



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Helce Ribeiro Julio Junior

**Estudo estrutural da bexiga em fetos humanos normais e com síndrome de
Prune Belly**

Rio de Janeiro

2018

Helce Ribeiro Julio Junior

Estudo estrutural da bexiga em fetos humanos normais e com síndrome de Prune Belly

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Rio de Janeiro

2018

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

J94 Julio Junior, Helce Ribeiro.
Estudo estrutural da bexiga em fetos humanos normais e com síndrome de Prune Belly. / Helce Ribeiro Julio Junior. – 2018.
51 f.

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

1. Síndrome do Abdome em Ameixa Seca - Histopatologia - Teses. 2. Bexiga - Histologia - Teses. 3. Feto - Anatomia – Teses. I. Favorito, Luciano Alves. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.62:616-091.8

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

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

Assinatura

Data

Helce Ribeiro Julio Junior

Estudo estrutural da bexiga em fetos humanos normais e com síndrome de Prune Belly

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

Aprovada em 06 de junho de 2018.

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

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

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

Prof. Dr. Valter Javaroni
Hospital Federal de Bonsucesso

Prof. Dr. João Paulo Martins de Carvalho
Hospital Federal Cardoso Fontes

Prof. Dr. Nicolino César Rosito
Hospital Moinhos de Vento

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família, em especial à minha esposa, Gisele, que sempre me apoiou. Também não poderia me esquecer de agradecer aos colegas de laboratório, sobretudo os professores doutores Luciano Alves Favorito, por ter me orientado, e Francisco José Barcellos Sampaio, por ter me recebido de portas abertas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família e amigos, bem como aos colegas de laboratório que me apoiaram nesse período de pesquisa. Agradeço especialmente ao meu orientador, professor doutor Luciano Alves Favorito.

O presente trabalho foi realizado na Unidade de Pesquisa Urogenital, Centro Biomédico, Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Recebeu apoio financeiro, direta ou indiretamente, de CNPq, Faperj e Capes.

RESUMO

JULIO JUNIOR, Helce Ribeiro. *Estudo estrutural da bexiga em fetos humanos normais e com síndrome de Prune Belly*. 2018. 51 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A síndrome de Prune Belly (SPB) é uma desordem caracterizada pela deficiência dos músculos da parede abdominal, malformações do trato urinário e criptorquia bilateral. O objetivo deste trabalho é a avaliação estrutural da bexiga de fetos com tal síndrome. Foram estudadas três bexigas de fetos masculinos com a anomalia e sete bexigas de fetos sem ela. A idade gestacional destes foi determinada em semanas pós-concepção (SPC), de acordo com o critério do comprimento do maior pé. Após essas medidas, os fetos foram dissecados, com magnificação de 16/25x. O abdome e a pelve fetal foram dissecados para a identificação do trato urogenital. A bexiga e a próstata foram separadas das outras estruturas e fixadas em formalina tamponada 10%. Realizou-se processamento histológico de rotina para inclusão em parafina e, em seguida, sofreram cortes de 5µm de espessura, com intervalo de 200µm entre cada um deles. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina para verificar a integridade do material. Foram utilizados o Tricrômico de Masson, para quantificar o tecido conjuntivo e o muscular, a Resorcina Fucsina de Weigert, com prévia oxidação, para observação das fibras do sistema elástico, e o Vermelho de Picro-Sirius, com polarização, para a observação dos diferentes tipos de colágeno. Os tecidos muscular e conjuntivo e as fibras do sistema elástico foram quantificadas por método estereológico. Imunostiquímica com tubulina (tubulina beta III) foi realizada para avaliação dos nervos da bexiga. As imagens foram capturadas com a utilização do microscópio Olympus BX51 e da câmera Olympus DP70. Em seguida, foram transferidas para o *software* Image Pro. As fibras foram quantificadas com a utilização do *software* Image J (versão 1.34s – National Institute of Health, Bethesda, MD) para a determinação da densidade volumétrica (Vv) de cada componente. As médias foram estatisticamente comparadas, utilizando os testes T não pareado e Mann-Whitney. O teste de Wilcoxon foi usado para as variáveis contínuas. O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os fetos com SPB tinham idade entre 17 e 31 SPC, pesavam entre 240 e 2150g e tinham o CVC entre 18 e 43cm. Já os fetos do grupo-controle tinham idade entre 12 e 35 SPC, pesavam entre 210 e 2860g e tinham o CVC entre 18 e 34cm. A análise quantitativa demonstrou que o tecido muscular era significativamente menor ($p=0.04$) nos fetos com SPB (9.67% a 17.75%, média=13.2%) quando comparados com o grupo-controle (13.33% a 26.56%, média=17.43%). A análise qualitativa do colágeno demonstrou a predominância da coloração verde no grupo-controle, sugerindo a presença de colágeno tipo 3 e a predominância da cor vermelha nos fetos com SPB, indicando a predominância de colágeno tipo 1 neste grupo. A análise qualitativa dos nervos com imunohistoquímica com tubulina demonstrou a predominância de nervos no grupo-controle quando comparados com os fetos com SPB. A bexiga destes tem uma concentração menor de fibras musculares lisas, colágeno tipo 3 e nervos. A alteração estrutural pode ser um dos fatores envolvidos na anomalia do trato urinário, tais como a bexiga de grande capacidade nos pacientes com a SPB.

Palavras-chave: Bexiga. Síndrome de Prune Belly. Histologia.

ABSTRACT

JULIO JUNIOR, Helce Ribeiro. *Structural study of the bladder in normal human fetuses and with Prune Belly syndrome*. 2018. 51 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Prune Belly syndrome is a disorder characterized by deficiency of the abdominal muscles, malformations of the urinary tract and bilateral cryptorchidism. The objective of this thesis is to study the bladder structure of fetuses with Prune Belly syndrome (PBS). We studied three bladders obtained from three male fetuses with PBS and seven bladders obtained from seven male fetuses without anomaly. The gestational age of the fetuses was determined in weeks post conception (WPC), according to the foot-length criterion. After the measurements, the fetuses were carefully dissected with the aid of a stereoscopic lens with 16/25X magnification. The abdomen and pelvis were opened to identify and expose the urogenital organs. Each bladder was dissected and embedded in paraffin, from which 5µm thick sections were obtained and stained with Masson's trichrome (to quantify connective tissue and smooth muscle) and picrosirius red with polarization (to observe collagen). Also, immunohistochemistry with tubulin (Tubulin, beta III, Mouse Monoclonal Antibody) was applied to observe the bladder nerves. The images were captured with an Olympus BX51 microscope, and Olympus DP70 camera. The stereological analysis was done with the Image Pro and Image J programs, using a grid to determine volumetric densities (Vv). Means were statistically compared using the Mann-Whitney test and a p-value < 0.05 was considered statistically significant. The PBS fetuses ranged in age from 17 to 31 WPC and weighed between 240 and 2150g. The fetuses from the control group ranged in age from 12 to 35 WPC, and weighed between 430, and 2860g. Quantitative analysis documented that smooth muscle fibers were significantly smaller (p=0.04) in PBS fetuses (9.67% to 17.75%, mean=13.2%) compared to the control group (13.33% to 26.56%, mean=17.43%). The analysis of collagen fibers showed predominance of green in the control group, suggesting collagen type III presence, and predominance of red in the in PBS fetal bladders, suggesting collagen type I presence in this group. The qualitative analysis of the nerves with immunohistochemistry with tubulin showed predominance of nerves in the control group compared to the PBS fetuses. The bladder in PBS had lower concentrations of smooth muscle fibers, collagen type III and nerves. These structural alterations can be one of the factors involved in urinary tract abnormality such as distended bladder in patients with Prune Belly syndrome.

Keywords: Prune Belly syndrome. Bladder. Histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Abdômen típico da síndrome de Prune Belly em um feto com 31 semanas pós-concepção	13
Figura 2 –	Ultrassonografia de feto com síndrome de Prune Belly, com seta evidenciando ausência de musculatura de parede abdominal e bexiga dilatada.....	14
Figura 3 –	Esquema evidenciando a divisão da cloaca, que originará o seio urogenital entre a quarta e a sexta semanas de gestação.....	16
Figura 4 –	Fotografia mostrando o estado de conservação dos fetos utilizados no trabalho	20
Figura 5 –	Figura evidencia as características de um dos fetos portadores da síndrome de Prune Belly estudados	20
Gráfico 1 –	Curva de crescimento traçada tendo como base os dados de Streeter (1920), correlacionando o comprimento do pé (CP) com a idade gestacional em semanas pós-concepção (SPC)	21
Figura 6 –	Figura evidencia a realização da medida do comprimento do maior pé com a utilização de um paquímetro de precisão	22
Figura 7 –	Realização das medidas do comprimento vértice-cóccix do feto e do seu comprimento total com a utilização de uma fita métrica	22
Figura 8 –	Bloco do sistema urogenital retirado de um feto do grupo-controle com 21 semanas pós-concepção	23
Figura 9 –	Fotomicrografia da bexiga com a grade de 100 pontos do software Image J sobreposta ao tecido para quantificação. Tricrômico de Masson X400	25
Tabela 1 –	A tabela mostra a idade (em SPC) e os parâmetros fetais de nossa amostra (peso em gramas e CVC em cm)	26
Figura 10 –	Fotografia evidencia um feto com síndrome de Prune Belly com 31 SPC .	27
Figura 11 –	Fotografia e fotomicrografia.....	27
Figura 12 –	Fotomicrografias da bexiga de um feto do grupo-controle	28
Figura 13 –	Análise do Colágeno	29
Figura 14 –	Fotomicrografias de bexigas de fetos mostrando a presença do tecido muscular nos grupos	29

Figura 15 –	Análise da distribuição dos nervos	30
Figura 16 –	Análise da distribuição dos nervos	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CVC	Comprimento vértice-cóccix
HCl	Ácido clorídrico
HPB	Hiperplasia prostática benigna
Hupe	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IC	Intervalo de confiança
SPB	Síndrome de Prune Belly
SPC	Semanas pós-concepção
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

Vv	Densidade volumétrica
μm	Micrômetros
%	Porcentagem
cm	Centímetros
mg	Miligramas
mm	Milímetros
r	Índice de correlação

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	OBJETIVO	18
2	MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1	Estudo dos fetos	19
2.2	Análise quantitativa	24
2.3	Análise estatística	25
3	RESULTADOS	26
3.1	Colágeno	28
3.2	Tecido muscular	29
3.3	Nervos	30
4	DISCUSSÃO	31
	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO A - Parecer do comitê de ética	40
	ANEXO B - Artigo publicado na revista <i>Neurorology and Uroynamics</i>	41
	ANEXO C - Artigo aceito para publicação na revista <i>Biomedical Research International</i>	46

INTRODUÇÃO

As malformações congênitas acometem uma em cada 40 gestações, com, aproximadamente, 20% dos fetos indo a óbito ainda no período uterino, como natimortos ou como resultado de abortos terapêuticos (COPP; GREENE, 2012).

A síndrome de Prune Belly (SPB) é uma anomalia congênita rara que afeta cerca de um em cada 30.000 a 50.000 nascimentos (HASSETT; SMITH; HOLLAND, 2012). Essa síndrome é caracterizada por uma tríade clássica de sinais, a saber: a) desenvolvimento deficiente dos músculos abdominais, o que faz com que a pele do abdome apresente um aspecto enrugado, como o de uma ameixa seca; b) criptorquidia bilateral e c) anormalidades do trato urinário, como hidronefrose bilateral severa, megaureter e megabexiga (Figura 1) (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002). A obstrução uretral, presente em um terço dos pacientes com SPB, pode ser a principal causa das malformações nessa síndrome (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002; STEPHENS; ZUGOR; SCHOTT; LABANARIS, 2012).

Frolich fez a primeira descrição de um neonato com ausência congênita da musculatura da parede abdominal (GOULDING; GARRETT, 1978). Em 1895, Parker descreveu um conjunto de anomalias do trato urinário (criptorquia, hidronefrose, hidroureter e megacisto vesical) junto com a ausência da musculatura da parede abdominal (GOULDING; GARRETT, 1978). Porém, coube a Osler, em 1901, cunhar o termo *síndrome de Prune Belly* (GOULDING; GARRETT, 1978). Tal síndrome é composta por três achados principais: flacidez da parede abdominal, criptorquidismo intra-abdominal e anormalidade urológica (ROUTH et al., 2010; SEIDEL et al., 2015). Devido à ausência da musculatura da parede abdominal, esta assume uma forma flácida, em aspecto de ameixa, achado característico dessa síndrome, conforme já apontado e como pode ser visto na Figura 1.

Mais de 96% dos casos são masculinos (GOULDING; GARRETT, 1978), com mulheres sendo acometidas em menos de 5% dos casos, nos quais a musculatura abdominal é ausente, porém com poucas (ou nenhuma) alterações do trato urinário (GOULDING; GARRETT, 1978) e sem anomalias gonadais (SEIDEL, 2015). SPB tem incidência estimada de 3,6 – 3,8 em cada 100.000 nascimentos de bebês do sexo masculino nos Estados Unidos (SEIDEL, 2015).

Figura 1 – Abdômen típico da síndrome de Prune Belly em um feto com 31 semanas pós-concepção



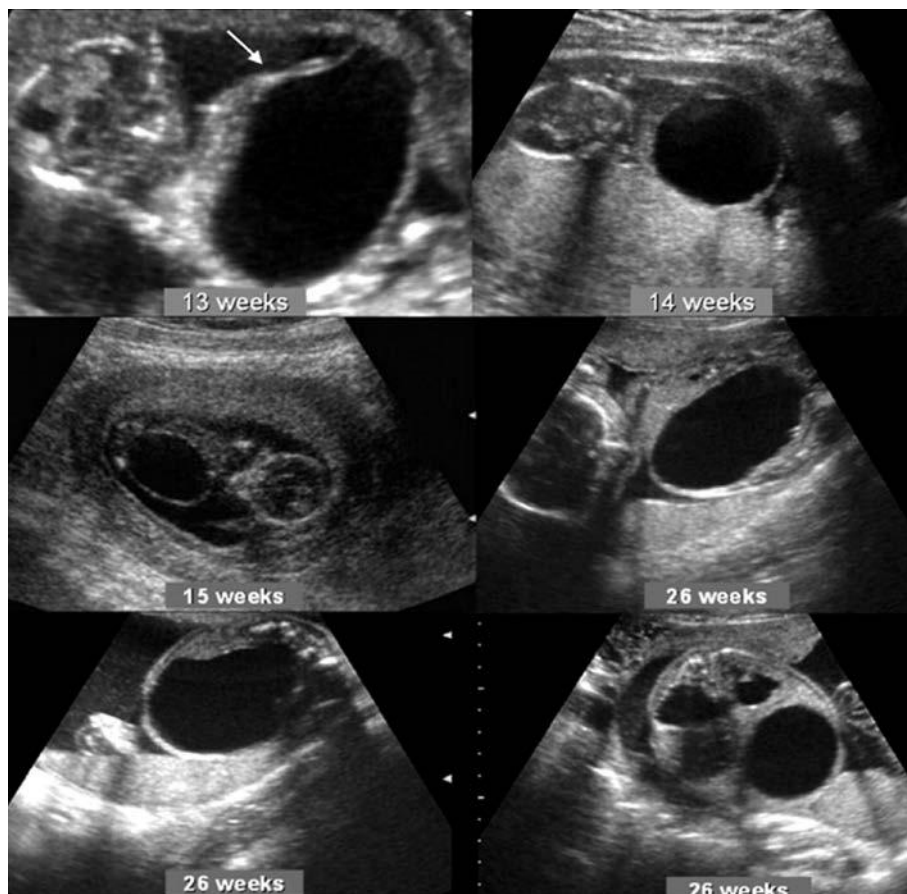
Fonte: RR SCHOOL OF NURSING, [2017?].

