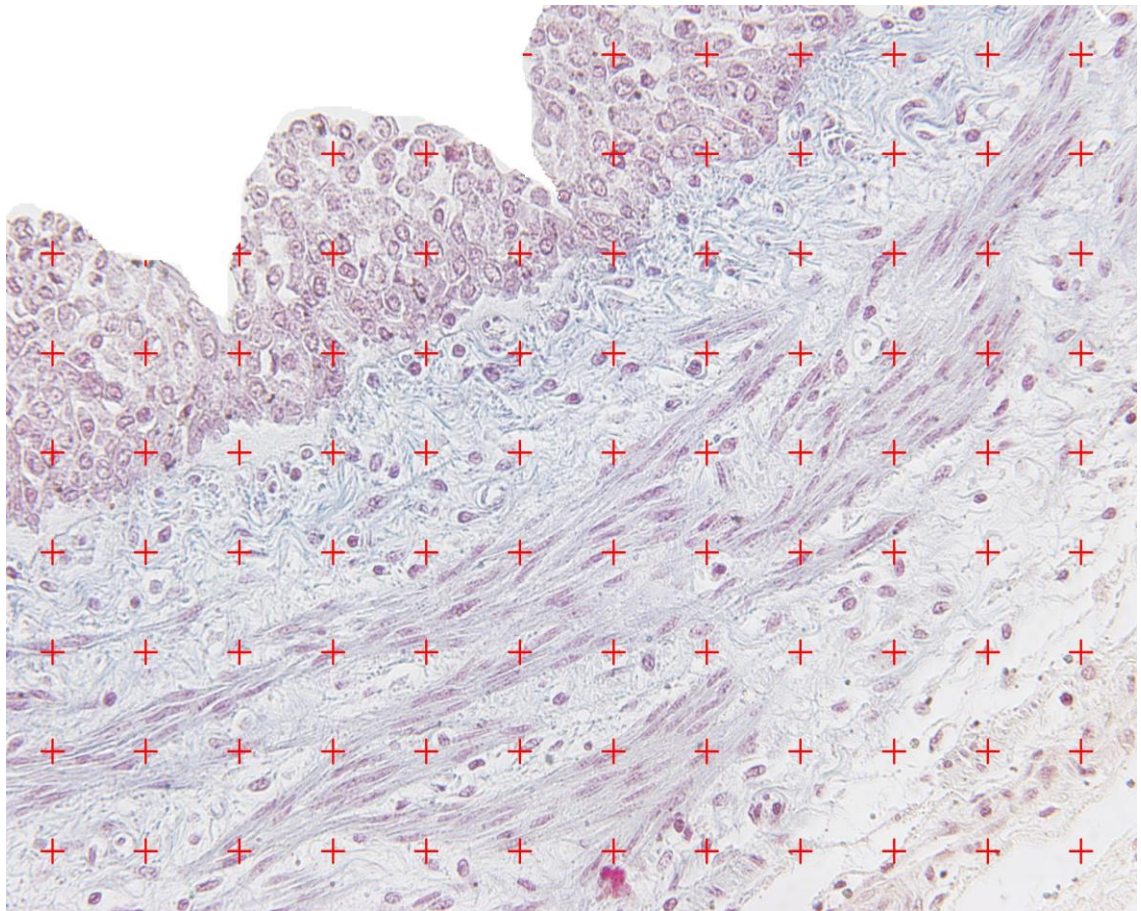


Figura 10 - A figura evidencia o método utilizado para quantificação do músculo na parede do ureter. Fotomicrografia do ureter de feto sem anomalia com a grade de cem pontos sobreposta. Tricrômico de Masson, 400x.

3.1.4 Elastina

Para a análise das fibras elásticas, foi realizada a imunohistoquímica específica para estas utilizando-se Anticorpo Monoclonal para Elastina ab 9519 (Laboratórios Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos da América) . Foi realizado para o anticorpo primário simultaneamente os controles negativos, onde o anticorpo primário será substituído por PBS/BSA. Para recuperação foi utilizado pepsina. A revelação foi feita com solução de 3,3, diamino-benzidina tetrahydrocloridro (DAB) a 0,1% em H₂O, lavados em água destilada, desidratado em uma série crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados com entellan.

3.1.5 Colágeno

Para análise qualitativa do colágeno foi feita a coloração com Vermelho de Picro Sirius. Foram fotografados 25 campos com luz polarizada e observado a predominância de cores.

Para confirmação dos achados com o Vermelho de Picro Sirius foi feita uma contraprova com o método imunohistoquímico para colágeno tipo III.

Além da análise qualitativa, foi realizado o método bioquímico através do qual a concentração do colágeno total do ureter foi determinada pela dosagem colorimétrica de hidroxiprolina. De 2 a 13 mg de tecido seco foram delipidados e hidrolisados em 6N HCl por 18 horas a 118°C como previamente descrito (26). A dosagem foi realizada nos hidrolisados neutralizados usando o método da cloramina T (27) e os resultados foram expressos em µg de hidroxiprolina por mg de tecido seco.

3.2 **Análise Estatística**

As médias foram comparadas estatisticamente através do teste T não pareado utilizando o software graph Pad Prism. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

Durante a avaliação macroscópica dos fetos, foi observada ausência de qualquer outra mal formação que não fosse exclusivamente a anencefalia. Os fetos anencéfalos estudados apresentavam idade entre 19 e 33 semanas pós concepção, e pesavam de 280 à 1330 g. Os fetos do grupo controle apresentaram idades entre 16 e 27 semanas pós concepção, e pesavam de 185 à 1128g.

4.1 Epitélio

Não houve diferença entre os grupos em relação ao epitélio, ambos apresentaram o epitélio de transição bem conservado. (Figura 11)

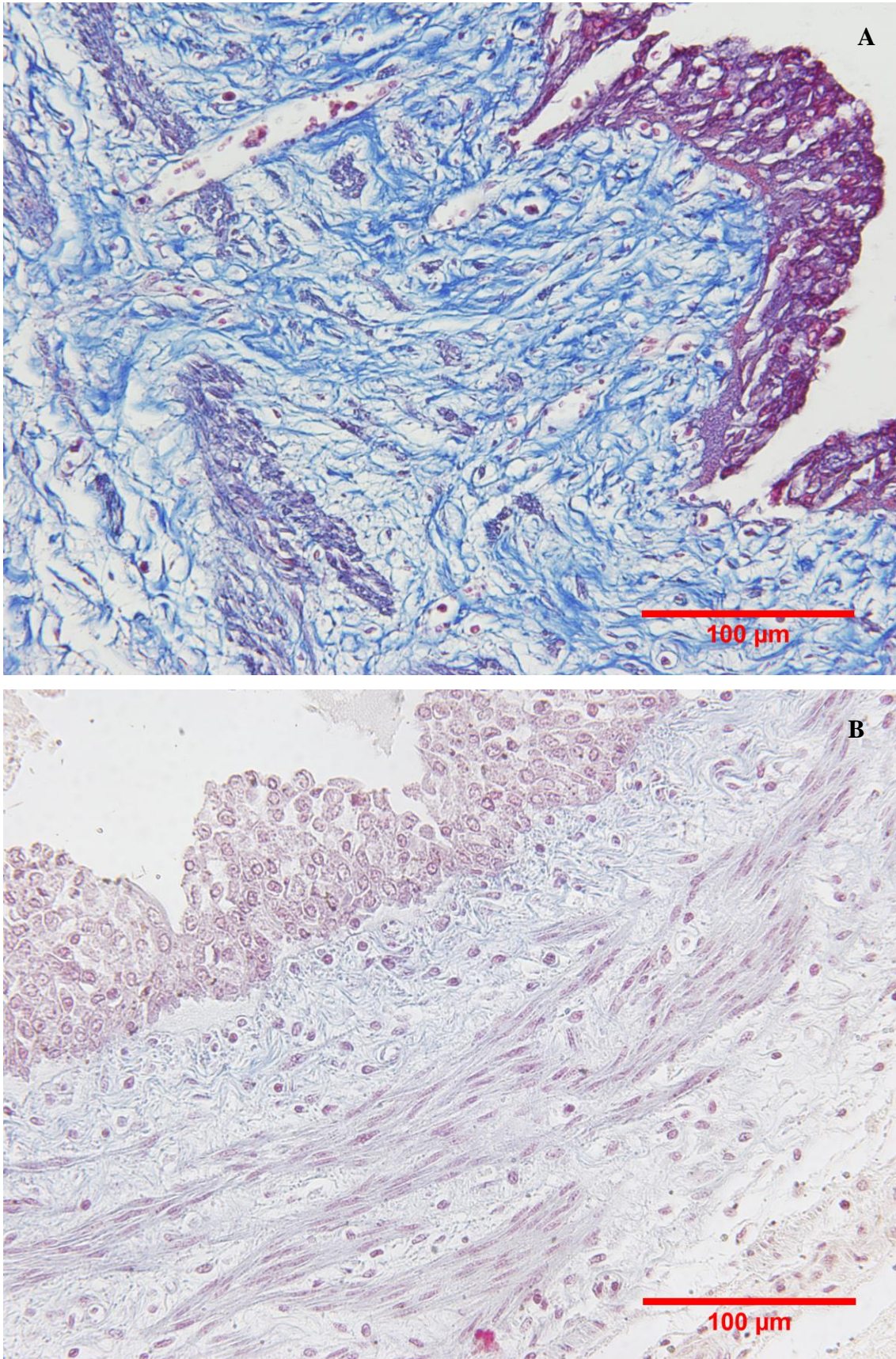


Figura 11 - Epitélio ureteral A) Fotomicrografia de ureter de feto anencéfalo, 33 semanas, corado com Tricrômico de Masson, 400x . B) Fotomicrografia de ureter de feto do grupo controle, 20 semanas, corado com Tricrômico de Masson, 400x.

