



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DA MULTIPARIDADE NOS TECIDOS DOS ÓRGÃOS PÉLVICOS E  
PERINEAIS DE RATAS WISTAR**

MARIA DA GLÓRIA DA SILVA

Brasília, Distrito Federal

2017

MARIA DA GLÓRIA DA SILVA

**EFEITO DA MULTIPARIDADE NOS TECIDOS DOS ÓRGÃOS PÉLVICOS E  
PERINEAIS DE RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus

Brasília, Distrito Federal

2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de da Silva, Maria da Glória  
Efeito da Multiparidade nos Tecidos dos Órgãos Pélvicos e  
Perineais de Ratas Wistar / Maria da Glória da Silva;  
orientador Selma Aparecida Souza Kückelhaus. -- Brasília,  
2017.  
86 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --  
Universidade de Brasília, 2017.

1. Órgãos Pélvicos. 2. Assoalho Pélvico. 3.  
Multiparidade. 4. Nulípara. 5. Força Muscular. I. Kückelhaus,  
Selma Aparecida Souza, orient. II. Título.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

Maria da Glória da Silva

### **EFEITO DA MULTIPARIDADE NOS TECIDOS DOS ÓRGÃOS PÉLVICOS E PERINEAIS DE RATAS WISTAR**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora:

**Orientador: Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus**

Universidade de Brasília

**Profª Dra. Fabiana Pirani Carneiro**

Universidade de Brasília e Secretaria de Saúde do Distrito Federal

**Profª Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges**

Universidade de Brasília

**Prof. Dr. José Roberto Souza Almeida Leite**

Universidade de Brasília

Brasília, 30 de junho de 2017

Dedico este trabalho primeiramente a DEUS  
por ter me sustentado até aqui.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Selma Aparecida de Souza Kückelhaus, orientadora deste trabalho, agradeço imensamente a sua orientação para a execução deste trabalho, pelo exemplo de profissionalismo regado com muito carinho, que faz acontecer por onde passa e por ter acreditado e me incentivado.

Ao Prof. Hugo Alves de Sousa, que tão brilhantemente participou ativamente na execução do trabalho, na dissecação das peças anatômicas e pelo apoio incondicional na coleta dos dados.

Ao Prof. Roberto Godoy, pelo apoio incondicional na dissecação das peças.

A Profa. Jussara Rocha, por suas orientações de anatomia.

Aos professores da Área de Morfologia/FM Yolanda Galindo, Ana Lúcia, Fábio Sales, Viviane Urbini, Roberto Leite, Luzirlane Braum, minha eterna gratidão.

Aos professores da Área de Patologia/FM, Fabiana Pirani, Tatiana Karla dos Santos Borges, Leonora Vianna, Andréa Motoyama, meu carinho.

Aos colegas técnicos da Área de Morfologia/FM Natalino, Abel, Abimael, Mauro, Felipe, Paulo, Carlos, Daniel grata pelo apoio, e em especial ao Guilliano, por compreender minhas ausências.

Aos colegas técnicos Área de Patologia/FM Tércia Lousa, agradeço imensamente pela amizade e pelas discussões técnicas, ao Braúlio pelo apoio técnico e à Elisabeth pelo grande incentivo.

Aos funcionários da Pós-Graduação/FM, grata pela atenção e carinho dispensado a mim.

Meu carinho ao amigo doutorando, Danilo Corazza.

Aos amigos e colegas, Leomar/HRAN por tamanha dedicação, Wasginthon (Sint-FuB), Elivaldo/FM e a todos que direta e indiretamente me ajudaram com seus conhecimentos.

Aos meus pais, Luís Pedro (in memorian) e Maria do Socorro, pelos ensinamentos e pelo muito que me proporcionaram, que Deus abençoe!

A minha vó, Maria Luiza da Conceição (in memorian), uma grande mulher.

As minhas lindas filhas Justine, Joelma, Jéssica, obrigada por tudo, hoje e sempre, obrigada por vocês existirem!

Ao meu neto Joel, dengo da vó, agradeço a Deus por sua existência.

Aos meus irmãos, José, Ricardo, Reginaldo, Rosangela, Ana, e em especial ao Roberto e Ronaldo pela ajuda com a busca dos artigos a minha eterna gratidão.

Aos meus sobrinhos e primos.

Aos meus genros Reinithon e Adriano.

A todos que de alguma forma me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

## PREFÁCIO

Ao observar que os pesquisadores da área da morfologia da Faculdade de Medicina concentravam seus esforços para caracterizar as modificações encontradas na estrutura da pelve e períneo feminino nas mais diversas fases da gestação, mas principalmente em decorrência do trabalho de parto, compreendi a importância do tema, sobretudo, pela grande incidência de ocorrências na região pélvicas e perineais em mulheres; além das implicações físicas, os indivíduos afetados reduzem muito a sua qualidade de vida, uma vez deixam o convívio familiar, social, sexual e desenvolvem grande sofrimento psicológico.

O sonho de fazer um mestrado, levou-me a aceitar prontamente a oportunidade em trabalhar com a equipe de pesquisa em Morfologia e Imunologia aplicada coordenada pela Profa. Selma Kückelhaus na Área de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, desenvolvendo um projeto de grande relevância científica e, aliar a isso, meus conhecimentos técnicos na obtenção de imagens histológicas. Assim, considerando que se trata de um tema ainda envolto por tabus e desconhecimento aceitei o desafio de estudar e saciar a curiosidade pelos efeitos que da multiparidade nos tecidos pélvicos e perineais.

Conhecer a microanatomia do assoalho pélvico foi realmente um conhecimento pessoal gratificante e participar da propagação deste conhecimento com a elaboração desse trabalho traz uma satisfação a mais. Também, acredito que o avanço de novas tecnologias pode permitir intervenções e propostas terapêuticas e propagar os conhecimentos aqui gerados pode contribuir no futuro para minimizar o sofrimento dos indivíduos afetados por afecções pélvicas.

## RESUMO

A gestação e o parto vaginal produzem adaptações nos tecidos da pelve e períneo para passagem do concepto, o que aumenta o risco para afecções dos órgãos pélvicos, sobretudo em condições de multiparidade e do mecanismo de parto. As afecções do assoalho pélvico feminino como as incontinências, urinária e fecal, e os prolapsos de órgãos pélvicos constituem um importante problema de saúde pública, pela sua alta prevalência e incidência, bem como pelas repercussões deletérias na qualidade de vida e pelos elevados custos de tratamento. Considerando que os tecidos dos órgãos pélvicos podem sofrer alterações estruturais e funcionais em decorrência de processos lesivos como os advindos da gestação e do mecanismo de parto, torna-se necessário identificar e quantificar essas alterações para compreender os mecanismos envolvidos nesse processo e dar suporte para novas propostas terapêuticas. No entanto, dada a impossibilidade de propor estudos dessa natureza com tecidos humanos, um modelo animal que seja morfofuncionalmente semelhante aos humanos, que inclusive apresentam afecções de pelve e períneo, podem agregar novos conhecimentos. Assim, esse estudo teve como objetivo descrever e comparar a arquitetura tecidual e a força muscular dos órgãos da pelve e períneo de ratas Wistar nulíparas e múltiparas. O estudo foi conduzido com grupos de nulíparas e múltiparas (n=5) de 12 meses de idade; as múltiparas acasalaram por três vezes gerando  $10,0 \pm 1,5$  filhotes por ninhada. Vencidos os 12 meses e tomadas às medidas da força de contração muscular, os animais eram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e então submetidos à dissecação para a remoção dos blocos pélvicos. Os espécimes histológicos depois de fixados foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol, embebidos e emblocados em parafina para a microtomia e então, as secções histológicas (5 µm) foram coradas com hematoxilina e eosina e com Tricromio de Gomori. Os resultados mostraram que a multiparidade: 1) reduziu a espessura da mucosa da uretra e vagina, aumentou a mucosa do reto, mas não afetou a mucosa do ânus; 2) reduziu a largura da submucosa da vagina, aumento no ânus e não afetou a largura dessa camada na uretra ou no reto; 3) aumentou a largura da camada muscular do reto, reduziu na vagina, mas não afetou essa camada na uretra ou ânus; 4) reduziu o total de fibras musculares lisas da uretra e ânus, aumentou no reto, mas não afetou o total de fibras na vagina; 5) reduziu o diâmetro e total de mionúcleos das fibras musculares esqueléticas do assoalho pélvico; 6) não afetou a largura das camadas visceral ou parietal da fáscia endopélvica ou os parâmetros morfométricos do esfíncter uretral externo; 7) diminuiu o tônus intra-anal e a força de contração evocada; 8) não afetou o tecido conjuntivo; 9) aumentou o número de leucócitos na mucosa da uretra e vagina das múltiparas, mas não no reto ou ânus. No conjunto, os resultados mostraram que a multiparidade causaram hipotrofia das estruturas dos músculos do assoalho pélvico, lisos, estriados, bem como no ânus das ratas múltiparas que implicaram na redução da efetividade da contração reflexa, mas paralelamente demonstrou que a musculatura respondeu positivamente quando eletro estimulada, aumentando a força de contração evocada. Assim, nossos resultados permitem relacionar as alterações estruturais causadas pela multiparidade com o desenvolvimento de afecções de órgãos pélvicos e perineais.

**Palavras-chaves:** Órgãos pélvicos; Assoalho pélvico; Multiparidade; Nulípara; Força muscular.

## ABSTRACT

Gestation and vaginal delivery produce adaptations in the tissues of the pelvis and perineum for the passage of the concept, which increases the risk for affections of the pelvic organs, especially in conditions of multiparity and the mechanism of delivery. Female pelvic floor affections such as urinary and fecal incontinence and pelvic organ prolapse constitute an important public health problem because of its high prevalence and incidence, as well as the deleterious repercussions on the quality of life and the high costs of treatment. Considering that pelvic organ tissues undergo structural and functional changes as a result of harmful processes such as those arising from gestation and the mechanism of delivery, it is necessary to identify and quantify these changes in order to understand the mechanisms involved in this process and to support new Therapeutic proposals. However, given the impossibility of proposing studies with human tissues, an animal model that is morphologically similar to humans, which even present pelvic and perineal affections, may aggregate new knowledge. Thus, this study aimed to describe and compare the architecture of the tissues and the muscular strength of pelvic and perineum organs of nulliparous and multiparous Wistar rats. The study was conducted with groups of nulliparous and multiparous ( $n = 5$ ) of 12 months of age; the multiparous rats mated three times ( $10.0 \pm 1.5$  rats/brood). After 12 months, measurements of muscle contraction force were taken and the animals were euthanized and then submitted to dissection to remove the pelvic blocks. After fixation, the specimens were dehydrated in alcohol, diaphanized in xylol, embedded and blocked in paraffin. After that, the histological sections ( $5 \mu\text{m}$ ) were stained with hematoxylin and eosin and with Gomori trichrome. The results showed that the multiparity: 1) reduced the width of the mucosa in the urethra and vagina, increased the width of the mucosa in the rectum, but does not affect the mucosa of the anus; 2) reduced the width of the submucosa in the vagina, increase in the anus and did not affect the width of this layer in the urethra or rectum; 3) increased the width of the muscular layer of the rectum, reduced in the vagina, but did not affect this layer in the urethra or anus; 4) reduced the total smooth muscle fibers of the urethra and anus, increased in the rectum, but did not affect the total fibers in the vagina; 5) reduced the diameter and total number of myonuclei of the skeletal muscle fibers of the pelvic floor; 6) did not affect the width of the visceral or parietal layers of the endopelvic fascia or the morphometric parameters of the external urethral sphincter; 7) decreased intra-anal muscular tonus and the evoked contraction force; 8) did not affect the parenchyma or the stroma of connective tissue; 9) increased the number of leukocytes in the mucosa of the urethra and vagina of the multiparous, but not in the rectum or anus. The results showed that multiparity structurally reduced the smooth and striated muscles of the pelvic floor and anus of multiparous rats, which implied a reduction in the effectiveness of intra-anal muscular tonus and the evoked contraction force. Thus, our results allow us to relate the structural changes caused by multiparity with the development of affections of pelvic and perineal organs.

Keywords: Pelvic organs; Pelvic floor; Multiparity; Nulliparous; Muscle strength.

**SUMÁRIO**

Prefácio	V
Resumo	VI
Abstract	VII
1. Introdução	1
1.1. Afecções do assoalho pélvico	3
1.2. Fatores de risco para afecções pélvicas	5
1.3. Constituição e adaptações dos órgãos pélvicos e perineais	6
2. Objetivos	9
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. Material e métodos	11
3.1. Delineamento experimental	12
3.2. Tipo de estudo	13
3.3. Animais	13
3.4. Obtenção das amostras	13
3.5. Obtenção das imagens histológicas	14
3.6. Obtenção dos dados morfométricos dos órgãos e assoalho pélvico	14
3.7. Análise histopatológica	15
3.8. Determinação da força de contração muscular	15

3.9. Análise estatística	17
4. Resultados	18
4.1. Determinação da largura das camadas teciduais	19
A. Uretra	19
B. Vagina	21
C. Reto	23
D. Ânus	25
4.2. Avaliação da musculatura lisa	27
4.3. Avaliação da musculatura estriada esquelética	30
A. Músculo do assoalho pélvico e fáscia endopélvica	30
B. Esfíncter anal externo	32
4.4. Avaliação da força muscular	34
4.5. Avaliação das células migratórias nos tecidos associados aos órgãos da pelve e períneo	36
5. Discussão	38
5.1. Considerações sobre a uretra	39
5.2. Considerações sobre a vagina	42
5.3. Considerações sobre o reto-ânus	44
5.4. Considerações sobre o assoalho pélvico	46
5.5. Considerações sobre a manômetria e a força dos músculos do assoalho pélvico	49
6. Conclusão	52

7.	Perspectivas e limitações	54
8.	Referências bibliográficas	56
9.	Anexos	67

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.	Afecções do assoalho pélvico	03
Figura 2.	Organograma do estudo	12
Figura 3.	Fotografia do manômetro	16
Figura 4.	Determinação da força de contração muscular	17
Figura 5.	Largura das camadas da uretra	20
Figura 6.	Fotomicrografias da uretra	21
Figura 7.	Largura das camadas da vagina	22
Figura 8.	Fotomicrografias da vagina	23
Figura 9.	Largura das camadas do reto	24
Figura 10.	Fotomicrografias do reto	25
Figura 11.	Largura das camadas do ânus	26
Figura 12.	Fotomicrografias do ânus	27
Figura 13.	Total de fibras musculares lisas nos órgãos pélvicos	28
Figura 14.	Fotomicrografias dos órgãos pélvicos	29
Figura 15.	Parâmetros morfométricos dos músculos do assoalho pélvico	31
Figura 16.	Fotomicrografias do assoalho pélvico	32

Figura 17.	Parâmetros morfométricos do músculo estriado esquelético esfíncter anal externo	33
Figura 18.	Fotomicrografias do esfíncter anal externo	34
Figura 19.	Parâmetros de força muscular de ratas nulíparas e multíparas	35
Figura 20.	Total de leucócitos presentes na mucosa dos órgãos pélvicos e perineais	36
Figura 21.	Fotomicrografias da mucosa dos órgãos pélvicos	37

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.	Largura das camadas mucosa, submucosa, muscular lisa e estria esquelética da uretra de ratas nulíparas e múltíparas	19
Tabela 2.	Largura das camadas mucosa, submucosa e muscular da vagina de ratas nulíparas e múltíparas	22
Tabela 3.	Largura das camadas mucosa, submucosa e muscular do reto de ratas nulíparas e múltíparas	24
Tabela 4.	Largura das camadas mucosa, submucosa e muscular do ânus de ratas nulíparas e múltíparas	26
Tabela 5.	Total de fibras musculares lisas nos órgãos pélvicos de ratas nulíparas e múltíparas	28
Tabela 6.	Parâmetros morfométricos do assoalho pélvico, músculos e fáscia, de ratas nulíparas e múltíparas	30
Tabela 7.	Parâmetros morfométricos dos músculos do esfíncter anal externo (EAE) do ânus de ratas nulíparas e múltíparas	33
Tabela 8.	Parâmetros de força muscular dos órgãos pélvicos e perineais obtidos para as ratas nulíparas e múltíparas	35

**LISTA DE SIGLAS**

**ASS. PÉLV** – Assoalho Pélvico  
**C** – Controle  
**COBEA** – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
**EAE** – Esfíncter anal externo  
**EAI** – Esfíncter anal interno  
**EE** – Eletroestimulação  
**EEIA** – Eletroestimulação pela via intra-anal  
**EEIV** – Eletroestimulação pela via intravaginal  
**EUE** – Esfíncter uretral externo  
**EENM** – Eletroestimulação neuromuscular  
**FM** – Força Muscular  
**IA** – Incontinência anal  
**IU** – Incontinência urinária  
**IUE** – Incontinência urinária de esforço  
**IUM** – Incontinência urinária mista  
**IUU** – Incontinência urinária de urgência  
**LABOCIEN** – Laboratório de Ciências  
**MAPs** – Músculos do assoalho pélvico  
**MULTIP** – Multiparidade  
**N** – Nulíparas  
**ÓRG. PÉLV.** Órgãos pélvicos.  
**POP** – Prolapso de órgãos pélvicos  
**SNC** – Sistema nervoso central  
**µs** – Microssegundos  
**Hz** – Frequência em Hertz  
**mA** – Miliampere  
**On** – Ligado  
**Off** – Desligado

## 1. INTRODUÇÃO

A gestação e o parto vaginal produzem adaptações nos tecidos associados à pelve e períneo (MacLennan et al., 2000). Tais adaptações são necessárias para preparar as estruturas de suporte dos órgãos pélvicos, bem como dos tecidos associados ao canal de parto, para passagem do concepto. Para isso, a região em questão receberá ação de vários hormônios, em especial da relaxina, hormônio produzido pelos ovários e placenta, que tem como função diminuir a síntese de colágeno no tecido conjuntivo, favorecendo a dilatação do útero, elasticidade da fáscia endopélvica, distensibilidade vaginal e alongamento da matriz extracelular (Ferlin et al., 2016).

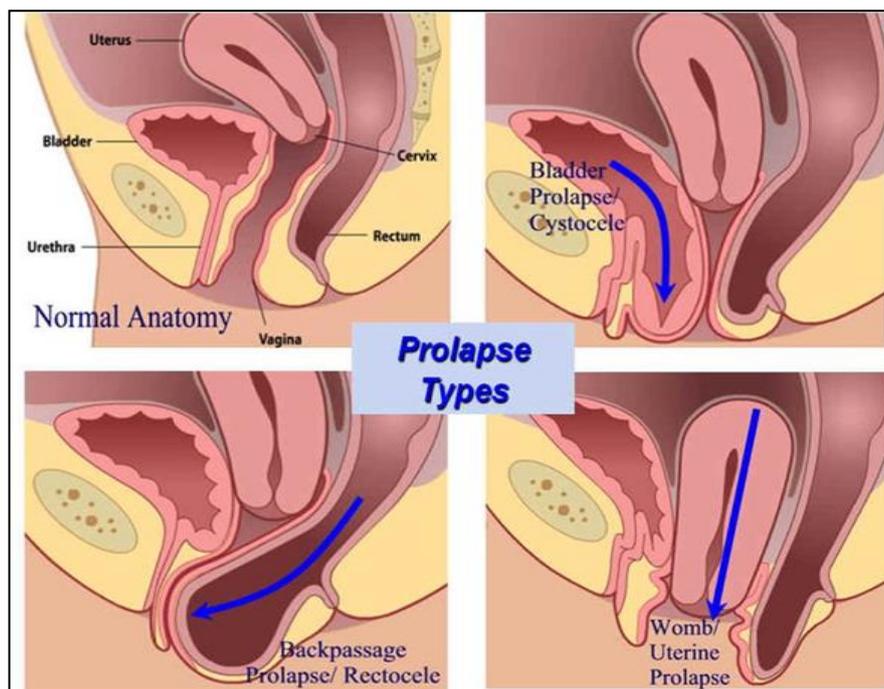
O interesse de diferentes organizações, nos últimos anos, para investigar as modificações que a paridade induz nos órgãos pélvicos tem crescido (Abrams et al., 2009) uma vez que na via de parto vaginal, aumenta significativamente o risco para afecções dos órgãos pélvicos, sobretudo em condições de multiparidade e do mecanismo de parto (O'Boyle et al., 2005). Devido ao grande aumento de afecções do órgão pélvicos, novos pesquisadores buscam estudar e compreender as modificações estruturais ocorridas na pelve e períneo. Os estudos são realizados em diversas mulheres e em diferentes fases da gravidez, o método de realizar tais estudos é feito por exames de imagens, desde o puerpério ou ainda após meses ou anos do trabalho de parto (Ashton-Miller & DeLancey, 2009; Staer-Jensen et al., 2015).

