

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas

Edilaine Farias Alves

Análise histomorfométrica do músculo bulboesponjoso em pacientes com estenose de uretra bulbar

> Rio de Janeiro 2022

Edilaine Farias Alves

Análise histomorfométrica do músculo bulboesponjoso em pacientes com estenose de

uretra bulbar

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.

Orientadora: Prof.^a Dra. Carla Braga Mano Gallo Coorientadores: Prof. Dr. Luciano Alves Favorito Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

> Rio de Janeiro 2022

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

 A474 Alves, Edilaine Farias. Análise histomorfométrica do músculo bulboesponjoso em pacientes com estenose de uretra bulbar / Edilaine Farias Alves – 2022. 90f.
 Orientadora: Prof.^a Dra. Carla Braga Mano Gallo Coorientadores: Prof. Dr. Luciano Alves Favorito Prof. Dr. Waldemar Silva Costa
 Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.
 1. Uretra - Estreitamento- Teses. 2. Pênis - Teses. 3. Estreitamento uretral. 4. Uretra - Anatomia & Histologia. I. Gallo, Carla Braga Mano. II. Favorito, Luciano Alves. III. Costa, Waldemar Silva. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.

> Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Edilaine Farias Alves

Análise histomorfométrica do músculo bulboesponjoso em pacientes com estenose de uretra bulbar

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.

Aprovada em 10 de agosto de 2022.

Orientadora: Prof.^a Dra. Carla Braga Mano Gallo Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Alves Favorito Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa (Coorientador) Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. André Guilherme Lagreca da Costa Cavalcanti Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Rodrigo da Silva Pires Hospital Naval Marcílio Dias

> Rio de Janeiro 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter guiado meu caminho e por ter me dado sabedoria para lidar com todas as oportunidades e vivências.

Agradeço aos meus pais, Expedito e Eronilde, minha base e exemplo, pelo apoio incondicional, amor e por sempre estarem ao meu lado, incentivando minha caminhada. Sem vocês não teria chegado até aqui. Estendo meus agradecimentos a toda a minha família pelo carinho.

Ao Prof. Dr. Luciano Alves Favorito, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, por sempre prezar pela qualidade do programa e pela oportunidade e ensinamentos durante meu doutorado, contribuindo para esta tese.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Carla Braga Mano Gallo, Prof. Dr. Luciano Alves Favorito e Prof. Dr. Waldemar Silva Costa, pelos quais eu tenho grande estima e inspiração. Agradeço a orientação e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional/científico.

Ao Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio, a Profa. Dra. Bianca Martins Gregório, ao Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza e ao Prof. Dr. Marco Aurelio Rodrigues da Fonseca Passos, docentes da Unidade de Pesquisa Urogenital e do Departamento de Anatomia, pelos ensinamentos que contribuíram para minha vida acadêmica e científica.

Aos colegas da Unidade de Pesquisa Urogenital, em especial a Isabella Mendes Procópio e a Priscila Fernandes dos Santos pela amizade, parceria e inestimável apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o curso (Processo 88882.450527/2019-01).

RESUMO

ALVES, Edilaine Farias. *Análise histomorfométrica do músculo bulboesponjoso em pacientes com estenose de uretra bulbar*. 2022. 90f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Introdução: O músculo bulboesponjoso (MB) envolve a uretra bulbar e sua função é expelir o sêmen e urina da uretra. As uretroplastias bulbares podem evoluir com disfunção ejaculatória e perda involuntária de urina, o que tem levado a preservação desse músculo durante o procedimento cirúrgico. Objetivos: Caracterizar o MB em pacientes com estenose uretral bulbar. Material e métodos: Foram estudados 21 pacientes, divididos em dois grupos: Grupo Estenose (n=14; média=62,00 anos) com estenose de uretra bulbar submetidos à uretroplastia aberta; e Grupo Controle (n=7; média=60,14 anos) com estenoses penianas (hipospádia, câncer de pênis e/ou infecção peniana) no qual foram submetidos à uretrostomia perineal. As amostras do MB foram dissecadas e os cortes histológicos foram utilizados para realização de técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas. As análises histomorfométricas foram realizadas em fotomicrografias. As médias foram comparadas estatisticamente usando o teste t de Student não pareado e o teste de Mann-Whitney (p<0,05). Resultados: A etiologia da estenose de uretra bulbar foi idiopática em 2 casos (14,29%), pós-ressecção transuretral de próstata em 6 (42,86%), pós-prostatectomia radical aberta em 5 (35,71%) e pósprostatectomia aberta em 1 caso (7,14%). O comprimento médio da estenose foi de 2,08 cm. O único parâmetro analisado com diferença significativa entre os grupos foram os vasos (diferença significativa entre o Grupo Controle: 5,11±1,98% e Grupo Estenose: 3,57±1,32%, p=0,0460). A análise quantitativa das fibras colágenas (Grupo Controle: 10,63±5,37% e Grupo Estenose: 10,83±4,55%, p=0,9296); diâmetro das fibras musculares do MB (Grupo Controle: 41,71±14,63 µm e Grupo Estenose: 40,11±8,59 µm, p=0,76) e fibras do sistema elástico (Grupo Controle: 3,83±1,54% e Grupo Estenose: 5,43±2,90%, p=0,2601) não mostraram diferença significativa. Conclusão: As análises histológicas mostraram uma diminuição significativa dos vasos do MB na estenose de uretra, sem alterações nas fibras do sistema elástico, colágeno, nervos e diâmetro das fibras musculares. Esses achados mostram que a estenose de uretra bulbar causa alterações mínimas na estrutura do MB.

Palavras-chave: Músculo bulboesponjoso. Estenose de uretra. Pênis. Uretra. Histomorfometria.

ABSTRACT

ALVES, Edilaine Farias. *Structural analysis of the bulbospongiosus muscle in patients with bulbar urethral strictures*. 2022. 90f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Background: Bulbospongiosus muscle (BSM) covers the bulbar urethra and its function is to expel of seminal fluid and urine from the urethra. Bulbar urethroplasty can evolve with ejaculatory dysfunction and post-mictional dribbling, which has led to the preservation of this muscle during the surgical procedure. Objective: To characterize the BSM in patients with bulbar urethral strictures. Methods: We studied 21 patients divided into 2 groups: Stricture Group (n=14; mean age=62.00 years) with bulbar stricture submitted to open urethroplasty; and Control Group (n=7; mean age=60.14 years) with penile strictures (hypospadias cripples, penile cancer and/or penile infection) who were submitted to perineal urethrostomy. Samples of the BSM were dissected and histologic sections were stained by histochemical and immunohistochemical techniques. Histomorphometric analyzes were performed on photomicrographs. Means were statistically compared using the unpaired Student t test and the Mann-Whitney test (P<0.05). Results: The etiology of bulbar urethral stricture was idiopathic in 2 cases (14.29%), post-transurethral resection of the prostate in 6 (42.86%), post open radical prostatectomy in 5 (35.71%) and post open prostatectomy in 1 case (7.14%). The average length of the stricture was 2.08 cm. The only parameter analyzed with significant difference between the groups was the vessels (significant difference between the control group: 5.11±1.98% and stricture group: 3.57±1.32%, P=0.0460). The quantitative analysis of the collagen fibers (Control Group: 10.63±5.37% and Stricture Group: 10.83±4.55%, P=0.9296); diameter of BSM muscle fibers (Control Group: 41.71±14.63 µm and Stricture Group: 40.11±8.59 µm, P=0.76 and elastic system fibers (Control Group: 3.83±1.54% and Stricture Group: 5.43±2.90%, P=0.2601) showed no significant difference. Conclusions: Histologic analysis showed a significant decrease of the BSM vessels in urethral stricture, without changes in elastic system fibers, collagen, nerves, and muscle fiber diameter. These findings show that the bulbar urethral stricture causes minimal alterations in the structure of the BSM.

Keywords: Bulbospongiosus muscle. Urethral stricture. Penis. Urethra. Histomorphometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Desenvolvimento dos somitos	14
Figura 2 –	Localização do músculo bulboesponjoso	15
Figura 3 –	Fotomacrografia mostrando o músculo bulboesponjoso em peça anatômica	16
Figura 4 –	Irrigação, drenagem venosa e inervação do músculo bulboesponjoso	
Figura 5 –	Organização do músculo estriado esquelético	17
Figura 6 –	Fotomicrografia do corte transversal do músculo bulboesponjoso de adultos	18
Figura 7 –	Desenvolvimento das uretras prostática e membranácea	19
Figura 8 –	Desenvolvimento da uretra esponjosa	20
Figura 9 –	Uretra masculina e estruturas associadas	20
Figura 10 –	Partes da uretra masculina	21
Figura 11 –	Irrigação arterial das partes intramural e prostática da uretra	22
Figura 12 –	Irrigação arterial das partes membranácea e esponjosa da uretra	24
Figura 13 –	Drenagem venosa da uretra	24
Figura 14 –	Histologia da uretra prostática e estruturas associadas	25
Figura 15 –	Histologia da uretra esponjosa	27
Figura 16 –	Progressão da estenose de uretra	27
Figura 17 –	Acesso cirúrgico	28
Figura 18 –	Uretrocistografia mostrando a estenose de uretra peniana proximal	31
Figura 19 –	Mensurando o diâmetro da fibra muscular, software ImageJ	32
Figura 20 –	Apresentação do resultado do diâmetro da fibra, software ImageJ	35
Figura 21 –	Utilizando os comandos <i>plugins</i> , <i>analyze</i> e <i>grid</i> para sobrepor a grade de 100 pontos, <i>software</i> ImageJ	35
Figura 22 –	Sobreposição da grade de 100 pontos, software ImageJ	36
Figura 23 –	Utilização do recurso <i>cell counter</i> para quantificação da densidade de área das estruturas analisadas, <i>software</i> ImageJ	37
Figura 24 –	Quantificação das fibras colágenas no músculo bulboesponjoso, <i>software</i> ImageJ	37
Figura 25 –	Quantificação das fibras do sistema elástico no músculo bulboesponjoso,	38

	software ImageJ	
Figura 26 –	Quantificação dos vasos sanguíneos no músculo bulboesponjoso,	39
	software ImageJ	
Figura 27 –	Quantificação dos nervos no músculo bulboesponjoso, software ImageJ	39
Figura 28 –	Fotomicrografias da organização das fibras colágenas no músculo	40
	bulboesponjoso	
Tabela 1 –	Dados clínicos dos pacientes e parâmetros analisados no músculo	41
	bulboesponjoso de pacientes come estenose de uretra bulbar	
Figura 29 –	Fotomicrografias do corte transversal do músculo bulboesponjoso	42
	mostrando o diâmetro das fibras musculares	
Figura 30 –	Fotomicrografias do corte longitudinal do músculo bulboesponjoso	43
	mostrando a distribuição das fibras colágenas	
Figura 31 –	Fotomicrografias do corte longitudinal do músculo bulboesponjoso	44
	mostrando a distribuição das fibras do sistema elástico	
Figura 32 –	Fotomicrografías do músculo bulboesponjoso mostrando a	45
	imunomarcação de vasos sanguíneos	
Figura 33 –	Fotomicrografías do corte longitudinal do músculo bulboesponjoso	46
	mostrando a imunomarcação de nervos	
		47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

А.	Artéria
Aa.	Artérias
BP	Bulbopeniana
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CEP/HUPE	Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto
Cm	Centímetros
DAB	3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloridro
DP	Desvio padrão
MB	Músculo bulboesponjoso
MEC	Matriz extracelular
N.	Nervo
Nn.	Nervos
PBS/BSA	Phosphate buffered saline / Bovine serum albumin
PTV	Prostatectomia transvesical
Ref	Referência
RTU	Ressecção transuretral
TRIS-EDTA	Trisaminomethane-ethylenediaminetetraacetic acid
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
V.	Veia
Vv.	Veias

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μm	Micrômetro
=	Igual
β	Beta
pН	Potencial de hidrogênio
°C	Graus Celsius
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
R	Marca registrada
	U
±	Mais ou menos
± <	Mais ou menos Menor
± < Nm	Mais ou menos Menor Nanômetro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO
1	REVISÃO DA LITERATURA
1.1	Morfologia do músculo bulboesponjoso
1.1.1	Embriologia do músculo
1.1.2	Anatomia do músculo
1.1.3	Histologia do músculo
1.2	Morfologia da uretra
1.2.1	Embriologia da uretra
1.2.2	Anatomia da uretra
1.2.3	Histologia da uretra
1.3	Estenose de uretra
2	OBJETIVOS
3	MATERIAL E MÉTODOS
3.1	Comitê de ética
3.2	Coleta das amostras e procedimentos histológicos
3.3	Imuno-histoquímica
3.4	Histomorfometria
3.4.1	Análise qualitativa
3.4.2	Análise quantitativa
3.4.2.1	Quantificação do diâmetro das fibras musculares do músculo bulboesponjoso
3.4.2.2	Quantificação das fibras colágenas, fibras musculares, fibras do sistema
	elástico, vasos sanguíneos e nervos
3.5	Análise estatística
4	RESULTADOS
4.1	Análise qualitativa do colágeno
4.2	Análise quantitativa
4.2.1	Diâmetro das fibras musculares
4.2.2	Fibras colágenas
4.2.3	Fibras do sistema elástico
4.2.4	Vasos sanguíneos.

4.2.5	<u>Nervos</u>	47
5	DISCUSSÃO	48
	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE – Termo de consentimento informado	56
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética	57
	ANEXO B – Artigo Urology doi.org/10.1016/j.urology.2019.11.046	61
	ANEXO C – Artigo International Brazilian Journal of Urology	
	doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2020.0055	68
	ANEXO D – Artigo Journal of Pediatric Urology doi.org/	
	10.1016/j.jpurol.2020.07.015	82

INTRODUÇÃO

A pesquisa translacional tem importância em todas as especialidades médicas, pois relaciona a medicina baseada em evidências às soluções sustentáveis para problemas de saúde pública (Mehić, 2011) e visa esclarecer as questões clínicas utilizando trabalhos de bancada para facilitar a previsão, prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças (Yao et al., 2013).

O músculo bulboesponjoso (MB), também conhecido como músculo bulbocavernoso, é um músculo estriado pareado, originário do corpo perineal e fixado na rafe mediana (Shafik & El-Sibai, 2000; Yang & Bradley, 2000). O MB envolve a uretra bulbar e tem como função a expulsão do líquido seminal e da urina, especialmente a última gota, da uretra por contrações rítmicas, agindo como uma bomba (Puppo & Puppo, 2016).

A estenose de uretra é o estreitamento de um segmento da uretra causado por cicatrização, sendo um processo fibroso que resulta em tecido cicatricial, que patologicamente tem o efeito de obstruir o trato urinário inferior. Este estreitamento diminui o calibre do lúmen uretral e pode resultar em uma série de efeitos prejudiciais, como a diminuição ou interrupção completa do fluxo urinário, distúrbios da micção e até perda da função renal (Cavalcanti et al., 2007; Tritschler et al., 2013). É uma doença relativamente comum e multifatorial com prevalência de 0,6% (Alwaal et al., 2014), sendo a uretra bulbar o principal local e podendo ser ocasionada devido a diversos fatores, como traumas e cateterismo uretral (Fenton et al., 2005). As uretroplastias bulbares estão associadas em 17 a 23% dos casos a disfunção ejaculatória e a perda involuntária de urina no período pós-operatório (Fredrick et al., 2017).

Estudos prévios avaliaram a preservação do MB e de sua inervação durante a uretroplastia bulbar com o objetivo de melhorar a função ejaculatória e a perda involuntária de urina. No entanto, eles não observaram um impacto significativo na função ejaculatória relatada pelos pacientes no período pós-operatório (Asopa et al., 2001; Barbagli et al., 2008; Erickson et al., 2010; Fredrick et al., 2017; Elkady et al., 2019).

Até o momento, não há relatos sobre a estrutura do MB em pacientes submetidos à uretroplastia. Nossa hipótese foi de que a espongiofibrose associada à estenose de uretra bulbar poderia comprometer a estrutura do MB. Apesar dos efeitos prejudiciais causados pela estenose uretral já terem sido observados e, visto que o MB tem papel importante nas funções sexual e miccional do indivíduo, uma análise qualitativa e quantitativa poderia ser importante para avaliar se o músculo é afetado na estenose e se, na presença da patologia, é preservado durante o procedimento cirúrgico.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Morfologia do músculo bulboesponjoso

1.1.1 Embriologia do músculo

O desenvolvimento do tecido muscular acontece no início da quarta semana por transformação epitélio-mesenquimal de células precursoras miogênicas, sendo originário do mesoderma paraxial, derivado do mesoderma embrionário. Os somitos (grego: *soma*, corpo) são células longitudinais que se segmentam em blocos de corpos cuboides presentes em uma camada grossa de tecido localizada próximo ao eixo do embrião, numa região denominada mesoderma paraxial, um dos derivados do mesoderma embrionário. Os somitos se desenvolvem em uma sequência cefalocaudal e, quando desenvolvidos, originam os músculos do esqueleto axial, da parede corporal e dos membros (Figura 1) (Moore & Persaud, 2008a; Moore & Persaud, 2008b; Sadler, 2019a).

No início da quarta semana, as células da região ventromedial dos somitos sofrem uma transformação epitélio-mesenquimal, perdendo suas características epiteliais e tornando-se mesenquimatosas (do tipo fibroblástico); o conjunto destas células constitui o esclerótomo. As células nas regiões dorsomedial e ventrolateral do somito formam os precursores para as células musculares, enquanto as células entre essas duas regiões formam o dermátomo e, juntas, as células de ambas as regiões formam o dermóniótomo (Figura 1). Ao final da quinta semana, já podem ser encontrados em torno de 42 a 44 pares de somitos, sendo esta periodicidade específica proeminente nestas duas semanas do desenvolvimento importantes para uma possível determinação da idade do embrião a partir da quantidade de somitos (Moore & Persaud, 2008b; Sadler, 2019b).

Na sexta semana, as células migram do dermomiótomo, formando o miótomo, que proporciona o componente muscular para seu próprio segmento, sendo identificado pela expressão de fatores de determinação miogênica (Figura 1). Os miótomos originam a maior parte dos músculos esqueléticos e na sétima semana ocorre a primeira indicação de miogênese, sendo o alongamento dos núcleos e dos corpos celulares de células mesenquimais ao se diferenciarem em mioblastos (célula muscular primitiva). Os mioblastos se fundem e

formam os miotubos - fibras musculares alongadas, multinucleadas e cilíndricas (Moore & Persaud, 2008a; Sadler, 2019a).



Figura 1 – Desenvolvimento dos somitos

Legenda: Fases de desenvolvimento de um somito. Em (A) células do mesoderma paraxial que sofrem transformação e tornam-se os somitos; (B) células da região ventromedial do somito; (C) formação do dermomiótomo; (D) diferenciação do dermomiótomo em miótomo.
 Fonte: Sadler, 2019b (traduzido por A autora, 2022).

O crescimento do músculo, durante o desenvolvimento embrionário, resulta da contínua fusão de mioblastos e miotubos, no qual desenvolvem-se os miofilamentos. Ao final do terceiro mês embrionário, ocorre o desenvolvimento das miofibrilas e outras organelas características das células musculares estriadas, como as estrias transversais. Os miotubos, ao se diferenciarem, tornam-se envoltos pelas lâminas externas que os separam do tecido conjuntivo circundante, e pelas fibras reticulares formando o endomísio. O perimísio e o epimísio, camadas de tecido conjuntivo que envolvem os feixes de fibras musculares e o

músculo inteiro, respectivamente, são formados pelos fibroblastos (Moore & Persaud, 2008a; Sadler, 2019a).

A maioria dos músculos esqueléticos apresenta um desenvolvimento antes do nascimento, e quase todos os demais se formam até o final do primeiro ano. O aumento no tamanho de um músculo após o primeiro ano resulta de um aumento no diâmetro das fibras devido à formação de mais miofilamentos. Os músculos aumentam em comprimento e em espessura, acompanhando o crescimento do esqueleto (Moore & Persaud, 2008a).

1.1.2 Anatomia do músculo

O MB, também conhecido como bulbocavernoso, é um músculo estriado pareado, originário do corpo perineal e fixado na rafe mediana, envolvendo a uretra bulbar (Figuras 2 e 3) (Shafik & El-Sibai, 2000; Yang & Bradley, 2000).





Legenda: Músculos do períneo, incluindo o músculo bulboesponjoso (seta amarela). Fonte: Chung et al., 2012 (traduzido por A autora, 2022).

Figura 3 – Fotomacrografia mostrando o músculo bulboesponjoso em peça anatômica



Fonte: A autora, 2022.

O MB tem como função eliminar o líquido seminal e a urina da uretra bulbar, especialmente a última gota, agindo como uma bomba para ejetar todo o conteúdo da uretra a partir de contrações rítmicas (Puppo & Puppo, 2016).

As fibras anteriores do MB circundam a região proximal do corpo do pênis e as contrações deste músculo e do músculo isquiocavernoso comprimem a raiz do pênis e os corpos eréteis. Essa compressão leva a um aumento na pressão dentro do tecido erétil, podendo aumentar a rigidez peniana e potencializar a ereção (Chung et al., 2012; Favorito & Sampaio, 2014; Moore et al., 2018). Concomitantemente, os músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso restringem a drenagem venosa dos tecidos eréteis, auxiliando a ereção e ajudando a promover a turgidez do pênis (Moore et al., 2018).

O MB recebe suprimento sanguíneo da artéria perineal (ramo da artéria pudenda interna) e sua drenagem venosa é feita através da veia pudenda interna. É inervado pelo nervo perineal (ramo do nervo pudendo) (Figura 4) (Yang & Bradley, 2000; Chung et al., 2012; Moore et al., 2018).



Figura 4 - Irrigação, drenagem venosa e inervação do músculo bulboesponjoso

Legenda: Períneo e músculo bulboesponjoso (A) Vascularização da artéria perineal (seta); (B) drenagem venosa da veia pudenda interna (seta); (C) inervação do períneo, indicando o nervo perineal (seta).
 Fonte: Drake et al., 2014 (traduzido por A autora, 2022).