4.2 Área da luz, diâmetro e espessura

Houve uma diminuição na espessura da parede, no diâmetro e na área da luz do ureter dos fetos anencéfalos em relação ao grupo controle (Figura 12 e Figura 13).

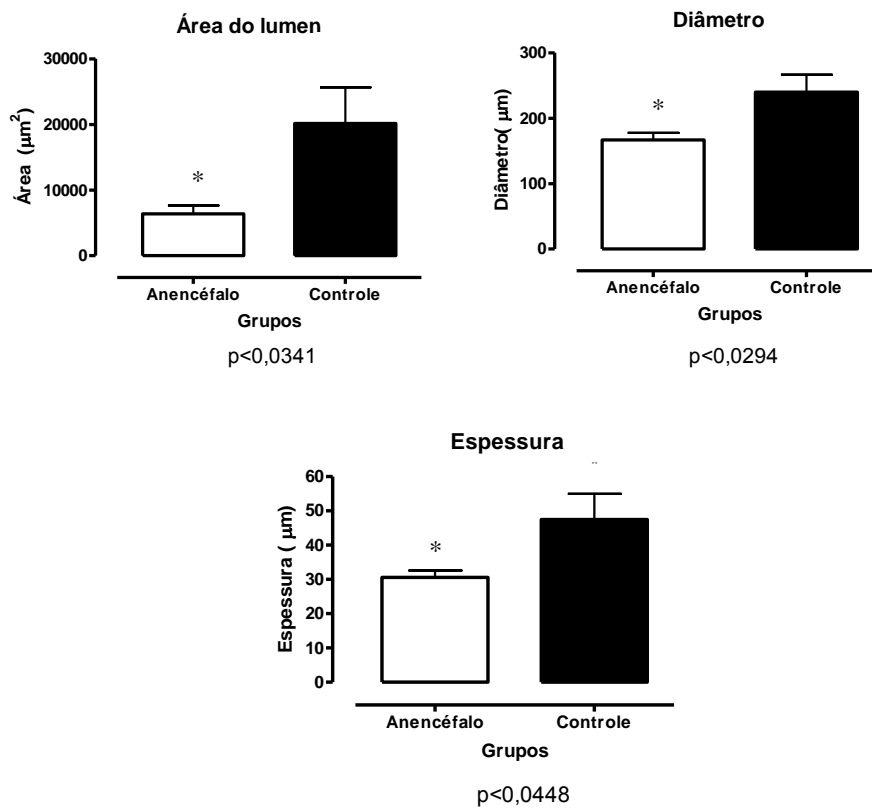


Figura 12 - Gráfico da área do lúmen do ureter de feto dos grupos anencéfalo e controle (A). Gráfico do diâmetro do ureter de feto dos grupos anencéfalos e controle (B). Gráfico da espessura da parede de fetos dos grupos anencéfalos e controle (C).

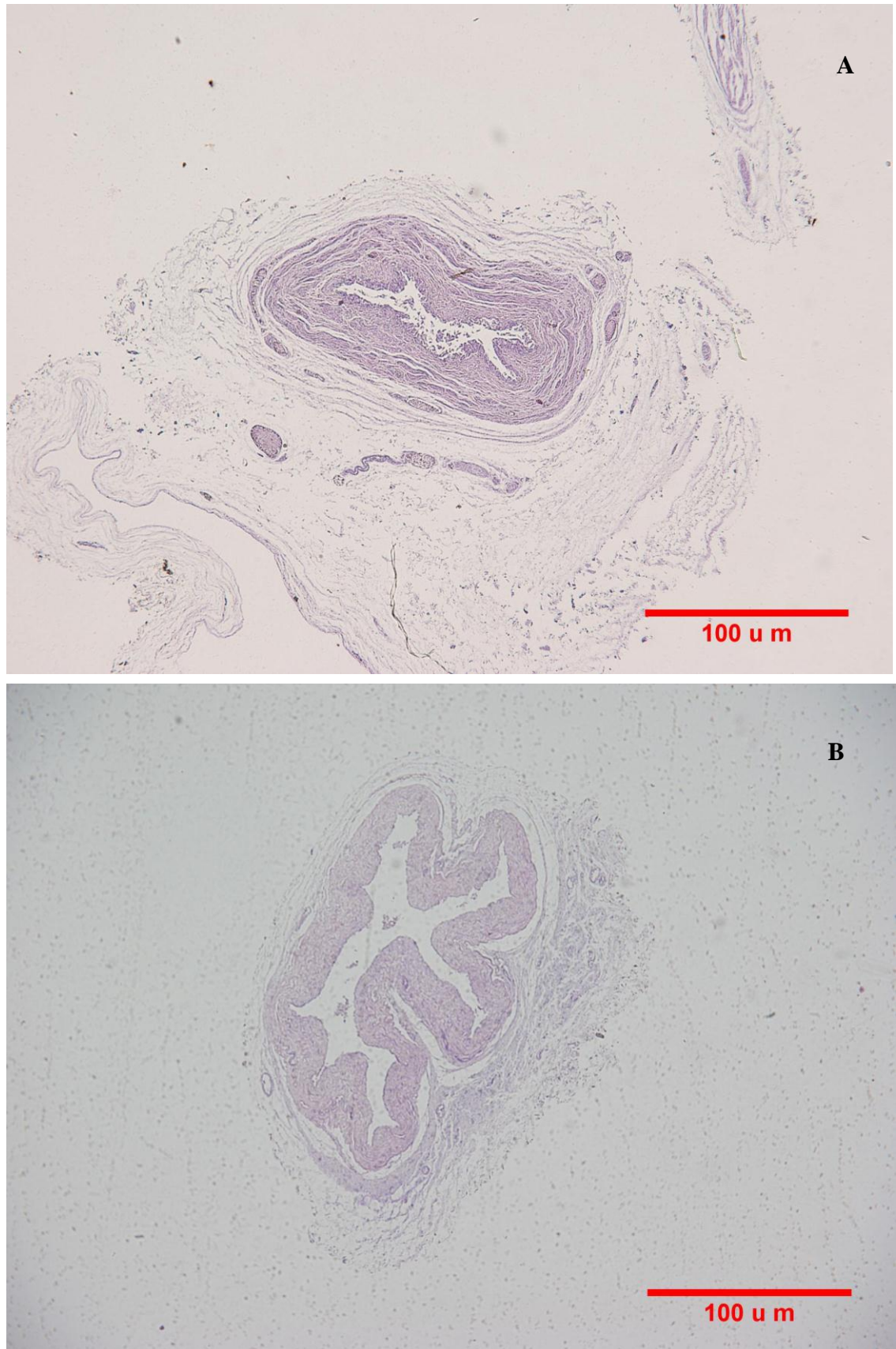


Figura 13 - A figura evidencia a diminuição na área da luz do ureter, no diâmetro e na espessura da parede do ureter no feto anencéfalo. A) Fotomicrografia de ureter de feto anencéfalo, 30 semanas, corado com Hematoxilina e Eosina, 40x. B) Fotomicrografia de ureter de feto do grupo controle, 27 semanas, corado com Hematoxilina e Eosina, 40x.