Os modelos animais têm sido largamente utilizados por facilitar o estudo de alterações em estruturas anatômicas ou para explicar aspectos morfofuncionais, tanto que Abramowitch et al. (2009), reportaram que o estudo em ratas tem auxiliado na tentativa de transpor o conhecimento acerca da morfologia do assoalho pélvico e das variações/disfunções relacionadas a múltiplos partos. Cabe destacar ainda, que dentre os modelos animais utilizados para o estudo das modificações na pelve e períneo, as ratas possuem semelhança, do ponto de vista morfofuncional, quando comparado aos humanos (Alperin et al., 2014). Desta maneira, percebe-se que o modelo animal pode mimetizar as modificações e

adaptações nos tecidos da pelve e períneo de mulheres, decorrentes de múltiplas gestações.

### 1.1. Afecções do assoalho pélvico

As afecções do assoalho pélvico feminino constituem um importante problema de saúde pública, devido sua alta prevalência e incidência, bem como pelas repercussões deletérias na qualidade de vida e pelos elevados custos de tratamento (Thom et al., 2005); a incontinência urinária (IU), incontinência anal (IA) e os prolapsos de órgãos pélvicos (POP) representam as principais disfunções pélvicas (Handa et al., 2007) (Figura 1).



**Figura 1.** Afecções do assoalho pélvico. Fonte: <http://www.fisioterapiamaesefilhos.com/artigos/>

No caso das incontinências, tem-se a perda involuntária da urina ou do conteúdo intestinal. Estas condições que refletem a perda funcional da musculatura esfinteriana podem afetar indivíduos de diferentes idades e gêneros, aumentando progressivamente com a idade, sendo que um em cada três indivíduos idosos apresenta algum problema com o controle da bexiga. As mulheres, contudo, têm três

vezes mais chances de sofrerem incontinência, principalmente por causa do esforço físico causado pela gestação, mas, sobretudo, devido aos danos teciduais oriundos do parto vaginal, bem como pela diminuição nos níveis de estrógeno observado com a menopausa; ressalta-se que a incontinência anal é sete a oito vezes mais frequente em mulheres com mais de três partos vaginais, bem como em indivíduos com mais de 70 anos de idade.

Os dados americanos mostram que anualmente são aportados cerca de 84 bilhões de dólares para o tratamento das afecções de pelve e períneo (Xu et al., 2012; Cheon & Maher, 2013; Coyne et al., 2014). Apesar de não se conhecer os custos de tratamento das afecções perineais e pélvicas no Brasil, as observações epidemiológicas atuais, aliada ao aumento da população idosa, permitem projetar um aumento considerável nos custos dos tratamentos para os sistemas público-privados de saúde para as próximas décadas (Herschorn et al., 2007; Kopp et al., 2008).

As incontinências acarretam a redução na qualidade de vida dos indivíduos afetados na proporção da gravidade do quadro clínico. A clínica das incontinências pode variar de leve a moderada causando pequenos escapes em situações de aumento na pressão abdominal (tosse, espirro, levantamento de peso, etc), denominada incontinência por esforço, ou na incapacidade de controlar a musculatura esfínteriana quando ocorre a necessidade da micção ou eliminação de gases, por exemplo, nesse caso tem-se a incontinência de urgência; é possível também que alguns indivíduos apresentem incontinência mista, quando ocorre à urinária e anal conjuntamente. Nos casos mais graves, por exemplo, tem-se a incontinência intensa que pode ser por transbordamento, quando ocorre a perda intermitente ou total das excretas posteriormente ao seu acúmulo na bexiga, ocorre a perda funcional do esfíncter permitindo o escape contínuo de urina ou fezes (Camarano & Kanso, 2010). Tão impactante quanto as incontinências, o prolapso de órgãos pélvicos (vagina, uretra, bexiga, reto e até o intestino) reduzem e muito a qualidade de vida dos indivíduos afetados. Nessa condição comum na multiparidade

associada ao envelhecimento, as alterações estruturais nos tecidos de sustentação dos órgãos pélvicos são tantas que causam a protusão dos órgãos para o meio externo (Oliveira & Carvalho, 2006).

## **1.2. Fatores de risco para afecções pélvicas**

Como reportado, a multiparidade, a senilidade e a menopausa são os principais fatores de riscos para as desordens do assoalho pélvico (Abrams et al., 2009; O'Boyle et al., 2005; Nygaard et al., 2008). Sabe-se que durante o período gestacional ocorrem várias adaptações morfológicas nos tecidos que compõem os órgãos abdominais pélvicos da mulher. Observa-se dentre outras mudanças, o aumento no tamanho e volume do útero que acarreta modificações na disposição dos órgãos abdominopélvicos (O'Boyle et al., 2005). Em consequência disso, ocorre aumento de sobrecarga nos elementos que estabilizam os órgãos pélvicos, que podem desencadear disfunções nos tecidos do assoalho pélvico, bem como alterações no posicionamento dos órgãos pélvicos após o parto (Rahn et al., 2008).

Semelhante às multíparas, nulíparas podem apresentar as mesmas entidades clínicas reportadas acima, o que demonstra que a multiparidade não é o único fator determinante para tais afecções e aponta para possíveis fatores intrínsecos dos indivíduos afetados. Alguns estudos mostram que as desordens do pavimento pélvico são mais comuns em mulheres primíparas da mesma idade, independentemente do modo de parto (Kopp et al., 2008; Nygaard et al., 2008; Hansen et al., 2012) na comparação com nulíparas, inclusive para prolapsos de órgãos pélvicos (Kudish et al., 2011). Apesar dessas constatações, a proporção de mulheres multíparas com disfunções no assoalho pélvico é destacadamente maior em relação às nulíparas (Abrams et al., 2009).

Segundo MacLennan et al. (2000), a incidência das desordens do assoalho pélvico varia de acordo com a via de parto, sendo que algum tipo de disfunção é observado em 58% das mulheres submetidas ao parto vaginal e em 43% daquelas submetidas ao parto cesáreo e ainda, que mulheres primíparas submetidas ao parto

vaginal, possuem duas vezes maior risco de manifestar sintomas de incontinência de esforço em comparação com as mulheres submetidas a cesariana (Handa et al., 2011). Memom & Handa (2012) mostraram num estudo de metanálise com 350 achados científicos que as mulheres apresentam uma alta incidência de alterações geniturinárias e fecais após a gestação, especialmente após o parto vaginal.

Na comparação com o parto cesáreo, o parto vaginal acarreta aumento de risco, especialmente no que tange a manifestação das incontinências (Zetterstrom et al., 1999), inclusive a incontinência anal (Abramov et al., 2005). O parto vaginal submete os músculos do assoalho pélvico (MAPs), a fáscia endopélvica, a vagina e os demais tecidos associados à pelve e períneo ao estresse mecânico importante, principalmente durante o período expulsivo do parto, no qual o pavimento pélvico estira de 2,5 a 3,5 vezes do comprimento normal (Ashton-Miller & DeLancey, 2009). Mant et al. (1997) e Patel et al. (2006) apontaram que o parto vaginal aumenta de 4 a 11 vezes o risco de prolapsos de órgãos pélvicos. Também, tem sido mostrado que complicações no parto normal, como o trauma obstétrico do esfíncter anal, costumam suscitar incontinência anal pós-parto, todavia, na ausência disso, o parto vaginal não parece aumentar o risco de incontinência anal (Borello-France et al., 2006).

### **1.3. Constituição e adaptações dos órgãos pélvicos e perineais**

A sustentação dos órgãos pélvicos é fornecida pelos componentes do assoalho pélvico. Segundo DeLancey (1992), o assoalho pélvico é o conjunto de estruturas situadas entre o peritônio visceral e a pele da vulva. Deste modo, de cima para baixo, observa-se a fáscia endopélvica, o músculo levantador do ânus e a membrana perineal (diafragma urogenital) (Wei & DeLancey, 2004). O complexo muscular do levantador do ânus, é o principal responsável pelo sistema de suporte dos órgãos pélvicos (Ashton-Miller & DeLancey, 2009). Além de apoiar as vísceras da pelve, ele mantém o hiato urogenital fechado, contra a ação de abertura da pressão intra-abdominal, do mesmo modo que contribuí para manutenção da

continência anal (DeLancey, 1988). Sabe-se que uma contração voluntária dos músculos elevadores do ânus aumenta ainda mais a força de fechamento dos óstios da uretra, vagina e reto-ânus (DeLancey, 1988). Dessa forma, injúrias nos músculos levantadores do ânus podem levar ao alargamento do hiato e causar o descenso dos órgãos pélvicos, o que resultará em manifestações de sinais e sintomas nos aparelhos genitourinários, bem como no segmento reto-anal (DeLancey, 2005; DeLancey et al., 2007; Dietz & Simpson, 2008). Sabe-se que as forças de compressão, estiramento e cisalhamento, geradas pelo parto vaginal, causa isquemia nos tecidos associados à pelve e períneo, o que pode suscitar em alguns casos, dano neuromuscular do nervo pudendo, e consequente incontinência urinária e fecal ou ainda prolapsos de órgãos pélvicos (Lien et al., 2005). Alguns fatores presentes no parto vaginal são considerados potencialmente lesivos aos componentes do assoalho pélvico, dentre eles destacam-se o uso de fórceps, macrossomia fetal, apresentações posteriores, uso de episiotomia (especialmente a mediana, que aumenta o risco de lacerações de esfíncter anal) e período expulsivo prolongado (Vieira et al. 2008).

Considerando que os tecidos dos órgãos pélvicos podem sofrer alterações estruturais e funcionais em decorrência de processos lesivos como os advindos da gestação e do mecanismo de parto e, que tais alterações, podem se relacionar com afecções de pelve e períneo presentes nos indivíduos afetados, torna-se necessário identificar e quantificar essas alterações para compreender os mecanismos envolvidos nesse processo e dar suporte para novas propostas terapêuticas. Considerando também que as pesquisas concentram esforços nos exames de imagem topográficas, propostas de estudos morfológicos e morfométricos que permitam comparar o parênquima e o estroma dos tecidos da pelve e períneo tornam-se fundamentais. No entanto, dada a impossibilidade de propor estudos dessa natureza com tecidos humanos, estudos com modelo animal que seja morfofuncionalmente semelhante aos humanos, que inclusive apresentam afecções de pelve e períneo, podem agregar novos conhecimentos. Assim, estudos com ratas

Wistar podem fornecer informações importantes acerca das alterações estruturais e funcionais que ocorrem na multiparidade à semelhança das observadas em humanos.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivo Geral**

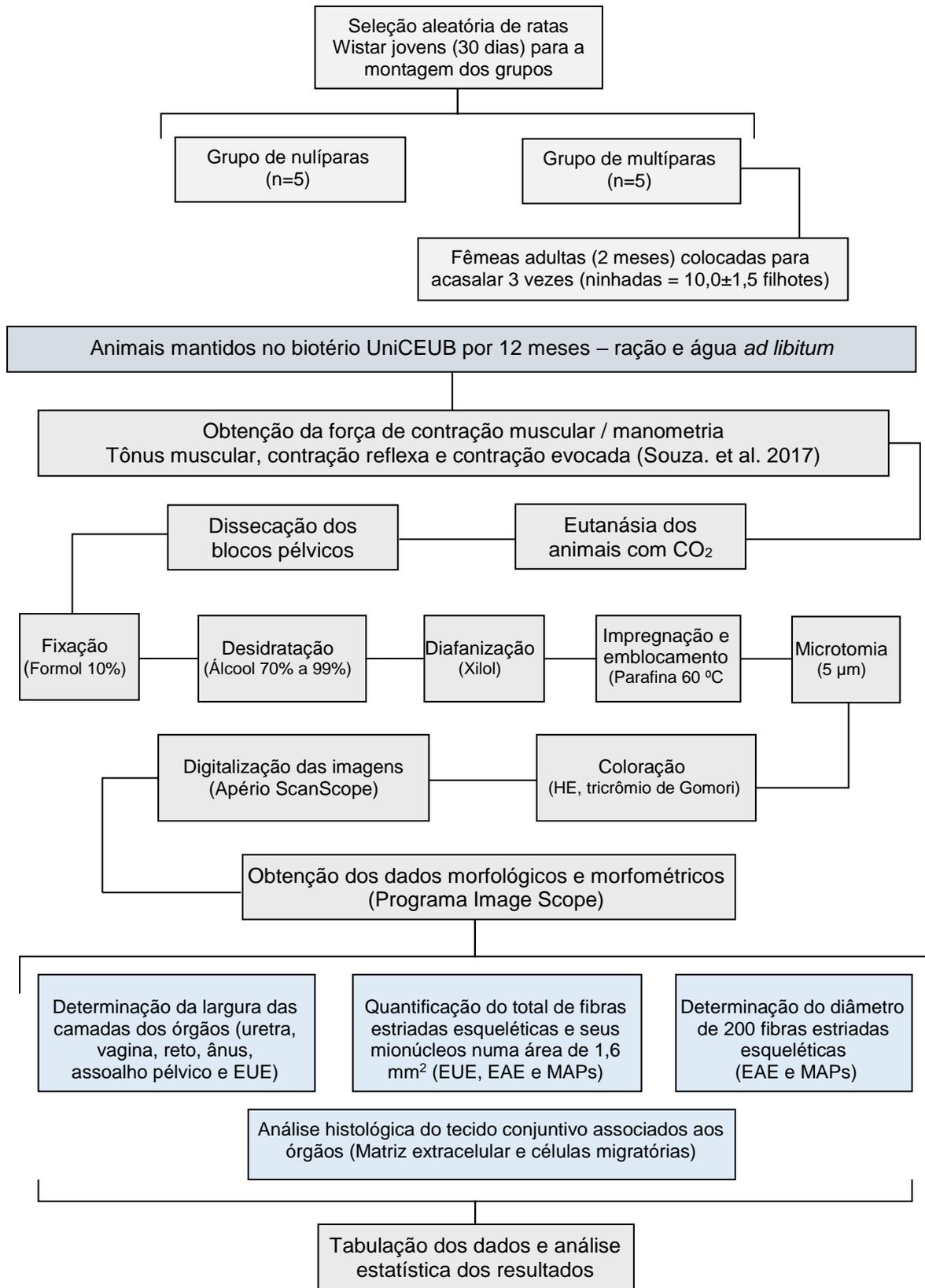
Descrever e comparar a arquitetura tecidual e a força muscular dos órgãos da pelve e períneo de ratas Wistar nulíparas e múltíparas.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar a largura das camadas teciduais (mucosa, submucosa e muscular) associadas à uretra, vagina, reto, ânus e assoalho pélvico;
- Quantificar o número de fibras musculares lisas dos órgãos;
- Determinar o total, o diâmetro e os mionúcleos das fibras musculares esqueléticas dos esfíncteres da uretra e ânus;
- Determinar a força muscular no repouso e na contração;
- Avaliar o tecido conjuntivo, matriz extracelular e as células migratórias.

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

### 3.1. Delineamento experimental



**Figura 2.** Organograma do estudo.

### 3.2. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo descritivo e comparativo para descrever e comparar a arquitetura tecidual dos órgãos de pelve e períneo de ratas Wistas nulíparas e múltiparas. O cálculo amostral e os critérios experimentais e de manutenção dos animais seguiram as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado em 19/04/2013 pela Comissão de Ética no uso de Animais do UniCEUB (nº 01/2013).

### 3.3. Animais

Para o estudo foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (n=12) por se tratar de um animal com forma e função dos órgãos pélvicos similar a dos humanos (Alperin et al., 2014). As ratas eram nulíparas ou múltiparas (3 gestações com  $10,0 \pm 1,5$  filhotes por ninhada) com 12 meses de idade provenientes do biotério do Centro Universitário de Brasília. Durante a fase reprodutiva, os animais eram mantidos com temperatura controlada (23°C), ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com ração balanceada e água potável *ad libitum*, no alojamento de animais no biotério do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB). A coleta dos dados foi realizada no Laboratório de Técnicas Histológicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

### 3.4. Obtenção das amostras

Completada a idade de 12 meses e depois de tomadas as medidas da força de contração muscular, os animais eram eutanasiados em câmara com concentração de 40% de CO<sub>2</sub>, e então submetidos à dissecação para a remoção dos blocos pélvicos, sendo o segmento reto-anal removido da pelve, mas preservando-se a pele perianal, para não danificar os músculos associados. Em seguida, os

espécimes eram fixados em solução de formol a 10% e então processados para a obtenção das secções histológicas.

### **3.5. Obtenção das imagens histológicas**

Para a obtenção das imagens os espécimes histológicos fixados eram desidratados em álcool por 1 h (70%, 80%, 90% e 3x 100%), diafanizados em xilol por 30 minutos (2 banhos), embebidos em parafina a 60 graus por 1 h (3 banhos) e emblocados em parafina para a microtomia em secções histológicas de  $\mu\text{m}$  de espessura. As secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliar possíveis infiltrados inflamatórios e com Tricromio de Gomori para avaliar a matriz extracelular de tecido conjuntivo e o tecido muscular. As imagens foram obtidas pela digitalização das secções histológicas no equipamento Aperio ScanScope® com objetiva de 20 e posteriormente ampliadas (200x, 400x e 1000x) no programa ImageScope version 11.2.0.780 (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA) e então, analisadas por um único observador.

### **3.6. Obtenção dos dados morfométricos dos órgãos e assoalho pélvico**

Para determinar a largura das camadas teciduais (mucosa, submucosa e muscular) dos órgãos pélvicos (uretra, vagina, reto e ânus) e o diâmetro das fibras musculares esqueléticas utilizou-se a ferramenta de medida do programa ImageScope Leica® (versão 12.0) nas imagens das secções histológicas digitalizadas. Para a obtenção da largura delimitou-se quatro áreas equidistantes de  $400 \mu\text{m}^2$  ( $1.6 \text{ mm}^2$ ) nas secções transversais dos órgãos e dos músculos e então, calculou-se a média. Para determinar o diâmetro médio das fibras musculares esqueléticas foram tomadas as medidas do diâmetro maior e menor de 200 fibras para todos os músculos esqueléticos. Para quantificar o número de mionúcleos por fibra muscular esquelética dos músculos do assoalho pélvico (MAPs) e EAE, foram analisadas de 20 fibras de cada músculo em secções transversais. Já para

quantificar os mionúcleos do EUE, delimitou-se quatro áreas equidistantes de 400  $\mu\text{m}^2$  (1.6  $\text{mm}^2$ ) nas secções longitudinais do músculo e então, calculou-se a média.

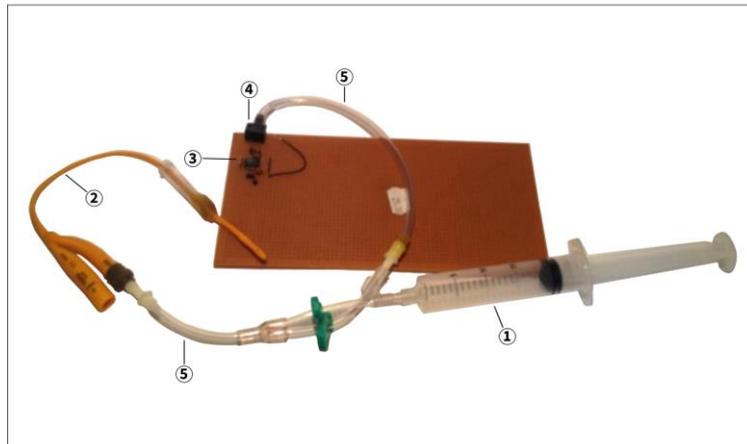
Para determinar o total de fibras musculares lisas (esfíncter anal interno) e esqueléticas (esfíncter uretral externo, esfíncter anal externo e músculos do assoalho pélvico) foram selecionadas as secções transversais digitalizadas de cada músculo, com aumento de 400 x para os músculos esqueléticos e 1000 x para o músculo liso. Os resultados foram expressos em média $\pm$ DP para dados paramétricos ou mediana para os não paramétricos.

### **3.7. Análise histopatológica**

Para as análises qualitativas das secções histológicas considerou-se a presença ou ausência de tecido necrótico e/ou células em degeneração, a estrutura dos tecidos musculares e do estroma adjacente, a presença ou ausência de infiltrado inflamatório e a presença ou ausência de micro-hemorragias. As análises foram feitas por um único observador e nas secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina.