O tecido muscular é constituído por células alongadas contendo grande quantidade de filamentos citoplasmáticos de proteínas contráteis que geram forças necessárias para a contração desse tecido, utilizando a energia contida nas moléculas de ATP (Junqueira & Carneiro, 2013a).

O músculo estriado esquelético é formado por feixes de células cilíndricas muito longas (até 30 cm), multinucleadas, que apresentam estriações transversais e contém muitos filamentos – as miofibrilas. Essas células, ou fibras, têm contração rápida e vigorosa e estão sujeitas ao controle voluntário. Nas fibras musculares esqueléticas os numerosos núcleos se localizam na periferia das fibras, nas proximidades da membrana celular das células musculares, denominada de sarcolema (Junqueira & Carneiro, 2013a).

O músculo é envolvido por uma camada de tecido conjuntivo, denominada de epimísio. O epimísio se dirige para o interior do músculo em forma de finos septos separandoo em feixes de fibras musculares, envolvidas pelo perimísio. Cada fibra muscular, individualmente, é envolvida pelo endomísio - formado pela lâmina basal da fibra associada a fibras reticulares. O tecido conjuntivo é importante, pois mantém as fibras musculares unidas, possibilitando que a força de contração gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro (Figuras 5 e 6) (Junqueira & Carneiro, 2013a).



Figura 5 - Organização do músculo estriado esquelético

Legenda: Desenho esquemático da organização do músculo. À direita, abaixo, o esboço de um músculo evidenciando um segmento, representado na figura maior, à esquerda.
 Fonte: Junqueira & Carneiro, 2013a.



Figura 6 - Fotomicrografia do corte transversal do músculo bulboesponjoso de adultos

Legenda: Fotomicrografia do corte transversal do músculo bulboesponjoso de um indivíduo adulto sem patologia, mostrando o perimísio (seta amarela) e o endomísio (seta preta).
Nota: Tricrômico de Masson, objetiva de 20x. A barra de escala representa 100 μm.
Fonte: A autora, 2022.

1.2 Morfologia da uretra

1.2.1 Embriologia da uretra

O seio urogenital pode ser dividido em três partes: vesical craniana ou superior; pélvica ou média; e fálica caudal ou inferior. A uretra é derivada das partes pélvica e fálica. A maior região do seio urogenital é a parte vesical craniana, que é superior, se diferencia na bexiga urinária e é contínua com o alantoide; a parte pélvica é um canal estreito que origina, no homem, as partes prostática e membranácea da uretra; a parte caudal desenvolve a uretra fálica, posteriormente uretra esponjosa, e cresce em direção ao tubérculo genital (primórdio do pênis) (Moore & Persaud, 2008d; Joseph & Vezina, 2018; Sadler, 2019c).

A uretra tem origem durante a sexta semana de gestação a partir de pregas urogenitais na região caudal da membrana cloacal, que compreende o endoderma e o ectoderma, e na 14^a semana seu desenvolvimento está completo (Krishnan et al., 2006; Hsu & Liu, 2018).

A uretra é dividida em quatro partes que possuem sua própria classificação anatômica e tipo celular histológico. As regiões proximais são a uretra prostática e a uretra membranácea, derivadas do seio urogenital; a região distal é a uretra esponjosa, subdividida em uretra bulbar e uretra peniana, derivadas da placa uretral no aspecto ventral do tubérculo genital, cujo mesênquima se torna o corpo esponjoso (Figuras 7 e 8) (Altemus, 1991; Krishnan et al., 2006). O epitélio da maior parte da uretra masculina se origina no endoderma do seio urogenital e o epitélio da parte distal da uretra que reveste a fossa navicular é derivada do ectoderma superficial; os tecidos conjuntivo e muscular liso são derivados do mesoderma visceral (Moore & Persaud, 2008d; Joseph & Vezina, 2018; Sadler, 2019c).

Figura 7 – Desenvolvimento das uretras prostática e membranácea



Fonte: Sadler, 2019c (traduzido por A autora, 2022).





Legenda: Desenvolvimento da parte distal da uretra. Cortes longitudinais da uretra esponjosa de fetos com 11 semanas (A), 12 semanas (B), e 14 semanas (C) de desenvolvimento.
 Fonte: Moore & Persaud, 2008d.

A uretra masculina é um tubo muscular de 18 a 22 cm de comprimento, responsável por conduzir a urina da bexiga urinária para o meio externo, além de fornecer uma via de saída do sêmen (Moore et al., 2018).

A uretra é dividida em quatro partes que compõem dois segmentos principais: proximal e distal. O segmento proximal é constituído pelas partes intramural (ou préprostática), prostática e membranácea (ou membranosa) da uretra. O segmento distal é constituído pela uretra esponjosa que é subdividida em uretras bulbar e peniana (ou pendular) (Figuras 9 e 10) (Krishnan et al., 2006; Moore et al., 2018). Os segmentos proximal e distal são também conhecidos como uretra posterior e uretra anterior, respectivamente: a parte posterior está localizada entre o colo da bexiga e a uretra bulbar, e a parte anterior, é circundada pelo corpo esponjoso a uretra anterior consiste na uretra bulbar e peniana, além da fossa navicular. A uretra posterior consiste na uretra prostática e membranosa (Andrich & Mundy, 2008).



Figura 9 – Uretra masculina e estruturas associadas

- Legenda: Esquema mostrando os segmentos proximal e distal da uretra e suas relações com outras estruturas: crista uretral, seios prostáticos, ductos ejaculatórios, utrículo prostático, dúctulos prostáticos, colículo seminal, ductos bulbouretrais e esfíncteres interno e externo da uretra.
- Fonte: Moore et al., 2018 (traduzido por A autora, 2022).



Legenda: Esquema mostrando as partes da uretra: intramural, prostática, membranácea e esponjosa (subdivida em uretras bulbar e peniana).

Fonte: Moore et al., 2018 (traduzido e editado por A autora, 2022).

A uretra intramural está localizada no colo da bexiga, sendo envolvida pelo esfíncter interno da uretra. O diâmetro e o comprimento desta região podem variar entre 0,5 e 1,5 cm, pois dependem do estado da bexiga, ou seja, se ela está enchendo ou esvaziando. Durante o enchimento, o colo da bexiga é contraído e o diâmetro da uretra é pequeno; durante o esvaziamento, o colo da bexiga relaxa e a uretra é larga (Figuras 9 e 10) (Moore et al., 2018).

A uretra prostática se estende ao longo da glândula prostática e termina no seu ápice. É a parte mais dilatável da uretra, medindo entre 3 e 5 cm, no qual apresenta em sua parede posterior a crista uretral, uma crista longitudinal mediana elevada de tecido e que contém o colículo seminal, também conhecido como *verumontanum*. O colículo seminal é uma eminência arredondada mediana, sendo o local onde desembocam os ductos ejaculatórios, cujos orifícios são semelhantes a fendas e se abrem de ambos os lados para a uretra prostática. Além disso, no colículo também está localizado o utrículo prostático, orifício semelhante a fenda remanescente do ducto Mulleriano embrionário. Os dúctulos prostáticos se abrem lateralmente ao colículo seminal e drenam para os seios prostáticos – sulcos bilaterais localizados de ambos os lados da crista uretral (Levin et al., 2007; Hsu & Liu, 2018; Moore et al., 2018). A uretra prostática pode ser subdividida em segmentos proximal e distal: o

segmento proximal vai do colo da bexiga ao colículo seminal, e o segmento distal vai do colículo seminal ao esfíncter externo da uretra (Figuras 9 e 10) (Ricke et al., 2018).

A uretra membranácea é a parte mais curta e mais estreita da uretra, medindo apenas de 1 a 2 cm, e atravessa o assoalho pélvico (Hsu & Liu, 2018). É circundada pelo esfíncter externo da uretra, que além de vasos, nervos e músculo transverso profundo do períneo, representa o diafragma urogenital (Levin et al., 2007; Andrich & Mundy, 2008). Está localizada no diafragma urogenital e estende-se do ápice da próstata até a musculatura do assoalho pélvico. Além disso, as glândulas bulbouretrais estão localizadas posterolateralmente à uretra membranácea (Figuras 9 e 10) (Moore et al., 2018).

A uretra esponjosa é o maior segmento da uretra e começa na extremidade distal da parte membranácea e termina no óstio externo da uretra, que é ligeiramente mais estreito do que as outras partes da uretra (Moore et al., 2018). É subdividida em uretra bulbar (porção proximal) e uretra peniana (porção distal). A uretra bulbar é dilatada, circundada pelo corpo esponjoso do pênis, envolvida pelo músculo bulboesponjoso, além de ser o local de abertura dos ductos das glândulas bulbouretrais (Levin et al., 2007; Andrich & Mundy, 2008; Moore et al., 2018). A uretra peniana (ou pendular) é a parte mais longa, podendo medir cerca de 15 a 20 cm, no qual apresenta uma dilatação na sua porção terminal, na glande do pênis, denominada de fossa navicular, e que aumenta do diâmetro proximal ao meato (Figuras 9 e 10) (Levin et al., 2007; Hsu & Liu, 2018). A uretra apresenta em toda sua extensão as glândulas de *Littré* (ou glândulas uretrais), porém estas estão localizadas predominantemente na uretra peniana, e tem função de secretar muco para lubrificar a uretra (Junqueira & Carneiro, 2013b; Hsu & Liu, 2018).

A uretra é bem vascularizada e recebe seu suprimento sanguíneo das direções proximal e distal (Hsu & Liu, 2018). As partes intramural e prostática da uretra são supridas por ramos prostáticos das artérias vesicais inferiores e retais médias (Figura 11). As partes membranácea e esponjosa da uretra são supridas por ramos da artéria dorsal do pênis (Moore et al., 2018). A uretra esponjosa e o corpo esponjoso também são irrigados pela artéria bulbouretral, um dos ramos arteriais penianos e que corre medialmente no espaço perineal profundo. Também anastomosa-se com a artéria cavernosa e dorsal do pênis na glande para garantir que a uretra tenha um suprimento vascular tanto anterógrado quanto retrógrado (Figura 11) (Favorito & Sampaio, 2014; Hsu & Liu, 2018).

A drenagem venosa da uretra é realizada através das veias das duas partes proximais da uretra que drenam para o plexo venoso periprostático, e a parte distal da uretra é realizada através das veias que acompanham as artérias, tendo nomes semelhantes (Moore et al., 2018).

A drenagem venosa da uretra bulbar é realizada por veias bulbares que drenam para o plexo prostático, que é a veia pudenda interna (Figura 12) (Kavoussi, 2016).

A inervação da uretra é derivada dos nervos do plexo nervoso periprostático (fibras simpáticas, parassimpáticas e aferentes viscerais mistas), que surgem do plexo hipogástrico inferior (del Pozo-Jiménez et al., 2014; Moore et al., 2018). O segmento prostático da uretra é inervado por fibras somáticas motoras, com ausência de inervação autonômica. A inervação da parte membranácea da uretra pode ser derivada dos nervos cavernosos, extensões do plexo prostático, que fornecem inervação autonômica ao músculo liso intrínseco deste segmento. A uretra esponjosa tem sua inervação proveniente dos axônios submucosos que passam centralmente pelo nervo dorsal do pênis (Figura 13) (Kavoussi, 2016).



Figura 11 - Irrigação arterial das partes intramural e prostática da uretra

Legenda: Esquema evidenciando as artérias vesical inferior (seta preta) e retal média (seta amarela). Fonte: Moore et al., 2018 (traduzido por A autora, 2022).







Figura 13 – Drenagem venosa da uretra

Fonte: Moore et al., 2018; Hsieh et al., 2015 (traduzidos e editados por A autora, 2022).

1.2.3 Histologia da uretra

A parede da uretra consiste em mucosa com epitélio variável (Hsu & Liu, 2018). Em desenvolvimento, a uretra forma um epitélio estratificado composto por camadas basal, intermediária e superficial (Joseph & Vezina, 2018). A uretra masculina normal é revestida

por uma camada de epitélio pseudoestratificado colunar que fica na membrana basal e, abaixo desta membrana, há uma camada de tecido conjuntivo contendo sinusoides vasculares do corpo esponjoso e fibras musculares lisas (Cavalcanti et al., 2007).

O tecido conjuntivo da uretra inclui principalmente fibroblastos e matriz extracelular (MEC) contendo colágeno, proteoglicanos, fibras elásticas e glicoproteínas (Cavalcanti et al., 2007). O tecido muscular da uretra é composto tanto por músculos estriados quanto lisos. As células musculares lisas da uretra são reunidas em pequenos feixes e ligadas umas às outras por muitas junções do tipo aderente, mas sem junções de abertura. A contração do músculo liso longitudinal poderia ter um papel na estabilização da uretra e permitir que a força gerada pelos elementos musculares circulares obstruísse o lúmen ou auxiliasse na abertura do colo da bexiga durante a micção (Yoshimura & Chancellor, 2012). Na parte proximal da uretra, a musculatura da bexiga forma o seu esfincter interno (Junqueira & Carneiro, 2013b), e na parte membranácea da uretra podem ser observadas camadas espessas de músculo estriado no nível do esfincter externo da uretra (Stoddard & Leslie, 2020).

As partes intramural e prostática são revestidas por epitélio de transição (urotélio), que pode se estender para os dúctulos prostáticos (Figura 14). O urotélio é cercado por uma camada longitudinal interna e uma camada circular externa do músculo liso (Chung et al., 2012; Junqueira & Carneiro, 2013b; Stoddard & Leslie, 2020). A uretra membranosa é revestida por epitélio pseudoestratificado colunar (Junqueira & Carneiro, 2013b). A uretra esponjosa possui epitélio pseudoestratificado colunar, com áreas de epitélio estratificado pavimentoso (Figura 15) (Junqueira & Carneiro, 2013b). A fossa navicular é revestida por epitélio estratificado para suportar as tensões da abrasão (Hsu & Liu, 2018; Stoddard & Leslie, 2020).



Figura 14 - Histologia da uretra prostática e estruturas associadas

- Legenda: Fotomicrografia mostrando a histologia da uretra prostática (seta vermelha) e estruturas importantes ductos ejaculatórios (setas pretas) e utrículo prostático (seta amarela).
- Nota: Fotomicrografias da próstata de feto controle, 17,6 semanas. Tricrômico de Masson, 40x. As barras de escalas representam 200 μm.
- Fonte: A autora, 2022.



Figura 15 – Histologia da uretra esponjosa

- Legenda: Fotomicrografia mostrando a histologia do pênis, com os corpos cavernosos (seta preta), corpo esponjoso (seta amarela) e uretra esponjosa (seta vermelha).
- Nota: Fotomicrografías da próstata de feto controle, 17,6 semanas. Tricrômico de Masson, 40x. As barras de escalas representam 200 μm.
- Fonte: A autora, 2022.

1.3 Estenose de uretra

A estenose uretral é uma doença comum na urologia, no qual são realizados vários procedimentos cirúrgicos para tratá-la. Porém, essa variedade de tratamentos pode apresentar a falta de uma técnica ideal (Andrich & Mundy, 2008).

A estenose uretral é o estreitamento de qualquer segmento da uretra que pode acarretar consequências potencialmente graves para todo o trato urinário, como a diminuição ou interrupção completa do fluxo urinário, causando distúrbios da micção e carência da função renal. Em geral, a estenose da uretra é um processo fibroso que resulta em tecido cicatricial, no qual diminui o calibre do lúmen uretral (Figura 16) (Cavalcanti et al., 2007; Mundy & Andrich, 2011; Tritschler et al., 2013).



Figura 16 – Progressão da estenose de uretra

Legenda: Estágios da progressão da estenose de uretra. (A) Prega mucosa que resulta em extravasamento urinário, causando uma reação fibrótica; (B) maior estreitamento do lúmen uretral com constrição da íris; (C) envolvimento de espessura total com fibrose mínima no tecido esponjoso; (D) espongiofibrose de espessura total; (E) inflamação e fibrose envolvendo tecidos fora do corpo esponjoso; (F) estenose complexa complicada por uma fístula, podendo prosseguir para a formação de um abcesso ou abrir para a pele ou o reto.

Fonte: Jordan & McCammon, 2012.

A estenose uretral é uma doença relativamente comum e multifatorial com prevalência de 0,6% (Alwaal et al., 2014). As estenoses uretrais podem ser classificadas em anteriores e posteriores, no qual 80 a 90% ocorrem na uretra anterior (Lee & Kim, 2013; Palminteri et al., 2013). Segundo estudo de Palminteri et al. (2013), a uretra bulbar foi o local mais comum de estenose uretral (46,9%), seguida pela uretra peniana (30,5%), estenoses bulbopenianas (9,9%) e estenoses panuretrais (4,9%).

Dentre as etiologias das estenoses uretrais, a mais comum é a idiopática, sendo seguida das causas iatrogênicas que incluem ressecção transuretral, cateterismo uretral, cistoscopia, prostatectomia e cirurgia prévia de hipospádia, e traumas (Lumen et al., 2009; Palminteri et al. 2013).

A fisiopatologia da estenose uretral é caracterizada por uma lesão do epitélio uretral ou do corpo esponjoso adjacente atribuída a uma das etiologias mencionadas anteriormente e, posteriormente, causa extravasamento de urina para o corpo esponjoso. Após este evento inicia-se uma inflamação e alterações fibrosas do corpo esponjoso, que causam contração com compressão do lúmen uretral (Hampson et al., 2014). Ocorre uma metaplasia do epitélio colunar pseudoestratificado normal da uretra para o epitélio escamoso estratificado (Chambers & Baitera, 1977), que por ser mais frágil, é mais afetado pelas alterações na pressão, dividindo-se quando distendido durante a micção e causando fístulas ou úlceras na mucosa uretral, que leva a um extravasamento maior de urina para os tecidos fora do corpo esponjoso. Estes eventos mais complexos causam alterações fibrosas e estenose (Mundy & Andrich, 2011).

Esta doença, em boa parte dos casos, tem como tratamento preferencial a uretroplastia com retirada do tecido fibrosado (Cavalcanti et al., 2007). As uretroplastias bulbares estão associadas em 17 a 23% dos casos a disfunção ejaculatória e perda involuntária de urina no período pós-operatório (Fredrick et al., 2017).

Estudos prévios avaliaram a preservação do MB e de sua inervação durante a uretroplastia bulbar com o objetivo de melhorar a função ejaculatória. No entanto, eles não observaram um impacto significativo na função ejaculatória relatada pelos pacientes no período pós-operatório (Asopa et al., 2001; Barbagli et al., 2008; Erickson et al., 2010; Fredrick et al., 2017; Elkady et al., 2019).

2 OBJETIVOS

Analisar, qualitativa e quantitativamente, por meio de métodos histoquímicos e imunohistoquímicos, o músculo bulboesponjoso em pacientes com estenose de uretra bulbar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP/HUPE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro com CAAE: 89602318.4.0000.5259 (Apêndice e Anexo A) e realizado na Unidade de Pesquisa Urogenital, localizada no Departamento de Anatomia, Centro Biomédico da UERJ.

Foram estudados 21 pacientes submetidos a tratamento cirúrgico pelo mesmo cirurgião e acompanhados prospectivamente em nossa instituição entre julho de 2014 e julho de 2019. Estes pacientes foram divididos em dois grupos: Grupo Estenose - 14 pacientes (idade média=62,00 anos) com estenose de uretra bulbar ou bulbopeniana submetidos à uretroplastia aberta; Grupo Controle - 7 pacientes (idade média=60,14 anos) com estenose peniana (hipospádia multioperada, câncer de pênis e/ou infecção peniana) submetidos à uretrostomia perineal. Foram excluídos do nosso estudo os pacientes com trauma uretral, devido à possibilidade de impacto do trauma na estrutura/função do músculo, e aqueles que se recusaram a assinar o termo de consentimento.

3.2 Coleta das amostras e procedimentos histológicos

Fragmentos do MB foram obtidos a partir de biópsia, diretamente sobre a estenose bulbar, próximo à rafe mediana e antes do manuseio do tecido (Figura 17). Além disso, os dados sobre a etiologia e o comprimento da estenose foram coletados para posterior análises, a partir de uma planilha. O comprimento foi realizado a partir de uma uretrocistografia (Figura 18).

Após a coleta, as amostras foram fixadas em formalina tamponada a 4%, permanecendo no fixador por um período mínimo de 24 horas. As amostras foram submetidas a técnicas histológicas de rotina, desidratadas em álcool e clarificadas em xilol na processadora Leica TP 1020 (Solms, Alemanha), para posterior inclusão em parafina no aparelho Leica EG 1150 H (Solms, Alemanha). Após a inclusão, foram realizados cortes

histológicos de cada amostra com 5 µm de espessura no micrótomo Leica RM2125 RT (Solms, Alemanha). Os cortes foram corados pelas técnicas histoquímicas: Hematoxilina-Eosina, para verificar a integridade do tecido; tricrômico de Masson, para análise do tecido conjuntivo e das fibras musculares; Picrosirius red com polarização, para análise qualitativa do colágeno; e resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação, para análise das fibras do sistema elástico.





Fonte: A autora, 2022.

Figura 18 - Uretrocistografia mostrando a estenose de uretra peniana proximal



3.3 Imuno-histoquímica

Para as imunomarcações, foram realizados cortes histológicos com 5 µm de espessura no micrótomo Leica RM2125 RT (Solms, Alemanha), montados em lâminas silanizadas para a realização dos estudos imuno-histoquímicos.