No estudo de Routh et al. (2010), 133 neonatos masculinos com SPB foram avaliados. Entre eles, 50% eram brancos, 31% negros e 10% hispânicos, com um universo de 43% de fetos prematuros sendo responsáveis por 56% dos óbitos. Segundo Wein et al. (2007), a síndrome de Prune Belly pode ser classificada em três grupos: 1) os que apresentam displasia renal importante e hipoplasia pulmonar presente, correspondentes a 20% dos casos, nos quais a maioria é natimorta ou morre logo após o nascimento; 2) os correspondentes a 40% dos casos, com função renal adequada presente desde o nascimento, apesar de várias anormalidades anatômicas e funcionais, que, porém pode tornar-se comprometida por obstrução ou infecção. 1/3 desses pacientes, se não tratados, vão a óbito nos primeiros dois anos de vida, por insuficiência renal ou sepse; por fim, 3) os que apresentam pequenas anormalidades do trato urinário, com função renal preservada e sobrevivência na maioria dos casos, correspondentes a 40% dos casos.

A SPB continua associada à alta mortalidade perinatal, provavelmente devido à prematuridade e a complicações pulmonares. De forma geral, o principal fator determinante para a sobrevida é a gravidade das anomalias do trato urinário, em particular o grau de displasia renal. A orquidopexia foi o procedimento cirúrgico mais realizado em pacientes com SPB para correção da criptorquia. Quando não tratados, apesar de níveis sérios de testosterona normais,

esses pacientes não apresentam espermatogênese após a puberdade. A SPB pode ser detectada ainda durante a vida intrauterina, conforme ilustra a Figura 2.

Figura 2 – Ultrassonografia de feto com síndrome de Prune Belly, com seta evidenciando ausência de musculatura de parede abdominal e bexiga dilatada



Fonte: CONSENSO de hidronefrose da SPU, 2016.

A etiologia da SPB não é conhecida. No entanto, algumas hipóteses têm sido sugeridas. Estudos revelam a possibilidade de herança genética e possível associação com a trissomia dos cromossomas 18 e 21 (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002; ZUGOR; SCHOTT; LABANARIS, 2012). Outras proposições, tais como uropatia obstrutiva distal e defeito mesodérmico da parede abdominal, anomalias do alantoide e do trato urinário, também vêm sendo estudadas (HASSETT; SMITH, HOLLANDA, 2012; STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002; ZUGOR; SCHOTT; LABANARIS, 2012; SHIMADA et al., 2000).

A causa da criptorquidia na SPB é desconhecida. No entanto, especula-se que as alterações anatômicas na parede abdominal impedem um aumento da pressão intra-abdominal, que é um dos fatores necessários para a migração testicular. Também se considera que a

megabexiga, nessa síndrome, torna o canal inguinal extraperitoneal, de modo que o gubernáculo e seu processo vaginal não podem desenvolver-se normalmente (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002; ZUGOR; SCHOTT; LABANARIS, 2012).

O estudo de Costa et al. (2015) mostrou que fetos com SPB apresentam alterações no gubernáculo, o que poderia desempenhar um papel na criptorquia dessa síndrome. De fato, o processo de migração testicular depende de estímulos hormonais e de modificações anatômicas (BACKHOUSE, 1982; HEYNS; HUTSON, 1995). O testículo migra do abdome para o escroto, atravessando a parede abdominal e o canal inguinal entre a décima quinta e vigésima oitava semana pós-concepção (BACKHOUSE, 1982; HEYNS; HUTSON, 1995; HEYNS, 1987; SAMPAIO; FAVORITO, 1998). O momento em que começa essa descida é controverso: Backhouse (1982) relata que o processo se inicia próximo à vigésima quarta semana, enquanto Heyns (1987), Sampaio e Favorito (1998) relatam casos nos quais a descida começa já com 17 semanas.

Quanto à bexiga urinária, sabemos que ela é um órgão muscular oco que recolhe a urina produzida pelos rins e funciona como um reservatório temporário (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002). É constituída por mucosa (revestida por epitélio de transição), camada muscular e adventícia (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002). A cloaca primitiva é dividida pelo septo urorretal, processo que se estende da quarta até a sétima semana pós-concepção (SADLER, 1995; MOORE, 1977; MAIZELS, 1992). Ela é dividida no canal anorretal posterior e no seio urogenital, localizado anteriormente, conforme demonstrado na Figura 3. A membrana cloacal é dividida também em duas porções, a membrana urogenital, anterior, e a membrana anal, posteriormente. O seio urogenital, originado da cloaca primitiva, é dividido em três porções: vesical, pélvica e fálica.

A porção vesical é a mais superior e a mais larga do seio urogenital. Inicialmente, ela é contínua com o alantoide, cujo lúmen posteriormente se oblitera, originando o úraco (SADLER, 1995; MOORE, 1977; MAIZELS, 1992). A segunda porção do seio urogenital, situada abaixo da porção vesical, é a porção pélvica, de onde se originarão a próstata e a porção membranosa da uretra, como pode ser igualmente depreendido da Figura 3, que também demonstra que a porção distal do seio urogenital é a porção fálica, que é fechada externamente pela membrana urogenital.

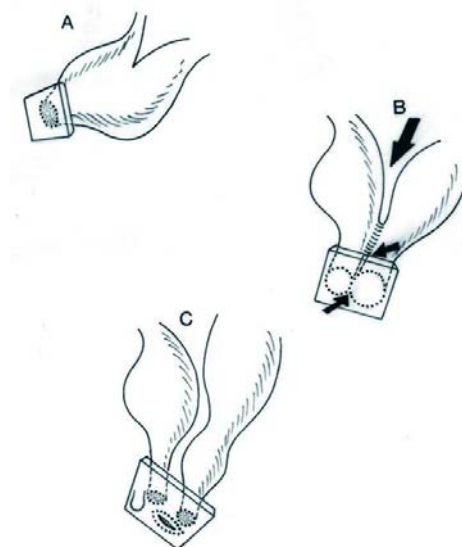
Em torno da quinta semana de desenvolvimento, a porção do ducto mesonéfrico situada distalmente à origem dos brotos uretéricos se dilata e é absorvida pela região do seio urogenital (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002). Os dutos mesonéfricos se fundem na linha média, originando uma região triangular, o futuro trígono vesical (PARK, 2002).

A bexiga é, então, dividida sob o ponto de vista embriológico em duas porções: corpo vesical e trígono. O corpo vesical é derivado do endoderma da região vesical do seio urogenital. O epitélio dessa região é derivado do endoderma do seio urogenital; já a lâmina própria, as camadas musculares e a adventícia derivam do mesênquima esplâncnico adjacente (SADLER, 1995; MOORE, 1977; MAIZELS, 1992).

O trígono se origina da incorporação dos dutos mesonéfricos na base da bexiga em desenvolvimento (PARK, 2002). Inicialmente, esses dutos contribuem para a formação da mucosa do trígono vesical, no entanto, o epitélio é substituído pelo epitélio endodérmico do seio urogenital (SADLER, 1995; MOORE, 1977; MAIZELS, 1992).

Diversas anomalias congênitas podem acometer a bexiga, sendo as principais: as anomalias do úraco (originadas por falhas no fechamento do alantoide), as de septação, os divertículos congênitos de bexiga e a extrofia vesical.

Figura 3 – Esquema evidenciando a divisão da cloaca, que originará o seio urogenital entre a quarta e a sexta semanas de gestação



Legenda: a) Cloaca primitiva; b) Divisão da cloaca pelo septo urorretal (setas); c) Término da divisão da cloaca terminada com a formação do seio urogenital anterior e o canal anorretal posterior.

Fonte: STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002.

A bexiga fetal normal é visualizada, aproximadamente, na décima semana gestacional, devido a ser, nesse momento, o início da produção de urina. No entanto, as opiniões sobre o início da produção de urina, de fato, variam da décima primeira até a décima sexta semanas de gestação, com base em ultrassonografias (WILCOX; CHITTY, 2001; BRONSHTEIN; BARHAVA; BLUMENFELD, 1993; PATTEN et al., 1990). Entre a quarta e a quinta semanas do

desenvolvimento fetal, a bexiga, localizada próxima à região umbilical, migra para a região pélvica e posiciona-se próximo ao púbis (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002). Durante a migração da bexiga, a luz do úraco estreita-se e progressivamente fecha-se, tornando-se um cordão fibroso que conecta a cúpula da bexiga ao umbigo (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002). Após o nascimento, essa estrutura vestigial recebe o nome de ligamento umbilical mediano (ASHLEY et al., 2006). O momento do fechamento do úraco e as suas dimensões ainda são desconhecidos.

Newman (1989) descreveu que a bexiga fetal humana passa por uma série de transformações em seu desenvolvimento da décima terceira até a vigésima primeira semanas gestacionais, finalmente adquirindo um urotélio típico e uma camada muscular bem desenvolvida. Até a décima primeira semana gestacional, a parede da bexiga é formada por mesênquima e este, gradualmente, amadurece em tecido conjuntivo frouxo. O colágeno torna-se aparente por volta da décima terceira semana gestacional.

O colágeno e a elastina são componentes importantes da parede da bexiga que participam do seu funcionamento. O colágeno proporciona resistência de tensão, porém, um acúmulo excessivo dessa substância pode inibir a contratilidade da bexiga e a condução dos impulsos elétricos através da parede. A elastina proporciona elasticidade ao tecido e pode ajudar na complacência (KIM et al., 1991).

No tecido muscular, o papel do colágeno e da elastina é proporcionar sustentação, da mesma forma que os tendões no tecido esquelético. Dessa maneira, como o músculo liso não apresenta tendões, ele necessita de uma maior quantidade de colágeno (KIM; KOGAN; MASSAD, 1991).

O músculo detrusor da bexiga é um dos que apresenta a camada mais espessa de músculo liso. Ele é responsável pela principal função da bexiga, que é o armazenamento e a eliminação da urina. Em algumas condições patológicas, como a hiperplasia prostática benigna (HPB), as válvulas posteriores de uretra, a espinha bífida e os danos no cordão espinhal, a organização e a função do músculo detrusor são profundamente alteradas. Essas alterações levam à complacência anormal de bexiga e à subsequente pressão intravesical elevada, a qual, não sendo tratada, ocasiona danos renais (BASKIN et al., 2001).

Estudos qualitativos e quantitativos sobre a matriz extracelular, a musculatura e os nervos da bexiga na síndrome de Prune Belly são extremamente raros. Diante de tal lacuna, a indagação deste trabalho é: a estrutura da bexiga em fetos humanos com síndrome de Prune Belly apresenta diferença em relação aos fetos sem anomalias?

1 OBJETIVO

O objetivo desta tese foi realizar uma análise morfológica de fetos humanos portadores de síndrome de Prune Belly, avaliando, por métodos quantitativos, possíveis alterações na matriz extracelular, nos nervos e na musculatura da bexiga.

2 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 923-662-CEP/HUPE, indicado no ANEXO A.

2.1 Estudo dos fetos

Foram utilizados sete fetos humanos sem anomalias aparentes e três fetos portadores da síndrome de Prune Belly, todos do sexo masculino. Nenhum dos fetos estudados apresentou morte relacionada ao aparelho urogenital, todos apresentavam bom estado de preservação, conforme demonstrado na Figura 4. Os fetos portadores da síndrome de Prune Belly demonstravam as características típicas dessa anomalia, ou seja, criptorquia bilateral, megabexiga e agenesia da musculatura da parede abdominal anterior (Figura 5). Os fetos utilizados neste estudo foram doados pelo Instituto Fernandes Figueira.

Todos os fetos estudados encontravam-se em perfeito estado de conservação, com classificação grau I, segundo Streeter (1920), ou seja: apresentavam-se róseos, brilhantes, com tecidos firmes, sem traumatismos ou hematomas. Após constatado o óbito, os fetos eram mantidos a uma refrigeração menor que quatro graus centígrados, por um período de 24 a 72 horas. Ao chegarem ao Laboratório de Pesquisa Urogenital da Uerj, os fetos eram descongelados, limpos, identificados e analisados quanto ao seu aspecto morfológico.

A idade gestacional dos fetos foi determinada em semanas pós-concepção (SPC), de acordo com o critério do comprimento do maior pé (Gráfico 1). Eram feitas três medidas de cada um dos pés, direito e esquerdo. Em seguida, era feita a média entre as três medidas de cada um dos pés. Aquele que apresentasse a maior média seria utilizado para a determinação da idade gestacional. Atualmente, esse critério é o parâmetro mais aceito para o cálculo da idade gestacional (HERN, 1984; MERCER et al., 1987; PLATT et al., 1988; FAVORITO; COSTA; SAMPAIO, 2010; FAVORITO; SAMPAIO, 2014). Também foram determinados o comprimento vértice-cóccix dos fetos e o seu peso corporal imediatamente antes da dissecação. Todas as medidas foram feitas pelo mesmo examinador. A primeira medida tomada era o peso, utilizando-se uma balança de precisão de 1.0g. Em seguida, eram tomadas medidas lineares: comprimento total (CT),

comprimento vértice-cóccix (VC) e comprimento do maior pé (Figuras 6 e 7). Para as medidas lineares usou-se uma fita métrica e, para o comprimento do maior pé (região mais posterior do calcanhar até a extremidade do dedo mais proeminente, primeiro ou segundo), foi utilizado um paquímetro de 0.01cm de precisão. Todas as medidas foram feitas pelo mesmo investigador.

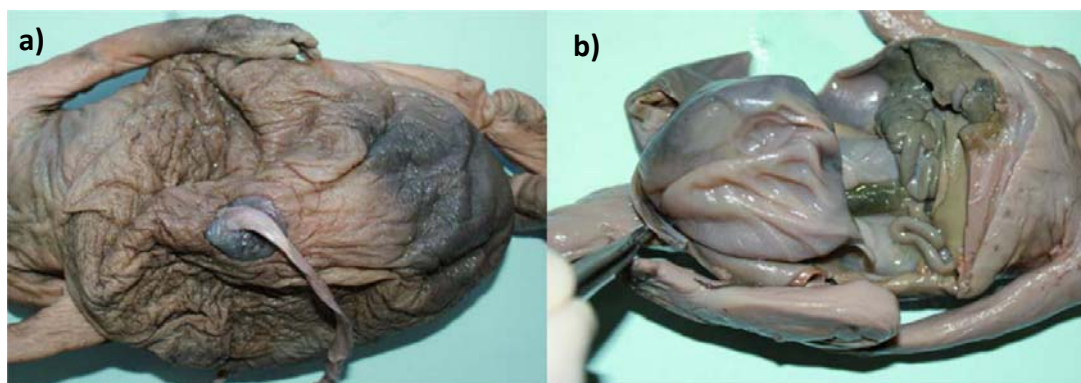
Após os procedimentos descritos previamente, realizamos a dissecação dos órgãos do sistema urinário e genital dos fetos com a retirada de um bloco contendo a bexiga, a próstata e o pênis (Figura 8).

