



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ISABEL CRISTINA ALBUQUERQUE FEITOSA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE METILTESTOSTERONA NAS
PROPRIEDADES ANISOTRÓPICAS DAS FIBRAS MUSCULARES E COLÁGENAS
PERIURETRAIS DE RATAS**

Campinas

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ISABEL CRISTINA ALBUQUERQUE FEITOSA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE METILTESTOSTERONA NAS
PROPRIEDADES ANISOTRÓPICAS DAS FIBRAS MUSCULARES E COLÁGENAS
PERIURETRAIS DE RATAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas –
Unicamp para obtenção de Título de Mestre
em Ciências. Sob orientação do Prof. Dr.
Cássio Luís Zanettini Ricetto e
coorientação do Prof. Dr. Benedicto de
Campos Vidal.

**Campinas
2012**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652**

Feitosa, Isabel Cristina Albuquerque, 1974 -
F329e Efeito da suplementação de metiltestosterona nas propriedades anisotrópicas das fibras musculares e colágenas periuretrais de ratas / Isabel Cristina Albuquerque Feitosa. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.
Orientador : Cássio Luís Zanettini Riccetto.
Coorientador : Benedicto de Campos Vidal.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
1. Andrógenos. 2. Incontinência urinária. 3. Diafragma da pelve. 4. Birrefringência. I. Riccetto, Cássio Luís Zanettini. II. Vidal, Benedicto de Campos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effect of supplementation of methyltestosterone on anisotropic properties of periurethral muscle and collagen fibers of rats.

Palavra-chave em inglês:

Androgens

Urinary incontinence

Pelvic floor

Birefringence

Área de Concentração: Ciências da Cirurgia

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Cássio Luís Zanettini Riccetto [Orientador]

Wagner José Fávaro

Aparecido Donizeti Agostinho

Data da defesa: 07-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

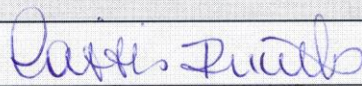
Banca Examinadora da Defesa de Mestrado

Isabel Cristina Albuquerque Feitosa

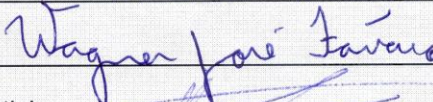
Orientador: Prof. Dr. Cássio Luis Zanettini Riccetto

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Cássio Luis Zanettini Riccetto -



2. Prof(a). Dr(a). Wagner José Fávaro -



3. Prof(a). Dr(a). Aparecido Donizeti Agostinho -



Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 07/02/2012

Dedico este trabalho...

*... Ao Cesar, meu companheiro, meu marido
pela perseverança em construir uma história ao meu lado;
por tanto amor dedicado a mim;
por cada gesto terno, gentil e altruísta;
por acreditar em mim, mesmo quando eu duvidava.*

*Ao Bruno, meu filho,
por me fazer sentir a felicidade em todos os minutos da minha vida.*

*A Deus,
São tantas coisas para agradecer, que nem sei por onde começar.
Agradeço por me colocar sempre no caminho da felicidade, mesmo quando erro
na escolha.*

.

Agradecimentos

Aos meus pais, Bonifácio e Célia, pela dedicação, amor e educação.

A minha irmã, Regina sempre presente, muito carinhosa, por isso, minha segunda mãe.

Ao meu Irmão, Bonifácio (in Memoriam), por estar sempre por perto!

A minha família: obrigado pelos ensinamentos da vida.

Ao Dr. Roni de Carvalho Fernandes, amigo e incentivador, pelos exemplos de postura e ética na vida profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Riccetto meu orientador, que me guiou com dedicação, generosidade e compreensão. Agradeço pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelos exemplos de postura na ciência.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal pela oportunidade de realizar este projeto junto à disciplina de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Por ser um orientador incansável.

Ao Prof. Dr. Paulo Palma, que proporcionou grande entusiasmo para iniciar no programa de Pós-Graduação.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Unicamp, os biólogos Ana Cristina de Moraes e William Adalberto Silva, que proporcionaram um agradável ambiente de trabalho e contribuíram de forma imprescindível para a execução deste projeto.

A todos aqueles que em algum momento da minha vida contribuíram pela construção do conhecimento adquirido ao longo dos anos.

“Certeza!

.... de tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

Fernando Pessoa

Sumário

Agradecimentos	viii
Sumário	xii
Símbolos, Siglas e Abreviaturas	xv
Lista de Figuras	xvii
Resumo	xix
Abstract.....	xxi
1.Introdução	23
1.1. BASES ANATÔMICAS DO MECANISMO DE CONTINÊNCIA URINÁRIA FEMININA....	26
1.2. A INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS NA CONTINÊNCIA URINÁRIA.....	28
1.3. ASPECTOS TÉCNICOS DA MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA E BIRREFRINGÊNCIA	34
2. Objetivo do Estudo	39
3. Material e Métodos.....	40
3.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	40
3.2. COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS E TRATAMENTO REALIZADO	40
3.3. COLETA DOS ESPÉCIMES PARA O ESTUDO	41
3.4. ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO	42
3.4.1. Macroscopia.....	42
3.4.2. Análise microscópica das imagens	42
4. Resultados	45

4.1. OBSERVAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE TRATAMENTO.....	45
4.2. ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO	45
4.2.1. - Macroscopia	45
4.2.2. Microscopia	45
5. Discussão	53
6. Conclusão	62
7. Referências Bibliográficas.....	63
8. Anexos	72
8.1. ANEXO 1 – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA	72
8.2 - ANEXO 2 - RANDOMIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO	73
8.3 - ANEXO 3 - MEDIDAS DE DENSIDADE MÉDIA DO MÚSCULO PERIURETRAL NO GRUPO PLACEBO.....	76
8.4. ANEXO 4 - MEDIDAS DE DENSIDADE MÉDIA DO MÚSCULO PERIURETRAL NO GRUPO TESTOSTERONA	78
8.5. ANEXO 5 - MEDIDAS DE DENSIDADE MÉDIA DAS FIBRAS COLÁGENAS PERIURETRAIS NO GRUPO PLACEBO.....	82
8.6. ANEXO 6 – MEDIDAS DE DENSIDADE MÉDIA DAS FIBRAS COLÁGENAS PERIURETRAIS NO GRUPO TESTOSTERONA.....	89

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
ICS	International Continence Society
DHEA	Dehidro-Epi-Androsterona
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante
HERS	Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study
IU	Incontinência Urinária
IUE	Incontinência Urinária de Esforço
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
RO	Retardo Óptico
SWAN	Study of Women's Health Across the Nation
WHILA	The Women's Health in the Lund Area
WHI	Women's Health Initiative

Lista de Figuras

	Página
Figura: 1	Esquema de Análise da Birrefringência 38
Figura: 2	Fibra Muscular sob Luz Polarizada 48
Figura: 3	Fibra Muscular sob Luz Polarizada – Inversão do Plano 49
Figura: 4	Tendão Muscular sob Luz Polarizada 49
Figura: 5	Tendão Muscular sob Luz Polarizada - Análise 50
Figura: 6	Fibras Colágenas sob Luz Polarizada 50
Figura: 7	Fibras Colágenas sob Luz Polarizada – Inversão do Plano 51
Figura: 8	Histograma – Análise das Fibras Musculares 52
Figura: 9	Histograma – Análise das Fibras Colágenas 54

Resumo

Introdução: A incontinência urinária é um problema de saúde muito prevalente, afetando entre 10% a 50% das mulheres em algum momento de sua vida, causando morbidade social e redução na qualidade de vida. Nas mulheres entre 40-59 anos a incontinência urinária de esforço é mais frequente e naquelas acima de 60 anos a urge-incontinência é mais prevalente. A mudança de padrão de incontinência com o aumento da idade pode sugerir que o envelhecimento em geral e as alterações fisiológicas decorrentes deste processo possam contribuir com a sua patogênese. Há vários anos foi demonstrado que os tecidos originados do seio urogenital são sensíveis aos hormônios sexuais, principalmente o estrógeno. Recentemente, tem surgido importante interesse no uso da suplementação de andrógenos nas mulheres. Embora existam significativos interesses nas aplicações clínicas dos andrógenos em mulheres, não se sabe exatamente como se dá a atuação destes hormônios no assoalho pélvico e trato urinário inferior. **Objetivo:** Analisar o efeito da suplementação de metiltestosterona sobre as propriedades anisotrópicas das fibras musculares e colágenas periuretrais de ratas. **Métodos:** Foi realizado um estudo experimental com 30 ratas que foram divididas em dois grupos: 15 ratas submetidas a suplementação de metiltestosterona por 60 dias e 15 ratas controles. Posteriormente foi removida a bexiga, uretra e região perineal em bloco. A região

periuretral foi analisada através de microscopia de polarização, com quantificação da birrefringência das fibras musculares e colágenas. **Resultados:** A densidade média de brilho da musculatura, no grupo controle foi de 65,3070. No grupo com suplementação de testosterona foi 84,7624, portanto com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,006$). Quanto às medidas da birrefringência do colágeno periuretral nos grupos controle e com suplementação de testosterona, foram obtidas com mediana de 95,9436 no controle e a mediana foi de 100,8646 no grupo com testosterona, com diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos avaliados, com $p = 0,005$. **Conclusão:** O uso de testosterona promoveu um aumento nos valores de birrefringência das fibras colágenas e musculares periuretrais de ratas submetidas a suplementação de metiltestosterona quando comparadas com o grupo controle.

Abstract

Introduction: Urinary incontinence is a prevalent health problem, affecting between 10% and 50% of women at some point in their lives, causing social morbidity and reduced quality of life. Among women between 40-59 years of age, stress urinary incontinence is more frequent and in those above 60 years of age urge incontinence is more prevalent. The changing pattern of incontinence with increasing age may suggest that the aging process and the physiological changes resulting from this process may play a role in its pathogenesis. It has been shown for the last years that the tissues derived from urogenital sinus are sensitive to estrogen. Recently, there has been significant interest in the use of androgen supplementation in women. Although there is significant interest in clinical applications of androgens in women, it is not known exactly how occurs the action of these hormones in the pelvic floor and lower urinary tract. **Objective:** To analyze the effect of methyltestosterone supplementation on the anisotropic properties of the periurethral collagen and muscle fibers of rats. **Methods:** We conducted an experimental study with 30 female rats that were divided into 2 groups: 15 rats subjected to supplementation of methyltestosterone for 60 days and 15 control rats. Bladder, urethra, and perineum were removed en block after sacrifice. The periurethral region was analyzed by polarized light microscopy with quantification

of the birefringence of muscle and collagen fibers. **Results:** The mean density of brightness of the muscles in the control group was 65.3070. In the group with testosterone supplementation was 84.7624, so the difference was statistically significant ($p = 0.006$). The measurements of birefringence of periurethral collagen fibers in control and testosterone groups were obtained with a median of 95.9436 in control and 100.8646 in the testosterone group, with statistically significant difference between them, with $p = 0.005$. **Conclusion:** The use of testosterone promoted an increase in the values of birefringence of periurethral collagen fibers and muscle tissue of rats submitted to methyltestosterone supplementation when compared with the control group.

1.Introdução

A Sociedade Internacional de Continência (ICS) define a Incontinência Urinária (IU) como “a perda involuntária de urina” (1). A incontinência urinária é um problema de saúde muito prevalente, que afeta 10% a 50% das mulheres em algum momento de sua vida, causando morbidade social e redução na qualidade de vida (2). Apesar de haver comprometimento da qualidade de vida em todos os tipos de incontinência urinária, a influência negativa na vida sexual das mulheres com bexiga hiperativa tem sido maior do que naquelas com incontinência urinária de esforço (2,3).

Um estudo nacional realizado na cidade de Pouso Alegre, Minas Gerais, analisou indivíduos com mais de 18 anos e que demonstrou incidência de incontinência urinária em 32,9% das mulheres (4). Os dados nacionais são confirmados pela literatura internacional. Num estudo recente da população de quatro países europeus (França, Alemanha, Espanha e Reino Unido), com 17.080 mulheres, foi encontrado que 35% (23% na Espanha, 44% na França, 41% na Alemanha e 42% no Reino Unido) tinham algum tipo de perda involuntária de urina em acompanhamento por 30 dias, sendo a perda involuntária aos esforços o tipo mais comum identificado nestas mulheres. Apenas 25% destas mulheres com

incontinência urinária consultaram um médico em seu país devido a este problema (5).

Dooley e colaboradores (2008), em um estudo com 4.229 mulheres, 49,6% relataram incontinência urinária. Destas mulheres, 49,8% apresentavam incontinência urinária de esforço, 34,3% incontinência urinária mista e 15,9% incontinência de urgência pura. Este estudo ainda demonstrou que existem diferenças étnicas e raciais no tipo de incontinência urinária nas mulheres nos Estados Unidos, onde a incontinência urinária de esforço foi mais frequente nas mulheres brancas do que nas negras. Estas, por sua vez, apresentavam mais incontinência de urgência que as brancas (6). Neste trabalho, quanto maior o índice de massa corpórea, mais prevalente a incontinência urinária de esforço e a incontinência urinária mista.

Fenner et al., em 2008, também observaram diferenças raciais na prevalência da incontinência urinária. Foram avaliadas 2.814 mulheres, com uma prevalência de 26,5% de incontinência urinária. Quando estratificada por raça, a prevalência de incontinência urinária foi 14,6% para mulheres negras e 33,1% para as brancas. A incontinência urinária de esforço foi mais frequente nas mulheres brancas (39,2%) em comparação com as negras (25,0%). Contudo, grande proporção de mulheres negras (23,8%) relatou sintomas de incontinência de urgência pura quando comparadas com as brancas (11,0%). Os fatores de risco foram semelhantes (7).

As diferenças na prevalência dos tipos de incontinência urinária não se limitam à raça. As diversas modalidades apresentam uma distribuição etária

característica. Dessa forma, uma revisão de literatura realizada por Minassian et al., em 2003 demonstraram que a prevalência de mulheres com incontinência urinária era de 27,6% e que esta prevalência aumentava significativamente com a idade (8). Estes dados diferem dos apresentados por Campbell e colaboradores, que encontraram incontinência urinária em apenas 11% das pacientes com idade superior a 65 anos e em 21% daquelas com mais de 80 anos (9). Outros autores demonstraram que a incontinência urinária pode afetar mulheres jovens, mas atinge principalmente mulheres com 65 anos ou mais, com taxas de até 50%. Em mulheres institucionalizadas esta taxa chega a 60% (8). Dooley e colaboradores (2008), afirmaram que nas mulheres entre 40-59 anos a incontinência urinária de esforço foi mais frequente e que naquelas com mais que 60 anos a incontinência de urgência foi mais prevalente (6).

Apesar das diferenças nos valores encontrados, todos os autores afirmam que a incontinência urinária é mais prevalente após a menopausa. Segundo Hsieh et al. (2008), que estudaram pacientes após a menopausa (acima de 60 anos), numa amostra de 2.410 mulheres, 29,8% afirmavam ter incontinência urinária. Destas, 81,2 % apresentavam incontinência relacionada aos esforços. Das 485 mulheres com incontinência urinária, 211 não procuraram atendimento médico, sendo vergonha a principal razão alegada (10).

Segundo Lasserre et al. (2009), em um estudo realizado na França, a prevalência da IU foi de 26,8%, que aumentava com a idade, com o índice de massa corpórea e com o número de partos. Neste trabalho eles mostraram que uma em cada quatro mulheres apresentavam sintomas de incontinência urinária,

demonstrando importância da doença. Este estudo relatou, ainda, que a maior parte destas mulheres (60,3%) nunca tinha informado seus sintomas aos médicos (11).

1.1. Bases Anatômicas do Mecanismo de Continência Urinária Feminina

A continência urinária é determinada pela integridade dos tecidos e das estruturas de suporte da uretra, representadas por ligamentos, fâscias e músculos do assoalho pélvico. Os mecanismos internos que mantêm a resistência uretral também são relevantes, como o sistema contrátil formado pelos músculos lisos e estriado periuretrais e pelo plexo vascular da submucosa uretral (12).

Segundo DeLancey (1990), a uretra feminina é um tubo muscular de três a quatro cm de comprimento e seis mm de diâmetro, formada por várias camadas, sendo as duas mais internas, a mucosa e a submucosa, que mantêm a luz uretral ocluída graças a sua superfície anfractuosa, que constitui o “esfíncter mucoso” (13). Outro componente importante é o plexo vascular submucoso, que é responsável por aproximadamente 30% da pressão de fechamento uretral (14,15).

A camada intermediária é formada por tecido esponjoso uretral e revestida por tecido conjuntivo fibroelástico e tecido muscular liso, que predomina no terço proximal da uretra (16).

A camada externa é formada por tecido muscular estriado, denominado de rabdoesfíncter e está presente em 80% do comprimento uretral. Nesta camada as fibras estão dispostas de forma circular, sendo mais espessa no terço médio da uretra (17). O rabdoesfíncter é formado por duas camadas. A camada mais

interna, chamada de parauretral, é formada por fibras de contração lenta, sendo responsável pela manutenção do tônus basal. A porção externa do rabdoesfíncter, chamada de periuretral, formada por feixes do músculo elevador do ânus, e composta por fibras de ação rápida, responsáveis pela contração reflexa que ocorre durante o aumento súbito da pressão abdominal (18).

Segundo DeLancey, o esfíncter uretral estriado é 12,5% menor nas pacientes com incontinência urinária de esforço do que nas pacientes continentas, tanto em relação à espessura quanto ao comprimento do esfíncter uretral estriado (19).

O assoalho pélvico, que consiste no músculo elevador do ânus, seus ligamentos e fáscias, previnem a descida dos órgãos pélvicos e mantém a continência urinária. O músculo elevador do ânus é dividido em quatro porções: pubococcígeo, puboretal, iliococcígeo e coccígeo (20). A relação entre anatomia do assoalho pélvico e incontinência urinária é evidenciada em diversos estudos, como o de Stav e colaboradores, que em 2007 demonstraram que nas pacientes com incontinência urinária o diâmetro transversal deste músculo era menor do que nas continentas (21). O músculo elevador do ânus tem fibras de contração rápida e lenta, que ajudam a manter o tônus muscular constante e os ajustes de tensão, conforme as modificações de pressão abdominal (20). Contrações reflexas de ambos os tipos de fibras musculares são importantes para manter a continência urinária e fecal (20).

A fáscia endopélvica, que também auxilia na manutenção da continência urinária e fecal (20), é constituída por diversos tipos de colágenos, principalmente

os tipos I e III. Pacientes com prolapsos de órgãos pélvicos apresentam modificação na taxa de produção do colágeno, com elevação na quantidade do tipo III, menos resistente (22). Diminuição importante no conteúdo de colágeno é encontrada de dois a quatro anos após a menopausa (23).

Do ponto de vista funcional, o assoalho pélvico é um sistema de suporte dinâmico, com tônus muscular constante e ajuste de tensão em resposta às modificações de pressão abdominal.

De acordo com a Teoria Integral da Continência, proposta por Petros e Ulmsten em 1990, a frouxidão da porção suburetral da vagina e de seus ligamentos de sustentação é a responsável direta por todos os tipos de incontinência urinária (24). Estas estruturas (ligamentos, músculos e estruturas fibrosas/fasciais) estariam interligadas formando e mantendo uma rede de sustentação da uretra. As alterações que ocorrem nos tecidos conjuntivos e musculares destas estruturas e as diversas inter-relações entre os fatores que os modificam e/ou influenciam vem sendo estudados intensivamente e demonstram, o papel preponderante destes tecidos no desenvolvimento da incontinência urinária (24).

1.2. A Influência dos Hormônios Sexuais na Continência Urinária

Há vários anos foi demonstrado que os tecidos originados do seio urogenital são sensíveis ao estrógeno (25). Acredita-se que o trato urinário inferior feminino seja alvo da ação dos hormônios estrógeno e progesterona. Esta teoria é baseada nas mudanças observadas na citologia uretral, com proliferação da

mucosa uretral, inicialmente atrofica, após administração de estrógeno nas mulheres pós-menopausa com incontinência urinária (26), e na presença de receptores de estrógeno na uretra e no trato urinário inferior (27).

Fatores genéticos que afetam atividades enzimáticas são determinantes importantes na toxicidade, eficácia e disposição de substâncias quimicamente ativas, incluindo hormônios endógenos e exógenos. Explica-se, assim, o fato de pacientes com os mesmos fatores etiológicos terem graus de intensidade diferentes para incontinência urinária e para prolapso de órgãos pélvicos (28).

Sartori et al. em 1995, avaliaram mulheres na pós-menopausa com IUE, e concluíram que a reposição hormonal com estrógeno e progesterona melhora os sintomas clínicos e as alterações urodinâmicas relacionadas à incontinência urinária de esforço. Com isso, é razoável postular que a hipoestrogenia é fator importante no desenvolvimento de disfunções da uretra e bexiga relacionadas com a incontinência urinária de esforço (29).

Numa revisão sistemática realizada por Batista et al. em 2010, foi demonstrado os melhores níveis de evidência científica disponíveis a favor dos benefícios da associação da terapia de reposição hormonal ao treinamento dos músculos do assoalho pélvico como terapêutica de primeira linha no tratamento tanto da incontinência urinária de esforço quanto da incontinência de urgência e da incontinência urinária mista (30).

Copas e colaboradores (2001) demonstraram que a expressão de receptores de estrógeno na fáscia do músculo elevador do ânus é maior nas mulheres com incontinência urinária do que nas pacientes saudáveis. Contudo, a

terapia de reposição hormonal causa diminuição na expressão destes receptores e não previne as desordens do assoalho pélvico (31).

Em 2004, Parekh et al. demonstraram, por meio de um estudo experimental em coelhas ooforectomizadas, que a privação hormonal por seis semanas provocou diminuição importante no fluxo sanguíneo da mucosa vesical (32). A partir deste resultado, postularam que a hipóxia levaria à atrofia e apoptose da mucosa vesical, e causaria aumento da sua permeabilidade. Tais alterações poderiam ser a causa dos sintomas de urgência, frequência, incontinência e das infecções vesicais na pós-menopausa (32).

Segundo Bai et al. (2003), a concentração urinária dos metabólitos dos esteróides endógenos não é diferente entre as mulheres pós-menopausa com e sem incontinência urinária de esforço e, não afetam a gravidade da incontinência urinária nessa faixa etária (33).

Raz e colaboradores (1973) afirmaram que a progesterona afeta o metabolismo do colágeno, favorecendo o enfraquecimento dos tecidos conectivos periuretrais. Promove ainda relaxamento do esfíncter muscular liso, por meio de ação sobre os betarreceptores (34).

Brincat et al. (1985), afirmaram que o prolapso do colo vesical depende do conteúdo de colágeno da fáscia endopélvica, e demonstraram que o estrógeno aumenta o conteúdo de colágeno (23). Em contrapartida, outros autores afirmaram que a terapia de reposição hormonal com estrógeno diminuiu o colágeno total e aumentou a quantidade de ligações imaturas entre as fibras de colágeno no tecido

vaginal periuretral (35), favorecendo o surgimento de incontinência urinária e prolapso do assoalho pélvico.

Edwall et al., em 2007, observaram que existe uma correlação positiva entre os níveis séricos de estradiol e o pro-colágeno tipo I nas pacientes saudáveis sem terapia de reposição hormonal. Isto não é observado nas pacientes com incontinência urinária de esforço (36). Existe também correlação positiva entre os níveis séricos de estradiol e do telopeptídeo do colágeno tipo I e as pacientes com incontinência urinária de esforço sem terapia de reposição hormonal. Isto reforça a teoria de que os estrógenos podem aumentar o *turnover* (metabolismo) do colágeno no tecido urogenital de formas diferentes (36). Os mesmos autores em 2009, afirmaram que o estradiol tópico, ou seja, utilizado por via vaginal, melhora o metabolismo do colágeno. Inversamente, durante a reposição hormonal sistêmica o estradiol sofre metabolismo hepático, sendo convertido em estrona, que atua como antagonista do estradiol, não melhorando o metabolismo do colágeno. Também demonstrou que o tecido urogenital de pacientes com incontinência urinária de esforço e mulheres urologicamente saudáveis podem apresentar sensibilidades diferentes ao estrógeno, a qual estaria relacionada, também, à menopausa (37).

O aumento do risco de incontinência urinária de esforço nas pacientes em reposição hormonal também foi avaliado por Lin et al., que analisaram o papel do estrógeno na diminuição da concentração e da qualidade do colágeno, com aumento da produção dos colágenos tipo I e III, alterando os tecidos de suporte da uretra e aumentando a contratilidade vesical (38). Teleman e colaboradores

(2009), com o estudo WHILA, avaliaram 6.440 mulheres entre 50-59 anos, na perimenopausa, e correlacionaram os níveis de estradiol e incontinência urinária. Observaram que os níveis de estradiol total foram mais elevados no grupo incontinente do que no grupo continente. Dessa forma, sugeriram que o estrógeno poderia influenciar a conformação e organização das moléculas de colágeno, produzindo tecido conectivo de maior mobilidade e elasticidade no assoalho pélvico (39).

Hendrix et al. (2005) avaliaram dados obtidos no WHI (Women's Health Initiative) referentes a 27.347 mulheres na pós-menopausa entre 50-79 anos, e observaram que a terapia de reposição hormonal com estrógeno isoladamente ou associado com a progesterona aumentou o risco de incontinência urinária, levando ao seu desenvolvimento ou piora após um ano de tratamento. A partir destes dados, afirmaram que a TRH (terapia de reposição hormonal) com estrógenos não deve ser prescrita para prevenção ou tratamento da incontinência urinária (40). Corroborando esta afirmação, um estudo desenvolvido para avaliar a terapia de reposição hormonal na prevenção de doenças do coração (estudo HERS), mostrou que a TRH com estrógeno e progesterona oral aumentou o risco de incontinência urinária de esforço em 16% e incontinência de urgência em 12% das mulheres pós-menopausa. Das pacientes que já tinham IU no início do estudo, 18% pioraram da incontinência de urgência e 22% da IUE (41). Em 2009, Townsend et al., publicaram um estudo com 7.341 mulheres pós-menopausa (NHS), entre 37 e 54 anos, em que sugeriu que a TRH pós-menopausa aumentou o risco de incontinência (42). Este aumento na incidência não pareceu variar com

o tipo de hormônio ou a via de administração. Por outro lado, Waetjen e colaboradores (2005) demonstraram que doses muito baixas de estradiol, empregadas para prevenção de osteoporose, não se associaram com risco significativo de desenvolvimento ou piora da IU (43).

Em estudo recente, no qual foi avaliada relação entre os níveis de estradiol e o desenvolvimento ou piora da incontinência urinária em 1.587 mulheres durante a perimenopausa, Waetjen et al. (2011) observaram que ano após ano o nível de estradiol endógeno não teve efeito no desenvolvimento ou piora da IU (44). Estes achados abalam a crença de que a redução dos níveis de estrógeno esteja associada à incontinência urinária.

Recentemente, tem surgido importante interesse no uso da suplementação de andrógenos nas mulheres (45). Entretanto, vários efeitos adversos têm sido associados à terapia de reposição dos andrógenos, principalmente relacionados à dose, o que tem limitado o seu uso (45).

A suplementação de andrógenos em mulheres está usualmente baseada na presunção de que benefícios clínicos poderiam ser adquiridos com doses menores do que nos homens (45). Embora os efeitos anabólicos dos andrógenos em homens tenham sido largamente estudados, os dados destes efeitos em mulheres são limitados e pouco esclarecidos.

Embora exista interesse significativo na aplicação clínica dos andrógenos no assoalho pélvico e trato urinário inferior feminino, não se sabe o exato papel dos andrógenos nestes sistemas e várias pesquisas serão necessárias para esclarecer estas dúvidas. Os estudos em tecidos humanos sofrem restrições

legais e éticas, razão pela qual os modelos animais fornecem a principal fonte de informações para estudos envolvendo efeitos dos andrógenos no assoalho pélvico e trato urinário inferior.

1.3. Aspectos Técnicos da Microscopia de Luz Polarizada e Birrefringência

A microscopia de polarização, como o nome já demonstra, é um método de microscopia que utiliza polarizadores, localizados um acima das objetivas (chamado de analisador) e outro imediatamente abaixo do condensador (polarizador), e sua óptica tem cristais isentos de tensão (46).

Este tipo de microscopia traz informações valiosas sobre a ultraestrutura e a organização molecular de células e tecidos (46). Este método, quando quantificado, atinge níveis elevados de precisão, permitindo a determinação estatística exata da ordem molecular, da direção da vibração e de variações nos estados de agregação molecular (47, 48, 49, 50).

Esta modalidade de microscopia óptica permite a determinação das anisotropias ópticas (birrefringência e dicroísmo) em preparados biológicos (46). Uma vez determinada a birrefringência, esta permite interpretações das propriedades físico-químicas e características funcionais das estruturas em estudo (51).

A birrefringência é adquirida através da diferença de índices de refração do objeto, o que significa que num corpo birrefringente, a propagação da luz ocorre com velocidades diferentes em direções diferentes, ou seja, duas direções de propagação com um índice de refração para cada uma delas. Esta alteração de

propagação provoca um brilho característico à microscopia (49). A birrefringência é expressa matematicamente pela equação:

$$B = n_e - n_o$$

(birrefringência intrínseca) onde n_e é o índice de refração na direção de propagação do raio extraordinário e n_o o índice de refração na direção do raio ordinário. O raio ordinário obedece as leis de refração $n_o = \sin(i)/\sin(r)$, enquanto o extraordinário não segue as leis de refração e é perpendicular àquele (46).

