Yuri Afonso Ferreira

Análise da expressão das metaloproteinases e seus inibidores teciduais no músculo detrusor de pacientes com obstrução infravesical por hiperplasia prostática benigna

Tese apresentada para à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes

Coorientadora: Dra. Sabrina T. dos Reis

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autorb

Ferreira, Yuri Afonso

Análise da expressão das melaproteínas e seus inibidores teciduais no músculo detrusor de pacientes com obstrução infravesical por hiperplasia prostática benigna / Yuri Afonso Ferreira. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientador: Alberto Azoubel Antunes.

Coorientadora: Sabrina Thalita dos Reis

Descritores: 1.Hiperplasia prostática 2.Obstrução do colo da bexiga urinária 3.Expressão gênica 4.Metaloproteases 5.Metaloproteínase 1 da matriz 6.Metaloproteínase 2 da matriz 7.Metaloproteínase 9 da matriz 8.Colágeno tipo I 9.Colágeno tipo III 10.Bexiga urinária hiperativa 11.Inibidores teciduais de metaloproteínas 12.Ressecção transuretral da próstata 13.Estudos prospectivos 14.Urodinâmica 15.Enurese noturna

USP/FM/DBD-309/14

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed, São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

*“O amor é o fundamento da vida,
é a motivação para o cotidiano,
a estabilidade para nossos corações,
força matriz para as realizações pessoais,
o equilíbrio sobre nossas ações profissionais,
O amor sempre vence “*

*Dedico esta tese para o motivo de meu maior amor
Meus três preciosos filhos: Sara, Bruna e Yuri
Minha querida e amada esposa Fabiana
Minha linda Mãe
Meu querido Pai
Meus tios sempre presentes: Tio Nelson, Tia Vera, Tio Gonçalves e Tia Vera*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes, meu orientador, que me ofereceu um horizonte de oportunidades sólidas e permanentes. Teve compreensão e sensibilidade de conduzir de forma acessível este belo projeto profissional e de vida. Como cientista e médico, amadureceu rápido, com uma filosofia de trabalho séria e encantadora, modelo a ser seguido por todos. Como pai, esposo, filho e amigo tem qualidades raras, a honestidade, amor e a preocupação de fazer quem está ao seu lado crescer e ser feliz.

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, a gratidão eterna de me abrigar. De oferecer o aprendizado profissional e da vida. Apoiar um projeto que muda totalmente a perspectiva de um profissional. Tive a honra de conviver e aprender com o maior médico desse país. O maior cirurgião e professor dos nossos tempos, uma lenda Viva da medicina. Um ser humano dotado de uma energia superior, com sensibilidade e arte nos relacionamentos profissionais e humanos.

Profa. Dra. Sabrina Thalita dos Reis, minha orientadora, pesquisadora fantástica, que me ofereceu a oportunidade de aprender e desenvolver este projeto. Ofereceu a segurança e estabilidade para que esta tese esteja pronta. Esteve presente em todos os momentos ao meu lado. Meu agradecimento é na forma de oferecer a minha amizade sincera.

Profa. Dra. Katia Leite, Professora chefe do LIM 55, que abriu as portas para que fosse realizado esse projeto. Com seu entusiasmo, competência e proficiência, faz o laboratório ser uma excelência nacional em pesquisa.

Ao meus queridos primos: Jú, André, Jó, Riquinho e Paulinho, por sempre estarem presentes em nossas vidas.

Aos meus estimados sogros: Sr Agremir e Sra Lindalva, sempre apoiando a mim, minha esposa e nossos filhos.

Aos meus compadres, Floriano, Marthinha, Fernando, Valéria, Agenor, Cau, Ebeveraldo e Jair. Obrigado por sempre estarem presentes e protegendo nossa família.

A meu amigo e companheiro Dr José Araújo S Junior, que sempre esteve a meu lado em qualquer situação. Sempre estaremos juntos.

Ao Dr Marco Madeiro, professor e excelente cirurgião, que esteve sempre ao meu lado orientando, dando apoio e estabilidade no meu ambiente de trabalho.

Aos meus irmãos queridos, Leonor, Leandro, tereza e Joãozinho.

As secretárias da urologia que sempre facilitam nossas vidas: Elisa, Cida, Iones, Teresa e Inisabete.

Aos Amigos do LIM: Denis, Iran, Nelson, Nayara

Ao Prof. Dr Adriano calado, meu orientador no mestrado, sempre confiou e abriu o caminho do meu potencial acadêmico, endossando mais este projeto.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Considerações Gerais	02
1.2. HPB e suas consequências clínicas	02
1.3. Papel da matriz extracelular na bexiga	04
1.4. Metaloproteinases e seus inibidores	08
1.5. Justificativa	12
2. OBJETIVO	14
2.1. Primário	15
2.2. Secundários	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Desenho do estudo	17
3.2. Local e época	17
3.3. Sujeitos	17
3.4. Intervenção	21
3.5. Extração do RNA e síntese de cDNA	22
3.6. Análise de expressão de genes por PCR em tempo real quantitativo	24
3.7. Análise estatística	25

4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	46
7. PERSPECTIVAS	48
8. REFERÊNCIAS	50
9. APÊNDICES	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPB – Hiperplasia Prostática Benigna

OIV – Obstrução infravesical

MEC – Matriz Extracelular

MB – Membrana Basal

MI – Matriz Intersticial

MMP – Metaloproteinase da Matriz

MT1-MMP – Metaloproteinase da Matriz tipo membrana 1

TIMP-1 – Inibidor de Metaloproteinase

RECK - Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs

RTU P – Ressecção transurethral da Próstata

US – Ultra som

TGF β – Fator de crescimento transformante beta

miRNA: microRNA

STUI: Sintomas do trato urinário inferior

DHT: α -diidrotestosterona

RA: Receptor androgênico

HRE: Elementos de resposta a hipóxia

IPSS: índice internacional de sintomas prostáticos

PSA: Antígeno Prostático Específico

LIM -55: Laboratório de Investigação Médica 55

QOL: Qualidade de vida

HD: Hiperatividade detrusora

CNI: Contração não inibida

PCA 3: Prostate cancer antigen 3

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas dos 43 pacientes submetidos à RTU de próstata _____	19
Tabela 2. Características clínicas do grupo controle _____	20
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para quantificação da expressão de colágenos I e III, metaloproteinases de matriz (MMPs) 1, 2 e 9 e Inibidores de metaloproteinases (TIMP1, TIMP2 e RECK) _____	22
Tabela 4. Dados urodinâmicos pré e pós-operatórios dos 43 pacientes avaliados _____	29
Tabela 5. Nível de expressão relativa dos oito genes em relação a qualidade de vida _____	31
Tabela 6. Nível de expressão relativa dos oito genes em relação ao IPSS e Urgência miccional _____	32
Tabela 7. Nível de expressão relativa dos genes em relação a presença de HD e amplitude das CNIs _____	33
Tabela 8. Nível de expressão relativa dos genes em relação ao período de início das CNI _____	34
Tabela 9. Nível de expressão relativa dos oito genes em relação a Complacência e a Sensibilidade _____	35
Tabela 10. Nível de expressão relativa dos oito genes em relação ao Fluxo miccional e pressão miccional _____	35
Tabela 11. Nível de expressão relativa dos seis genes em relação a persistência de CNI após 6 meses de tratamento cirúrgico _____	36
Tabela 12. Expressão categorizada das MMPs em relação a Persistência de CNI após 6 meses de tratamento cirúrgico _____	37
Tabela 13. Nível de expressão relativa dos oito genes em relação a Complacência pré operatória _____	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral das metaloproteinases _____10

Figura 2: Sistema TaqMan® _____24

Figura 3. Expressão relativa dos genes MMP1, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, RECK, COL I e III _____30

RESUMO

Ferreira, YA. Análise da expressão das metaloproteinases e seus inibidores teciduais no músculo detrusor de pacientes com obstrução infravesical por Hiperplasia Prostática Benigna. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: A obstrução infravesical (OIV) de longo prazo secundária a hiperplasia prostática benigna (HPB) pode causar alterações funcionais e morfológicas na bexiga. Um dos principais eventos consiste no aumento da deposição de colágeno e perda de complacência vesical, levando a alteração de armazenamento e esvaziamento urinário. O aumento da deposição de colágeno na matriz extracelular (MEC) da musculatura detrusora é a principal razão para a diminuição da complacência vesical. Na bexiga, assim como em outros órgãos, este fenômeno depende da atividade equilibrada de enzimas proteolíticas, incluindo as metaloproteinases (MMP) e os seus inibidores endógenos (inibidores teciduais de metaloproteinases-TIMPs). Como estes fenômenos são desconhecidos na bexiga obstruída, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica de colágeno, MMPs e seus inibidores na bexiga de pacientes com obstrução infravesical.

Material e Métodos: Foi realizada uma análise prospectiva e controlada de 43 pacientes com OIV devido a HPB, que foram submetidos à ressecção transuretral da próstata (RTUP) entre 2011 e 2012. Como grupo controle foram selecionados espécimes de músculo detrusor de 10 pacientes que foram submetidos a prostatectomia radical retropúbica devido adenocarcinoma de próstata. Todos estes pacientes tinham idade menor que 60 anos, tamanho de próstata menor que 30 gramas ao ultra-som e escore internacional de sintomas prostáticos (IPSS) menor que 7. Todos os pacientes foram submetidos a estudo urodinâmico pré e pós operatório (após 6 meses). A biópsia de fragmento de músculo da bexiga foi realizada ao final da RTUP e colocada em solução estabilizadora de RNA para quantificação da expressão de colágenos I e III, metaloproteinases de matriz 1, 2 e 9, e inibidores de MMPs (TIMP1, TIMP2 e RECK) na bexiga de pacientes com HPB. Os genes descritos foram avaliados através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Resultados: Todos os pacientes com HPB tinham confirmado OIV, através da análise do estudo urodinâmico (média de pressão detrusora no fluxo máximo de 78,5 cmH₂O e fluxo urinário máximo de 7,7 ml / s). O gene MMP1 mostrou-se superexpresso em pacientes com HPB (mediana = 1,87). MMP9, TIMP1 e RECK estavam subexpressos na maioria dos casos, enquanto TIMP2, colágeno I e III foram superexpressos (1,5, 4,4 e 1,9 vezes, respectivamente). No que diz respeito às características clínicas e urodinâmicas encontramos que MMP2 foi mais expresso entre pacientes com um baixo IPSS global (0,005) e sem urgência (p=0,035). Colágeno III foi mais expresso em pacientes com contrações vesicais não inibidas (p = 0,049). Os outros genes não mostraram nenhuma correlação estatística com quaisquer características clínicas ou urodinâmicas. Após 6 meses de RTU, pacientes que possuíam expressão aumentada de duas ou mais MMPs, apresentaram resolução da CNI em 66,6% dos casos, contra 14,0% quando apenas uma ou nenhuma MMP estava aumentada (p=0,038).