### **3.8. Determinação da força de contração muscular**

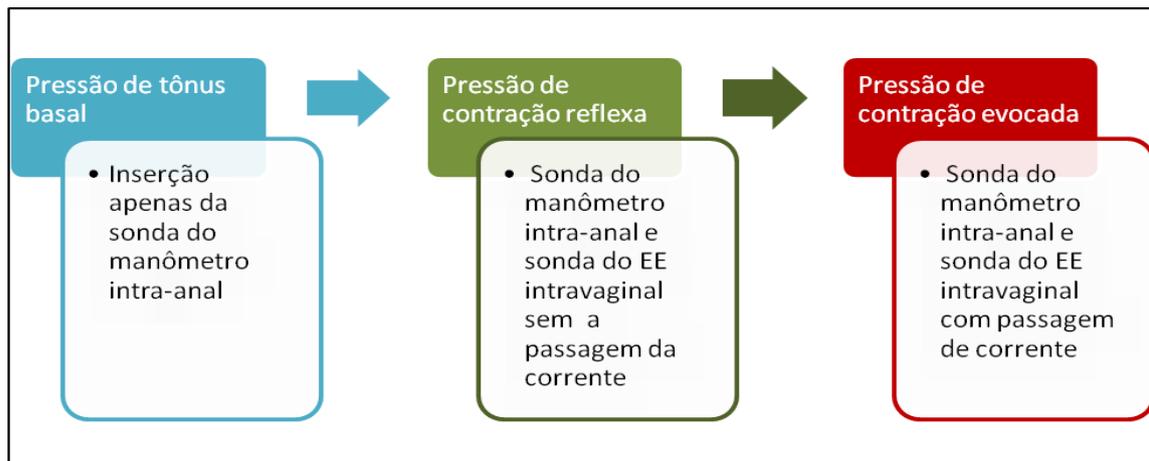
Para a obtenção dos registros da força muscular das ratas nulíparas e múltiparas, foi utilizado um manômetro de pressão adaptado ao modelo animal com um transdutor de pressão (Honeywell®, Phoenix, United States) acoplado a um amplificador com ganho de 11 vezes (Honeywell®, Phoenix, United States), um osciloscópio digital (Diligent®, Pullman, United States) com interface gráfica pelo programa de computador da Diligent®, uma sonda de Foley (Solidor®, Diadema, Brasil) e uma seringa de 20 mL, com 21,3 mm de diâmetro e êmbolo de 11 cm (Sousa et al., 2017). Depois de introduzida no ânus das ratas, a sonda do manômetro foi insuflada e o registro da pressão intra-anal foi tomado durante 120 segundos (Figura 2).



**Figura 3.** Fotografia do manômetro utilizado para medir a força e que foi produzido e calibrado nos estudos de Sousa et al. 2017. Os componentes do manômetro são a seringa (1), a sonda de Foley (2), o amplificador (3), o sensor de pressão (4) e a mangueira de condução de ar (5).

Para a medição da força dos músculos da pelve e períneo, foi introduzida no ânus das ratas nulíparas e múltiparas (estudo pareado) a sonda do manômetro. Os passos para o registro da pressão intra-anal foram os seguintes: 1) introdução da sonda no reto-ânus; 2) insuflação da sonda intra-anal; 3) observação e registro da pressão intra-anal durante 120 segundos.

Os registros da força ocorreram em três momentos: o primeiro registrou a pressão de tônus basal dos músculos da pelve e períneo, o segundo capturou a pressão mediada pela contração reflexa dos músculos no momento da inserção da sonda de eletroestimulação, por via intravaginal, sem passagem de corrente elétrica, o terceiro gravou a pressão mediada pela contração evocada dos músculos da pelve e períneo no momento da eletroestimulação intravaginal (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema para a determinação da força de contração muscular.

Os parâmetros utilizados para a eletroestimulação foram: corrente bifásica simétrica retangular com largura de pulso de 700- $\mu$ s e frequência de 50 Hz, em que a intensidade foi padronizada inicialmente entre 2 a 4 mA ou até a contração muscular visível ao observador, sem causar sofrimento ao animal, de acordo com os estudos de (Sousa et al., 2017; Wyndaele & Poortmans, 2006), conforme esquematizado na figura 2. O tempo decorrido entre a passagem da corrente/contração muscular e sua interrupção/repouso muscular (*On/off*) foi de 5 e 10 segundos, respectivamente.

### 3.9. Análise estatística

A normalidade das variáveis e a homogeneidade das variâncias foram analisadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente. Para comparações entre dois grupos com distribuição paramétrica foi usado o teste t e para dois grupos com distribuição não paramétrica foi usado Mann-Whitney; diferenças de  $p < 0,05$  foram consideradas significantes. As análises e as representações gráficas foram feitas empregando-se o programa Prism® 5 Software Package (GraphPad, USA, 2005).

## **4. RESULTADOS**

Para avaliar como a multiparidade afeta os tecidos associados aos órgãos da pelve e períneo foram avaliados diferentes parâmetros morfológicos em secções histológicas obtidas de ratas nulíparas e múltiparas advindas de 5 gestações múltiplas.

#### 4.1. Determinação da largura das camadas teciduais

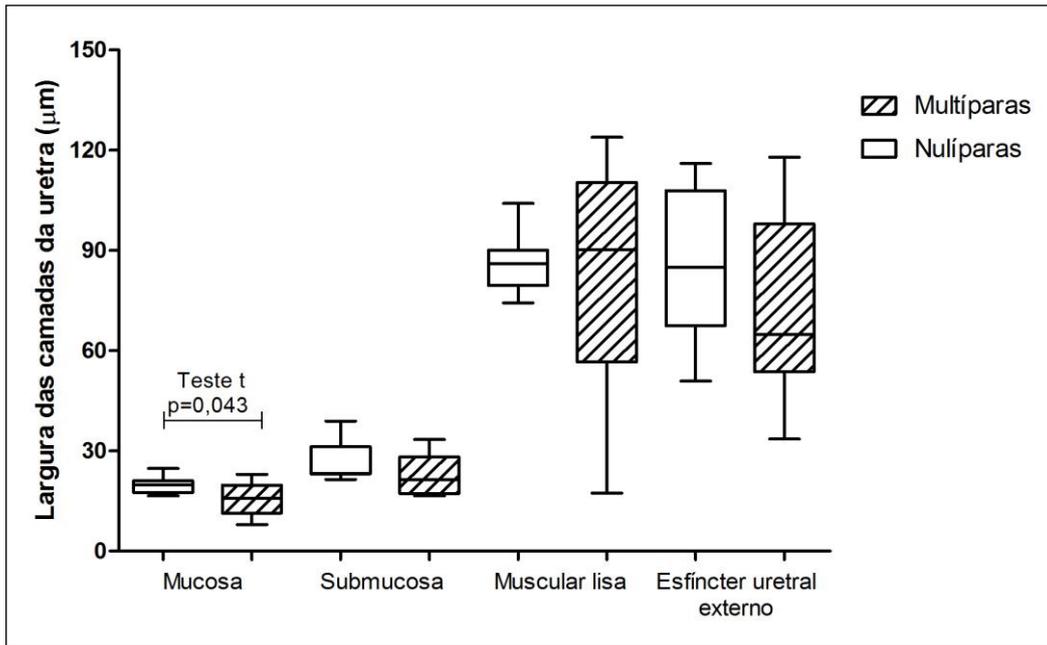
##### A. Uretra

Os resultados para a uretra mostraram que a média±DP da largura da mucosa obtida para o grupo de múltiparas foi menor (15,6±5,2) do que para o grupo de nulíparas (19,8± 2,5) (Teste t, p = 0,043). Para as camadas submucosa ou muscular os resultados, analisados pelos testes de Mann-Whitney ou teste t, respectivamente, mostraram não haver diferenças entre os grupos, assim como na média±DP do esfíncter uretral externo (Tabela 1; Figura 5 e 6).

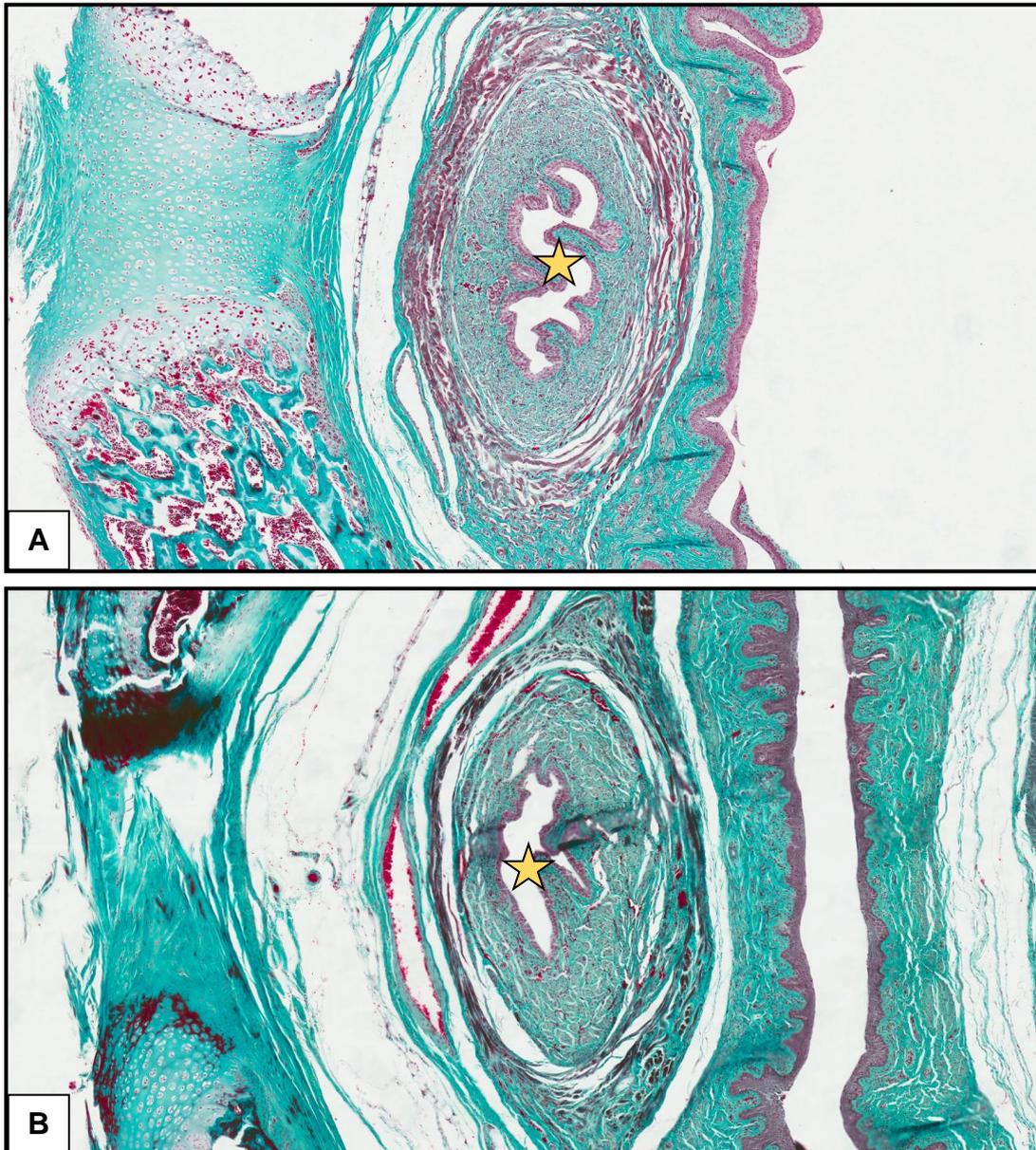
**Tabela 1.** Largura das camadas mucosa, submucosa, muscular lisa e estria esquelética da uretra de ratas nulíparas e múltiparas.

<b>Largura das camadas</b>		<b>Nulíparas</b>	<b>Múltiparas</b>
		<i>Média±DP</i>	<i>Mediana</i>
<b>1</b>	<b>Mucosa</b>	19,8± 2,5	15,6± 5,2*
		19,9	15,8
<b>2</b>	<b>Submucosa</b>	26,8±6,2	23,1±5,8
		23,2	21,4
<b>3</b>	<b>Muscular</b>	86,0 ± 8,8	83,2± 33,3
		86,0	90,2
<b>4</b>	<b>Esfíncter uretral externo</b>	85,5±21,7	72,3±26,9
		84,9	64,8

\*Valores diferentes do controle, p < 0,05



**Figura 5.** Largura das camadas mucosa, submucosa e muscular da uretra de ratas nulíparas e múltíparas. Os resultados mostraram na comparação com as nulíparas, que as ratas múltíparas apresentaram redução na largura da camada mucosa (Teste t,  $p=0,043$ ), mas não houve diferenças entre as larguras das camadas submucosa ou muscular ( $p>0,05$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.



**Figura 6.** Fotomicrografias da uretra (★) de ratas nulíparas (A) e múltiparas (B) representativas dos resultados. Observar maior largura da mucosa da uretra em A na comparação com B. Coloração de tricrômio de Gomori, aumento 40x.

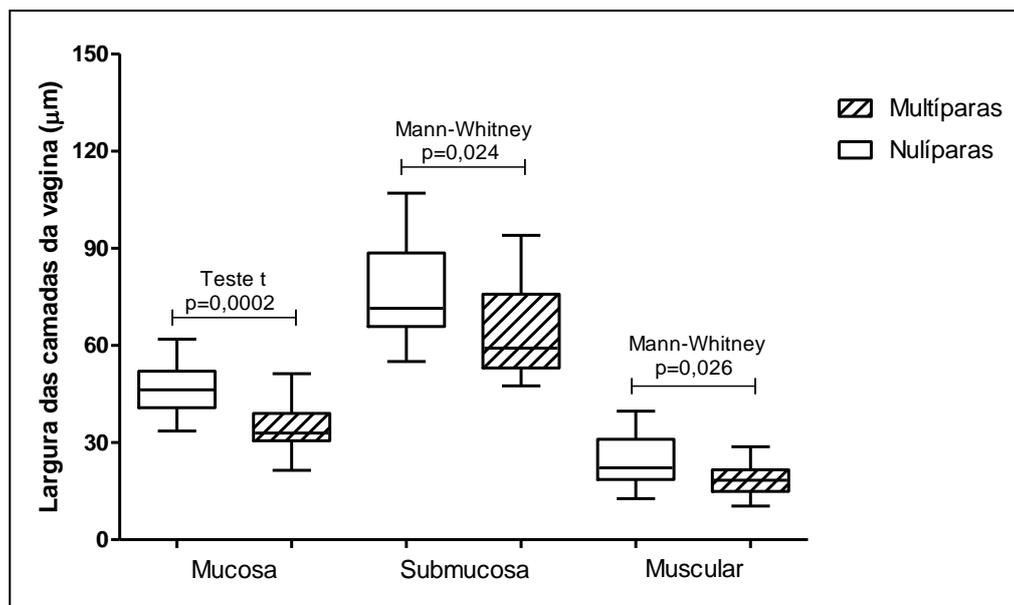
## B. Vagina

Os resultados para a vagina mostraram que a média $\pm$ DP da largura da mucosa obtida para o grupo de múltiparas foi menor ( $33,6\pm 7,7$ ) do que para o grupo de nulíparas ( $45,8\pm 8,5$ ) (Teste t,  $p = 0,0002$ ), bem como as medianas das larguras das camadas submucosa e muscular nas múltiparas (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ) (Tabela 2; Figura 7 e 8).

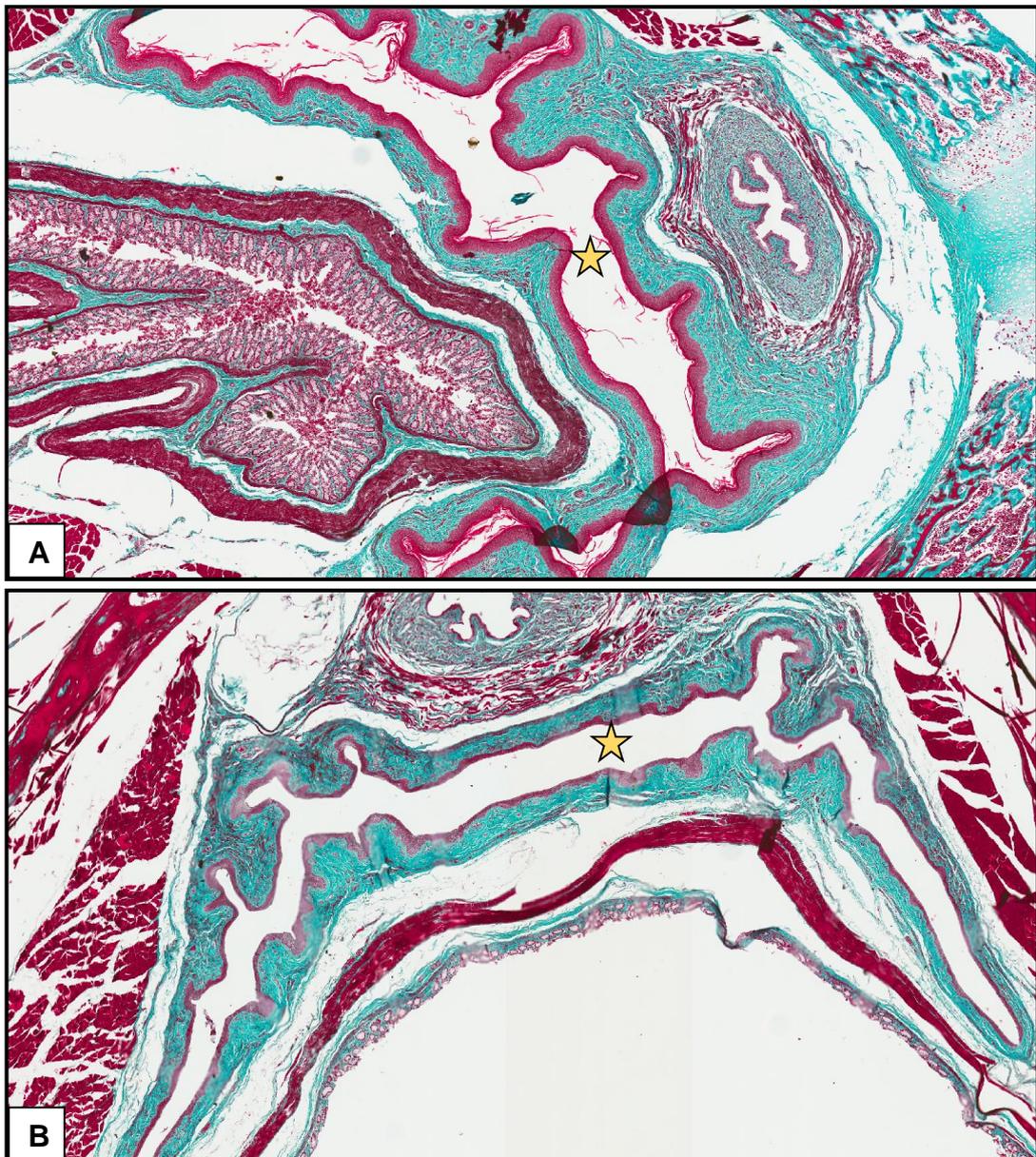
**Tabela 2.** Largura das camadas mucosa, submucosa e muscular da vagina de ratas nulíparas e múltíparas.

<b>Largura das camadas</b>		<b>Nulíparas</b>	<b>Múltíparas</b>
		<i>Média±DP</i>	<i>Mediana</i>
<b>1</b>	<b>Mucosa</b>	45,8± 8,5	33,6± 7,7*
		46,3	32,9
<b>2</b>	<b>Submucosa</b>	76,0±14,5	64,6±15,8*
		71,5	59,2
<b>3</b>	<b>Muscular</b>	24,5± 7,9	18,7 ± 5,3*
		22,2	18,3

\*Valores diferentes do controle,  $p < 0,05$



**Figura 7.** Largura das camadas mucosa, submucosa e muscular da vagina de ratas nulíparas e múltíparas. Os resultados mostraram na comparação com as nulíparas, que as ratas múltíparas reduziram a largura da camada mucosa e aumentaram as larguras das camadas submucosa e muscular ( $p < 0,05$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.



**Figura 8.** Fotomicrografias da vagina (★) de ratas nulíparas (A) e múltíparas (B) representativas dos resultados. Observar menor largura da mucosa e maior largura da submucosa e muscular em B, na comparação com A. Coloração de tricrômio de Gomori, aumento 30x.