Figura 4 – Fotografia mostrando o estado de conservação dos fetos utilizados no trabalho



Fonte: O autor, 2010.

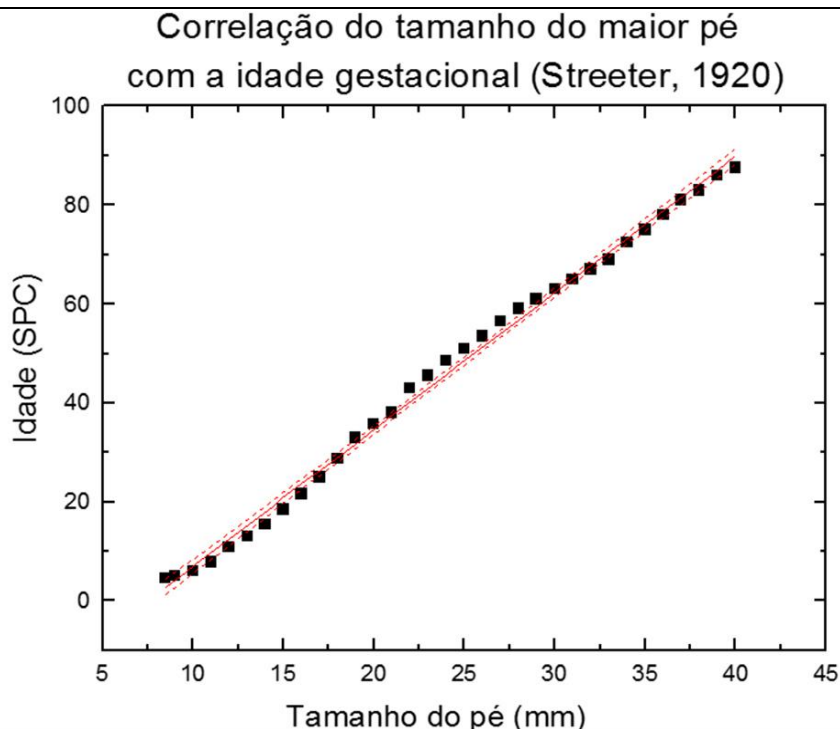
Figura 5 – Figura evidencia as características de um dos fetos portadores da síndrome de Prune Belly estudados



Legenda: a) Podemos observar o abdome característico da síndrome (esquerda); b) após a retirada da parede abdominal, podemos observar a presença de megabexiga (direita).

Fonte: O autor, 2016.

Gráfico 1 – Curva de crescimento traçada tendo como base os dados de Streeter (1920), correlacionando o comprimento do pé (CP) com a idade gestacional em semanas pós-concepção (SPC). Este gráfico foi utilizado para determinar a idade gestacional dos fetos estudados e foi construído em escala semilogarítmica

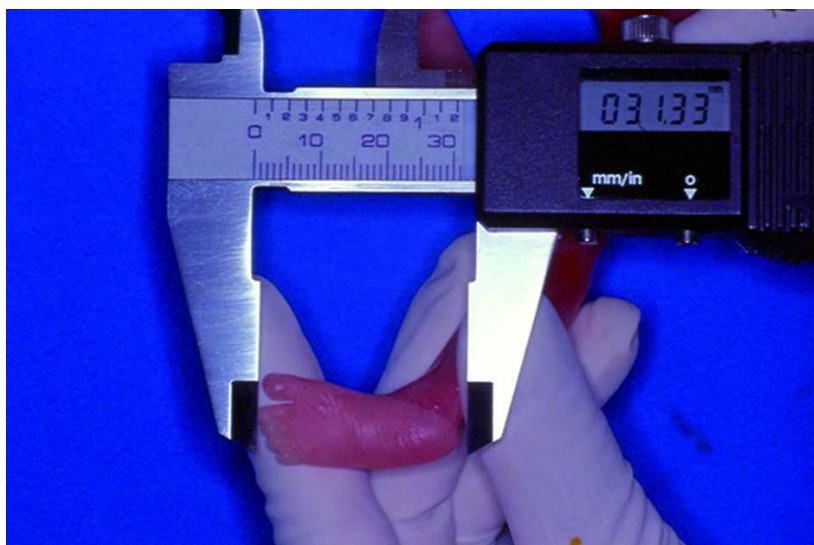


Equação alométrica relativa ao gráfico acima: $(Y = A + B * X)$, onde: X = Idade fetal em semanas pós-concepção e Y = comprimento do maior pé em mm.

Parâmetro	Valor	Desvio padrão
A	-20.67676	0.85318
B	2.76421	0.03304
SD	1.80236	
P	4.3706E-38	
R	0.99779	

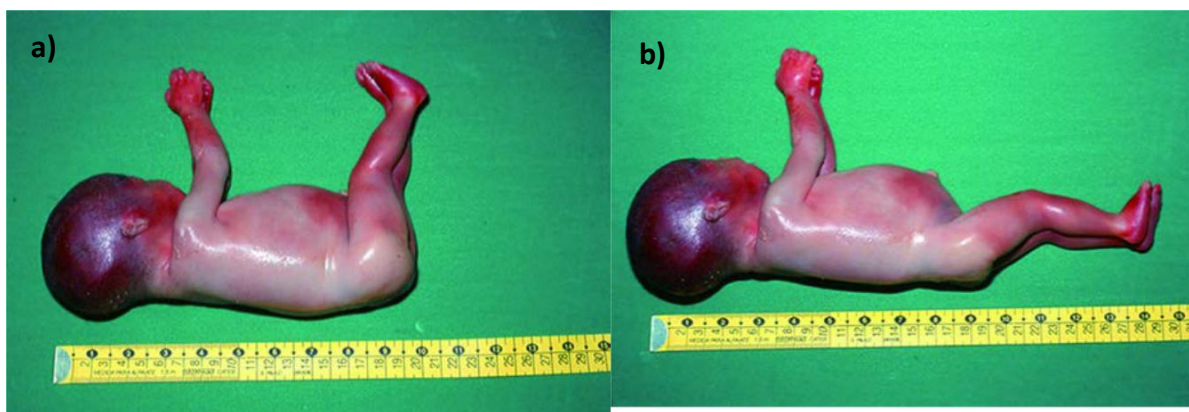
Fonte: SAMPAIO; LACERDA; PRATES, 1989; FAVORITO, 1997; FREITAS, 2000.

Figura 6 – Figura evidencia a realização da medida do comprimento do maior pé com a utilização de um paquímetro de precisão



Fonte: O autor, 2016.

Figura 7 – Realização das medidas do comprimento vértice-cóccix do feto e do seu comprimento total com a utilização de uma fita métrica



Legenda: a) Medida do comprimento vértice-cóccix (VC) do feto (figura esquerda) com a utilização de fita métrica;
b) Medida comprimento total (CT), do feto com a utilização de uma fita métrica (figura direita).

Fonte: O autor, 2016.

Figura 8 – Bloco do sistema urogenital retirado de um feto do grupo-controle com 21 semanas pós-concepção



Nota: A figura evidencia o bloco do sistema urogenital retirado de um feto do grupo-controle com 21 semanas pós-concepção, composto por pênis, próstata e bexiga. Podemos evidenciar os dois testículos e os gubernáculos na parte superior da figura

Fonte: O autor, 2016.

2.2 Análise quantitativa

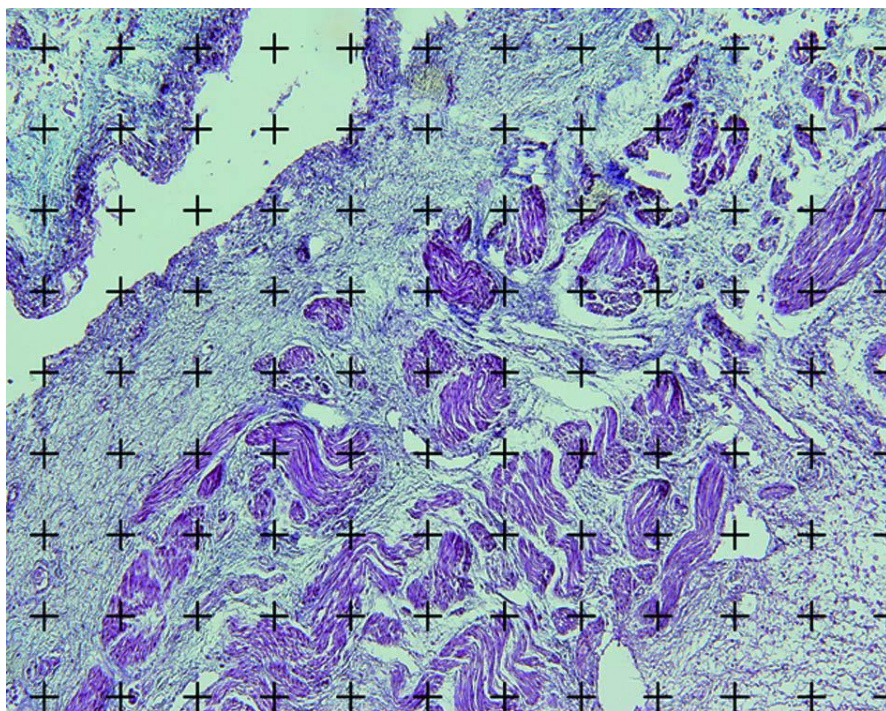
A bexiga e a próstata foram separadas das outras estruturas e fixadas em formalina tamponada a 10%. Realizou-se processamento histológico de rotina para inclusão em parafina e, em seguida, foram feitos cortes de 5 μ m de espessura, com intervalo de 200 μ m entre cada um deles. Foram estudados o tecido muscular, o tecido conjuntivo, as fibras do sistema elástico e o colágeno, por meio de métodos histoquímicos e imuno-histoquímicos.

Os cortes eram corados com hematoxilina-eosina para verificar a integridade do material. Foram utilizados: Tricrômico de Masson, para caracterizar o colágeno e o tecido muscular; Resorcina Fucsina de Weigert, com prévia oxidação, para a observação das fibras do sistema elástico, e Vermelho de Picro-Sirius, com polarização, para a observação dos diferentes tipos de colágeno. O tecido muscular e as fibras do sistema elástico foram quantificados por método quantitativo (CHAGAS et al., 2002; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; MANDARIM-DE-LACERDA; FERNANDES-SANTOS; AGUILA, 2010).

Cinco cortes foram corados e cinco campos foram selecionados em cada corte. Assim, foram analisados 25 diferentes campos de cada um dos fetos estudados. Todos os campos selecionados foram fotografados em aumento de 400x; as imagens foram capturadas com a utilização do microscópio Olympus BX51 e da câmera Olympus DP70. Em seguida, no processo de investigação, elas eram transferidas para o *software* Image Pro. As fibras foram quantificadas com a utilização do *software* Image J (versão 1.34s; National Institute of Health, Bethesda, MD) para a determinação da densidade volumétrica (Vv) de cada componente.

Uma grade de 100 pontos era sobreposta à área do tecido selecionada. Com relação aos cortes corados pelo Tricrômico de Masson, os pontos que se encontravam sobre a coloração azul eram colocados como tecido conjuntivo e os que se encontravam sobre a coloração vermelha, eram colocados como tecido muscular (Figura 9). Era determinada a média dos dados obtidos em cada feto para que fosse realizada a análise estatística.

Figura 9 – Fotomicrografia da bexiga com a grade de 100 pontos do software Image J sobreposta ao tecido para quantificação. Tricrômico de Masson X400



Fonte: O autor, 2017.

2.3 Análise estatística

Para comparar as médias, foram utilizados os testes T não pareado e o *Mann-Whitney test*. O teste de Wilcoxon foi usado para as variáveis contínuas. O valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

Os fetos com síndrome de Prune Belly tinham idade entre 17 e 31 SPC, pesavam entre 240 e 2150g e tinham o CVC entre 18 e 43 cm. Os fetos do grupo controle tinham idade entre 12 e 35 SPC, pesavam entre 210 e 2860 g e tinham o CVC entre 18 e 34cm. Os dados da morfometria fetal podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 – A tabela mostra a idade (em SPC) e os parâmetros fetais de nossa amostra (peso em gramas e CVC em cm)

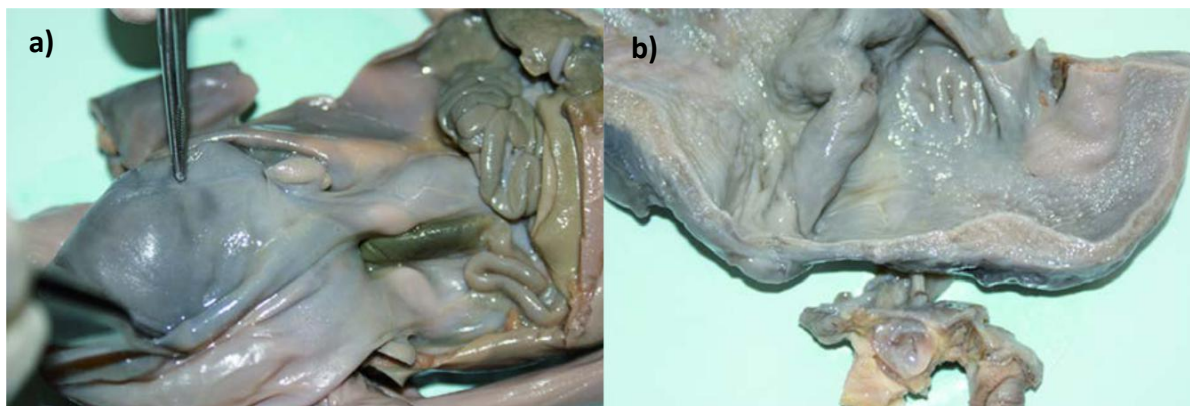
Feto	Idade	Anomalia	Peso (g)	CVC (cm)
1	17	Prune Belly	240	18
2	23	Prune Belly	1100	25
3	31	Prune Belly	2150	43
4	12	sem anomalia	210	18
5	16	sem anomalia	430	22
6	18	sem anomalia	250	18
7	19	sem anomalia	380	21
8	21	sem anomalia	401	21
9	21	sem anomalia	450	22
10	35	sem anomalia	2860	34

Fonte: O autor, 2016.

Os três fetos com SPB tinham o aspecto típico da parede abdominal anterior, megabexigas e criptorquidia bilateral, além de hidronefrose bilateral. Em dois casos, foram observadas uma obstrução severa (atresia) na região da uretra prostática (Figura 10) e uma obstrução na região do colo vesical (Figura 11).

Não foi observada a presença de fibras do sistema elástico em nenhum dos fetos analisados. Como mostram as imagens, as fibras desse sistema foram observadas apenas nos vasos sanguíneos (Figura 12).