As imunomarcações foram realizadas utilizando-se os anticorpos primários anti-CD31 na diluição 1:35 (Abcam, policional, Ref: ab28364, Cambridge, EUA) para análise dos vasos sanguíneos e anti-tubulina ßIII na diluição 1:50 (Abcam, monoclonal, Ref: ab78078, UK) para análise dos nervos. A recuperação antigênica foi realizada com tampão ácido etilenodiamino tetra-acético (TRIS-EDTA), pH 9,0, overnight por 12 horas a 60°C. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio (H2O2) 3% em metanol durante 15 minutos e incubados à temperatura ambiente com 10% de soro de cabra para bloqueio das reações inespecíficas (Histostain[®]-Plus Kit, Invitrogen, cat. no. 85-9643, Camarillo, CA, EUA). Os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-CD31 e anti-tubulina BIII, ambos diluídos em tampão fosfato salino/albumina sérica bovina (PBS/BSA 1%), por 1 hora a 37°C. Em seguida, foi feita a incubação com anticorpo secundário e a reação foi amplificada a partir do sistema biotinaestreptavidina (Invitrogen, cat. no. 85-9643, Camarillo, CA, EUA). As seções foram reveladas com 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloridro (DAB) (Invitrogen, cat. no. 85-9643, Camarillo, CA, EUA) e contra coradas com Hematoxilina de Harris. Simultaneamente, foi feito o controle negativo, onde o anticorpo primário foi substituído por PBS/BSA 1%.

3.4 Histomorfometria

As análises histomorfométricas foram realizadas utilizando-se fotomicrografias obtidas com resolução de 2040x1536 pixels, em um microscópio (Olympus BX51, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital (Olympus DP71, Tóquio, Japão). Para cada análise, as fotomicrografias foram capturadas e salvas sob as mesmas condições.

As análises morfométricas foram realizadas com os seguintes aumentos: 200x – para avaliação do diâmetro das fibras musculares; 400x – para avaliação dos vasos sanguíneos e nervos; 600x – para avaliação do tecido conjuntivo e das fibras do sistema elástico. As

mensurações foram realizadas com o *software* ImageJ[®] (versão 1.50i, *Image Processing and Analysis in Java*, NIH, Bethesda, Maryland, EUA).

3.4.1 Análise qualitativa

A análise qualitativa da organização do colágeno foi realizada em fotomicrografias dos cortes corados pela técnica histoquímica de Picrosirius red, observadas sob luz polarizada e capturadas com aumento de 100x para avaliar a predominância de cores.

Para análise do colágeno foram observados cinco campos aleatórios por seção, totalizando 35 campos analisados no Grupo Controle e 70 campos analisados no Grupo Estenose.

3.4.2 Análise quantitativa

3.4.2.1 Quantificação do diâmetro das fibras musculares do músculo bulboesponjoso

Para as análises quantitativas do diâmetro das fibras musculares foram utilizadas fotomicrografias dos cortes corados pelo tricrômico de Masson e capturadas com aumento de 200x. A medição do diâmetro da fibra foi realizada utilizando-se a ferramenta "*straight line*", no qual foram feitas duas medidas aleatórias e perpendiculares na fibra muscular após a calibração do *software*, de modo que estas se encontram próximas ao centro e, ao terminar cada marcação da distância desejada, foram selecionadas as opções *analyze* e *measure*. A janela *results* forneceu o valor referente ao diâmetro em µm. Após a mensuração, foi feita a média das medidas, no qual foi inserida em uma planilha para obter o diâmetro das fibras musculares (Figuras 19 e 20).

Para esta análise foram analisadas 15 fibras de dez campos aleatórios apenas nos cortes transversais do músculo. Assim, dois pacientes (um de cada grupo estudado) foram excluídos por apresentarem cortes longitudinais. Analisamos um total de 60 campos no Grupo Controle e 130 campos no Grupo Estenose.


Figura 19 - Mensurando o diâmetro da fibra muscular, software ImageJ

Legenda: A figura mostra o método utilizado para medir o diâmetro das fibras musculares (linha reta destacada pela cor amarela), a partir da ferramenta "*straight line*" indicada no círculo em vermelho.
Nota: Fotomicrografia do músculo bulboesponjoso de paciente do grupo controle; objetiva de 20x.
Fonte: A autora, 2022.

Figura 20 - Apresentação do resultado do diâmetro da fibra, software ImageJ



Legenda: Após traçar uma linha reta na fibra (cor amarela) e selecionar as opções *analyze* e *measure*, a janela *results* nos fornece o resultado da mensuração do diâmetro delimitado em μm (círculo verde, 62.393).
 Nota: Fotomicrografia do músculo bulboesponjoso de paciente do grupo controle; objetiva de 20x.
 Fonte: A autora, 2022.

3.4.2.2 Quantificação do tecido conjuntivo, fibras do sistema elástico, vasos sanguíneos e nervos

As análises quantitativas do tecido conjuntivo, fibras do sistema elástico, vasos sanguíneos e nervos foram realizadas a partir de densidade de área. Para essas quantificações, foi utilizado o método de contagem de pontos, no qual é sobreposta uma grade de 100 pontos às fotomicrografías usando os comandos *plugins*, *analyze* e *grid*, após a calibração do *software* e a mensuração da área da imagem (Figuras 21 e 22). As estruturas analisadas eram quantificadas quando passavam pelo quadrante superior direito das cruzes.

Para estas análises foi utilizado o *plugin cell counter* e a ferramenta "*point*", que possibilita quantificar mais de uma estrutura na mesma fotomicrografía. A quantidade de cada estrutura analisada é apresentada na janela *cell counter*, nos quais os valores encontrados são tabelados e feitas as médias de cada amostra para a análise estatística (Figuras 23-27).

Figura 21 – Utilizando os comandos *plugins*, *analyze* e *grid* para sobrepor a grade de 100 pontos, *software* ImageJ



Legenda: Após calibração e mensuração da área da imagem (círculo vermelho, 39737.034), selecionar as opções *plugins, analyze* e *grid.*

Nota: Fotomicrografia do músculo bulboesponjoso de paciente do grupo controle; objetiva de 60x.

Fonte: A autora, 2022.



Figura 22 - Sobreposição da grade de 100 pontos, software ImageJ

Legenda: Configuração da janela *grid* para sobrepor a grade de 100 pontos à fotomicrografia.
Nota: Fotomicrografia do músculo bulboesponjoso de paciente do grupo controle; objetiva de 60x.
Fonte: A autora, 2022.





Legenda: Configuração do *software* após a sobreposição da grade para abrir a janela *cell counter*.
Nota: Fotomicrografia do músculo bulboesponjoso de paciente do grupo controle; objetiva de 60x.
Fonte: A autora, 2022.

O tecido conjuntivo e as fibras do sistema elástico foram avaliadas a partir de fotomicrografias dos cortes corados pelas técnicas histoquímicas de tricrômico de Masson e resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação, respectivamente. Para ambas as análises, as fotomicrografias foram capturadas com aumento de 600x, sendo analisados cinco campos aleatórios por seção, totalizando 35 campos no Grupo Controle e 70 campos no Grupo Estenose (Figuras 24 e 25).

Para a análise dos vasos sanguíneos e dos nervos foram utilizadas fotomicrografias dos cortes corados por imuno-histoquímica, sendo as imunomarcações com anti-CD31 e anti-tubulina β III, respectivamente. Para ambas as análises, as fotomicrografias foram capturadas com aumento de 400x, sendo analisados cinco campos aleatórios por seção, totalizando 35 campos no grupo controle e 70 campos no grupo estenose (Figuras 26 e 27).

Figura 24 - Quantificação das fibras colágenas no músculo bulboesponjoso, software ImageJ



Legenda: Ferramenta "point" (círculo) e o resultado da densidade de área do colágeno na janela cell counter (retângulo).

Nota: Fotomicrografia do músculo bulboesponjoso de paciente do grupo controle; objetiva de 60x.

Fonte: A autora, 2022.





Legenda: Resultado da densidade de área das fibras do sistema elástico na janela *cell counter* (retângulo verde).
Nota: Fotomicrografia do músculo bulboesponjoso de paciente do grupo controle; objetiva de 60x.
Fonte: A autora, 2022.

Figura 26 - Quantificação dos vasos sanguíneos no músculo bulboesponjoso, software ImageJ



Legenda: Resultado da densidade de área dos vasos sanguíneos na janela *cell counter* (retângulo verde). Nota: Fotomicrografía do músculo bulboesponjoso de paciente com estenose de uretra bulbar; objetiva de 40x.

Fonte: A autora, 2022.



Figura 27 - Quantificação dos nervos no músculo, software ImageJ

Legenda: Resultado da densidade de área dos nervos na janela *cell counter* (retângulo verde).
 Nota: Fotomicrografia do músculo bulboesponjoso de paciente com estenose de uretra bulbar; objetiva de 40x.
 Fonte: A autora, 2022.

3.5 Análise estatística

Todos os dados das amostras foram testados para a curva de distribuição normal e homogeneidade de variância por meio do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. As médias foram comparadas estatisticamente usando o teste t de *Student* não pareado para os dados que apresentaram-se paramétricos e o teste de *Mann-Whitney* para os dados que apresentaram-se não paramétricos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, sendo considerado o valor de p<0,05 como estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o *software* GraphPad Prism 6 (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

A etiologia da estenose uretral bulbar foi idiopática em 2 casos (14,29%), pós-RTU em 6 (42,86%), pós-prostatectomia radical aberta em 5 (35,71%) e pós-prostatectomia aberta (cirurgia de Millin) em 1 caso (7,14%). O local de estenose foi bulbar em 13 casos (92,86%) e bulbopeniana em 1 caso (7,14%). O comprimento médio da estenose foi de 2,08 cm.

Os dados clínicos dos pacientes estudados estão apresentados na Tabela 1, juntamente com os resultados da quantificação realizada nos dois grupos.

4.1 Análise qualitativa do colágeno

A análise qualitativa dos cortes corados pelo Picrosirius red e observados sob luz polarizada mostrou uma predominância de coloração avermelhada nos dois grupos estudados, que caracterizam fibras espessas, com 280 nm de comprimento, 1,5 nm de espessura e diâmetro variável de 20 a 90 nm o que pode indicar uma concentração de colágeno do tipo I (Figura 28) (Junqueira & Carneiro, 2013c).

Figura 28 – Fotomicrografias da organização das fibras colágenas no músculo bulboesponjoso



Legenda: Fotomicrografías do corte longitudinal do músculo bulboesponjoso mostrando a organização das fibras colágenas e a predominância das fibras colágenas em vermelho nos grupos estudados, observadas sob luz polarizada.

Nota: Picrosirius red, 100x. As barras de escala representam $100 \,\mu m$.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes e parâmetros analisados no músculo bulboesponjoso de pacientes com estenose de uretra bulbar

	Idade	Causa	Tamanho da estenose (cm)	Diâmetro das fibras musculares (µm)	Fibras colágenas (%)	Fibras elásticas (%)	Vasos (%)	Nervos (%)
Grupo Contr	ole							
Controle 1	79	Câncer de pênis		33,80	7,20	4,80	6,60	0,00
Controle 2	80	Estenose de uretra peniana		47,40	12,40	3,60	4,20	7,40
Controle 3	41	Hipospádia multioperada		44,19	5,20	3,40	4,40	2,00
Controle 4	60	Estenose de uretra peniana		66,67	19,00	5,80	5,60	5,00
Controle 5	60	Infecção pós-priapismo		25,37	13,60	5,20	7,80	3,60
Controle 6	52	Estenose de uretra peniana		-	4,00	1,50	1,60	5,00
Controle 7	49	Hipospádia multioperada		32,80	13,00	2,50	5,60	6,40
Média (DP)	60,14 (14,76)			41,71 (14,63)	10,63 (5,37)	3,83 (1,54)	5,11 (1,98)	4,20 (2,56)
Grupo Esten	ose							
Estenose 1	70	Pós-prostatectomia	3,0	30,05	9,80	5,00	3,00	5,00
Estenose 2	71	Pós-RTU	1,0	41,19	7,40	2,60	3,20	9,00
Estenose 3	53	Idiopática	3,5	43,00	11,60	10,20	4,20	2,00

Estenose 4	77	Pós-prostatectomia	4,0	61,04	9,40	8,40	4,63	7,00
Estenose 5	62	Pós-RTU	1,5	34,73	20,00	9,67	3,98	8,40
Estenose 6	66	Pós-prostatectomia	4,0	38,65	5,00	3,60	2,40	4,40
Estenose 7	59	Pós-prostatectomia	BP - 3,0 Bulbar - 2,5	38,64	6,60	9,60	1,60	7,02
Estenose 8	29	Idiopática	1,5	43,35	6,20	2,75	2,60	2,60
Estenose 9	53	Pós-prostatectomia	1,0	41,53	9,20	2,60	5,20	7,20
Estenose 10	79	Pós-RTU	1,0	33,85	14,00	3,60	2,00	6,08
Estenose 11	33	Idiopática	2,0	51,19	10,20	6,40	3,40	3,67
Estenose 12	71	Pós-RTU	1,0	-	13,00	2,60	3,60	4,00
Estenose 13	66	Pós-prostatectomia	1,2	33,16	19,60	3,60	3,60	4,00
Estenose 14	79	Pós-RTU	1,0	31,06	9,60	5,40	6,60	5,40
Média (DP)	62,00 (15,60)		2,08 (1,15)	40,11 (8,59)	10,83 (4,55)	5,43 (2,90)	3,57 (1,32) *	5,41 (2,12)
Valor de p				0,7668	0,9296	0,2601	0,0460	0,2621

43

Legenda: Ressecção transuretral de próstata (RTU); bulbopeniana (BP); desvio padrão (DP).

Nota: A medida do diâmetro das fibras musculares foi realizada somente nos cortes transversais do músculo, sendo excluídos desta análise o Controle 6 e Estenose 12 por apresentarem cortes longitudinais. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças foram testadas com teste t de *Student* não pareado e teste de *Mann-Whitney*, p<0,05. O símbolo [*] indica diferença estatística.

Fonte: A autora, 2022.

4.2 Análise quantitativa

As análises quantitativas apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (Tabela 1, Figuras 29-33).

4.2.1 Diâmetro das fibras musculares

A análise quantitativa do diâmetro das fibras musculares do bulboesponjoso não apresentou diferença significativa entre o grupo controle (41,71±14,63 μ m) e o grupo estenose (40,11±8,59 μ m), p=0,7668 (Tabela 1, Figura 29).

Figura 29 – Fotomicrografias do corte transversal do músculo bulboesponjoso mostrando o diâmetro das fibras musculares



- Legenda: Fotomicrografias do diâmetro das fibras musculares do bulboesponjoso de pacientes com estenose de uretra bulbar em cortes transversais. (A) grupo controle; (B) grupo estenose; (C) gráfico do diâmetro das fibras musculares. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças foram testadas por teste t de *Student* não pareado, p<0,05.
- Nota: Tricrômico de Masson, 200x. As barras de escala representam 100 µm.
- Fonte: A autora, 2022.

A análise das fibras colágenas nos fragmentos de MB não apresentou diferença significativa entre o grupo controle $(10,63\pm5,37\%)$ e o grupo estenose $(10,83\pm4,55\%)$, p=0,9296 (Tabela 1, Figura 30).

Figura 30 – Fotomicrografias do corte longitudinal do músculo bulboesponjoso mostrando a distribuição das fibras colágenas



- Legenda: Fotomicrografias das fibras colágenas no músculo bulboesponjoso de pacientes com estenose de uretra bulbar em cortes longitudinais. (A) grupo controle; (B) grupo estenose; (C) gráfico da densidade de área das fibras colágenas. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças foram testadas por teste t de *Student* não pareado, p<0,05.
- Nota: Tricrômico de Masson, 600x. As barras de escala representam 25 µm.
- Fonte: A autora, 2022.

Quando analisadas as fibras do sistema elástico, não foi observada diferença significativa entre o grupo controle $(3,83\pm1,54\%)$ e o grupo estenose $(5,43\pm2,90\%)$, p=0,2601 (Tabela 1, Figura 31).

Figura 31 – Fotomicrografias do corte longitudinal do músculo bulboesponjoso mostrando a distribuição das fibras do sistema elástico



Legenda: Fotomicrografias das fibras do sistema elástico no músculo bulboesponjoso de pacientes com estenose de uretra bulbar em cortes longitudinais. (A) grupo controle; (B) grupo estenose; (C) gráfico da densidade de área das fibras do sistema elástico. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças foram testadas por teste de *Mann-Whitney*, p<0,05.

Nota: Resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação, 600x. As barras de escala representam 25 µm.

Fonte: A autora, 2022.

4.2.4 Vasos sanguíneos

A análise dos vasos sanguíneos apresentou diferença significativa entre o grupo controle $(5,11\pm1,98\%)$ e o grupo estenose $(3,57\pm1,32\%)$, p=0,0460 (Tabela 1, Figura 32).

Figura 32 – Fotomicrografias do músculo bulboesponjoso mostrando a imunomarcação de vasos sanguíneos



- Legenda: Fotomicrografias da imunomarcação de vasos sanguíneos no músculo bulboesponjoso de pacientes com estenose de uretra bulbar. (A) grupo controle, corte transversal; (B) grupo estenose, corte longitudinal; (C) gráfico da densidade de área dos vasos sanguíneos. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças foram testadas por teste t de *Student* não pareado, p<0,05.
 Nota: Imuno-histoquímica de anti-CD31, 400x. As barras de escala representam 50 µm.
- Fonte: A autora, 2022.

Com relação aos nervos, não foi observada diferença significativa entre o grupo controle ($4,20\pm2,56\%$) e o grupo estenose ($5,41\pm2,12\%$), p=0,2621 (Tabela 1, Figura 33).

Figura 33 – Fotomicrografias do corte longitudinal do músculo bulboesponjoso mostrando a imunomarcação de nervos



- Legenda: Fotomicrografias da imunomarcação de nervos no músculo bulboesponjoso de pacientes com estenose de uretra bulbar em cortes longitudinais. (A) grupo controle; (B) grupo estenose; (C) gráfico da densidade de área dos nervos. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças foram testadas por teste t de *Student* não pareado, p<0,05.
- Nota: Imuno-histoquímica de anti-tubulina βIII, 400x. As barras de escala representam 50 μm.
- Fonte: A autora, 2022.

5 DISCUSSÃO

A causa exata da disfunção ejaculatória e da perda involuntária de urina após a uretroplastia bulbar não é totalmente compreendida, mas várias teorias tem sido propostas para explicar esses problemas: a) lesão dos nervos perineais; b) lesão do MB; c) alteração da estrutura da uretra bulbar e do reflexo bulbouretral; d) formação de saculação após uretroplastia bulbar (enxerto de mucosa oral levando a uma saculação) e e) lesão dos vasos que suprem a uretra bulbar e o MB (Shafik & El-Sibai, 2000; Erickson et al., 2010; Fredrick et al., 2017; Kaluzny et al., 2018; Urkmez et al., 2019). Estudos anteriores com preservação do MB e dos nervos perineais durante a uretroplastia bulbar demonstraram que a técnica é uma alternativa segura, viável e minimamente invasiva, além de ter efeito mínimo na função ejaculatória do paciente (Barbagli et al., 2008; Erickson et al., 2010; Fredrick et al., 2017; Elkady et al., 2019).

Estudos sobre a estrutura do MB são raros na literatura e inexistentes em pacientes com estenose uretral. Este estudo é o primeiro a abordar esse tópico em pacientes submetidos à uretroplastia bulbar. Estudos anteriores avaliaram a histologia da estenose de uretra bulbar e concluíram que esta é caracterizada por alterações nas características da matriz extracelular (Baskin et al., 1993; Da-Silva et al., 2002; Cavalcanti et al., 2007; Prihadi et al., 2018).

O componente colágeno é um importante marcador da estenose uretral (Baskin et al., 1993; Da-Silva et al., 2002; Prihadi et al., 2018). Baskin (Baskin et al., 1993) avaliou, a partir de um estudo bioquímico, a presença do colágeno no tecido uretral normal e com estenose e sugeriu que a alteração no tecido com estenose não é causada pela quantidade de colágeno, mas pela proporção dos tipos de colágeno, podendo explicar o processo de fibrose e formação de cicatriz. De forma semelhante, Prihadi (Prihadi et al., 2018) avaliou a estenose uretral em um modelo experimental e observou que esta é causada pela decomposição do colágeno e por um desequilíbrio na degradação da matriz extracelular. Em nosso estudo, a análise quantitativa das fibras colágenas não mostrou diferença estatística entre os grupos controle e estenose de uretra submetidos à uretroplastia e observaram a presença de colágeno tipo I e colágeno tipo III no tecido com estenose (Da Silva et al., 2008). Em nosso estudo, a presença dos diferentes tipos de colágeno no MB não foi confirmada, uma vez que, na análise qualitativa do colágeno, foi observada predominância de cor vermelha nos dois grupos estudados, podendo sugerir uma prevalência de colágeno tipo I.

Não foram observadas alterações no sistema elástico nos dois grupos. Os processos de cicatrização tiveram como características menor quantidade de fibras elásticas e uma amplificação do colágeno tipo III, um colágeno recentemente encontrado e associado à retração muscular, o que não observamos em nossa amostra. O colágeno e as fibras elásticas são os componentes fibróticos da matriz extracelular e estão relacionados a alterações patológicas em diferentes tecidos. A diminuição da concentração de fibras elásticas é típica dos processos cicatriciais e as concentrações aumentadas de fibras elásticas estão relacionadas à maior distensibilidade tecidual (Da-Silva et al., 2002; Cavalcanti et al., 2007). Como não foram observadas alterações significativas na distribuição do sistema elástico nos dois grupos estudados, a estenose uretral parece não causar mudanças significativas na elasticidade da matriz extracelular do MB em pacientes com estenose de uretra bulbar.

Não há relatos na literatura que descrevam aspectos dos nervos, vasos sanguíneos e diâmetro das fibras musculares no MB e no tecido com estenose. O processo de ejaculação tem duas fases, a fase de emissão e ejeção. O MB é a estrutura mais importante envolvida na fase de ejeção (Puppo & Puppo, 2016). Essa função ocorre por contrações rítmicas involuntárias do MB para expelir o sêmen. A porção motora do nervo perineal inerva o MB. Essa inervação e reflexo parassimpático da medula espinal tem papel fundamental na manutenção do tônus muscular (Yang & Bradley, 2000). Em nosso estudo não foram observadas alterações significativas na estrutura do MB e no diâmetro e inervação das fibras musculares. A presença de nervos no MB em pacientes com estenose de uretra foi muito semelhante à encontrada nos pacientes do grupo controle.

Nossos resultados mostraram diferença significativa entre os dois grupos estudados na análise dos vasos sanguíneos, apresentando menor densidade vascular no Grupo Estenose quando comparado ao Grupo Controle. Os vasos sanguíneos são importantes porque fornecem um suprimento sanguíneo abundante ao MB, permitindo o seu funcionamento adequado. A diminuição da concentração dos vasos no MB de pacientes submetidos à uretroplastia bulbar, o único parâmetro alterado neste estudo, pode ser explicada pela manipulação do MB ocorrida durante o procedimento cirúrgico e pela espongiofibrose, que pode levar a uma alteração na função da contração muscular. Isso poderia explicar a incidência de alterações ejaculatórias mesmo após a cirurgia, onde o músculo foi preservado. O MB está localizado fora do corpo esponjoso, que é separado do músculo em condições normais por um plano de tecido conjuntivo muito bem definido, sendo evidente durante a cirurgia (Shafik & El-Sibai, 2000; Puppo & Puppo, 2016). A estenose uretral afeta fundamentalmente o interior do corpo espalhe para fora e comprometa o músculo. Portanto, a alteração morfológica encontrada no músculo dependerá do grau de espongiofibrose de cada caso particular. No entanto, futuros estudos prospectivos serão necessários para confirmar esses achados.

Além da alteração nos vasos que suprem o MB durante a uretroplastia bulbar, a alteração do reflexo bulbouretral e da estrutura da uretra bulbar também poderia explicar a disfunção ejaculatória e perda involuntária de urina, mesmo com a preservação dos nervos e músculos. A compreensão a esse respeito poderia ser fornecida por estudos multicêntricos com desenho randomizado prospectivo, comparando a preservação do MB e dos nervos em pacientes com estenose de uretra bulbar com e sem transecção. Talvez a abordagem cirúrgica da uretra bulbar, evitando a dissecção do MB do corpo esponjoso e deixando intacto o tendão central do períneo, possa estar associada à melhora da função ejaculatória, preservando os nervos, músculos e estrutura da uretra bulbar.

O presente estudo tem algumas limitações importantes: o estudo foi restrito à análise morfológica; o pequeno tamanho da amostra submetida ao tratamento cirúrgico; etiologias heterogêneas em ambos os grupos de pacientes; falta de correlação com a função préoperatória e falta de um estudo (ressonância magnética ou ultrassonografia) sobre o grau/gravidade da espongiofibrose na uretra bulbar.

CONCLUSÃO

As análises histológicas mostraram uma diminuição significativa da quantidade de vasos no músculo bulboesponjoso na estenose de uretra bulbar, sem alterações nas fibras do sistema elástico, colágeno, nervos e diâmetro das fibras musculares. Esses achados mostram mínimas alterações na estrutura do músculo bulboesponjoso e as alterações ligadas a espongiofibrose não se relacionam com as alterações da musculatura bulbouretral.

REFERÊNCIAS

Altemus AR, Hutchins GM. Development of the human anterior urethra. J Urol. 1991;146(4):1085-93.

Alwaal A, Blaschko SD, McAninch JW, Breyer BN. Epidemiology of urethral strictures. Transl Androl Urol. 2014;3(2):209-13.

Andrich DE, Mundy AR. What is the best technique for urethroplasty?. Eur Urol. 2008;54(5):1031-41.

Asopa HS, Garg M, Singhal GG, Singh L, Asopa J, Nischal A. Dorsal free graft urethroplasty for urethral stricture by ventral sagittal urethrotomy approach. Urology. 2001;58(5):657-9.

Barbagli G, De Stefani S, Annino F, De Carne C, Bianchi G. Muscle- and nerve-sparing bulbar urethroplasty: a new technique. Eur Urol. 2008;54(2):335-43.

Baskin LS, Constantinescu SC, Howard PS, McAninch JW, Ewalt DH, Duckett JW, et al. Biochemical characterization and quantitation of the collagenous components of urethral stricture tissue. J Urol. 1993;150(2 Pt 2):642-7.

Cavalcanti AG, Costa WS, Baskin LS, McAninch JA, Sampaio FJ. A morphometric analysis of bulbar urethral strictures. BJU Int. 2007;100(2):397-402.

Chambers RM, Baitera B. The anatomy of the urethral stricture. Br J Urol. 1977;49(6):545-51.

Chung BI, Sommer G, Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In: Wein AJ, editor-in-chief; Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. Campbell-Walsh Urology. 10 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2012. p. 33-70.

Da-Silva EA, Sampaio FJ, Dornas MC, Damiao R, Cardoso LE. Extracellular matrix changes in urethral stricture disease. J Urol. 2002;168(2):805-7.

Da Silva EA, Schiavini JL, Santos JB, Damião R. Histological characterization of the urethral edges in patients who underwent bulbar anastomotic urethroplasty. J Urol. 2008;180(5):2042-6.

del Pozo-Jiménez G, Jara Rascón J, Aragón Chamizo J, Blaha I, Hernández Fernández C, Lledó García E. Anatomía y vascularización de la uretra masculina [Anatomy and vascularization of the male urethra]. Arch Esp Urol. 2014;67(1):5-11.

Drake RL, Vogl AW, Mitchell AWM. Pelvis and Perineum. In: Drake RL, Vogl AW, Mitchell AWM, editors. Gray's Anatomy for Students. 3 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2014. p. 421-532.

Elkady E, Dawod T, Teleb M, Shabana W. Bulbospongiosus muscle sparing urethroplasty versus standard urethroplasty: a comparative study. Urology. 2019;126:217-21.

Erickson BA, Granieri MA, Meeks JJ, McVary KT, Gonzalez CM. Prospective analysis of ejaculatory function after anterior urethral reconstruction. J Urol. 2010;184(1):238-42.

Favorito LA, Sampaio FJB. Morfologia aplicada do pênis. In: Favorito LA, Sampaio FJB, editors. Morfologia urogenital aplicada à urologia pediátrica. 1 ed. Rio de Janeiro; 2014. p. 143-53.

Fenton AS, Morey AF, Aviles R, Garcia CR. Anterior urethral strictures: etiology and characteristics. Urology. 2005;65(6):1055-8.

Fredrick A, Erickson BA, Stensland K, Vanni AJ. Functional effects of bulbospongiosus muscle sparing on ejaculatory function and post-void dribbling after bulbar urethroplasty. J Urol. 2017;197(3 Pt 1):738-43.

Hampson LA, McAninch JW, Breyer BN. Male urethral strictures and their management. Nat Rev Urol. 2014;11(1):43-50.

Hsieh C-H, Hsieh J-T, Chang S-J, Chiang I-N, Yang SS-D. Penile venous surgery for treating erectile dysfunction: Past, present, and future perspectives with regard to new insights in venous anatomy. Urological Science. 2015;27(2):60-5.

Hsu G-L, Liu S-P. Penis Structure. In: Skinner MK, editor-in-chef. Encyclopedia of Reproduction. 2 ed. United States: Academic Press; 2018. p. 357-66.

Jordan GH, McCammon KA. Surgery of the Penis and Urethra. In: Wein AJ, editor-in-chief; Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. Campbell-Walsh Urology. 10 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2012. p. 956-1000.

Joseph DB, Vezina CM. Male Reproductive Tract: Development Overview. In: Skinner MK, editor-in-chief. Encyclopedia of Reproduction. 2 ed. United States: Academic Press; 2018. p. 248-55.

Junqueira LC, Carneiro J. Tecido Muscular. In: Junqueira LC, Carneiro J, editors. Histologia Básica. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013a. p. 177-98.

Junqueira LC, Carneiro J. Aparelho Urinário. In: Junqueira LC, Carneiro J, editors. Histologia Básica. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013b. p. 367-84.

Junqueira LC, Carneiro J. Tecido Conjuntivo. In: Junqueira LC, Carneiro J, editors. Histologia Básica. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013c. p. 89-118.

Kaluzny A, Gibas A, Matuszewski M. Ejaculatory disorders in men with urethral stricture and impact of urethroplasty on the ejaculatory function: a systematic review. J Sex Med. 2018;15(7):974-81.

Kavoussi PK. Surgical, Radiographic, and Endoscopic Anatomy of the Male Reproductive System. In: Wein AJ, editor-in-chief; Kavoussi LR, Partin AW, Peters CA, editors. Campbell-Walsh Urology. 11 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2016. p. 498-515.e2. Krishnan A, de Souza A, Konijeti R, Baskin LS. The anatomy and embryology of posterior urethral valves. J Urol. 2006;175(4):1214-20.

Lee YJ, Kim SW. Current management of urethral stricture. Korean J Urol. 2013;54(9):561-9.

Levin TL, Han B, Little BP. Congenital anomalies of the male urethra. Pediatr Radiol. 2007;37(9):851-945.

Lumen N, Hoebeke P, Willemsen P, De Troyer B, Pieters R, Oosterlinck W. Etiology of urethral stricture disease in the 21st century. J Urol. 2009;182(3):983-87.

Mehić B. Translational research in medicine. Bosn J Basic Med Sci. 2011;11(2):73.

Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Pelvis and Perineum. In: Moore KL, Dalley AF, Agur AMR, editors. Moore Clinically Oriented Anatomy. 8 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2018. p. 1293-529.

Moore KL, Persaud TVN. O Sistema Muscular. In: Moore KL, Persaud TVN, editors. Embriologia Clínica. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008a. p. 363-9.

Moore KL, Persaud TVN. Formação das Camadas Germinativas e Início da Diferenciação dos Tecidos e Órgãos: Terceira Semana. In: Moore KL, Persaud TVN, editors. Embriologia Clínica. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008b. p. 55-72.

Moore KL, Persaud TVN. O Sistema Urogenital. In: Moore KL, Persaud TVN, editors. Embriologia Clínica. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008d. p. 245-87.

Mundy AR, Andrich DE. Urethral strictures. BJU Int. 2011;107(1):6-26.

Palminteri E, Berdondini E, Verze P, De Nunzio C, Vitarelli A, Carmignani L. Contemporary urethral stricture characteristics in the developed world. Urology. 2013;81(1):191-6.

Prihadi JC, Sugandi S, Siregar NC, Soejono G, Harahap A. Imbalance in extracellular matrix degradation in urethral stricture. Res Rep Urol. 2018;10:227-32.

Puppo V, Puppo G. Comprehensive review of the anatomy and physiology of male ejaculation: premature ejaculation is not a disease. Clin Anat. 2016;29(1):111-9.

Ricke WA, Timms BG, vom Saal FS. Prostate Structure. In: Skinner MK, editor-in-chef. Encyclopedia of Reproduction. 2 ed. United States: Academic Press; 2018. p. 315-24.

Sadler TW. Muscular System. In: Sadler TW, editor. Langman's Medical Embryology. 14 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019a. p. 160-6.

Sadler TW. Third to Eighth Weeks: The Embryonic Period. In: Sadler TW, editor. Langman's Medical Embryology. 14 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019b. p. 72-95.

Sadler TW. Urogenital System. In: Sadler TW, editor. Langman's Medical Embryology. 14 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019c. p. 256-83.

Shafik A, El-Sibai O. Mechanism of ejection during ejaculation: identification of a urethrocavernosus reflex. Arch Androl. 2000;44(1):77-83.

Stoddard N, Leslie SW. Histology, Male Urethra. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.

Tritschler S, Roosen A, Füllhase C, Stief CG, Rübben H. Urethral stricture: etiology, investigation and treatments. Dtsch Arztebl Int. 2013;110(13):220-6.

Urkmez A, Yuksel OH, Ozsoy E, Topaktas R, Sahin A, Koca O, et al. The effect of urethroplasty surgery on erectile and orgasmic functions: a prospective study. Int Braz J Urol. 2019;45(1):118-26.

Yang CC, Bradley WE. Reflex innervation of the bulbocavernosus muscle. BJU Int. 2000;85(7):857-63.

Yao Q, Lyu PH, Ma FC, Yao L, Zhang SJ. Global informetric perspective studies on translational medical research. BMC Med Inform Decis Mak. 2013;13:77.

Yoshimura N, Chancellor MB. Physiology and Pharmacology of the Bladder and Urethra. In: Wein AJ, editor-in-chief; Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. Campbell-Walsh Urology. 10 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2012. p. 1786-833.

APÊNDICE – Termo de consentimento informado

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

O Sr. será submetido a uma cirurgia para o tratamento de estenose uretral que é uma patologia cirúrgica. Normalmente, durante a cirurgia, retira-se um fragmento que depois é desprezado ou enviado para o serviço de Anatomia Patológica, para inclusão em estudos de rotina e arquivamento.

Fazemos parte de uma equipe de pesquisa científica e estamos realizando estudos sobre os problemas decorrentes de patologias urológicas. Gostaríamos de solicitar ao Sr. que tenha a gentileza de nos autorizar a estudar um fragmento do material doente que será extraído durante a cirurgia a qual o Sr. será submetido.

Esta extração será feita durante a cirurgia e não implicará em aumento do tempo de cirurgia nem alterará os resultados operatórios.

Será respeitado o segredo médico e sua identidade não será revelada.

O grupo de médicos e professores que estão fazendo parte deste trabalho estão à sua disposição no Serviço de Urologia deste hospital e na Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Departamento de Anatomia do Hospital Universitário Pedro Ernesto, Av. 28 de Setembro, número 77, fundos. Telefone 2868-8527. Sendo o pesquisador responsável Edilaine Farias Alves, Telefone 982356027.

Os dados e resultados finais serão utilizados somente para esta pesquisa.

Caso o senhor não queira participar do estudo, isto não afetará o seu tratamento.

Eu, _____

portador da identidade ______, declaro estar ciente do que foi exposto acima e autorizo a utilização, para fins científicos, da peça que será extraída durante a cirurgia a qual serei submetido.

(nome completo)

Paciente:

Testemunha:

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do músculo bulboesponjoso na estenose de uretra Pesquisador: Edilaine Farias Alves Área Temática: Versão: 1 CAAE: 89602318.4.0000.5259 Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.770.641

Apresentação do Projeto:

O músculo bulboesponjoso tem como pontos de fixação o centro tendíneo do períneo e a rafe mediana na face ventral do bulbo do pênis. Sua

função é auxiliar no esvaziamento da urina e do sêmen, promovendo a contração do bulbo do pênis e do corpo esponjoso. A estenose uretral é o

estreitamento de um segmento da uretra que pode resultar em diminuição ou interrupção completa do fluxo urinário, levando a uma série de efeitos

prejudiciais. Em geral, a estenose uretral é causada pelo depósito de tecido fibroso, o que acarreta problemas na micção com consequências

potencialmente graves para todo o trato urinário. Este trabalho tem como objetivo caracterizar quantitativamente o músculo bulboesponjoso após a

estenose de uretra. Serão analisadas 25 amostras do músculo bulboesponjoso divididas nos seguintes grupos: grupo controle (n=10) e grupo

estenose (n=15), obtidas de indivíduos com idade entre 40 e 85 anos submetidos a cirurgias urológicas. Após processamento das amostras e

preparação dos cortes histológicos, serão realizadas técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas específicas para identificação e análise dos

componentes que constituem o músculo bulboesponjoso.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo							
Bairro: Vi	la Isabel		CEP:	20.551-030			
UF: RJ	Município:	RIO DE JANEIRO					
Telefone:	(21)2868-8253			E-mail:	cep.hupe.interno@gmail.com		



UERJ - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO



Continuação do Parecer: 2.770.641

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar, a partir de uma análise qualitativa e quantitativa, o músculo bulboesponjoso após a estenose de uretra.

Objetivo Secundário:

- Analisar qualitativamente o componente colágeno no músculo bulboesponjoso; - Analisar e quantificar, por meio de estudos histoquímicos, o

diâmetro das fibras musculares no músculo bulboesponjoso; - Analisar e quantificar, por meio de estudos histoquímicos e imuno-histoquímicos, o

tecido conjuntivo no músculo bulboesponjoso; - Analisar e quantificar, por meio de estudos histoquímicos e imuno-histoquímicos, as fibras do

sistema elástico no músculo bulboesponjoso; - Analisar e quantificar, por meio de estudos imunohistoquímicos, os vasos sanguíneos e nervos no

músculo bulboesponjoso.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Resolução 466/2012, homologada pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Ministério da Saúde, considera-se que toda e qualquer pesquisa que envolva seres humanos na dimensão da saúde, envolva riscos aos participantes. Nossa pesquisa enquadra-se no que a literatura considera de riscos mínimos, pois não executará nenhum tipo de intervenção medicamentosa, invasiva ou manipulativa, nem nenhum tipo de modificação intencional nas variáveis fisiológicas ou psicológicas aos indivíduos que participam do estudo. Em nosso caso aplicaremos entrevista semiestruturada em que o participante poderá negar-se a responder qualquer pergunta em que não se sinta à vontade para responder. Contudo, não se extinguirá a possibilidade de danos à dimensão psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer fase de uma pesquisa e dela recorrente. Nesse caso, o pesquisador se submeterá a legislação civil dos pais, no que verse sobre assunto, incluso aos ressarcimentos de qualquer natureza, quando previsto na lei.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão analisadas 25 amostras do músculo bulboesponjoso divididas nos seguintes grupos: grupo controle (n=10) e grupo estenose (n=15), obtidas

de indivíduos com idade entre 40 e 85 anos submetidos a cirurgias urológicas. Após processamento das amostras e preparação dos cortes

histológicos, serão realizadas técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas específicas para

 Endereço:
 Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

 Bairro:
 Vila Isabel
 CEP: 20.551-030

 UF:
 RJ
 Município:
 RIO DE JANEIRO

 Telefone:
 (21)2868-8253
 E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.770.641

identificação e análise dos componentes que constituem o músculo bulboesponjoso

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todas dados necessários para apreciação ética.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	09/05/2018		Aceito
do Projeto	ROJETO_1071074.pdf	11:20:54		
TCLE / Termos de	Termo_de_consentimento_informado_Pr	09/05/2018	Edilaine Farias Alves	Aceito
Assentimento /	oj_Bulbo.pdf	11:18:17		
Justificativa de				
Ausência				
Outros	Declaracao_de_ciencia_Proj_Bulbo_assi	09/05/2018	Edilaine Farias Alves	Aceito
	nada.pdf	11:18:05		
Projeto Detalhado /	Projeto_Plataforma_Brasil_Proj_Bulbo.p	09/05/2018	Edilaine Farias Alves	Aceito
Brochura	df	11:16:48		
Investigador				
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Proj_Bulbo_assinada.p	09/05/2018	Edilaine Farias Alves	Aceito
	df	11:16:32		

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Situação do Parecer:

Aprovado

Forma



Continuação do Parecer: 2.770.641

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 13 de Julho de 2018

Assinado por: WILLE OIGMAN (Coordenador)

 Endereço:
 Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

 Bairro:
 Vila Isabel

 CEP:
 20.551-030

 UF:
 RJ

 Município:
 RIO DE JANEIRO

 Telefone:
 (21)2868-8253

 E-mail:
 cep.hupe.interno@gmail.com

Reconstructive Urology

Structural Analysis of the Bulbospongiosus Muscle in Patients With Bulbar Urethral Strictures



Edilaine F. Alves, Carla M. Gallo, Waldemar S. Costa, Francisco J. Sampaio, and Luciano A. Favorito

OBJECTIVE	To characterize the bulbospongiosus muscle (BSM) in patients with bulbar urethral strictures.						
MATERIALS AND	We studied 21 patients divided into 2 groups: Stricture Group ($n = 14$; mean age = 62.00 years) with						
METHODS	bulbar stricture submitted to open urethroplasty; and Control Group ($n = 7$; mean age = 60.14 years)						
	with penile strictures (hypospadias cripples, penile cancer and/or penile infection) who were submit-						
	ted to perineal urethrostomy. Samples of the BSM were dissected and histologic sections were						
	stained by histochemical and immunohistochemical techniques. Histomorphometric analyzes were						
	performed on photomicrographs. Means were statistically compared using the unpaired Student						
	<i>t</i> test and the Mann-Whitney test ($P < .05$).						
RESULTS	The etiology of bulbar urethral stricture was idiopathic in 2 cases (14.29%), post-TURP in 6						
	(42.86%), post open radical prostatectomy in 5 (35.71%) and post open prostatectomy in 1 case						
	(7.14%). The average length of the stricture was 2.08 cm. The only parameter analyzed with sig-						
	nificant difference between the groups was the vessels (significant difference between the con-						
	trol group: 5.11 \pm 1.98% and stricture group: 3.57 \pm 1.32%, P = .0460). The quantitative						
	analysis of collagen (Control Group: 10.63 \pm 5.37% and Stricture Group: 10.83 \pm 4.55%,						
	P = .9296); diameter of BSM muscle fibers (Control Group: 41.71 ± 14.63 μ m and Stricture						
	Group: 40.11 \pm 8.59 μ m, P = .76 and elastic system fibers (Control Group; 3.83 \pm 1.54% and						
	Stricture Group: $5.43 \pm 2.90\%$, P = .2601) showed no significant difference.						
CONCLUSIONS	Histologic analysis showed a significant decrease of the BSM vessels in urethral stricture, without						
	changes in elastic fibers, collagen, nerves, and muscle fiber diameter. These findings show that the						
	bulbar urethral stricture causes minimal alterations in the structure of the BSM. UROLOGY						
	137: 183–189, 2020. © 2020 Elsevier Inc.						

The bulbospongiosus muscle (BSM), also known as the bulbocavernosus muscle, is a paired striated muscle originating from the perineal body and fixed in a median raphe involving the bulbar urethra.^{1,2} The BSM is involved with the expulsion of seminal fluid and urine, especially the last drop, from the bulbar urethra by rhythmic contractions, acting as a pump to evacuate the contents of the bulbar urethra.³

Urethral stricture may involve any segment of the urethra and is a relatively common and multifactorial disease with prevalence of 0.6%.⁴ Approximately 80% of urethral strictures occur in the anterior urethra.^{5,6} Bulbar

© 2020 Elsevier Inc.

All rights reserved.

urethroplasty is associated in 17%-23% of the cases with ejaculatory dysfunction and post voiding dribbling in the postoperative period.⁷

Previous studies have evaluated the preservation of the BSM and its innervation during bulbar urethroplasty, aiming to improve the ejaculatory function. However, they have not observed a significant impact on patients' reported ejaculatory function in the postoperative period.⁸⁻¹⁰

To our knowledge, there are no reports about the structure of the BSM in patients submitted to urethroplasty. Our hypothesis was that the spongiofibrosis associated with bulbar urethral stricture could compromise the structure of the BSM. The objective of this paper is to characterize, by quantitative methods applied to histologic sections, the BSM muscle in patients with bulbar urethral strictures.

MATERIAL AND METHODS

This study was carried out in accordance with the ethical standards of the hospital's institutional committee on human experimentation (IRB: 2.770.641, CAAE: 89602318.4.0000.5259).

Disclosures: No Disclosures.

Funding: This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – Brazil) (Grant number: 301522/2017-0) and the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ) (Grant number: E-26/202.873/2017).

From the Universidade do Estado do, Rio de Janeiro, Faculdade de Ciencias Medicas, Rio de janeiro, Brazil; and the State University Rio de janeiro, Rio de janeiro, Brazil Address correspondence to: Luciano Alves Favorito, M.D., Ph.D., Rua Professo

Gabizo, State University Rio de janerio, 104/201, Tijuca, Rio de Janeiro CEP: 20271-320, Brazil. E-mail: lufavorito@Vahoo.com.br

Submitted: October 31, 2019, accepted (with revisions): November 25, 2019

We studied 21 patients who underwent surgical treatment by the same surgeon and were followed-up prospectively in our institution from July 2014 to July 2019. We formed 2 groups: Stricture Group—14 Patients (mean age = 62.00 years old) with bulbar or bulbopenile urethral stricture submitted to open urethroplasty; and Control Group—7 patients (mean age = 60.14 years old) with penile strictures (hypospadias cripples, penile cancer and/or penile infection) who were submitted to perineal urethrostomy. Patients with urethral trauma (because the possibility of the trauma impact in the muscle structure/function) and those that refused to sign the consent form were excluded from the study.

A small sample of the bulboespongiosus muscle was obtained directly over the bulbar stricture, near median raphe prior to tissue handling. The fragments of the BSM were fixed in 4% buffered formalin and routinely processed for paraffin embedding, after which 5 μ m thick sections were obtained at 200 μ m intervals. Muscle fibers, connective tissue, elastic system fibers, collagen, blood vessels, and nerves were studied by histochemical and immunohistochemical methods.

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 muscle tissue; Weigert's resorcin-fuchsin with previous oxidation to observe elastic system fibers; and Picrosirius red with polarization for observation of different collagen types. The immunohistochemical analysis of blood vessels was done with anti-CD31 (dilution 1:35, CD31, Abcam, Rabbit Polyclonal Antibody, ref: ab28364) and the immunohistochemical analysis of nerves was done with antitubulin (dilution 1:50, Tubulin, beta III, Abcam, Mouse Monoclonal Antibody, ref: ab78078).

Connective tissue, muscle tissue, elastic system fibers, vessels and nerves were quantified by a stereological method.¹¹⁻¹³ We used the ImageJ software, version 1.50i, loaded with its own plug-in (http://www.imagej.nih.gov/ij). All sections were photographed with a digital camera (DP71, Olympus America, Inc., Melville, NY) under the same conditions at a resolution of 2.040 × 1.536 pixels, directly coupled to the microscope (BX51, Olympus America, Inc.) and stored in a TIFF file.

The qualitative analysis of different collagen types was performed with photomicrographs obtained under polarized light to evaluate the color predominance (\times 100). To quantify the vessels and nerves (\times 400), connective tissue and elastic fibers (\times 600), we used the ImageJ software to determine the volumetric density (Vv) of each component. Results for each field were expressed as a percentage through the quantification assessment method, by superposing a 100-point test grid (multipurpose test system) on the magnified images on the video monitor screen (Fig. 1A).¹¹⁻¹³ The arithmetic mean of the quantification in 5 fields of each section was determined. Afterward, we obtained the mean quantification value for the sections studied from muscle samples. For these analyses, we studied 5 microscopic fields chosen at random, totaling 35 test areas in the Control Group and 70 test areas in the Stricture Group.

For measure the diameter of the muscle fibers ($\times 200$), we used the straight-line tool of ImageJ and analyzed 15 fibers of from 10 microscopic fields chosen at random only of the muscle cross sections. Thus, 2 patients (1 from each group studied) were excluded because they had longitudinal sections. We analyzed totaling 60 test areas in the Control Group and 130 test areas in the Stricture Group (Fig.1B).

Statistical Analyses

Means were statistically compared using the unpaired Student t test for parametric data and Mann-Whitney test for



Figure 1. Morphometric analysis of the bulbospongiosus muscle using the ImageJ software. (A) Quantification using the test grid: Photomicrograph showing the quantification used for collagen and elastic fibers, vessels and nerves, Control Group, Masson's trichrome, $\times 600$. (B) Quantification using the straight-line tool: Photomicrograph showing the quantification used for diameter of the muscle fibers, Control Group, Masson's trichrome, $\times 200$. (Color version available online.)

nonparametric data. All tests were 2-sided, and the results were expressed as mean \pm standard deviation, with a *P* value <.05 being considered statistically significant. All analyses were performed using the GraphPad Prism 6 software.

RESULTS

The etiology of bulbar urethral stricture was idiopathic in 2 cases (14.29%), post-TURP in 6 (42.86%), post open radical prostatectomy in 5 (35.71%) and post open prostatectomy (Millin surgery) in 1 case (7.14%). The site of stricture was bulbar in 13 cases (92.86%) and bulbopenile in 1 case (7.14%). The average length of the stricture was 2.08 cm. The clinical data of the patients studied are shown in Table 1, along with the results of the quantification performed in the 2 groups.

When we qualitatively analyzed the collagen, we observed a predominance of red color in both groups, which may indicate a concentration of type I collagen (Fig. 2A). The quantitative analysis of collagen in BSM showed no significant difference between the Control Group (10.63 \pm 5.37%) and the Stricture Group (10.83 \pm 4.55%), *P* = .9296 (Fig. 2B).

Table 1. The table shows the patients clinical data

			Stricture	Diameter of the		Elastic System		
	Age	Cause	Length (cm)	Muscle Fibers (μ m)	Collagen Fibers (%)	fibers (%)	Blood Vessels (%)	Nerves (%)
Control Group								
Control 1	79	Penile cancer		33.80	7.20	4.80	6.60	0.00
Control 2	80	Penile urethral		47.40	12.40	3.60	4.20	7.40
		stricture						
Control 3	41	Hypospadia cripple		44.19	5.20	3.40	4.40	2.00
Control 4	60	Penile urethral		66.67	19.00	5.80	5.60	5.00
		stricture						
Control 5	60	Postpriapism		25.37	13.60	5.20	7.80	3.60
		infection						
Control 6	52	Penile urethral		-	4.00	1.50	1.60	5.00
		stricture						
Control 7	49	Hypospadia cripple		32.80	13.00	2.50	5.60	6.40
Mean (SD)	60.14 (14.76)			41.71 (14.63)	10.63 (5.37)	3.83 (1.54)	5.11 (1.98)	4.20 (2.56)
Stricture Grou	p							
Stricture 1	70	Postprostatectomy	3.0	30.05	9.80	5.00	3.00	5.00
Stricture 2	71	Post-TURP	1.0	41.19	7.40	2.60	3.20	9.00
Stricture 3	53	Idiopathic	3.5	43.00	11.60	10.20	4.20	2.00
Stricture 4	77	Postprostatectomy	4.0	61.04	9.40	8.40	4.63	7.00
Stricture 5	62	Post-TURP	1.5	34.73	20.00	9.67	3.98	8.40
Stricture 6	66	Postprostatectomy	4.0	38.65	5.00	3.60	2.40	4.40
Stricture 7	59	Postprostatectomy	BP-3.0	38.64	6.60	9.60	1.60	7.02
			Bulbar—2.5					
Stricture 8	29	Idiopathic	1.5	43.35	6.20	2.75	2.60	2.60
Stricture 9	53	Postprostatectomy	1.0	41.53	9.20	2.60	5.20	7.20
Stricture 10	79	Post-TURP	1.0	33.85	14.00	3.60	2.00	6.08
Stricture 11	33	Idiopathic	2.0	51.19	10.20	6.40	3.40	3.67
Stricture 12	71	Post-TURP	1.0	-	13.00	2.60	3.60	4.00
Stricture 13	66	Post-TVP	1.2	33.16	19.60	3.60	3.60	4.00
Stricture 14	79	Post-TURP	1.0	31.06	9.60	5.40	6.60	5.40
Mean (SD)	62.00 (15.60)		2.08 (1.15)	40.11 (8.59)	10.83 (4.55)	5.43 (2.90)	3.57 (1.32)*	5.41 (2.12)

BP, bulbopenile; SD, standard deviation; TURP, transurethral resection of the prostate; TVP, transvesical prostatectomy. The measure of the diameter of the muscle fibers was performed only in muscle cross sections. The control 6 patient and stricture 12 patient had longitudinal sections, therefore they were excluded. Data are compared with unpaired *t* test and Mann-Whitney test, *P* <.05. The symbol "*" indicates statistical difference.

64



Figure 2. Photomicrographs and graphs of the bulbospongiosus muscle (BSM). (A) Collagen fibers, Qualitative analysis: The predominance of red collagen fibers can be observed in both control and stricture group, which may indicate a concentration of type I collagen, Picrosirius red under polarized light, $\times 100$. (B) Collagen fibers, Quantitative analysis: The BSM collagen quantitative analysis showed no significant difference between the groups, Masson's trichrome, $\times 600$. (C) Diameter of the muscle fibers: The diameter of the BSM muscle fibers did not present significant difference between the groups, Masson's trichrome, $\times 600$. (C) Diameter of the muscle fibers.

The quantitative analysis of elastic system fibers in BSM samples showed no difference between the Control Group (3.83 \pm 1.54%) and Stricture Group (5.43 \pm 2.90%), *P* = .2601 (Fig. 2D).

The quantitative analysis of vessels showed a significant difference between the Control Group ($5.11 \pm 1.98\%$) and Stricture Group ($3.57 \pm 1.32\%$), *P* = .04 (Fig. 2E).

The quantitative analysis of nerves showed no difference between the Control Group ($4.20 \pm 2.56\%$) and Stricture Group ($5.41 \pm 2.12\%$), *P* = .26 (Fig. 2F).

DISCUSSION

The exact cause of ejaculatory dysfunction and post voiding dribbling after bulbar urethroplasty is not totally understood, but several theories have been proposed to explain these problems: (1) injury of the perineal nerves; (2) injury of the BSM; (3) alteration of the structure of the bulbar urethra and the bulbourethral reflex; (4) sacculation formation after bulbar urethroplasty (buccal mucosa graft support leading a sacculation), and (5) injury of the vessels that supply the bulbar urethra and BSM.^{1,7,9,14,15} Previous studies with preservation of the BSM and perineal nerves during bulbar urethroplasty have shown that the technique is a safe, viable, and minimally invasive alternative with minimal effect on the patient's ejaculatory function.⁸⁻¹⁰

Studies of the structure of BSM are rare in the literature and nonexistent in patients with urethral stricture. This paper is the first to address this topic in patients submitted to bulbar urethroplasty. Previous studies have evaluated the histology of bulbar urethral stricture and concluded that it is characterized by changes in extracellular matrix characteristics.¹⁶⁻¹⁸

The collagen component is an important marker of urethral stricture.^{17,19} Baskin¹⁸ evaluated, in a biochemical study, the presence of collagen in normal and stenosed urethral tissue and suggested that the change in tissue with stricture is caused not by the amount of collagen, but by the proportion of collagen types, and this may explain the process of fibrosis and scar formation. Prihadi¹⁹ similarly evaluated urethral stricture in an experimental model and observed that it is caused by collagen decomposition and an imbalance in extracellular matrix degradation. In our study, quantitative analysis of collagen fibers showed no statistical difference between the control and stricture groups. A previous study evaluated the distribution of collagen in the tissue of patients with urethral stricture who underwent urethroplasty and observed the presence

of both type I collagen and type III collagen in the stenosed tissue.²⁰ In our study, the presence of different collagen types in the BSM was not confirmed, since in the qualitative analysis of collagen, predominance of red color was observed in both groups, which may indicate prevalence of type I collagen.

We observed no changes in the elastic system in both groups. The healing processes had as characteristics fewer elastic fibers and an amplification of the collagen type III, a recently found collagen that is associated with muscular retraction, which we did not observe in our sample. Collagen and elastic fibers are the fibrotic components of the extracellular matrix and are related to pathologic changes in different tissues. Decreased concentration of elastic fibers is typical of healing processes and increased concentrations of elastic fibers are related to greater tissue distensibility.¹⁷ Since no significant changes in elastic system distribution were observed in the 2 groups studied, ure-thral stricture does not seem to cause significant changes in extracellular matrix elasticity of BSM in patients with bulbar urethral stricture.

There are no reports in the literature describing aspects of the nerves, blood vessels, and muscle fiber diameter in BSM and stenosed tissue. The ejaculation process has 2 phases, the emission and ejection phase.³ The BSM is the most important structure involved in the ejection phase.³ This function occurs by involuntary rhythmic contractions of the BSM to expel the semen. The motor portion of perineal nerve supplies the BSM. This innervation and spinal parasympathetic reflex have a critical role in the maintenance of muscle tone.² In our study, no significant changes were observed in BSM structure and muscle fiber diameter and innervation. The presence of nerves in the BSM in patients with urethral stricture was very similar to that found in patients in the control group.

Our results showed significant difference between the 2 groups studied when analyzing the blood vessels, presenting lower vascular density in the stricture group when compared to the control group. Blood vessels are important because they provide an abundant blood supply to the BSM allowing its proper function. The decrease in vessel concentration in BSM patients undergoing bulbar urethroplasty, the only parameter altered in this study, can be explained the manipulation of BSM that occurred during the surgical procedure and by the spongiofibrosis, which could lead to a change in muscle contraction function. This could explain the incidence of ejaculatory changes even after surgery where the muscle was preserved. The BSM is located outside the corpus spongiosum, which is separated from the muscle under normal conditions by a very well-defined connective tissue plane

trichrome, $\times 200$. (D) Elastic system fibers: The quantitative analysis of the fibers of the elastic system in BSM samples showed no difference between the groups, Weigert's resorcin-fuchsin, $\times 600$. (E) Blood vessels: The quantitative analysis of the BSM vessels showed a significant decrease of vessels in the stricture group, immunohistochemistry with anti-CD31, $\times 400$; (F) Nerves: The quantitative analysis of the BSM nerves showed no difference between the groups, immunohistochemistry with anti- β III-tubulin, $\times 400$. (Color version available online.)

which is evident during surgery.^{1,3} Urethral stricture fundamentally affects the inside of the corpus spongiosum and only in advanced degree of spongiofibrosis is it possible for the process to spread outside and can compromise the muscle. Therefore, morphologic alteration find in the muscle will depend on the degree of spongiofibrosis of each particular case. However, future prospective studies will be necessary to confirm these findings.

In addition to the alteration in the vessels that supply the BSM during bulbar urethroplasty, the alteration of the urethral bulb reflex and the structure of the bulbar urethra could also explain ejaculatory and post-op dribbling dysfunction even with the preservation of nerves and muscles. Insight in this respect could be provided by multicenter studies with prospective randomized design, comparing preservation of the BSM and the nerves in patients with bulbar urethral stricture with and without transection. Perhaps surgical approach to the bulbar urethra avoiding dissection of the BSM from the corpus spongiosum and leaving the central tendon of the perineum intact could be associated with improvement of ejaculatory function by preserving the nerves, muscles, and structure of the bulbar urethra.

This paper has some important limitations: The study was restricted to morphologic analysis; the small sample size submitted to surgical treatment; heterogeneous etiologies in both patient groups; lack of correlation with preoperative function and the lack of a study (MRI or Ultrassonography) about the spongiofibrosis degree/severity in bulbar urethra.

CONCLUSION

Histologic analysis showed a significant decrease of the quantity BSM vessels in urethral stricture, without changes in elastic fibers, collagen, nerves and muscle fiber diameter. These findings show that the bulbar urethral stricture causes minimal alterations in the structure of the BSM during surgical approach.

Acknowledgment. The authors thank Isabella Mendes Procópio and Aline Costa de Souza for assistance with histochemical and immunohistochemical stains.

References

- Shafik A, El-Sibai O. Mechanism of ejection during ejaculation: identification of a urethrocavernosus reflex. Arch Androl. 2000;44:77–83.
- Yang CC, Bradley WE. Reflex innervation of the bulbocavernosus muscle. BJU Int. 2000;85:857–863.
- Puppo V, Puppo G. Comprehensive review of the anatomy and physiology of male ejaculation: premature ejaculation is not a disease. Clin Anat. 2016;29:111–119.
- Alwaal A, Blaschko SD, McAninch JW, et al. Epidemiology of urethral strictures. Transl Androl Urol. 2014;3:209–213.
- Lee YJ, Kim SW. Current management of urethral stricture. Korean J Urol. 2013;54:561–569.
- Palminteri E, Berdondini E, Verze P, et al. Contemporary urethral stricture characteristics in the developed world. Urology. 2013;81: 191–196.

- Fredrick A, Erickson BA, Stensland K, et al. Functional effects of bulbospongiosus muscle sparing on ejaculatory function and postvoid dribbling after bulbar urethroplasty. J Urol. 2017;197:738–743.
- Barbagli G, De Stefani S, Annino F, et al. Muscle- and nerve-sparing bulbar urethroplasty: a new technique. *Eur Urol.* 2008;54:335–343.
- Erickson BA, Granieri MA, Meeks JJ, et al. Prospective analysis of ejaculatory function after anterior urethral reconstruction. J Urol. 2010;184:238–242.
- Elkady E, Dawod T, Teleb M, et al. Bulbospongiosus muscle sparing urethroplasty versus standard urethroplasty: a comparative study. Urology. 2019;126:217–221.
- Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. Am J Physiol. 1990;258:L148–L156.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. APMIS. 1988;96:379–394.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. An Acad Bras Cienc. 2003;75:469–486.
- Kaluzny A, Gibas A, Matuszewski M. Ejaculatory disorders in men with urethral stricture and impact of urethroplasty on the ejaculatory function: a systematic review. J Sex Med. 2018;15:974–981.
- Urkmez A, Yuksel OH, Ozsoy E, et al. The effect of urethroplasty surgery on erectile and orgasmic functions: a prospective study. Int Braz J Urol. 2019;45:118–126.
- Cavalcanti AG, Costa WS, Baskin LS, et al. A morphometric analysis of bulbar urethral strictures. BJU Int. 2007;100:397–402.
- 17. Da Silva EA, Sampaio FJ, Dornas MC, et al. Extracellular matrix changes in urethral stricture disease. J Urol. 2002;168:805–807.
- Baskin LS, Constantinescu SC, Howard PS, et al. Biochemical characterization and quantitation of the collagenous components of urethral stricture tissue. J Urol. 1993;150:642–647.
- Prihadi JC, Sugandi S, Siregar NC, et al. Imbalance in extracellular matrix degradation in urethral stricture. *Res Rep Urol.* 2018;10:227–232.
- Da Silva EA, Schiavini JL, Santos JB, et al. Histological characterization of the urethral edges in patients who underwent bulbar anastomotic urethroplasty. J Urol. 2008;180:2042–2046.



Check for updates

The role and function of the bulbo sprongiosum muscle (BSM) has been the object of very little research. Due to its location wrapping the bulb of the corpus spongiosum (CS), it has been associated with the mechanism of seminal fluid expulsion during ejaculation and of urethral milking of urine at the end of micturition. However, there are no specific studies to document these hypotheses.

In this report, a morphometric histologic study was performed to characterize the BSM in patients operated by bulbar urethral strictures. The hypothesis of these investigators was that the spongiofibrosis associated with bulbar urethral stricture could compromise the structure of the BSM. For this end, a sample of BSM was obtained from over the site of the stricture and the characteristics of the muscle fibers and connective tissue were evaluated. The content of elastic and collagen fibers, blood vessels, and nerves was quantified and the findings compared with a control group of patients without bulbar stricture. The only difference found was a significant reduction in the amount of blood vessels in the study group.

This finding is very difficult to interpret due to obvious anatomic reasons, because the BSM is located outside the CS and urethral stricture is a process occurring fundamentally inside the CS. Since the BSM is anatomically separated from the spongiosum, it is only in bulbar strictures with advanced degrees of periurethral spongiofibrosis extending away from the tunica of the CS that the BSM may be expected to become compromised. Therefore, the degree of morphologic alteration possible to find in the muscle would most probably depend on the degree of spongiofibrosis of each particular case. Unfortunately, data on the severity of spongiofibrosis were not given, preventing elaborating on the background hypothesis of the study.

Moreover, the morphometric analysis was performed using a digital quantification method that does not allow identification of the different types of blood vessels, such as arterioles, venules, or capillaries, which may be significant additional information. The authors speculate that the decrease in vessel concentration found can be explained by the manipulation of BSM that occurred during the surgical procedure. However, a decrease in vasculature may be more a chronic than an acute phenomenon, therefore this finding remains unexplained.

Despite these limitations, the study is valuable and interesting because there is no previous research of this type and it opens the door for well-designed future studies. Understanding the physiology of the BSM would be of prime interest for the study and treatment of ejaculatory disorders, in addition to its relationship with urethral stricture disease. Challenges to overcome in this endeavor include the lack of a method to measure and evaluate the dynamic function of the BSM and of an objective way to quantify spongiofibrosis.

Reynaldo G. Gomez, Universidad Andres Bello, Hospital del Trabajador, Santiago, Chile

https://doi.org/10.1016/j.urology.2019.11.047 UROLOGY 137: 188–189, 2020. © 2020 Elsevier Inc.