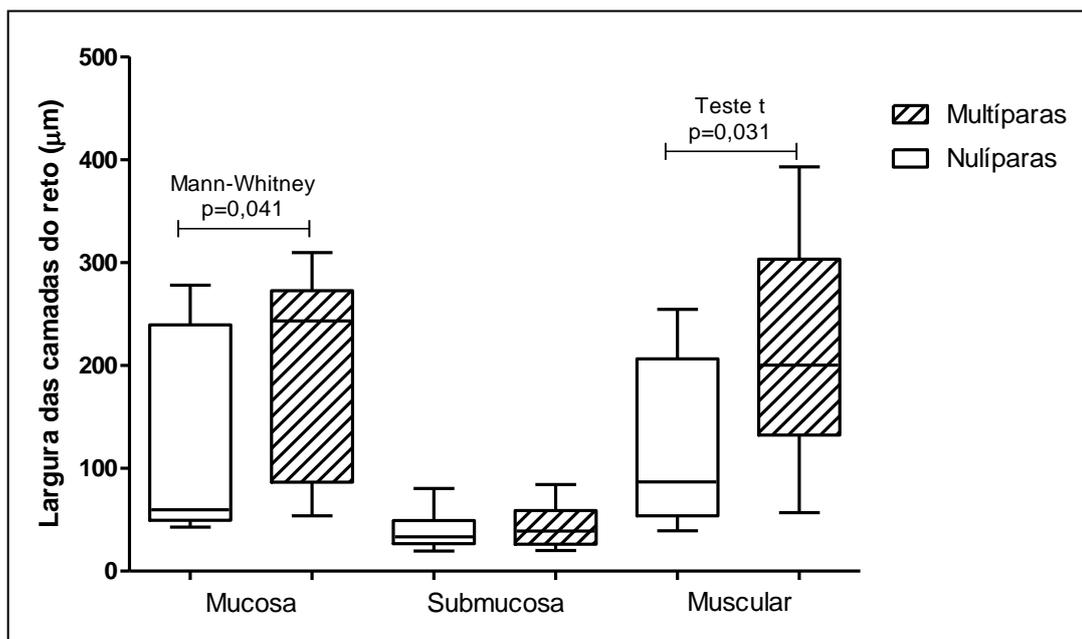
### C. Reto

No reto, os resultados mostraram que as ratas múltíparas apresentaram aumento na mediana da largura da mucosa e na  $media \pm DP$  da largura da camada muscular, na comparação com o grupo de nulíparas; para a submucosa não houve diferenças entre os grupos (Tabela 3; Figura 9 e 10).

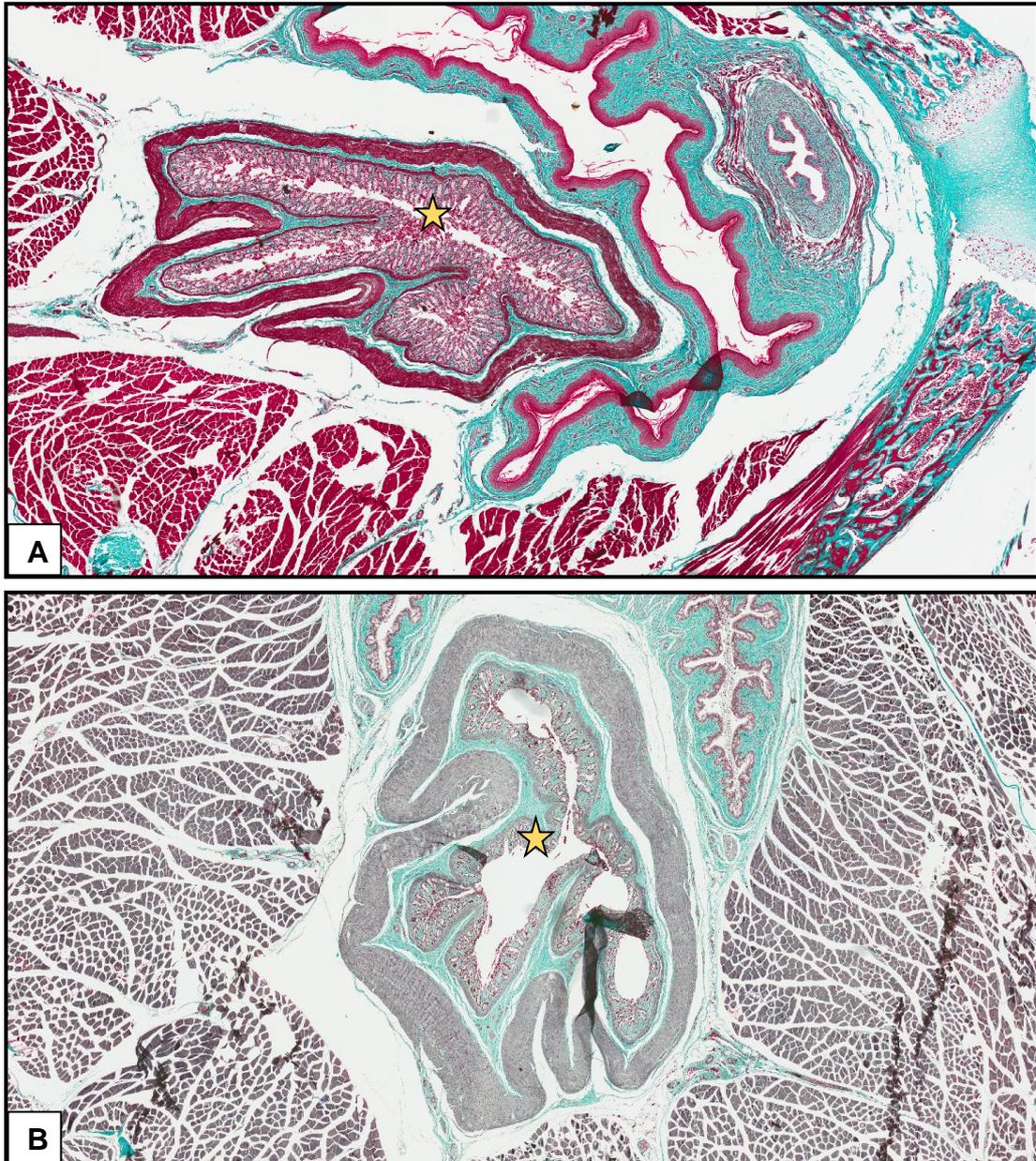
**Tabela 3.** Largura das camadas mucosa, submucosa e muscular do reto de ratas nulíparas e múltiparas.

	<b>Largura das camadas</b>	<b>Nulíparas</b>	<b>Múltiparas</b>
		<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>	<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>
<b>1</b>	<b>Mucosa</b>	120,0± 100,5 59,6	197,1± 92,1* 243,1
<b>2</b>	<b>Submucosa</b>	39,7±18,5 33,3	43,9±19,6 39,0
<b>3</b>	<b>Muscular</b>	122,1 ± 81,9 86,7	213,5± 104,4* 200,2

\*Valores diferentes do controle,  $p < 0,05$



**Figura 9.** Largura das camadas mucosa, submucosa e muscular do reto de ratas nulíparas e múltiparas. Os resultados mostraram na comparação com as nulíparas, que as ratas múltiparas apresentaram maiores larguras na mucosa e muscular ( $p < 0,05$ ); mas não houve diferenças para a submucosa entre os grupos (Teeste t,  $p > 0,05$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.



**Figura 10.** Fotomicrografias do reto (★) de ratas nulíparas (A) e múltiparas (B) representativas dos resultados. Observar maior largura das camadas e muscular em B, na comparação com A. Coloração de tricrômio de Gomori, aumento 20x.

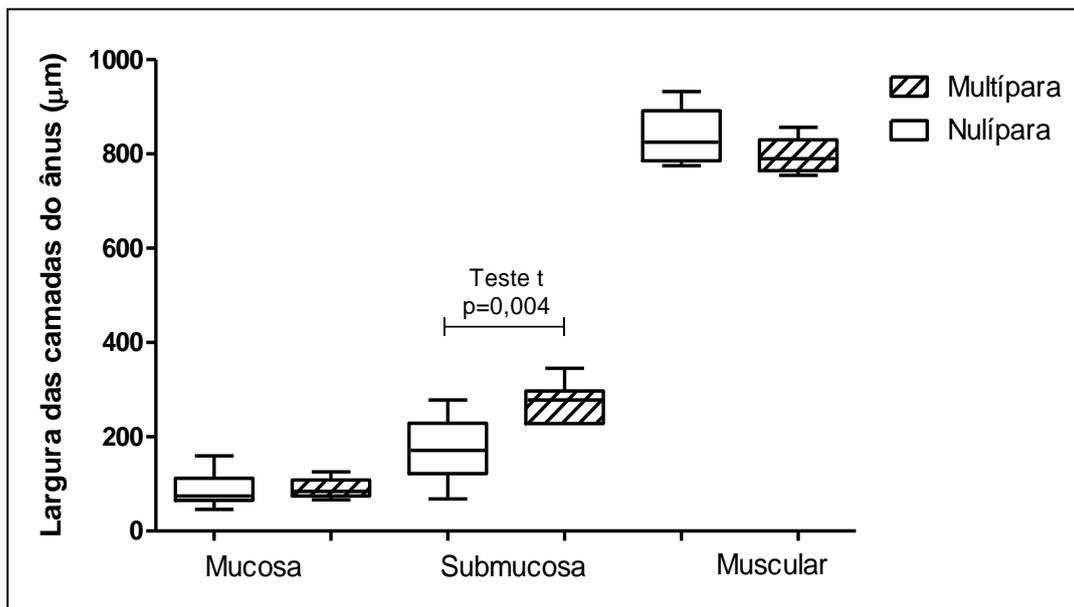
#### D. Ânus

Os resultados mostraram que as ratas múltiparas apresentaram aumento na  $\text{media} \pm \text{DP}$  da largura da camada submucosa quando comparado com as nulíparas; não houve diferenças nas camadas mucosa (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ) ou muscular (Teste t,  $p > 0,05$ ) entre os grupos (Tabela 4; Figura 11 e 12).

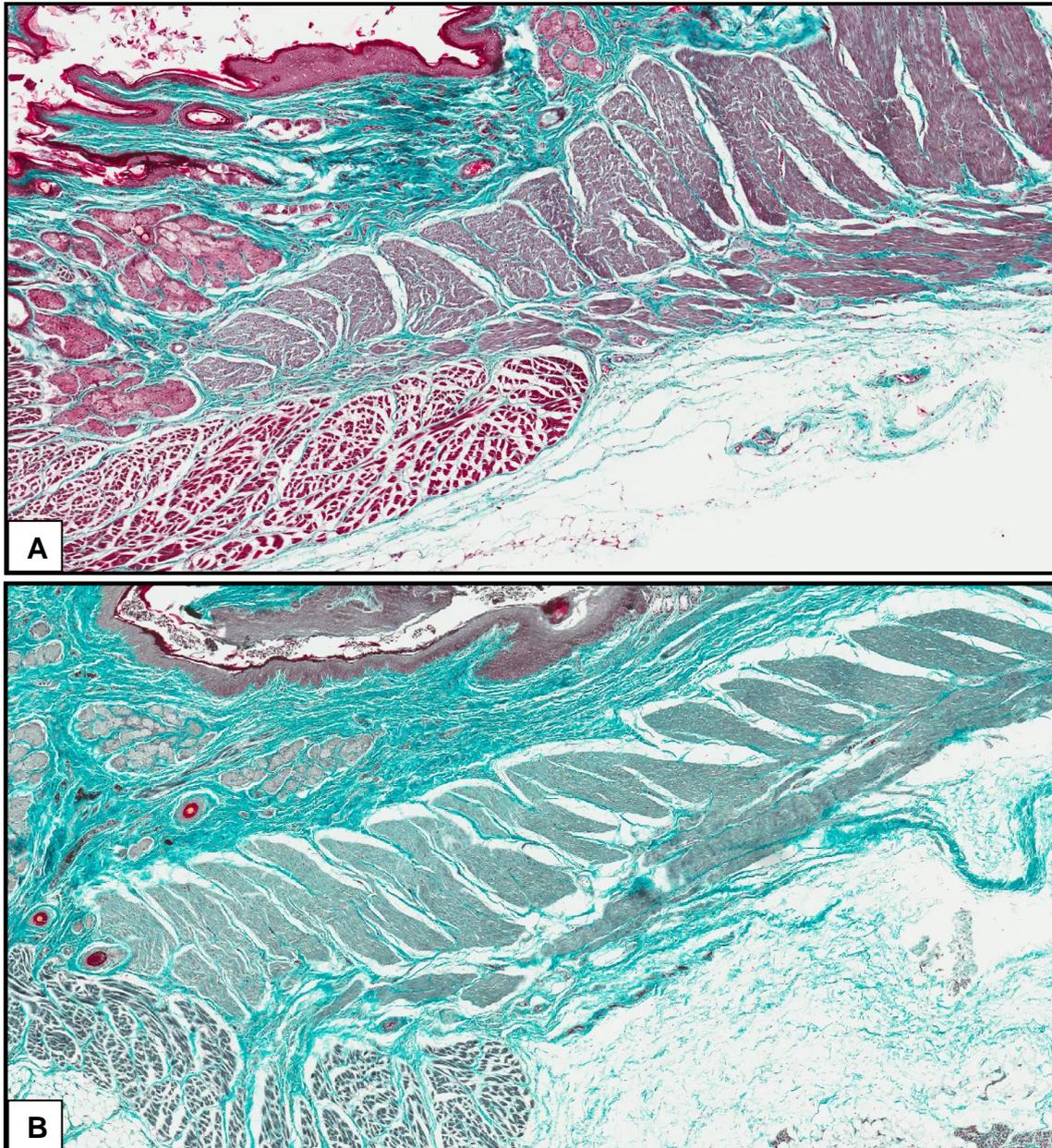
**Tabela 4.** Largura das camadas mucosa, submucosa e muscular do ânus de ratas nulíparas e múltiparas.

	<b>Largura das camadas</b>	<b>Nulíparas</b>	<b>Múltiparas</b>
		<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>	<i>Média±DP</i> <i>Mediana</i>
<b>1</b>	<b>Mucosa</b>	86,4±36,7 74,5	90,1±20,3 84,4
<b>2</b>	<b>Submucosa</b>	172,2±67,3 171,0	276,2±40,9* 278,3
<b>3</b>	<b>Muscular</b>	835,9±61,1 825,3	795,7±38,4 789,8

\*Valores diferentes do controle,  $p < 0,05$



**Figura 11.** Largura das camadas mucosa, submucosa e muscular do ânus de ratas nulíparas e múltiparas. Os resultados mostraram que quando comparado com as nulíparas as ratas múltiparas apresentaram maior largura da camada submucosa ( $p < 0,05$ ); não houve diferenças entre os grupos para as camadas mucosa (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ) ou muscular (Teste t,  $p > 0,05$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.



**Figura 12.** Fotomicrografias do ânus de ratas nulíparas (A) e múltíparas (B) representativas dos resultados. Observar maior submucosa em B, na comparação com A. Coloração de tricrômio de Gomori, aumento 40x.

#### 4.2. Avaliação da musculatura lisa

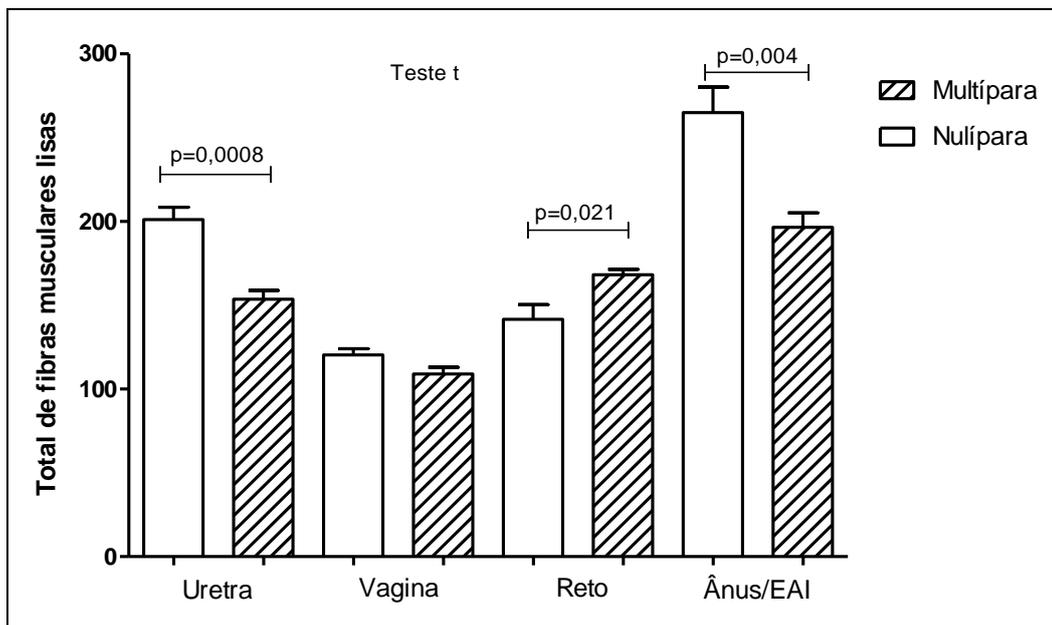
Para avaliar se a multiparidade afeta o músculo liso associado aos órgãos pélvicos (uretra, vagina, reto e ânus) foi quantificado o total dessas fibras em 10% da área total do músculo. Os resultados mostraram que, na comparação com o grupo de nulíparas, as ratas múltíparas reduziram o total das fibras lisas na uretra e no ânus (esfíncter anal interno), mas

aumentaram no reto (Teste t,  $p < 0,05$ ); para a vagina não houve diferenças entre os grupos (teste t,  $p > 0,05$ ) (Tabela 5, Figuras 13 e 14).

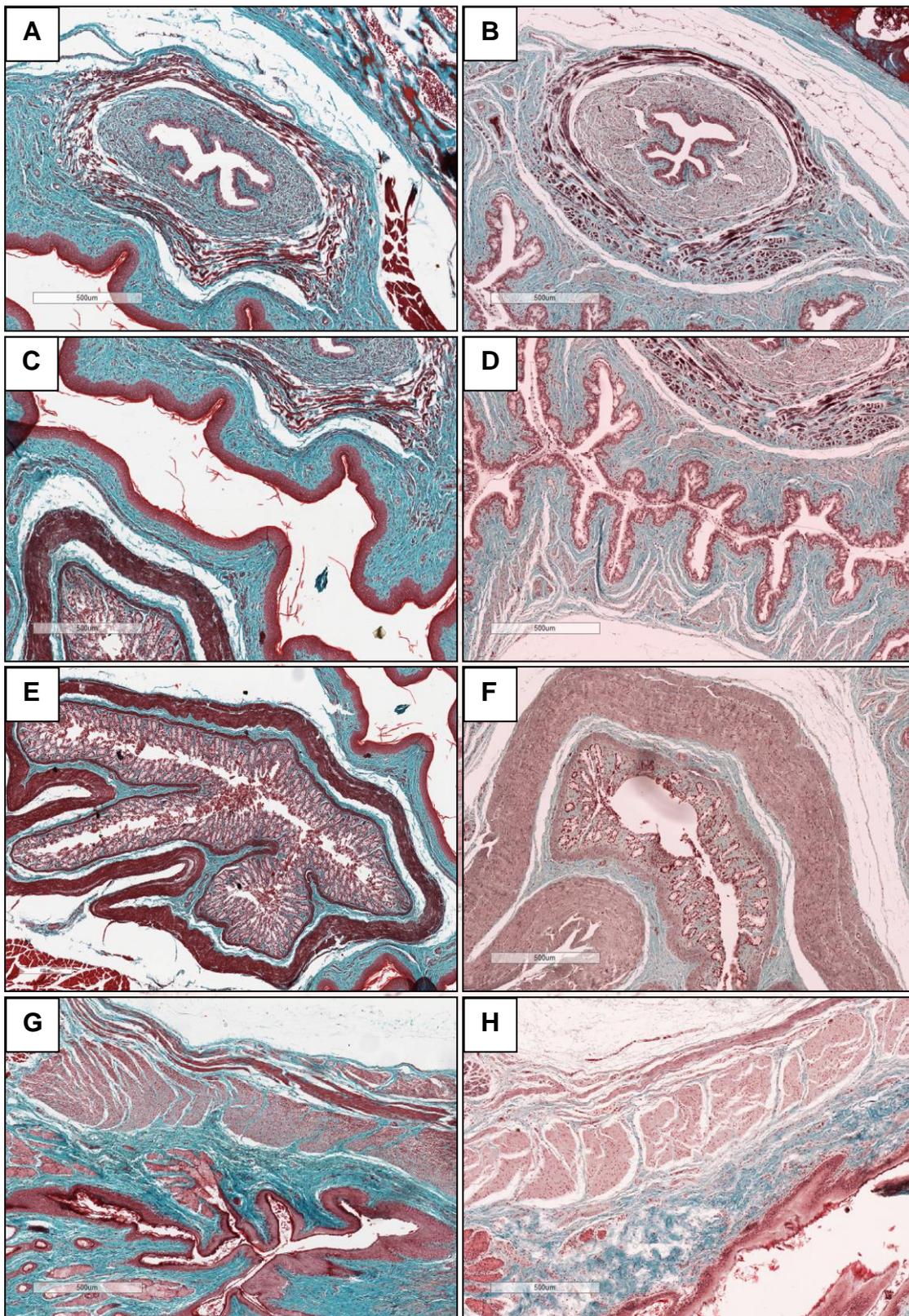
**Tabela 5.** Total de fibras musculares lisas nos órgãos pélvicos de ratas nulíparas e múltíparas.