Conclusões: Encontramos um perfil de superexpressão de MMP1, TIMP2, colágenos I e III, e expressão baixa de MMP9, TIMP1 e RECK nos pacientes com OIV. Considerando o escore de sintomas prostáticos e a urgência miccional, encontramos curiosamente uma maior expressão de MMP2 em pacientes menos sintomáticos e sem urgência miccional. Encontramos uma associação entre a maior expressão de colágeno III com HD. A expressão aumentada de duas ou mais MMPs está relacionada à maiores taxas de resolução das CNIs.

Descritores: Hiperplasia prostática benigna, Obstrução infravesical, expressão gênica, Metaloproteinases, MMP-1, MMP-2, MMP-9, colágeno tipo I, colágeno tipo III, Hiperatividade detrusora, Proteína Reck, inibidores teciduais de metaloproteinases, Ressecção endoscópica da próstata, Estudos prospectivos, Urodinâmica, Urgência miccional.

Abstract

Ferreira, YA. Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the detrusor muscle of patients with bladder outlet obstruction due to Benign Prostatic Hyperplasia. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introduction: Long-term Bladder outlet obstruction (BOO) secondary to Benign prostatic Hyperplasia (BPH) can cause functional and morphological abnormalities in the bladder, such as increased collagen deposition and loss of compliance, leading to urinary storage and voiding symptoms. A decrease in bladder compliance is known to be correlated with deterioration of renal function. Increased deposition of collagen in the extracellular matrix (ECM) is the primary reason for a decreased compliance. In the bladder, as in other organs, this phenomenon is dependent on the balanced activity of proteolytic enzymes, including matrix metalloproteinases (MMPs) and their endogenous inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). The imbalance between MMPs and TIMPs is a key regulator in ECM turnover. Since these mechanisms are unknown in the obstructed bladder, the objective of this study was to evaluate gene expression of collagen, MMPs and their inhibitors in patients with bladder outlet obstruction due to BPH.

Material and Methods: We performed a prospective and controlled analysis of 43 patients with BOO due to BPH who underwent transurethral resection of the prostate (TURP) from 2011 to 2012. The control group was comprised of 10 bladder specimens from patients with < 60 years who underwent radical prostatectomy with an International Prostatic Symptom Score (IPSS) < 8 and prostate volume < 30 grams. All patients underwent urodynamic analysis pre and post operatively after 6 months. A biopsy of the bladder muscle was performed at the end of TURP for analysis of collagen, metalloproteinases and TIMPs gene expressions. For this purpose we used the quantitative real time polymerase chain reaction method (qRT-PCR).

Results: All patients with BPH had confirmed BOO confirmed through urodynamic analysis (mean detrusor pressure at maximum flow 78.5 cmH₂O and mean maximum flow 7.7 ml/s). MMP1 gene showed an important overexpression in patients with BPH (median = 1.87). A similar phenomenon occurred in a lesser extent to MMP2, to which 13 of 23 subjects had under-expression (mean = 1.2). MMP9, TIMP1 and RECK were under-expressed in the majority of cases, while TIMP2, collagen I and III were over-expressed (1.5, 4.4 and 1.9x respectively) (figure). With regard to clinical and urodynamic characteristics we found that MMP2 was more over-expressed among patients with a low global IPSS (0.005) and without urgency (p=0.035). Collagen III was more over-expressed in patients with non-inhibited bladder contractions (p=0.049), RECK was more over-expressed in patients with a decreased complacence (p=0.049). The other genes showed no statistical correlation with any clinical or urodynamic characteristics. After 6 months of TURP, patients with non-inhibited bladder contractions showed resolution in 66.6% of cases, when had increased expression of two or more (≥ 02) MMPs in patients compared with 14.0% when only 01 MMP was increased (p = 0.038)

Conclusions: BOO is related with an over-expression of MMP1, TIMP2, colagens I and III, and with an under-expression of MMP9, TIMP1 and RECK.

Detrusor overactivity is related with higher collagen III expression, this fact may be due to a lower MMP1 expression. A lower global IPSS and no urgency were related to a higher expression of MMP2, suggesting that this gene may be inhibiting collagen deposition in the bladder. The increased expression of two or more MMPs is related to greater rates of resolution of non-inhibited bladder contractions .

Descriptors: Key words: benign prostatic hyperplasia, bladder outlet obstruction, gene expression, metalloproteinases, MMP-1, MMP-2, MMP-9, type I collagen, type III collagen, detrusor overactivity, Protein Reck, tissue inhibitors of metalloproteinases, endoscopic resection of the prostate, prospective studies, Urodynamics, urinary urgency.

Introdução

1 Introdução

1.1 Considerações Gerais

A Hiperplasia prostática benigna (HPB) é uma patologia frequente e apresenta sintomas miccionais bem característicos no homem adulto. É um processo relacionado ao envelhecimento masculino, com prevalência histológica de 10%, 50% e 90% respectivamente aos 25, 60 e 80 anos de idade **(Brooks, 2002; Peters, 1998)**. Como consequência da doença, aos 55 anos, cerca de 25% dos homens apresentam sintomas de esvaziamento vesical, alteração de complacência e capacidade vesical e aos 75 anos, cerca de metade queixam-se de sintomas como redução da força e do calibre do jato urinário, intermitência, sensação de esvaziamento miccional incompleto e urgência urinária **(Peters, 1998)**. Vários estudos clínicos sobre a história natural da doença evidenciaram que os sintomas urinários da HPB são oscilantes, com períodos de piora e de melhora espontânea. Entre 30 a 60% dos pacientes referem melhora subjetiva dos sintomas quando reavaliados num período de três a sete meses após a consulta inicial, e cerca de um terço dos casos o quadro clínico deteriora, resultando em cirurgia **(Bauer, 2000)**.

1.2. HPB e suas consequências na bexiga:

A HPB decorre da proliferação do estroma fibromuscular e do epitélio glandular na região periuretral e na zona de transição. Os sintomas decorrentes da HPB resultam de três componentes básicos **(Mirone et al., 2004)**: **a.** componente mecânico, no qual o aumento volumétrico da próstata provoca diminuição do calibre e aumento da resistência uretral, com consequente dificuldade de esvaziamento vesical; **b.** componente dinâmico, representado pela atividade alfa-adrenérgica aumentada nessa região em virtude da presença na cápsula, no estroma prostático e no colo vesical de altos níveis desses receptores, causando elevação da resistência uretral; **c.** componente vesical, decorrente das alterações secundárias à obstrução produzidas pela HPB na musculatura detrusora, que se traduzem por hiperatividade como resposta ao esforço contínuo na tentativa de esvaziamento, hipocontratibilidade, alterações de sensibilidade e alterações a complacência vesical **(Dahmani et al., 2002)**. Em geral, esses três fatores atuam simultaneamente e sua resultante promove aparecimento e gravidade da sintomatologia da HPB.

Evidências apontam que a redução da complacência vesical se deve principalmente ao estresse mecânico secundário à obstrução **(Levin et al., 1995)**. O aumento da espessura vesical observada nestes casos se deve à hipertrofia compensatória da musculatura lisa detrusora e ao excesso de deposição da matriz extracelular **(Levin et al., 2005)**. Do ponto de vista biomecânico, a complacência está primariamente relacionada à deposição da matriz extracelular, que por sua vez depende de uma atividade balanceada de enzimas proteolíticas como as metaloproteinases da matriz **(Sutherland et al., 1998)**.

1.3. Papel da matriz extracelular na bexiga

Alberts et al. (1997) afirmaram que as células de um tecido normalmente estão em contato com uma rede complexa de macromoléculas extracelulares denominada de matriz extracelular (MEC), que atua ajudando a manter células e tecidos unidos, fornecendo uma estrutura organizada onde as células podem migrar e interagirem entre si, além de suportar a maior parte do estresse mecânico infligido àquele tecido.

Pereira et al. (2005), conceituam matriz extracelular (MEC) como um espaço extracelular, preenchido por um complexo de componentes fibrosos e protéicos, com proporções variadas de proteínas e polissacarídeos que fornecem um substrato adequado para o crescimento e diferenciação dos mais variados tipos celulares do organismo.

São duas as classes principais de macromoléculas que compõem a matriz extracelular, as glicosaminoglicanas e as proteínas (**Alberts et al., 1997; Mott; Werb, 2004**). As glicosaminoglicanas são cadeias polissacarídicas não ramificadas compostas de unidades repetidas de dissacarídeos. Os componentes protéicos da matriz extracelular, para Alberts et al. (1997) são classificados ainda em estruturais, como o colágeno e a elastina, e adesivos como a fibronectina e a laminina.

O colágeno corresponde a 50% do estroma vesical, possuindo importante papel na adaptação vesical a condições fisiopatológicas específicas. Os colágenos tipo I e III são os mais comuns, sendo o colágeno tipo I o mais prevalente, e III o primeiro a ser sintetizado em processos de reparação e fibrose.

As propriedades específicas do tecido conjuntivo em cada órgão dependem da composição e proporção dos elementos da matriz extracelular necessários para o processo de interação entre as células, caracterizados pela determinação de uma MEC altamente específica para a função desempenhada por cada órgão. Uma das mais importantes funções do tecido conjuntivo é participar ativamente dos processos de remodelamento e fibrose, que são resultantes da interação entre as células e os componentes da MEC, caracterizada pela mudança em sua constituição e, principalmente, na distribuição das fibras de colágeno **(Chancellor et al., 2002; Yoshimura, 1997)**.