4.3 Densidade muscular

Não houve diferença significativa na quantificação do músculo no ureter. (Figura 14 e Figura 15)

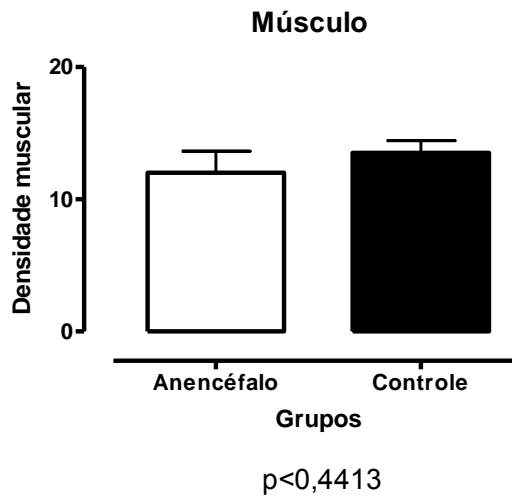


Figura 14 - Gráfico da quantificação de músculo no ureter de fetos dos grupos anencéfalo e controle.

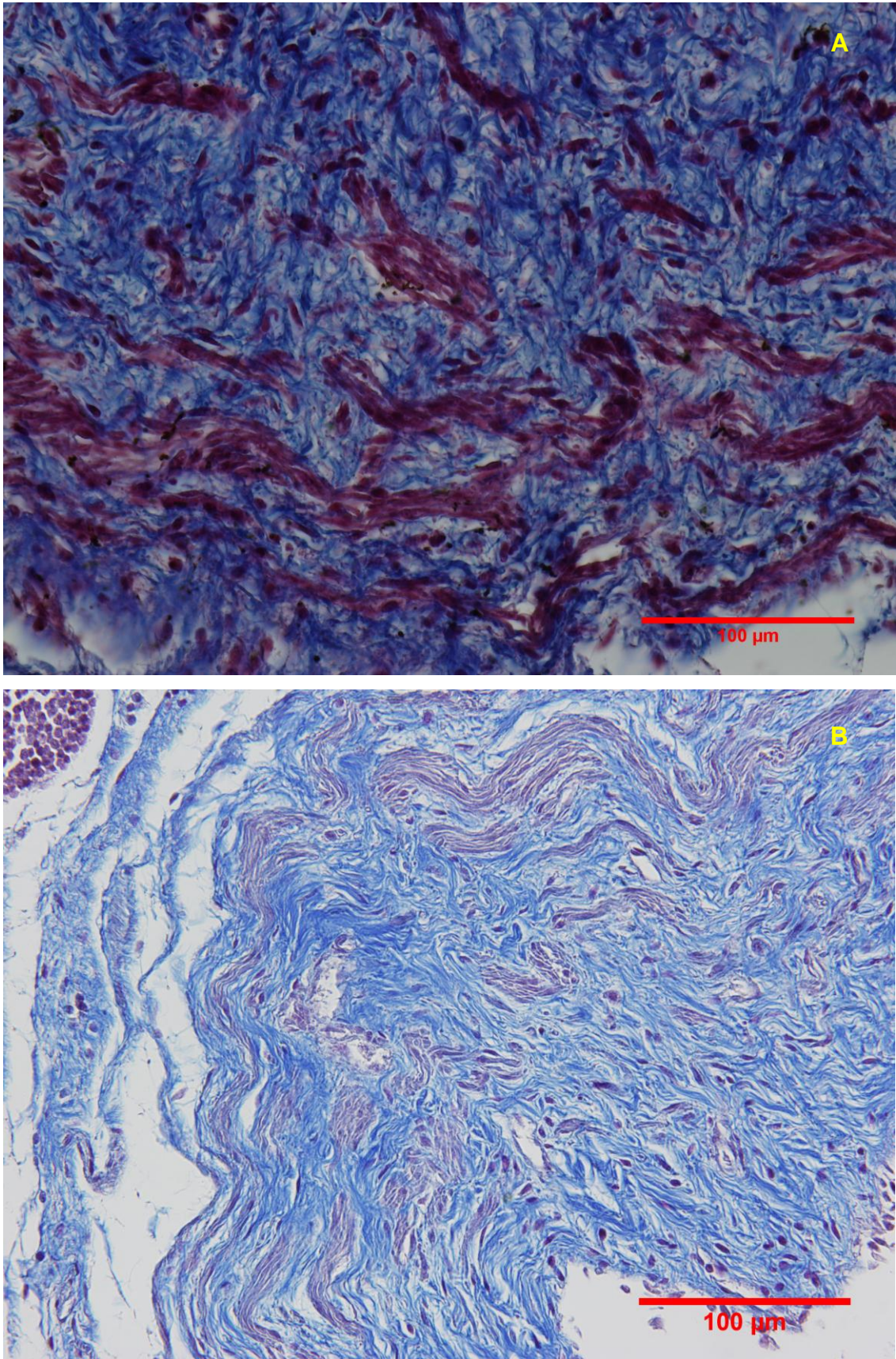


Figura 15 - Musculatura ureteral A) Fotomicrografia de ureter de feto anencéfalo, 20 semanas, corado com Tricrômico de Masson, 400x . B) Fotomicrografia de ureter de feto do grupo controle, 20 semanas, corado com Tricrômico de Masson, 400x.

4.4 Elastina

Através da imunohistoquímica foi possível observar que houve uma marcação mais evidente da elastina nos fetos do grupo controle (Figura 16).

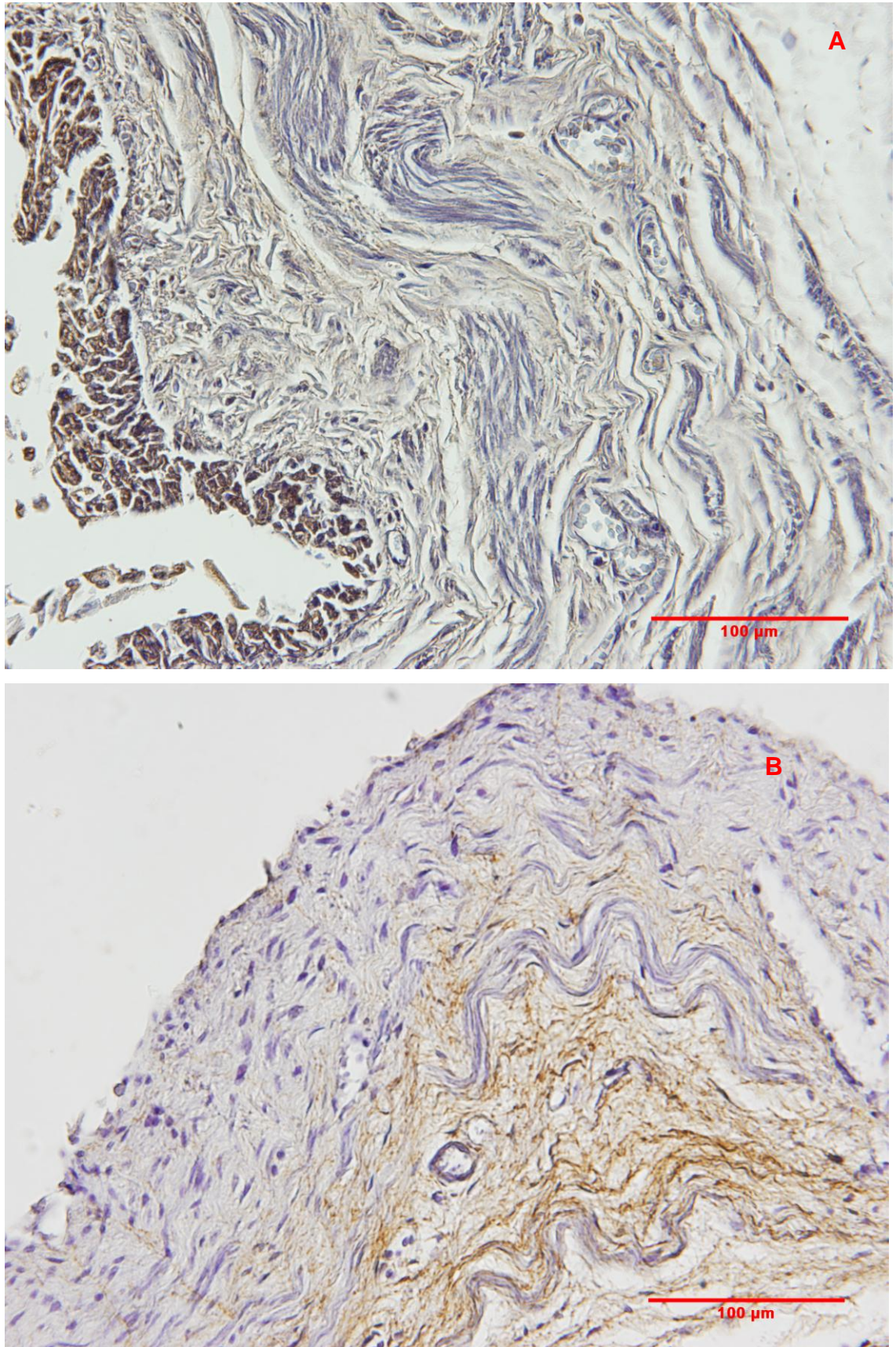


Figura 16 - Sistema elástico do ureter. A) Fotomicrografia de ureter de feto anencéfalo, 30 semanas, imunohistoquímica para elastina, 400x. B) Fotomicrografia de ureter de feto do grupo controle, 27 semanas, imunohistoquímica, 400x.