<i>Fibras musculares lisas</i>		<i>Nulíparas</i>	<i>Múltíparas</i>
		<i>Média±DP</i>	<i>Mediana</i>
<b>1</b>	<i>Uretra</i>	201,2±16,4	153,6± 11,9*
<b>2</b>	<i>Vagina</i>	120,4±8,4	109,0±9,0
<b>3</b>	<i>Reto</i>	141,6±19,5	168,2±7,4*
<b>4</b>	<i>Ânus</i>	265,0±34,0	199,6±19,2*

\*Valores diferentes do controle,  $p < 0,05$



**Figura 13.** Total de fibras musculares lisas nos órgãos pélvicos (uretra, vagina, reto e ânus) de ratas nulíparas e múltíparas. Os resultados, analisados pelo teste t, mostraram diminuição no total de fibras na uretra e no esfíncter anal interno, mas aumento dessas fibras no reto nas múltíparas, na comparação com as nulíparas ( $p < 0,05$ ); não houve diferenças no total de fibras lisas entre os grupos para a vagina ( $p > 0,05$ ). Estão mostradas as médias e os desvios padrão.



**Figura 14.** Fotomicrografias dos órgãos pélvicos, uretra (A,B), vagina (C,D), reto (E,F) e ânus (G,H) de ratas nulíparas (A,C,E,G) ou múltíparas (B,D,F,H). Observar maior densidade das camadas musculares lisas em A, F e G na comparação com B, E e H, respectivamente. Coloração de tricrômio de Gomori. Barras = 500 µm.

### 4.3. Avaliação da musculatura estriada esquelética

O estudo da musculatura estriada foi realizado no assoalho pélvico e na musculatura esfínteriana da uretra e ânus

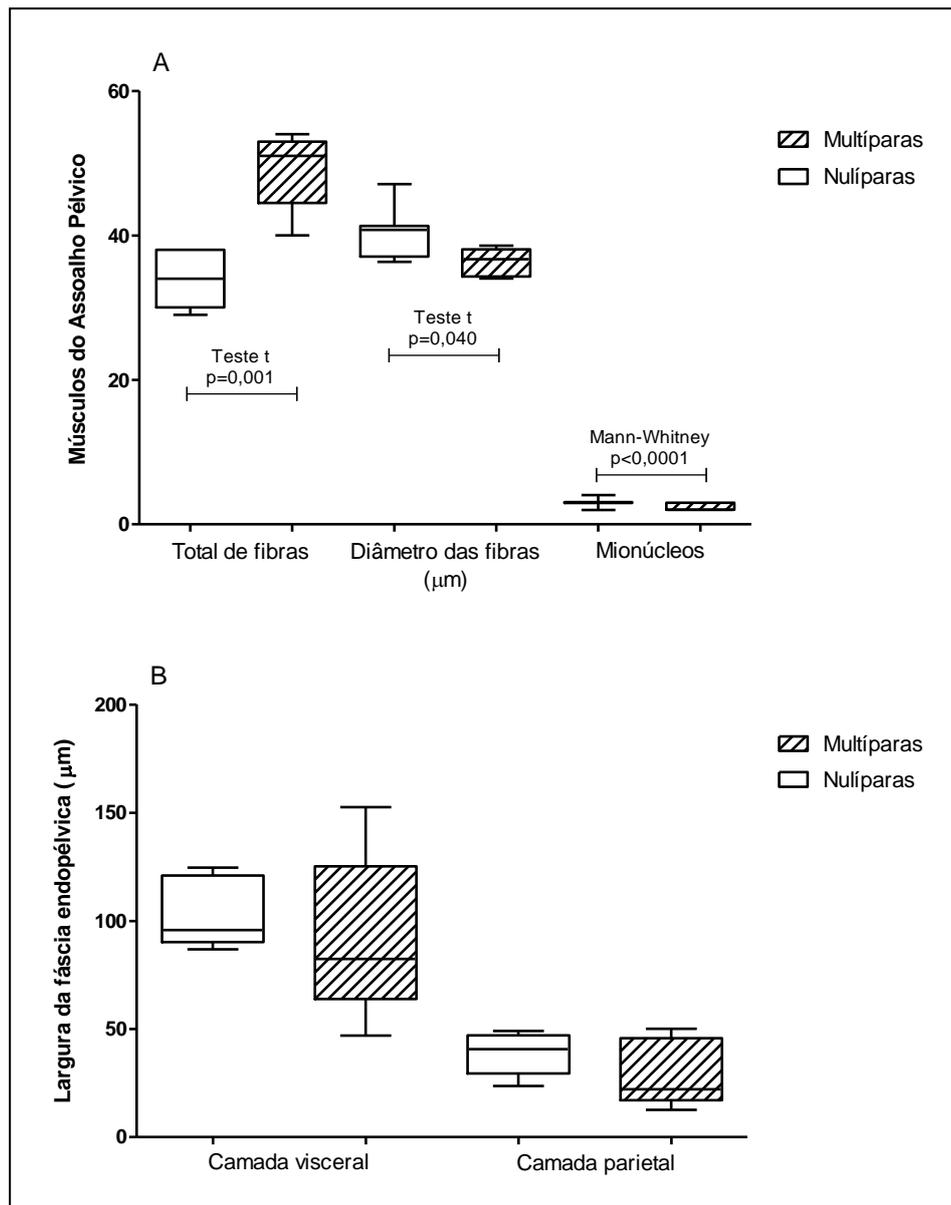
#### A. Músculo do assoalho pélvico e fáscia endopélvica

Os resultados mostraram que a multiparidade afetou o assoalho pélvico, uma vez que, na comparação com as nulíparas, as ratas múltiparas apresentaram aumento na  $\text{media} \pm \text{dp}$  do total de fibras esqueléticas ( $1,6 \text{ mm}^2$ ) (Teste t,  $p < 0,05$ ), mas reduziram a  $\text{media} \pm \text{dp}$  e a mediana do diâmetro e o total de mionúcleos, respectivamente ( $p > 0,05$ ). Os resultados mostraram também que, quando comparada com o grupo de nulíparas, a multiparidade não afetou a largura das camadas visceral ou parietal (Teste t,  $p > 0,05$ ) da fáscia endopélvica (Tabela 6; Figura 15 e 16).

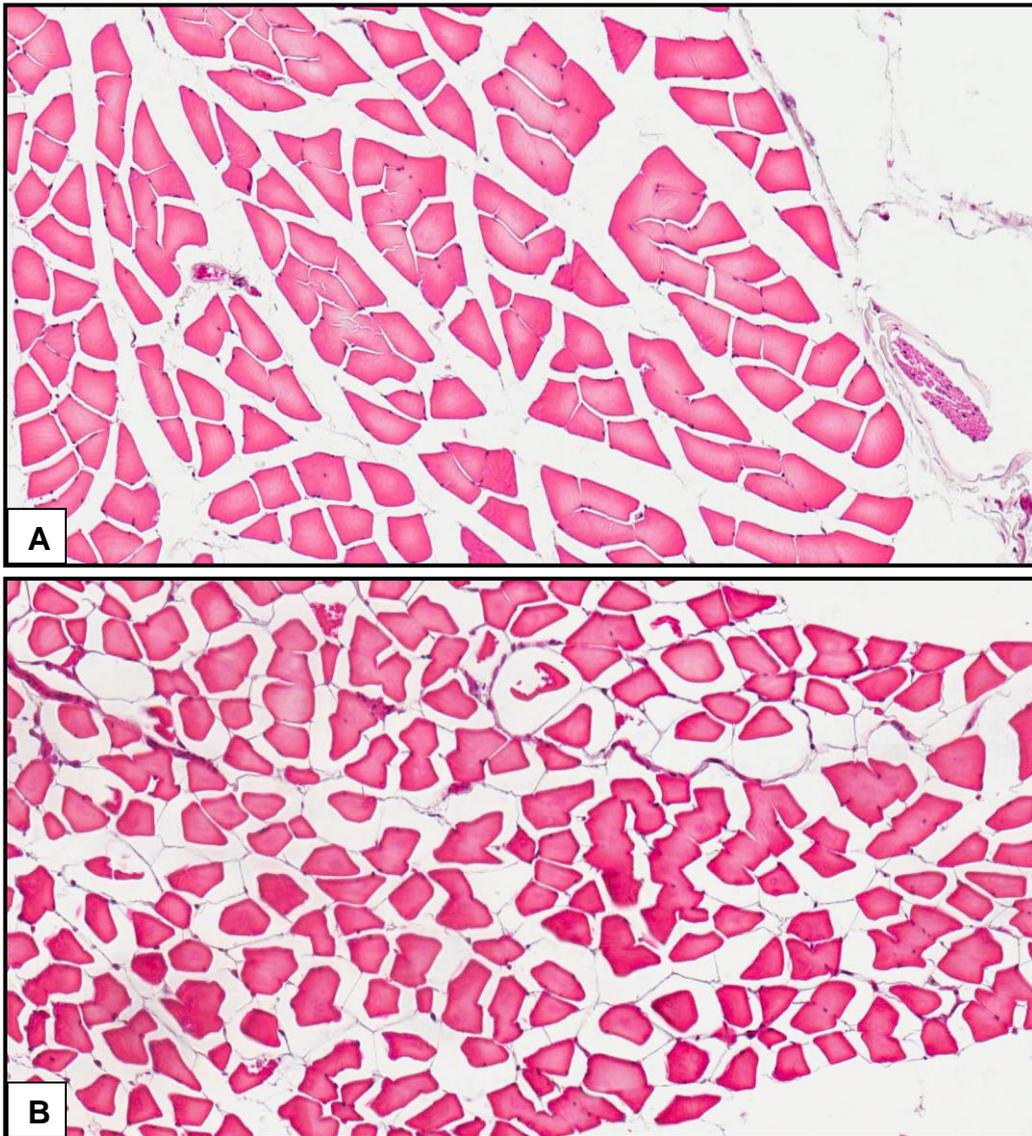
**Tabela 6.** Parâmetros morfométricos do assoalho pélvico, músculos e fáscia, de ratas nulíparas e múltiparas.

<b>Parâmetros morfométricos</b>		<b>Nulíparas</b>	<b>Múltiparas</b>	
		<i>Média ± DP</i>	<i>Mediana</i>	
<b>1</b>	<b>Músculos</b>	<i>Total de fibras</i>	$34,0 \pm 4,1$ 34,0	$49,2 \pm 5,5^*$ 51,0
		<i>Diâmetro das fibras</i>	$40,4 \pm 3,6$ 40,8	$36,3 \pm 1,9^*$ 36,7
		<i>Mionúcleos</i>	$2,9 \pm 0,6$ 3,0	$2,3 \pm 0,4^*$ 2,0
<b>2</b>	<b>Fáscia</b>	<i>visceral</i>	$103,7 \pm 16,38$ 95,7	$92,1 \pm 38,57$ 82,38
		<i>parietal</i>	$38,7 \pm 9,8$ 40,6	$29,5 \pm 15,5$ 22,1

\*Valores diferentes do controle,  $p < 0,05$



**Figura 15.** Parâmetros morfométricos dos músculos do assoalho pélvico (total de fibras, diâmetro das fibras e total de mionúcleos) (A) e largura das camadas visceral e parietal da fásia endopélvica (B). Os resultados, analisados pelos testes t ou Mann-Whitney, mostraram que ratas múltiparas apresentaram maior total de fibras esqueléticas, mas menores diâmetros e total de mionúcleos, na comparação com as nulíparas ( $p<0,05$ ). Os resultados mostraram também que a multiparidade não afetou a larguras das camadas visceral ou parietal (Teste t,  $p>0,05$ ), na comparação com as nulíparas. Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.



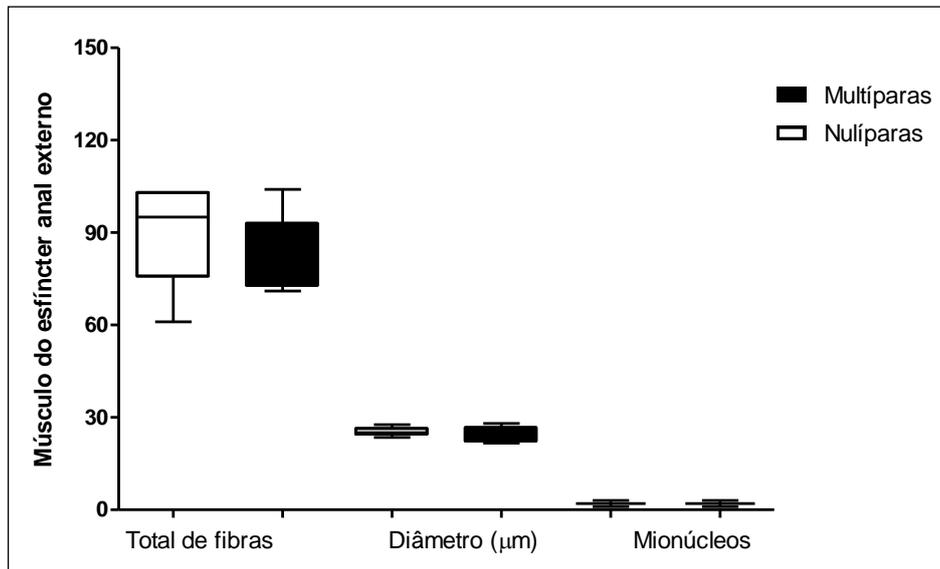
**Figura 16.** Fotomicrografias do assoalho pélvico de ratas nulíparas (A) e múltíparas (B) representativas dos resultados. Observar maior número de fibras esqueléticas e menor diâmetro em B, na comparação com A. Coloração HE, aumento 400x.

### **B. Esfíncter anal externo (EAE)**

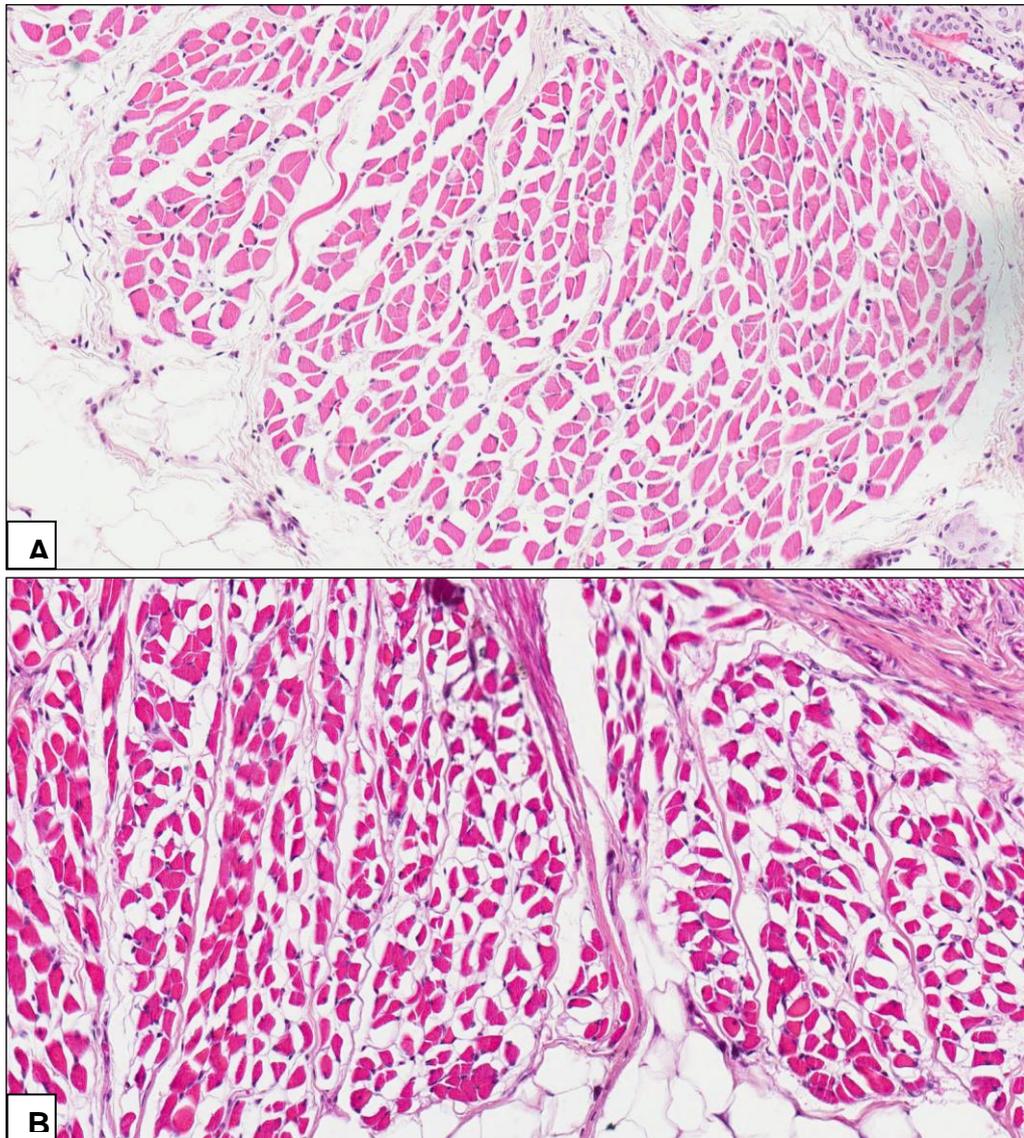
Os resultados mostraram que, na comparação com as nulíparas, a multiparidade não afetou o diâmetro, total de fibras e mionúcleos do esfíncter (Teste t,  $p>0,05$ ) ou o total de mionúcleos (Mann-Whitney,  $p>0,05$ ) (Tabela 7, Figuras 17 e 18).

**Tabela 7.** Parâmetros morfométricos dos músculos do esfíncter anal externo (EAE) do ânus de ratas nulíparas e múltiparas.

<i>Fibras musculares esqueléticas</i>		<i>Nulíparas</i>	<i>Múltiparas</i>
		<i>Média±DP</i>	<i>Mediana</i>
<i>Esfíncter anal externo</i>	Total de fibras	90,4±17,3 95,0	81,8±13,8 78,0
	Diâmetro das fibras	25,3±1,5 25,0	24,6±2,4 24,8
	Mionúcleos	2,0±0,5 2,0	2,1±0,6 2,0



**Figura 17.** Parâmetros morfométricos do músculo estriado esquelético esfíncter anal externo. Os resultados mostraram que, na comparação com as nulíparas, a multiparidade não afetou o diâmetro (Teste t,  $p>0,05$ ), total das fibras e mionúcleos (Mann-Whitney,  $p>0,05$ ) das fibras do esfíncter uretral externo. Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.



**Figura 18.** Fotomicrografias do esfíncter anal externo, (A) nulíparas e (B) múltipara de ratas Wistar. Não houve diferenças no total, diâmetro ou mionúcleos das fibras musculares entre os grupos de nulíparas e múltiparas. Coloração HE, aumento 200x.

#### 4.4. Avaliação da força muscular

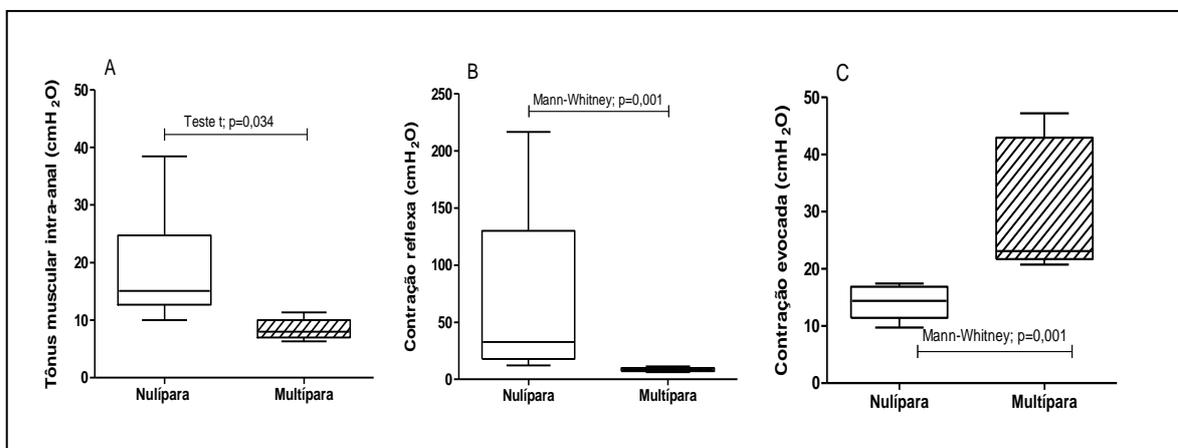
Para avaliar a força dos músculos da pelve e períneo foram tomadas a medida de tônus muscular pela introdução da sonda de Foley no ânus, a força de contração reversa pela introdução da sonda de eletroestimulador na vagina e pela força de contração evocada pela aplicação da eletroestimulação.