AUTHOR REPLY



In the present paper we reported the finding of bulbospongiosus muscle (BSM) histology in patients with bulbar urethral strictures. The histologic assessment of the blood vessels, the neural integrity and the BSM itself were analyzed. There were 2 groups of patients where tissue for analysis was harvested. The experimental group (the stricture group) with bulbar urethral stricture undergoing urethroplasty and the control group which were patients undergoing perineal urethrostomy such as hypospadias cripples, penile cancer, or infections. The results showed only a change in blood vessel density. The blood vessels density is the only parameter that showed a significant difference favoring the control group. The report represented the first of its kind in the literature and we believe that the finding of this paper is of great interest to reconstructive urologists. We appreciate and agree with several points of the editorial comment.

The degree of morphologic alteration possible to find in the BSM will depend on the degree of spongiofibrosis of each particular case and this specific aspect was not analyzed or commented in the study group. Data on the severity of spongiofibrosis were not given to be able to correlate with possible alterations of the BSM. We agree with the editorial comment: this is an important limitation of the present paper. Future studies about the spongiofibrosis degree in patients with bulbar urethral stricture with MRI and/or Ultrassonography will be the next step to clarify the hypothesis that the spongiofibrosis is the cause of BSM impairment in patients with bulbar urethral stricture.

The morphometric analysis of blood vessels in this paper was done with immunohistochemical analysis with anti-CD31 (dilution 1:35, CD31, Abcam, Rabbit Polyclonal Antibody, ref: ab28364) a very precise method to show the vessels. In our opinion the identification of the different types of blood vessels is not so significant because the most important information is that the BSM vessels are affected by the bulbar urethral stricture (probably because the spongiofibrosis).

Luciano A. Favorito, Urogenital Research Unit, State University Rio de Janeiro; Rio de Janeiro, Brazil

https://doi.org/10.1016/j.urology.2019.11.048 UROLOGY 137: 189, 2020. © 2020 Elsevier Inc.

ANEXO C – Artigo International Brazilian Journal of Urology doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2020.0055

ORIGINAL ARTICLE

Vol. 47 (2): 308-321, March - April, 2021 doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2020.0055



Anatomic study of verumontanum during endoscopic surgeries in patients with benign prostatic hyperplasia

Henrique Barbosa de Menezes ^{1, 2}, Francisco José Barcellos Sampaio ¹, José Anacleto Dutra de Resende Júnior ², Rodrigo Ribeiro Vieiralves ¹, Fernando Salles da Silva Filho ², Edilaine Alves ¹, Luciano Alves Favorito ¹

¹ Unidade de Pesquisa Urogenital, Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ² Setor de Urologia, Hospital Federal de Lagoa, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

ABSTRACT

Introduction and objective: To evaluate changes in verumontanum anatomy in patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) who used 5-alpha reductase inhibitors (5-ARIs) and to propose an anatomical classification of the verumontanum.

Materials and Methods: We studied 86 patients with BPH and 7 patients without the disease (age under 40 years-old who underwent kidney or ureteral lithotripsy). Of the patients with BPH, 34 (mean age=67.26) had 5-ARIs use and 52 (mean age=62.69) did not use the drug. During surgeries, photographs of the seminal colliculus were taken and later, with the aid of software (Image J), the length (longitudinal diameter) and width (transverse diameter) of the verumontanum were measured in all patients. During the procedure, we evaluated the different types of verumontanum. For statistical analysis, the R-Project software was used. Results: In the group of patients with BPH who were taking medication (group 1), the mean measures of length and width of the verumontanum were 4.69mm and 2.94mm respectively. In the group of patients with BPH who did not use the drug (group 2), the mean diameters were 4.54mm and 3.20mm respectively. In the control group (group 3), the average length and width were 5.63mm and 4.11mm respectively. There was an increase in longitudinal and transverse measurements of the control group with an increase in body mass index (BMI) (p=0.0001 and p=0.035 respectively). In addition, there was a reduction in transverse diameter in the group of BPH using 5-ARI with increased prostate volume (p=0.010). We found five different verumontanum types: "volcano" (51.61%), "lighthouse" (24.73%), "whale tail" (12.90%), "hood" (5.38%) and "castle door" (5.38%), which we propose as an anatomical classification.

Conclusion: Veromontanum has smaller measurements in patients with BPH regardless of treatment. In the control group, there was an increase in verumontanum diameters with an increase in BMI. The volcano type of verumontanum was the most frequent regardless of groups and BMI.

ARTICLE INFO

D José Anacleto Dutra Júnior https://orcid.org/0000-0001-7396-4351

Keywords:

Prostatic Hyperplasia; Lower Urinary Tract Symptoms; 5-alpha Reductase Inhibitors

Int Braz J Urol. 2020; 47: 308-21

Submitted for publication: January 20, 2020

Accepted after revision: March 09, 2020

Published as Ahead of Print: October 10, 2020

INTRODUCTION

The verumontanum (seminal colliculus) is a bulge distal to the urethral crest that presents the tional importance due to the presence of ejaculatory ducts, fundamental structures for semen elimination. Thus, this structure plays an important role in reproduction (2). It can be affected by problems such as cysts or polyps, which lead to symptoms of emptying, dysuria, hematuria, infertility, hemospermia, prostatitis and urinary tract infection (3).

Although there are anatomical classifications of the prostate (McNeal and Randall) (4, 5) and classification of the prostate utricle (6), so far no classification of the seminal colliculus has been created.

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is one of the most common diseases in men, with progressive incidence according to age. BPH leads to lower urinary tract symptoms (LUTS) due to intra-bladder obstruction (7). Among the medications used to treat BPH, 5-alpha-reductase inhibitors (5-ARIs) are prominent because they are able to alter the natural history of the disease by decreasing prostate volume (8). There are two FDA-authorized 5-ARIs drugs: finasteride and dutasteride. Finasteride acts by inhibiting type 2 enzyme, while dutasteride inhibits types 1 and 2. However, this class of drugs has side effects such as ejaculatory disorders and reduced semen volume (8-10).

Previous studies analyzing the anatomy of the verumontanum in BPH and in patients with normal prostates are scarce in the literature. We hypothesized that the verumontanum anatomy could be altered in patients with BPH due to the use of 5-alpha-reductase inhibitors, which could justify side effects such as ejaculatory disorders. Although, that is not the purpose of our work.

The aim of this paper is to create an anatomical endoscopic classification for verumontanum and to assess changes in verumontanum anatomy in patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) using 5-alpha-reductase inhibitors, such as: assess whether the 5-ARIs alter the size or anatomy of the verumontanum, assess whether BPH increase the size or change the anatomy of the verumontanum, compare the size of the verumontanum with age, the body mass index (BMI) and the prostate weight.

MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol described here was approved by the committee for ethical 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 (opinion number 3.233.220).

This is an anatomical, observational, analytical, prospective and non-randomized study, carried out at the Federal Hospital of Lagoa, started in March 2018 and completed in October 2019. We studied 86 patients with BPH (age 41 to 85 years, mean=64.5 years) and 7 patients without BPH, who formed the control group (age 29 to 38 years, mean=32.71 years). Of the patients with BPH, 34 used 5-ARIs (16 used finasteride and 18 used dutasteride, wich composed the Group 1) and 52 did not use this class of drugs (Group 2). The average age of group 1 was 67 years and the average age of group 2 was 62 years. All the patients in the study were evaluated by the same professional, who applied the same questionnaire. Data were collected such as age, height, weight, body mass index, prostate weight, alpha-blocker use, 5-alpha--reductase inhibitor use, presence of systemic arterial hypertension and diabetes mellitus, and delayed bladder catheter (DBC) use.

Inclusion criteria: Patients with BPH who underwent transurethral resection (TUR) of the prostate or bladder and patients younger than 40 years without BPH who underwent an endoscopic procedure to treat urolithiasis composed the control group (because the literature shows that at this age occurs a significant increase in the prevalence of BPH, as well as in lower urinary tract symptoms associated with BPH) (7).

Exclusion criteria: All patients with any other prostate pathology (prostate cancer, prostatitis, prostatic cyst, etc.), patients with BPH who used finasteride or dutasteride for less than 6 months (because the literature shows that at this moment the drugs start to have the best effect) (11), as well as patients undergoing any minimally invasive surgical treatment of the prostate. In our study, all patients who used 5-ARIs were also using alpha-blockers.

In order to standardize the performance of TURs so that the technique used in the introduction of the resectoscope was always the same, all patients were operated by the same surgeon. The resectoscope used was Olympus[®] 26 French (Fr) - continuous flow. The electrodes used were "loop" type. The generator used was the Olympus[®] bipolar plasma. During transurethral resection surgery, photographs of the veru-
montanum were taken (40cm distance between the camera and the monitor screen) and the images were analyzed using Image J version 1.46r, with its plug--in (http://rsb.info.nih.gov/ij/). The longitudinal and transverse diameters of the seminal colliculus were measured using the distance between the two ends of the resectoscopic loop, which was determined prior to surgery individually as a measurement parameter. The distance of the resection loop and the optics was standardized (1cm). In the case of patients in the control group, the measurement was made using the diameter of a ureteral catheter (previously known measure) as a parameter for verumontanum diameter measurement (Figure-1). All verumontanums were initially photographed without the resection loop and without the ureteral catheter in the visual field so that they could be evaluated to standardize a classification of their anatomy.

After completing the verumontanum measurements, comparisons were made between the following groups: patients with BPH who used 5-alpha--reductase inhibitors (group 1), patients with BPH who did not use 5-alpha-reductase inhibitors (group 2), and patients under 40 years of age, without BPH, undergoing the endoscopic procedure to treat urolithiasis (group 3, control). In addition, comparisons of verumontanum size with age, BMI and prostate weight were performed. After the analysis of all verumontanums, we proposed a new classification for the organ's morphology.

Statistical analysis was performed using the R-Project software, version 3.5.3. The Kruskal--Wallis test and Dunn's post-test were used to verify if there was a statistically significant difference between the means of the variables. The Mann-Whitney mean comparison test was used to evaluate the prostate size variables present in groups 1 and 2. Simple linear correlations were calculated to compare verumontanum measurements with variables in the three groups. We considered p-values <0.05 as statistically significant.

RESULTS

Figure 1 - The figure shows the measurement of verumontanum diameters of groups 1, 2 and 3. A) Standardization of recurrent distance in groups 1 and 2 (distance between the two ends of the resection loop). B) Measurement of the longitudinal diameter of the verumontanum of groups 1 and 2. C) Standardization of the recognized distance of group 3 (ureteral catheter diameter). D) Verification of the longitudinal diameter of the verumontanum.



Data and variables of patients with BPH										
Pt.	Age	LDV	TDV	Verum. Type	Prostate Weight	5 ARI	OBES./BMI (kg/m²)	SAH	DM	DBC
1	55	2.75mm	2.20mm	WT	60g	Yes	Yes/31.37	No	No	No
2	66	3.19mm	3.3mm	V	75g	Yes	No/24.91	No	No	Yes
3	52	2.81mm	3.39mm	WT	54g	Yes	No/27.3	Yes	Yes	No
4	72	3.71mm	3.5mm	CD	55g	Yes	No/24.0	No	No	Yes
5	68	7.11mm	2.2 mm	Н	46g	Yes	Yes/38.4	Yes	Yes	No
6	64	6.6mm	3.12mm	WT	47g	Yes	No/23.8	Yes	Yes	Yes
7	66	2.91mm	2.26mm	V	54g	Yes	No/29.72	No	No	Yes
8	68	5.18mm	3.23mm	Н	63g	Yes	Yes/34.15	Yes	No	Yes
9	63	2.88mm	2.04mm	CD	65g	Yes	No/22.59	Yes	Yes	No
10	58	4.56mm	3.88mm	CD	40g	Yes	No/26.81	Yes	No	No
11	79	6.31mm	4.2mm	V	57g	Yes	No/29.29	Yes	No	No
12	68	3.92mm	4.0mm	V	50g	No	No/22.94	No	No	No
13	77	4.92mm	3.0 mm	V	140g	No	No/26.9	Yes	No	No
14	72	8.31mm	2.51mm	L	40g	No	No/20.06	No	No	No
15	66	4.37mm	4.40mm	WT	32g	Yes	No/23.99	No	No	No
16	68	6.91mm	3.24mm	Н	63g	Yes	No/25.0	Yes	No	Yes
17	56	6.17mm	3.95mm	L	65g	Yes	No/29.4	Yes	No	No
18	78	5.36mm	2.11mm	WT	66g	Yes	No/23.6	Yes	No	Yes
19	63	4.51mm	2.90mm	V	40g	No	No/25.0	No	No	Yes
20	68	5.29mm	2.43mm	V	51g	No	No/25.9	No	No	Yes
21	60	5.33mm	3.75mm	V	41g	No	No/22.7	No	No	Yes
22	52	7.28mm	2.32mm	L	70g	Yes	No/25.0	Yes	No	Yes
23	68	7.29mm	3.15mm	WT	53g	Yes	No/17.5	Yes	No	Yes

Table 1 - All data and variables of all patients.

24	69	3.79mm	2.75mm	V	40g	No	Yes/34.11	Yes	Yes	No
25	68	4.70mm	4.17mm	V	66g	No	No/24.9	No	No	Yes
26	60	3.31mm	3.07mm	V	31g	No	No/28.5	Yes	No	No
27	67	4.5mm	3.06mm	V	69g	No	No/23.14	No	No	Yes
28	62	4.15mm	3.81mm	V	67g	Yes	No/22.9	Yes	Yes	No
29	78	3.57mm	1.24mm	Н	100g	Yes	No/25.8	Yes	No	No
30	62	2.17mm	2.4mm	V	84g	Yes	No/19.0	Yes	Yes	No
31	65	4.03mm	1.7mm	L	67g	Yes	No/24.9	No	No	Yes
32	64	6.31mm	4.14mm	L	20g	No	No/27.0	No	No	No
33	72	5.87mm	3.14mm	L	52g	No	No/28.6	No	Yes	No
34	67	2.24mm	2.35mm	V	33g	No	Yes/31.0	No	No	No
35	72	5.91mm	4.97mm	CD	44g	No	Yes/45.6	Yes	No	No
36	74	2.6mm	2.4mm	WT	30g	No	No/23.0	Yes	Yes	No
37	81	3.19mm	2.46mm	WT	86g	Yes	No/23.0	Yes	No	No
38	71	4.59mm	1.96m	L	59g	Yes	Yes/32.0	Yes	No	No
39	74	5.59mm	2.62mm	L	48g	No	No/28.0	Yes	No	No
40	59	4.77m	3.19mm	V	47g	Yes	No/22.8	No	No	No
41	70	10mm	6.61mm	V	33g	No	No/24.4	Yes	No	No
42	68	4.74mm	3.75mm	V	41g	Yes	No/26.0	No	No	No
43	71	4.81mm	2.99mm	V	37g	Yes	No/26.0	No	No	Yes
44	79	5.34mm	2.77mm	L	55g	Yes	No/24.0	No	Yes	No
45	60	5.65mm	3.92mm	V	20g	Yes	Yes/34.6	Yes	No	No
46	70	2.57mm	2.51mm	WT	42g	Yes	No/21.5	Yes	No	Yes
47	58	7.93mm	6.82mm	V	20g	No	No/24.9	Yes	No	No
48	82	4.93mm	3.25mm	L	40g	No	No/24.9	Yes	No	No
49	60	4.49mm	3.94mm	V	63g	No	Yes/31.4	Yes	Yes	No

IBJU I VEROMONTANUM ENDOSCOPIC ANATOMY

50	77	3.59mm	2.16mm	V	36g	Yes	No/28.0	Yes	Yes	Yes
51	44	3.1mm	2.85mm	CD	25g	No	No/25.53	No	No	No
52	69	4.47 mm	2.48mm	L	56g	Yes	No/27.68	Yes	No	Yes
53	70	4.92 mm	2.30mm	L	25g	No	No/27.15	Yes	No	No
54	80	3.85mm	2.13mm	V	158g	Yes	No/22.03	Yes	No	No
55	48	3.06mm	2.67mm	V	27g	No	No/28.3	Yes	No	No
56	74	4.32 mm	3.29mm	V	24g	No	No/26.98	Yes	No	No
57	57	4.58mm	3.15mm	V	35g	No	No/26.49	No	No	No
58	56	4.42mm	1.59mm	L	35g	No	Yes/32.11	Yes	No	No
59	70	4.22mm	2.37mm	L	51g	No	Yes/32.0	Yes	No	No
60	46	2.22mm	2.35mm	V	29g	No	No/23.87	Yes	No	No
61	49	4.92mm	4.53mm	V	27g	No	No/27.76	No	No	No
62	41	4.49 mm	3.23mm	V	30g	No	No/20.76	No	No	No
63	58	2.45mm	2.66mm	V	19g	No	No/26.34	No	No	No
64	56	2.36mm	5.09mm	V	35g	No	No/22.34	No	No	No
65	83	4.25mm	3.13mm	V	75g	No	No/23.62	No	No	Yes
66	76	8.0mm	1.76mm	Н	30g	No	No/24.7	Yes	No	No
67	61	3.80mm	1.48mm	L	30g	No	No/22.34	No	No	No
68	63	5.34mm	4.21mm	V	31g	No	No/27.71	No	No	No
69	50	4.94mm	3.36mm	V	28g	No	No/29.58	Yes	Yes	No
70	42	3.17mm	3.84mm	V	30g	No	Yes/34.33	Yes	Yes	No
71	52	3.65 mm	2.56mm	V	50g	No	No/25.30	Yes	No	No
72	68	3.03 mm	3.06mm	V	65g	No	Yes/31.37	Yes	No	No
73	72	2.22mm	1.74mm	V	42g	No	No/27.16	Yes	Yes	No
74	49	4.03 mm	2.54mm	L	38g	No	No/29.41	No	No	No

IBJU | VEROMONTANUM ENDOSCOPIC ANATOMY

IBJU I VEROMONTANUM ENDOSCOPIC ANATOMY

75	47	4.37 mm	4.42mm	WT	39g	No	No/28.32	Yes	No	No
76	77	2.68mm	2.64mm	V	24g	No	No/22.72	No	No	No
77	85	4.45mm	4.33mm	V	40g	Yes	No/26.36	No	No	No
78	44	4.28 mm	2.25mm	L	27g	No	No/27.68	No	No	No
79	61	2.42mm	2.08mm	V	75g	No	No/24.77	Yes	Yes	No
80	51	8.08mm	3.73mm	L	75g	Yes	No/24.38	No	No	No
81	76	3.75mm	2.65mm	V	54g	No	Yes/31.57	Yes	Yes	No
82	68	4.38mm	3.31mm	WT	38g	No	No/22.86	No	No	No
83	53	11.26mm	5.6mm	L	30g	No	No/29.2	No	No	No
84	46	3.87mm	2.87mm	L	30g	No	No/25.0	Yes	No	No
85	66	2.85mm	1.64mm	L	35g	No	No/29.32	Yes	Yes	No
86	72	4.41mm	3.46mm	V	40g	No	No/24.0	Yes	Yes	No

Data and variables of patients without BPH (control group)

Pt.	Age	LDV	TDV	Verum. Type	OBES./BMI (kg/m ²)	SAH	DM	DBC
1	29	16.6mm	10 mm	L	Yes/34.0	No	No	No
2	37	3.14mm	2.0mm	V	No/25.9	No	No	No
3	38	2.77mm	2.12mm	V	No/25.39	No	No	No
4	34	2.79mm	1.74mm	V	No/25.9	No	No	No
5	29	4.58mm	2.81mm	WT	No/25.6	No	No	No
6	30	5.28mm	7.65mm	V	No/26.06	No	No	No
7	32	4.26mm	2.46mm	L	No/26.77	No	No	No

Pt = Patient; LDV = Longitudinal diameter of the verumontanum; TDV = transverse diameter of the verumontanum; 5 ARI = 5-alpha-reductase inhibitor; OBES./BMI = Obesity/ Body Mass Index; SAH = systemic arterial hypertension; DM = Diabetes Mellitus; DBC = delayed bladder catheter; mm = millimeter; g = gram; V = volcano; WT = Whale Tail; L = Lighthouse; H = Hood; CD = Castle Door.

Note: Prostate volume was not included in the control group because in this age group there is no routine investigation of benign prostatic hyperplasia.

All variables studied are presented in Table-1. The mean, standard deviation and median of BMI, prostate weight and verumontanum measurements are shown in Table-2.

In the control group, there was an increase in longitudinal (R^2 =0.9791; p=0.0013) and transverse (R^2 =0.9777; p=0.0014) measurements of the verumontanum with rising body mass index (BMI), with statistical significance. However, in the comparison according to age, verumontanum diameters decreased (longitudinal diameter (R^2 =0.3403; p=0.1692) and transverse diameter (R^2 =0.4221; p=0.1142) as age increased (Figure-2).

In BPH patients who used 5-alpha-reductase inhibitors (group 1), when comparison of the verumontanum measurements and BMI revealed na increase in longitudinal diameter (R^2 =0.0285; p=0.3397) and a slight increase in transverse diameter (R^2 =0.0005; p=0.8986) with an increase in BMI. In this group there was a reduction in longitudinal (R^2 =0.0238; p=0.3833) and transverse (R^2 =0.0325; p=0.3080) diameters with increasing age. In the comparson with prostate weight, there was a reduction in longitudinal (R^2 =0.0237; p=0.3852) and transverse (R^2 =0.1864; p=0.0108) diameters as the prostate weight increased, but only the transverse diameter was statistically significant (Figure-3).

In the control group, there was an increase in longitudinal ($R^2=0.9791$; p=0.0013) and transverse ($R^2=0.9777$; p=0.0014) measurements of the verumontanum with rising body mass index (BMI), with statistical significance. However, in the comparison according to age, verumontanum diameters decreased (longitudinal diameter (R^2 =0.3403; p=0.1692) and transverse diameter (R^2 =0.4221; p=0.1142) as age increased (Figure-2).