4.5 Colágeno

Na análise qualitativa do colágeno observamos que o grupo anencéfalo apresentou uma coloração mais avermelhada enquanto o grupo controle apresentou uma coloração mais esverdeada, sugerindo assim uma diferença no arranjo do colágeno (Figura 17).

Através da imunohistoquímica do colágeno III, foi observada uma predominância deste no grupo controle (Figura 17).

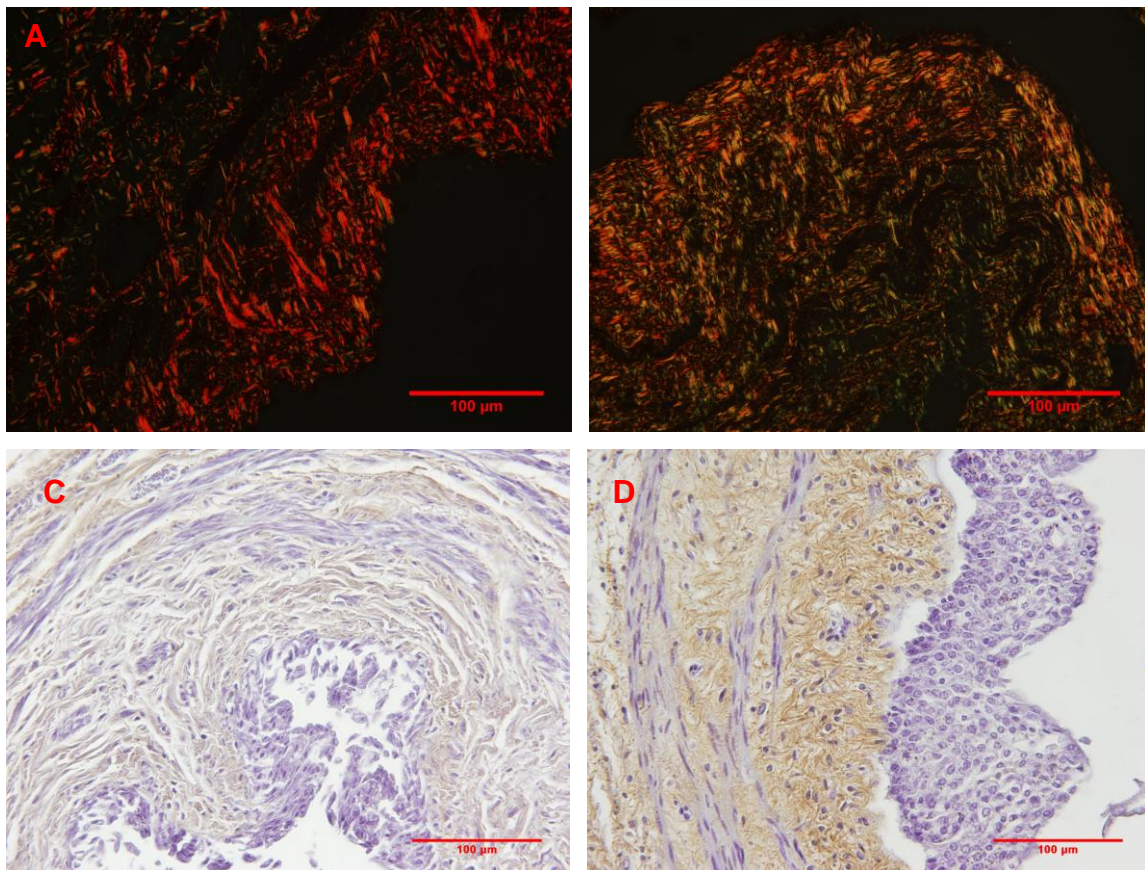


Figura 17 - Colágeno do ureter A) Fotomicrografia de ureter de feto anencéfalo, 30 semanas, corado com Vermelho de Picro sirius, 400x . B) Fotomicrografia de ureter de feto do grupo controle, 27 semanas, corado com Vermelho de Picro sirius, 400x. C) Fotomicrografia de ureter de feto anencéfalo, 30 semanas, imunohistoquímica para colágeno III, 400x . D) Fotomicrografia de ureter de feto do grupo controle, 27 semanas, imunohistoquímica para colágeno III, 400x.

Na análise bioquímica do colágeno total não houve diferença estatística entre os grupos. (Tabela 1)

Tabela 1 - Valores das médias e desvios-padrão das concentrações de hidroxiprolina por mg de tecido seco.

Grupo	Média	Desvio padrão	CV(%)
Anencéfalo	44.259	7.132	16.7
Controle	38.186	16.859	46.4

5 DISCUSSÃO

Os fetos anencéfalos avaliados neste estudo não apresentavam qualquer alteração grosseira da anatomia e a anatomia dos sistemas urinário e genital eram idênticas às dos fetos do grupo controle. Não havia a presença de vasos renais e pélvicos aberrantes e o ureter se encontrava em seu trajeto habitual em todas as amostras estudadas. Estes resultados sugerem que, preliminarmente, os sistemas urinário e genital dos fetos com anencefalia não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle.

O avanço da faixa etária populacional, o aumento da prevalência de doenças degenerativas e o diagnóstico precoce de doenças hematológicas têm levado ao aumento progressivo da demanda por estudos na área de engenharia tecidual e transplante celular [28]. Por outro lado, o avanço dos cuidados assistenciais promove a prevalência cada vez maior de pacientes com algum grau de restrição à atividade motora ou com lesões neurológicas incapacitantes, que têm sido vastamente explorados com a utilização de células tronco, sejam elas provenientes de uma matriz embrionária ou de tecido adulto [29].

São indiscutíveis as vantagens e progressos que a utilização destes materiais promove nos indivíduos com restrições diversas, no entanto, o emprego do tecido humano na substituição de outros tecidos lesionados não encontra uma linha de pesquisa tão ampla, encontrando-se mais focada na substituição de ossos, cartilagens, revestimento epidérmico e tecido miocárdico [30, 31].

A utilização de modelos cadavéricos humanos, seja de órgãos ou tecidos, confere vantagem em relação aos modelos em que se utilizam animais uma vez que são mais fidedignos e isenta o indivíduo receptor de qualquer zoonose, auxiliando na prevenção de reação imunológica resultante de rejeição de um heteroenxerto [32].

Os indivíduos com anencefalia invariavelmente evoluirão para o óbito. A questão do uso de tecidos de fetos anencéfalos como uma fonte de tecido autólogo para estudo, ainda não tem respaldo e comprovação de sua aplicabilidade clínica. O questionamento que se faz é se os tecidos utilizados também sofreriam de malformações encontradas nestes fetos.

Existem relatos de transplante onde o doador foi um feto anencéfalo e o ureter neste procedimento foi utilizado para derivar a urina [9]. Com a dificuldade de se conseguir doadores a utilização de tecidos e órgãos de fetos com anencefalia

pode ser útil no futuro. A engenharia tecidual também pode no futuro ser utilizada para a reconstrução ureteral. Existem alguns relatos com o uso de células uroteliais autólogas transplantadas [33, 34] e o uso de enxertos tubulares autólogos para a reconstrução ureteral em modelos animais com bons resultados [35, 36]. A análise da estrutura do ureter em fetos com anencefalia pode ser de grande utilidade no futuro para as pesquisas de engenharia tecidual.

Em nossa amostra não observamos diferenças significativas na musculatura lisa do ureter quando comparamos os fetos anencéfalos com os do grupo controle. Observamos um discreto aumento da musculatura lisa na parede dos ureteres dos fetos sem anomalia.

Em um estudo recente foi documentada a presença de alterações morfológicas e histológicas importantes na bexiga de fetos anencéfalos [12]. O colágeno estava aumentado nos espécimes de fetos anencéfalos quando comparado aos de fetos normais. As células musculares lisas também se apresentavam com sua densidade volumétrica reduzida. Neste estudo [12] foi discutido que o longo intervalo de exposição do sistema nervoso central de fetos anencéfalos ao líquido amniótico com consequente perda da interação neural entre córtex e medula espinhal poderia ser determinante para a mudança da realimentação neuronal. Esta perda da interação poderia lesar em definitivo a interação dos segmentos nervosos pélvicos e sacrais, levando à lesões irreversíveis da bexiga urinária, ainda em uma fase de desenvolvimento intra-uterina.