Os resultados mostraram que, na comparação com as nulíparas, as ratas múltiparas apresentaram redução de 56% e 49% na média±DP do tônus intra-anal e na contração evocada (Teste t,  $p=0,033$ ; Teste t,  $p=0,030$ ), respectivamente (Tabela 8, Figura 19).

**Tabela 8.** Parâmetros de força muscular dos órgãos pélvicos e perineais obtidos para as ratas nulíparas e múltiparas.

<b>Parâmetros de força</b>		<b>Nulíparas</b>	<b>Múltiparas</b>
		<i>Média±DP</i>	<i>Mediana</i>
<b>1</b>	<i>Tônus muscular intra-anal</i>	19,4±9,7 15,1	8,4±1,8* 8,0
<b>2</b>	<i>Contração reflexa</i>	25,5±16,13 19,9	16,5±3,2 16,3
<b>3</b>	<i>Contração evocada</i>	56,0± 26,2 56,1	28,5±5,1* 28,23

\*Valores diferentes do controle,  $p < 0,05$



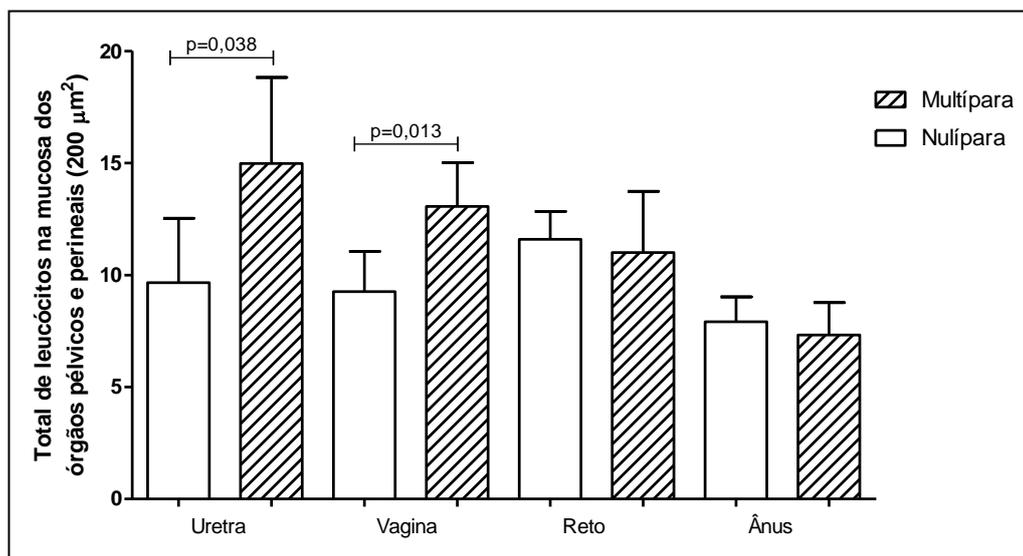
**Figura 19.** Parâmetros de força muscular de ratas nulíparas e múltiparas, tônus intra-anal (A) contração reflexa (B) e contração evocada (C). Os resultados mostraram que, na comparação com as nulíparas, as ratas múltiparas diminuíram o tônus intra-anal (Teste t,  $p=0,033$ ) e a força de contração evocada (Teste t,  $p=0,033$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

#### 4.5. Avaliação das células migratórias nos tecidos associados aos órgãos da pelve e períneo.

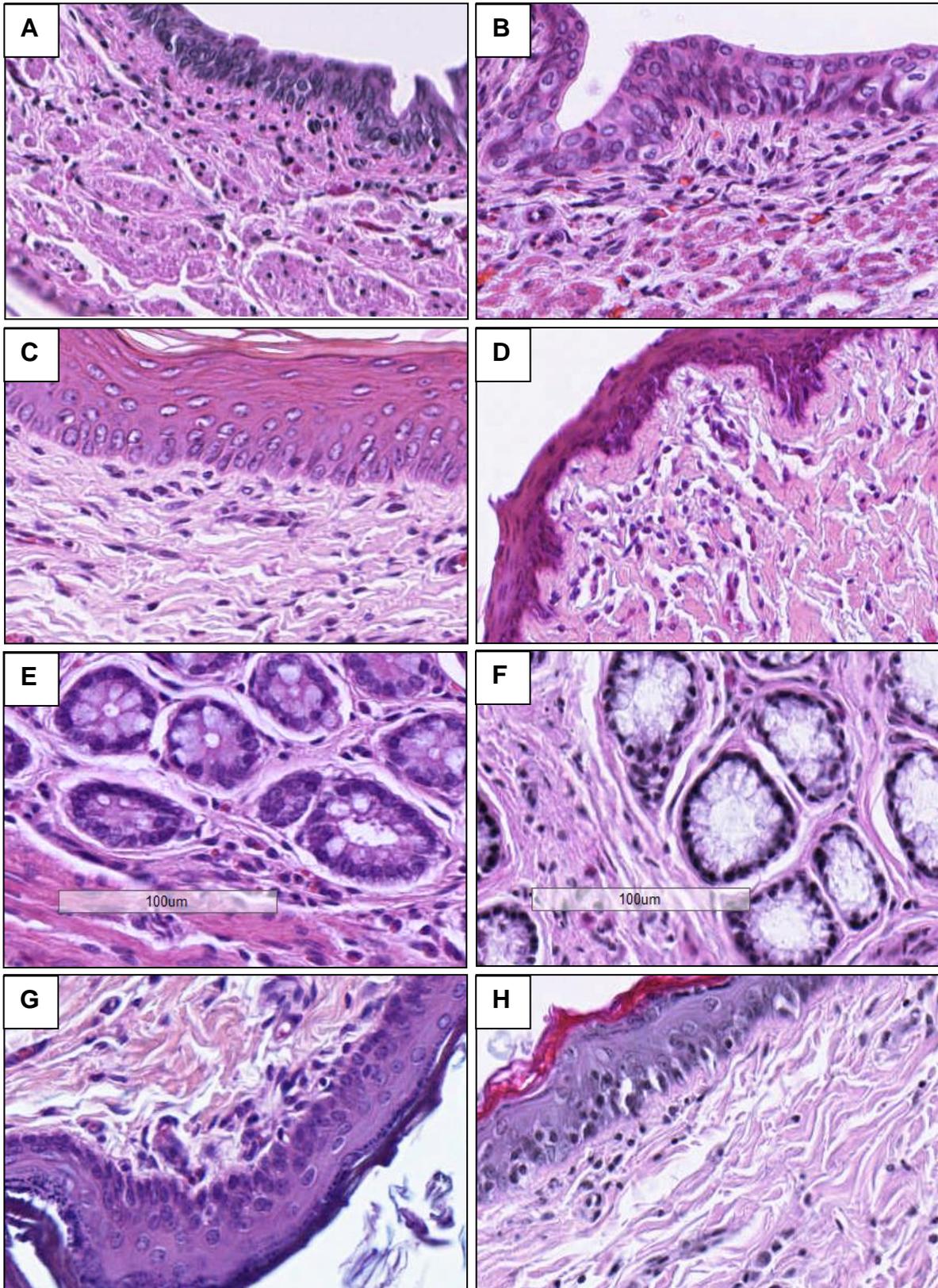
Para a avaliação histopatológica foi feita a análise qualitativa do parênquima e do estroma que compõe os diferentes órgãos pélvicos (uretra, vagina, reto, ânus, e assoalho pélvico), bem como foram identificadas e quantificadas as células migratórias numa área total de  $200 \mu\text{m}^2$ , em três quadrantes equidistantes, das secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina.

Os resultados mostraram que no parênquima ou estroma dos órgãos obtidos das nulíparas ou múltiparas (uretra, vagina, reto, ânus e assoalho pélvico) não foi observada alterações sugestivas de processos patológicos, como tecido necrótico, células em degeneração, processos fibróticos ou microhemorrágicos.

Quanto aos leucócitos foi observado maior número dessas células, predominantemente formado por eosinófilos, linfócitos e macrófagos, na mucosa da uretra e vagina das múltiparas (uretra =  $15,0 \pm 3,8$ ; vagina =  $13,1 \pm 2,0$ ) na comparação com as nulíparas (uretra =  $9,7 \pm 2,9$ ; vagina =  $9,3 \pm 1,8$ ) (Teste t,  $p < 0,05$ ) (Figura 20). Para o reto e ânus, o total de leucócitos não diferiu entre os grupos de nulíparas (reto =  $11,6 \pm 1,2$ ; ânus =  $7,9 \pm 1,1$ ) ou múltiparas (reto =  $11,0 \pm 2,7$ ; ânus =  $7,3 \pm 1,5$ ) (Teste t,  $p > 0,05$ ).



**Figura 20.** Total de leucócitos presentes na mucosa dos órgãos pélvicos e perineais de ratas nulíparas ou múltiparas. Os resultados analisados pelo teste t mostraram maior número de células na mucosa da uretra e vagina das múltiparas, na comparação com as nulíparas ( $p < 0,05$ ); para a mucosa do reto e ânus não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Estão mostradas as médias e os desvios padrão.



**Figura 21.** Fotomicrografias da mucosa dos órgãos pélvicos, uretra (A,B), vagina (C,D), reto (E,F) e ânus (G,H) representativas dos resultados obtidos para nulíparas (A,C,E,G) ou múltiparas (B,D,F,H). Observar maior número de leucócitos/200  $\mu\text{m}^2$  em B e D na comparação com A e C, respectivamente. Não houve diferenças no total de leucócitos no trecho reto-anal entre os grupos. Coloração HE. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .



### 5.1. Considerações sobre a uretra

A uretra é constituída, de uma perspectiva mais interna para uma externa, em toda sua extensão, por uma túnica mucosa, submucosa e muscular lisa (Gartner & Hiatt, 2003). A mucosa é formada por tecido epitelial, cuja a principal função é a proteção (Gartner & Hiatt, 2003). Já a submucosa, caracteriza-se pela maciça presença de tecido conjuntivo fibroelástico, além de um rico plexo vascular, que possui papel chave na estabilidade da uretra (DeLancey, 1988; Gartner & Hiatt, 2003). Por sua vez, a túnica conjuntiva é envolvida pela túnica de músculo liso (Gartner & Hiatt, 2003). Funcionalmente, a túnica muscular lisa mantém as paredes da uretra colabadas (DeLancey, 1988; Sampaio et al., 2001).

DeLancey (1988), denomina de mecanismo intrínseco de continência urinária ao conjunto das três camadas. Entende-se que este mecanismo eficiente de constrição contribui para o fechamento da uretra e, por conseguinte, da manutenção da pressão intra-uretral superior em relação à pressão intra-vesical, o que garante o armazenamento da urina (DeLancey, 1988; Sampaio et al., 2001).

Sabe-se que a uretra possui três porções anatômicas, proximal, média e uma distal. Nota-se que ao redor dos dois últimos seguimentos uretral a presença do esfíncter uretral externo (Cannon et al., 2002; Jung et al., 2012). Este possui duas porções, sendo uma externa, o rabnoesfíncter, músculo estriado esquelético do tipo I de contração lenta, e uma porção interna, o músculo periuretral, formado por fibras do tipo II de contração rápida, predominantemente (Oelrich, 1983; Woodman & Graney, 2002). A primeira porção é responsável pela contração tônica da uretra, com ação sinérgica ao mecanismo intrínseco (Sampaio et al., 2001; Jung et al., 2012). A segunda porção é responsável por constriuir a uretra, vigorosamente, durante os aumentos súbitos da pressão intra-abdominal. Oelrich (1983) e Jung et al. (2012), salientam que a porção periuretral do EUE age de forma concomitante aos músculos do assoalho pélvico, aumentando a pressão intra-uretral. A todo, esse conjunto de estruturas, chama-se de mecanismo extrínseco da continência urinária.

Compreende-se que muitos fatores são responsáveis por afetar o funcionamento dos mecanismos intrínseco e extrínseco uretral, tais como envelhecimento, menopausa, obesidade, neuropatias, cirurgias múltiplas, parto vaginal, trauma obstétrico e radioterapia pélvica (Heesakkers & Gerretsen, 2004). Phillips & Monga (2005), destacam que múltiplos partos sejam capazes de expor os tecidos associados a pelve e períneo a forças tensionais para além da capacidade viscoelástica, o que ocasiona, em algumas mulheres, alterações no parênquima uretral permanentemente. Dessa forma, há necessidade de investigações que visem caracterizar onde ocorrem as possíveis alterações, se nas estruturas do mecanismo intrínseco ou extrínseco da continência.

Nesse sentido, o presente estudo objetivou caracterizar e comparar, por meio de análise morfológica, os tecidos associados à continência, urinária e fecal, e a sexualidade. No que se refere às estruturas de mecanismo extrínseco da continência urinária, nossos resultados indicaram que os músculos do assoalho pélvico de ratas múltiparas apresentaram menor diâmetro em relação às nulíparas, bem como menor largura do EUE. Tais resultados apontam para uma alteração importante das estruturas responsáveis pela continência urinária feminina. Dessa forma, corroboram também com os achados de alguns estudos (Feola et al., 2011; Xelhuantzi et al., 2014), que observaram que a multiparidade reduz a largura da musculatura estriada esquelética periuretral e do assoalho pélvico e, com isso, podem favorecer alterações nos tecidos responsáveis pelo mecanismo de continência urinária. Pelo que esses achados apontados, ajudam a confirmar o porquê de algumas mulheres com disfunções de órgãos pélvicos, quando solicitadas a realizarem testes irritativos, como tossir e manobra de Valsalva, perderem urina durante a execução das tarefas solicitadas, pelo fato de os músculos responsáveis pela contração reflexa durante os aumentos súbitos da pressão intra-abdominal não conseguirem realizar contração efetiva para evitar a perda de urina. Esses ao contraírem, comprimem a uretra junto a parede anterior da vagina, por meio de duas vias; pelo aumento da tensão da fáschia endopélvica que circunda a uretra, bexiga,

vagina e reto, e pelo músculo esfíncter da vagina, que é feixe dos MAP's (Sampaio et al., 2001). Em sendo assim, os resultados do presente estudo, reforçam a tese de que a multiparidade, tendo como via de parto a vagina, contribui de maneira significativa para redução do diâmetro dos músculos responsáveis pela continência urinária, o que favorece a manifestação de perda de urina aos esforços.

Em relação às estruturas de mecanismo intrínseco da continência urinária, nossos achados revelaram que as múltiparas possuem menor largura nas túnicas mucosa, submucosa e muscular da uretra, bem como menor número de células musculares lisas em relação as nulíparas. Dessa forma, esses resultados indicam que múltiparas possuem menor volume de tecidos responsáveis pelo fechamento uretral fisiológico, o que pode comprometer também o mecanismo de continência urinária. Esses resultados corroboram com os achados de Xelhuantzi et al. (2014), que observaram que ratas múltiparas possuem menor túnica mucosa e submucosa quando comparadas as nulíparas. Além disso, relataram que nulíparas possuem maior quantidade de músculo liso, colágeno e vasos sanguíneos no trato urinário inferior em relação as múltiparas. Algumas hipóteses são cogitadas para explicar os fenômenos até aqui discutidos. Como o dano mecânico induzido pelo parto, que além de estirar a uretra, comprime suas paredes, o que provoca redução do suprimento sanguíneo, que ocasiona à atrofia do tecido (Cannon et al., 2002; Jung et al., 2012), que por sua vez resulta em retração das células para um tamanho menor no qual a sobrevivência ainda é possível. No músculo atrófico, as células contêm menor quantidade de mitocôndrias e retículo endoplasmático, para adequar o volume celular aos níveis reduzidos de suprimento sanguíneo, nutrientes ou estímulos tróficos (Rydevik et al., 1990). Em posse dessas informações, nota-se que os múltiplos mecanismos de parto, promovem perda de massa nas túnicas da uretral, o que compromete os mecanismos de continência urinária intrínseco e extrínseco.

## 5.2. Considerações sobre a vagina

As disfunções funcionais do assoalho pélvico têm impacto na qualidade de vida e auto-imagem da mulher, sendo o prolapso de órgão pélvico (POP) uma das mais comuns afecções funcionais da pelve (Barber et al., 2001; Melville et al., 2005). O POP tem maior incidência em mulheres multíparas, que pariram via parto normal, e idosas (Luber et al., 2001; Reay Jones et al., 2003). De tal modo que Mant et al. (1997) e Nygaard et al. (2008), observaram que mulheres que pariram tem quatro vezes mais probabilidade em relação as nulíparas, de desenvolverem POP após um único parto vaginal, e este risco quase dobra a partir do segundo parto. Sabe-se que o parto vaginal é mecanicamente exigente, visto que requer por um lado, alta capacidade elástica da vagina para proporcionar distensão máxima durante a passagem do concepto, versus a manutenção da resistência para evitar a ruptura e consequente lesão dos tecidos relacionados com o terço distal da pelve e períneo (Lien et al., 2004).

Muitos estudos têm sido conduzidos com o intuito de apontar quais as adaptações e alterações morfológicas que a multiparidade promove nos componentes da região em questão (Abramowitch et al., 2009; Lukacz et al., 2006). Pelo que nosso estudo, corroborou com a literatura ao demonstrar que multíparas possuem menor largura das túnicas mucosa, conjuntiva e muscular em relação às nulíparas.

Quanto a menor largura da mucosa vaginal em multíparas, nossos resultados corroboram com os achados de outros estudos (Feola et al., 2011; Xelhuantzi et al., 2014), que notaram menor largura da mucosa vaginal em multíparas frente às nulíparas. Assim, esses resultados apontam que a multiparidade reduz a espessura do epitélio, uma vez que durante a passagem do feto pelo canal de parto há isquemia transitória da mucosa, gerada pela compressão dos vasos sanguíneos na submucosa, além de estiramento das fibras do plexo hipogástrico inferior e do nervo pudendo, responsáveis pela inervação sensitiva e

motora, visceral e somática, dos tecidos da pelve e períneo, que também exerceram função neurotrófica nesses tecidos (Damaser et al., 2005; Rocha et al., 2007).

Em relação a menor largura da túnica de tecido conjuntivo da vagina nas múltiparas, nossos resultados confirmaram os relatos da literatura (Lowder et al., 2007; Abramowitch et al., 2009), em que a multiparidade contribui para redução do tecido conjuntivo e, dessa maneira, pode comprometer o papel biomecânico da vagina na sustentação dos órgãos pélvicos. Esse achado aliado ao menor diâmetro dos MAPs, confirmam o maior fator de risco que as múltiparas têm em relação às nulíparas para disfunções do assoalho pélvico, visto que possuem modificações nos tecidos responsáveis por resistir forças de compressão e tensão (DeLancey, 1992). Rundgren (1974) e Rahn et al. (2008), demonstraram que a prenhez e a multiparidade induzem adaptações na biomecânica dos tecidos da vagina, aumentando a extensibilidade, ou seja, a capacidade de alongar-se no sentido longitudinal e transversal, no entanto, diminui a força tênsil, que é a capacidade de resistir carga acima da propriedade viscoelástica. Diante disso, percebe-se que os elementos de suporte da vagina sofrem modificações importantes devido a multiparidade, o que a expõe para as disfunções do assoalho pélvico.

No que se refere a túnica muscular da vagina, nossos resultados apontaram para uma menor largura e número de fibras nas múltiparas em relação as nulíparas. Esses achados indicam que a multiparidade afeta o suporte ativo da vagina mediado pela túnica muscular (Feola et al., 2011), uma vez que o parto vaginal estira e comprimi os tecidos da pelve e períneo (Ashton-Miller & DeLancey, 2009). Ademais, cada tecido reage de maneira diferente ao estresse biomecânico, visto que eles possuem capacidade variável para adaptar-se às exigências do parto. Sabe-se que os músculos têm maior extensibilidade que os ligamentos, que por sua vez possuem maior capacidade elástica que os nervos, que são mais inelásticos, o que os expõem a lesões (Rydevik et al., 1990; Nordin e Frankel, 2003). Considerando que os nervos são estirados e comprimidos durante o parto vaginal, que eles possuem papel de condutores de estímulos sensitivo-efetuador, bem como fatores tróficos nos

tecidos (Chao, 2003), mediados pelo fator de crescimento neuronal (NGF), e que a multiparidade reduz a força tênsil da túnica muscular da vagina, o que interfere na interação entre músculo liso e NGF (Feola et al., 2011; Sofroniew et al., 2001), acreditamos que seja plausível que os múltiplos partos promovam diminuição na largura da parede da vagina, em função do efeito dos múltiplos estiramentos e de alterações nos fluxos axoplasmáticos neuronais.