In BPH patients who used 5-alpha-reductase inhibitors (group 1), when comparison of the verumontanum measurements and BMI revealed na increase in longitudinal diameter (R^2 =0.0285; p=0.3397) and a slight increase in transverse diameter (R^2 =0.0005; p=0.8986) with an increase in BMI. In this group there was a reduction in longitudinal (R^2 =0.0238; p=0.3833) and transverse (R^2 =0.0325; p=0.3080) diameters with increasing age. In the comparson with prostate weight, there was a reduction in longitudinal (R^2 =0.0237; p=0.3852) and transverse (R^2 =0.1864; p=0.0108) diameters as the prostate weight increased, but only the transverse diameter was statistically significant (Figure-3).

The graphs show that the verumontanum did not increase with age in the three groups. It can also be noted that the verumontanum did not increase with increased prostate volume, suggesting that in patients with BPH there is no associated growth of the verumontanum along with the prostate.

During the anatomical analysis of the verumontanum, we observed five different morphological types, whose nomenclature we created according to their appearance (Figure-4): "Volcano" colliculus is a short colliculus with the utricle at its upper extremity;

Variables	Control (n=7) µ±∂; m	BPH+without 5ARIs (n=52) μ±∂; m	BPH+5ARIs (n=34) μ±∂; m	P value
Age (years)	32.71±3.73; 32.00	62.69±11.12; 65.00	67.26±8.94; 68.00	<0.0001 (1)
Body mass index (kg/m²)	27.36±3.72; 25.90	27.11±4.19; 26.90	26.11±4.38; 25.00	0.4203 (1)
Prostate weight (g)	-	40.85±19.80; 35.00	59.85±23.94; 56.50	< 0.0001 (2)
Longitudinal diameter of the verumontanum (mm)	5.63±4.93; 4.26	4.54±1.86; 4.38	4.69±1.56; 4.52	0.6990 (1)
Transversal diameter of the verumontanum (mm)	4.11±3.31; 2.46	3.20±1.15; 3.03	2.94±0.83; 3.06	0.6261 (1)

Table 2 - Clinical characteristics of the studied groups.

BPH = Benign prostatic hyperplasia; 5ARIs=5 alpha reductase inhibitors; Data were expressed as mean (µ)±standard deviation (∂); median (m).

(1) Nonparametric differences were tested by Kruskal-Wallis and Dunn's posttest, p <0.05; (2) Nonparametric differences were tested by Mann-Whitney, p <0.05.





"Lighthouse" colliculus is longer colliculus with the anterior utricle at its upper extremity; "Whale Tail" colliculus is a short, flattened organ with an elongated urethral crest; "Hood" colliculus is the most elongated colliculus of all, tapered and continuous with the urethral crest; and "Castle Door" colliculus is a broad, short colliculus with enlarged prostate utricle. Group 1 presented frequency of verumontanum types as follows: 12 (35.29%) patients with "Volcano" colliculus; 8 (23.53%) with "Whale tail"; 7 (20.59%) with "Lighthouse"; 4 (11.76%) with "Hood"; and 3 (8.82%) with "Castle Door" type. In the analysis of group 2, the frequency pattern was: 32 (61.54%) patients with "Volcano" type colliculus; 14 (26.92%) with "Lighthouse"; 3 (5.77%) with "Whale Tail"; 2 (3.85%) with "Castle Door"; and 1 (1.92%) with "Hood" type.

In the control group, the "Volcano" colliculus was present in 4 (57.14%) patients, "Lighthouse" in 2 (28.57%) patients and "Whale Tail" in 1 (14.29%) patient.

There was no statistical difference in the comparison between the three groups (p=0.0908).

Of the patients who were using delayed bladder catheters, 10 (50%) had "Volcano" colliculus, 4 (20%) had "Whale Tail", 3 (15%) had "Lighthouse", 2 (10%) had "Hood", and 1 (5%) had "Castle Door".

Among obese (BMI \geq 30kg/m²), overweight (BMI 25 - 29.9 kg/m²) and normal patients (BMI \leq 24.9kg/m²), the "Volcano" verumontanum was the most frequent in all of them, presenting frequencies of 7 (46.66%), 29 (52.72%) and 12 (52.17%) respectively, with statistical significance (p=0.022).

DISCUSSION

The 5-alpha-reductase inhibitors are known to act by inducing apoptosis of prostate epithelial cells (12), leading to a reduction in prostate size of about 18-28% and a decrease in serum prostate--specific atigen (PSA) levels of about 50% after six to twelve months of treatment (8, 11). In addition, 5-alpha-reductase inhibitors improve International Prostate Symptom Score (IPSS) by 15-30% and urinary maximal flow by 1.5-2.0mL/s in patients with LUTS (9, 10). 5-alpha-reductase inhibitors reduce the long-term risk (> one year) of acute urinary retention (AUR) or the need for surgery (13). In addition, finasteride can decrease bleeding during transurethral prostate resection surgery, probably due to its effects on prostate vascularization (14). Figure 3 - The figure shows the linear regression graphs of group 1 and group 2 comparing the variables age (years), BMI (kg/m²) and prostatic weight (grams) with the verumontanum measurements. Linear regression of group 1: A) With increasing age, the longitudinal (r^2 =0.0238; p=0.3833) and transverse (r^2 =0.0325; p=0.3080) diameters of the verumontanum decreased; B) There was na increase in longitudinal (r^2 =0.0285; p=0.3397) and transverse (r^2 =0.0005; p=0.8986) diameters with increasing BMI; C) There is a reduction in longitudinal (r^2 =0.0237; p=0.3852) and transverse (r^2 =0.1864; p=0.0108) diameters with increasing prostate weight. Linear regression of group 2: D) There was na increase in longitudinal diameter (r^2 =0.0196; p=0.3223) and a reduction in transverse diameter (r^2 =0.0118; p=0.4440) with increasing age; E) There was a reduction in longitudinal diameter (r^2 =0.0006; p=0.8662) and an increase in transverse diameter (r^2 =0.0049; p=0.6235) with increasing BMI; F) There was a reduction in longitudinal (r^2 =0.0029; p=0.7063) and transverse (r^2 =0.0078; p=0.5323) diameter with increasing prostate weight.





However, there is no information in the literature on whether this class of drugs alters the verumontanum size. In the present study, the mean verumontanum measurements were higher in the control group compared to the group without the drug, where the transverse diameter was larger than in the group that used the medicine. This suggests that 5-alpha-reductase inhibitors also decrease the verumontanum size.

In addition to decreased libido and erectile dysfunction, it is now known that the use of 5-alpha--reductase inhibitors can cause ejaculatory disorders and reduced semen volume (8-10, 15). The cause of these ejaculatory disorders is not known, but we can speculate that changes in verumontanum size could be involved. Therefore, further studies are needed to assess whether the form of verumontanum, influenced by the use of 5-ARIs in the population affected by BPH/LUTS, could modify the ejaculatory pattern of these individuals.

In our sample, in patients of group 1 and group 2, we observed a decrease in verumontanum measurements along with an increase in prostate weight, but only the decrease in verumontanum transversal measurement in the BPH group who used the drug was statistically significant.

BMI and metabolic syndrome are important in the incidence and prognosis of prostate diseases (16). There are no reports in the literature of alteration of verumontanum morphology in patients with BPH using 5-alpha-reductase inhibitors. In our study, we observed in patients who used 5-alpha-reductase inhibitors an increase in both diameters (mainly in the longitudinal diameter) with increase of BMI. In the group who did not use 5-alpha reductase inhibitors, the longitudinal diameter of the verumontanum decreased and the transverse diameter increased as the BMI increased. And in the control group, verumontanum diameters increased as BMI increased, with statistical significance.

During prostate TUR surgery, there is concern about verumontanum injury. Thus, Malalasekera and collaborators (17) performed a 3D study of the pathway of the ejaculatory ducts through the prostate to try to define a way to minimize the chance of ejaculatory duct injury during trans-urethral resection of the prostate, and he suggested preserving the prostate tissue located 7.5mm on either side of the verumontanum from the midline and 10mm proximal to the verumontanum. Thus, knowledge of the anatomy of the verumontanum is again important to define resection limits in the surgical treatment of BPH (17).

Another condition to be discussed would be obstructive azoospermia. This disease leads to infertility due to obstruction of the male reproductive tract, Figure 4 - The figure shows the 5 types of verumontanum found in the study. The left side shows the 5 types of verumontanum during the endoscopic surgery and the right has drawings of the 5 types. A) "Volcano". B) "Lighthouse". C) "Whale Tail". D) "Castle Door". E) "Hood".



which can occur anywhere (rete testis, efferent ducts, epididymis, vas deferens and ejaculatory duct) (18). One of the tests used to diagnose this condition is seminal vasography/vesiculography, which consists of catheterization of the ejaculatory ducts through the verumontanum and contrast injection (19, 20). When the obstruction is located in the ejaculatory ducts, the ideal treatment is transurethral resection of the ejaculatory duct, accessed through the verumontanum (20). Thus, better knowledge of the anatomy of the verumontanum, as well as its classification, may help the endoscopic treatment of obstructive azoospermia. These facts reinforce the importance of knowledge of verumontanum anatomy.

The average diameter of verumontanum in group 3 was higher than in group 2, which was higher than in group 1, suggesting that 5-alpha--reductase inhibitors shrink the prostate as well as the verumontanum. Patients using 5-alpha-reductase inhibitors showed increased longitudinal diameter of the verumontanum with increasing BMI. In the group who did not use 5-alpha reductase inhibitors, there was a reduction in longitudinal diameter and an increase in transverse diameter of the verumontanum as the BMI increased. The verumontanum was smaller in patients with BPH who used and those who did not use 5-alpha-reductase inhibitors as the prostate enlarged, suggesting that BPH does not increase the size of the verumontanum. In the control group, verumontanum diameters increased with increasing BMI, suggesting that obesity may be associated with increased verumontanum size. In all groups the measures of the verumontanum decreased with advancing age, except for group 2, which presented an increase in longitudinal diameter.

A finding of great interest during this study is that all patients could be grouped into one of the five categories of our verumontanum morphological classification. From what has been shown, we believe this classification represents anatomic reality and will be useful in future studies involving the verumontanum. We propose to classify the verumontanum into five different anatomical types ("Volcano", "Lighthouse", "Whale Tail", "Hood" and "Castle Door"). We observed that the "Volcano" colliculus was the most frequent (51.61% of all patients in the study), followed by the "Lighthouse Tower" and "Whale Tail" types, with the "Castle Door" and "Hood" being less prevalent. However, we did not observe any difference between the groups, suggesting that the type of colliculus is not altered by BPH, the use of 5-alpha-reductase inhibitors or the use of delayed bladder catheters.

The main limitations of the present study are: presence of a small sample of patients; impossibility of measuring the third diameter of the verumontanum and consequently calculating its volume, because the image analyzed by endoscopy is obtained in two dimensions; lack of standardization of a single type of 5-ARIs; our measurement method did not use more reliable measurement tools, such as a caliper, but this was the only way we found to carry out the measurements, considering that the study was with live patients.

CONCLUSION

The veromontanum measurements were smaller in patients with BPH who used and those who did not use the medicine as the prostate enlarged. In the control group, there was an increase in verumontanum diameters with an increase in BMI. We observed the presence of five morphological types of verumontanum in our sample ("Volcano", "Lighthouse", "Whale Tail", "Hood" and "Castle Door"), and the "Volcano" type was most frequent regardless of groups or BMI, suggesting that the use of 5-alpha--reductase inhibitors and obesity do not influence verumontanum morphology. Creating a new anatomical classification is always interesting. In addition, we believe this classification may help in endoscopic prostate surgery as well as future studies.

ABBREVIATIONS

- BPH = Benign prostatic hyperplasia
- LUTS = Lower urinary tract symptoms
- 5-ARIs = 5-alpha-reductase inhibitors
- BMI = Body mass index
- DBC = Delayed bladder catheter
- TUR = Transurethral resection
- OR = Odds ratio
- **PSA** = Prostate-specific antigen
- **IPSS** = International prostate symptom score
- AUR = Acute urinary retention

ACKNOWLEDGMENTS

The present paper was supported by FAPERJ, CAPES and CNPQ.

81

We would like to thank Dr. Eduardo Medina Felici for the verumontanum illustration.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

- Kavoussi PK: Surgical, Radiographic, and Endoscopic Anatomy of the Male Reproductive System. In: Campbell-Walsh Urology. 11^a ed. Philadelphia, Elsevier. 2016; 21: 498-515.
- Sadler TW: Langman's Medical Embryology. 7th ed. Baltimore, Wialliams & Wilkins. 1995.
- Nork JJ, Yap MK, Kaplan GW. Verumontanum Cyst Associated With Lower Urinary Tract Symptoms in an Adolescent. Urology. 2016;88:192-4.
- McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. Am J Surg Pathol. 1988;12:897-906.
- Cifuentes Delatte L: Cirurgia Urologica Endoscopica. 2^a ed. Madrid, Paz Montalvo S.A. 1981.
- Oh CS, Chung IH, Won HS, Kim JH, Nam KI. Morphologic variations of the prostatic utricle. Clin Anat. 2009;22:358-64.
- Egan KB. The Epidemiology of Benign Prostatic Hyperplasia Associated with Lower Urinary Tract Symptoms: Prevalence and Incident Rates. Urol Clin North Am. 2016;43:289-97.
- Andriole G, Bruchovsky N, Chung LW, Matsumoto AM, Rittmaster R, Roehrborn C, et al. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5alpha-reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. J Urol. 2004;172(4 Pt 1):1399-403.
- McConnell JD, Roehrborn CG, Bautista OM, Andriole GL Jr, Dixon CM, Kusek JW, et al. The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. N Engl J Med. 2003;349:2387-98.
- Roehrborn CG, Siami P, Barkin J, Damião R, Major-Walker K, Nandy I, et al. The effects of combination therapy with dutasteride and tamsulosin on clinical outcomes in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia: 4-year results from the CombAT study. Eur Urol. 2010;57:123-31. Erratum in: Eur Urol. 2010;58:801.

- Naslund MJ, Miner M. A review of the clinical efficacy and safety of 5alpha-reductase inhibitors for the enlarged prostate. Clin Ther. 2007;29:17-25.
- Rittmaster RS, Norman RW, Thomas LN, Rowden G. Evidence for atrophy and apoptosis in the prostates of men given finasteride. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81:814-9.
- McConnell JD, Bruskewitz R, Walsh P, Andriole G, Lieber M, Holtgrewe HL, et al. The effect of finasteride on the risk of acute urinary retention and the need for surgical treatment among men with benign prostatic hyperplasia. Finasteride Long-Term Efficacy and Safety Study Group. N Engl J Med. 1998;338:557-63.
- Donohue JF, Sharma H, Abraham R, Natalwala S, Thomas DR, Foster MC. Transurethral prostate resection and bleeding: a randomized, placebo controlled trial of role of finasteride for decreasing operative blood loss. J Urol. 2002;168:2024-6.
- Fertig RM, Gamret AC, Darwin E, Gaudi S. Sexual side effects of 5-α-reductase inhibitors finasteride and dutasteride: A comprehensive review. Dermatol Online J. 2017;23.
- Yin Z, Yang JR, Rao JM, Song W, Zhou KQ. Association between benign prostatic hyperplasia, body mass index, and metabolic syndrome in Chinese men. Asian J Androl. 2015;17:826-30.

- Malalasekera AP, Sivasuganthan K, Sarangan S, Thaneshan K, Weerakoon DN, Mathangasinghe Y, et al. Morphological variations of the human ejaculatory ducts in relation to the prostatic urethra. Clin Anat. 2018;31:456-61.
- Jow WW, Steckel J, Schlegel PN, Magid MS, Goldstein M. Motile sperm in human testis biopsy specimens. J Androl. 1993;14:194-8.
- Wosnitzer MS, Goldstein M. Obstructive azoospermia. Urol Clin North Am. 2014;41:83-95.
- Meacham RB, Hellerstein DK, Lipshultz LI. Evaluation and treatment of ejaculatory duct obstruction in the infertile male. Fertil Steril. 1993;59:393-7.

Correspondence address:

Henrique Barbosa de Menezes, MD Rua Mary Ubirajara, 110/602 - Santa Lúcia Vitória, ES, 29056-030, Brasil Telephone.: +55 27 98177-6300 E-mail: henriquebmenezes@hotmail.com ANEXO D – Artigo Journal of Pediatric Urology doi.org/ 10.1016/j.jpurol.2020.07.015



Journal of Pediatric Urology (xxxx) xxx xxx

Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses

Rodrigo R. Vieiralves, Gisele S. Ribeiro Jr, Edilaine F. Alves, Francisco J. Sampaio, Luciano A. Favorito *

Summary

Background

Anogenital distance (AGD), the distance from the anus to the genitals, is a marker of normal genital development. AGD and other biometric parameters of external female genitalia are important as ultrasonographic markers that can determine fetal gender in the first trimester. Neural tube defects are one of the commonest congenital malformations of the central nervous system, with anencephaly being the most severe defect. Female genitalia development and their association with anencephaly have not been previously described.

Aim

The aim of this study was to compare the biometric parameters of external female genitalia in fetuses with anencephaly and compare it to the parameters of normocephalic fetuses at different gestational ages.

Study design

We studied 34 female fetuses, 22 normocephalic and 12 anencephalic, aged between 12 and 22 weeks post-conception. The fetuses were placed in the classic lithotomy position and before the fetal dissection, the external female genitalia were photographed with a digital camera. Biometric parameters were recorded and measurements were performed using the Image J software, version 1.46r. Clitoral length and width, clitoris to anus distance, vaginal opening length and width, vaginal opening to labia majora distance, and AGD were measured (Figure). For statistical analysis, the Wilcoxon–Mann–Whitney test was used (p < 0.05).

Results

We observed a significant difference between some measurements of the groups: the vaginal opening width was significantly greater in anencephalic fetuses and the vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly greater in normocephalic fetuses. For the clitoris length and width, we did not find statistical differences. We also did not find statistical significance in AGD between groups (normocephalic 2.32 mm [2.46–6.42/SD = 2.17] vs. anencephalic 3.93 mm [1.15–6.65/SD = 1.93]; p = 0.499). The linear regression analysis indicated that AGD increased more with age in anencephalic than in the **normocephalic** group, but without significant differences ($r^2 = 0.01677$; p < 0.318).

Discussion

This article is the first to report the female external genitalia parameters in fetuses with anencephaly. In our study we observed some alterations in biometry of the external genitalia in anencephalic fetuses, with a pattern of morphological reduction in this group. The vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly lower in anencephalic fetuses but we did not find statistical significance in clitoris measurements and AGD.

Conclusions

Anencephalic fetuses had some alterations in external genitalia development, but the anogenital distances did vary significantly between the groups.

https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2020.07.015

1477-5131/© 2020 Journal of Pediatric Urology Company. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: Vieiralves RR et al., Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses, Journal of Pediatric Urology, https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2020.07.015



Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro,

* Correspondence to: Luciano Alves Favorito, Rua Professor Gabizo, 104/201, Tijuca, Rio de

Janeiro, RJ, CEP: 20271-320,

lufavorito@yahoo.com.br,

@alvesfavorito (L.A.

Anogenital distance; Neural

genitalia; Human fetuses

Received 20 April 2020

Revised 29 June 2020

Accepted 13 July 2020

Available online xxx

tube defects; Female external

Brazil. Tel.: +55(21) 22644679.

Brazil

Favorito)

Keywords



Summary Fig. The figure shows the standardized technique to perform the biometric measurements. A) The figure shows an 18 weeks post-conception (WPC) female fetus with anencephaly; B) In this figure we are placing the same fetus with 18 WPC in the classic lithotomy position; C) Schematic drawing showing the major axis (arrow) between initial (A = Vaginal Opening) and final (B = Anus) points during Anogenital Distance (AGD) measurements and D) Frontal picture of the genitalia using the Image J software, version 1.46r. The red line shows the AGD measurement.

30

140

Introduction

Anogenital distance (AGD), the distance from the anus to the genitals, is a marker of normal genital development [1]. AGD in males is normally twice that in females [2], and girls with congenital adrenal hyperplasia (CAH) have been shown to have longer perineal lengths than their normal counterparts [3]. The AGD is also important to evaluate fetal androgen exposure [4].

С

Neural tube defects are one of the commonest congenital malformations of the central nervous system, with anencephaly being the most severe defect. Recently, neural tube defects (NTDs) have gained space in the scientific literature and news reports around the world [5-7]. Since its introduction in the Americas in 2015, the mosquitoborne Zika virus (family *Flaviviridae*) has spread rapidly and has been associated with the increased incidence of microcephaly and anencephaly [8-10]. Anencephaly is observed in 0.03% of all births. It occurs at a rate three to four times higher in female fetuses than males and is associated with abnormalities in the hypothalamic-pituitary axis [11].

150

The influence of neural development on genital development was demonstrated in previous studies of anencephalic fetuses [12,13]. The cerebral lesions with consequent impaired brain control of the nerves seems to be the main factor involved in testicular alterations (growth, histology and testicular migration) in fetuses with anencephaly [11,14]. Previous studies about penile development have shown no difference in the penile structure in anencephalic fetuses compared with normocephalic ones [12]. Studies about the female genitalia in fetuses with anencephaly have never been published, a fact that reinforces the importance of the present study.

In patients with a family history of ambiguous genitalia, determination of the fetal gender in the first trimester of pregnancy is important [15]. AGD and other biometric parameters of external female genitalia are important, since they are helpful as ultrasonographic markers that can determine fetal gender in the first trimester, especially



Figure 1.2.tiff D 74 mm (406x541); RGB; 858k С 140 150 1

Figure 1 The figure shows the standardized technique to perform the biometric measurements. A) The figure shows a 18 weeks post conception (WPC) female fetus with anencephaly; B) In this figure we are placing the same fetus with 18WPC in the classic lithotomy position; C) Schematic drawing showing the major axis (arrow) between initial (A = Vaginal Open) and final (B = Anus) points during Anogenital Distance (AGD) measurements and D) Frontal picture of the genitalia using the Image J software, version 1.46r. The red line shows the AGD measurement. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

after 12 weeks after conception [16]. Studies of the female gential anatomy of fetuses and newborns are very rare, and the association between female genital biometrics and neural tube defects in fetuses has not been previously described [17,18].

We hypothesized that anencephaly impacts the female genital congenital development during the human fetal period. The confirmation of these alterations could be important in future studies about the impact of neural tube defects on female external genitalia development. The objective of this study was to compare the biometric parameters (especially the anogenital distance) of external female genitalia in fetuses with anencephaly and compare them with the parameters of normocephalic fetuses at different gestational ages.

Materials and methods

We studied 34 female fetuses (22 normocephalic and 12 anencephalic), aged between 12 and 22 weeks postconception (WPC), that died of causes unrelated to the genitourinary tract. The fetuses came to our laboratory as donations from the obstetric section of our hospital. The fetuses of the control group (normocephalic) were macroscopically well preserved, showed no signs of malformation, and the demise was due to hypoxia. The gestational age was determined in WPC according to the foot-length criterion. This criterion is currently considered the most acceptable parameter to estimate gestational age [19-21]. The fetuses were also evaluated regarding crown-rump length (CRL) and body weight immediately before dissection. All data were collected during the period from July 2018 through December 2019.

Using a standardized technique, all fetuses were placed in the classic lithotomy position and before the fetal pelvis dissection, the female genitalia were photographed with a digital camera (DP70, Olympus America, Inc., Melville, New York) under the same conditions (same focal distance by the same examiner) at a resolution of 2040 pixels and stored in a TIFF file. The biometric parameters were recorded and measurements were performed by the same

+ MODEL

R.R. Vieiralves et al.

Table 1 The table shows the main fetal parameters analyzed and the external genitalia measurements in the 34 fetuses studied: Fetal age in weeks postconception (WPC). CL = clitoris length; CW = clitoris width; CAD = clitoris to anus distance; VL = vaginal open length; VW = vaginal open width; VLD = vaginal open to labia majora distance; AGD = anogenital distance; AGD = anogenital distance;

Fetus	Anomaly	Age (WPC)	CL	CW	CAD	VL	VW	VLD	AGD
1	None	17.9	3.69	1.73	16.04	8.1	1.23	7.3	8.1
2	None	18.7	3.89	1.64	17.92	8.78	1.73	8.29	6.87
3	None	16.8	3.2	1.1	17.94	8	1.33	6.47	5.33
4	None	17.5	3.01	1.15	17.92	6.38	1.63	6.24	7.2
5	None	14.9	3.22	1.2	13.92	5.78	1.73	4.23	4.16
6	None	16.7	3.15	2.33	15.78	5.98	1.04	5.88	6.28
7	None	16.8	3.22	1.97	17.22	4.55	1.36	4.74	4.07
8	None	15.1	3.47	1.76	16.28	6.35	1.09	5.56	6.34
9	None	17.7	3.88	1.31	15.98	6.2	1.23	6	6.42
10	None	19.2	2.05	2.29	15.04	3.94	0.76	3.54	5.44
11	None	21.5	3.47	3.33	9.46	1.98	1.54	4.53	3.22
12	None	22.6	3.15	2.71	20.18	7.42	0.87	5.34	4.7
13	None	20.1	3.83	2.45	20.85	7.83	0.83	5.93	2.85
14	None	21.7	1.97	2	5.45	4.22	0.78	4.42	4.3
15	None	14.5	3.2	2.34	13.47	4.83	2.5	4.67	3.21
16	None	15.2	3.77	3.24	9.43	2.11	0.67	3.18	3.06
17	None	18.6	3.38	3.42	0.23	1.75	0.36	3.93	6.21
18	None	17.5	3.59	1.63	17.04	8.27	1.33	7.51	3.3
19	None	16.6	3.48	2.53	9.46	0.97	2.18	5.02	2.87
20	None	13.6	3.98	0.76	7.23	2.56	1.21	2.65	3.05
21	None	13.8	3.54	0.9	7.86	2.24	0.91	3.83	2.46
22	None	12.9	3.19	0.36	5.02	2.08	0.42	0.24	6.42
23	Anenc	12.3	3.25	1.94	3.34	2.41	2.21	2.95	2.18
24	Anenc	13.6	3.14	1.96	4.04	1.8	2.06	3.35	1.15
25	Anenc	14.5	3.09	0.15	4.19	2.33	2.1	3.12	2.31
26	Anenc	14.3	3.62	2.65	6.73	6.73	1.4	4.17	5.32
27	Anenc	16.5	3.31	2.51	9.01	2.21	0.47	3.86	3.45
28	Anenc	18.6	3.13	0.97	11.34	0.36	0.66	3.77	3.42
29	Anenc	18	3.23	1.9	12.88	7.98	1.32	3.9	1.81
30	Anenc	12.3	3.25	1.7	3.44	1.93	2.11	2.75	2.45
31	Anenc	14	2.12	2.31	9.43	1.73	1.83	2.12	6.65
32	Anenc	18.3	3.62	3.16	12.12	3.39	2.11	5.07	6.48
33	Anenc	16.3	3.68	2.74	14.01	3.66	1.04	3.23	5.87
34	Anenc	17.6	3.35	2.38	14.9	5.38	2.41	5.86	6.05

observer, using the Image J software, version 1.46r, because of the high intra-observer precision compared to inter-observer analysis [22,23]. Clitoral length and width, clitoris to anus distance, vaginal opening length and width, vaginal opening to labia majora distance, and vaginal opening to anus distance (anogenital distance) were measured. All measurements were performed, considering the major axis between initial and final points. For clitoris and vaginal opening, cranio-caudal and latero-lateral measurements were performed, again considering the largest visible axes (Fig. 1). Data are expressed in millimeters.

1.e4

All parameters were statistically processed and graphically described. The Shapiro–Wilk test was used to verify the normality of the data. After that, the Wilcoxon–Mann–Whitney test was used for comparison of quantitative data between normocephalic fetuses vs. fetuses with anencephaly (p < 0.05). Simple linear correlations (r² values less than 0.4 reflect very weak correlation, while r²

between 0.4 and 0.7 reflect moderate correlation and r^2 greater than 0.7 indicates strong correlation) were calculated for all female genital measurements, according to fetal age. The statistical analysis was performed with the R program (Version 3.5.1).

Results

The gestational age of fetuses ranged from 12 to 22 weeks post-conception (WPC). The normocephalic group's average gestational age was 17 WPC while for the anencephalic group it was 15 WPC. The summary of the findings regarding the fetal age and genital measurements is reported in Table 1.

We did not find statistical significance of anogenital distance between groups (normocephalic 2.32 mm [2.46–6.42/SD = 2.17] vs. anencephalic 3.93 mm [1.15–6.65/SD = 1.93]; p = 0.499). The linear regression

+ M





Figure 2 Anogenital Distance (AGD) x Age: The linear regression analysis indicated that AGD increases more in anencephalic fetuses but without significantly than in the normal group ($r^2 = 0.01677$; p < 0.318).

analysis indicated that AGD increased more with age in an encephalic fetuses than in the normocephalic group, but without significant differences ($r^2 = 0.01677$; p < 0.318) (Fig. 2).

We observed a significant difference in four biometric parameters. The vaginal opening width was significantly greater in anencephalic fetuses and the vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly greater in **normocephalic** fetuses. The comparisons were: clitoris to anus distance (normocephalic – 13.16 mm (0.23–20.85 3.34-14.9/SD = 5.53) vs. anencephalic 8.79 mm (3.34–14.9/SD = 4.32); p = 0.008); vaginal opening length (normocephalic – 5.01 mm [0.97–8.78/SD = 2.45] vs.

anencephalic - 3.335.01 mm [0.36-7.98/SD = 2.17]; p = 0.028); vaginal opening width (normocephalic -1.22 mm [0.36-2.50/SD = 0.52] vs. anencephalic -1.64 mm [0.47-2.41/SD = 0.59]; p = 0.032); and vaginal opening to labia majora distance (normocephalic -4.97 mm [0.24-8.29/SD = 1.74] vs. anencephalic -3.67 mm [2.12-5.86/SD = 0.98]; p = 0.005) (Table 2). The linear correlations comparing morphological data of external female genitalia and fetal age (WPC) between groups are reported in Fig. 3.

For the clitoris length and width, we did not find statistical differences. We also did not find statistically significant differences for clitoris length (normocephalic - 3.33 mm [1.97–3.98/SD = 0.51] vs. anencephalic - 3.24 mm [2.12–3.68/SD = 0.40]; p = 0.267) and clitoris width (normocephalic - 1.91 mm [0.36–3.42/SD = 0.82] vs. anencephalic - 2.03 mm [0.15–3.16/SD = 0.78]; p = 0.351).

Discussion

Embryological development of the female reproductive tract is a complex process in which fetal structures are differentiated in an orchestrated way to form external genitalia [23]. Any impairment at this stage can lead to a slight difference, resulting in congenital anomalies that affect the female genital tract. The genital tubercle is the anlage of the external genitalia in both males and females. Congenital abnormalities frequently result from abnormal formation of this structure and its subsequent development [24–26].

Between the 17th and the 30th day after conception, the neural tube is formed. This will form the spinal cord, spine, brain and skull. A neural tube defect occurs when the tube fails to close, leaving the developing brain or spinal cord exposed to amniotic fluid [5]. The absence of a functional brain makes the anencephalic fetuses unable to present consciousness or feel pain, but the brainstem reflexes may be preserved, leading to primordial actions such as breathing, and they may occasionally respond to sound and touch. Even so, the anencephalic fetus will not be viable, with average survival of hours or days [6].

The organ structure of anencephalic fetuses is almost unknown. Some recent studies have compared the

Table 2 The table summarizes the fetal age and the biometric parameters comparative findings between the two different groups (Normocephalic vs Anencephalic. SD = Standard deviation; WPC = weeks post conception; mm = millimeters and * = Biometric parameters with significant difference after statistical analysis.

- biometric parameters with significant unreferce after statistical analysis.										
Parameter	Normocephalic	Anencephalic	p-value							
Gestacional age	12.9–21.7 WPC (mean = 17.26/SD \pm 2.67)	12.3–18.6 WPC (mean = $15.52/SD \pm 2.30$)	p = 0.0287							
Clitoris length	$1.97-3.98 \text{ mm} \text{ (mean} = 3.33/\text{SD} \pm 0.51 \text{)}$	$2.12-3.68 \text{ mm} (\text{mean} = 3.24/\text{SD} \pm 0.40)$	p = 0.2671							
Clitoris width	$0.36 - 3.42 \text{ mm} \text{ (mean} = 1.91/\text{SD} \pm 0.82 \text{)}$	$0.15 - 3.16 \text{ mm} \text{ (mean} = 2.03 / \text{SD} \pm 0.78 \text{)}$	p = 0.3513							
Clitoris to anus distance	0.23–20.85 mm (mean = 13.16/SD \pm 5.53)	$3.34-14.90 \text{ mm} \text{ (mean} = 8.79/\text{SD} \pm 4.32 \text{)}$	$p = 0.0082^*$							
Vaginal open length	$0.97 - 8.78 \text{ mm} \text{ (mean} = 5.01/\text{SD} \pm 2.45)$	$0.36-7.98 \text{ mm} \text{ (mean} = 3.32/\text{SD} \pm 2.17)$	$p = 0.0283^*$							
Vaginal open width	$0.36-2.50 \text{ mm} \text{ (mean} = 1.22/\text{SD} \pm 0.52 \text{)}$	$0.47-2.41 \text{ mm} \text{ (mean} = 1.64/\text{SD} \pm 0.59 \text{)}$	$p = 0.0325^*$							
Vaginal open labia majora distance	0.24–8.29 mm (mean = 4.97/SD \pm 1.74)	2.12–5.86 mm (mean = 3.67/SD \pm 0.98)	p = 0.0055*							
Anogenital distance	0.82–6.42 mm (mean = 2.32/SD \pm 2.17)	1.15–6.65 mm (mean = 3.93/SD \pm 1.93)	p = 0.4991							

Please cite this article as: Vieiralves RR et al., Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses, Journal of Pediatric Urology, https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2020.07.015

1.e5



Figure 3 The figure shows a linear regression analysis comparing the morphological data and fetal age (WPC) with statistical significance. Correlation for normal fetuses morphology (blue point), and fetuses with anencephaly morphology (red points) vs fetal age are demonstrated. The points plotted represent the mean values obtained for each week studied. (A) Vaginal Open Length x Age: he linear regression analysis indicated that the vaginal open length ($r^2 Z 0.1253$; p = 0.0476)) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group. (B) Vaginal Open Width x Age: the linear regression analysis indicated that the vaginal Open Width x Age: the linear regression analysis indicated that the vaginal open width ($r^2 Z 0.1163$; p < 0.0579)) increases significantly more with age in the normal group than in the anencephalic group. (C) Clitoris to anus distance x Age: the linear regression analysis indicated that clitoris to anus distance ($r^2 Z 0.2474$; p < 0.0046)) increases significantly more with age in the normal group and (D) Vaginal Open to Labia Majora distance x Age: the linear regression analysis indicated that vaginal open to labia majora distance ($r^2 Z 0.2773$; p < 0.0024)) increases significantly more with age in the normal group. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

structures of the bladder, penis and testes between normocephalic and anencephalic fetuses [12,13,27]. The bladder of anencephalic fetuses had significant structural alterations, with more connective tissue, less smooth muscle and more type III and total collagen concentrations compared to normal fetal bladders [27]. On the other hand, de Carvalho [12] demonstrated there was no difference in the structure of male genitalia of anencephalic fetuses compared with normocephalic ones. Histochemistry and immunolabeling data suggested that penile shaft development is maintained unaltered in anencephalic fetuses [12]. The testicular growth was slower and did not show significant correlations with fetal parameters during the period studied in fetuses with anencephaly, which can be attributed to the abnormal hypothalamic-pituitary axis in anencephalic boys [13]. In anencephaly, the abnormal hypothalamic-pituitary axis is probably the most important factor involved in structural alterations in testicular histology and development in this syndrome [11,14].

Anogenital distance and female genitalia development

The most important parameter in female genitalia to evaluate the fetal androgen exposure and detect gender between 11 and 13 weeks post-conception is AGD [4]. The relationship between AGD and serum testosterone in both genders was reported, where a long distance was associated with elevated serum testosterone levels [28]. The female external genitalia do not require fetal ovarian hormones for their development [24,25] as occurs in male fetuses, which require hormones for their development. Thus, we speculate that the abnormal hypothalamic-pituitary axis does not significantly alter the development of female external genitalia in anencephalic fetuses. In addition, it has been proposed that shorter AGD is associated with infertility in the future [29]. In our study, we observed some alterations in biometry of the external genitalia in an encephaly. The vaginal opening length, clitoris to anus distance and vaginal opening to labia majora distance were significantly lower in an encephalic fetuses and the vaginal opening width was only significantly higher in anencephalic fetuses, but we did not find statistical significance in clitoris measurements and AGD. More studies are needed in this field to know the real impact of anencephaly and its association with malformations of the female genitourinary tract. However, studies in female human fetuses with neural tube disorders assessing the incidence of genitourinary abnormalities are rare and for our knowledge this article is the first to report the female genitalia and their correlations with fetuses having an encephaly. We believe that an encephalic fetuses can be used as a model for to study the development of urogenital organs in other neural tube disorders, such as meningoceles and myelomeningoceles, and we believe that the present study provides evidence of a principle to explore the failure of brain development early in the embryologic process and its impact on genital development.

Some limitations of our study should be mentioned: (a) the unequal WPC of anencephalic fetuses and the control group; (b) the lack of pathological analysis of external genitalia organs in our sample; and (c) the small sample size. However, anencephalic fetuses are rare, so observations of a small sample are still relevant and (d) the biometric parameters of the external genitalia were measured by a single observer, which could potentially generate measurement bias.

Conclusions

Anencephalic fetuses had some alterations in external genitalia development but the most important biometric parameter, the anogenital distance, did not show significant variations between the groups. We therefore speculate that the abnormal hypothalamic-pituitary axis does not significantly alter the development of external genitalia in female anencephalic fetuses. Translational aspects of the anencephalic model are very promissing in some fields of fetal and neonatal diagnosis and treatment, but more studies are needed to confirm this potential in future pediatric urology research.

Ethical approval

This study was carried out in accordance with the ethical standards of the hospital's institutional committee on

human experimentation. (IRB: 2.475.334, CAAE: 78881317.4.0000.5259).

Funding

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq —Brazil) (Grant number: 301522/2017-0) and the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ) (Grant number: E-26/ 202.873/2017).

Conflicts of interest

None to declare.

References

- Thankamony A, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL, Hughes IA. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. Environ Health Perspect 2009;117:1786–90.
- [2] Salazar EM, Riquer PR, Marquez EY, Longnecker MP, Avila MH. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. Environ Health 2004;13: 3–8.
- [3] Callegari C, Everett S, Ross M, Brasel JA. Anogenital ratio: measure of fetal virilization in premature and full-term newborn infants. J Pediatr 1987;111:240–3.
- [4] Dean A, Smith LB, Macpherson S, Sharpe RM. The effect of dihydrotestosterone exposure during or prior to the masculinization programming window on reproductive development in male and female rats. Int J Androl 2012;35:330–9.
- [5] Blatter BM, Van der Star M, Roeleveld N. Review of neural tube defects: risk factors in parental occupation and the environment. Environ Health Perspect 1994;102:140–5.
- [6] Müller L, Abrahamsson K, Sillén U, Jacobsson B, Odén A, Hellström M. Ultrasound assessment of detrusor thickness in children and young adults with myelomeningocele. J Urol 2006;175:704–8.
- [7] Cook RJ, Erdman JN, Hevia M, Dickens BM. Prenatal management of anencephaly. Int J Gynecol Obstet 2008;102:304–8.
- [8] Teixeira MG, da Conceição N, Costa M, de Oliveira WK, Nunes ML, Rodrigues LC. The epidemic of zika virus—related microcephaly in Brazil: detection, control, etiology, and future scenarios. Am J Publ Health 2016;106:601–5.
- [9] Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. Nature 2017;546:411–5.
- [10] Hurtado-Villa P, Puerto AK, Victoria S, Gracia G, Guasmayán L, Arce P, et al. Raised frequency of microcephaly related to zika virus infection in two birth defects surveillance systems in Bogotá and Cali, Colombia. Pediatr Infect Dis J 2017;36: 1017–9.
- [11] Zondek LH, Zondek T. Ovarian hilar cells and testicular Leydig cells in anencephaly. Biol Neonate 1983;43:211–9.
- [12] de Carvalho JPM, Costa WS, Sampaio FJB, Favorito LA. Anencephaly does not cause structural alterations in the fetal penis. J Sex Med 2012;9:735–42.
- [13] Pires RS, Gallo CM, Sampaio FJ, Favorito LA. Do prune-belly syndrome and neural tube defects change testicular growth? A study on human fetuses. J Pediatr Urol 2019;15:571–8.
- [14] Zondek LH, Zondek T. Observations on the testis in anencephaly with special reference to the Leydig cells. Biol Neonat 1965;8:329–47.

Please cite this article as: Vieiralves RR et al., Are anogenital distance and external female genitalia development changed in neural tube defects? Study in human fetuses, Journal of Pediatric Urology, https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2020.07.015

1.e7

+ MODEL

R.R. Vieiralves et al.

[15] Fuchs F, Borrego P, Amouroux C, et al. Prenatal imaging of genital defects: clinical spectrum and predictive factors for severe forms. BJU Int 2019:124:876–82.

1.e8

- [16] Najdi N, Safi F, Hashemi-Dizaji S, Sahraian G, Jand Y. First trimester determination of fetal gender by ultrasonographic measurement of anogenitaldistance: a cross-sectional study. Int J Reprod Biomed 2019;17:51–6.
- [17] Brodie KE, Grantham EC, Huguelet PS, Caldwell BT, Westfall NJ, Wilcox DT. Study of clitoral hood anatomy in the pediatric population. J Pediatr Urol 2016;12. 177.1-177.
- [18] Lloyd J, Crouch NS, Minto CL, Liao LM, Creighton SM. Female genital appearance: "Normality" unfolds. BJOG An Int J Obstet Gynaecol 2005;112:643–6.
- [19] Hern W. Correlation of fetal age and measurements between 10 and 26 weeks of gestation. Obstet Gynecol 1984;63:26–32.
- [20] Mercer BM, Sklar S, Shariatmadar A, Gillieson MS, D'Alton ME. Fetal foot length as a predictor of gestational age. Am J Obstet Gynecol 1987;156:350-5.
- [21] Platt L, Medearis A, DeVore G, et al. Fetal foot length: relationship to menstrual age and fetal measurements in the second trimester. Obstet Gynecol 1988;71:526-31.
- [22] Bidra AS, Uribe F, Taylor TD, Agar JR, Rungruanganunt P, Neace WP. The relationship of facial anatomic landmarks with midlines of the face and mouth. J Prosthet Dent 2009; 102:94–103.

- [23] Tello C, Liebmann J, Potash SD, Cohen H, Ritch R. Measurement of ultrasound biomicroscopy images: intraobserver and interobserver reliability. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35: 3549–52.
- [24] Makiyan Z. Studies of gonadal sex differentiation. Organogenesis 2016;12:42–51.
- [25] Fluck CE, Böni MM, Pandey AV. Why boys will Be boys: two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. Am J Hum Genet 2011;89: 201–18.
- [26] Matsumaru D, Haraguchi R, Moon AN, et al. Genetic analysis of the role of Alx4 in the coordination of lower body and external genitalia formation. Eur J Hum Genet 2014;22:350-7.
- [27] Pazos HMF, Lobo ML de P, Costa WS, Sampaio FJB, Cardoso LEM, Favorito LA. Do neural tube defects lead to structural alterations in the human bladder? Histopathology 2011;26:581–8.
- [28] Litwin A, Aitkin I, Merlob P. Clitoral length assessment in newborn infants of 30 to 41 weeks gestational age. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1991;38:209–12.
- [29] Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. Environ Health Perspect 2005;113:1056–61.