Os fetos com anencefalia apresentavam uma significativa diminuição da área de sua luz, de seu diâmetro e de sua espessura. A lesão do sistema nervoso com consequente alteração na regulação neural pode ser uma hipótese plausível para explicar as alterações estruturais no ureter de fetos e pacientes portadores de disrafismos.

Em outro estudo recente, no entanto, não foram observadas alterações no desenvolvimento da genitália masculina em fetos anencéfalos [14]. O desenvolvimento genital poderia ocorrer normalmente em paralelo às alterações do sistema nervoso central. Em tese, a fisiologia da ereção e a estrutura uretral estariam mantidas [14]. A não lesão da genitália fetal pela exposição do sistema nervoso central ao líquido amniótico sugere que os mecanismos de maturação para esta seriam apenas dependentes da interação hormonal e molecular. A interação dos receptores estrogênicos e androgênicos em órgãos alvo independentemente da

interação do sistema nervoso central é bem conhecida em modelos de estudo com ratos [37], porém estudos com humanos são pouco disponíveis na literatura.

O colágeno e a elastina são importantes componentes da parede do ureter e podem afetar a contração ureteral. O colágeno é responsável por proporcionar tensão de resistência aos tecidos, no entanto um acúmulo de colágeno pode inibir a contração ureteral e a condução de estímulos elétricos pela parede do ureter. A elastina é responsável pela elasticidade do tecido e auxilia na complacência [38].

Alterações nas fibras do sistema elástico estão envolvidas na formação de tecido fibrótico, no entanto em nossa amostra nós só observamos a presença de fibras elásticas em fetos com mais de 25 semanas pós-concepção e nós não observamos diferenças no sistema elástico entre os fetos com anencefalia e os do grupo controle. Esse fato pode indicar que as fibras do sistema elástico surgem apenas no terceiro trimestre gestacional no ureter fetal. Estudos prévios demonstraram a presença de fibras do sistema elástico em outros órgãos dos sistemas urinário e genital durante o período fetal humano [39]

Em nosso estudo não observamos diferenças significativas entre as fibras elásticas e o colágeno em fetos com anencefalia e nos fetos do grupo controle. Observamos um pequeno aumento do colágeno tipo I nos ureteres de fetos com anencefalia. Em um estudo prévio da bexiga de fetos com anencefalia observamos a predominância do colágeno tipo III [12]. Estudos prévios em coelhos mostraram que a obstrução ureteral leva a um aumento progressiva da espessura da lamina muscular com um grande aumento do colágeno, o que não foi confirmado por nossos estudos [40].

6 CONCLUSÃO

A concentração total de colágeno não apresentou diferença nos ureteres dos fetos anencéfalos e nos sem anomalia. Os fetos com anencefalia tinham o ureter com alterações estruturais evidentes como menor diâmetro, menor área e menor espessura quando comparados com os fetos sem anomalia. Essas diferenças parecem indicar que os ureteres de fetos com anencefalia apresentaram alterações estruturais provavelmente em virtude da exposição e lesão cerebral com conseqüente perda do controle central nos nervos ureterais.

O presente trabalho foi submetido para publicação no periódico *Histology and Histopatology* (Anexo C e Anexo D)

REFERÊNCIAS

1. Blatter, BM, van der Star, M, Roeleveld, N. Review of neural tube defects: risk factors in parental occupation and the environment. *Environmental Health Perspect.* 1994; 102: 140-5.
2. Müller L, Abrahamsson K, Sillén U, Jacobsson B, Hellström OM Ultrasound assessment of detrusor thickness in children and young adults with myelomeningocele. *The Journal of Urology.* 2006; 175:704-8.
3. Cook RJ, Erdman JN, Hevia M, Dickens BM: Prenatal management of anencephaly. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2008;102: 304-8
4. Calzolari F, Gambi B, Ganari G, Tamisari L: Anencephaly: MRI findings and pathogenetic theories. *Pediatr Radiol.* 2004; 34:1012-16.
5. Fost N. Removing organs from anencephalic infants: ethical and legal considerations. *Clin Perinatol.* 1989; 16: 331-337
6. Rothenberg LS. The anencephalic neonate and brain death: an international review of medical, ethical, and legal issues. *Transplant Proc.* 1990; 22: 1037-9
7. Milliez, J. Anencephaly and organ transplantation. *Int J. Gyn and Obst.* 2008; 102: 99-104.
8. Pinotti, José Aristodemo, Projeto de lei Nº 4360, DE 2004. [acesso em 2012 Nov 20]. Disponível em: <http://www.portalbioetica.com.br/artigos/Gisleno11.07.06.pdf>.
9. Laberge JM. Transplanting organs from anencephalic infants. *CMAJ* 1987;137:437– 8.
10. Salaman, JR. Anencephalic organ donors. *BMJ.* 1989; 298: 622-3.
11. Byrne P. Use of anencephalic newborns as organ donors. *Paediatr. Child Health.* 1995; 10: 335-7.
12. Pazos HM, Lobo ML, Costa WS, Sampaio FJ, Cardoso LE, Favorito LA. Do neural tube defects lead to structural alterations in the human bladder? *Histol Histopathol.* 2011;26: 581–8.
13. Kalayciog˘lu A, Karaca M, Can I, Keles ON, Üçüncü Y, Gündog˘du C, et al. Anencephalic fetuses can be an alternative for kidney transplantation: a stereological and histological investigation. *Histol Histopathol.* 2010; 25: 413-422.
14. Carvalho J P ; Costa W.S. ; Sampaio F.J.B. ; Favorito LA . Anencephaly Does Not Cause Structural Alterations in the Fetal Penis. *The Journal of Sexual Medicine.* 2012; 9. 735-742.

15. Sadler TW: Langman's Medical Embryology. 7th ed., Baltimore: Williams & Wilkins; 1995.
16. Maizels M: Normal development of the urinary tract. In: Campbell's Urology. 6a. ed. New York: Saunders; 1992. p. 1301.
17. Moore KL: The Developing human. Clinically Oriented Embryology. Philadelphia: W.B. Saunders; 1977.
18. Motola JA, Shalon RS, Smith AD. Anatomy of the ureter. Urol Clin N Amer, 1988; 15: 295-8.
19. Alcaraz A, Vinaixa F, Tejedo-Mateu A, Forés MM, Gotzens V, Mestres CA, Oliveira J, Carretero P: Obstruction and recanalization of the ureter during embryonic development. J Urol. 1991; 145: 410-6.
20. Domenech G, Tejedo A, Vilanova J: Contribution al estudio de la membrana ureteral de Chwalla. Su importancia clinica. Arch Esp Urol. 1973; 26: 355-9.
21. Mercer BM, Sklar S, Shariatmadar A, Gillieson MS, D'Alton MK. Fetal foot length as a predictor of gestational age. Am J Obst Gynecol. 1987; 156: 350-6.
22. Hern, WM. Correlation of fetal age and measurements between 10 and 26 weeks of gestation. Obst Gynecol. 1984; 63: 26-32.
23. Platt LD, Medearis AL, DeVore GR, Horenstein JM, Carlson DE, Brar HS. Fetal foot length: Relationship to menstrual age and fetal measurements in the second trimester. Obstet Gynecol. 1988; 71: 526-531.
24. Costa WS, Sampaio FJB, Favorito LA, Cardoso LE: Testicular migration: remodeling of connective tissue and muscle cells in human gubernaculum testis. Journal of Urology. 2002; 167(5):2171-6
25. Favorito LA, Cardinot TM, Morais ARM, Sampaio FJB Urogenital anomalies in human male fetuses. Early Human Development. 2004; 79: 41-7
26. Cabral. C, Sampaio FJ. and Cardoso LE. Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycan and collagen as a consequence of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. J Urol. 2003;170:2512-6.
27. Bergman I, Loxley R. The determination of hydroxyproline in urine hydrolysates. Clin Chim Acta. 1970; 27(2):347-9.