Sabemos que a habilidade do trato urinário inferior de armazenar e esvaziar a urina requer uma significativa coordenação entre o músculo liso vesical, a inervação periférica, a medula espinhal e os centros corticais maiores. A acomodação da urina (complacência) é primeiramente um fenômeno passivo, dependente das propriedades intrínsecas e do conteúdo de colágeno da parede, do músculo liso vesical e da quiescência da via parassimpática. Em condições de obstrução da uretra prostática, o conteúdo do colágeno pode aumentar e levar à perda da distensibilidade vesical com consequente diminuição da complacência (de Groat, 2006).

O estroma vesical é considerado um tecido metabólico, que ocupa o espaço entre os feixes musculares, vasos sanguíneos e nervos e que possui um importante papel na adaptação da bexiga a condições fisiopatológicas específicas. Além disso, especula-se também a possibilidade de haver uma íntima relação entre as alterações na composição desse estroma com o crescimento e o funcionamento muscular **(Kim et al., 2000)**.

As propriedades mecânicas e a função dos colágenos na parede vesical são bastante similares às apresentadas nos tendões, porém na bexiga as fibras colágenas suportam maior distensão. Essa habilidade de alterar sua tortuosidade faz das fibras colágenas um elemento indispensável para a capacidade viscoelástica vesical **(Pupa et al., 2002)**.

As fibras do colágeno tipo I se dispõem de forma ondulada e, quando submetidas a uma carga volumétrica, estiram-se a ponto de aumentarem seu comprimento em 3 a 5% **(Lynch et al., 2002)**. Normalmente formam fibrilas heterotípicas com outros colágenos, especialmente com os tipos III e V, consistindo em obstáculo que limita a compatibilidade mútua entre os colágenos fibrilares.

O colágeno tipo III, que geralmente se localiza próximo ao tipo I, também é amplamente distribuído pela parede vesical. É responsável por formar as fibras reticulares, que respondem pela sustentação das células musculares, em associação à substância amorfa da MEC **(Curran et al., 1999)**. O colágeno tipo III parece sofrer mudanças conformacionais para acomodar o aumento de volume intravesical. Estima-se que quando a bexiga está vazia, o colágeno tipo III do interstício vesical apresenta-se como uma malha de fibras frouxas e onduladas, sem seguir uma orientação uniforme e como se fossem molas dispersas **(Nagase et al., 1999)**.

Um dos modelos mais utilizados para a indução de fibrose vesical experimental é o de obstrução infravesical parcial crônica. O uso da obstrução infravesical crônica parcial em animais induz aumento da massa vesical e altera seu funcionamento. Dessa forma, promove aumento da frequência urinária, do volume residual e da pressão intravesical durante a micção,

procurando reproduzir o que ocorre em seres humanos, assim, isso se constitui em estabelecido modelo experimental (**Backhaus et al., 2002**). Na fase inicial da obstrução infravesical (OIV) crônica parcial, é observada uma hiperdistensão transitória da bexiga, iniciando-se os eventos moleculares que levam à hipertrofia do músculo detrusor. Com a remodelação da parede vesical que ocorre em fase avançada da OIV, algumas bexigas tornam-se disfuncionais, e essas alterações caracterizam-se pela irreversibilidade.

A fibrose ocorre a partir de alterações estruturais da parede vesical na tentativa de se adaptar à obstrução com aumento da pressão intravesical para manutenção do fluxo urinário, decorrentes do aumento da deposição de colágeno em toda espessura vesical, principalmente à custa de colágeno tipo III, o que propicia diminuição da contratilidade e da capacidade viscoelástica da bexiga (**Deveaud et al., 1998**). A estimulação excessiva dos fibroblastos em resposta à lesão física ou a outros estímulos inflamatórios e de destruição do tecido, como os decorrentes do quadro obstrutivo, pode levar a uma ativação persistente do processo de fibrose, com aumento da matriz extracelular, em especial do colágeno que é depositado independentemente do aumento do número dos fibroblastos. Ao mesmo tempo, o aumento da deposição de colágeno acarreta à maior presença de fatores de crescimento e citocinas no tecido em questão, caracterizando bem a função reparadora do colágeno.

O aumento da deposição do colágeno tipo III parece ser regulado pelo aumento simultâneo da transcrição de seu mRNA (**Chang et al., 1998**). Esse processo de deposição inicia-se no urotélio e lâmina própria e estende-se para a camada muscular, enquanto a fibrose progride. As principais alterações macroscópicas da parede vesical são: Espessamento e a presença de

trabeculações (**Gosling, Dixon, 1980**). Estas são causadas pela deposição de colágeno na MEC detrusora (**Peters et al., 1992**)

Diversas afecções como a obstrução infravesical (OIV) parcial crônica podem induzir estes processos através da remodelação da MEC e consequentemente alterar a função vesical (**Levin et al. 2004**). Essa estrutura de colágeno responsável pelo reforço detrusor composta de colágeno tipo I e III, são reguladas por ação de enzimas proteolíticas (matriz metaloproteinases – MMPs) e inibidores enzimáticos endógenos, chamados de inibidores teciduais de metaloproteinases- TIMPs (**Chancellor et al., 2002; Fini et al., 1998**).

1.4. Metaloproteinases e seus inibidores:

As MMP são enzimas que equilibram a renovação da MEC, e por isso exercem importante papel no desenvolvimento e progressão de patologias humanas. As MMP estão subdivididas em cinco grupos, baseados na especificidade do substrato e na sua homologia interna (figura 1):

- 1- Matrilisinas: Possuem um domínio pro-peptídeo, peptídeo sinal e um domínio catalítico com o sítio ligante de zinco. Fazem parte deste grupo MMP-7 e MMP-26 (**Lynch, Matrisian, 2002**).
- 2- Colagenases contêm um domínio simples de hemopexina conectado ao domínio catalítico através de uma região de dobradiça rica em prolina, estas MMP degradam a hélice nativa de colágeno tipo I, II e III entre outros. São estas: MMP-1, MMP-8 e MMP-13 (**Curran, Murray 1999**)

- 3- Estromelisinases são semelhantes às colagenases, mas como as matrilisinases possuem um substrato específico e degradam muitas proteínas da matriz extracelular, como os proteoglicanos, fibronectina e laminina. São estas: MMP-3, MMP-10 e MMP-12. **(Nagase et al., 1999)**
- 4- Gelatinases: Enzimas que contêm uma região adicional de três repetições de fibronectina tipo II, que possuem preferência por colágeno desnaturado (gelatinases) e também degradam colágenos tipos IV, V, VII e X, além de fibronectinas e lamininas. São estas: MMP-2 e MMP-9 **(Kleiner, Stetler-Stevenson, 1999)**.
- 5- MMP tipo membrana (MMP-TM) é o quinto e maior grupo das metaloproteinases que degrada gelatina e fibronectina. Assim como outros substratos da matriz extracelular, estas MMP estão limitadas à superfície das células através de um domínio transmembrana c-terminal. São estas: MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25 **(Seiki, 1999)**

Figura 1. Estrutura geral das metaloproteinases. As MMP possuem um domínio pro-peptídeo responsável pela latência da enzima, e um domínio catalítico, portador de um íon zinco, estas estruturas estão sempre presentes e caracterizam estas enzimas. Um domínio hemopexina determina substratos e inibidores de cada MMP. *(Imagem reproduzida da tese de Doutorado de Dra. Sabrina Reis)*

A MMP-1, ou collagenase 1, é uma enzima com 52 kDa na forma inativa e 41 kDa na forma ativa que é expressa in vivo em áreas de rápida remodelação tecidual fisiológica ou patológica. É expressa por fibroblastos, ceratinócitos, condrócitos, monócitos, macrófagos, hepatócitos e uma variedade de células tumorais. Os substratos já identificados desta enzima são os colágenos dos tipos I, II, III, VII, VIII e X, além de agregana, serpins e α 2-macroglobulina (Nabeshima et al., 2002). Lynch e Matrisian (2002) relatam que além destes substratos a MMP-1 ainda degrada o colágeno tipo XI, gelatina, entacina, fibronectina, laminina, tenacina e vitronectina.

Após a degradação pela MMP-1, o colágeno tipo I é posteriormente degradado por outras enzimas (**De Souza; Line, 2002**), pois após clivado, desnatura-se formando a gelatina que é degradada pela MMP-2 e MMP-9 (**Cotrim et al. 2002; Stamekovic, 2000**).

A MMP-2, ou gelatinase A, tem 75 kDa na sua forma inativa e 65 kDa na forma ativa e a MMP-9, ou gelatinase B, tem 92 kDa na forma inativa e 84 kDa quando ativada (**Stamekovic, 2000**). A MMP-2 é expressa por uma variedade de células normais ou tumorais e tem a capacidade de degradar gelatina, colágenos dos tipos IV, V e X na sua forma ativa, além de laminina, TGF- β , e colágenos dos tipos I, II e III desnaturados (**Kubota et al., 2002**). De Souza et al. (2005) descrevem a MMP-9, ou gelatinase B como uma enzima expressa por leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, ceratinócitos e células endoteliais que atua nos colágenos do tipo IV, V e IX, em proteoglicanas e na elastina e tem sua expressão controlada por fatores como o TNF- α , a IL-1, o PDGF e o EGF.

A atividade das MMP é regulada por inibidores endógenos, através, dos quatros inibidores de metaloproteinases (TIMP), onde cada um consiste de um domínio N-terminal responsável pela atividade inibitória da MMP, e um domínio C-terminal. Embora todas as TIMP liguem-se firmemente a maioria das MMP, elas possuem diferente atividade inibitória contra diferentes MMP (**Brew et al., 2001**).

Outro inibidor de MMP é a proteína RECK (proteína indutora de reversão rica em cisteína com domínio Kazal). RECK é uma glicoproteína de ancoragem em membranas celulares, cuja estrutura é diferente das TIMP, expressa em

vários tecidos normais, mas não identificada em células derivadas de tumores. A RECK inibe MMP-9, 2 e 14, funcionando também, como um regulador estrutural de processo de renovação (turnover) da matriz extracelular. A RECK inibe a MMP-9 de dois modos, supressão da sua secreção e direta inibição de sua atividade enzimática (**Chang et al., 2008**). Durante o processo de transformação celular a expressão do gene RECK é inibida liberando MMP-9, contribuindo assim para o comportamento invasivo de células cancerosas.