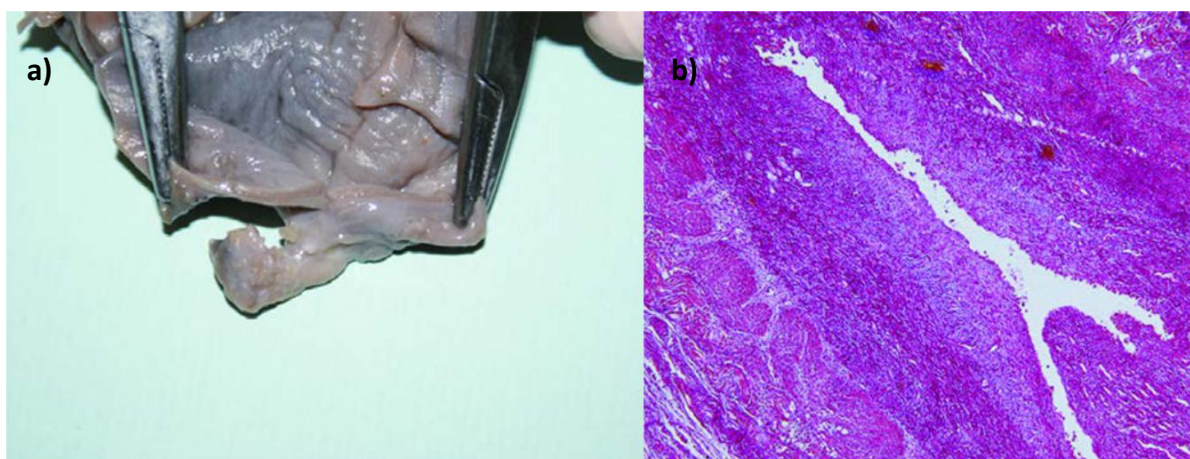
Figura 10 –Fotografia evidencia um feto com síndrome de Prune Belly com 31 SPC



Legenda: a) a parede abdominal foi aberta, evidenciando a megabexiga; b) após realizar dissecação cuidadosa, observou-se importante área de estenose/ atresia na região da uretra prostática.

Fonte: O autor, 2016.

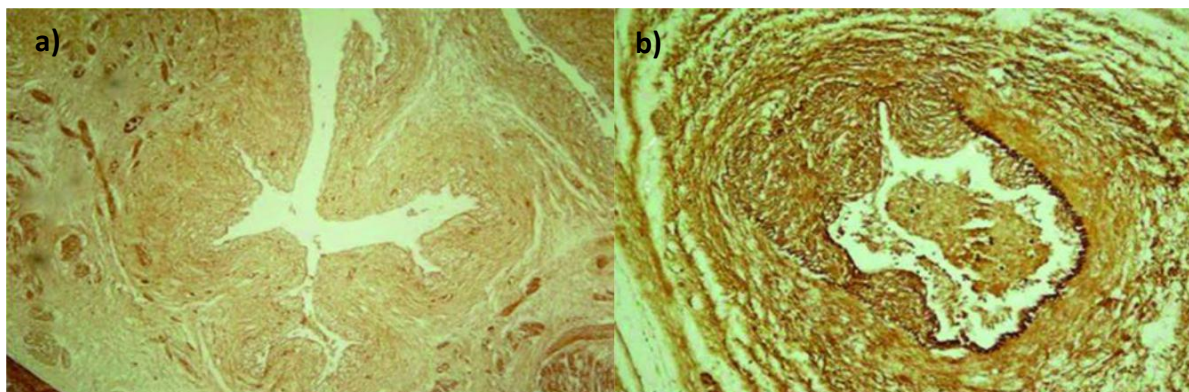
Figura 11 – Fotografia e fotomicrografia



Legenda: a) a fotografia evidencia um feto com síndrome de Prune Belly com 17 SPC. Após realizar dissecação cuidadosa, observou-se importante área de estenose/ atresia na região do colo vesical; b) fotomicrografia da região da próstata desse feto, evidenciando a patência da uretra prostática. Sirius Red X40.

Fonte: O autor, 2016.

Figura 12 – Fotomicrografias da bexiga de um feto do grupo-controle



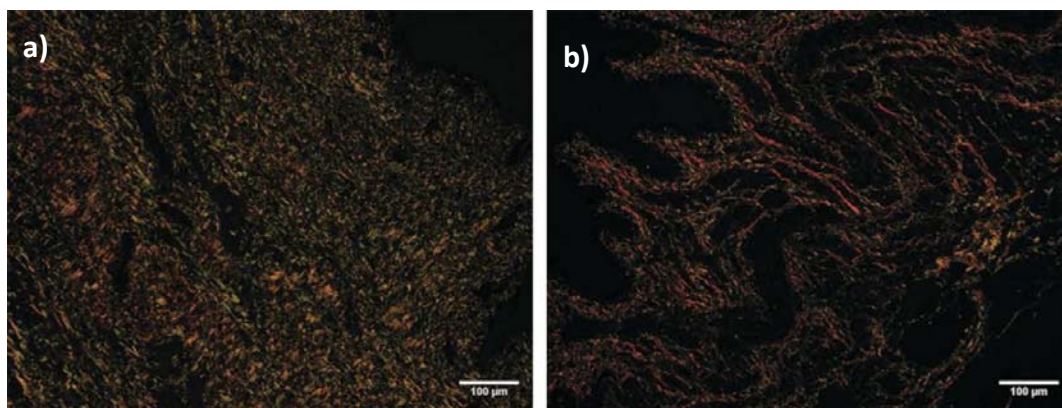
Legenda: a) fotomicrografia da bexiga de um feto do grupo controle sem evidenciar a presença das fibras do sistema elástico. Feto do sexo masculino com 21 SPC. Resorcina Fucsina de Weigert com prévia oxidação (40x); b) fotomicrografia do mesmo feto do grupo-controle evidenciando a presença de fibras elásticas na região da artéria umbilical (400x). Resorcina Fucsina de Weigert com prévia oxidação.

Fonte: O autor, 2017.

3.1 Colágeno

As fotomicrografias dos cortes corados com Vermelho de Picro Sirius com polarização apresentaram diferença de cores entre os grupos. Essa diferença de cores, como já foi descrito anteriormente, pode sugerir alterações na espessura das fibras de colágeno nas bexigas dos fetos portadores de síndrome de Prune Belly. A análise qualitativa demonstrou a predominância da coloração verde no grupo-controle, sugerindo a presença de colágeno tipo 3, e a vermelha, nos fetos com Prune Belly, sugerem colágeno tipo 1 nesse grupo (Figura 13).

Figura 13 – Análise do colágeno



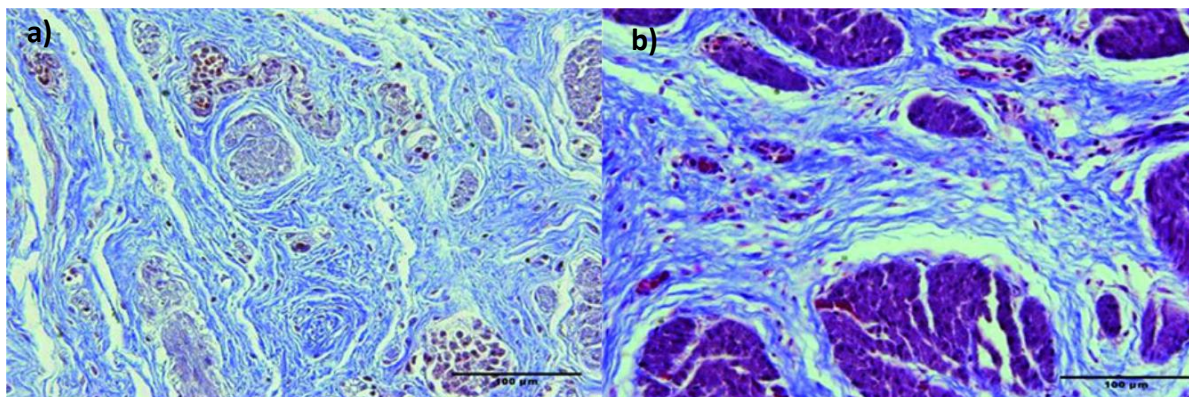
Legenda: a) fotomicrografia da bexiga de um feto do grupo-controle com 18 SPC, evidenciando o predomínio da coloração verde; b) fotomicrografia de um feto com síndrome de Prune Belly com 19 SPC, evidenciando o predomínio da coloração vermelha. Picro Sirius Red com polarização. 200x.

Fonte: O autor, 2017.

3.2 Tecido muscular

A análise quantitativa demonstrou que o tecido muscular foi significativamente menor ($p = 0.04$) nos fetos com síndrome de Prune Belly (9.67% a 17.75%, média = 13.2%) quando comparados com o grupo-controle (13.33% a 26.56%, média = 17.43%). A disposição do tecido muscular nos dois grupos estudados pode ser observada na Figura 14.

Figura 14 – Fotomicrografias de bexigas de fetos mostrando a presença do tecido muscular (corado em vermelho) nos grupos



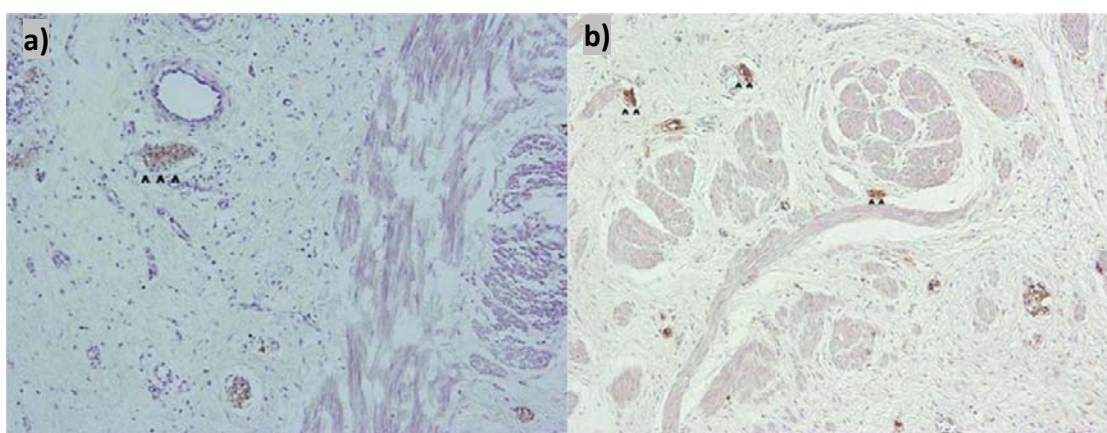
Legenda: a) bexiga de feto com síndrome de Prune Belly com 17 SPC; b) bexiga de feto normal com 18 SPC. Tricrômico de Masson. 400X.

Fonte: O autor, 2017.

3.3 Nervos

A análise qualitativa dos nervos com imuno-histoquímica com antitubulina demonstrou a predominância de nervos no grupo-controle quando comparado com os fetos com síndrome de Prune Belly (Figuras 15 e 16).

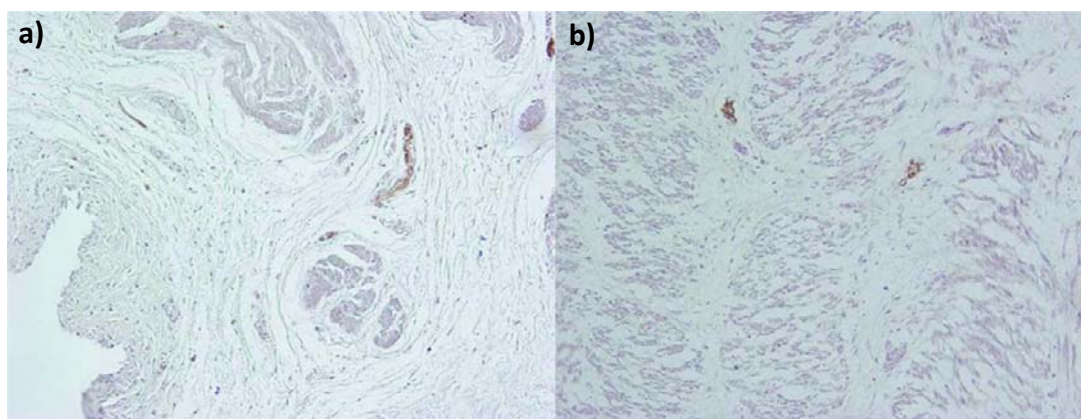
Figura 15 – Análise da distribuição dos nervos



Legenda: a) Fotomicrografia demonstrando os nervos (setas) na bexiga de um feto do grupo controle com 35 SPC. Tubulina X200; b) fotomicrografia demonstrando os nervos na bexiga de um feto portador de síndrome de Prune Belly com 31 SPC. Tubulina X200.

Fonte: O autor, 2017.

Figura 16 – Análise da distribuição dos nervos



Legenda: a) fotomicrografia demonstrando os nervos na bexiga de um feto do grupo-controle com 18 SPC. Tubulina X200; b) fotomicrografia demonstrando os nervos na bexiga de um feto portador de síndrome de Prune Belly com 17 SPC. Tubulina X200.

Fonte: O autor, 2017.

4 DISCUSSÃO

A etiologia da SPB não é conhecida. No entanto, algumas hipóteses acerca dela têm sido sugeridas. Estudos revelam a possibilidade de herança genética e associação com a trissomia dos cromossomos 18 e 21 (HASSETT; SMITH; HOLLAND, 2012; STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002). Outras hipóteses, tais como uropatia obstrutiva distal e defeito mesodérmico da parede abdominal, anomalias do alantoide e do trato urinário, também vêm sendo estudadas (COPP; GREENE, 2012; HASSETT; SMITH; HOLLAND, 2012; STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002; ZUGOR; SCHOTT; LABANARIS, 2012). A obstrução uretral está presente em um terço dos pacientes com SPB e pode ser a principal causa das malformações nessa síndrome (HASSETT; SMITH; HOLLAND, 2012; STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002).

A causa da criptorquidia na SPB é desconhecida. No entanto, especula-se que as alterações anatômicas na parede abdominal impedem um aumento da pressão intra-abdominal, que é um dos fatores necessários para a migração testicular. Também se especulou que a megabexiga nessa síndrome torna o canal inguinal extraperitoneal, de modo que o gubernáculo e seu processo vaginal não podem desenvolver-se normalmente (HASSETT; SMITH; HOLLAND, 2012; STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002; COSTA et al., 2015).

Alguns estudos sugerem que a SPB pode surgir de uma obstrução anatômica de vários tipos (uretra, próstata, colo vesical) ou de uma obstrução funcional, originando a megabexiga (VOLMAR et al., 2001; DIAO et al., 2008; PELLEGRINO et al., 2017; TAGHAVI; SHARPE; STRINGER, 2016). Volmar et al. (2001) analisou onze casos de SPB e observou obstrução mecânica em oito deles. Na presente amostra, todos os três fetos de SPB apresentaram obstrução no nível da uretra prostática ou do colo vesical. Os achados desta pesquisa corroboram que a aparência fenotípica da SPB, juntamente com a megabexiga, com espessamento acentuado e alterações histológicas, pode ser explicada por obstrução do trato urinário.