28. de Filippis L. Neural stem cell-mediated therapy for rare brain diseases: perspectives in the near future for LSDs and MNDs. *Histol Histopathol.* 2011; 26: 1093-1109.
29. Carney BJ, Shah K. Migration and fate of therapeutic stem cells in different brain disease models. *Neuroscience.* 2011; 14. [Epub ahead of print] [acesso em 2012 Nov 20]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21946010>>
30. Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Regenerative therapies using cell heat-based tissue engineering for cardiac disease. *Cardiol Res Pract.* 2011; e:845170. Epub 2011.
31. Pereira H, Frias AM, Oliveira JM, Espregueira-Mendes J, Reis RL. Tissue Engineering and Regenerative Medicine Strategies in Meniscus Lesions. *Arthroscopy.* 2011 Oct 19. [acesso em 2012 Nov 20]. Disponível em <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019234>
32. Hashemi SM, Soudi S, Shabani I, Naderi M, Soleimani M. The promotion of stemness and pluripotency following feeder-free culture of embryonic stem cells on collagen-grafted 3-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials.* 2011; 32: 7363-7374.
33. Zhu Y, Fu W, Li G, Shi J, Tan H, Hu K, et al. Autologous urothelial cells transplantation onto a prefabricated capsular stent fortissue engineered ureteral reconstruction. *J Mater Sci Mater Med.* 2012 ;23:1119-28.
34. Geutjes P, Roelofs L, Hoogenkamp H, Walraven M, Kortmann B, de Gier R, Farag F, et al. Tissue engineered tubular construct for urinary diversion in a preclinical porcine model. *J Urol.* 2012; 188:653-660.
35. Zhang J, Gu GL, Liu GH, Jiang JT, Xia SJ, Sun J, et al. Ureteral reconstruction using autologous tubular grafts for the management of ureteral strictures and defects: an experimental study. *Urol Int.* 2012 ;88(1):60-5.
36. Fu WJ, Xu YD, Wang ZX, Li G, Shi JG, Cui FZ, et al. New ureteral scaffold constructed with composite poly (L-lactic acid)-collagen and urothelial cells by new centrifugal seeding system *J Biomed Mater Res.* 2012 ;100:1725-33.
37. Goya HO, Braden TD, Willians CS, Willians JW. Estrogen-induced developmental disorders of the rat penis involve both estrogen receptor (ESR)- and androgen receptor (AR)-mediated pathways. *Biol Reprod.* 2009; 81:507-516.
38. Kim KM, Kogan BA, Massad. CA: Huang Collagen and elastin in the normal fetal bladder. *J Urol.* 1991: 146:524-27.
39. Bastos AL, Silva EA, Costa WS, Sampaio FJB. The concentration of elastic fibers in the male urethra during human fetal development. *BJU Int.* 2004;94:620-3

40. Cheng EY, Maizels M, Chou P, Hartanto V, Shapiro E. Response of the newborn ureteropelvic junction complex to induced and later reversed partial ureteral obstruction in the rabbit model. *J Urol* 1993 ;150:782-789.

ANEXO A – Comitê de Ética

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



Rio de Janeiro, 23 de Novembro de 2010

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Aut. João Paulo Martins de Carvalho – Orient. Prof. Luciano Alves Favorito / PG Fisiologia

Registro CEP/HUPE: 2585/2010 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)
CAAE: 0048.0.228.325-10

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "ESTUDO ESTRUTURAL E ONTOGENÉTICO DO PÊNIS DE FETOS HUMANOS NORMAIS, ANENCÉFALOS E COM MIELOMENINGOCELE NO SEGUNDO TRIMESTRE DE GESTAÇÃO" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

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

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

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HUPE/UERJ

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

ANEXO B - Protocolo

UERJ- DEPARTAMENTO DE ANATOMIA UNIDADE DE PESQUISA UROGENITAL
--

PROCOLO PARA MORFOMETRIA GERAL DE FETOS

Data:

Nº do feto:

Grupo:

Sexo:

Peso(g):

Comprimento Total (cm):

Comprimento Vértice-Cóccix (cm):

Comprimento dos pés (cm):

PE	1	2	3	Média
Direito				
Esquerdo				

UERJ- DEPARTAMENTO DE ANATOMIA UNIDADE DE PESQUISA UROGENITAL
--

PROCOLO PARA MORFOMETRIA GERAL DE FETOS

Data:

Nº do feto:

Grupo:

Sexo:

Peso(g):

Comprimento Total (cm):

Comprimento Vértice-Cóccix (cm):

Comprimento dos pés(cm):

PE	1	2	3	Média
Direito				
Esquerdo				

ANEXO C – E-mail de submissão do artigo**De:** F Hernández <fhcalvo@um.es>**Para:** luciano favorito <lufavorito@yahoo.com.br>**Enviadas:** Segunda-feira, 29 de Outubro de 2012 14:21**Assunto:** Fwd: Re: Reception of paper B-4871

Reference: B-4871

Dear Dr.Favorito et al.,

I am pleased to acknowledge receipt today of the paper entitled "DO NEURAL TUBE DEFECTS LEAD TO STRUCTURAL ALTERATION IN THE HUMAN URETER? STUDY IN ANENCEPHALIC FETUSES" submitted for publication in HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY (2011 IMPACT FACTOR:2.480).

As soon as the manuscript has been seen by the referees, you will be informed as to whether it can be accepted.

If it is accepted, the authors are requested to cover part of the printing cost (each paper about 600 euros; with colour, about 900 euros; or equivalent USD).

P.S.(NOTE):

The cost of the 1 institutional subscription for 1 year (2013)is 600 euros or equivalent USD.

Yours sincerely,

Prof. Francisco Hernández-Calvo

Founder and Editor of

HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY<http://www.hh.um.es>E-mail<fhcalvo@um.es>

Department of Cell Biology and Histology

School of Medicine

University of Murcia

30100 Espinardo - MURCIA

SPAIN

ANEXO D – Artigo - Do neural tube defects lead to structural alterations in the human ureter? Study in anencephalic fetuses

**DO NEURAL TUBE DEFECTS LEAD TO STRUCTURAL
ALTERATIONS IN THE HUMAN URETER? STUDY IN
ANENCEPHALIC FETUSES**

Suelen Costa, João P.M. Carvalho, Waldemar S. Costa, Luiz E.M. Cardoso, Francisco J.B. Sampaio, Luciano Alves Favorito

Urogenital Research Unit from State University from Rio de Janeiro – Brazil

Running head: **Study of the Ureter in human Anencephalic fetuses**

Key words: anencephaly, Ureter, embryology, human fetuses

Correspondence Address

Luciano Alves Favorito MD, PhD

Rua Professor Gabizo 104/201 - Tijuca - Rio de Janeiro -RJ - Brazil

Zip Code: 20271-062

Telephone number: 55(21) 25876499

Fax number: 55(21) 38728802/25876121

e-mail: lufavorito@yahoo.com.br

Supported by grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPQ – Brazil) and *Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)*, Brazil.

ABSTRACT

Introduction and Objective: The objective of this paper is to analyze the structure of the ureter in normal and anencephalic human fetuses.

Methods: We studied 16 ureters from 8 human fetuses without congenital anomalies aged 16 to 27 weeks post-conception (WPC) and 14 ureters from 7 anencephalic fetuses aged 19 to 33 WPC. The ureters were dissected and embedded in paraffin, from which 5 μ m thick sections were obtained and stained in Masson trichrome, to quantify smooth muscle cells (SMC) and to determine the ureteral lumen area, thickness and ureteral diameter. The samples were also stained in Weigert Resorcin Fucsin (to observe elastic fibers) and Picro-Sirius Red with polarization and immunohistochemistry analysis of the collagen type III fibers to observe collagen. Stereological analysis of collagen, elastic system fibers and SMC was performed in sections. Data were expressed as volumetric density (Vv-%). The images were captured with Olympus BX51 microscopy and Olympus DP70 camera. The stereological analysis was done using the software Image Pro and Image J. For biochemical analysis, samples were fixed in acetone, and collagen concentrations were expressed as micrograms of hydroxyproline per mg of dry tissue. Means were statistically compared using the unpaired t-test ($p < 0.05$).

Results: The ureteral epithelium was well preserved in the anencephalic and control groups. We did not observe differences in the transitional epithelium in the anencephalic and control groups. There was no difference in elastic fibers and total collagen distribution in normal and anencephalic fetuses. SMC concentration did not differ significantly ($p=0.1215$) in anencephalic and control group. The ureteral lumen area ($p=0.0047$), diameter ($p=0.0024$) and thickness ($p=0.0144$) were significantly smaller in anencephalic fetuses.

Conclusions: Fetuses with anencephaly showed smaller diameter, area and thickness. These differences could indicate that anencephalic fetal ureter has significant structural alterations probably due to cerebral lesions with consequent brain control damage in ureter nerves.

INTRODUCTION

Neural tube defects are one of the commonest congenital mal-formations of the central nervous system, with an average prevalence at birth of 1 per 1000 (Blatter et al., 1994). Anencephaly is the most severe of fetal neural tube defects, resulting from failure of the neural tube to close at the base of the skull in the third or fourth week (day 26 to 28) after conception, leaving the skull bones that usually surround the head unformed.

Despite ethical conflicts the literature shows some reports about the use of anencephalic fetuses' organs for transplantation (Davis, 1988; Salaman, 1989; Byrne, 2005; Milliez, 2008). The organ structure of anencephalic fetuses and children is almost unknown. Recently the structure of anencephalic fetal kidneys (Kalayciog˘lu et al., 2010), bladder (Pazos et al., 2011) and penis (Carvalho et al., 2012) was studied. The bladder of anencephalic fetuses had gross histological alterations when compared to normal fetuses (Pazos et al. 2011). Carvalho (Carvalho et al, 2012) shows no differences in the structure of the genitalia from anencephalic fetuses compared to normal ones.