As MMP são também reguladas em níveis transcricional e pós transcricional. A expressão da maioria das MMP é baixa em tecido normal e acima do normal quando há remodelamento. A expressão pode ser induzida por citocinas, fatores de crescimento, agentes químicos, estresse físico, oncogenes e interações com a matriz extracelular (**Baker et al., 2002**).

Backhaus et al, em 2002, demonstraram num modelo de distensão in vitro de células de músculo detrusor humano que a distensão a maiores pressões (numa situação equivalente à distensão vesical resultante de obstrução infravesical) esteve correlacionada com diminuição da atividade das MMPs 1, 2 e 9, bem como aumento da atividade de seus inibidores teciduais.

1.5 Justificativa

Apesar de classicamente os sintomas urinários serem considerados consequência direta da HPB, suas correlações com a obstrução infra-vesical são muitas vezes questionáveis (**Yalla,1995**). Os mecanismos pelos quais a obstrução prostática produz sintomas urinários e as alterações que ocorrem no

músculo detrusor são pouco conhecidos **(Kuo, 2000)**. Ademais, evidências apontam que indivíduos idosos e mulheres também podem desenvolver estes sintomas mesmo sem apresentar obstrução infra-vesical. Por estas razões, nos últimos anos, as alterações vesicais decorrentes da obstrução prostática e seu papel na gênese dos sintomas urinários têm sido extensamente estudados. Até o presente momento, não sabemos por que cerca de metade dos pacientes obstruídos desenvolvem hiperatividade detrusora, alguns desenvolvem hipocontratilidade e outras alterações da sensibilidade vesical.

Os níveis de expressão de colágeno, das metaloproteinases e de seus reguladores teciduais na musculatura detrusora, relacionados com a alteração da fisiologia miccional em humanos são pouco conhecidos. Além disto, as alterações nos níveis de expressão destes genes como consequência do processo obstrutivo infra-vesical e suas correlações com as variáveis clínicas e urodinâmicas dos pacientes com HPB ainda não foram descritas de forma adequada. A determinação das alterações moleculares e gênicas secundárias à obstrução prostática pode contribuir substancialmente para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, que possam impedir a deterioração vesical ou mesmo tratá-la ainda no início da alteração molecular, nos pacientes obstruídos com HPB.

Objetivo

2 Objetivo

2.1 Objetivo primário:

Determinar o perfil de expressão das metaloproteinases 1, 2 e 9, seus inibidores teciduais TIMP1, TIMP2 e RECK e do colágeno tipo I e III no músculo detrusor de pacientes com HPB e OIV

2.2 Objetivos secundários:

1. Correlacionar o perfil de expressão destes genes com parâmetros clínicos como escore de sintomas, volume prostático e resíduo urinário pós-miccional;
2. Correlacionar o perfil de expressão destes genes com as alterações urodinâmicas pré e pós-operatórias;

Materiais e métodos

3 Material e Métodos

3.1 Desenho do estudo

Estudo prospectivo e controlado utilizando amostras teciduais de bexiga em pacientes com diagnóstico de HPB submetidos a tratamento cirúrgico.

3.2 Local e Época

O estudo foi desenvolvido no laboratório de investigação Médica 55 (LIM-55) e divisão de Urologia do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), sendo executado entre Janeiro de 2011 e abril de 2014.

3.3 Sujeitos

Foram selecionados 43 pacientes com HPB, com idade entre 45 e 80 anos (média 63 anos), com diagnóstico de OIV e indicação para tratamento cirúrgico da HPB. Os critérios de exclusão aplicados foram: pacientes com presença de retenção urinária, antecedente de cirurgia prostática, antecedente de cirurgia pélvica, cirurgia vesical, bexiga neurogênica, neuropatia diabética, doença de Parkinson, uso de medicamentos que alterem a função do trato urinário inferior, radioterapia pélvica, estenose de uretra, suspeita de câncer de próstata, antecedente de câncer de bexiga, cálculos vesicais, infecção urinária sintomática, e pacientes que não colaborem com o estudo urodinâmico.

Os participantes foram submetidos à anamnese (incluindo o índice internacional de sintomas prostáticos – IPSS) (Apêndice) e exame físico (incluindo toque digital da próstata) direcionado para as queixas miccionais, e foram feitos os seguintes exames: antígeno prostático específico (PSA), creatinina, colesterol total, glicemia, exame de urina tipo I, ultra-som abdominal e pélvico, e estudo urodinâmico completo no pré e pós-operatório. As investigações urodinâmicas foram realizadas de acordo com os padrões estabelecidos pela sociedade de internacional de continência (**Schäfer et al, 2002**). As variáveis urodinâmicas avaliadas foram a sensibilidade vesical, presença de contrações não inibidas, complacência vesical, capacidade cistométrica máxima, pressão detrusora de abertura e no fluxo urinário máximo. A complacência (C) vesical foi calculada como a alteração da pressão (P) intravesical em relação à alteração do volume intravesical (V), por meio da relação entre a alteração do volume e a correspondente alteração da pressão intra-vesical (**Chancellor et al. 2002**).

As características clínicas dos 43 pacientes submetidos à RTU de próstata estão demonstradas na tabela 1. Neste grupo a idade média é de 63,14 anos, tempo médio de sintomas de 49,4 meses, Índice Internacional de Sintomas Prostáticos (IPSS) médio de 21,6, PSA médio de 2,97 ng/dl e volume médio da próstata de 54 g.

No grupo controle foram selecionados 10 pacientes, com IPSS baixo (< 7), submetidos a prostatectomia radical retropúbica devido a adenocarcinoma de próstata. Uma amostra de músculo detrusor foi colhida no momento da abertura da bexiga. As características clínicas do grupo controle estão na tabela 2. Os pacientes tinham idade em média de 58 anos (DP 8.8), o que não

difere estatisticamente do grupo de pacientes ($p=0,078$), tamanho da próstata ao ultra-som de 29,1 g em média (DP 8,4), IPSS 1,7 (DP 1,3). Todos aceitaram participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (aprovação no comitê de ética 0453/08).

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes com hiperplasia prostática benigna.

Variável Clínica	Total (n=43)
Idade (anos)	
Média	63,0
Mediana	63,0
Desvio Padrão	6,9
Tempo de sintomas (meses)	
Média	42,0
Mediana	36,0
Desvio Padrão	28,2
IPSS (score)	
Média	22,0
Mediana	25,0
Desvio Padrão	7,4
Qualidade de Vida (score)	
Média	5
Mediana	4
Desvio Padrão	0,8
Urgência Miccional	
Sim	24
IMC	
Média	28,0
Mediana	28,0
Desvio Padrão	4,8
PSA (ng/mL)	
Média	2,9
Mediana	2,3
Desvio Padrão	2,3
Tamanho da próstata (g) US	
Média	54,0
Mediana	54,0
Desvio Padrão	17,6

Tabela 2. Características clínicas dos pacientes do grupo controle.

Variável Clínica	Total (n=10)
Idade (anos)	
Média	58,3
Mediana	56,0
Desvio Padrão	8,8
PSA (ng/ml)	
Média	6,8
Mediana	4,7
Desvio Padrão	6,1
IPSS (score)	
Média	1,7
Mediana	2,0
Desvio Padrão	1,3
Estadio Clinico (n)	
T1c	6
T2a	1
T2b	3
Gleason peça (n)	
6	3
7	3
8	3
9	1
Estadio patológico (n)	
pT2	9
pT3	1
Tamanho da próstata (g) US	
Média	29,1
Mediana	29,6
Desvio Padrão	8,4

3.4 Intervenção

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Os pacientes foram submetidos à ressecção transuretral da próstata (RTU-P).

No final da RTU da próstata, todos os pacientes foram submetidos a uma biópsia profunda da bexiga para obtenção da amostra do músculo detrusor.

Os fragmentos retirados foram imediatamente colocados em solução estabilizadora de RNA (RNA later, Applied Biosystems), e encaminhados para o laboratório de investigação médica da disciplina de urologia do HCFMUSP, onde foram processados.

Os fragmentos congelados foram utilizados para análise da expressão dos genes através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os genes analisados foram: MMP 1, 2, e 9, TIMP 1, 2, RECK, colágeno tipo I e III. Os primers utilizados para expressão dos genes estão expostos na tabela 1. O controle endógeno utilizado para expressão dos genes foi a beta-2-microglobulina (B2M) e o GAPDH.

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. A bióloga responsável pela medida das expressões gênicas não teve acesso às informações clínicas dos pacientes. Este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisas do HCFMUSP sob o protocolo número 0863/11.

Tabela 3. Primers utilizados para quantificação da expressão de colágenos I e III, metaloproteinases de matriz (MMPs 1, 2 e 9) e Inibidores de metaloproteinases (TIMP1, TIMP2 e RECK) na bexiga de pacientes com HPB.

Identificação do ensaio	
Colágeno I	Hs00171458_m1
Colágeno III	Hs00609977_m1
MMP1	Hs00327458_m1
MMP2	Hs00900055_m1
MMP9	Hs00923996_m1
TIMP1	Hs00265208_s1
TIMP2	Hs02758991_g1
RECK	Hs99999907_m1

3.5 Extração do RNA e síntese de cDNA

Os espécimes congelados a -80°C foram macerados e colocados em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril. O RNA foi isolado com o kit mirVana (Ambion®) de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA. Ao tubo foram então adicionados 500 µl do tampão de lise e 50 µl do aditivo de homogeneizar, e a solução foi deixada por 10 min no gelo. Foram então adicionados 500 µl de fenol-clorofórmio e as amostras foram vortexadas e centrifugadas na velocidade máxima (14.000

RPM) por 5 min em temperatura ambiente. A fase aquosa foi então removida para um novo tubo e foi adicionado um terço do volume de etanol 100%. Posteriormente, a solução foi transferida para um filtro e centrifugada a 10.000 g por 15 seg. No filtro que continha o RNA total, foi feita uma lavagem com 700 µl de *wash solution 1/3*, e as amostras foram centrifugadas por 10 seg a 10.000 g. Foram feitas então duas lavagens com 500 µl de *wash solution 2/3*, e nos intervalos as amostras foram centrifugadas por 10 seg a 10.000 g. O filtrado foi depois descartado e foram adicionados 100 µl de água *RNAse free* a 95°C aos tubos contendo RNA e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g por 10 seg. O filtrado contendo o RNA foi então armazenado em freezer -80°C até ser utilizado.