A maior parte da bexiga se origina da parte vesical do seio urogenital, enquanto que o trigono vesical tem origem a partir da absorção da região caudal do duto mesonéfrico, durante o desenvolvimento da bexiga (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002; LATERZA; GENNARO; TUBARO, 2011). A bexiga fetal humana passa por uma série de transformações em seu desenvolvimento da décima terceira até a vigésima primeira semanas gestacionais, finalmente adquirindo um urotélio típico e uma camada muscular bem desenvolvida. Até a décima primeira semana gestacional, a parede da bexiga é formada por mesênquima e este, gradualmente, é substituído por tecido conjuntivo frouxo. O colágeno torna-se aparente por volta da décima

terceira semana gestacional (STEPHENS; SMITH; HUTSON, 2002; LATERZA; GENNARO; TUBARO, 2011; TASIAN; CUNHA; BASKIN, 2010).

O colágeno e a elastina são componentes importantes da parede da bexiga que participam do seu funcionamento. O colágeno proporciona resistência de tensão, porém seu acúmulo excessivo pode inibir a contratilidade da bexiga e a condução dos impulsos elétricos através da parede. A elastina proporciona elasticidade ao tecido e pode ajudar na complacência (FREEDMAN; QURESHI; SHAPIRO, 1997). No tecido muscular, o seu papel é proporcionar sustentação, da mesma forma que os tendões, no tecido esquelético. Dessa maneira, como o músculo liso não apresenta tendões, necessita de uma maior quantidade de colágeno (FREEDMAN; QURESHI; SHAPIRO, 1997).

Esse mesmo estudo, feito por Freendman, entre outros, analisou a estrutura da bexiga de nove fetos com válvula de uretra posterior e atresia uretral. Essa pesquisa estudo demonstrou um aumento substancial na espessura da parede da bexiga, mas não foram observadas alterações significativas na distribuição do tecido conjuntivo e nos músculos lisos da bexiga fetal. Ele também sugeriu que os processos de obstrução intrauterinos não estão associados ao excesso de deposição de colágeno, mas a um aumento do desenvolvimento da musculatura vesical (FREEDMAN; QURESHI; SHAPIRO, 1997).

Pazos et al. (2011), em um estudo feito em bexigas de fetos com anencefalia, observou um aumento significativo na quantidade de colágeno total nas bexigas desses fetos, com predominância do colágeno tipo III. Segundo esse estudo, isso pode sugerir uma alteração importante no desenvolvimento da camada muscular da bexiga.

Os nervos da bexiga em fetos anencefálicos podem ser modificados devido a lesões cerebrais, com consequentes danos no controle cerebral nos nervos da bexiga (PAZOS et al., 2011). No entanto, nesse estudo, os pesquisadores não investigaram a distribuição dos nervos da bexiga em fetos anencefálicos. Portanto, que são necessárias mais pesquisas para confirmar ou refutar essa hipótese.

As alterações do sistema elástico estão envolvidas na formação de tecidos fibróticos (FREEDMAN; QURESHI; SHAPIRO, 1997). No entanto, não foi observada, em nenhum dos casos estudados neste trabalho, a presença de fibras do sistema elástico na bexiga. Isso pode indicar que esse componente da matriz extracelular forma-se apenas a partir do terceiro trimestre gestacional na bexiga fetal. Estudos prévios evidenciaram a presença de fibras do sistema elástico em outros órgãos do sistema genito-urinário em fetos humanos (BASTOS et al., 2004). Neste estudo, foi observada a predominância de um sistema elástico fino e escasso no tecido do corpo esponjoso de um feto com 15 semanas de gestação. Além disso, observou-se, em um feto

com 36 semanas de gestação, a trabécula do corpo esponjoso delimitando extensos espaços vasculares (BASTOS et al., 2004).

Segundo o estudo de Bastos et al, as fibras do sistema elástico são abundantes e organizadas em fetos no terceiro trimestre gestacional (BASTOS; SILVA; COSTA; SAMPAIO, 2004). A amostra da presente pesquisa era composta de fetos do segundo trimestre gestacional, período no qual, provavelmente, as fibras do sistema elástico ainda estão se formando na bexiga fetal.

Estudos anteriores mostraram que fetos com SPB e obstrução infravesical aumentaram a espessura muscular e uma relação normal do tecido conjuntivo (VOLMAR et al, 2001; WORKMAN; KOGAN, 1990). No presente trabalho, encontramos uma diminuição na densidade volumétrica de células musculares lisas em bexigas de SPB. Provavelmente, isso aconteceu devido à obstrução observada na uretra prostática em casos de SPB. A bexiga em SPB é submetida a uma pressão hidrostática muito maior, o que pode causar um aumento na atividade fibroblástica (JUNKER et al., 2008). Com base nessas observações, podemos especular que a redução muscular lisa é um evento importante na obstrução da bexiga. Esse evento provavelmente está correlacionado com um processo de hidrodilatação.

Em nossa amostra, foi observado um predomínio do colágeno tipo I na bexiga da SPB. O colágeno é responsável por proporcionar tensão de resistência aos tecidos (USHIKI, 2002; HIRSHBERG et al., 2007). A quantidade de colágeno é aumentada na obstrução crônica de bexiga nos adultos humanos. Porém, um estudo sobre a obstrução de bexiga fetal humana mostrou que, embora a quantidade total de colágeno tenha aumentado, ele é proporcional à quantidade de músculo, o qual aumenta, também, em resposta à obstrução. Se todo o colágeno for removido do tecido muscular liso, sua força de ativação será reduzida. De maneira interessante, o acúmulo anormal de colágeno encontrado em bexigas obstruídas pode diminuir a contratilidade muscular, além de afetar a complacência da bexiga (FREEDMAN et al., 1997).

Assim, com base nestes achados, os resultados da estrutura de colágeno sugerem que a matriz de colágeno da bexiga na SPB é interrompida. Podemos especular que a ocorrência de uma obstrução mecânica ou a pressão intra-abdominal alterada na SPB dificulta o desenvolvimento da bexiga. O fornecimento nervoso da bexiga tem origem sacral, exceto o trígono, que é inervado pelo plexo hipogástrico (VAN DUZEN; DUNCAN, 1953).

No presente estudo, observamos uma pequena quantidade de nervos na bexiga do grupo SPB na análise qualitativa. Este é o primeiro estudo que avalia a distribuição dos nervos da bexiga humana com SPB. A pequena quantidade de nervos presente nas bexigas estudadas poderia ser a consequência da obstrução posterior da uretra combinada com um processo de

hidrodistensão e degradação da matriz extracelular e dos demais componentes da parede da bexiga. Entretanto, mais pesquisas futuras, com amostras maiores, serão necessárias para esclarecer esse tópico.

Algumas limitações deste estudo devem ser mencionadas, a saber: a) distribuição desigual de SPC entre SPB e fetos de controle e b) pequeno tamanho da amostra, uma vez que os fetos com SPB são raros. No entanto, apesar da limitação do tamanho da amostra, as observações ainda fornecem novas informações importantes.

CONCLUSÃO

A bexiga, em fetos com síndrome de Prune Belly, apresenta redução de fibras musculares lisas, colágeno tipo III e nervos. Essas alterações estruturais podem ser um dos fatores envolvidos nas anomalias do trato urinário, como a megabexiga, em pacientes com síndrome de Prune Belly.

REFERÊNCIAS

- ASHLEY, R. A. et al. Urachal Carcinoma: Clinicopathologic Features And Long-Term Outcomes of An Aggressive Malignancy. *Cancer*, v. 107, n. 4, p. 712-720, 2006.
- BACKHOUSE, K. M. Embryology of Testicular Descent And Maldescent. *The Urologic Clinics of North America*, v. 9, n. 3, p. 315-325, 1982.
- BASKIN, L. et al. Mesenchymal-Epithelial Interactions In Bladder Smooth Muscle Development: Effects of The Local Tissue Environment. *J Urol*, v. 165, p. 1283-1288, 2001.
- BASTOS, A. L. et al. The Concentration of Elastic Fibers in The Male Urethra During Human Fetal Development. *BJU Int.*, v. 94, n. 4, p. 620-623, 2004.
- BRONSHTEIN, M.; BAR-HAVA, I.; BLUMENFELD, Z. Differential Diagnosis of The Nonvisualized Fetal Urinary Bladder by Transvaginal Sonography In The Early Second Trimester. *Obstet Gynecol*, v. 82, p. 490-493, 1993.
- CHAGAS, M. A. et al. Stromal and Acinar Components of The Transition Zone in Normal And Hyperplastic Human Prostate. *BJU Int.* v. 89, n. 7, p. 699-702, 2002.
- COPP, A. J.; GREENE, N. D. E. Neural Tube Defects-Disorders of Neurulation and Related Embryonic Processes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, v. 2, n. 2, p. 213-227, 2012.
- COSTA, S. F. et al. Structural Study of Gubernaculum Testis in Fetuses with Prune Belly Syndrome. *J Urol*. v. 193, suppl. 5, p.1830-1836, 2015.
- DIAO, B. et al. Prune Belly Syndrome: Epidemiologic, Clinic And Therapeutic Aspects. *Prog Urol*. v. 18, n. 7, p. 470-474, 2008.
- FAVORITO, L. A.; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J. B. The Position of The Testis During The Fetal Period: An Additional Parameter To Estimate Fetal Weight. *International Braz J Urol*, v. 36, n. 5, p. 609–613, 2010.
- FAVORITO, L. A.; SAMPAIO, F. J. B. Testicular Migration Chronology: Do The Right And The Left Testes Migrate at The Same Time? Analysis of 164 Human Fetuses. *BJU International*, v. 113, n. 4, p. 650–653, 2014.
- FREEDMAN, A. L; QURESHI, F.; SHAPIRO, E, et al. Smooth Muscle Development in The Obstructed Fetal Bladder. *Urology*, v. 49, p. 104-107, 1997.
- GOULDING, F. J.; GARRETT, R. A. Twenty-Five-Year Experience with Prune Belly Syndrome. *URL*, v. 12, n. 3, p. 329-332, 1978.
- HASSETT, S.; SMITH, G. H.; HOLLAND, A. J. Prune Belly Syndrome. *Pediatr Surg Int*. v. 28, n. 3, p. 219-228, 2012.

HERN, W. M. Correlation of Fetal Age And Measurements Between 10 and 26 Weeks of Gestation. *Obst Gynecol.* v. 63, n. 1, p. 26-32, 1984.

HEYNS, C. F. The Gubernaculums During Testicular Descent In The Human Fetus. *J Anat.* v. 153, p. 93-112, 1987.

HEYNS, C. F.; HUTSON, J. M. Historical Review of Theories On Testicular Descent. *Journal of Urology*, v. 153, n. 3, p. 754–767, 1995.

HIRSHBERG, A. et al. The Influence of Inflammation on The Polarization Colors of Collagen Fibers in The Wall of Odontogenic Keratocyst. *Oral Oncol.* v. 43, n. 3, p. 278-282, 2007.

JUNKER, J. P. et al. Mechanical Tension Stimulates The Transdifferentiation of Fibroblasts Into Myofibroblasts in Human Burn Scars. *Burns.* v. 34, n 7, p. 942-946, 2008.

KIM, K. M. et al. Collagen And Elastin In The Normal Fetal Bladder. *J Urol.* v. 146, n. 2, p. 524-527, 1991.

LATERZA, R. M.; GENNARO, M.; TUBARO, A. Female Pelvic Congenital Malformations. Part I: Embryology, Anatomy And Surgical Treatment. *Eur J Obst Gynecol and Repro Biol.* v. 159, n. 1, p. 26-34, 2011.

MAIZELS, M. Normal Development of The Urinary Tract. In: CAMPBELL'S Urology. 6th. ed. New York: Saunders, 1992. p. 1301.

MANDARIM-DE -LACERDA, C. A. Stereological Tools In Biomedical Research. *An Acad Bras Cienc.* v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; FERNANDES-SANTOS, C.; AGUILA, M. B. Image Analysis And Quantitative Morphology. *Methods Mol Biol.*; n. 611, p. 211-225, 2010.

MERCER, B. M. et al. Fetal FootLength As A Predictor of Gestational Age. *Am J Obst Gynecol.* v. 156, n. 2, p. 350-355, 1987.

MOORE, K. L. *The Developing Human*. Clinically Oriented Embryology. Philadelphia: W.B Saunders, 1977.

NEWMAN, J.; ANTONAKOPOULOS, G. N. The fine structure of the human fetal urinary bladder: Development and maturation: A light, transmission and scanning electron microscopic study. *J Anat*, n. 166, pp. 135-150, 1989.

PARK, J. M. Normal and Anomalous Development of The Urogenital System. In: CAMPBELL'S Urology. 8th. ed. New York: Saunders, 2002. p. 1737.

PATTEN, R. M. et al. The fetal genitourinary tract. *Radiol Clin North Am*, v. 28, n. 1, p. 115-130, 1990.

PAZOS, H. M. et al. Do Nural Tube Defects Lead to Structural Alterations in The Human Bladder? *Histol Histopathol*, v. 26, n. 5, p. 581-588, 2011.

PELLEGRINO, M. et al. Prenatal Detection of Megacystis: Not Always An Adverse Prognostic Factor: Experience In 25 Consecutive Cases In A Tertiary Referral Center, With Complete Neonatal Outcome And Follow-Up. *J Pediatr Urol*, v. 13, n. 5, p. 486.e1-e10, 2017.

PLATT, L. D. et al. Fetal Foot Length: Relationship to Menstrual Age And Fetal Measurements In The Second Trimester. *Obstet Gynecol*. v. 71, n. 4, p. 526-531, 1988.

RR SCHOOL OF NURSING, Eagle-Barret syndrome (prune belly syndrome). In: RR SCHOOL OF NURSING. *Prune Belly Images*. [Indian, 2017?]. Disponível em: <https://www.rrnursingschool.biz/newborns-2/images/8245_39_225-prune-belly.jpg> Acesso em: 14 nov. 2017.

ROUTH, J. C. et al. Congenital Anomalies, Contemporary Epidemiology, and Characterization of Newborn Males with Prune Belly Syndrome. *URL*, v. 76, n. 1, p. 44-48, 2010.

SADLER, T. W. *Langman's Medical Embryology*. 7th ed.. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.

SAMPAIO, F. J.; FAVORITO, L. A. Analysis of Testicular Migration During the Fetal Period In Humans. *Journal of Urology*, v. 159, n. 2, p. 540-542, 1998.

SAMPAIO, F. J.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Morphometry of The Kidney. Applied Study In Urology And Imaging. *J Urol (Paris)*. v. 95, n. 2, p. 77-80, 1989.

SEIDEL, N. E. et al. Pediatric Urology Clinical Manifestations and Management of Prune-Belly Syndrome in a Large Contemporary Pediatric Population. *URL*, v. 85, n. 1, p. 211-215, 2015.

SHIMADA, K. et al. Histology of The Fetal Prune Belly Syndrome with Reference to The Efficacy of Prenatal Decompression. *Int J Urol*. v. 7, n. 5, p. 161-166, 2000.

STEPHENS, F. D.; SMITH, E. D.; HUTSON, J. M. Morphology and Embryogenesis of The Triad (Prune Belly) syndrome. In: STEPHENS, F. D.; SMITH, E. D.; HUTSON, J. M. *Congenital Anomalies of the Kidney, Urinary and Genital Tracts*. London: Martin Dunitz, 2002. Chapter 37, p. 391-409.

STREETER, G. L. Weight, Sitting Height, Head Size, Foot Length And Menstrual Age of The Human Embryo. *Contr Embryol Carnegie Instn*, v. 11, p. 143-170, 1920.

TAGHAVI, K.; SHARPE, C.; STRINGER, M. D. Fetal Megacystis: A Systematic Review. *J Pediatr Urol*. v. 13, n. 1, p. 7-15, 2017.

TASIAN, G.; CUNHA, G.; BASKIN, L. Smooth muscle differentiation and patterning in the urinary bladder. *Differentiation*, v. 80, n. 2-3, p. 106-117, 2010.

USHIKI, T. Collagen Fibers, Reticular Fibers And Elastic Fibers. A Comprehensive Understanding From A Morphological Viewpoint. *Arch Histol Cytol*. v. 65, n. 2, p. 109-126, 2002.

VAN DUZEN, R. E.,; DUNCAN, C. G. Anatomy And Nerve Supply of Urinary Bladder. *JAMA*. v. 153, n. 15, p. 1345-1347, 1953.

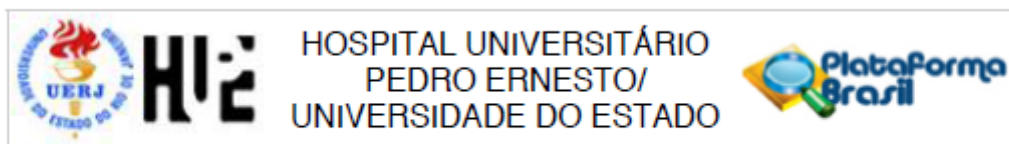
VOLMAR, K. E. et al Patterns of Congenital Lower Urinary Tract Obstructive Uropathy: Relation to Abnormal Prostate And Bladder Development And The Prune Belly Syndrome. *Pediatr Dev Pathol.* v. 4, n. 5, p. 467-472, Sept.-Oct. 2001.

WEIN, A. J. et al. Prune Belly Syndrome. In: CAMPBELL-WALSH Urology. 9. ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2007, p. 3482-3496.

WILCOX, D. T.; CHITTY, L. S. Non-Visualisations of The Fetal Bladder: Aetiology And Management. *Prenat Diagn*, v. 21, n. 11, p. 977-983, 2001.

WORKMAN, S. J.; KOGAN, B. A. Fetal Bladder Histology in Posterior Urethral Valves And The Prune Belly Syndrome. *J Urol.* v. 144, n. 2, p. 337-339, 1990.

ZUGOR, V.; SCHOTT, G. E.; LABANARIS, A. P. The Prune Belly Syndrome: Urological Aspects and Long-Term Outcomes of a Rare Disease. *Pediatr Rep.* v. 4, n. 2, p. e20, 2012.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo dos órgãos urogenitais na síndrome de Prunne Belly e em fetos anencéfalos

DADOS DO PARECER:

Número do Parecer: 923.662

Situação do Parecer: Aprovado

Received: 19 March 2017 | Accepted: 25 April 2017
DOI: 10.1002/nau.23327

ORIGINAL BASIC SCIENCE ARTICLE

WILEY   

Structural study of the bladder in fetuses with prune belly syndrome

Helce R. Julio Junior | Suelen F. Costa | Waldemar S. Costa |
Francisco J. Barcellos Sampaio | Luciano A. Favorito 

Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence

Luciano Alves Favorito, Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Rua Professor Gabizo, 104/201, Tijuca, RJ, CEP: 20271-320, Rio de Janeiro, Brazil.
Email: lufavorito@yahoo.com.br

Funding information

National Council for Scientific and Technological Development (CNPq–Brazil); Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ)

Aims: To study the bladder structure of fetuses with prune belly syndrome (PBS).

Methods: We studied three bladders obtained from three male fetuses with PBS and seven bladders from seven male fetuses without anomalies. Each bladder was dissected and embedded in paraffin, from which 5 µm thick sections were obtained and stained with Masson's trichrome (to quantify connective tissue and smooth muscle) and picrosirius red with polarization (to observe collagen). Immunohistochemistry with tubulin (Tubulin, beta III, Mouse Monoclonal Antibody) was applied to observe the bladder nerves. The images were captured with an Olympus BX51 microscope and Olympus DP70 camera. The stereological analysis was done with the Image Pro and Image J programs, using a grid to determine volumetric densities (Vv). Means were statistically compared using the Mann-Whitney test ($P < 0.05$).

Results: Quantitative analysis documented that smooth muscle fibers were significantly smaller ($P = 0.04$) in PBS fetuses (9.67% to 17.75%, mean = 13.2%) compared to control group (13.33% to 26.56%, mean = 17.43%). The analysis of collagen fibers showed predominance of green in the control group, suggesting collagen type III presence, and predominance of red in the in PBS fetal bladders, suggesting collagen type I presence in this group. The qualitative analysis of the nerves with immunohistochemistry with tubulin showed predominance of nerves in the control group.

Conclusion: The bladder in PBS had lower concentrations of smooth muscle fibers, collagen type III, and nerves. These structural alterations can be one of the factors involved in urinary tract abnormality such as distended bladder in patients with PBS.

KEYWORDS

bladder, histology, prune belly syndrome

1 | INTRODUCTION

Prune belly syndrome (PBS) is a congenital anomaly characterized by deficiency or hypoplasia of the abdominal muscles as well as malformations of the urinary tract, such as

large and hypotonic bladders, dilated and tortuous ureters, and bilateral cryptorchidism.¹ Urethral obstruction occurs in one-third of patients with PBS and can be the primary cause of the bladder alterations in this syndrome.^{2,3}

Studies of the bladder structure in PBS are scarce in the literature and show that bladder histology is variable, with both increased musculature and defective or dysplastic muscles,⁴ along with normal ratio of connective tissue.⁵

Alan Wein led the peer-review process as the Associate Editor responsible for the paper.

Another study demonstrated that the walls of the bladder were thick or thin and the muscle, when present, was intermixed with fibrocytes and large plaques of collagen.²

Recently, important alterations in the gubernaculum testis structure were demonstrated in fetuses with PBS.⁶ Nevertheless, structural, qualitative and quantitative analyses of smooth muscle cells, extra-cellular matrix, and nerves of the bladder during the human fetal period in PBS are scarce.

The hypothesis stated in our study is: Is the bladder structure similar in PBS and normal fetuses? This paper describes the bladder structure in fetuses with prune belly syndrome (PBS).

2 | MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol described here was approved by the ethics committee on human experimentation of our university. This study was carried out in accordance with the ethical standards of the hospital's institutional committee on human experimentation.

We studied three bladders obtained from three male fetuses with PBS and seven bladders obtained from seven male fetuses without anomalies. The fetuses were macroscopically well preserved. The gestational age was determined in weeks post conception (WPC), according to the foot-length criterion, which is currently considered the most acceptable parameter to calculate gestational age.⁷⁻⁹ The fetuses were also evaluated regarding crown-rump length (CRL) and body weight immediately before dissection. The same observer made the measurements.

After the measurements, the fetuses were carefully dissected with the aid of a stereoscopic lens with 16/25× magnification. The abdomen and pelvis were opened to identify and expose the urogenital organs.

The bladder of each fetus was separated from the other structures and fixed in 10% buffered formalin, and routinely processed for paraffin embedding, after which 5 µm thick sections were obtained at 200 µm intervals. Sections were stained with hematoxylin-eosin to assess the integrity of the tissue. The following staining methods were used: Masson's trichrome, to quantify connective and smooth muscle tissue, Weigert's resorcin fuchsin with previous oxidation to observe elastic system fibers, and picosirius red with polarization for observation of different collagen types.

The smooth muscle tissue was quantified by a stereological method.¹⁰⁻¹² We studied five microscopic fields chosen at random, totaling 25 test areas for each bladder for the quantitative analysis. We used the Image J software, version 1.46r, loaded with its own plug-in (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). All sections were photographed with a digital camera (DP70, Olympus America, Inc., Melville, New York) under the same conditions at a resolution of 2040 pixels, directly coupled to

the microscope (BX51, Olympus America, Inc.) and stored in a TIFF file.

To quantify the smooth muscle tissue we used the Image J software to determine the volumetric density (Vv) of the tubules (Fig. 1). Results for each field were obtained through the quantification assessment method, to count the muscle cells of each section. The arithmetic mean of the quantification in five fields of each section was determined. Afterward, we obtained the mean quantification value for the five sections studied from each bladder (total of 25 test areas).

Means were statistically compared using the unpaired *T*-test and the Mann-Whitney test for all categorical variables and Wilcoxon rank sum tests were used for continuous variables. All tests were two-sided and a *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

3 | RESULTS

The prune belly fetuses ranged in age from 17 to 31 WPC, weighed between 240 and 2150 g, and had crown-rump length between 18 and 43 cm. The fetuses in the control group ranged in age from 12 to 35 WPC, weighed between 210 and 2860 g and had crown-rump length between 18 and 34 cm (Table 1). The three fetuses with PBS had the typical aspect of the anterior abdominal wall, enlarged bladders, bilateral cryptorchidism, and bilateral hydronephrosis (Fig. 2). In two cases we observed severe obstruction in prostatic urethra and in one case obstruction at the level of the vesical neck.

We did not observe elastic fibers in the bladder in PBS and in the control group. Quantitative analysis documented that smooth muscle fibers were significantly smaller (*P* = 0.04) in PBS fetuses (9.67% to 17.75%, mean = 13.2%) when

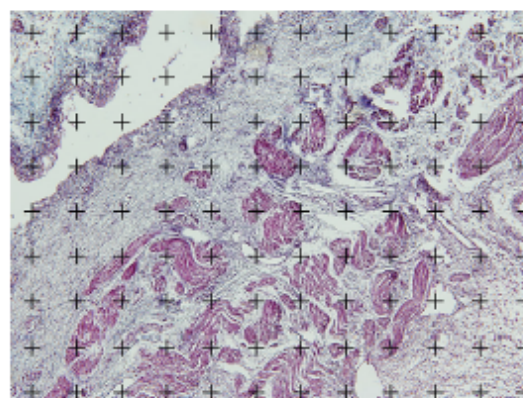


FIGURE 1 Morphometric analysis of the bladder. To quantify the smooth muscle number we used the Image J Test grid software to determine the volumetric density (Vv). HE ×400

TABLE 1 The table shows the age and the fetal parameters of our sample: Seven male fetuses without anomalies and three male fetuses with prune belly syndrome WPC, age in weeks post-conception; g, grams; CRL, crown-rump length; and cm, centimeters

Fetus	Age (WPC)	Anomaly	Weight (g)	CRL(cm)
1	17	Prune belly	240	18
2	23	Prune belly	1100	25
3	31	Prune belly	2150	43
4	12	none	210	18
5	16	none	430	22
6	18	none	250	18
7	19	none	380	21
8	21	none	401	21
9	21	none	450	22
10	35	none	2860	34

compared to the control group (13.33% to 26.56%, mean = 17.43%).

The analysis of collagen fibers showed predominance of red in the control group, suggesting collagen type I presence, and predominance of green in the in PBS fetal bladder, suggesting collagen type III presence in this group.

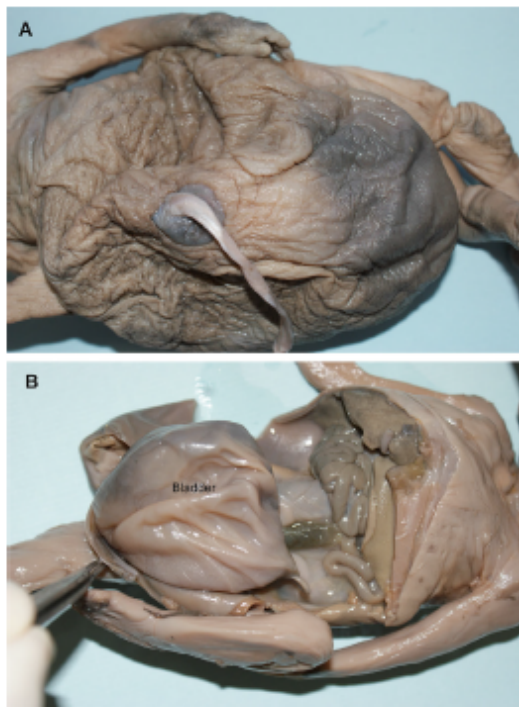


FIGURE 2 Fetus with 35 weeks post-conception with PBS. A) Aspect of the abdominal wall in PBS. B) The anterior abdominal wall is extirpated. We can observe the enlarged bladder (B) in PBS

The qualitative analysis of the nerves with immunohistochemistry with tubulin showed predominance of nerves in the control group when compared to the PBS fetuses (Fig. 3).

4 | DISCUSSION

The etiology of PBS is controversial. Some studies suggest that PBS may arise from either anatomic obstruction of various types or functional obstruction from megacystis.^{13,14} Volmar¹³ analyzed 11 cases of PBS and observed mechanical obstruction in eight cases. In our sample, all three PBS fetuses had obstruction at the level of the prostatic urethra or vesical neck. Our findings corroborate that the phenotypic appearance of PBS, along with the megacystis, with marked thickening, and histological alterations, can be explained by a urinary tract obstruction.

In our sample we did not observe elastic fibers in any of the bladders analyzed. This may indicate that this

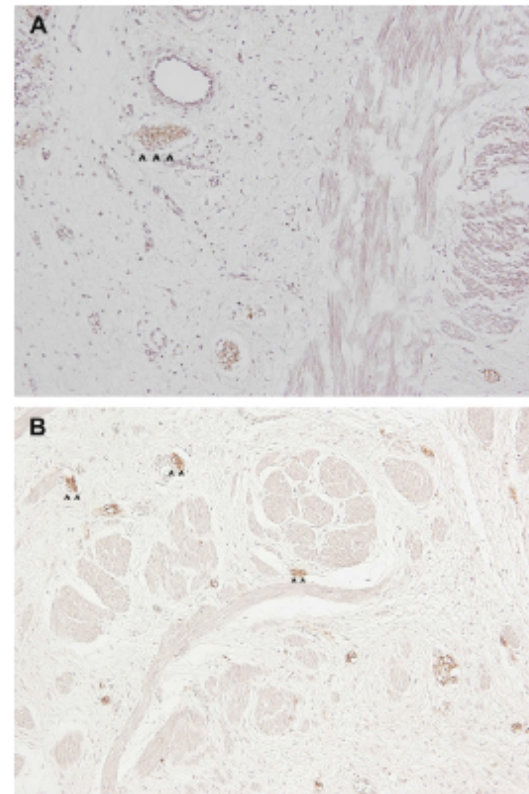


FIGURE 3 Analysis of the nerves distribution. A) Photomicrograph showing the nerves of the bladder (arrowhead). bladder of control group fetus with 35 WPC. Tubulin $\times 200$. B) Photomicrograph showing the nerves of the bladder (arrowhead). Bladder of a prune belly fetus with 31 WPC. Tubulin $\times 200$

extracellular matrix component appears only in the third gestational trimester in the fetal testis. Previous studies have shown the existence of elastic system fibers in other human fetal genitourinary organs.¹⁵

Previous studies have shown that fetuses with PBS and infra-vesical obstruction have increased muscle thickness and a normal ratio of connective tissue.¹³ In the present work, we found a decrease in the Vv of smooth muscle cells in PBS bladders. Probably this happened due to the obstruction observed in the prostatic urethra in cases of PBS. The bladder in PBS is submitted to a much higher hydrostatic pressure, which can cause an increase in fibroblast activity.¹⁶ Based on these observations, we can speculate that the smooth muscle reduction is an important event in bladder obstruction. This event is probably correlated to a hydrodistension process.

In our sample we observed a predominance of collagen type I in the PBS bladders. Collagen provides tensile strength, but over-accumulation can inhibit contractility and conduction of electrical impulses through the visceral wall.^{17,18} In earlier phases of the remodeling and repair of connective tissues, the synthesis of type III collagen is enhanced.¹⁶ Thus, based on these findings, the results of the collagen structure suggest that the collagen matrix of the prune belly bladder is disrupted. We can speculate that the occurrence of a mechanical obstruction or the altered intra-abdominal pressure in PBS hinders the bladder development.

The nerve supply of the bladder has sacral origin, except for the trigone, which is innervated by the hypogastric plexus.¹⁹ In the present study, we observed a small quantity of nerves in the bladder of the PBS group in the qualitative analysis. This is the first study assessing the distribution of the nerves of the human bladder with PBS. The small quantity of nerves present in the bladders studied could be the consequence of posterior urethra obstruction combined with a hydrodistension process and degradation of the extracellular matrix and the other components of the bladder wall, but future research with a larger samples will be necessary to clarify this topic.

Some limitations of this study should be mentioned: 1) unequal WPC distribution between PBS and control fetuses; and 2) small sample size, since prune belly fetuses are rare. However, despite the sample size limitation, the observations still provide important new information.

5 | CONCLUSIONS

The bladder in PBS has lower concentrations of smooth muscle fibers, collagen type III, and nerves. These structural alterations can be one of the factors involved in urinary tract abnormality such as distended bladder in patients with PBS.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – Brazil) and the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ).

CONFLICTS OF INTEREST

None declared

REFERENCES:

- Hassett S, Smith GH, Holland AJ. Prune belly syndrome. *Pediatr Surg Int*. 2012 Mar;28:219–228.
- Stephens FD, Smith ED, Hutson JM. Morphology and embryogenesis of the triad (prune belly) syndrome. *Congenital Anomalies of the Kidney, Urinary and Genital Tracts*. London: Martin Dunitz; 2002;Chapter:37:391–409.
- Zagor V, Schott GE, Labanaris AP. The Prune belly syndrome: urological aspects and long-term outcomes of a rare disease. *Pediatr Rep*. 2012 Apr 2;4:e20.
- Shimada K, Hosokawa S, Tohda A, Matsumoto F, Johnin K. Histology of the fetal prune belly syndrome with reference to the efficacy of prenatal decompression. *Int J Urol*. 2000 May;7:161–166. PMID: 10830822.
- Workman SJ, Kogan BA. Fetal bladder histology in posterior urethral valves and the prune belly syndrome. *J Urol*. 1990 Aug;144:337–339. PMID: 2374202.
- Costa SF, Costa WS, Sampaio FJ, Favorito LA. Structural study of gubernaculum testis in fetuses with prune belly syndrome. *J Urol*. 2015 May;193:1830–1836.
- Hern WM. Correlation of fetal age and measurements between 10 and 26 weeks of gestation. *Obst Gynecol*. 1984 Jan;63:26–32. PMID: 6691014.
- Mercer BM, Sklar S, Shariatmadar A, Gillieson MS, D'Alton ME. Fetal foot length as a predictor of gestational age. *Am J Obst Gynecol*. 1987 Feb;156:350–355. PMID: 3548369.
- 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 Apr;71:526–531. PMID: 3353042.
- Chagas MA, Babinski MA, Costa WS, Sampaio FJ. Stromal and acinar components of the transition zone in normal and hyperplastic human prostate. *BJU Int*. 2002 May;89:699–702.
- Mandarin-de-lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003 Dec;75:469–486. PMID: 11966627.
- Mandarin-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguilu MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol*. 2010;611:211–225.
- Volmar KE, Fritsch MK, Perlman EJ, Hutchins GM. Patterns of congenital lower urinary tract obstructive uropathy: relation to abnormal prostate and bladder development and the prune belly syndrome. *Pediatr Dev Pathol*. 2001 Sep-Oct;4:467–472.
- Diao B, Diallo Y, Fall PA, et al. Prune Belly syndrome: epidemiologic, clinic and therapeutic aspects. *Prog Urol*. 2008 Jul;18:470–474.

15. Bastos AL, Silva EA, Costa WS, Sampaio FJ. The concentration of elastic fibers in the male urethra during human fetal development. *BJU Int.* 2004 Sep;94:620–623.
16. Junker JP, Kratz C, Tollbäck A, Kratz G. Mechanical tension stimulates the transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts in human burn scars. *Burns.* 2008 Nov;34:942–946.
17. Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol.* 2002 Jun;65:109–126.
18. Hirschberg A, Lib M, Kozlovsky A, Kaplan I. The influence of inflammation on the polarization colors of collagen fibers in the wall of odontogenic keratocyst. *Oral Oncol.* 2007 Mar;43:278–282.
19. Van Duzen RE, Duncan CG. Anatomy and nerve supply of urinary bladder. *JAMA.* 1953 Dec 12;153:1345–1347.

How to cite this article: Julio Junior HR, Costa SF, Costa WS, Barcellos Sampaio FJ, Favorito LA. Structural study of the bladder in fetuses with prune belly syndrome. *Neurourology and Urodynamics.* 2017;9999:1–5. <https://doi.org/10.1002/nau.23327>

Research Article

Relationship between Undescended Testis Position and Prevalence of Testicular Appendices, Epididymal Anomalies, and Patency of Processus Vaginalis

Luciano A. Favorito, Helce Riberio Julio-Junior, and Francisco J. Sampaio

Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Luciano A. Favorito; lufavorito@yahoo.com.br

Received 23 September 2017; Revised 13 November 2017; Accepted 3 December 2017; Published 28 December 2017

Academic Editor: Dragana Zivkovic

Copyright © 2017 Luciano A. Favorito et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Objectives. To assess the incidence of testicular appendices (TAs), epididymal anomalies (EAs), and processus vaginalis (PV) patency in patients with undescended testis (UT) according to testicular position and to compare them with human fetuses. **Methods.** We studied 85 patients (108 testes) with cryptorchidism and compared the features with those of 15 fetuses (30 testes) with scrotal testes. We analyzed the relationships among the testis and epididymis, patency of PV, and the presence of TAs. We used the Chi-square test for statistical analysis ($p < 0.05$). **Results.** In 108 UT, 72 (66.66%) had PV patent, 67 (62.03%) had TAs, and 39 (36.12%) had EAs. Of the 108 UT, 14 were abdominal (12.96%); 14 had PV patency, 9 TAs, and 7 EAs; 81 were inguinal (75%); 52 had PV patency, 45 TAs, and 31 EAs, and 13 were suprascrotal (12.03%); 6 had PV patency, 13 TAs, and 1 EA. The patency of PV was more frequently associated with EAs ($p = 0.00364$). The EAs had a higher prevalence in UT compared with fetuses ($p = 0.0005$). **Conclusions.** Undescended testis has a higher risk of anatomical anomalies and the testes situated in abdomen and inguinal canal have a higher risk of presenting patency of PV and EAs.

1. Introduction

During the human fetal period, the testes migrate from the abdomen to the scrotum, traversing the abdominal wall and the inguinal canal between the 15th and the 28th week postconception [1, 2]. Cryptorchidism is one of the most common congenital anomalies among males, with a rate between 2 and 5% of full-term births, a rate that can reach 30% in premature babies [3, 4].

Cryptorchidism can be associated with various anatomical anomalies, but epididymal anomalies and patency of the vaginal process are among the most frequent [3, 5, 6]. Epididymal anomalies are associated with cryptorchidism with highly variable incidence reported in the literature: from 36 to 79% [7, 8]. The occurrence of inguinal hernias associated with cryptorchidism is due to the persistence of the vaginal process [9, 10]. The vaginal process (PV) is a conduit that extends from the peritoneum to the scrotum and is covered by a coelomic epithelium. This conduit is usually

obliterated after the end of the testicular migration [9, 10]. In cases where the vaginal process does not close, the child may develop inguinal hernia or communicating hydrocele.

Testicular and epididymal appendices have been considered congenital anomalies [9]; however some studies report that these structures are present in most normal individuals [11]. The functions of testicular appendages are controversial: they can control the amount of serous fluid in the vaginal tunica space [12].

Studies of epididymal anomalies and their relation to the patency of the vaginal process as well as the analysis of the embryology and structure of the testicular and epididymal appendages are frequent [11, 13, 14]. The analysis of the correlation between the position of the cryptorchidic testis and the presence of abnormalities of the epididymis, patency of the vaginal process, and testicular appendages are rare. To the best of our knowledge, no study has been published regarding these parameters using as a control group human fetuses with testes that completed their migration.

TABLE 1: The table shows the relation between the presence of testicular appendix, the patency of the vaginal process, and the presence of epididymal anomaly in patients with cryptorchidism in relation to the position of the testis.

Testicular position	Appendices presence/absence	Processus vaginalis occlusion/patency	Epididymal anomalies presence/absence
Abdominal (14—12.96%)	9 (64.29%)/5 (33.71%)	0 (0%)/14 (100%)	7 (50%)/7 (50%)
Inguinal (81—75%)	45 (55.66%)/36 (44.34%)	29 (35.8%)/52 (64.2%)	31 (38.27%)/50 (61.72%)
Suprascrotal (13—12.03%)	13 (100%)/0 (0%)	7 (53.84%)/6 (46.16%)	1 (7.69%)/12 (92.30%)
Total (108—100%)	67 (62.03%)/41 (37.97%)	36 (33.34%)/72 (66.66%)	39 (36.12%)/69 (63.88%)

The aim of this paper is to assess the incidence of testicular appendices (Tas), epididymal anomalies (EAs), and processus vaginalis (PV) patency in patients with undescended testis (UT) according to testicular position and compare these aspects with human fetuses having testes situated in scrotum.

2. Material and Methods

This study was approved and was carried out in accordance with the ethical standards of the hospital's institutional committee on human experimentation.

From January 2011 to January 2017, we studied 85 patients with cryptorchidism (108 testicles). Fifteen male human fetuses with the scrotal testes were also studied. Fetuses were of gestational age between 30 and 35 weeks postconception (WPC) and their cause was prematurity or perinatal asphyxia.

All patients underwent orchidopexy through incision in the inguinal region and the testicles were divided into three groups according to their position: (A) abdominal: testicles located above the inner inguinal ring; (B) inguinal: testicles located between the inner and outer inguinal rings; and (C) suprascrotal: testicles located below the outer inguinal ring. During surgery, three parameters were analyzed: (A) persistence of PV; (B) relationship between testis and epididymis; and (C) presence of testicular appendages.

To analyze the relations between the testis and epididymis in surgical patients and fetuses, we used a previous classification [15, 16]: Type I: epididymis attached to the testis at the head and tail; Type II: epididymis totally attached to the testis; Type III: epididymis attached to the testis only at the head; Type IV: epididymis attached to the testis only at the tail; Type V: no visible connection between the testis and epididymis; and Type VI: epididymal atresia. Type I and II relationships are considered normal, while the other types are considered to be epididymal anomalies (EAs) [15]. To analyze the structure of the PV, we considered two situations: (a) complete obliteration of the PV between the internal inguinal ring and the upper pole of the testis and (b) complete patency of the PV.

In relation to the testicular appendices, we analyzed the following situations: (I) absence of testicular and epididymal appendages, (II) presence of a testicular appendix, (III) presence of appendix of the epididymis, and (IV) presence of testicular appendix and epididymis (Figure 1).

The urogenital tract of the 15 fetuses studied was anatomically well preserved. To estimate the gestational age, the measurement of the length of the largest foot [17, 18] was used.

We also measured the weight, total length and the vertex-coccyx length of the fetuses. All measurements were done by the same investigator. After the measurements, the fetuses were carefully dissected with the aid of a stereoscopic lens with 16/25x magnification.

We used the Chi-square test for contingency analysis of the populations under study ($p < 0.05$), calculated by GraphPad.

3. Results

The fetuses presented age between 30 and 35 WPC (mean = 31.66), weight between 1195 and 2860 g (mean = 1835.53), and VC length between 27 and 34 cm (mean = 30.67). PV was found in 7 cases (23.34%). We observed EAs (Type III) in only 1 case (3.44%). In 18 cases (60%) we observed the presence of a testicular appendix, while in 7 cases (23.33%) no appendices were found. In 3 cases (10%) we observed the presence of a testicular appendix and epididymis and in 2 cases (6.6%) we found a single epididymal appendix.

The 85 patients were aged between 1 and 10 years (mean = 5.16). Of the 108 testes, 14 were abdominal (12.96%); 81 inguinal (75%); and 13 suprascrotal (12.03%). The correlations between the position of the cryptorchid testicles, the presence of ATs, the patency of the PV, and the EAs can be seen in Table 1.

PV was found in 72 cases (66.66%) of cryptorchidism and in 7 cases (23.34%) in the fetuses ($p < 0.0001$). All abdominal testicles had patent PV, and this patency is significant in relation to fetuses ($p < 0.001$), the inguinal testicles ($p = 0.0072$), and also the suprascrotal testes ($p = 0.0014$). We also observed that the patency of PV in the testes located in the canal was higher than the patency in the fetuses ($p = 0.0001$). We did not observe any difference in the patency of the PV between the suprascrotal testis and the fetus ($p = 0.1345$) and between the inguinal and suprascrotal testes ($p = 0.2141$).

EAs (Figure 2) were found in 39 cases of cryptorchidism (36.11%) and in only one case in the fetuses ($p = 0.0005$). We observed AEs in 7 abdominal (50%), 31 inguinal (38.27%), and 1 suprascrotal testes (7.69%). There was a difference between the presence of EAs in the abdominal ($p = 0.0002$) and inguinal ($p = 0.0003$) testicles compared to the fetuses and between the abdominal and suprascrotal testes ($p = 0.0161$). There was no significant difference in the occurrence of EAs between the suprascrotal testes and fetuses ($p = 0.5330$); between the abdominal and inguinal testes ($p = 0.4082$); and between the inguinal and suprascrotal testes ($p = 0.0308$).

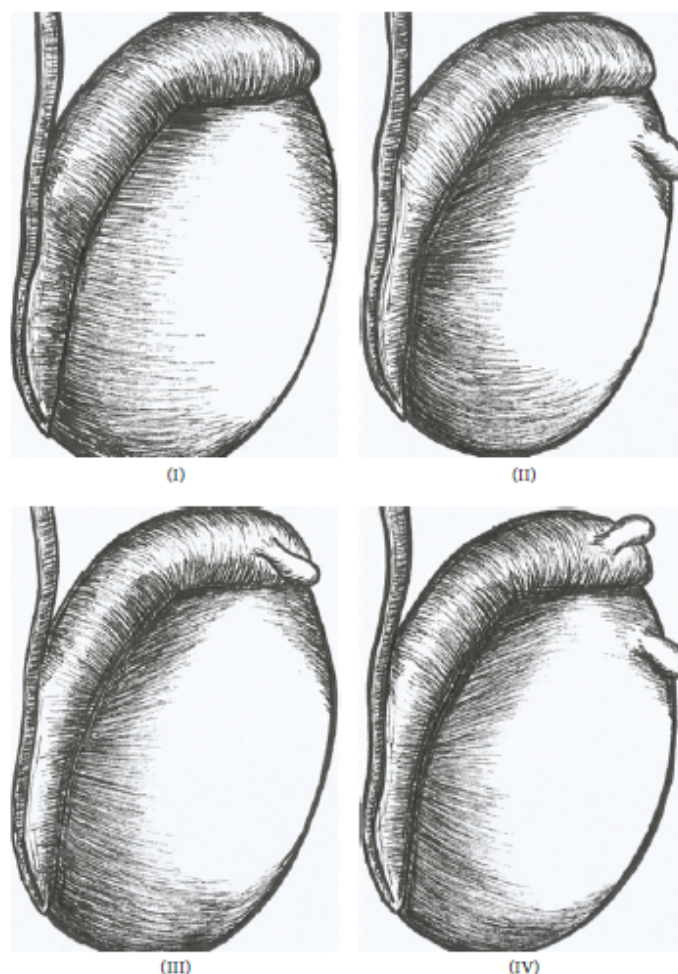


FIGURE 1: Schematic drawing showing the types of possible dispositions of the paratesticular appendages found during surgical intervention: (I) absence of testicular and epididymis appendages; (II) presence of testicular appendix; (III) presence of epididymal appendix; and (IV) presence of the testicular appendix and epididymis.

Of the 72 testicles with patent PV, 27 (37.5%) had EAs, and in the 36 testicles that had occluded PV, 12 (33.33%) had EAs ($p = 0.67$). In 40 cases of AEs (39 in cryptorchidism and 1 in fetuses), the PV was patent in 29 (72.5%). On the other hand, in the 96 cases of normal anatomy of the epididymis (69 cryptorchidism and 29 in the fetuses), the PV was patent in 51 (53.12%), which was significant ($p = 0.0364$).

There were no differences ($p = 0.1367$) in the occurrence of TAs among the 108 cases of cryptorchidism (67 had appendages) and 30 fetal testicles (23 had appendages). When analyzing the position of the testes and the occurrence of appendices we found a significant difference between the inguinal testicles and fetuses ($p = 0.0426$), between the abdominal and suprascrotal testes ($p = 0.0170$), and

between the inguinal and suprascrotal testes ($p = 0.0022$). No differences were found in the occurrence of appendices between the abdominal testicles and fetuses ($p = 0.3904$); between suprascrotal and fetal ($p = 0.0570$); and between abdominal and inguinal ($p = 0.5425$).

Of the 67 testicles with appendages, 49 (73.13%) had patent PV and 19 (28.35%) had EAs, whereas in 41 testicles without appendages, 23 (56.09%) had patent PV and 17 (41.46%) had EAs. This analysis showed that the presence of appendices is associated more frequently with patency of PV and with EAs ($p = 0.0054$). The correlation between PV patency, the occurrence of EAs, and the presence of TAs can be seen in Table 2.

TABLE 2: The table shows the correlation between the patency of the process and the presence of anomalies of epididymis and testicular appendices in the 108 testicles of patients with cryptorchidism studied.

Processus vaginalis	Epididymal anomalies	Testicular appendices
Patency: 72 (66.66%)	27 (69.23%)	49 (73.13%)
Occlusion: 36 (33.33%)	12 (30.76%)	18 (26.86%)
Total: 108 (100%)	39 (100%)	67 (100%)



FIGURE 2: A 4-year-old patient with suprascrotal testis presented anatomical relationship between the testis and the epididymis Type I, epididymis attached to the testis at the head and tail. Note the presence of a testicular appendix (ap) and patency of the processus vaginalis (PV). m = mesorchium, T = testis, and E = epididymis.

4. Discussion

Knowledge of anomalies associated with cryptorchidism is relevant in clinical practice, both to prevent accidents during orchidopexy and to predict infertility in the future (and counsel patients/parents), such as in cases of epididymis atresia and total disjunction between the testis and the epididymis [19, 20]. EAs are frequently found in cryptorchidism [5, 13, 14]. The abdominal testicles present a higher index of these anomalies [3, 19]. Previous studies on fetuses and children without cryptorchidism have demonstrated an incidence of EAs below 4% [15, 16].

In the present study, we observed EAs in only 3.44% of the fetal testes and 36.12% in the cryptorchid testicles, a difference that was significant. When we analyzed the testicular position, we observed that the abdominal testicles presented EAs in half of the cases and those in the canal had EAs in more than 38%. The most cranially positioned testicles had a higher incidence of EAs than the suprascrotal ones and the fetal testicles located in the scrotum, confirming findings from previous studies [3, 5, 13].

Platt [18] questioned the high incidence of EAs associated with cryptorchidism [5, 7, 21]. The author considers this a consequence of the lack of definition of the normal anatomical pattern of the epididymis in the various studies. We used the same standard proposed by Turek [15] to analyze the relationship between the testis and the epididymis and found an incidence of more than 30% of this type of anomaly (disjunction and/or atresia) in patients with cryptorchidism, confirming the high incidence of EAs in cryptorchidism.

The timing of vaginal closure is still unknown. Studies suggest that at birth there would be patency of PV in up to

80% of boys, with progressively lower rates during the first year of life [22]. In a significant number of adult men, the PV is never obliterated. However, in the majority of these cases, there is no development of indirect inguinal hernia [5, 9]. In a study of 137 patients with cryptorchidism, the authors found no significant difference in the patency of PV in relation to the age of the patients [23].

The patency of PV in patients with cryptorchidism ranges from 21.3 to 81.3% [24]. In our study, PV was found in more than 66% of cases of cryptorchidism and 23% of fetuses, a significant difference. Regarding testicular position, we observed that all abdominal testicles had patent PV and that the testicles located in the canal presented a PV patency index of 64%, which was higher than the PV patency found in the suprascrotal testes and fetal testes.

Patients with cryptorchidism with patent PV have a higher EA index than in cases where the PV is closed [5, 7, 13]. The index of EAs in patients with cryptorchidism and patent PV varies from 50 to 80% [5, 8]. Of the 72 testicles with patent PV in our study, 27 (37.5%) had EAs and 12 (33.33%) had EAs in the 36 testicles that had occluded PV, a difference that was not significant. This finding, discordant with several studies in the literature, can be attributed to the type of classification used to determine epididymal anomalies. In our study we used the classification that is currently accepted in the literature [2, 8, 15]. However, when analyzing and comparing cases of EAs in fetuses and patients (72.5% of PV patency) with cases of normal epididymis anatomy in the two groups (53.12% of PV patency), the difference was significant, which confirms the association between EAs and PV patency.

TAs had a significantly lower incidence in patients with cryptorchidism, which could indicate a possible role of TAs in the process of testicular migration [12]. In our study, we observed that 62% of testicles with cryptorchidism had testicular appendages, a much larger number than the 24% reported by Józsa [12], who in an elegant histologic study analyzed 37 appendix testes that were collected intraoperatively. The great majority of the population analyzed by Józsa was Caucasian. In contrast, we analyzed more than 100 testes of patients with a great variety of ethnicities. The substantial difference between our findings and those of Józsa might be explained by geographical or racial causes. There may be some differences in testicular appendix incidence in the different ethnicities. More prospective studies are needed to confirm this hypothesis.

We did not find a significant difference in the number of appendages in the testicles with cryptorchidism in relation to the control group, nor did we find a significant difference in the incidence of appendices in relation to testicular position in patients with cryptorchidism. Tostes [25] also did not

observe differences in the number of TAs in the testicles of patients with cryptorchidism in relation the control group. This study showed that the TAs in undescended testes had a larger quantity of elastic fibers and smaller quantity of smooth muscle cells and predominance of type III collagen. The collagen matrix at the testicular appendix in patients with cryptorchidism is disrupted or degraded, rather than fibrotic, which is consistent with higher hydrostatic pressure. This finding suggests that undescended testis involves histologic alteration in TAs [25].

In the testes where the TAs were present, 73% had patent PV and 28% EAs. When comparing the incidence of EAs and the patency of PV in appendage patients with patients without appendices, we observed that the presence of appendices was associated more frequently with the patency of PV and EAs. The novelty of this report is the investigation of testicular appendages among the previously studied parameters, such as the position of the cryptorchidic testis, the presence of the abnormalities of the epididymis, and patency of the vaginal process.

The main limitations of our study are as follows: (a) the ideal control group for our study would consist of children with the same age group as those with cryptorchidism and without genital anomalies, a very difficult group to obtain, and (b) use of human fetuses as a control group. How can one know if the testicles will not become ascending (a previously documented scrotal testicle that later ascends into an extrascrotal position)? We do not have this answer, but the low PV patency index, lower than previously described in the literature [22], in our opinion may be a factor that demonstrates that the testicles present a lower risk of ascending.

5. Conclusions

The abdominal and inguinal testes were associated with the occurrence of a greater number of anatomical abnormalities of the epididymis and in the patency of the PV. The PV patency was not associated with a higher frequency of epididymal anomalies. The presence of paratesticular appendages was associated more frequently with the occurrence of epididymal anomalies and the patency of the vaginal process in patients with cryptorchidism.

Disclosure

An earlier version of this work has been presented at the 37th Congress of the Société Internationale d'Urologie, Centro de Congressos de Lisboa, according to the following link: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00345-017-2090-9>.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq,

Brazil) and the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ).

References

- [1] C. F. Heyns and J. M. Hutson, "Historical review of theories on testicular descent," *The Journal of Urology*, vol. 153, no. 3, pp. 754–767, 1995.
- [2] F. J. B. Sampaio and L. A. Favorito, "Analysis of testicular migration during the fetal period in humans," *The Journal of Urology*, vol. 159, no. 2, pp. 540–542, 1998.
- [3] P. A. Lee and C. P. Houk, "Cryptorchidism," *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, vol. 20, no. 3, pp. 210–216, 2013.
- [4] J. M. Hutson and J. Thorup, "Evaluation and management of the infant with cryptorchidism," *Current Opinion in Pediatrics*, vol. 27, no. 4, pp. 520–524, 2015.
- [5] C. G. Scorer and G. H. Farrington, *Congenital Deformities of the Testis and Epididymis*, Butter Worths, London, UK, 1971.
- [6] J. S. Barthold and J. F. Redman, "Association of epididymal anomalies with patent processus vaginalis in hernia, hydrocele and cryptorchidism," *The Journal of Urology*, vol. 156, no. 6, pp. 2054–2056, 1996.
- [7] M. Mollaeian, V. Mehrabi, and B. Elahi, "Significance of epididymal and ductal anomalies associated with undescended testis: study in 652 cases," *Urology*, vol. 43, no. 6, pp. 857–860, 1994.
- [8] L. A. Favorito, W. S. Costa, and F. J. B. Sampaio, "Analysis of anomalies of the epididymis and processus vaginalis in human fetuses and in patients with cryptorchidism treated and untreated with human chorionic gonadotrophin," *BJU International*, vol. 98, no. 4, pp. 854–857, 2006.
- [9] T. E. B. Johansen, "Anatomy of the testis and epididymis in cryptorchidism," *Andrologia*, vol. 19, no. 5, pp. 565–569, 1987.
- [10] O. B. Lao, R. J. Fitzgibbons, and R. A. Cusick, "Pediatric inguinal hernias, hydroceles, and undescended testicles," *Surgical Clinics of North America*, vol. 92, no. 3, pp. 487–504, 2012.
- [11] D. Rolnick, S. Kawanoue, P. Szanto, and I. M. Bush, "Anatomical incidence of testicular appendages," *The Journal of Urology*, vol. 100, no. 6, pp. 755–756, 1968.
- [12] T. Józsa, B. Dienes, A. Telek, Z. Hargitai, Á. Pór, and C. Kiss, "Differential expression of androgen and estrogen receptor of appendix testis in patients with descended and undescended testes," *International Journal of Urology*, vol. 15, no. 2, pp. 171–174, 2008.
- [13] S.-O. Kim, S. W. Na, H. S. Yu, and D. Kwon, "Epididymal anomalies in boys with undescended testis or hydrocele: Significance of testicular location," *BMC Urology*, vol. 15, no. 1, article no. 108, 2015.
- [14] S. Sharma and A. Sen, "Complete testicular epididymal dissociation in the abdominal cryptorchid testis," *Journal of Pediatric Urology*, vol. 9, no. 6, pp. 1023–1027, 2013.
- [15] P. J. Turek, D. H. Ewalt, H. M. Snyder, and J. W. Duckett, "Normal epididymal anatomy in boys," *The Journal of Urology*, vol. 151, no. 3, pp. 726–727, 1994.
- [16] L. A. Favorito and F. J. B. Sampaio, "Anatomical relationships between testis and epididymis during the fetal period in humans (10–36 weeks postconception)," *European Urology*, vol. 33, no. 1, pp. 121–123, 1998.
- [17] W. M. Hern, "Correlation of fetal age and measurements between 10 and 26 weeks of gestation," *Obst Gynecol*, vol. 63, pp. 26–32, 1984.

- [18] L. D. Platt, A. L. Medearis, G. R. DeVore, J. M. Horenstein, D. E. Carlson, and H. S. Brar, "Fetal foot length: relationship to menstrual age and fetal measurements in the second trimester," *Obstetrics & Gynecology*, vol. 71, no. 4, pp. 526–531, 1988.
- [19] C. H. Han and S. H. Kang, "Epididymal anomalies associated with patent processus vaginalis in hydrocele and cryptorchidism," *Journal of Korean Medical Science*, vol. 17, no. 5, pp. 660–662, 2002.
- [20] E. Rachmani, Z. Zachariou, H. Snyder, and F. Hadziselimovic, "Complete testis-epididymis nonfusion anomaly: a typical association with cryptorchid testis," *Urologia Internationalis*, vol. 89, no. 3, pp. 355–357, 2012.
- [21] M. Kubota, K. Nakaya, Y. Arai, T. Ohyama, N. Yokota, and Y. Nagai, "The area and attachment abnormalities of the gubernaculum in patients with undescended testes in comparison with those with retractile testes," *Pediatric Surgery International*, vol. 30, no. 11, pp. 1149–1154, 2014.
- [22] C. Burgmeier, J. Dreyhaupt, and F. Schier, "Comparison of inguinal hernia and asymptomatic patent processus vaginalis in term and preterm infants," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 49, no. 9, pp. 1416–1418, 2014.
- [23] L. A. Favorito, W. S. Costa, and F. J. Sampaio, "Relationship between the persistence of the processus vaginalis and age in patients with cryptorchidism," *International Brazilian Journal of Urology*, vol. 31, no. 1, pp. 57–61, 2005.
- [24] H. Aggarwal, B. A. Kogan, and P. J. Feustel, "One third of patients with a unilateral palpable undescended testis have a contralateral patent processus," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 47, no. 9, pp. 1711–1715, 2012.
- [25] G. D. Tostes, S. F. Costa, J. P. D. Carvalho, W. S. Costa, F. J. B. Sampaio, and L. A. Favorito, "Structural analysis of testicular appendices in patients with cryptorchidism," *International Brazilian Journal of Urology*, vol. 39, no. 2, pp. 240–247, 2013.