In the future, tissue from urethras from anencephalic fetuses could be used as engineering models in the pediatric population (Raya-Rivera, 2011). Tissue from kidneys, ureters and bladder could be used too in the future as an alternative to complex reconstructive surgeries (Zhao Z et al., 2012).

Morphology of the ureters during human fetal period is rare (Oswald J et al., 2003). Studies of the ureter in anencephalic fetuses are unknown. The objective of our study is to analyze the ureter structure in anencephalic human fetuses.

MATERIAL AND METHODS

The present work received institutional review committee and parent approval. This work was carried out in accordance to the ethical standards of the responsible institutional committee on human experimentation.

We studied 16 ureters obtained from 8 human fetuses (4 male and 4 female) and 14 ureters from 7 anencephalic human fetuses (4 male and 3 female) that died of causes non-related to the genitourinary tract. The fetuses were macroscopically well-preserved and there was no evidence of congenital malformation. The gestational age of the fetuses was determined in weeks post-conception (WPC), according to the foot-length criterion. Presently, the foot-length criterion is considered the most acceptable parameter used to calculate the gestational age (Mercer et al., 1987; Hern, 1988; Platt et al., 1988; Costa et al., 2002; Favorito et al., 2004). The fetuses were also evaluated regarding crown-rump length and body weight immediately before dissection, and all measurements were taken by the same observer.

After the measurements, the fetuses were carefully dissected with the aid of a stereoscopic lens with 16/25X magnification. The fetal ureter was carefully removed, together with kidneys and bladder. The ureter was separated from the other structures and fixed in 10% buffered formalin, and routinely processed for paraffin embedding, and 5µm thick sections were obtained at 200µm-intervals. Smooth muscle cells, connective tissue, elastic system fibers and collagen were studied by histochemical, immunohistochemical and biochemical methods.

Sections were stained with haematoxylin-eosin to assess the integrity of the tissue. We performed the following staining: Masson's trichrome, in order to quantify SMC and to determine the ureteral lumen area, thickness and ureteral diameter; Weigert Resorcin Fuchsin with previous oxidation in order to observe elastic system fibers; and Picro-Sirius Red with polarization for observation of different collagen types. SMC were quantified by a stereological method (Cavalcanti et al., 2007).

Five sections were stained, and five fields of each section were selected. All selected fields were photographed and the images were captured with Olympus BX51 microscopy and Olympus DP70 camera. Images were transferred to Image Pro software. The fibers were quantified using software Image J in order to determine the

volumetric density (Vv) of each component (Figure 1A). The ureter lumen area was determined by the contour of the epithelium (Figure 1B) and the ureter thickness was measured using the software at least five times in each specimen (Figure 1C).

The immunohistochemical analysis of the collagen type III (mouse monoclonal collagen III ABCAM) and collagen type I (mouse monoclonal collagen I ABCAM) fibers used the avidin biotin (ABC) method with positive and negative controls. The immunohistochemical analysis of the elastic system fibers used Monoclonal Elastin Antibody ab 9519 Abcam® Laboratories, Cambridge, MA, United States. The slides were previously treated with poly-L-lysine for better adherence of the sections.

For the biochemical analysis of the collagen, tissue samples were fixed in acetone. The concentration of total collagen in the bladder tissue was determined by a colorimetric hydroxyproline assay. Thus, 5 to 14 mg of dry, defatted ureter tissue was hydrolyzed in 6N HCl for 18 hours at 118°C, as previously described (Cabral et al., 2003). The assay was then carried out in the neutralized hydrolysates using a chloramine T method (Bergman et al., 1963). Results were expressed as micrograms of hydroxyproline per milligram of dry, defatted tissue.

Means were statistically compared using the Unpaired T test ($p < 0.05$) and the Wilcoxon Two-Sample Test with Graph Pad Prism software.

RESULTS

After dissection we did not observe any macroscopic anomalies in the urogenital system of the anencephalic fetus. The anencephalic fetuses studied ranged in age between 19 to 33 WPC, weighed between 280 and 1330g, and had crown-rump length between 14 and 25 cm. The fetus of the control group studied ranged in age between 16 to 27 WPC, weighed between 185 and 1128g, and had crown-rump length between 14.5 and 27 cm (Table 1).

The ureteral epithelium was well preserved in the anencephalic and control groups. We did not observe differences in the transitional epithelium in the anencephalic and control groups. The analysis of the ureteral lumen area shows a decrease ($p=0.0047$) in anencephalic ureter ($6365 \pm 1282\mu$) as compared to normal ($20170 \pm 5480\mu$). The ureteral diameter shows a decrease ($p=0.0024$) in anencephalic ureter ($166.7 \pm 10.99\mu$) as compared to normal ($240.0 \pm 26.66\mu$) and ureteral thickness were significantly smaller ($p=0.0144$) in anencephalic fetuses ($30.57 \pm 2.034 \mu$) as compared to normal ($47.49 \pm 7.453 \mu$).

Histochemistry with Weigert's has shown unclear results and to confirm the presence of elastic system elements, immunolabeling with elastin has been performed, showing its positivity only in fetuses from 27th WPC. There was no difference in elastic fibers distribution in normal and anencephalic fetuses (Figure 2).

Stereology analysis documented a decrease without significance ($p=0.1215$) of SMC in anencephalic ureter ($12.00 \pm 1.628\%$) as compared to normal ($13.51 \pm 0.9231\%$). In figure 3 we can observe the SMC arrangement in normal and anencephalic fetus ureters.

Biochemical analysis showed that the concentrations of total collagen in the ureter from normal (mean \pm SD, $38.19 \pm 16.86 \mu\text{g}$ hydroxyproline/mg dry tissue) and anencephalic ($44.26 \pm 7.13 \mu\text{g}$ hydroxyproline/mg dry tissue) fetuses are not significantly different ($p>0.05$)

In qualitative analysis, (immunohistochemistry) type III collagen was observed in both groups, although normal ureter fetuses showed a higher quantity (Figure 4A and Figure 4B). Regarding type I collagen, a small quantity was observed in both groups. Picro Sirius Red with polarization photomicrographies presented a difference in colors between groups. This difference could suggest changes in the

collagen fiber organization of anencephalic fetus ureters. The analysis shows a predominance of green in normal fetal ureter, suggesting collagen Type III presence and a predominance of red in anencephalic fetal ureter, suggesting collagen type I presence in this group (Figure 4C and Figure 4D)

DISCUSSION

The ureters develop from the caudal portion of the ureteric bud. At the fifth week of development, the ureteric bud arises as a diverticulum from the mesonephric (Wolfian) duct (Moore and Persaud, 2003). The ureter bud grows cranially and contacts the intermediate mesoderm. As it reaches the mesoderm in the lower lumbar - upper sacral region, a cap of mesoderm cells surrounds it. This cap of cells is the metanephrogenic blastema. The metanephrogenic blastema forms glomeruli, proximal tubules and distal tubules (Moore and Persaud, 2003). The ureteric bud divides and branches forming the renal pelvis, calyces, and collecting tubules which will provide a conduit for urine drainage in the mature kidney. At nine weeks of development the metanephros, which will become the mature kidney, starts to produce urine (Moore and Persaud, 2003).

Knowledge of the structure of the ureter in an anencephalic fetus is of great importance, as there are reports of an anencephalic fetus transplant donor with chronic renal failure where the ureter was used to divert urine (Laberge et al., 1987). The tissue-engineered will be useful in the future for ureteral reconstruction. There are some reports with autologous urothelial cells transplantation (Zhu Y, Geutis P) and ureteral reconstruction using autologous tubular grafts in animal models with good results (Zang J, Fu WJ). Analyze of ureteral structure in anencephalic fetuses could be important in tissue-engineered future researches.

In our samples we do not observed significant differences in SMC when comparing anencephalic and normal fetuses. A slight but not significant increase in SMC was observed in normal fetuses, but we observed significant decrease of lumen area, thickness and diameter in ureter of anencephalic fetuses. In a recent study we observed gross histological alterations in bladder of anencephalic fetuses (Pazos et al., 2011). The lesion in the nervous system with consequent alteration in nerve regulation could be a plausible hypothesis to explain structural changes in bladder and ureter in patients with neural tube defects.

Anencephalic fetuses have cerebral exposition, usually with spinal cord preservation. Bladder nerves in anencephalic fetuses could be modified due to cerebral lesions with consequent brain control damage in bladder nerves. This could lead to structural alterations in anencephalic bladder fetuses and in the ureters too.

Collagen and elastin are important components of the ureter wall, which affect ureter contraction. Collagen provides tensile strength although an over accumulation may inhibit ureteral contractility and the conduction of electrical impulses through the wall. Elastin provides tissue elasticity and could help compliance (Kim et al., 1991).

Elastic system fiber alterations are involved in fibrotic tissue formation; however, in our samples, we only observed the presence of elastic fibers in fetuses with more than 25WPC and we do not observed differences in elastic system fibers in anencephalic and control groups. This may indicate that this extracellular matrix component appears only in the third gestational trimester in fetal ureter. Previous studies showed the elastic system fibers in other human fetal genitourinary organs (Bastos et al., 2004)

In our study, we do not observed significant differences between elastic fibers the total collagen in normal and anencephalic ureters. We observed a small increase of collagen tipe I in anencephalic ureter fetuses. In previous study of anencephalic bladder we observed a predominance of collagen type III collagen. Collagen increases in bladder chronic obstruction in human adults. The abnormally large amount of collagen found in obstructed bladders is also believed to decrease muscle contractility, in addition to affecting bladder compliance and subsequent high intravesical pressure, which, result in changes in ureteral contraction and leads a histological changes in ureteral wall (Kim et al., 1991). Previous studies in rabbits, shows that ureteral obstruction causes progressive thickening of the lamina muscular with a great increase in collagen (cheng EY, 1993), findings not confirmed by our samples.

CONCLUSIONS

The concentrations of total collagen in the ureter from normal and anencephalic fetuses are not significantly different. Fetuses with anencephaly showed smaller diameter, area and thickness. These differences could indicate that anencephalic fetal ureter has significant structural alterations probably due to cerebral lesions with consequent brain control damage in ureter nerves.

List of abbreviations

WPC - weeks post-conception

Vv - volumetric density

SMC - Smooth Muscle Cells

REFERENCES

- Bastos A. L., Silva E. A., Costa W. S. and Sampaio F. J. B. (2004). The concentration of elastic fibers in the male urethra during human fetal development. *B.J.U. INT.* 94, 620-623.
- Bergman I. and Loxley R. (1963). Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Biochem.* 35, 1961- 1965.
- Blatter B. M., Star M. and Roeleveld N. (1994). Review of neural tube defects: risk factors in parental occupation and the environment. *Environmental Health Perspectives.* 102, 140-145.
- Byrne, P. (2005). Use of anencephalic newborns as organ donors. *Paediatr. Child. Health.* 10, 335-337.
- Cabral C. A. P., Sampaio F. J. B. and Cardoso L. E. M. (2003). Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycan and collagen as a consequence of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J. Urol.* 170, 2512- 2516.
- Carvalho, J.P.M., Costa, W.S., Sampaio, F.J., Favorito, L.A. (2012). Anencephaly does not cause structural alterations in the fetal penis
J Sex Med, 9:735-742.
- Cavalcanti A. G., Costa W. S., Baskin L. S., McAninch J. A. and Sampaio F. J. B. (2007). A morphometric analysis of bulbar urethral strictures. *B.J.U. INT.* 100, 397-402.
- Cheng EY, Maizels M, Chou P, Hartanto V, Shapiro E (1993)
Response of the newborn ureteropelvic junction complex to induced and later reversed partial ureteral obstruction in the rabbit model. *J Urol* ;150:782-789.
- Costa W. S., Sampaio F. J. B., Favorito L. A. and Cardoso L. E. (2002). Testicular migration: remodeling of connective tissue and muscle cells in human gubernaculum testis. *J. UROL.* 167, 2171- 2176.
- Davis A. (1988). The status of anencephalic babies: should their bodies be used as donor banks? *J. Med. Ethics.* 14, 150-153.
- Favorito L. A., Cardinot T. M., Morais A. R. M. and Sampaio F. J. B. (2004). Urogenital anomalies in human male fetuses. *Early Human Development.* 79, 41-47.

- Fu WJ, Xu YD, Wang ZX, Li G, Shi JG, Cui FZ, Zhang Y, Zhang X (2012). New ureteral scaffold constructed with composite poly (L-lactic acid)-collagen and urothelial cells by new centrifugal seeding system *J Biomed Mater Res*;100:1725-33.
- Geutjes P, Roelofs L, Hoogenkamp H, Walraven M, Kortmann B, de Gier R, Farag F, Tiemessen D, Sloff M, Oosterwijk E, van Kuppevelt T, Daamen W, Feitz W.(2012) Tissue engineered tubular construct for urinary diversion in a preclinical porcine model. *J Urol.* ; 188:653-660.
- Hern W.M. (1984). Correlation of fetal age and measurements between 10 and 26 weeks of gestation. *Obst. Gynecol.* 63. 26-32.
- Kalaycıođlu A., Karaca M., Can I., Keles O.N., Üçüncü Y., Gündođdu C, Uyanık A. and Bünyami Ünal B. (2010). Anencephalic fetuses can be an alternative for kidney transplantation: a stereological and histological investigation. *Histol. Histopathol.* 25, 413-422.
- Kim, K. M., B. A. Kogan, C. A. Massad, Y. C. Huang(1991) Collagen and elastin in the normal fetal bladder. *J Urol* 146:524-27.
- Laberge, J. M. (1987) Transplanting organs from anencephalic infants. *CMAJ* 137:437-8.
- Mercer, B.M., S. Sklar, A. Shariatmadar, M. S. Gillieson, M.K. D'Alton (1987) Fetal foot length as a predictor of gestational age. *Am J Obst Gynecol* 156: 350-56.
- Milliez, J. (2008) Anencephaly and organ transplantation. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 102: 99.
- Moore, K. L., T. V. N. Persaud (2003) *The developing human.* Elsevier Science Health Science 7th ed.
- Oswald, J., Brenner, E., Deibl, M., Fritsch, H., Bartsch, G., Radmayr, C. (2003). Longitudinal and thickness measurement of the normal distal and intravesical ureter in human fetuses. *J Urol*, 169:1501-1504.
- Pazos HM, Lobo ML, Costa WS, Sampaio FJ, Cardoso LE, Favorito LA (2011): Do neural tube defects lead to structural alterations in the human bladder? *Histol Histopathol.* 26:581-8.
- Platt L.D., Medearis A.L., DeVore G.R., Horenstein J.M., Carlson D.E. and Brar H.S. (1988). Fetal foot length: Relationship to menstrual age and fetal measurements in the second trimester. *Obstet. Gynecol.* 71, 526-531.

- Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. (2011) Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet.*; 377:1175-1182.
- Salaman J. R. (1989). Anencephalic organ donors. *B.M.J.* 298, 622- 623.
- Xu Y, Fu W, Li G, Shi J, Tan H, Hu K, Cui F, Lin Q, Zhang X (2012). Autologous urothelial cells transplantation onto a prefabricated capsular stent fortissue engineered ureteral reconstruction. *J Mater Sci Mater Med.* ;23:1119-28.
- Zhang J, Gu GL, Liu GH, Jiang JT, Xia SJ, Sun J, Zhu YJ, Zhu J. (2012) Ureteral reconstruction using autologous tubular grafts for the management of ureteral strictures and defects: an experimental study. *Urol Int.* 2012;88(1):60-5.
- Zhao Z, Yu H, Xiao F, Wang X, Yang S, Li S. (2012) Differentiation of adipose-derived stem cells promotes regeneration of smooth muscle for ureteral tissue engineering. *J Surg Res.* 2012 Mar 28.

Table 1: The table shows the age and the fetal parameters of our sample. The anencephalic fetuses studied ranged in age between 19 to 33 WPC, weighed between 280 and 1330g, and had crown-rump length between 14 and 25 cm. The fetus of the control group studied ranged in age between 16 to 27 WPC, weighed between 185 and 1128g, and had crown-rump length

between 14.5 and 27 cm. WPC = age in weeks post-conception, g=grams; CRL=crown-rump length; cm=centimeters, F= Female fetuses; M=Male Fetuses.

Fetus(Sex)	Age (WPC)	Anomaly	Weight (g)	CRL(cm)
1(M)	19	anencephaly	280	14
2 (F)	20	anencephaly	280	14
3 (M)	20	anencephaly	340	16.5
4 (F)	22	anencephaly	420	19
5 (M)	21	anencephaly	420	19.5
6(F)	30	anencephaly	1220	22
7(M)	33	anencephaly	1330	25
8(M)	16	none	185	14.5
9(M)	16	none	195	15
10(M)	17	none	190	16
11(F)	17	none	225	17.5
12(F)	17	none	140	18.5
13(F)	18	none	280	16.5
14(F)	18	none	235	15.3
15(F)	27	none	1128	27