A concentração e pureza do RNA foram estimadas em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280 nM).

A síntese de cDNA foi realizada a partir 20 µl de RNA, utilizando-se a enzima Multiscribe™ transcriptase reversa e iniciadores randômicos (Applied Biosystems).

O RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20 µL. A este volume foram acrescentados 2 µL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6 µL do mix de dNTPs (100 mM), 2 µL do tampão da enzima (10X), e 8,4 µl de água RNA/DNA nuclease free. As soluções foram então submetidas a ciclos de temperaturas em equipamento de PCR Veriti (Applied Biosystem, Foster City, CA), seguindo os seguintes parâmetros: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C e 5 min a 85°C. Após o termino dos ciclos, o cDNA foi armazenado a -20°C até o uso.

3.6 Análise de expressão de genes por PCR em tempo real quantitativo

As reações foram realizadas no termociclador ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, CA, EUA) no modo standard. Para quantificação das amostras foi utilizado o reagente TaqMan® (Figura 2) (Applied Biosystems, CA, EUA).

As reações ocorreram nas seguintes concentrações: 0,5 µl do primer específico, 5 µl de TaqMan® Universal PCR master mix (Applied Biosystems, CA, EUA), 3,5 µl de água livre de nuclease e 1µl de cDNA.

O nível de expressão dos genes foi obtido pela quantificação relativa dos níveis de expressão em vezes, determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Figura 2: Sistema TaqMan®: Este protocolo utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela *Taq* polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* da fluorescência emitida que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite então a detecção do produto do PCR em tempo Real.

3.7 Análise Estatística

A expressão gênica das metaloproteinases e seus inibidores teciduais foi avaliada através da análise de expressão relativa entre os grupos de pacientes com e sem hiperatividade detrusora, pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Tal valor consiste na elevação de 2 à potência da subtração entre o valor de expressão gênica do indivíduo com HPB e a média de expressão de todos indivíduos sem HPB, segundo método validado para análise de expressão relativa de genes. No gráfico construído (figura 3), os números acima de 1 indicam uma superexpressão, enquanto valores entre 0 e 1 denotam subexpressão. Valores de expressão indetectável são por convenção expressos como 0,01 sendo esse o limite de detecção do método. A linha de base é a média de expressão de cada gene dentre os indivíduos sem HPB, com a qual a expressão dos indivíduos com obstrução é comparada. Cada barra representa um único indivíduo com obstrução; barras acima da linha-base representam superexpressão enquanto barras abaixo da linha-base denotam subexpressão dos respectivos genes.

A análise estatística foi realizada através do software SPSS 19.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). A comparação das expressões gênicas entre os grupos foi feita através do teste T de Student, quando os grupos não apresentavam distribuição homogênea foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney. Para comparar valores de escala nominal foi utilizado o teste do qui-quadrado. Um valor de p inferior ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo para todos os cálculos

Resultados

4 Resultados

Todos os pacientes foram avaliados através de estudo urodinâmico pré e pós-operatório (6 meses após cirurgia). Assim, confirmada OIV no pré-operatório e desobstrução no pós-operatório. Os dados do estudo urodinâmico estão descritos na tabela 4. Tiveram resultados estatisticamente significantes a melhora do fluxo máximo (7,74 ml/s para 19,38ml/s, p 0,000), diminuição da pressão detrusora fluxo máximo (78,58 cmH₂O para 32,12 cmH₂O, p 0,000), diminuição da pressão detrusora de abertura na micção inicial (70,64 cmH₂O para 29,12 cmH₂O, p 0,000), diminuição da amplitude na CNI (30,11cmH₂O para 5,58 cmH₂O, p 0,001) e melhora de complacência (6,69 ml/cmH₂O para 17,65 ml/cmH₂O, p 0,000). Os pacientes apresentavam em média 75,59 ml de resíduo pós miccional. Nenhum paciente apresentou resíduo pós-miccional no pós-operatório.

Tabela 4. Dados urodinâmicos pré e pós-operatórios dos 43 pacientes avaliados

	Pré	Pós	p
Número de pacientes (n)			
Qmax (ml/seg)			
Média (DP)	7,74 (3,17)	19,38 (5,89)	0,000
Pdet Qmax (cm H2O)			
Média (DP)	78,58 (28,81)	32,12 (10,89)	0,000
CCM (ml)			
Média (DP)	392,39 (127,76)	409,86 (98,26)	0,454
Pabertura (cmH2O)			
Média (DP)	70,64 (24,38)	29,12 (13,25)	0,000
Amplitude da CNI (cmH2O)			
Média (DP)	30,11 (44,07)	5,58 (14,51)	0,001
Perda urinária (n)	9	3	0,127
Complacência (ml/cmH2O)			
Média (DP)	47,08 (65,23)	87,59 (111,23)	0,043
Resíduo pós-miccional (ml)			
Média	75,59	0	-

Teste T-pareado

Análise da expressão gênica do grupo estudado

Analizando a expressão relativa dos genes entre os pacientes com HPB e o grupo controle (figura 3), o gene de MMP1 foi superexpresso na maioria

dos pacientes com HPB (mediana = 1,87). Enquanto o gene da MMP2 apresentou um padrão heterogêneo, no qual 13 dos 23 indivíduos apresentaram subexpressão (mediana = 1,2). A MMP9 mostrou-se mais subexpressa no grupo de pacientes com HPB (mediana=0,49).

Quanto aos inibidores teciduais, o gene de TIMP2 apresentou uma tendência à superexpressão na HPB (mediana = 1,52). A expressão dos genes de TIMP1 e RECK apresentou padrão de subexpressão, e o colágeno I e III apresentaram um perfil de superexpressão nos pacientes com HPB com valores de mediana, respectivamente de 4,40 e 1,98.

Figura 3. Expressão relativa dos genes MMP1, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, RECK, COL I e III. A linha de base representa a média de expressão dos indivíduos sem HPB enquanto cada coluna representa a expressão relativa do respectivo gene em um único indivíduo em relação à linha-base.

A expressão gênica em relação a qualidade de vida (dados do questionário IPSS), não teve significância estatística entre os grupos (tabela 5). Enquanto os níveis de expressão gênica de acordo com o IPSS e o sintoma de urgência miccional (tabela 6), demonstraram que a expressão de MMP2 foi estatisticamente maior entre os pacientes com escore de sintomas ≤ 22 ($p=0,005$) e com ausência de urgência miccional ($p=0,035$). Os demais genes não demonstraram diferença estatisticamente relevante de acordo com os sintomas.

Tabela 5. Nível de expressão relativa dos oito genes em relação a qualidade de vida.

Genes	QOL		
	Média (desv. padrão)		P
	≤ 3 (n=13)	> 3 (n=12)	
MMP1	17,60(40,25)	12,61(31,54)	0,778*
MMP2	1,37 (0,67)	1,036 (0,76)	0,257*
MMP9	1,980(3,26)	1,11 (1,84)	0,431*
TIMP1	0,51 (0,24)	0,703(0,648)	0,936**
TIMP2	1,69(1,153)	1,572(1,074)	0,795*
RECK	1,14(0,928)	1,269(1,31)	0,778*
COL I	4,53(4,522)	7,18 (7.64)	0,654**
COL III	2,70(1,434)	2,14(1,432)	0,398*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

Tabela 6. Nível de expressão relativa dos oito genes em relação ao IPSS e Urgência miccional.

Genes	IPSS			Urgência miccional		
	Média (desv. padrão)			Média (desv. padrão)		
	≤ 22 (n=12)	> 23 (n=15)	P	Não (n=18)	Sim (n=24)	p
MMP1	15,91(38,32)	13,57(29,69)	0,880*	1174,0(4025)	14,95(36,31)	0,50**
MMP2	1,578(0,727)	0,839(0,509)	0,005*	1,697(1,140)	1,049(0,631)	0,035**
MMP9	1,811(3,13)	1,22 (2,108)	0,565*	1,501 (4,00)	8,502(33,43)	0,384*
TIMP1	0,49(0,288)	0,636(0,594)	0,455*	0,675(0,694)	0,814(0,939)	0,601)*
TIMP2	1,304(0,997)	1,740(1,168)	0,314*	1,493(0,905)	1,827(1,208)	0,485*
RECK	1,087(0,956)	1,186 (1,216)	0,820*	0,970(0,863)	3,598(12,06)	0,363*
COL I	5,40 (4,45)	5,84 (7,234)	0,862*	5,523(4,420)	6,468(6,238)	0,671*
COL III	2,267 (1,011)	2,402(1,738)	0,872**	1,837(0,753)	2,528(1,703)	0,476

* Teste T

** Teste de Mann-Whitney

A expressão de colágeno III, foi estatisticamente significativa na presença de HD (p 0,049). Não houve expressão significativas dos genes, avaliando a amplitude e período das CNIs (tabela 7 e 8).

Tabela 7. Nível de expressão relativa dos genes em relação a presença de HD e amplitude das CNIs.

Genes	HD			Amplitude da CNI		
	Média (desvio padrão)			Média (desv. padrão)		
	Sim (n=21)	Não (n=22)	P	<40 cm H ₂ O (n=6)	≥40 cm H ₂ O (n=15)	P
MMP1	19,04 (40,99)	913,54 (355)	0,890**	22,08 (41,75)	17,14 (43,28)	0,843**
MMP2	1,10 (0,66)	1,52 (1,09)	0,136*	0,96 (0,74)	1,15 (0,64)	0,563*
MMP9	9,99 (36,55)	1,41 (3,62)	0,280*	1,34 (2,36)	13,7 (43,65)	0,504**
TIMP1	0,84 (1,02)	0,67 (0,63)	0,527*	0,86 (0,85)	0,83 (1,11)	0,946*
TIMP2	1,94 (1,26)	1,44 (0,866)	0,139*	1,49 (1,48)	2,14 (1,15)	0,302*
RECK	3,98 (13,21)	1,09 (1,10)	0,313*	0,73 (0,48)	5,37 (15,75)	0,487*
COL I	5,58 (5,25)	6,87 (6,23)	0,536*	4,26 (5,70)	6,29 (5,13)	0,465*
COL III	2,81 (1,75)	1,71 (0,81)	0,049*	2,44 (2,17)	3,06 (1,50)	0,524*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

Tabela 8. Nível de expressão relativa dos genes em relação ao período de início das CNIs.