Quando a luz polarizada penetra no corpo birrefringente, propaga-se em dois caminhos ópticos diferentes:

1) o raio ordinário = $n_o \times e$

2) raio extraordinário = $n_e \times e$ e: espessura do espécime em estudo

O brilho exibido pelo objeto decorre da diferença de caminho óptico ou retardo óptico (RO), que é representado pela equação (52,53):

$$RO = S \cdot \frac{e^2}{2\epsilon_0 m \omega^2} = S \times 2.510^{-15}$$

Onde:

S: número de ligações peptídicas/cm²;

e: carga do elétron

m: massa do elétron

ϵ_0 : permissividade (constante dielétrica) do espaço;

ω_0 : ressonância da frequência deste oscilador eletrônico

O corpo birrefringente colocado entre polarizadores deverá exibir brilho máximo quando um dos seus eixos de propagação for colocado a 45 graus dos dois polarizadores:

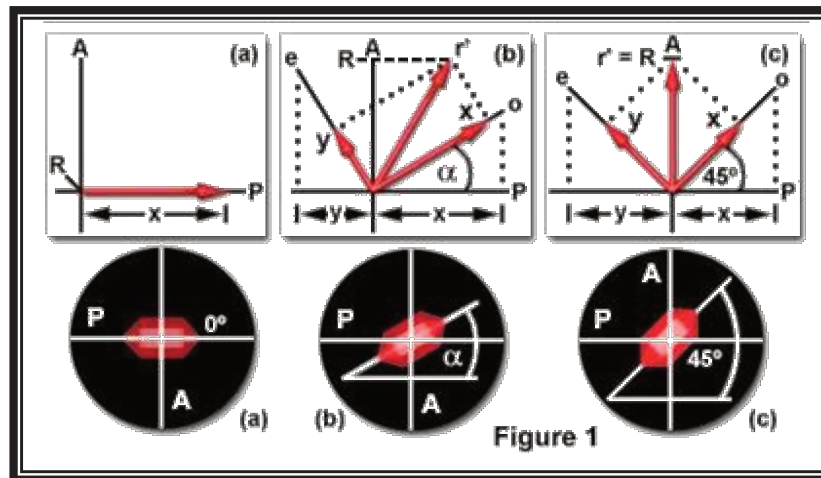


Figura 1. Esquema representativo da análise da birrefringência. Onde P – eixo do polarizador e A – eixo do analisador.

(a): ilustra espécime birrefringente anisotrópico com eixo óptico longo paralelo a direção do polarizador.

(b): com o espécime orientado a ângulo α , obtém-se a resultante r' .

(c): com o espécime orientado a 45 graus do plano de luz polarizada, obtém-se o brilho mais intenso ($r' = R$). (55)

Quando estas direções são paralelas ao analisador e polarizador, as imagens birrefringentes desaparecem, e o objeto se torna negro. Quando isto não acontece, o brilho permanecerá em alguns setores do objeto (46).

O colágeno e as fibras musculares, além da birrefringência de forma, apresentam, também, birrefringência intrínseca positiva, que é secundária à ligações químicas nos microcorpos (50).

A birrefringência intrínseca, como explicada anteriormente, é uma anisotropia óptica resultante de um alinhamento assimétrico das ligações químicas

ou moléculas dentro de um meio de transmissão, independente do índice refrativo do meio de imersão (50).

A birrefringência de forma é uma anisotropia óptica revelada por corpos mistos, isto é composto, nos quais partículas assimétricas de um dado índice refrativo estão dispersas com a orientação preferencial em meios de índices refrativos diferentes. A birrefringência de forma é variável em função da supra-organização dos diferentes tecidos. Nos tendões ela “toma” até 80% e no colágeno a birrefringência total é de 80% a 95 % (50).

Feixes colágenos embebidos em água têm apresentado RO mais elevado, resultante da soma da birrefringência de forma com a intrínseca (47, 48, 49,54).

A demonstração da birrefringência, avaliada em termos de RO, estuda as peculiaridades estruturais dos tecidos, e se correlaciona com suas funções biomecânicas (50,54).

Provenzano e Vanderby, em 2006, afirmaram que o comportamento mecânico do tecido conectivo é determinado pela composição e organização do colágeno. O tecido imaturo é mais desorganizado, ou seja, com fibras colágenas desordenadas e com várias pontes de proteoglicanos entre elas, comparado com o tecido maduro, que é mais organizado, contínuo, com poucas interligações, que resultam em maior resistência do tecido (56). Conforme estudo realizado por Huiling et al., 2008, quanto mais organizadas, ou seja, mais bem orientadas as fibras colágenas, maior sua birrefringência e maior resistência (57).

Durante o desenvolvimento do tecido muscular ocorre compactação ordenada das miofibrilas dentro do miócito. Esse fato parece ser determinante para o aumento da força de contração do miócito e do músculo como um todo (58). Assim como ocorre com o colágeno, a compactação e organização das miofibrilas dos miócitos podem ser estudadas por meio de microscopia de polarização (55).

2. Objetivo do Estudo

- Analisar o efeito da suplementação de metiltestosterona sobre as propriedades anisotrópicas das fibras musculares e colágenas periuretrais de ratas.

3. Material e Métodos

3.1. Aspectos Éticos

Este estudo foi desenvolvido no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, no Laboratório de Biologia do colágeno tipo I e tipo II e no Laboratório de Anisotropias Ópticas de Biopolímeros do Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas/Unicamp, após aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal, Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEa-IB-Unicamp), conforme protocolo 1000-1 (Anexo 1).

3.2. Composição dos grupos e tratamento realizado

Nas dependências do Núcleo de Medicina e Cirurgia da Unicamp, foram utilizadas 30 ratas Large Wistar, fêmeas, brancas, pesando entre 240g e 410g, com três meses de idade. Todos os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP).

Os animais foram randomizados em dois grupos (Anexo 2):

Grupo 1C (Controles): constituído por 15 ratas que receberam doses diárias de 0,1ml de óleo de sésamo (placebo) aplicados por via subcutânea durante 60 dias, de forma ininterrupta.

Grupo 2T (Testosterona): constituído por 15 ratas que receberam doses diárias de 0,075mg/kg/dia de metiltestosterona aplicados por via subcutânea durante 60 dias, de forma ininterrupta.

3.3. Coleta dos espécimes para o estudo

Todos os animais foram submetidos a eutanásia após 60 dias de tratamento. Após a identificação do animal, era realizada indução anestésica através da injeção intravenosa (veia da cauda) de pentobarbital sódico 45mg/kg. Após a indução anestésica, o animal era mantido sob ventilação espontânea com cateter de oxigênio nasal, com fluxo de 2l/min (60). Em seguida, o animal era imobilizado em decúbito dorsal, com abdução dos quatro membros e exposição do abdome. Eram realizadas tricotomia e antissepsia do abdome com polivinil pirrolidona iodo a 10%. Posteriormente, era realizada infusão intravenosa de pentobarbital sódico até ser constatada a morte do animal (parada cardiorrespiratória).

Imediatamente após o óbito eram retiradas, em bloco, a bexiga, uretra, vagina, reto e musculatura do assoalho pélvico.

3.4. Estudo anatomopatológico

3.4.1. Macroscopia

Foram introduzidos moldes de poliuretano na vagina e no reto no material retirado dos animais. Em seguida, foram fixados a um suporte plano de cartolina com grampos metálicos, para orientar a fixação e preparo do material, visando o exame microscópico posterior. A fixação das peças cirúrgicas foi realizada através de imersão em paraformaldeído a 4% por 48 horas e, em seguida, em álcool a 70%.

Após a fixação, foi realizada microdissecção com magnificação de 2,5 vezes em bloco das estruturas do assoalho pélvico dos ossos da bacia, identificando-se a uretra, a vagina, o reto e a musculatura perineal. Este material foi impregnado com parafina (Histosec - Merck Darmsdat, Alemanha) para confecção de blocos. Foram realizados dois cortes transversais de cada bloco, na espessura de sete micrometros, interessando uretra, vagina, reto e musculatura perineal. Em seguida estes cortes foram desparafinizados e hidratados, para o preparo de lâminas sem emprego de nenhuma coloração, visto que, segundo Vidal (47, 48, 49,54), as bandas colágenas embebidas em água apresentam seu maior retardo óptico.

3.4.2. Análise microscópica das imagens

Para a avaliação das imagens utilizou-se microscopia de luz polarizada, que analisa a birrefringência: propriedade dos tecidos correspondente a intensidade de brilho exibida pelos objetos quando examinados entre polarizadores cruzados.

As medidas da birrefringência foram feitas utilizando um microscópio Olympus Bx 51. As imagens foram analisadas em um software (Image Pro-Plus 5.1 System) acoplado ao fotomicroscópio (aparelho que capta imagem). Neste equipamento utilizou-se uma lente Neofluar, com objetiva de amplificação Optovar fator 2 40 X 2 para analisar as fibras musculares e 40 X 1 para as fibras colágenas.

Todas as observações foram iniciadas pelo posicionamento do maior eixo da fibra (muscular ou colágena) a 45 graus do azimute do vetor elétrico da luz polarizada (50). Em seguida foram selecionadas as áreas nas quais os feixes musculares e colágeno estavam bem definidos. Cada corte foi analisado em pelo menos seis locais. Todas as etapas foram realizadas pelo mesmo examinador, que recebeu treinamento prévio no Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

A birrefringência apareceu visualmente como brilho. Este fenômeno foi avaliado como tal com o analisador de imagem e expresso em valores em *Gray Average* (GA) ou média de cinza, considerados em pixel. Os parâmetros analisados foram área, *Gray Average* e desvio-padrão. Os tons de brilho estavam entre 50 e 255 pixel de níveis de cinza, onde 255 correspondeu aos valores máximos de brilho (50).

A amostragem foi definida através da análise das lâminas, nas quais a partir de uma média de 50 medidas para a musculatura periuretral e 150 medidas para o colágeno, obteve-se diferença entre os grupos. Com estes dados,

continuou-se a realização das medidas, sem mudanças significativas nos resultados.

Para as análises estatísticas foi utilizado o software Minitab. Os resultados obtidos nos dois grupos foram analisados através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 0,006 para fibras musculares e 0,005 para fibras colágenas.

4. Resultados

4.1. Observações durante o período de tratamento

Durante as aplicações de placebo ou testosterona, as ratas eram manipuladas apenas pelo examinador, que passou por treinamento prévio no Biotério com outros animais. Não houve óbito de nenhum animal durante o estudo, nem observado qualquer comprometimento sistêmico dos mesmos.

4.2. Estudo anatomopatológico

4.2.1. - Macroscopia

Durante a observação macroscópica dos cortes não foram detectadas diferenças entre o grupo placebo e o grupo exposto à metiltestosterona. Os tecidos periuretral e perivaginal encontravam-se íntegros, com aspecto normal em todos os animais.

4.2.2. Microscopia

Foi realizada, inicialmente, a análise morfológica das estruturas, na qual se considerou que o preparo das lâminas resultou em amostras nas quais as

imagens birrefringentes permitiram boa e acurada caracterização das fibras colágenas e das bandas anisotrópicas das fibras musculares.

As fibras colágenas estavam distribuídas em torno da uretra, fazendo um trançado. As fibras musculares estavam distribuídas em feixes mais organizados (planos), com aspecto linear.

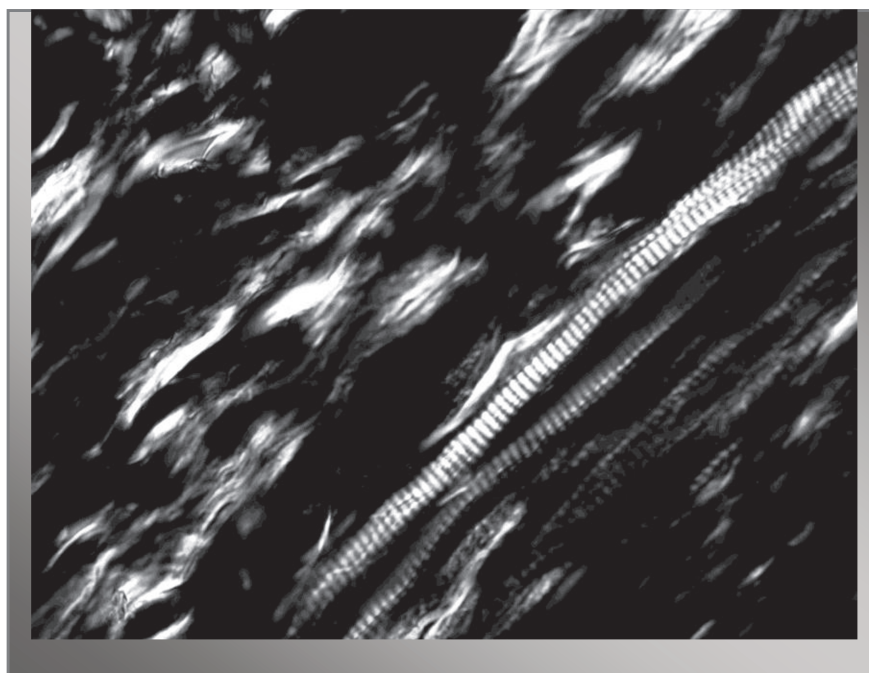


Figura 2. Microscopia de polarização – Aumento 40 x 2. Birrefringência. Imagem obtida de corte ultrafino (7 μ m) da região periuretral, sem contraste. Aspecto linear das fibras musculares periuretrais. Com as fibras musculares orientadas a 45 graus do plano de luz polarizada, obtém-se o brilho mais intenso, com os maiores valores de Gray Average (GA), enquanto as fibras em outras orientações têm menos intensidade de brilho, ou seja, menores valores de birrefringência.

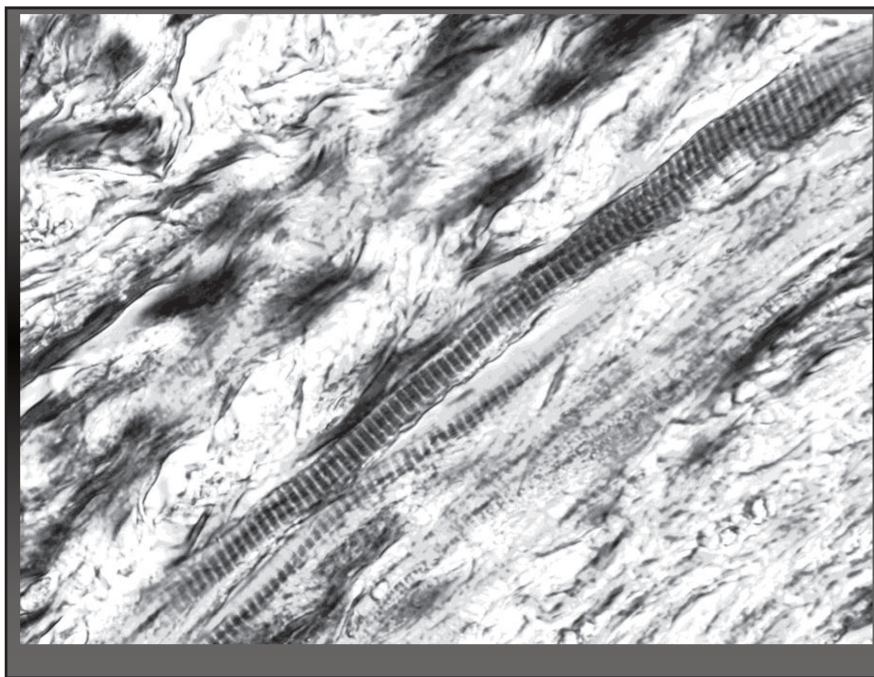


Figura 3. Microscopia de polarização – Aumento 40 x 2. Birrefringência. Compensação. O mesmo corte da página anterior, com a inversão do plano de luz, ficando totalmente pretas as fibras musculares, ou seja, no plano paralelo a luz. Aspecto linear das fibras musculares periuretrais no plano paralelo a luz polarizada.

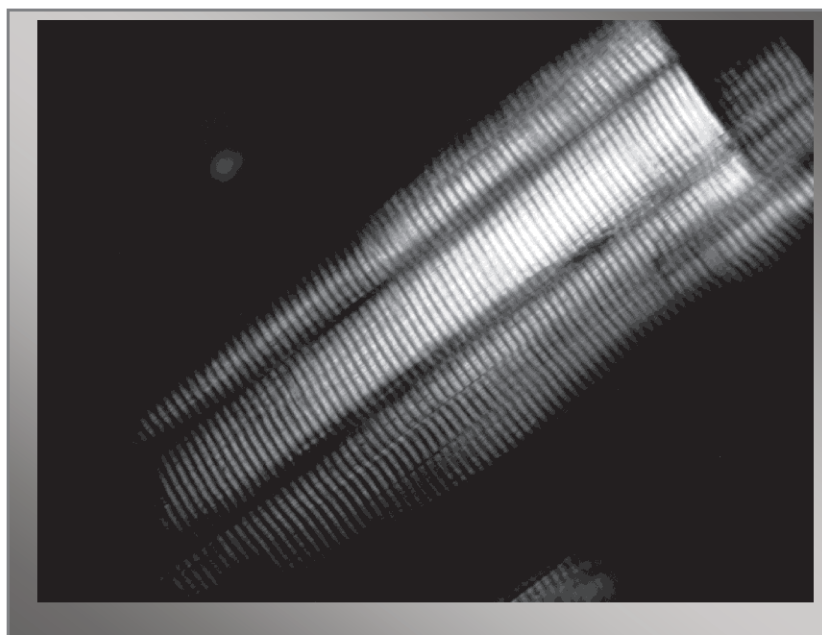


Figura 4. Microscopia de polarização - Aumento 100 x 2. Birrefringência músculo da região periuretral. Maior intensidade de brilho, com valores de Gray Average (GA) mais elevados.

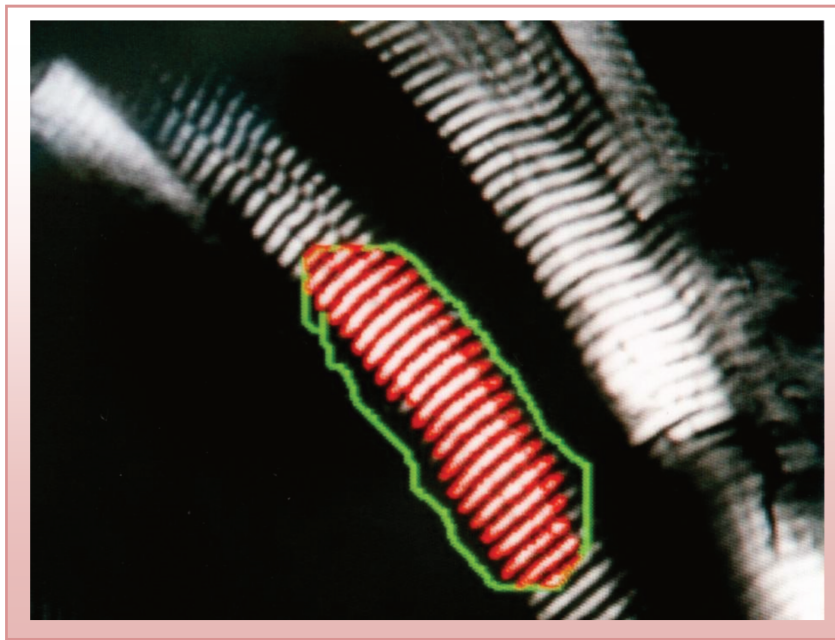


Figura 5. Microscopia de polarização - Aumento 100 x 2. Birrefringência do músculo periuretral. A área com maior brilho foi selecionada pelo examinador, e em seguida, o software realizou as medidas de intensidade de brilho Gray Average (GA).

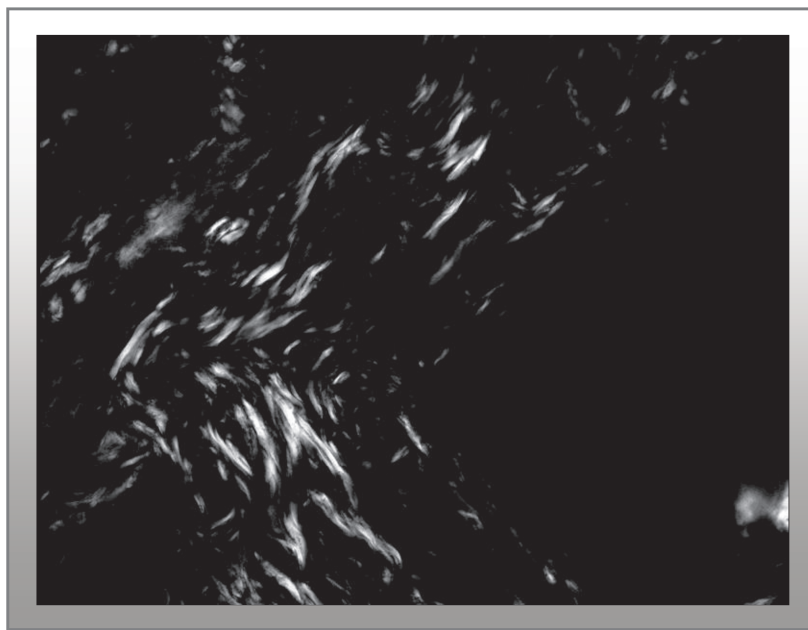


Figura 6. Microscopia de polarização - Aumento 40 x 1. Birrefringência. Aspecto trançado das fibras colágenas periuretrais. Imagem obtida de corte ultrafino (7 μ m) da região periuretral, sem contraste. Aspecto linear das fibras colágenas periuretrais. Com as fibras colágenas orientadas a 45 graus do plano de luz polarizada, obtem-se o brilho mais intenso, com os maiores valores de Gray Average (GA), enquanto as fibras em outras orientações têm menos intensidade de brilho, ou seja, menores valores de birrefringência.

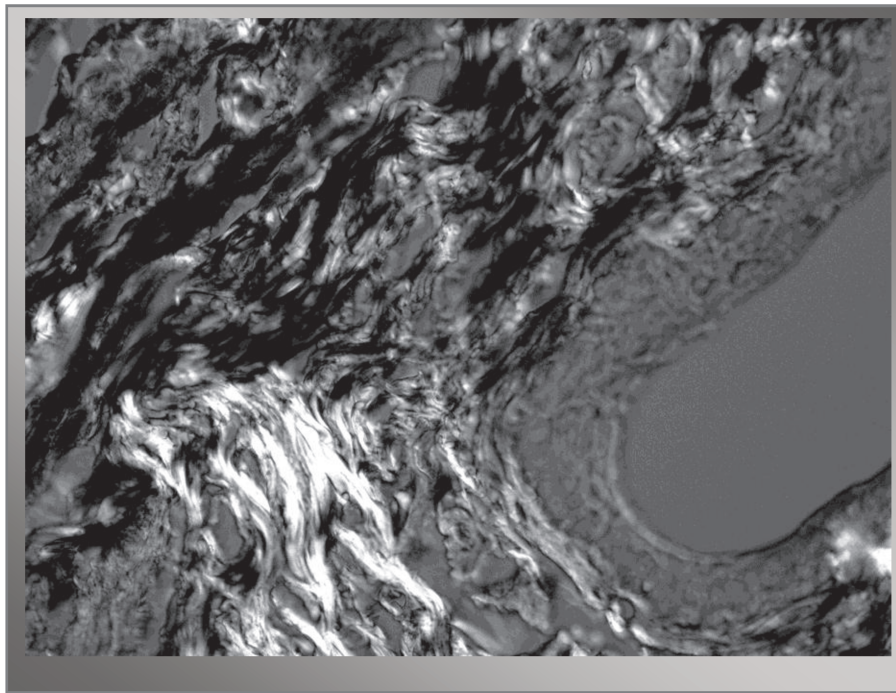


Figura 7. Microscopia de polarização – Aumento 40 x 1. Birrefringência. Aspecto trançado das fibras colágenas periuretrais. Com as fibras colágenas orientadas a 45 graus do plano de luz polarizada, obtem-se o brilho mais intenso, com os maiores valores de Gray Average (GA), enquanto as fibras em outras orientações têm menos intensidade de brilho, ou seja, menores valores de birrefringência.

Densidade de brilho das bandas anisotrópicas da musculatura periuretral, foram obtidas 196 medidas de Gray Average no grupo controle (Anexo 3), cuja mediana foi de 65,307 pixels. No grupo com suplementação de metiltestosterona foram realizadas 95 medidas (Anexo 4), cuja mediana foi de 84,762 pixels ($p=0,006$). A área total avaliada foi de $4,213 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. Os resultados estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Birrefringência das fibras musculares periuretrais				
Grupos	N	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75
Placebo	196	47,424	65,307	106,475
Testosterona	95	69,311	84,762	98,405
N= número de	medidas	de Gray	Average	p = 0,006

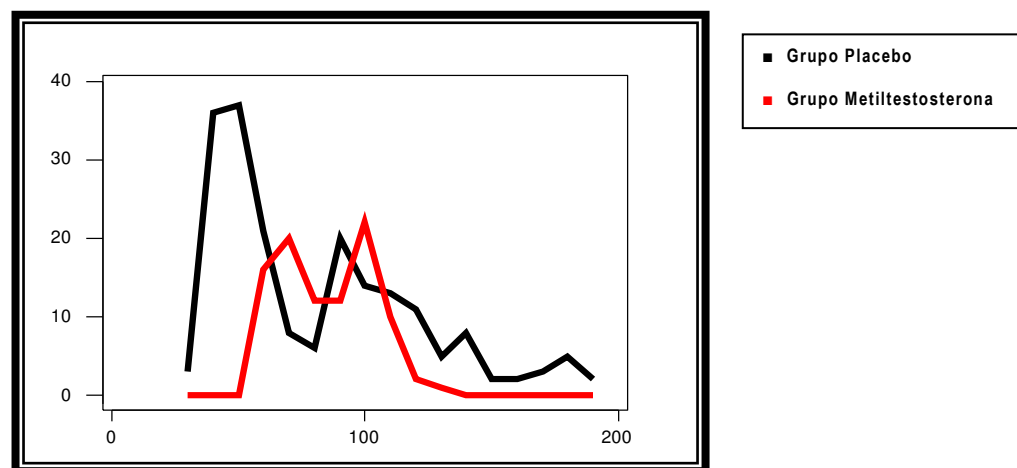


Figura 8. Histograma representativo das medidas de densidade de brilho obtidas a partir da quantificação da birrefringência nas fibras musculares periuretrais – Valores de Gray Average. Eixo Y: frequência; Eixo X: Gray Average (pixels)

A distribuição das medidas de densidade de brilho das fibras musculares periuretrais realizadas no grupo que recebeu suplementação da metiltestosterona tem sua distribuição deslocada para a direita, quando comparada com a distribuição das medidas do grupo controle. Isso denota que a frequência dos

valores mais elevados de birrefringência foi maior no grupo que recebeu suplementação, em relação ao grupo placebo.

Esta alteração pode ter se relacionado com a melhor organização das fibrilas dentro dos miócitos, levando a uma compactação ordenada do tecido muscular, resultando no aumento da birrefringência (58).

Na análise do colágeno periuretral, foram obtidas 555 medidas de Gray Average (Anexo 5) no grupo placebo (mediana: 95,943) e 511 medidas (Anexo 6) no grupo que recebeu metiltestosterona (mediana: 100,864), as quais estão sumarizadas na Tabela 2. Observou-se diferença significativa entre os grupos ($p=0,005$). Nesta análise foi avaliada área total de $23,224 \times 10^4 \mu\text{m}^2$.

<i>Tabela 2. Birrefringência das fibras colágenas periuretrais</i>				
Grupos	N	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75
Placebo	555	84,749	95,944	111,242
Testosterona	511	89,086	100,865	116,285
N= número de	medidas	de Gray	Average	p = 0,005

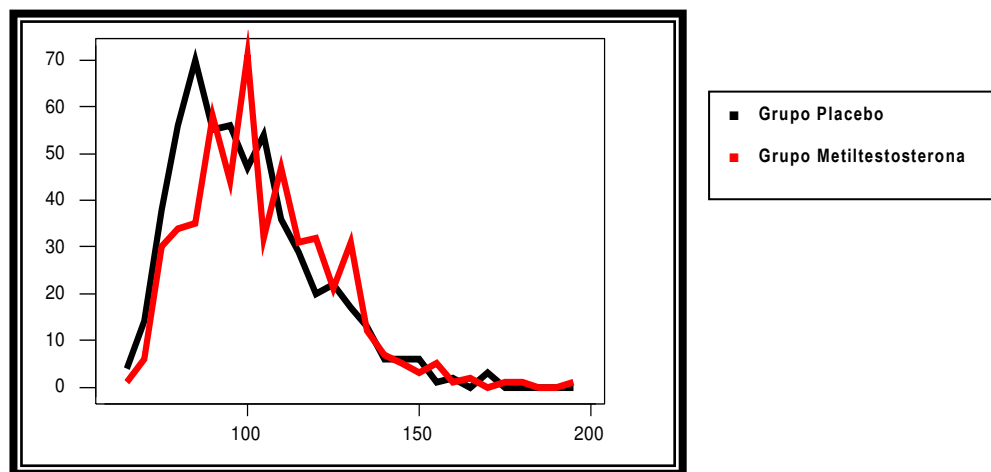


Figura9 . Histograma representativo das medidas de densidade de brilho obtidas a partir da quantificação da birrefringência nas fibras colágenas periuretrais – Valores de Gray Average. Eixo Y: frequência; Eixo X: Gray Average (pixels)

A distribuição das medidas de densidade de brilho das fibras colágenas periuretrais realizadas no grupo que recebeu suplementação de metiltestosterona tem sua distribuição deslocada para a direita, quando comparada com a distribuição das medidas do grupo controle (Figura 9). Isso denota que os valores de birrefringência mais elevados foram observados no grupo que recebeu a suplementação, em relação ao grupo placebo.

O alinhamento mais ordenado das fibras de colágeno determina o aumento da birrefringência no tecido periuretral das ratas com suplementação de testosterona. Os valores de intensidade de brilho mais elevados sugerem uma maior compactação ordenada destas fibras, tornando o tecido mais resistente (58).

5. Discussão

Os andrógenos são conhecidos por melhorar os efeitos anabólicos da musculatura estriada. Sabe-se que a suplementação de testosterona está relacionada ao aumento da massa muscular livre de gordura, com o aumento do diâmetro e adequação da forma das fibras musculares. Relaciona-se, ainda, com a melhora nas funções cognitiva e sexual em homens (60). Nestes, a dose ideal para suplementação ou reposição e os efeitos adversos vêm sendo extensivamente estudados e encontram-se bem estabelecidos (61).

A partir dos resultados obtidos em homens, vem ocorrendo uma busca constante da compreensão dos efeitos dos andrógenos sobre os sintomas apresentados pelas mulheres na pós-menopausa. Postula-se que os andrógenos modificariam e, eventualmente promoveriam melhora das alterações cognitivas e de alterações do humor, como a depressão, das anormalidades da função sexual e alterações relacionadas ao trato urinário inferior a assoalho pélvico (61).

Alguns avanços significativos têm sido alcançados. Atualmente já existe nível de evidência “A” para terapia de reposição com testosterona por via transdérmica, na dose de 300 microgramas de liberação diária, nas mulheres pós-menopausa com a finalidade de melhorar a satisfação sexual (61).

No nosso estudo foi demonstrada melhora na ultraestrutura e organização da matriz extracelular e tecido muscular periuretral com a suplementação da testosterona em ratas normais. Dessa forma, apresentamos dados experimentais que corroboram o possível uso da testosterona em mulheres com incontinência urinária e disfunções do assoalho pélvico.

Para obter evidências objetivas da influência dos andrógenos sobre o trato urinário feminino são necessários métodos de quantificação das alterações apresentadas pelos tecidos postos em estudo. Os conflitos encontrados nos diversos estudos sobre este tema podem se relacionar com diferentes abordagens metodológicas ou, ainda, com variações da técnica para a medição das alterações e para a avaliação direta dos espécimes obtidos.

A microscopia de polarização é um método que traz informações importantes sobre ultraestrutura e organização molecular de células e tecidos, as quais são expressas através das propriedades ópticas teciduais e, em particular sua birrefringência. Esta, quando quantificada fornece níveis elevados de precisão, e permite determinar a ordem molecular da direção da vibração e de variações no estado de agregação molecular (46,50). Corroborando esta afirmação, Rieppo et al. em 2008, descreveram que a microscopia de luz polarizada é um método tradicional para a visualização da arquitetura colágena da cartilagem articular, com suas formas de avaliação e análise se modernizando ao longo dos anos, com a utilização de softwares cada vez mais sofisticados e precisos (62).

A determinação das anisotropias ópticas (birrefringência e dicroísmo) em preparados biológicos permite interpretações das propriedades físico-químicas e características funcionais das estruturas. A birrefringência é um método acurado para detectar e medir a ordem molecular e o arranjo das fibras colágenas e musculares (47, 48, 54).

As fibras colágenas têm uma organização planar, em forma de ondas. Os tecidos musculares se comportam como unidades contráteis, com adesão entre as células garantida por zonas de adesão e por junções comunicantes (63). Como sua função e propriedades dependem fundamentalmente da integridade e da organização espacial de sua estrutura, a microscopia de luz polarizada é o método mais apropriado para descrever e interpretar as avaliações concernentes a estes tecidos (51, 64).

No nosso estudo demonstramos que há aumento nas densidades de brilho dos tecidos muscular estriado e colágeno periuretrais das ratas submetidas à suplementação de metiltestosterona. Isso sugere que ocorreu melhora da organização das fibras colágenas e miofibrilas musculares, que poderá determinar maior resistência do tecido. Segundo Vidal e colaboradores, as medidas de birrefringência permitem uma acurada observação morfológica tecidual e podem estar relacionadas diretamente com as propriedades biomecânicas da estrutura em análise. Por exemplo, a birrefringência de forma aumenta em tendões calcâneos de ratos submetidos a exercício (55).

É conhecida a influência dos hormônios sexuais sobre os tecidos do trato urinário inferior em mulheres. Uma aludida melhora no padrão de resistência do

assoalho pélvico induzida por suplementação hormonal na menopausa não encontra guarida à luz dos estudos relacionados ao assunto (27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 61).

Alguns estudos prospectivos randomizados observacionais têm, inclusive, demonstrado aumento nos riscos de desenvolver incontinência urinária e piora da gravidade dos sintomas de incontinência entre as mulheres que fazem terapia de reposição hormonal (42). Samsioe e colaboradores (1985) demonstraram em um estudo duplo-cego, placebo-controlado, que após o uso de estriol oral (3mg/dia) mulheres com idade média de 75 anos apresentaram melhora dos sintomas de urgência e da incontinência urinária mista, porém não houve melhora entre as mulheres com incontinência urinária de esforço (65).

Com relação aos andrógenos, existem poucos dados relacionados à presença de receptores no trato urinário feminino, especialmente em humanos. Rosenweig et al. (1995) (66) encontraram receptores andrógenos em altas concentrações no epitélio do trígono vesical e uretra de coelhos não-estrogenizados e em moderada quantidade no músculo liso da bexiga e uretra. Observações recentes têm mostrado que os andrógenos podem ter importante papel nas alterações do assoalho pélvico e do trato urinário inferior, porque os músculos destas estruturas, principalmente o elevador do ânus e o esfíncter uretral são sensíveis a estes hormônios (67) e contêm uma grande quantidade de receptores androgênicos (31). Cayzergues et al. (2005) também observaram que existem modificações na expressão dos receptores androgênicos nos motoneurônios do nervo pudendo, que controla o esfíncter uretral externo, em

ratas ooforectomizadas, sugerindo que a testosterona provavelmente influencia a transmissão do impulso nervoso e a coordenação da continência urinária no nível espinhal (68). Complementando esta afirmação, Sinha-Hikim e colaboradores, em 2002, observaram que a administração de testosterona está associada com o aumento do número de receptores de andrógenos e com o consequente aumento da resposta do músculo esquelético (69).

Edwall et al. (2007), foram mais além nas suas conclusões, sugerindo que existe correlação negativa entre a testosterona e os marcadores do metabolismo do colágeno tipo I e tipo III nas mulheres com IU de esforço, a qual não existe nas pacientes normais. Estes resultados sugerem que as mulheres saudáveis tem o tecido urogenital menos sensível a ação da testosterona do que as mulheres com IU de esforço (36).

A hipertrofia muscular induzida pela testosterona tem sido associada com o aumento do número de núcleos dentro da fibra muscular e com a estimulação da produção de proteínas musculares. Ho et al. (2004), sugeriram que os efeitos anabólicos dos andrógenos desempenham papel importante no músculo elevador do ânus de ratos (70). Este modelo experimental tem sido largamente utilizado para avaliar a atividade androgênica.

Com base nos dados supracitados e no nosso estudo, observamos que a musculatura e o colágeno da região periuretral sofrem modificações pela suplementação da testosterona. Estas modificações parecem se correlacionar positivamente com a continência urinária.

Huiling e colaboradores (2008), avaliaram a resistência da cérvix e sua correlação com os andrógenos em ratas durante a gestação. Afirmaram que a dehidrotestosterona acelera o declínio da resistência cervical ao longo da gestação e que seu antagonista, a flutamida inibe este efeito. Neste estudo, foi utilizada a microscopia de luz polarizada com quantificação da birrefringência para avaliar a organização das fibras colágenas e esta análise foi correlacionada com um método físico de quantificação da resistência do colo do útero. Nas ratas que utilizaram flutamida, as fibras colágenas estavam mais organizadas e com birrefringência mais elevada do que nas ratas tratadas com dehidrotestosterona. O uso da androstenediona e da dehidroepiandrostenediona não alteraram significativamente a resistência cervical, demonstrando efeitos diferentes dos diversos andrógenos nestes tecidos (57).

Analizando ainda as fibras colágenas, a resistência do tecido e a birrefringência, Martin et al. em 1996, afirmaram que o córtex lateral do osso de equinos é mais forte do que das outras regiões, por ter fibras colágenas mais organizadas que as outras áreas (71). Isso corrobora nossa inferência de que o aumento da intensidade da birrefringência do colágeno, verificada no nosso estudo, poderia se relacionar com aumento da resistência tecidual.

Alguns autores relacionaram a atividade androgênica ao aumento da pressão de fechamento uretral (72). Com base nestas evidências pode-se considerar que os andrógenos contribuem para a melhora da continência urinária. Madeiro et al. (2002), demonstraram que a reposição hormonal com combinação de testosterona com estrógeno produzia mais efeitos nos vasos sanguíneos,

bexiga, na espessura epitelial da uretra, bem como na quantidade de fibras musculares em ratas do que o estrógeno ou a testosterona isoladamente (73).

Mammadov e colaboradores (2011) avaliaram o efeito da testosterona no assoalho pélvico num modelo experimental de IU em ratas. Foram avaliados quatro grupos: sendo três com IU de esforço induzida por lesão do nervo ciático e um grupo controle. O primeiro grupo foi submetido à reposição de testosterona após 30 dias da indução da IU, no segundo a reposição de testosterona era realizada apenas no momento da lesão ciática e o terceiro grupo recebeu solução salina (sham). Foram realizadas análises urodinâmicas e histológicas dos animais, nos quais se verificou que: os grupos com suplementação da testosterona apresentaram áreas musculares maiores que o controle e que o valor da pressão de perda (VLPP) foi mais alto nos grupos tratados que no controle e no grupo sham. A partir destes dados, o autor concluiu que a testosterona teve efeitos preventivos e curativos no modelo experimental de IU de esforço em ratas (74). Esses dados confirmam a sensibilidade dos tecidos do trato urogenital a ação da testosterona, e demonstram que os espécimes com incontinência urinária de esforço induzida experimentalmente e que receberam reposição da testosterona têm o mesmo comportamento clínico e histomorfométrico que o grupo controle, sem IU de esforço.

Os estudos experimentais têm como finalidade a avaliação dos efeitos clínicos e histopatomorfológicos em condições controladas e conhecidas. A partir dos dados obtidos nestes estudos, são criadas as bases para a tentativa de

reprodução dos resultados em modelos humanos, com objetivo de fundamentar e permitir as aplicações clínicas.

Apesar dos dados anteriores terem demonstrado a influência dos andrógenos no trato urinário inferior, Teleman et al. (2009) não observaram correlação dos níveis séricos dos andrógenos com incontinência urinária durante a avaliação de mais de 6000 mulheres, no estudo WHILA. Neste estudo apenas os níveis elevados de estradiol estavam relacionados com o aumento da incidência de IU (39). Em outro estudo multicêntrico, chamado SWAN, com mais de 3300 mulheres na fase de transição da menopausa, foram analisados os níveis séricos de hormônios esteróides (estradiol, FSH, testosterona e DHEA) e não foi encontrada correlação com o desenvolvimento ou com a piora da incontinência urinária (44). Estes achados modificam a crença de que a redução pura e simples dos níveis de estrógenos está associada à incontinência urinária e sugerem a existência de um mecanismo mais complexo, no qual pode haver a participação da variabilidade genética e da expressão dos receptores na determinação da influência estrogênica sobre as alterações do trato urinário inferior (28, 31, 44).

O estudo de Bai et al. (2003) também tentou correlacionar os níveis de metabólitos urinários dos andrógenos com incontinência urinária de esforço. Nesta análise, que incluiu apenas mulheres na pós-menopausa, não foram encontradas diferenças nos níveis de metabólitos dos andrógenos na urina de mulheres normais comparadas com aquelas com IU de esforço (33).

Apesar de eventuais dados conflitantes, cuja existência já foi mencionada e possivelmente atribuível a variações na metodologia e técnica das análises,

existe uma tendência consistente, verificada a partir do conjunto de estudos sobre o tema, a considerar um papel relevante dos andrógenos nas alterações histomorfométricas do trato urinário inferior e do assoalho pélvico. Por consequência, justifica-se sugerir uma linha de investigação que inclua estudos clínicos visando o uso de testosterona como alternativa futura para o tratamento e eventual prevenção da incontinência urinária.

6. Conclusão

- A suplementação com metiltestosterona promoveu aumento da birrefringência das fibras colágenas e musculares periuretrais de ratas quando comparadas com o grupo controle.

7. Referências Bibliográficas

1. Abrams P, Cardozo L, Fall M, et al. The standardization of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of International Continence Society. *Neurourol Urodyn* 2002; 21: 167-78.
2. Chen GD, Lin TL, Hu SW, Chen YC, Lin LY. Prevalence and correlation of urinary incontinence and overactive bladder in Taiwanese women. *Neurourol Urodyn* 2003; 22:109-17.
3. Teloken C, Caraver F, Weber FA, Teloken PE, Moraes JF, Sogari PR, Graziottin TM. Overactive Bladder: Prevalence and Implications in Brazil. *European Urology* 2006; 49:1087-92.
4. Santos CRS, Santos VLCG. Prevalence of Urinary Incontinence in a Random Sample of the Urban Population of Pouso Alegre, Minas Gerais, Brazil. *Ver. Latino-Am. Enfermagem* 2010; 18(5):903-10.
5. Hunskaar S, Lose G, Sykes D and Voss S. The prevalence of urinary incontinence in women in four European countries. *BJU Int* 2004; 93:324-30.
6. Dooley Y, Kenton K, Cao G, Luke A, Durazo-Arvizu R, Kramer H, Brubaker L. Urinary Incontinence prevalence: Results from the National Health and nutrition examination Survey. *J Urol* 2008; 179:656-61.
7. Fenner DE, Trowbridge ER, Patel DL, Fultz NH, Miller JM, Howard, DeLancey JOL. Establishing the Prevalence of Incontinence Study: Racial Differences in Women's Patterns of Urinary Incontinence. *J Urology* 2008; 179:1455-60.

8. Minassian VA, Drutz HP, Al-Badr A. Urinary Incontinence as a worldwide problem. *Ginecol Obstetrics* 2003; 82:327-38.
9. Campbell AJ, Reinken J, McCosh L. Incontinence in the elderly: prevalence and prognosis. *Age Ageing* 1985; 14(2):65-70.
10. Hsieh C, Su T, Chang S, Lin S, Lee M, Lee MY. Prevalence of and attitude toward urinary incontinence in postmenopausal women. *Ginecol aObstet* 2008; 100:171-4.
11. Lasserre A, Pelat C, Gueroult V, Hanslik T, Chartier-Kastler E, Blanchon T, Ciofu C, Montefiore ED, Alvarez FP, Bloch J. Urinary Incontinence in French Women: Prevalence, Risk Factors, and Impact on Quality of Life. *Eur Urol* 2009; 56:177-83.
12. Ashton-Miller JA, Howard D, DeLancey JO. The functional anatomy of the female pelvic floor and stress continence control system. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2001; 207:1-7.
13. DeLancey JO. Anatomy and physiology of urinary continence. *Clin Obst Gynecol* 1990; 33:298-302.
14. Raz S, Caine M, Ziegler M. The vascular component in the production of intraurethral pressure. *J Urol* 1972; 108:93-6.
15. Rud T, Anderson KE, Asmussen M, Hunting A, Ulmsten U. Factors maintaining the intraurethral pressure in women. *Invest Urol* 1980; 17:343-7.
16. Mostwin JL. Current concepts of female pelvic anatomy and physiology. *Urol Clin North Am* 1991; 18:175-83.
17. McGuire EJ, O'Connell HE. Urethral function. *J Pelvic Surg* 1995; 1:36-42.
18. Oelrich TM. The striated urogenital sphincter muscle in the female. *Anat Rec* 1983; 205:223-9.

19. Morgan DM, Umek W, Guire K, Morgan HK, Garabrant, A, De Lancey JOL. Urethral Sphincter Morphology and Function with and Without Stress Incontinence. J Urology 2009; 182:203-9.
20. Ho HM, Bhatia NN. Lower Urinary Tract Disorders in Postmenopausal Women. Treat Postm Woman 2007; 12:693-737.
21. Stav K, Alcalay M, Peleg S, Lindner A, Gayer G, HersHKovitz I. Pelvis Architecture and Urinary Incontinence in Women. Eur Urol 2007; 52:239-44.
22. Friedman DW, Boyd CD, Norton P, Greco RS, Boyarsky AH, Mackenzie JW, Deak SB. Increases in type III collagen gene expression and protein synthesis in patients with inguinal hernias. Ann Surg 1993; 218(6):754-60.
23. Brincat M, Moniz CJ, Studd JW, Darby A, Magos A, Emburey G, Versi E. Long-term effects of the menopause and sex hormones on skin thickness. Br J Obstet Gynaecol 1985; 92(3):256-9.
24. Petros PE, Ulmsten UI. An integral theory of female urinary incontinence. Experimental and clinical considerations. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl. 1990; 153:7-31.
25. Parkes A S, Zuckerman S. The menstrual cycle of the primates. Part II some effects of oestrin on baboons and macaques. The Menstrual Cycle of the primates (1931)272-276.
26. Ulmsten U, Stormby N. Evaluation of the uretral mucosa before and after oestrogen treatment in postmenopausal women with a new sampling technique. Gynecol Obstet Invest 1987; 24:206-11.
27. Iosif CS, Batra S, Ek A, Astedt B. Estrogen receptors in the human female lower urinary tract. Am J Obstet Gynecol 1981; 41(7): 817-20.

28. Altman D, Forsman M, Falconer C, Lichtenstein P. Genetic influence on stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Eur Urol* 2008; 54(4):918-22.
29. Sartori MGF, Baracat EC, Girao MJBC, Gonçalves WJ, Sartori JP, Lima GR. Menopausal genuine stress urinary incontinence treated with conjugated estrogens plus progestogens. *Int J Gynecol Obstet* 1995; 49; 165-9.
30. Batista RLA, Souza FO, Dias LAR, Silva ACJSR, Freitas MMS, Sá MFS et al. Systematic review of hypoestrogenism influences and training on urinary incontinence. *Femina* 2010; 38; 3:135-40.
31. Copas P, Bukovsky A, Asbury B, Elder RF, Caudle MR. Estrogen, Progesterone, and androgen receptor expression in levator ani muscle and fascia. *J Women's Health* 2001; 10:785-95.
32. Parekh MH, Chichester P, Lobel R W, Aikawa K, Levin R M. Effects of castration on female rabbit bladder physiology and morphology. *Urology* 2004; 64(5):1048-51.
33. Bai SW, Jung BH, Chung BC, Kim SU, Kim JY, Rha KH et al. Relationship between urinary profile of the endogenous steroids and postmenopausal women with stress urinary incontinence. *Neurol Urodynamic* 2003; 22:98-205.
34. Raz S, Zeigler M, Caine M. The effect of progesterone on the adrenergic receptors of the urethra. *Br J Urol* 1973; 45:131-5.
35. Jackson S, James M, Abrams P. The effect of oestradiol on vaginal collagen metabolism in postmenopausal women with genuine stress incontinence. *BJOG* 2002; 109(3):339-44.
36. Edwall L, Carlstrom K, Jonasson AF. Endocrine Status and Markers of collagen synthesis and degradation in serum and urogenital tissue from

women with and without stress urinary incontinence. *Neurourol Urodyn* 2007; 26:410-15.

37. Edwall L, Carlström K, Jonasson AF. Different estrogen sensitivity of urogenital tissue from women with and without stress urinary incontinence. *Neurourol Urodyn* 2009; 28(6):516-20.
38. Lin AD, Levin R, Kogan B, Whitbeck C, Chichester P, Sokol R, Mannikarottu A. Estrogen induced functional hypertrophy and increased force generation of the female rabbit bladder. *Neurourol Urodyn* 2006; 25(5):473-9.
39. Teleman P M, Persson J, Mattiasson A, Samsioe G. The relation between urinary incontinence and steroid hormone levels in perimenopausal women. A report from the Women's Health in the Lund Area (WHILA) study. *Acta Obstet Gynecol* 2009; 88: 927-32.
40. Hendrix SL, Cochrane BB, Nygaard IE, Handa VL, Barnabei VM, Iglesia C et al. Effects of estrogen with and without progestin on urinary incontinence. *JAMA* 2005; 293; 8:935-48.
41. Steinauer JE, Waetjen LE, Vittinghoff E, Subak LL, Hulley SB, Grady D, et al. Postmenopausal hormone Therapy: Does it cause incontinence? *Obstet Gynecol* 2005;106:940-5.
42. Townsend M K, Curhan G C, Resnick N M, Grodstein F . Postmenopausal hormone therapy and incident urinary incontinence in middle-aged women. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200: 86.e1-86.e5.
43. Waetjen LE, Brown JS, Vittinghoff E, Ensrud KE, Pinkerton J, Wallace R, et al. The Effect of ultralow-dose transdermal estradiol on urinary incontinence in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 2005; 106: 946-52.
44. Waetjen LE, Johnson WO, Xing G, Feng W, Grendale GA, Gold EB, (SWAN). Serum estradiol levels are not associated with urinary incontinence

- in midlife women transitioning through menopause. *Menopause* 2011; 12:1-8.
45. Paderó MCM, Bhasin S, Friedman TC. Androgen supplementation in older women: too much hype, not enough data. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50: 1131-40.
 46. Vidal BC. Métodos em Biologia Celular. *Biologia Celular* 1ª. Ed São Paulo, Atheneu, 1987. p. 5-34.
 47. Vidal BC. Evaluation of carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell Mol Biol* 1986; 32:527-35.
 48. Vidal BC. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell Mol Biol* 1980; 26:415-21.
 49. Vidal BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron* 2003; 34:423-32.
 50. Vidal BC, Mello ML. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: Na approach to spatially resolved supramolecular organization. *Acta Histochemica* 2010; 112: 53-61.
 51. Gathercole LJ, Keller A, Shah JS. The periodic wave pattern in native tendon collagen: correlation of polarizing with scanning electron microscopy. *J Microsc* 1974; 102(Pt 1):95-105.
 52. Landowne D. Molecular motion underlying activation and inactivation of sodium channels in squid giant axons. *J Membr Biol* 1985; 88(2):173-85.
 53. Cantor CR, Schimmel PR. *Biophysical chemistry II: Techniques for the study of biological structure and function*. San Francisco, CA: W.H. Freeman & Co; 1980.

54. Vidal Bde C, Bozzo L. Variation of birefringence of the collagen fibers. *Rev Biol Oral* 1966; 4:1-7.
55. Vilarta R, Vidal Bde C. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix*. 1989 9(1):55-61.
56. Provenzano PP, Vanderby R. Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol* 2006; 25:71-84.
57. Huiling J, Dailey T L, Long V, Chien EK. Androgen-regulated cervical ripening: a structural, biomechanical, and molecular analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 543.e1-543.e9.
58. Morton MJ, Thornburg KL. Fetus and neonates: physiology and clinical applications. Vol 1 The circulation. 1993 1^a. Ed. p.149-58.
59. Eisele PH. Anesthesia for laboratory animals: practical considerations and techniques. *Exp Animal Biom Res* 1990; 1:298-300.
60. Ferrando AA, Sheffield-Moore M, Paddon-Jones D, et al. Differential anabolic effects of testosterone and amino acid feeding in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:358-62.
61. Santen RJ, Allred DC, Ardoin SP, Archer DF, Boyd N, Braunstein G et al. Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine society scientific statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(7 Suppl 1):s1-s66.
62. Rieppo J, Hallikainen J, Juverlin JS, Kiviranta I, Helminen HJ, Hyttinen MM. Practical considerations in the use of polarized light microscopy in the analysis of the collagen network in articular cartilage. *Microscopy Res Tech* 2008; 71:279-87.

63. Klaunig JE, Shi Y. Assessment of gap junctional intercellular communication. *Curr Protoc Toxicol* 2009; Chapter 2:Unit2.17.
64. Kastelic J, Galeski A, Baer E. The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res* 1978; 6(1):11.
65. Samsioe G, Jansson I, Mellström D, Svanborg A. Occurrence, nature and treatment of urinary incontinence in a 70-year-old female population. *Maturitas* 1985; 7(4):335-42.
66. Rosenzweig BA, Bolina PS, Birch L, Moran C, Marcovici I, Prins GS. Location and concentration of estrogen, progesterone, and androgen receptors in the bladder and urethra of the rabbit. *Neurourol Urodyn* 1995; 14(1):87-96.
67. Nnodim JO. Quantitative Study of the Effects of denervation and castration on the levator ani muscle of the rat. *Anat Rec* 1999; 255:324-33.
68. Cayzergues L, Yaici E, Tabard SB, Jestin A, Blanchard P, Giuliano F, et al. Morphological study of the spinal motoneurons controlling the urethral sphincter of female rats: role of androgens in a menopausal model. *J Urol* 2005; 173:1022-6.
69. Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, Storer TW, Casaburi R, Shen R, Bhasin S. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283(1):E154-64.
70. Ho MH, Bhatia NN, Bhasin S. Anabolic effects of androgens on muscles of female pelvic floor and lower urinary tract. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; 16:405-9.
71. Martin, RB, Lau ST, Mathews PV, Gibson VA, Stover SM. Collagen fiber organization is related to mechanical properties and remodeling in equine bone. A comparison of two methods. *J Biomech* 1996; 29:1515-21.

72. Bump RC, Friedman CI. Intraluminal urethral pressure measurements in the female baboon: effects of hormonal manipulation. J Urol 1986; 136(2):508-11.
73. Madeiro A, Girão M, Sartori M, Acquaroli R, Baracat E, Rodrigues D LG. Effects of the association of androgen/estrogen on the bladder and urethra of castrated rats. Clin Exp Obstet Gynecol 2002; 29(2):117-20.
74. Mammadov R, Simsir A, Tuglu I, Evren V, Gurer E, Özyurt C. The effect of testosterone treatment on urodynamic findings and histopathomorphology of pelvic floor muscles in female rats with experimentally induced stress urinary incontinence. Int Urol Nephrol 2011; 29. [Epub ahead of print].

8. Anexos

8.1. Anexo 1 – Protocolo do Comitê de Ética

	Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia	 CEEAB-IB-UNICAMP
---	--	---

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAB-IB-UNICAMP**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1000-1, sobre **"EFEITOS DO SUPLEMENTO DE ANDRÔGENO SOBRE O CONTEÚDO DE COLÁGENO DO TRATO URINÁRIO INFERIOR DE RATAS ADULTAS"** sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Cássio Luis Zanettini Ricetto / Daniel Rogério Mendes Fernandes** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAB)-IB-UNICAMP em reunião de 22 de março de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1000-1, entitled **"EFFECTS OF ANDROGEN ON THE COLLAGEN CONTENT IN THE LOWER URINARY TRACT OF ADULT FEMALE RATS"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on March 22, 2006.

Campinas, 31 de outubro de 2011.
2ª. VIA

 _____ Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	 _____ Fátima Alonso Secretária Executiva
--	---

CEEAB-IB - Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP - Brasil	Telefone: (19) 3788-6359 Telefax: (19) 3788-6356 E-mail: ceea@cemb.unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm
---	--

8.2 - Anexo 2 - Randomização dos Grupos de Estudo

Número do espécime	Tratamento
1/NO	Placebo
2/NO	Metiltestosterona
3/NO	Placebo
4/NO	Metiltestosterona
5/NO	Placebo
6/NO	Metiltestosterona
7/NO	Placebo
8/NO	Metiltestosterona
9/NO	Placebo
10/NO	Metiltestosterona
11/NO	Placebo
12/NO	Metiltestosterona
13/NO	Placebo
14/NO	Metiltestosterona
15/NO	Placebo

Número do espécime	Tratamento
16/NO	Metiltestosterona
17/NO	Placebo
18/NO	Metiltestosterona
19/NO	Placebo
20/NO	Metiltestosterona
21/NO	Placebo
22/NO	Metiltestosterona
23/NO	Placebo
24/NO	Metiltestosterona
25/NO	Placebo
26/NO	Metiltestosterona
27/NO	Placebo
28/NO	Metiltestosterona
29/NO	Placebo
30/NO	Metiltestosterona

NO – Não submetida a ooforectomia

8.3. Anexo 3 - Medidas de densidade média do músculo periuretral no grupo placebo

Area	Densidade
8,0647583	64,711357
9,0484486	62,748547
107,81546	79,187843
8,0647583	60,484173
6,8933411	51,983662
5,0986695	56,301914
28,046436	75,973495
5,3990331	56,524338
26,229239	75,07959
25,756166	72,27668
1,7571262	52,551281
24,629803	74,420731
24,997747	74,034843
23,435858	71,030441
22,392096	66,705231
20,837715	65,193153
18,232061	61,971581
15,731536	58,044868
11,256121	55,685791
6,5253959	52,110474
4,265161	57,044014
2,8759801	59,984333
1,1939447	52
282,73212	100,51901
1,3215992	77,085228
12,750428	114,85513
8,4852676	103,83451
2,7708528	101,72358
1,6294718	96,737328
1,1639084	90,335487
10,610339	113,06511
9,4314127	101,13455
12,397501	102,08843
12,908119	101,05933
16,850389	108,48574
17,75148	113,85237
1,824708	87,946503
18,997988	116,72767
1,7496171	87,103004
20,402187	125,37394

Area	Densidade
19,583696	120,33589
18,765207	120,505
17,66888	114,79983
16,850389	106,40998
16,1145	102,96925
20,071787	114,38571
45,497555	127,94273
41,540264	116,33405
17,300934	117,63541
16,580063	114,6712
14,582645	106,80072
14,372391	103,97701
10,910703	98,521683
5,474124	132,4815
42,83183	147,0461
2,342835	130,0994
8,905776	148,5793
8,094795	144,9443
7,351396	142,8121
6,562942	138,0664
6,397741	137,9824
6,683087	137,4843
7,14865	137,9296
7,028505	138,8878
6,119905	135,5656
4,287688	130,7916
2,620671	57,00573
4,422852	59,517826
12,562701	59,068142
2,0499806	55,289379
14,177155	61,371822
3,2364161	56,327145
6,3827233	57,475296
14,590155	62,199692
14,740336	65,420784
60,027637	66,88166
5,7219238	160,71523
1,7796534	159,1519
7,6517591	167,81354
8,748086	174,44635

Area	Densidade
9,5891027	180,0235
9,6416664	182,5257
9,2812309	185,19904
8,6805038	185,17387
7,8169589	180,60519
7,4264865	178,91811
6,9083595	176,88152
5,902142	173,43002
1,4642718	88,682053
6,9459047	91,839996
11,413811	99,659866
18,299643	107,64834
2,3803804	85,8265
14,6277	105,56571
20,342115	113,19897
21,588623	116,35304
21,085514	119,93661
21,258223	123,07065
19,756407	124,50855
85,633621	124,22738
14,019464	116,39368
10,865648	106,49758
7,1561594	104,29486
5,4290695	95,716461
1,051272	88,242859
3,0637071	49,125
8,2975407	43,762897
11,864356	47,678482
12,555192	48,763157
12,502628	47,567566
13,328629	51,977467
13,418737	52,489086
13,163428	52,905876
13,456283	52,728237
10,813085	55,558334
12,990719	50,539883
11,353739	46,936508
11,759229	46,54023
11,939447	48,638363
12,855556	48,455025
12,705374	47,047871
1,2014538	33,368752

Area	Densidade
12,990719	48,302891
11,331211	45,861496
9,9495392	46,474716
9,408885	44,531525
8,6880131	44,269665
3,6193795	43,935684
1,0662903	38,96479
1,133872	30,344372
3,0336709	33,58416
8,3651218	38,266605
8,8306856	37,748299
2,0349624	37,121773
2,1175623	35,716312
9,2361765	39,58374
2,0199442	36,401485
15,378609	40,796387
7,1486502	40,95483
2,1100533	38,480427
14,192173	45,345501
2,4629803	41,088413
13,073319	51,581276
3,2063799	45,412178
14,357373	49,180962
4,0098519	43,211609
14,319827	47,962769
4,8884153	45,596004
5,1812696	38,076813
15,025681	49,22139
16,18959	53,787106
15,220918	54,203255
18,08939	58,653797
38,056049	59,430149
20,131861	49,770233
17,270899	49,762608
69,346413	51,53503
1,3516356	38,366665
9,2136488	47,37653
12,112156	53,472412
5,3689966	44,27972
5,4365783	43,972374
4,5880518	41,731586
1,0813084	36,736111

Area	Densidade
2,9961255	40,952381
10,309976	48,078659
1,3516356	37,799999
8,4251947	45,5
8,3501043	43,084534
1,0362539	39,920288
1,0362539	39,289856
8,4101763	43,025894
5,3840151	41,454674
1,2389992	37,836365
4,7907972	39,653606
1,3441265	37,486034
2,5455801	36,808258
1,3741628	36,491802
1,3140901	36,228573
1,4342355	36,460732
4,4679065	87,189919

Area	Densidade
6,089869	89,320595
8,5528488	93,826164
13,058301	86,124207
9,9195032	94,461014
9,3713398	94,32933
9,5440483	96,579857
9,3488121	94,654617
8,935813	92,968071
9,7392845	92,599846
7,7268496	89,139938
6,3977413	85,670189
6,9233775	90,196312
6,8182502	88,056168
2,620671	81,699142
1,0587811	79,085106

8.4. Anexo 4 - Medidas de densidade média do músculo periuretral no grupo testosterona

Area	Densidade
2,778362	96,754051
3,5668161	95,658951
12,277356	98,405502
13,651519	101,93949
13,343646	102,66179
13,073319	104,8811
12,923138	104,75189
3,8821976	95,605415
18,051844	94,302826
21,896496	96,463646
11,931938	89,147888
3,1913617	84,762352
22,872677	99,188118
24,40453	100,10062
21,453459	98,378372
4,8358517	86,777954
7,2537775	88,388199
92,053886	134,80887
6,8032322	116,86092
11,241102	121,90381
2,6732347	114,41854
107,86051	87,930519
6,6830869	76,868538
4,4303608	66,159325
8,5228128	71,333923
10,114739	74,172974
21,738804	73,367874
5,4891419	65,746925
1,3441265	62,469273
1,914817	62,384315
8,635449	96,71739
13,3061	99,70486
13,35116	97,02587
24,10417	96,29657
15,0407	92,61058
12,05959	94,37733
9,949539	97,01509
4,4303608	66,159325
8,5228128	71,333923

Area	Densidade
10,114739	74,172974
21,738804	73,367874
5,4891419	65,746925
1,3441265	62,469273
1,914817	62,384315
8,635449	96,71739
13,3061	99,70486
13,35116	97,02587
24,10417	96,29657
15,0407	92,61058
12,05959	94,37733
9,949539	97,01509
1,907308	85,73228
13,1409	98,35257
17,00808	101,2406
14,45499	97,26494
13,16343	99,07701
24,10417	96,29657
15,0407	92,61058
12,05959	94,37733
9,949539	97,01509
1,907308	85,73228
13,1409	98,35257
17,00808	101,2406
14,45499	97,26494
13,16343	99,07701
16,18959	108,2876
16,74526	108,8251
18,04433	109,779
17,63884	113,3912
16,85039	110,6952
17,2709	111,1348
16,58006	110,5059
16,70772	111,4265
25,71862	111,2686
8,530322	104,706
20,327097	69,66642
30,013819	67,12384
15,581354	66,258797

Area	Densidade
13,628991	64,955925
17,376026	64,610199
16,932989	65,944565
15,678972	66,856804
17,18079	67,121506
42,779266	74,044235
49,657589	78,107063
21,979095	78,746155
21,258223	78,831154
1,2389992	55,763638
121,87998	82,67556
20,785151	80,089592
3,5367796	59,411888
2,1100533	62,843418
17,158262	70,989494
11,451357	70,948853
31,770945	70,682343
13,005737	76,627602
14,026973	72,102249
16,204609	70,552361

Area	Densidade
7,3513956	72,179779
10,873157	64,479279
2,6732347	69,311798
22,790077	77,89193
3,0862346	61,489052
10,587811	61,96312
4,5354881	63,698677
7,0360141	61,081108
2,5605984	62,79179
1,5318536	61,024509
1,39669	57,924732
2,1851442	59,831615
4,9635062	71,717094
7,6292315	75,868111
83,651222	77,897308
7,1786866	75,358788
121,95507	92,674339
1,8171989	86,818184
2,7107801	89,991692
1,9298352	88,424126

8.5. Anexo 5 - Medidas de densidade média das fibras colágenas periuretrais no grupo placebo

Area	Densidade
139,70851	168,65106
243,63487	118,32842
52,919891	122,93368
214,42604	104,71782
56,102539	120,65882
105,33905	130,66667
45,982052	146,93028
93,78347	133,27913
85,856636	116,6772
1188,2805	148,89812
60,638531	109,20216
546,9364	140,99185
43,933838	114,44938
97,932777	125,97257
292,14746	146,5321
43,552059	97,625153
265,49673	152,48935
51,695404	94,985458
174,30104	125,44788
58,878548	96,93058
517,28131	122,6412
246,28194	128,24268
577,45374	116,66638
66,745964	93,703819
82,673935	149,29659
132,80788	124,46445
303,98578	111,24181
650,71381	135,19095
77,230766	131,11276
57,558372	112,39443
59,68174	104,97086
114,20287	125,19109
160,57401	136,8812
561,92743	138,67465
172,81346	146,99181
426,14532	135,388
272,93274	133,11649
182,48064	170,96773

Área	Densidade
127,67692	147,98721
55,347332	94,427437
93,538956	170,66278
59,518093	111,61304
83,432419	11694569
57,257687	109,42844
57,257687	109,42844
225,99664	158,94284
375,25281	106,83234
59,45536	104,27885
380,72571	116,80286
120,96967	95,494537
77,90004	94,987015
192,89122	99,322418
76,576477	86,72242
141,41878	110,60081
71,163017	114,70575
60,617069	103,76444
53,405739	74,377312
46,179531	100,50172
484,0571	112,82063
48,837498	75,039429
104,2682	126,65896
86,505188	80,877846
49,534054	101,29392
53,941048	88,11042
164,03925	91,540382
60,995369	73,179398
157,97147	106,88225
889,70801	129,00276
153,80717	97,39328
100,60978	86,194923
303,7923	111,54317
61,421803	80,709625
177,21594	116,57789
91,329597	85,677689
86,719269	86,503914
42,202091	94,54892

Área	Densidade
109,56274	86,623451
40,600849	84,542091
267,25143	107,55497
347,70956	95,60952
2994,5574	131,37558
1420,1365	117,49564
49,301003	84,262276
107,25758	116,13351
42,712627	89,190659
53,331356	98,017578
42,682941	111,4797
84,086838	95,935486
87,299232	94,742218
235,66327	105,43084
195,56802	113,04452
77,587654	78,192894
108,90838	90,933266
433,07544	110,891
43,682667	80,212044
96,133171	87,728394
216,12134	111,02854
271,3266	113,9362
111,89767	102,95492
95,151657	97,658813
44,110661	74,434128
131,57343	106,22626
203,92624	98,341866
74,36055	92,840431
494,70541	120,82606
52,290318	65,236328
215,61568	119,33334
164,06892	101,33492
89,143288	103,51143
163,92029	89,911987
49,970261	81,16613
158,86382	100,00981
58,432449	84,736176
218,50117	126,22368
131,97495	109,54028
60,48484	102,6866
107,793	117,3064
592,3854	144,693

Área	Densidade
76,20462	91,3298
162,1505	121,4796
59,04221	103,9457
93,03977	136,8397
133,8192	130,8556
84,86019	93,7298
165,2886	126,5667
62,78996	78,53079
51,68467	86,58999
240,0059	147,5937
281,4398	140,1218
1660,767	144,2391
153,6734	104,179
115,4223	118,73
59,48838	123,7795
61,511	96,37633
47,2189	65,53241
81,3306	103,2624
107,5848	104,8733
55,24241	94,13947
420,5382	129,6195
310,3658	105,0353
287,5669	106,5595
267,1923	137,1116
110,2023	105,3934
250,0595	102,2472
263,5038	120,3108
58,50676	90,59659
43,33149	89,62854
671,1483	116,6682
188,4294	151,6079
53,31816	110,121
88,89052	92,31057
212,6413	124,9856
73,27486	86,0203
379,7742	141,1009
100,1487	103,8528
84,65196	100,9208
53,1504	88,67975
50,89232	115,3976
62,3339	102,65
305,4431	102,8781

Área	Densidade
231,4692	131,7549
237,9833	133,0525
40,23894	97,65349
436,2287	89,127
71,2671	72,38379
53,06443	94,29702
841,1957	124,2609
61,28778	84,90606
44,92865	89,31191
217,4301	102,3449
73,83915	116,3363
70,15173	82,85257
174,5092	93,49606
237,4926	130,7282
91,59716	133,0921
294,5269	118,8961
95,38969	110,704
96,87672	109,4208
62,65629	92,69178
49,89418	97,65673
115,2289	102,4645
119,2594	81,8823
90,27366	82,19508
64,76798	74,40547
79,78876	96,96232
81,39494	89,15453
68,03982	102,5418
121,0886	130,962
108,611	103,1119
441,40381	136,61568
76,323593	103,33687
803,47998	133,19511
48,854858	77,305618
41,655956	80,965118
270,37485	99,030357
127,24563	105,32368
40,871056	116,9908
177,15645	137,91693
69,452644	106,08509
42,618492	76,108864
487,6265	103,93916
48,044289	82,865768

Área	Densidade
216,19576	127,78403
59,845394	85,235832
66,374138	88,917366
1548,394	124,56808
650,20813	119,78574
325,461	99,542671
79,372437	108,84842
59,994057	77,422203
280,85947	104,1034
154,4171	130,53246
69,988068	87,353218
4946,192	136,8101
129,9227	80,74387
126,7252	108,7793
79,25344	84,47237
1482,986	125,5472
181,514	131,7127
46,67935	133,2765
51,20378	97,88495
282,6591	102,5815
367,4301	154,532
47,6056	91,10581
328,45047	139,58865
315,34814	96,587158
98,245094	112,37652
251,79948	128,25781
343,3967	119,12698
178,37598	104,8471
53,56929	86,694931
53,123199	78,877312
521,26721	102,11942
332,59961	118,10888
172,09999	99,631645
1475,6986	116,15058
176,20459	103,52577
306,58829	106,741
601,10046	104,77512
52,189476	82,005249
81,290901	91,601532
137,53722	82,999176
85,142769	76,282051
1159,1907	103,13864

Área	Densidade
551,10004	86,710922
422,75412	117,55003
82,748329	91,402939
154,19383	100,20319
83,789383	96,367386
83,65554	85,440506
512,90906	125,43367
82,263367	112,47577
99,509247	76,322121
61,772125	131,81572
78,837074	97,209534
124,43481	159,53348
306,45456	116,71645
57,153484	88,052582
272,27853	122,02135
373,14072	96,7248
93,57518	81,860146
53,304108	73,234871
109,41408	79,759186
73,334274	69,243835
56,424736	74,90731
51,353371	70,37394
78,658585	89,408798
78,078552	80,260742
59,458641	76,015221
110,52941	74,104752
130,11601	88,880562
66,59232	69,73289
48,74239	71,92762
85,60381	76,2325
533,1053	102,9776
80,10111	82,64325
178,58417	106,42642
68,927193	77,832138
40,91309	79,309044
266,83527	130,78532
64,411079	78,989983
271,80261	79,589333
72,412247	70,810471
54,699558	86,573967
972,54602	97,672661
72,560951	92,185905

Área	Densidade
113,608	86,175217
72,585815	87,52037
47,06525	96,141174
176,88875	107,69936
103,06862	85,613708
199,55385	80,654137
47,532959	82,793343
202,55798	72,916519
121,19273	85,220139
45,77137	81,508492
123,30444	92,395935
112,909	84,092392
174,30095	100,42763
422,36777	85,789764
89,886948	88,227951
371,04391	99,956421
71,653717	77,739571
100,17841	79,245811
69,345276	106,7136
352,70676	102,339
250,87755	121,85757
129,58057	87,484474
284,23553	80,347084
224,53894	96,344193
444,2149	95,799568
52,528244	91,344208
54,803673	78,238144
139,76807	75,083496
92,415268	96,952766
49,018421	69,877907
41,660839	81,204369
56,008312	85,500969
335,50763	88,841148
59,279423	85,894249
303,95551	81,999626
68,062256	93,764519
50,330494	113,5961
59,00433	83,467415
75,2481	82,465569
87,055542	77,840355
113,08379	97,956268
83,905441	93,453796

Área	Densidade
407,8504	102,64473
734,7829	120,27789
402,89902	88,305809
132,34889	85,204079
230,58594	97,88784
160,96001	88,004807
205,97842	124,69495
84,703781	100,11494
301,75137	107,85251
59,071239	75,153572
179,13664	111,85159
4004,1699	121,39223
72,198761	111,60863
647,88672	87,607666
530,19336	94,009392
56,340645	68,033691
125,45296	93,378983
63,400818	88,239799
50,98978	74,575882
111,88947	125,60945
43,367802	144,97223
126,57007	102,26672
75,463013	85,783546
1977,5076	115,89985
44,816818	106,64554
162,98318	112,2391
169,26341	113,82428
230,49542	93,376839
203,62328	74,421295
241,72714	82,716774
62,176304	95,254448
40,579762	82,97319
1424,0951	110,01815
71,764252	82,066254
175,18788	99,621902
347,28287	119,4122
1383,6359	109,41624
141,66675	99,846893
393,41797	85,595161
697,58472	87,221138
44,914162	76,518776
179,37819	86,455673

Área	Densidade
157,54846	94,320534
316,78775	102,4021
144,89745	95,101158
935,38672	96,448799
180,31415	87,012711
287,77194	86,187355
83,694092	100,80133
237,83224	105,31151
53,485615	87,4375
140,82135	84,597939
163,15593	89,190941
212,59071	104,08823
64,313309	82,011864
129,52901	95,09465
42,835876	81,78186
95,440857	81,843025
602,53644	98,514832
68,614365	92,111465
138,79845	84,930214
87,91761	78,388611
281,70282	106,55897
188,46648	75,639595
82,51487	103,07838
43,516926	77,158295
142,21036	79,271805
160,6265	107,52445
219,11403	104,87102
183,63556	93,835556
57,556641	81,784348
50,281837	81,788673
128,98564	89,534126
147,88661	86,493668
82,102226	98,843246
169,41435	101,80452
104,83926	109,36201
51,380512	73,487808
419,56552	86,33123
96,195702	105,23402
103,11338	126,51265
59,871555	84,748627
59,460606	76,577133
101,86868	110,57159

Área	Densidade
49,530315	75,414375
56,451302	95,943581
72,708656	77,217659
86,304085	98,119019
67,70327	81,856453
1313,2262	80,455269
82,49453	93,688332
222,85623	90,356636
60,79739	75,110321
89,207642	75,8097
934,48132	98,314644
97,289536	86,84407
68,989777	76,543716
60,160004	82,266548
624,81927	115,07408
62,92601	91,458618
831,49188	122,90364
67,668182	86,285484
63,325378	84,739868
47,998936	65,108459
572,88672	92,073326
121,86006	114,78296
100,66428	97,596489
192,33099	102,884
104,09808	122,52421
40,866585	71,854164
165,36856	74,748825
43,149605	87,628021
61,240246	97,023552
74,058929	78,51664
275,5134	130,69234
93,131119	88,156136
555,37494	118,25027
105,80559	92,590195
41,304329	94,657967
83,242813	77,619286
502,53635	100,49193
288,04373	105,887
113,61061	105,21088
381,79373	95,695602
56,899231	81,901329
65,4338	83,065987

Área	Densidade
54,710171	85,741348
137,71147	94,084282
819,8678	125,82583
565,27802	112,10439
674,69836	113,77977
53,507439	76,71373
51,82999	69,724487
94,476425	114,10131
238,04353	92,781464
55,324093	85,497162
430,85797	94,947823
94,711159	85,005875
613,82892	99,450172
102,00289	105,67897
89,13224	80,140022
102,3249	86,557465
274,57748	95,422119
235,74881	110,47922
197,55449	112,28913
224,4566	78,741936
186,20175	93,084816
100,35236	101,69103
53,255947	84,1483
1094,7468	109,2868
45,85516	74,664474
81,40097	87,956177
92,813965	82,338707
272,22229	93,291275
183,54457	89,648766
216,99895	89,906281
224,66821	90,878876
223,2188	102,98095
453,26114	106,83097
1245,955	105,5854
43,34916	68,65349
43,78195	75,93398
182,488	78,30961
108,8768	79,60802
339,2212	102,4746
40,00104	85,9947
1766,969	114,3126
52,59501	82,56078

Área	Densidade
104,1365	87,08758
81,43119	67,53827
63,91066	78,57238
118,0859	80,82948
170,3503	90,71203
47,28936	76,57111
94,54512	104,2046
3004,47	118,1206
1215,822	125,3716
47,12997	76,60811
88,44947	88,11601
104,1014	120,9979
103,261	91,52242
103,261	70,62605
604,288	111,0174
210,2658	84,27412
53,63324	81,60736
104,2977	105,9893
110,5072	83,06155
117,5121	79,3204
51,17581	88,11879
500,2418	115,454
90,77602	71,81705
56,98312	84,45094
61,88444	87,52857
446,9812	92,88454
668,6599	98,06828
67,28226	85,18841
133,6351	99,71417
136,5943	111,783
147,011	88,01837
78,20386	90,22562

Área	Densidade
295,4109	79,79715
109,2695	87,17109
44,85377	85,47356
145,2598	92,19098
482,5486	117,223
518,3576	97,36668
130,616	101,7048
108,5147	88,71109
54,36135	75,824
88,07377	80,54366
290,8818	82,89293
140,1572	83,01717
112,6661	89,18138
993,5994	111,7456
75,55513	99,05286
59,67037	82,91848
74,53706	82,03397
136,715	89,90032
47,48399	92,8186
44,75474	81,32947
404,2273	97,30468
97,66351	92,32877
60,92157	83,29696
76,35864	73,44492
80,67654	83,30114
48,2757	64,78178
105,6965	94,33438
89,7578	92,61758

8.6. Anexo 6 – Medidas de densidade média das fibras colágenas periuretrais no grupo testosterona

Area	Densidade
1203,8069	110,33983
82,111313	102,95899
77,766327	81,883026
103,6585	77,262505
107,45093	76,466805
130,81497	93,293854
63,659184	102,90096
157,4064	80,659225
58,29866	75,4375
176,04102	78,691513
313,14691	96,438232
297,30814	125,58961
257,67398	102,91096
404,46164	119,50214
256,48419	103,09488
222,15947	96,208267
576,65082	106,82138
72,784088	91,032974
892,47455	98,717484
218,64958	94,711975
183,32829	113,89417
131,40987	80,585808
42,695274	105,22656
150,53534	82,669044
115,34806	85,738258
620,4046	87,667473
95,107063	91,684296
80,011871	95,242805
77,022621	92,485985
380,6069	80,675522
83,477119	68,883965
560,82642	90,176689
52,171337	74,423676
1160,2317	119,02905
73,825218	85,310371
74,806602	93,202003
90,942894	103,8006
442,14758	110,10406
341,76089	120,08976
298,05173	117,49541

Área	Densidade
42,271442	92,568153
163,5931	132,6664
43,9321	90,23048
66,15109	110,1357
99,73234	156,6209
122,1594	87,07229
54,98797	87,5479
143,4266	125,1717
54,92269	96,82266
391,5526	132,2057
198,2748	120,9183
240,3033	113,6954
69,31886	99,94505
834,7117	109,1104
47,51633	63,49501
87,00173	99,28005
633,819	99,52197
213,028	112,1328
51,09644	110,9278
71,47519	88,27377
768,64948	118,29313
68,857796	87,735405
51,160011	89,109718
57,84922	131,70869
342,77228	111,33099
142,77213	105,6032
62,615681	100,91726
43,376938	82,673996
673,85504	101,20627
41,835167	74,443596
1598,3643	106,64204
49,196915	93,794563
201,57646	89,108307
49,910751	96,878693
143,06961	87,663902
42,224342	100,44559
71,891792	99,460732
77,320084	131,52377
48,02203	72,445824
62,760235	83,02401

Área	Densidade
49,226685	99,083435
46,564545	91,022148
615,9425	119,71344
125,36241	78,251732
63,152596	80,102516
99,78698	80,638672
496,49786	124,13873
324,03409	100,36205
200,40747	75,458069
71,397034	74,668167
44,124146	84,228363
634,54156	105,99543
51,36541	82,682106
349,21515	122,67607
42,726868	80,796951
429,04614	109,01803
167,27066	88,22998
72,411667	79,458771
52,14539	71,587135
139,40222	82,520126
1546,4386	129,05975
1002,114	100,91001
46,86998	83,576309
53,747375	96,659187
139,58342	100,54509
110,20528	98,866531
58,870056	81,233925
217,08963	107,5999
71,437393	74,319214
70,444214	75,253418
485,08456	129,62914
54,658112	77,526627
68,427879	97,298889
113,28341	87,589691
328,68387	90,130951
63,863907	93,521515
292,36136	124,17873
51,935837	73,424049
45,101971	78,465057
245,22974	80,424255
83,212639	76,557953
92,857719	74,076279

Área	Densidade
274,48691	115,23693
191,4252	76,856232
75,568756	74,039825
344,70633	112,44408
101,41917	70,845215
445,77313	114,05215
56,994785	101,50861
105,41981	82,456474
65,573029	78,469818
44,056973	77,348145
42,648033	82,56266
73,958405	89,086128
86,835701	75,075569
185,83955	100,64088
68,624168	77,385582
45,038345	77,108437
464,67435	88,774879
65,38018	78,168594
118,2066	76,795479
69,055389	74,942101
142,66328	88,610565
91,181969	126,53563
59,432053	82,063522
112,01699	97,201759
118,87074	78,265327
86,141289	94,128235
202,17404	96,991867
176,20789	76,322037
118,62424	98,802643
70,289764	84,543808
136,73021	104,12459
423,79272	112,37588
44,097183	77,323189
53,081516	100,72636
256,43124	114,34663
401,20807	116,69336
53,842888	86,020203
175,21135	77,646935
126,16257	77,089767
76,509743	87,936447
912,9837	141,22887
66,782524	86,793106

Área	Densidade
291,09332	129,98157
70,149033	81,227341
64,283089	75,885857
2415,0376	130,30383
62,355759	73,201767
268,23688	134,93498
161,89627	120,95695
93,713135	98,843414
56,541977	103,28571
40,75251	89,971428
53,735592	95,663345
127,37362	110,9876
61,089302	93,398575
77,777748	83,079323
732,12592	104,45681
45,365536	97,57074
89,429131	90,320595
138,13425	78,756599
88,637215	91,90715
49,912781	77,619148
157,51823	101,46089
446,31686	99,226135
40,448952	68,334229
123,67159	80,354546
162,07747	91,509155
64,343346	83,764511
371,0452	105,29403
1454,3495	101,50939
48,79569	73,51634
78,60309	86,0369
895,4114	99,28051
1163,588	128,7
75,99979	78,94872
207,0651	92,47272
56,4865	93,03509
1199,699	104,0887
156,8539	75,59729
77,4759	70,71409
78,50246	78,79391
67,60947	81,88328
117,14983	113,68987
147,97717	120,14362

Área	Densidade
179,07616	122,39079
122,30286	112,97597
499,39655	125,3603
52,583252	110,76646
46,026211	86,191391
78,426819	108,85734
95,56501	118,91696
40,36504	112,25253
60,638184	104,08913
335,14526	134,99016
70,273232	109,27372
88,969467	100,58646
75,330482	131,98973
94,072159	120,9361
75,271736	114,36061
366,18375	132,89064
146,61856	120,88461
105,01201	113,68988
110,46033	109,46922
206,44124	122,37254
70,249695	110,5119
79,1315	116,05054
70,531532	93,215454
73,743629	104,4904
63,85704	94,71553
128,0898	137,1538
641,0636	144,2215
68,45813	90,70279
64,31675	106,3299
104,9466	128,1016
49,83722	121,9553
385,5675	136,6922
50,80355	105,2807
151,9324	114,5626
62,09084	98,89041
73,59602	121,0709
68,69636	104,0453
370,1091	149,2952
69,54011	117,0235
42,11785	102,449
209,5413	125,4255
76,81154	113,2213

Área	Densidade
49,61091	98,08696
57,37394	124,2107
116,5996	129,0767
399,638	129,045
92,51216	121,0854
65,27794	109,9784
250,423	129,7883
90,49752	118,3755
344,1125	111,5845
48,07274	101,8098
60,79399	101,697
62,06225	101,7556
53,19374	83,65885
84,6032	115,0193
50,35222	112,9785
67,11448	143,4869
80,29721	97,86063
44,60547	99,05412
62,09581	108,4358
100,1527	127,4961
168,2066	118,422
581,2203	121,4458
716,9086	116,7747
193,2369	101,7749
68,2351	100,7543
283,1526	155,6713
252,0231	115,4617
76,63545	108,4858
202,8081	111,1344
56,40272	113,7421
187,0474	99,75257
228,5026	127,872
79,4804	120,0571
91,99883	91,96167
145,0753	128,8522
105,2538	130,3758
568,9013	155,9314
98,18842	100,0141
157,9861	109,9325
143,4734	138,1444
111,9851	131,1657
117,5122	101,9009

Área	Densidade
50,71957	99,50833
59,07986	97,59926
389,8554	115,3742
184,7224	125,7314
47,06958	105,19585
280,70663	118,3856
399,15482	139,01112
1264,6141	164,47768
105,52883	111,25918
281,40109	111,91579
196,3166	113,33334
80,132767	111,89494
91,203758	129,65816
1068,8112	193,36983
442,72388	153,1463
381,34076	122,07779
383,33325	136,0182
93,201538	143,91367
52,111942	104,18316
211,8661	149,05243
341,15347	177,76332
456,34106	176,22298
187,01712	101,25706
531,40112	123,51208
94,197937	134,6057
40,202301	93,409668
42,119583	86,96759
141,41513	98,964867
46,101788	88,161522
66,108124	95,219833
67,453468	114,82825
41,359734	83,554405
138,34557	96,772392
99,82383	106,34101
218,29724	103,08848
83,806412	86,946541
43,364231	94,641083
41,626431	89,932037
63,271572	87,923599
78,593071	84,510429
138,70763	95,664246
48,12793	80,07692

Área	Densidade
82,174255	99,688484
53,836338	92,806328
40,363274	100,45647
138,52834	122,37531
58,756138	85,299629
60,292637	81,961128
49,921219	91,516487
74,78875	84,962502
60,802467	87,598564
202,14384	117,99258
53,537727	84,601166
62,927822	91,294914
304,22723	125,18478
103,68363	90,001053
42,019039	87,552498
47,089699	92,871857
180,76717	101,31933
42,322624	98,211197
140,03632	108,92556
99,547157	95,98613
100,21157	90,098488
43,570499	93,199066
52,73748	102,01234
447,7662	102,16896
243,47823	111,95435
87,7668	90,757576
46,432186	91,688789
40,729088	89,93573
50,967892	88,439133
60,490429	95,32975
62,996532	93,829269
109,84303	86,762863
292,18002	143,19165
56,33884	90,45488
61,007149	111,16071
175,63406	130,25587
42,770466	88,912277
42,126312	73,32663
133,06169	83,996605
114,46278	77,54528
146,81799	110,22437
100,05385	101,89584

Área	Densidade
244,233	124,26143
47,958599	87,145088
454,61972	156,86058
48,832565	91,406738
795,71307	131,96733
54,337807	133,21687
272,34326	120,11111
246,46753	123,03513
72,09481	116,28463
296,61865	150,00783
178,8346	129,0945
307,5486	126,2649
42,76366	95,52826
444,2941	123,0364
129,2875	160,4498
217,18	133,2173
63,95434	115,8128
74,592422	92,245224
41,98378	91,401497
171,46738	111,88345
102,53627	95,884468
53,881535	103,68725
104,38646	98,089645
86,780586	92,40609
78,623276	77,469185
181,52193	91,074471
730,67719	95,466095
47,463772	81,221489
131,37079	79,856178
47,826012	77,059502
157,12573	85,648781
385,7489	91,670593
382,18634	84,451088
130,73669	78,120605
381,703	118,0115
175,7246	89,56319
51,96756	104,8856
239,9156	110,9206
45,35524	86,95914
229,40836	88,695976
209,17381	91,801636
229,83101	91,200485

Área	Densidade
1944,3251	97,689384
117,51213	79,761398
206,73309	83,802727
134,72386	100,41385
206,1897	104,9138
56,42097	89,06491
129,378	107,4979
41,192	100,8646
46,73915	88,73673
807,9716	130,7312
64,6705	88,81239
43,47142	128,6899
65,79443	99,49917
498,551	127,7146
120,6824	96,51289
412,3796	118,9461
522,7959	131,2784
61,77555	85,86372
43,75829	87,7277
43,81384	101,0707
81,01021	109,3745
56,60902	96,53019
542,6938	122,0185
225,6044	105,5278
1079,409	131,8844
1324,276	131,6946
200,8456	102,9921
208,7865	110,2248
751,1481	115,505
131,1194	140,3254
79,44336	93,70867
444,6259	143,074
51,39727	113,9768
72,40176	102,4635
160,6717	131,9691
122,91	115,3021
296,3469	111,8944
82,51823	109,2901
40,71566	85,16203
360,5679	124,1341
82,28157	123,1384
46,81128	101,6871

Área	Densidade
83,64032	114,1009
107,5182	98,64656
44,29853	95,63869
505,0125	117,3469
54,43516	97,90752
73,1129	109,1903
1082,7	138,0258
69,28678	100,0253
220,7429	101,4035
46,7576	102,9038
72,70542	95,66579
65,32648	100,1033
66,35139	100,6375
81,34066	98,11215
46,07656	93,84914
75,82203	106,7478
49,96989	98,69656
67,14482	108,2583
74,41946	99,72529
76,91223	110,6312
74,60753	99,46591
56,73647	97,42287
217,6027	110,5086
82,64227	141,2643
124,064	118,7226
62,61908	131,5765
88,78159	119,3346
461,4131	130,4748
108,7862	98,59132
52,91706	95,13757
404,8009	164,2856
155,9482	125,2455
206,1898	120,3807
101,872	101,8875
53,3616	118,4102
191,9386	112,1091
624,6384	127,6852
350,84558	138,58957
44,618916	124,35765
57,950878	93,117752
187,43954	116,15105
91,277451	108,17719

Área	Densidade
608,87701	133,70273
46,828064	112,39773
68,748283	98,598083
81,657692	102,13377
87,137733	98,595558
47,539242	91,582779

Área	Densidade
175,78522	109,15604
549,39624	132,89801
66,450401	89,231789
149,7585	109,39478
45,999474	110,90845