### **5.3. Considerações sobre reto-ânus**

O organismo da mulher experimenta adaptações anatômicas e funcionais durante a vida, especialmente na gravidez. Essas adaptações ocorrem nas mais variadas esferas morfofuncionais (molecular, bioquímica, hormonal, celular, tecidual), tanto sistêmicas como locais. No que diz respeito as mudanças morfológicas promovidas pela gestação nas estruturas que compõem a pelve e períneo, em específico o reto e ânus, sabe-se que esses segmentos são muito exigidos durante a fase expulsiva do trabalho de parto, o dito secundamento, uma vez que a região perineal, formada pelo óstio da vagina, parede posterior da uretra e anterior do reto-ânus, constituem o estreitamento distal do canal de parto, sendo submetida a forças de tração, cisalhamento, pressão e torção (Montenegro & Filho, 2011). Em decorrência dessas forças incidindo sobre os tecidos, acreditamos que o parênquima e o estroma do reto e ânus, submetidos a múltiplos trabalhos de parto vaginal, tenham modificações importantes.

No tocante a maior largura da mucosa e submucosa apresentada pelas múltiparas em relação as nulíparas, nossos achados demonstraram que a multiparidade induziu uma biorremodelação, em especial, do tecido conjuntivo anal. Entende-se que o tecido conjuntivo confere resistência e elasticidade nos órgãos, além de desempenhar um importante papel em processos de cicatrização (Gartner & Hiatt, 2003). Assim, é possível que os múltiplos mecanismos de parto, com grande forças de tensão aplicadas nos tecidos componentes do canal de parto e nas adjacências deste, tenham induzidos o aumento tanto do tecido conjuntivo na

submucosa como do tecido epitelial da mucosa, em respostas aos repetidos estímulos tensionais, que por seu turno, ativam sinalizadores mecânicos da membrana celular dos fibroblastos, via ativação dos genes talina e p130Cas, e das células progenitoras epiteliais, via ativação dos genes vinculina e paxilina, das respectivas túnicas (Geiger & Bershadsky, 2001; Gillespie & Walker, 2001; Hayakawa et al., 2012).

Quanto ao menor diâmetro e número de fibras do EAE, bem como menor largura e número de fibras do EAI apresentado pelas múltiparas em relação as nulíparas, nossos achados apontam para diminuição no parênquima muscular estriado esquelético e liso responsáveis pela continência de gases e fezes nas ratas múltiparas. Esses resultados podem ser explicados pela distensão que o ânus recebe durante a passagem do feto no canal de parto, já que o pavimento pélvico é estirado 1,5 vez a 3,5 vezes acima do comprimento fisiológico, e também comprimido a uma pressão de 19kPa durante a expulsão do concepto (Ashton-Miller & DeLancey, 2009), o que tem como resultante um adelgaçamento das fibras musculares. Phull et al. (2011) demonstraram que a compressão dos tecidos pélvicos, em função do parto, causa diminuição do fluxo sanguíneo e hipóxia tecidual, o que resultou em ruptura de fibras musculares esqueléticas e modificações no trofismo dos músculos lisos. À vista disso, percebe-se que ambos os músculos responsáveis pela continência anal, fezes e flatos, reduziram seu volume. Em sendo assim, os nossos resultados corroboram com o entendimento de que múltiplos partos modificam os tecidos perianal, expondo-os a risco de lesão (Quigley, 2007; Mégnard et al., 2016).

No que se refere ao aumento das túnicas mucosa, conjuntiva e muscular observado no reto das múltiparas em relação as nulíparas, nossos achados apontam para um ganho de massa no parênquima do reto mediado pela adaptação aos múltiplos partos. Yao et al. (2008), observaram que a relaxina promoveu inibição da apoptose das células epiteliais do útero e vagina, e concomitante crescimento do epitélio da vagina e do útero via ativação dos LGR-7 (Leucine-rich repeat-containing

G-protein coupled receptor). Além do mais, Burger et al. (1998), notaram que a relaxina induziu crescimento no tecido conjuntivo.

Em relação a túnica muscular, nossos resultados revelaram mudanças significativas para camada muscular, uma vez que houve grande aumento na média da largura dessa túnica, o que corrobora com os achados de Zhao et al. (1996), que constataram crescimento da túnica muscular nos órgãos do canal de parto mediados, pela ação da relaxina. Dessa forma, acreditamos que secreção da relaxina durante as múltiplas gestações possa ter contribuído para o aumento na largura das túnicas mucosa submucosa e muscular do reto, à semelhança do que ocorreu com os tecidos da vagina e do útero nos estudos de Yao et al. (2008), Burger et al. (1998) e Zhao et al. (1996).

#### **5.4. Considerações sobre o assoalho pélvico**

Nossos achados revelaram que múltiparas possuem menor diâmetro de fibras e número de mionúcleos, bem como maior número de células nos MAP's, quando comparadas as nulíparas. Esse resultado pode ser explicado pelas adaptações morfológicas intrínsecas ao período gestacional e ao mecanismo de parto. Durante o período gestacional a força de compressão sobre a musculatura pélvica aumenta a medida que transcorrem as semanas, isto ocorre devido ao ganho de peso fetal e uterino (Herrera et al., 2000; Grob et al., 2016). Outro fato que deve ser pontuado é o aumento da frequência da contratilidade uterina, que empurra o feto em direção aos diafragmas pélvico e urogenital em baixa pressão (1 contração por hora com uma pressão de 6 a 8 mmHg) antes do início da dilatação (trabalho de parto) (Montenegro & Filho, 2011). Ademais, a partir do início da dilatação a frequência e a pressão das contrações uterinas aumentam em larga escala, chegando ao final do período expulsivo a uma contratilidade trinta vezes maior aliada a uma pressão sete vezes superior do período anterior ao início do parto (30 contrações por hora com uma pressão de 50mmHg por contração) (Montenegro & Filho, 2011). Esses fenômenos evocam um estiramento de três vezes acima do

comprimento normal dos músculos pélvicos, e com isso expõem os tecidos moles a risco de lesão (Ashton-Miller & DeLancey, 2009), tanto que Nygaard et al. (2008), observaram que mulheres que pariram por via vaginal possuem maior ocorrência de IA e IU comparadas as nulíparas. Os autores anteriormente citados, pontuam que a prevalência da IA é de 20% a 80% superior nas múltiparas e destacam que o maior registro de IA está diretamente associado ao número de partos vaginais. DeLancey (2005) demonstrou, por meio de imagem de ressonância magnética, o assoalho pélvico de uma primípara imediatamente após o parto vaginal. Na ocasião, a paciente apresentou atrofia importante dos MAP's, quando comparada a uma nulípara. O pesquisador salientou que lacerações no levantador do ânus em primíparas não são incomuns, uma vez que afetam de 10% a 15% desse público. Segundo o autor, a modificação estrutural dos MAP's ocorre em função da tensão para além da capacidade visco elástica dos tecidos da pelve e períneo, gerando instabilidade nos elementos de sustentação e continência exercidos pelos MAP's. Corroborando com o tema, Hilde e Van der Goot (2013), acompanharam 277 nulíparas durante o processo gestacional e seis meses após o parto. Os pesquisadores observaram que as participantes que se submeteram ao parto cesariano, reduziram em 10% a pressão de fechamento vaginal, enquanto que mulheres submetidas ao parto vaginal reduziram em 30%, 60% e 59% a pressão de fechamento vaginal, força e resistência dos MAP's, respectivamente.

Dessa forma, acreditamos que alguns dos eventos abordadas anteriormente, tenham contribuído, em nosso estudo, para as múltiparas apresentarem menor diâmetro das fibras dos MAP's em relação as nulíparas, uma vez que cada mecanismo de parto envolve toda uma cadeia de eventos biomecânicos, que por sua vez induzem adaptações nos tecidos da pelve e períneo (Ashton-Miller & DeLancey, 2009). É sabido que os músculos possuem um sistema de reparo tecidual, o qual é ativado no momento da lesão, especialmente após a ruptura da membrana basal, que estimula a migração de células satélites para o local da lesão, com o propósito de produzir mioblastos e, conseqüentemente, novas células

musculares (Nagata et al., 2006). Dessa forma, talvez seja esse o motivo pelo qual as múltiparas do nosso estudo, apresentaram um maior número de fibras em relação as nulíparas.

Quanto ao menor diâmetro das fibras musculares e largura da fáscia endopélvica apresentados pelas múltiparas em relação as nulíparas, entendemos que provavelmente as forças de tensão geradas pelo processo gestacional e a fase de expulsão do parto, sob no aparelho de contenção elástica das vísceras, irão resultar em diferenças na fáscia endopélvica. Essa hipótese, fundamenta-se nos estudos de Chen et al. (2006) e Lien et al. (2004), que investigaram o efeito do aumento da pressão intra-abdominal (PIA) e do período expulsivo do parto normal sobre as estruturas de suporte do assoalho pélvico. Os referidos autores, notaram que o aumento da PIA, aliada com o aumento das forças de tensão e compressão, estiraram os elementos de suporte, resultando em adelgaçamento da fáscia endopélvica, à semelhança do que foi descrito para os MAP's. Sabe-se que a tensão mecânica nos tecidos, induzem modificações nos elementos constituintes da matriz extracelular (MEC) (Eastwood et al., 1998), especialmente nas fibras de colágeno, visto que elas são responsáveis por resistirem as forças de tensão impostas a matriz. Desse modo, os estímulos mecânicos sobre as fibras da matriz repercutem diretamente nos fibroblastos, uma vez que eles possuem ligação com as fibras, por meio das integrinas e adesinas (Benjamin & Ralphs, 1997; Benjamin & Ralphs, 1998). Os fibroblastos não apenas possuem ligação com as fibras do MEC, mas também as produzem e remodelam. Portanto, é possível que a tensão persistente sobre a fáscia endopélvica, devido à multiparidade e aos mecanismos de partos, para além das propriedades viscoelásticas do tecido, tenha gerado o remodelamento da MEC via fibroblastos, pois os tais secretam TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor- $\beta$ 1*), que tem múltiplas ações (proliferação, diferenciação e antiproliferação celular) nos componentes da matriz (Desmouliere et al., 1993). Além do mais, a secreção da relaxina durante a gestação, também contribui para remodelação do tecido conjuntivo da pelve e períneo, com o intuito de aumentar distensibilidade do canal de

parto, ligamentos e fâscias pélvicas, via inibição da metaloproteinase (MMP) e estimulação das gelatinases, o que resulta em menor condensação do colágeno (Zhao et al., 1996 Klein, 2016).

Em relação ao menor número mionúcleos observados nos MAPs das múltiparas, cremos que esteja relacionado ao menor diâmetro da fibra muscular apresentado por esse grupo, já que existe uma correlação direta entre diâmetro fibra muscular e a quantidade de miofibrilas, que por sua vez contém os sarcômeros, que são constituídos pelas proteínas contráteis, que possuem necessidade metabólica e remodeladora dependente dos mionúcleos (Machado, 2008; Chaillou, 2013). Assim, percebe-se que o menor o volume muscular leva a uma atividade metabólica menor que, dessa maneira, resulta em um menor número de mionúcleos.

### **5.5. Considerações sobre manometria e a força dos músculos do assoalho pélvico**

Os músculos do assoalho pélvico, bem como os músculos do diafragma urogenital, esfíncter anal externo e interno, esfíncter uretral externo e interno, além das túnicas mucosa, conjuntiva e muscular lisa da uretra, vagina e ânus cumprem com a importante tarefa de sustentar os órgãos pélvicos, manter a continência urinária e fecal, e facilitar o intercuro sexual (Moore & Persaud, 2008; Joviliano, 2011). Sabe-se que, especialmente, a fraqueza desses grupos musculares favorece a manifestação de afecções como prolapso de órgãos pélvicos, incontinências e queixas sexuais.

Pelo exposto até aqui, percebe-se que a investigação da força dos músculos da pelve e períneo deve ocupar papel importante nas consultas com ginecologistas, urologistas, proctologistas e fisioterapeutas, visto que tais músculos possuem papel chave na fisiologia da região em questão. Assim, discutem-se as repercussões da multiparidade na investigação das pressões intra-anal durante o tônus basal de repouso, bem como na contração reflexa e evocada.

Quanto ao tônus basal, observou-se que as múltiparas possuem menor força em relação as nulíparas. Esses achados corroboram com Pool-Goudzwaard et al. (2004), que demonstraram que a multiparidade pela via vaginal contribui para o menor desenvolvimento de força dos MAPs. Da mesma forma, Meyer et al. (1998), apontaram que o parto vaginal diminuiu o registro de força de pressão intra-uretral, intravaginal e intra-anal após nove semanas do parto. Balsamo et al. (2001), observaram que o aumento da intensidade da sintomatologia de incontinência fecal está relacionado à diminuição progressiva das pressões basal de repouso. Conforme o que foi exposto acima e correlacionando com os achados do nosso experimento, entendemos que todos os elementos constituintes responsáveis pela continência urinária e fecal sofrem modificações induzidas pela gestação e pelo mecanismo de parto, o que explica a diferença encontrada entre as múltiparas e nulíparas.

Em relação a contração reflexa, os dados demonstraram não existir diferença entre nulíparas e múltiparas. Isso pode ser explicado pelo reflexo vaginopuborretal preservado em ambos os grupos, que consiste numa contração muscular dos MAPs em função de estiramento do introito vaginal e das suas paredes (Shafik, 1995). O mecanismo desse reflexo é semelhante ao clássico reflexo de estiramento monossináptico (Rodrigues, 2010). Assim, ao introduzir a sonda do eletroestimulador na vagina das ratas, deflagrou-se o reflexo vaginopuborretal, que apresentou como resultante a contração dos músculos da pelve e períneo, além de aumentar a tensão dos músculos lisos das paredes dos órgãos dessa região (Shafik, 1995). Ademais, é importante salientar que a vagina é o órgão da cópula feminino e a estimulação dela inicia uma série de padrões comportamentais, que se expressão em movimentos estereotipados (Pfaus, 2009), que neste caso, culminaram em aumento da tensão muscular na pelve e períneo registrados pelo manômetro.

No tocante a contração evocada, observou-se que as múltiparas desenvolveram menor força de contração em relação as nulíparas, o que corrobora

com a literatura. Morkved et al. (2003), constataram que a paridade reduz a força muscular de forma significativa. Os mesmos autores, em outro estudo, demonstraram também que mulheres incontinentes possuem menor registro de força dos MAPs em relação as continentas (Morkved et al., 2004). Um outro aspecto que merece destaque dos nossos resultados, foi que ambos os grupos aumentaram a força dos músculos da pelve e períneo durante a contração evocada, demonstrando que os programas de exercícios e a eletroestimulação para essa região podem ser utilizados para aumentar a força desses músculos, que segundo Klein et al. (1997) e Hay-Smith et al. (2011), indicam que o aumento da força dos MAPs constitui um fator de proteção contra afecções do pavimento pélvico.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados das comparações entre o grupo de nulíparas e múltiparas permitem concluir que na multiparidade ocorrem:

- Redução na largura da camada mucosa da uretra e vagina, aumento na mucosa do reto, mas não afeta a mucosa do ânus;
- Redução na largura da camada submucosa da vagina, aumento no ânus e não afeta a largura dessa camada na uretra ou no reto;
- Aumento na largura da camada muscular do reto, redução na vagina, mas não afeta essa camada na uretra ou ânus;
- Redução no total de fibras musculares lisas da uretra e ânus, aumento no reto, mas não afeta o total de fibras na vagina;
- Redução no diâmetro e total de mionúcleos das fibras musculares esqueléticas do assoalho pélvico;
- Não afetou a largura das camadas visceral ou parietal da fáscia endopélvica ou os parâmetros morfométricos do esfíncter uretral externo;
- Diminuição do tônus intra-anal e da força de contração evocada;
- Não afetou o parênquima ou estroma do tecido conjuntivo;
- Aumento o número de leucócitos na mucosa da uretra e vagina das múltiparas, mas não para o reto ou ânus.

No conjunto, os resultados mostraram que a multiparidade diminuiu estruturalmente os músculos lisos e estriados do assoalho pélvico e ânus das ratas múltiparas que implicaram na redução da efetividade do tônus intra-anal muscular e da força de contração evocada. Assim, nossos resultados permitem relacionar as alterações estruturais causadas pela multiparidade com o desenvolvimento de afecções de órgãos pélvicos e perineais.

## **7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS**

O estudo realizado apresentou como limitações a impossibilidade de identificar as fibras reticulares e do sistema elástico pela que permitiriam descrever a elasticidade do estroma tecidual e a sustentação das células migratórias e a justaposição celular. Outra limitação importante refere-se à identificação dos tipos de fibras musculares cuja técnica demanda secções histológicas obtidas sob congelamento e, considerando que as amostras biológicas nesse estudo foram fixadas em solução de formol essa identificação foi impossibilitada. Além dessas, considera-se uma limitação importante a ausência de imunomarcção para descrever células em proliferação que poderia demonstrar a hiperplasia observada para o tecido muscular liso ou mesmo o aumento de mionúcleos.

Dentre as perspectivas pretende-se descrever os efeitos da multiparidade nas fibras reticulares e as do sistema elástico e na proliferação de células no estroma e parênquima dos órgãos associados á pelve e períneo. Considerando os resultados obtidos para a força de contração muscular, será de grande valia a determinação dos tipos de fibras musculares esqueléticas na musculatura esfínteriana.

Os resultados obtidos nesse estudo para a força de contração evocada apontam para o efeito da eletroestimulação na musculatura esfínteriana, assim, pretende-se num futuro próximo identificar o efeito desse método nos tecidos de ratas nulíparas e múltíparas.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Abramov Y, Sand PK, Botros SM, Gandhi SMD, Miller JJR, Nickolov AMA, Angel MA, Goldberg RP. Risk factors for female anal incontinence: new insight through the Evanston–Northwestern twin sister’s study. *Obstet. Gynecol.* 106(4):726–732, 2005.
2. Abramowitch SD, Feola A, Jallah Z, Moalli PA. Tissue mechanics, animal models, and pelvic organ prolapse: a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1: S146-158, 2009.
3. Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein A. Incontinence. 4<sup>th</sup> International Consultation on Incontinence, Paris: Health Publication Ltd., pp.1325-1385, 2009.
4. Alperin M, Tuttle LJ, Conner BR, Dixon DM, Mathewson MA, Ward SR, et al. Comparison of pelvic muscle architecture between humans and commonly used laboratory species. *Int. Urogynecol. J.* 25: 1507-1515, 2014.
5. Ashton-Miller JA, DeLancey JOL. On the Biomechanics of Vaginal Birth and Common Sequelae. *Annu Rev. Biomed. Eng.* 11:163-176, 2009.
6. Balsamo F, Filho PRR, Pozzobo NBHZ, Castro CAT, Formiga GJS. Correlação entre achados manométricos e sintomatologia na incontinência fecal. *Rev. Bras. Coloproct.* 31: 39-43, 2011.
7. Barber MD, Kuchibhatla MN, Pieper CF, Bump RC. Psychometric evaluation of 2 comprehensive condition-specific quality of life instruments for women with pelvic floor disorders. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185:1388-1395, 2001.
8. Benjamin M, Ralphs JR. Tendons and ligaments-an overview. *Histol. Histopathol.* 12:1135- 1144, 1997.
9. Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments: an adaptation to compressive load. *J. Anat.* 193:481-494, 1998.
10. Borello-France D, Burgio KL, Richter HE, Zyczynski H, Fitzgerald MP, Whitehead W, et al. Fecal and urinary incontinence in primiparous women. *Obstet Gynecol.* 108:863-72, 2006.