Genes	Período da CNI		
	Média (desv. padrão)		
	Precoce (n=11)	Tardio (n=10)	P
MMP1	15,92 (35,68)	22,68 (49,75)	0,781*
MMP2	1,21 (0,54)	0,98 (0,76)	0,462*
MMP9	17,91 (51,71)	2,07 (3,69)	0,579**
TIMP1	1,23 (1,35)	0,45 (0,22)	0,165**
TIMP2	1,83 (1,26)	2,06 (1,31)	0,692*
RECK	7,00 (18,66)	0,96 (0,62)	0,684**
COL I	7,42 (5,08)	3,50 (4,93)	0,128*
COL III	3,06 (1,60)	2,53 (2,01)	0,582*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

Não houve expressão significativa na análise da sensibilidade vesical para nenhum dos genes analisados (tabela 9). Também não houve significância para nenhum dos genes analisados quando avaliamos a pressão e fluxo miccional (tabela 10).

Tabela 9. Nível de expressão relativa dos oito genes em relação a sensibilidade Vesical.

Genes	Sensibilidade		
	Média (desv. padrão)		
	<100 (n=12)	100-150 (n=26)	p
MMP1	642,13(308,22)	182,88 (477,74)	0,701*
MMP2	1,16 (0,75)	1,77 (1,24)	0,063*
MMP9	1,30 (2,40)	17,32 (49,23)	0,245**
TIMP1	0,61 (0,45)	1,14 (1,42)	0,592 **
TIMP2	1,68 (1,05)	1,67 (1,24)	0,968*
RECK	1,07 (0,97)	6,41 (17,81)	0,612**
COL I	5,62 (5,97)	7,49 (4,85)	0,413*
COL III	2,10 (1,45)	2,80 (1,53)	0,268*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

Tabela 10. Nível de expressão relativa dos oito genes em relação ao Fluxo miccional e pressão miccional.

Genes	Fluxo urinário			Pressão miccional		
	Média (desv. padrão)			Média (desv. padrão)		
	≤ 8 (n=24)	> 8,1 (n=18)	P	≤ 77 (n=22)	> 78 (n=20)	p
MMP1	866(3461,8)	19,7 (42,7)	0,407*	1016,8(3899)	90,4 (315,02)	0,553**
MMP2	1,30 (1,08)	1,24 (0,69)	0,640*	1,21 (0,77)	1,44 (1,089)	0,428*
MMP9	1,58(3,63)	10,7 (38,60)	0,297**	0,97 (1,432)	10,47(36,63)	0,782**
TIMP1	0,67 (0,63)	0,86 (1,06)	0,487*	0,62(0,50)	0,89 (1,089)	0,311*
TIMP2	1,61 (1,00)	1,77 (1,21)	0,643*	1,78 (1,080)	1,57 (1,11)	0,531*
RECK	1,19 (1,09)	4,17 (13,9)	0,703**	0,977 (0,822)	4,11(13,20)	0,392**
COL I	7,66(6,73)	4,56(3,83)	0,252**	5,23(5,28)	7,45(6,11)	0,289*
COL III	2,44(1,47)	2,14(1,54)	0,600*	2,054 (1,514)	2,696 (1,422)	0,272*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

Não houve diferença estatística nos níveis de expressão gênica de acordo com a resolução ou persistência de CNI após 6 meses de tratamento cirúrgico para OIV como demonstram os resultados na Tabela 11.

Tabela 11. Nível de expressão relativa dos seis genes em relação a Persistência de CNI após 6 meses de tratamento cirúrgico.

Genes	Persistência de CNI		
	Média (desv. padrão)		
	Sim (n=7)	Não (n=10)	p
MMP1	1,99 (1,78)	21,52 (42,09)	0,281*
MMP2	0,84 (0,39)	1,01 (0,55)	0,501*
MMP9	1,27 (2,00)	25,22 (61,67)	0,174**
TIMP1	0,51 (0,29)	1,34 (1,59)	0,351**
TIMP2	2,26 (1,21)	1,44 (1,16)	0,193*
RECK	1,18 (0,93)	9,26 (22,40)	0,758**
COL I	4,66 (5,04)	5,86 (5,01)	0,658*
COL III	2,95 (2,12)	2,46 (1,65)	0,653*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

Para análise subsequente da persistência da HD categorizamos os pacientes em dois grupos, aqueles que tinham expressão menor que a mediana, que chamamos de expressão diminuída, e maior que a mediana, que chamamos de expressão aumentada, e comparamos com a persistência da CNI. Deste modo, os pacientes que possuíam expressão aumentada de pelo menos duas MMPs, apresentaram resolução da CNI em 66,6% dos casos, contra 14,3% quando apenas uma MMP estava aumentada ($p=0,038$) (Tabela 12).

Tabela 12. Expressão categorizada das MMPs em relação a Persistência de CNI após 6 meses de tratamento cirúrgico.

Genes	Persistência de CNI		
	Média (desv. padrão)		
	Sim (n=7)	Não (n=9)	p
2 ou 3 MMPs com expressão maior que a mediana	33,3%	66,6%	0,038***
Demais casos	85,7%	14,3%	

***Chi-Quadrado

Na avaliação da fase de enchimento cistométrico, os pacientes que permaneceram com baixa complacência pós tratamento cirúrgico tiveram superexpressão do gene RECK ($p=0,074$), assim como uma tendência à maior expressão dos colágenos I e III, no entanto, sem resultados estatisticamente significantes (tabela 13).

Tabela 13. Nível de expressão relativa dos oito genes em relação a Complacência pré operatória.

Complacência			
Média (desv. padrão)			
Genes	<12 cmH2O/ml	≥12 cm H2O/ml	P
	(n=10)	(n=32)	
MMP1	24,17 (49,25)	661,85 (302,09)	0,614*
MMP2	1,39 (0,76)	1,30 (0,98)	0,782*
MMP9	18,23 (51,67)	1,52 (3,29)	0,760**
TIMP1	0,86 (1,32)	0,72 (0,64)	0,639*
TIMP2	1,84 (1,26)	1,63 (1,04)	0,590*
RECK	7,40 (18,52)	0,92 (0,86)	0,074**
COL I	6,64 (4,36)	6,34 (6,12)	0,770*
COL III	2,53 (1,24)	2,21 (1,59)	0,624*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

Discussão

5 Discussão

De acordo com o perfil de expressão dos genes avaliados em pacientes com obstrução infravesical, resumidamente encontramos superexpressão de MMP1, TIMP2 e dos colágenos I e III e subexpressão do inibidor tecidual TIMP1 em relação ao grupo controle. Os demais genes estudados envolvidos nos processos de degradação proteica e respectiva inibição estiveram em padrão heterogêneo, sem tendência a sub ou superexpressão bem definida. O conjunto de tais achados aponta para um desequilíbrio da matriz extracelular diante da obstrução infravesical por HPB. Tal perfil de superexpressão de MMP1 pode estar relacionado ao fato de haver necessidade de uma maior degradação dos colágenos I e III, que também foram superexpressos. Entretanto estes dados precisam de confirmação através da análise de expressão proteica e atividade tecidual das metaloproteinases e seus inibidores, para avaliação do colágeno resultante dos processos de deposição e degradação.

Peters et al, em 1997, demonstraram que um modelo de obstrução infravesical pré-natal em ovelhas resultou no desenvolvimento de fibrose vesical e acúmulo de colágeno e matriz extracelular. Tal fenômeno esteve correlacionado, no modelo, com diminuição da atividade das metaloproteinases MMP1 e MMP2 e aumento da atividade do inibidor tecidual de tais enzimas.

Backhaus et al, demonstraram em cultura de células de musculatura lisa vesical de humanos, que quando submetidas a pressão hidrostática de 20 cm.H₂O em pouco menos de 7 horas, as MMPs 1, 2 e 9 já tem uma atividade

diminuída (15%, 37% e 25% respectivamente), sendo estatisticamente significativo quando comparado à pressão atmosférica ($p < 0,01$). Assim como a TIMP1 aumenta em média 10% após exposição de 20 cm.H₂O, tendo significado estatístico quando submetido a pressão de 40 cm.H₂O em 3, 7 e 24 horas (+14%, +21% e + 50%, respectivamente). Observa-se neste trabalho uma alteração molecular e desorganização estrutural da matriz celular vesical, com consequente alteração de espessura da parede vesical e déficit de complacência, mesmo quando a cultura de células foi submetidos a pressões hidrostáticas baixas.

Até o momento, a expressão das MMPs e TIMPs não foram avaliadas em bexigas de pacientes com obstrução infravesical crônica. Os resultados do presente estudo representam uma primeira abordagem em tecidos humanos provenientes de tais pacientes. Deve-se notar que todos os pacientes incluídos no estudo possuíam diagnóstico de obstrução infravesical por HPB, motivo pelo qual são esperadas, teoricamente, alterações basais na expressão de metaloproteinases em relação ao grupo controle sem obstrução infravesical. Já em relação a alterações no colágeno, embora não existam trabalhos que avaliaram a expressão gênica dos colágenos I e III, Rubinstein et al (2007) demonstraram através da técnica de *Picrosirius red* comparando amostras de 10 pacientes com HPB obstrutivo e 10 cadáveres de idade jovem (entre 18 e 35 anos), que o colágeno está aumentado no músculo detrusor de pacientes com obstrução infravesical. No entanto este autor não investigou os mecanismos responsáveis por tal acúmulo.

Considerando a presença de HD, demonstramos que pacientes com hiperatividade apresentam uma expressão menor de MMP1 e 2, embora sem

significância estatística, enquanto o colágeno III foi mais expresso nesses pacientes ($p=0,049$), sugerindo que nesse grupo ocorre uma mudança no perfil de expressão gênica das MMPs devido aumento da deposição de colágeno. Tal alteração revela um estágio mais precoce de remodelação vesical em resposta à obstrução infravesical. Acreditamos que com a progressão do processo obstrutivo e aumento adicional do acúmulo de colágeno essas contrações involuntárias devam desaparecer dando lugar a alterações de hipocontratilidade vesical muitas vezes irreversível.