11. Burger L, Sherwood OD. Relaxin increases the accumulation of new epithelial and stromal cells in the rat cervix during the second half of pregnancy. *Endocrinology*. 139: 3984- 3995,1998.
12. Camarano AA, Kanso S. As instituições de longa permanência para idosos no Brasil. *Rev Bras Estud Popul*. 27:232- 235, 2010.
13. Cannon T, Wojcik EM, Ferguson CL, Saraga S, Thomas C, Damaser MS. Effects of vaginal distension on urethral anatomy and function. *BJU International* 90:403–407, 2002.
14. Chaillou T. Time course of gene expression during mouse skeletal muscle hypertrophy. *Journal of applied physiology*. 115:1065-1074, 2013.
15. Chao, VM. Neurotrophins, and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nature Rev*. 4:299-309, 2003.
16. Chen LC, Ashton-Miller JA, Hsu Y, DeLancey JOL. Interaction between Apical Supports and Levator Ani in Anterior Vaginal Support: Theoretical Analysis *Obstet. Gynecol*. 108:334-332, 2006.
17. Cheon C, Maher C. Economics of pelvic organ prolapse surgery. *Int Urogynecol. J*. 24:1873-1876, 2013.
18. Coyne KS, Wein A, Nicholson S, Kvasz M, Chen CI, Milsom I. Economic burden of urgency urinary incontinence in the united states: a systematic review. *J. Manag. Care Pharm*. 20:130-140, 2014.
19. Damaser MS, Whitbeck C, Chichester P, Levin RM. Effect of vaginal distension on blood flow and hypoxia of urogenital organs of the female rat. *J. Appl. Physiol*. 98: 1884-1890, 2005.
20. DeLancey JOL. Strutral aspects of the extrinsic continence mechanism. *Obst. Gynecol*. 72: 296-301, 1988.
21. DeLancey JO, Anatomic aspects of vaginal eversion after hysterectomy. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 166: 1717-1724, 1992.

22. DeLancey JOL. The hidden epidemic of pelvic floor dysfunction: achievable goals for improved prevention and treatment. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192:1488-1495, 2005.
23. DeLancey JO, Morgan DM, Fenner DE, Kearney R, Guire K, Miller JM, Hussain H, Umek W, Hsu Y, Ashton-Miller JA. Comparison of levator ani muscle defects and function in women with and without pelvic organ prolapse. *Obstet. Gynecol.* 109:295–302, 2007.
24. Desmouliere A Geinoz A, Gabbiani F Gabbiani, G. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 122:103-111, 1993.
25. Dietz HP, Simpson JM. Levator trauma is associated with pelvic organ prolapse. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 115:979-984, 2008.
26. Eastwood M, Mudera VC, McGrouther DA, Brown RA. Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated collagen lattices: morphological changes. *Cell Motil Cytoskel.* 40:13-21, 1998.
27. Feola A Moallip, Alperin M, Duerr R, Gandley RE, Bramowitch S. Impact of pregnancy and vaginal delivery on the passive and active mechanics of the rat vagina. *Ann. Biomed. Eng.* 39: 549-558, 2011.
28. Ferlin A, De Toni L, Sandri M, Foresta C. Relaxin and insuli-like peptide 3 in the musculoskeletal system: from bench to bedside. *British. J. Pharm.* 174:1015-1024, 2016.
29. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia em cores.* 2<sup>ed.</sup> Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 376-377, 2003.
30. Geiger B, Bershadsky A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol.* 13: 584-592, 2001.
31. Gillespie PG, Walker RG. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature.* 413:194–202, 2001.

32. Grob ATM, Withagen MIJ, Waarsenburg MKV, Schweitzer KJ, Vaart CHV. Changes in the mean echogenicity and area of the puborectalis muscle during pregnancy and postpartum. *Int. Urogynecol. J.* 27:895–901, 2016.
33. Handa VL, Zyczynski HM, Burgio KL, Fitzgerald MP, Borello-France D, Janz NK, Fine PM, Whitehead W, Brown MB, Weber A. The impact of fecal and urinary incontinence on quality of life 6 months after childbirth. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 197:636 e1-6, 2007.
34. Handa VL, Blomquist JL, Knoepp LR, Hoskey KA, McDermott KC, Munoz A. Pelvic floor disorders 5–10 years after vaginal or cesarean childbirth. *Obstet. Gynecol.* 118:777–784, 2011.
35. Hansen BB, Svare J, Viktrup L, Jørgensen T, Lose G. Urinary incontinence during pregnancy and 1 year after delivery in primiparous women compared with a control group of nulliparous women. *Neurourol. Urodyn.* 31: 475-480, 2012.
36. Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. Mechano-sensing by actin filaments and focal adhesion proteins. *Commun. Integr. Biol.* 5: 572-577, 2012.
37. Hay-Smith EJC, Herderschee R, Dumoulin C, Herbison GP. Comparisons of approaches to pelvic floor muscle training for urinary incontinence in women. *Cochrane Database of Systematic Reviews.*12:1-103, 2011.
38. Heesakkers JP, Gerretsen RR. Urinary incontinence: sphincter functioning from a urological perspective. *Digestion.* 69:93-101, 2004.
39. Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr.* 54:S47-S51, 2000.
40. Herschorn S, Gajewski J, Schulz J, Corcos J. A population- based study of urinary symptoms and incontinence: the Canadian Urinary Bladder Survey. *BJU Int.* 101:52-58, 2007.
41. Hilde AMV, Van der Goot M. Age Differences in Media Multitasking: A Diary Study. *J. Broad. Eletron. Media* 57: 392-408, 2013.

42. Joviliano OFD. Anatomofisiologia anorretal. In: Rocha JJR, organizador. 20 ed. São Paulo: Atheneu, pp. 1-6, 2011.
43. Jung J, Ahn HK, Huh Y. Clinical and Functional Anatomy of the Urethral Sphincter. *Int Neurourol. J.* 16:102-106, 2012.
44. Klein MG, Janssen PA, MacWilliam L, Kaczorowski J, Johnson B. Determinants functioning in of vaginal-perineal childbirth integrity and pelvic floor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 176:403-410, 1997.
45. Klein C. The role of relaxin in mare reproductive physiology: A comparative review with other species. *Theriogenology.* 86:451-456, 2016.
46. Kopp Z, Irwin DE, Milson L, Abrams P. Worldwide Estimates of Current and Future Individuals, With Lower Urinary Tract Symptoms including Uinary Incontinece and Overactive Bladder. Poster presentation, 4<sup>th</sup> International Consultation on Incontinece, Paris, 2008.
47. Kudish BI, Iglesia CB, Gutman RE, Sokol AI, Rodgers AK, Gass M. Risk factors for prolapse development in white, black, and Hispanic women. *Female Pelvic Med Reconstr. Surg.* 17:80–90, 2011.
48. Lien KC, Mooney B, DeLancey JO, Ashton-Miller JA. Levator ani muscle stretch induced by simulated vaginal birth. *Obstet. Gynecol.* 103:31-40, 2004.
49. Lien KC, Morgan DM, DeLancey JO, Ashton-Miller JA. Pudendal nerve stretch during vaginal birth: a 3D computer simulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192:1669–1676, 2005.
50. Lowder JL, Debes KM, Moon DK, Howden N, Abramowitch SD, Moalli PA. Biomechanical adaptations of the rat vagina and supportive tissues in pregnancy to accommodate delivery. *Obstet. Gynecol.* 109:136–143, 2007.
51. Luber KM, Boero S, Choe JY. The demographics of pelvic floor disorders: current observations and future projections. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184:1496-1501, 2001.

52. Lukacz ES, Lawrence JM, Contreras R, Nager CW, Luber KM. Parity, mode of delivery, and pelvic floor disorders. *Obstet. Gynecol.* 107:1253–1260, 2006.
53. Machado MG. Bases da fisioterapia respiratória: terapia intensiva e reabilitação. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 111-24, 2008.
54. MacLennan AH, Taylor AW, Wilson DH, Wilson D. The prevalence of pelvic floor disorders and their relationship to gender, age, parity and mode of delivery. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 107:1460–1470, 2000.
55. Mant J, Painter R, Vessey M. Epidemiology of genital prolapse: observations from the Oxford Family Planning Association study. *Br J Obstet Gynaecol.* 104:579-585, 1997.
56. Melville JL, Delaney K, Newton K, Katon W. Incontinence severity and major depression in incontinent women. *Obstet. Gynecol.* 106:585-592, 2005.
57. Memon H, Handa VL. Pelvic floor disorders following vaginal or cesarean delivery. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 24: 349–354, 2012.
58. Ménard S, Poupon C, Bourgugnon J, Théau A, Goffinet F, Le Ray C. Predictive factors of 2-month postpartum anal incontinence among patients with an obstetrical anal sphincter injury. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* 45: 900-907, 2016.
59. Meyer S, Schreyer A, De Grandi P, Hohlfield P. The effects of birth on urinary incontinence mechanisms and other pelvic floor characteristics. *Obstet Gynecol.* 92:613–618, 1998.
60. Montenegro CAB, Filho JR. Rezende obstetrícia. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 238-262, 2011.
61. Moore KL, Persaud. TVN. Embriologia clínica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp. 237-243, 2008.
62. Morkved S, Bo K, Schei B, Salvesen KA. Pelvic floor muscle training during pregnancy to prevent urinary incontinence: a single-blind randomized controlled trial. *Obstet. Gynecol.* 101:313–319, 2003.

63. Morkved S, Salvesen KA, Bo K, Eik-Nes S. Pelvic floor muscle strength and thickness in continent and incontinent nulliparous pregnant women. *Int Urogynecol. J.* 15:384–390, 2004.
64. Nagata Y, Kobayashi H, Umeda M, Ohta N, Kawashima S, Zammit PS, Matsuda R. Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells. *Journal of Histochem Cytochem.* 54: 375-384, 2006.
65. Nordin M, Frankel VH. *Biomecânica básica do sistema musculoesquelético.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 128-151, 2003.
66. Nygaard I, Barber MD, Burgio KL, Kenton K, Meikle S, Schaffer J, Spino C, Whitehead WE, Wu J, Brody DJ. Prevalence of symptomatic pelvic floor disorders in us women. *JAMA* 300:1311-1316, 2008.
67. O'Boyle AL, O'Boyle JD, Davis BCGD. Pelvic organ support in pregnancy and postpartum. *Int. Urogynecol. J.* 16:69-72, 2005.
68. Oelrich TM. The striated urogenital sphincter muscle in the female. *Anat. Rec.* 205:223–232, 1983.
69. Oliveira IMC, Carvalho VCP. Pelvic organ prolapse: etiology, diagnosing and conservative treatment, a bibliographic survey. *Femina,* 35: 285-294, 2006.
70. Patel DA, Xu X, Thomason AD, Ransom SB, Ivy JS, DeLancey JO. Childbirth and pelvic floor dysfunction: an epidemiologic approach to the assessment of prevention opportunities at delivery. *Am J. Obstet. Gynecol.* 195:23-28, 2006.
71. Pfaus JG. Pathways of sexual desire. *J Sex Med.* 6: 1506-1533, 2009.
72. Phillips C, Monga A. Childbirth and the pelvic floor: the gynaecological consequences. *Rev. Gynaecol. Pract.* 5:15-22, 2005.
73. Phull HS, Pan HG, Butler RS, Hansel DE, Damaser MS. Vulnerability of continence structures to injury by simulated childbirth. *Am J Physiol Renal Physiol.* 301: F641-649, 2011.

74. Pool-Goudzwaard AL, Slieker ten Hove MC, Vierhout ME, Mulder PH, Pool JJ, Snijders CJ, Stoeckart R. Relations between pregnancy-related low back pain, pelvic floor activity and pelvic floor dysfunction. *Int Urogynecol J.* 16: 468-474, 2005.
75. Quigley EMM. Impact of pregnancy and parturition on the anal sphincters and pelvic floor. *Best. Pract Resear Clin. Gastroenterol.* 21: 879–897, 2007.
76. Rahn DD, Ruff MD, Brown SA, Tibbals HF. Biomechanical properties of the vaginal wall: effect of pregnancy, elastic fiber deficiency, and pelvic organ prolapse. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198: 590.e1-6, 2008.
77. Reay Jones NH, Healy JC, King LJ, Saini S, Shousha S, Allen-Mersh TG. Pelvic connective tissue resilience decreases with vaginal delivery, menopause and uterine prolapse. *Brit J Surg.* 90:466-472, 2003.
78. Rocha MA, Sartori MG, Simões MJ, Herrmann V, Baracat EC, Rodrigues GL, Girão MJ. Impact of pregnancy and childbirth on female rats urethral nerve fibers. *Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.* 18:1453-1458, 2007.
79. Rodrigues FV. Fisiologia sensorial. *Rev Biol.* 5: 25-33, 2010.
80. Rundgren A. Physical properties of connective tissue as influenced by single and repeated pregnancies in the rat. *Acta Physiol Scand Suppl.* 417:1-38, 1974.
81. Rydevik BL, Kwan MK, Myers RR, Brown RA, Triggs KJ, Woo SL, Garfin SR. Garfin SR. An in vitro mechanical and histological study of acute stretching on rabbit tibial nerve. *J. Orthop. Research.* 8:694-701, 1990.
82. Sampaio FJB, Dornas MC, Favorito LA. Aspectos anatomocirúrgicos no tratamento da incontinência urinária. In: Rubstein I. *Incontinência urinária na mulher.* 1ª ed. São Paulo: Atheneu, pp. 1-8, 2001.
83. Shafik A. Vagino-levator reflex: description of a reflex and its role in sexual performance. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 60:161-164, 1995.
84. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve Growth Factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Ann. Rev. Neurosc.* 24:1217-1281, 2001.

85. Sousa HA, Silva MG, Barbosa KP, Vianna LMS, Pacheco YG, Godoy JRP Kuckelhaus SAS. Electrical stimulation structurally affects the tissues of the rectum and anus of nulliparous rats. *J. Anat.* 231: 398-404, 2017.
86. Staer Jensen J, Siafarikas F, Hilde G, Benth JS, Bo K, Engh ME. Postpartum recovery of levator hiatus and bladder neck mobility in relation to pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 125: 531, 2015.
87. Thom DH, Nygaard IE, Calhoun EA. Urologic diseases in America project: urinary incontinence in women-national trends in hospitalizations, office visits, treatment and economic impact. *J. Urol.* 173:1295, 2005.
88. Vieira LFC, Philippsen FG, Salcedo MMP, Picoloto ASB. Prolapsos genitais. In: Silveira GPG, organizador. 2 ed. São Paulo: Ginecologia baseada em evidências, pp. 249-261, 2008.
89. Wei JT, DeLancey JOL. Functional anatomy of the pelvic floor and lower urinary tract. *Clin. Obstet. Gynecol.* 47(1): 3-17, 2004.
90. Woodman PJ, Graney DO. Anatomy and physiology of the female perineal body with relevance to obstetrical injury and repair. *Clin. Anat.* 15:321-334, 2002.
91. Wyndaele JJJ, Poortmans A. Functional and histological effects of intravaginal electrical stimulation on the pelvic muscles: a study in the rat. *Int Urogynecol J.* 17:444 – 448, 2006.
92. Xelhuantzi N, Rodriguez-Antolin J, Nicolas L, Castelan F, Cuevas E, Martinez-Gomez M. Tissue Alterations in Urethral and Vaginal Walls Related to Multiparity in Rabbits. *Anat. Record.* 297:1963–1970, 2014.
93. Xu X, Menees. SB, Zochowski MK, Fenner DE. Economic cost of fecal incontinence. *Dis. Colon Rectum.* 55:586-598, 2012.
94. Yao L, AgoulNIK AI, Cooke PS, Meling DD, Sherwood OD. Relaxin Acts on Stromal Cells to Promote Epithelial and Stromal Proliferation Inhibit Apoptosis in the Mouse Cervix and Vagina. *Endocrinol.* 146:2072-2079, 2008.

95. Zetterstrom J, Mellgren A, Jensen LL, Wong WD, Kim DG, Lowry AC, Madoff RD, Congilosi SM. Effect of delivery on anal sphincter morphology and function. *Dis Colon Rectum*. 42:1253-1260,1999.
96. Zhao S, Kuenzi MU, Sherwood OD. Monoclonal Antibodies Specific for Rat Relaxin. IX Evidence That Endogenous Relaxin Promotes Growth of the Vagina during the Second Half of Pregnancy in Rats. *Endocrinology*. 137:425-430, 1996.



Brasília, 19 de abril de 2013.

Parecer 004/13.

Da: Comissão de Ética em Uso de Animais do UniCEUB – CEUA / UniCEUB.

Para: Hugo Alves de Sousa.

Assunto: Encaminhamento do Parecer N° 004/13 do Projeto TCD (A) 001/12.

Prezado Pesquisador,

Encaminhamos o parecer do Projeto TCD (A) 001/12 “**Análise Morfométrica dos Músculos do Assoalho Pélvico Após Eletroestimulação em Ratas Wistar**”, atendeu a todas as solicitações apontadas; está **aprovado** por esta Comissão de Ética no Uso de Animais e em condições de ser iniciado.

Ressaltamos a necessidade de atenção aos Incisos I ao X do Art. 9º da Resolução Normativa 01/2010 CONCEA/MCT concernentes às responsabilidades do pesquisador, professores e técnicos responsáveis.

Cordialmente,



Ranieri Rodrigues de Oliveira  
Comissão de Ética no Uso de Animais/ UniCEUB  
Presidente

Ranieri Rodrigues de Oliveira  
CEUA UniCEUB

# Electrical stimulation structurally affects the tissues of the rectum and anus of nulliparous rats

Hugo Alves de Sousa,<sup>1</sup> Maria da Glória da Silva,<sup>2</sup> Keyla de Paula Barbosa,<sup>3</sup> Leonora Maciel de Souza Vianna,<sup>4</sup> Yolanda Galindo Pacheco,<sup>1</sup> José Roberto Pimenta de Godoy<sup>1</sup> and Selma Aparecida Souza Kuckelhaus<sup>1,5</sup> 

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Anatomy and Nanomedicine, Area of Morphology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Federal District, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Histology, Area of Morphology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Federal District, Brazil

<sup>3</sup>Labocien, University Center of Brasília UNICEUB, Brasília, Federal District, Brazil

<sup>4</sup>Area of Pathology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Federal District, Brazil

<sup>5</sup>Laboratory of Cell Immunology, Area of Pathology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Federal District, Brazil

## Abstract

Considering that the muscles of the anus perform a critical role in maintaining continence, losses in their structure can negatively affect the physiological control of the intestinal contents. Anorectal electro-stimulation (ARES) has been reported to have a positive effect on the functionality of treated patients, but how ARES affects the structural tissues of the anorectal segment remains unknown. Because the study of how ARES structurally affects human tissues is not possible, this study aimed to clarify these effects in a murine model, which has a similar anorectal segment (structure and physiology) to humans. For the descriptive and comparative study, randomly selected nulliparous adult Wistar rats ( $n = 5$ ) were submitted to 30 anorectal sessions of ARES with a biphasic current (700  $\mu$ s, 50 Hz from 2 to 4 mA). After treatment, the animals were euthanized, and the anorectal segments were dissected and processed for histopathological analysis. Our results showed that ARES increased the widths of the mucosal, submucosal and muscle layers of the rectum, as well as the number of leukocytes in the mucosa. ARES also caused hyperplasia of the smooth muscle of the internal anal sphincter and hypertrophy of the external anal sphincter muscle. In conclusion, our results showed that ARES had not only a positive effect on the structure (morphology) of all tissues associated with the rectum and anus but, more importantly, on the structural gain of the muscles (hyperplasia and hypertrophy), which could point to a functional gain of the anal sphincter, reinforcing the applicability of ARES as a non-invasive treatment for anal incontinence.

**Key words:** anal sphincter; electrical stimulation; fecal incontinence; histology; rectum.

## Introduction

The muscles associated with the anus are critical in maintaining continence. The integrated action of the muscles of the sphincter and pelvis, rectal compliance, consistency of the feces and the intestinal transit time cooperate in maintaining voluntary continence (Saad et al. 2002). Failures in this integration can cause a loss of physiological control of the intestinal contents, resulting in physical and psychological disability, loss of self-esteem and consequently a reduction in the quality of life of individuals affected by fecal

incontinence (Yiou et al. 2001; Rao, 2004). Although there are few epidemiological surveys, fecal incontinence is present in an estimated 2–33% of the population (Whitehead et al. 2009; Brown et al. 2012) and is more common in older women, possibly due to complications related to vaginal delivery mechanisms (Snoks et al. 1990).

Therapeutic approaches applied to the treatment of fecal incontinence (FI) depend on its severity. Conservative treatment is intended for patients for whom clinical evaluation and diagnostic methods have not identified significant structural or functional lesions, while invasive approaches are intended for more severe cases in which tissue damage and/or marked dysfunction are verified and for whom non-invasive treatments do not work (Van Koughnett & Wexner, 2013; Duelund-Jakobsen et al. 2016).

Among conservative and noninvasive treatments, food re-education, diarrhea control, biofeedback techniques and

### Correspondence

Selma Aparecida Souza Kuckelhaus, Area of Morphology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-000 Federal District, Brazil. E: selmask@gmail.com

Accepted for publication 6 April 2017

J O A	Journal Code	12635	WILEY	Dispatch 3:517	CE: Shobana
				No. of pages: 7	PE: Raju J
		Manuscript No.			
					