Em relação a persistência da CNI, mesmo não tendo encontrado significância estatística em nenhum dos genes analisados, notamos que todas as MMPs analisadas foram mais expressas nos pacientes que melhoraram após a cirurgia. Como elas tiveram uma expressão heterogênea categorizamos os pacientes em dois grupos, aqueles que tinham expressão menor que a mediana, que chamamos de expressão diminuída, e maior que a mediana, que chamamos de expressão aumentada, e comparamos com a persistência da CNI. Deste modo, os pacientes que possuíam expressão aumentada de pelo menos duas MMPs, apresentaram uma taxa de resolução da CNI significativamente maior comparado com os demais casos. Esse achado sugere o potencial efeito protetor das MMPs contra a deposição patológica do colágeno secundário a obstrução.

O fenômeno de deposição de colágeno se correlaciona primariamente com mudanças na complacência vesical, aqui nós não encontramos diferenças significativas do ponto de vista estatístico para nenhum dos genes analisados, entretanto algumas alterações nos chamaram a atenção. Demonstramos uma menor expressão de MMP1 e uma maior expressão de TIMP1 em pacientes

que possuíam complacência diminuída pré tratamento cirúrgico da HPB. Este foi acompanhado por uma maior expressão dos colágenos tipo I e III. Estudo recente (Yang et al, 2013) demonstrou que em um modelo de obstrução infravesical pós-natal em coelhos resultou em aumento da deposição de colágeno e diminuição da complacência, fenômenos correlacionados com diminuição da expressão proteica de MMP1 e aumento da expressão de TIMP1. Embora neste trabalho a metodologia proposta seja diferente, eles avaliaram a expressão proteica por western blot e nós expressão gênica através de PCR em tempo real, nossos resultados são semelhantes e se complementam reforçando a teoria de deposição de colágeno, a partir de mudanças na complacência vesical.

Como também demonstrou Deveaud et al. (1998) que analisaram fragmentos vesicais de 45 crianças submetidas a tratamento cirúrgico para bexigas com baixa complacência e fibróticas devido a uma série de causas (mielomeningocele, válvula de uretra posterior, refluxo vesico-ureteral) por imunohistoquímica. Uma grande infiltração de tecido conjuntivo foi evidenciada em feixes de músculo liso do detrusor. Os resultados mostraram um aumento no total de colágeno, e um aumento significativo no tipo I e colágeno III.

Considerando sensibilidade, período de CNI, amplitude, fluxo máximo, pressão detrusora máxima e escore de qualidade de vida (QOL) não encontramos diferenças significativas. Entretanto considerando o escore de sintomas prostáticos e a urgência miccional, encontramos uma maior expressão de MMP2 em pacientes menos sintomáticos e sem urgência miccional. Embora não existam dados da literatura para compararmos aos nossos, acreditamos que a maior expressão de MMP2 pode estar

correlacionada a uma menor deposição de colágeno e por isso menos sintomas. No entanto, observamos neste estudo que os níveis de expressão de colágeno I e III foram semelhantes entre os grupos com maior ou menor escore de sintomas. É importante enfatizar que a atividade proteolítica de MMP2 se faz de forma mais clara sobre o colágeno IV (**Petitclerc E et al, 2000**), que não foi foco deste estudo.

Algumas limitações do presente estudo valem ser ressaltadas: Não foi analisada a expressão das proteínas codificadas pelos genes. Avaliamos a expressão gênica dos marcadores, entretanto ressaltamos que embora avaliação proteica por western blot seja uma metodologia confiável e importante, a mesma possui falhas e não é um método quantitativo de expressão, enquanto a PCR em tempo real é um método quantitativo de expressão do RNAm, considerado padrão ouro para avaliação da expressão gênica.

Não foram analisados outros mecanismos potencialmente responsáveis pela descompensação vesical na HPB como as vias neuronais e angiogênicas. Ressaltamos que tais vias fazem parte de outra pesquisa do nosso grupo, onde encontramos que a média de expressão gênica do fator de crescimento neural no músculo detrusor foi significativamente maior nos pacientes que iniciaram CNI precocemente quando comparados àqueles que iniciaram as contrações na fase final de enchimento vesical. Em relação a resolução da HD, a média de expressão do fator de crescimento endotelial vascular foi cerca de três vezes maior entre os pacientes que evoluíram com melhora das CNIs (dados não publicados, tese de doutorado Marco Antônio Nunes).

Os casos selecionados de pacientes com HPB foram restritos a paciente que tinham critérios clínicos e urodinâmicos de tratamento cirúrgico. Pode-se continuar o presente estudo, ampliando os pacientes com HPB de quadro clínico mais ameno (90% da população com HPB), abrindo a possibilidade de um padrão de expressão gênica diferente dos pacientes descompensados.

Referente ao grupo controle, teve-se a preocupação de selecionar um grupo que não tivesse nenhuma interferência clínica, nem alterasse a expressão gênica na MEC detrusora. Por tanto foram escolhidos pacientes com adenocarcinoma de próstata, com características clínicas localizadas, sem queixas urinárias, com IPSS muito baixo e qualidade de vida excelente no aspecto miccional, sem nenhuma evidência de HPB clínico e com idade semelhante aos nosso grupo de casos.

Conclusão

6 Conclusão

- A obstrução infravesical está relacionado com uma superexpressão de MMP1, TIMP2, colágenos I e III, e com uma expressão baixa de MMP9, TIMP1 e RECK.
- De acordo com alterações urodinâmicas encontramos uma associação entre hiperatividade do detrusor e uma maior expressão de colágeno III.
- Assim como, maior expressão de MMP2 foi significativamente associada com IPSS mais baixo e ausência de urgência miccional.
- A expressão aumentada (maior que a mediana) de duas ou mais MMPs está relacionada com melhora da HD no período pós operatório.

Perspectivas

7 Perspectivas

1. Analisar as proteínas codificadas por estes genes nas biópsias de bexiga, e também na urina destes pacientes.
2. Ampliar os resultados para pacientes com HPB, que não apresentam evolução clínica e critérios urodinâmicos de indicação de tratamento cirúrgico.

Referências Bibliografias

8 Referências Bibliografias

1. Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In: Walsh PC edition. Campbell's urology, 8th ed. Philadelphia, Pennsylvania; 2002. pp 58-62.
2. Peters, C. A.: Lower urinary tract obstruction: clinical and experimental aspects. Br J Urol, suppl., 81: 22, 1998
3. Bauer, S. B.: The effects and challenges of bladder outlet obstruction. J Urol, 163: 3, 2000
4. Mirone, V, Imbimbo, C, correlation between detrusor collagen content and Urinary symptoms in patients with prostatic obstruction jurol vol. 172, 1386–1389, october 2004
5. Dahmani L, Bruyère F, Ouaki F, Pires C, Irani J, Doré B. Consequences of intravesical obstruction on detrusor muscle energy metabolism. Prog Urol. 2002 Sep;12(4):569-74.
6. Levin RM, Monson FC, Haugaard N, Buttyan R, Hudson A, Roelofs M, Sartore S, Wein AJ. Genetic and cellular characteristics of bladder outlet obstruction. Urol Clin North Am. 1995;22:263-83.
7. Sutherland RS, Baskin LS, Kogan BA, Cunha G. Neuroanatomical changes in the rat bladder after bladder outlet obstruction. Br J Urol. 1998;82(6):895-901.
8. Levin RM, Reed TP, Whitbeck C, Chichester P, Damaser M. Effect of strip length on the contractile dysfunction of bladder smooth muscle after partial outlet obstruction. Urology. 2005;66(3):659-64

9. Levin R, Chichester P, Levin S, Buttyan R. Role of angiogenesis in bladder response to partial outlet obstruction. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2004;215:37-47.

10. Mirone V, Imbimbo C, Longo N, Fusco F. The detrusor muscle: an innocent victim of bladder outlet obstruction. *Eur Urol.* 2007 Jan;51(1):57-66. Epub 2006 Aug 14.

26

11. Chancellor MB, Yoshimura N. physiology and pharmacology of the bladder and urethra. In: Walsh PC edition. *Campbell's urology*, 8th ed. Philadelphia, Pennsylvania; 2002. pp 839-40.

12. Yoshimura N, de Groat WC. Neural control of the lower urinary tract. *Int J Urol.* 1997; 4:111.

13. Fini, M. E., Cook, J. R., Mohan, R. and Brinkerhoft, C. E. In: *Matrix Metalloproteinases*. Edited by W. C. Parks and R. P. Mecham. San Diego: Academic Press, pp. 299–356, 1998

14. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1531-46.

15. Kaplan EP, Richier JC, Howard PS, Ewalt DH, Lin VK. Type III collagen messenger RNA is modulated in non-compliant human bladder tissue. *J Urol.* 1997;157(6):2366-9.

16. Hanai T, Matsumoto S, Ohnishi N, Kurita T. Partial outlet obstruction of the rat bladder induces a stimulatory response on proliferation of the bladder smooth muscle cells. *Int Urol Nephrol.* 2002;34(1):37-42.

17. Tekgul S, Yoshino K, Bagli D, Carr MC, Mitchell ME, Yao LY. Collagen types I and III localization by in situ hybridization and immunohistochemistry in the partially obstructed young rabbit bladder. *J Urol*. 1996;156:582-6.
18. Kim JC, Yoon JY, Seo SI, Hwang TK, Park YH. Effects of partial bladder outlet obstruction and its relief on types I and III collagen and detrusor contractility in the rat. *Neurourol Urodyn*. 2000;19(1):29-42.
19. Pupa SM, Ménard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol*. 2002 Sep;192(3):259-67. Review
20. Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation*. 2002 Dec;70(9-10):561-73.
21. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*. 1999 Nov;189(3):300-8.
22. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21491-4
23. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999;43 Suppl:S42-51
24. Jeong JW, Cha HJ, Yu DY, Seiki M, Kim KW. Induction of membrane-type matrix metalloproteinase-1 stimulates angiogenic activities of bovine aortic endothelial cells. *Angiogenesis*. 1999;3(2):167-74
25. Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, Bartlett JD. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem*. 2002 Dec 20;277(51)
26. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21491-4.

27. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):448-64.
28. Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers.* 2002;66(1):19-32
29. Lee D, Kim JS, Cho HK, Lee JH. The effects of glucose on the expression of MMP and TIMP in cultured retinal pigment epithelial cells. *Korean J Ophthalmol.* 2004 Dec;18(2):132- 40
30. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* 2001 Jun;69(6):851-9
31. Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Mar 7;1477(1-2):267-83
32. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 1999 May;13(8):781-92
33. Levin RM, O'Connor LJ, Leggett RE, Whitbeck C, Chichester P. Focal hypoxia of the obstructed rabbit bladder wall correlates with intermediate decompensation. *Neurourol Urodyn.* 2003;22(2):156-63.
34. Yu G, Bo S, Xiyu J, Enqing X. Effect of bladder outlet obstruction on detrusor smooth muscle cell: an in vitro study. *J Surg Res.* 2003 Oct;114(2):202-9.
35. Ghafar MA, Anastasiadis AG, Olsson LE, Chichester P, Kaplan SA, Buttyan R, Levin RM. Hypoxia and an angiogenic response in the partially obstructed rat bladder. *Lab Invest.* 2002;82(7):903-9.

36. Gosling JA, Dixon JS. Structure of trabeculated detrusor smooth muscle in cases of prostatic hypertrophy. *Urol Int*. 1980;35(5):351-5.
37. Deveaud CM, Macarak EJ, Kucich U, Ewalt DH, Abrams WR, Howard PS. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. *J Urol*. 1998;160(4):1518-27.
38. Yalla SV, Sullivan M P, Lecamwasam H S, DuBeau CE, Vickers MA. And Cravalho EG. Correlation of American Urological Association index with obstructive and nonobstructive prostatism. *J Urol* 1995; 153: 674.
39. Kuo HC. Pathophysiology of lower urinary tract symptoms in aged men without bladder outlet obstruction. *Urol Int* 2000; 64: 86.
40. Chang SL, Howard PS, Koo HP, Macarak EJ. Role of type III collagen in bladder filling. *Neurourol Urodyn*. 1998;17:135.
41. Peters CA, Vasavada S, Dator D, Carr M, Shapiro E, Lepor H. et al: The effect of obstruction on the developing bladder. *J Urol* 1992; 148: 491.
42. Backhaus, B. O., kaefer, M, Haberstroh, K M, Hile K, Nagatomi, J, Rink, RC, Cain, M P,† casale A and Bizios, R. Alterations in the molecular determinants of bladder Compliance at hydrostatic pressures less than 40 cm. H₂O. *Jurol*. 2002 dec ; 168, 2600–2604
43. Livak MJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-CT) method. *Methods*. 2001;25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.126
44. Peters CA, Freeman MR, Fernandez CA, Shepard J, Wiederschain DG, Moses MA. Dysregulated proteolytic balance as the basis of excess extracellular matrix in fibrotic disease. *Am J Physiol*. 1997 Jun;272(6 Pt 2):R1960-5.

45. Rubinstein M, Sampaio FJ, Costa WS. Stereological study of collagen and elastic system in the detrusor muscle of bladders from controls and patients with infravesical obstruction. *Int Braz J Urol.* 2007 Jan-Feb;33(1):33-9; discussion 39-41.

46. Yang L, Liu R, Wang X, He D. Imbalance between matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) contributes to bladder compliance changes in rabbits with partial bladder outlet obstruction (PBOO). *BJU Int.* 2013 Jan 10. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11740.x. [Epub ahead of print]

47. Nunes MA, Sakuma M, Brunhara JA, Reis ST, Viana NI, Leite KR, Srougi M, Antunes AA. The role of angiogenic and neurogenic markers on detrusor overactivity in patients with benign prostatic hyperplasia and bladder outlet obstruction. *The Journal of Urology* - April 2013 (Vol. 189, Issue 4, Supplement, Page 716, DOI: 10.1016/j.juro.2013.02.2914)

48. Deveaud CM, Macarak EJ, Kucich U, Ewalt DH, Abrams WR, Howard PS. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. *JUrol.* 1998 Oct;160(4):1518-27.

49. Petitclerc E. *et al.* New Functions for Non-collagenous Domains of Human Collagen Type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Biol Chem* 275, 8051–8061 (2000).

50. Schäfer W, Abrams P, Liao L, Mattiasson A, Pesce F, Spangberg A, Sterling AM, Zinner NR, van Kerrebroeck P; International Continence

Society. Good urodynamic practices: uroflowmetry, filling cystometry, and pressure-flow studies. *Neurourol Urodyn*. 2002;21(3):261-74

51. Gong, Chippada-venkata ud, Oh wk, Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers (basel)*. 2014 jun 27;6(3):1298-327.

52. Ozden f, Saygin c, Uzunaslan d, O, durak h, Aki h, Expression of mmp-1, mmp-9 and timp-2 in prostate carcinoma and their influence on prognosis and survival. *j cancer res clin oncol*. 2013 aug; 139(8):1373-82.

53. Schröder FH, Venderbos LD, van den Bergh RC, Hessels D, van Leenders GJ, van Leeuwen PJ, Wolters T, Barentsz JO, Roobol MJ. Prostate cancer antigen 3: diagnostic outcomes in men presenting with urinary prostate cancer antigen 3 scores ≥ 100 . *Urology*. 2014 Mar;83(3):613-6.

Apêndices

9. Apêndices

Publicações realizadas

Ainda não obtivemos nenhuma publicação referente a este trabalho, entretanto um resumo foi submetido e aprovado para apresentação na AUA 2014, principal congresso mundial de urologia (ANEXO).

Foi Apresentado como Pôster moderado na AUA 2014 no dia 17 de Maio de 2014.

The role of Matrix Metalloproteinases and their tissue inhibitors in the obstructed bladder secondary to Benign Prostatic Hyperplasia: analysis of expression of 8 genes

Authors: Yuri A Ferreira*, Joao A Barbosa, Marco A Nunes, Sabrina T Reis, Nayara I Viana, Katia R Leite, Miguel Srougi, Alberto A Antunes, Sao Paulo, Brazil

Abstract: MP19-18

Introduction and Objectives

Long-term Bladder outlet obstruction secondary to Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) can cause functional and morphological abnormalities in the bladder, such as increased collagen deposition and loss of compliance, leading to urinary storage and voiding symptoms. The mechanisms determining extracellular matrix deposition and the role of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors in this process are not fully elucidated. The objective of this study was to evaluate gene expression of collagen, MMPs and their inhibitors in patients with poor bladder compliance.

Methods

We performed a prospective and controlled analysis of 43 patients with BOO due to BPH who underwent TURP from 2011 to 2012. The control group was comprised of 4 bladder specimens from patients younger than 60 years who underwent radical prostatectomy with IPSS < 8 and prostate volume < 30 grams. All patients underwent urodynamic analysis pre and post operatively after 6 months. A biopsy of the bladder muscle was performed at the end of TURP for analysis of collagen, metalloproteinases and TIMPs gene expressions. For this purpose we used the quantitative real time polymerase chain reaction method (qRT-PCR).

Results

All subjects within the BPH group had BOO diagnosed on urodynamic preoperatively per Schaffer criteria. MMPs 2 and 9, TIMP-1 and type I collagen were down-regulated in subjects with long-term bladder outlet obstruction due to BPH. MMP-1 and TIMP-2 were significantly up-regulated in patients with such abnormalities. (Figure 1). Type III collagen was statistically more expressed among patients with non-inhibited bladder contractions (NIC) as compared to patients without ($p=0.04$), and MMP-2 was more expressed among patients with increased sensitivity ($p=0.06$).

Conclusions

Down-regulation of Matrix metalloproteinases and up-regulation of inhibitors may be involved with collagen deposition in the setup of bladder outlet obstruction. Up-regulation of MMP-1 and down-regulation of TIMP-1 found in this study could be due to different responses of humans and animals, and should be further studied. Type III collagen may be involved in the pathogenesis on NIC.

Date & Time: May 17, 2014 3:30 PM-5:30 PM

Session Title: Benign Prostatic Hyperplasia: Basic Research

IPSS

Sintomas urinários	Nenhuma	Menos de uma vez em cinco	Menos da metade do tempo	Cerca da metade do tempo	Mais da metade do tempo	Quase sempre	
1. Durante o último mês, com que frequência você teve a sensação de não esvaziamento completo da bexiga após terminar de urinar?	0	1	2	3	4	5	
2. Durante o último mês, com que frequência você teve que urinar novamente menos de 2 horas depois de terminar de urinar?	0	1	2	3	4	5	
3. Durante o último mês, com que frequência você percebeu que parou e começou novamente, várias vezes, enquanto urinava?	0	1	2	3	4	5	
4. Durante o último mês, com que frequência você achou difícil adiar a micção?	0	1	2	3	4	5	
5. Durante o último mês, com que frequência você teve fluxo urinário fraco?	0	1	2	3	4	5	
6. Durante o último mês, com que frequência você teve que fazer força ou contrair a barriga para começar a urinar?	0	1	2	3	4	5	
	Nenhuma	Uma vez	Duas vezes	Três vezes	Quatro vezes	Cinco ou mais vezes	
7. Durante o último mês, quantas vezes você teve de se levantar para urinar desde a hora em que se deitou até a hora em que se levantou de manhã?	0	1	2	3	4	5	
Total de sintomas urinários:							
Qualidade de vida por causa dos sintomas urinários	Excelente	Agradável	Satisfatória na maior parte do tempo	Mista	Insatisfatória na maior parte do tempo	Infeliz	Péssima
8. Se você tivesse que passar o resto da vida com suas condições urinárias exatamente do modo como estão agora, como se sentiria?	1	2	3	4	5		
Total de qualidade de vida:							
TOTAL:							

Índice IPSS	Gravidade dos sintomas	Descrição dos sintomas
0–7	Leves	Pouco incômodo, fluxo urinário razoável e baixo volume residual
8–19	Moderados	Incômodo, fluxo urinário reduzido e volume residual mais alto, mas sem evidências de complicações
≥20	Graves	Complicações de obstrução

Ética

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0863/11

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES E SEUS INIBIDORES TECIDUAIS NO MÚSCULO DETRUSOR DE PACIENTES COM HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

Pesquisador Responsável: Alberto Azoubel Antunes

Pesquisador Executante: Yuri Afonso Ferreira

Co-autores: Miguel Srougi, Katia Ramos Moreira Leite, Sabrina Thalita dos Reis

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: CIRURGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 18/07/2012, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 18 de Julho de 2012.

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq