Thiago Souto Hemerly

**Expressão gênica de fatores relacionados à hipóxia e
fibrose em pacientes submetidos à ampliação vesical
por disfunção neurogênica do trato urinário inferior**

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

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Cristiano
Mendes Gomes

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Hemerly, Thiago Souto

Expressão gênica de fatores relacionados à hipóxia
e fibrose em pacientes submetidos à ampliação vesical
por disfunção neurogênica do trato urinário inferior
/ Thiago Souto Hemerly. -- São Paulo, 2018.

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

Programa de Urologia.

Orientador: Cristiano Mendes Gomes.

Descritores: 1.Bexiga neurogênica 2.Matriz
extracelular 3.Hipóxia 4.Músculo liso 5.Urodinâmica

USP/FM/DBD-114/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

DEDICATÓRIA

À minha esposa Paula que me fez acreditar que tudo é possível quando acreditamos no que realmente queremos. A grande responsável pelas nossas maiores conquistas e minha parceira inseparável. Te amo hoje e sempre e muito obrigado por estar sempre ao meu lado.

Às minhas filhas, Marina e Letícia, maiores alegrias e orgulhos de nossas vidas e para quem eu farei tudo para ensinar e educar da melhor maneira possível.

Aos meus pais, Milton e Virgínia, por terem me ensinado desde cedo a importância e o gosto por estudar sempre. Sou grato sempre por tudo que me ensinaram.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr Cristiano Mendes Gomes**, meu orientador, por ter me aceitado como aluno e ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto. Agradeço pela confiança e ensinamentos e meu eterno respeito pelo seu comprometimento com a vida acadêmica e inestimável competência.

Ao **Prof. Dr Miguel Srougi**, digníssimo Professor Titular da Divisão de Urologia da FMUSP, por ter me aceitado como aluno da pós-graduação e em seu serviço.

Ao **Prof. Dr Homero Bruschini**, chefe do grupo de Disfunção Miccional da Divisão de Urologia da FMUSP, por suas considerações e suporte acadêmico.

À **Profa. Dra Katia Ramos Moreira Leite**, chefe do LIM 55, por toda sua contribuição científica ao desenvolvimento desse projeto e belíssimo trabalho realizado em todos esses anos de pesquisa.

À **Profa. Dra Sabrina Thalita dos Reis**, pela inestimável ajuda em toda a elaboração e realização do nosso projeto.

Ao **Dr José de Bessa Jr.**, pela amizade e auxílio com idéias e análises estatísticas.

Ao **Dr Carlos Henrique Suzuki Bellucci**, amigo desde os tempos de residência e meu maior exemplo de excelência em pesquisa.

Aos amigos do LIM 55, em especial às **Dra. Nayara Viana e Vanessa Schreiter**, pela paciência, tempo, apoio e amizade em todo esse período.

Aos amigos e mestres do grupo de Urologia do **Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo**, minha primeira casa em São Paulo e responsáveis por minha formação como Urologista, meu eterno agradecimento. Em especial aos meus grandes exemplos de liderança e de urologistas, **Dr Demerval Mattos Junior, Dr Limírio Leal da Fonseca Filho e Dr. Luís Augusto Seabra Rios**, nunca poderei expressar o quanto me ajudaram durante toda a produção desse projeto.

Um agradecimento especial aos meus avós, **Lucia e Augusto** por todo o carinho recebido, à minha irmã **Monique** por toda a amizade e aos meus

sogros **Angélica e José Carlos** por terem me recebido em sua família de braços abertos.

RESUMO

Hemerly TS. *Expressão gênica de fatores relacionados à hipóxia e fibrose em pacientes submetidos à ampliação vesical por disfunção neurogênica do trato urinário inferior* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: A disfunção neurogênica do trato urinário inferior (DNTUI) é comum, tendo como causa diversas doenças neurológicas e se apresentando de maneira diversa e heterogênea. O tratamento da DNTUI pode incluir medicamentos, utilização de toxina botulínica intravesical e tratamento cirúrgico. A cirurgia de ampliação vesical é uma alternativa consagrada, usada principalmente no caso de bexigas fibrosadas ou em pacientes refratários ao tratamento conservador ou minimamente invasivo. Os mecanismos que levam à progressão da fibrose vesical e à refratariedade aos tratamentos conservadores nessa população de pacientes não são bem conhecidos.

Objetivos: Avaliar a expressão gênica dos fatores relacionados à hipóxia e fibrose nos pacientes com DNTUI e correlacionar o padrão de expressão gênica com as características urodinâmicas dos pacientes estudados. *Métodos:*

Foram avaliados prospectivamente 17 pacientes com DNTUI que foram submetidos à cirurgia de ampliação vesical pelo Departamento de Urologia do HCFMUSP. Os pacientes foram avaliados de acordo com os sintomas clínicos, exames laboratoriais e avaliação urodinâmica completa. Durante a cirurgia foi obtido um fragmento vesical interessando todas as camadas da bexiga para análise de expressão gênica com utilização de qRT-PCR de MMP-1, TIMP-1, HIF1 α , HIF2 α , HIF3 α , iNOS, eNOS, VEGF e CTGF. Amostras vesicais de 9 doadores cadavéricos foram utilizados como controles. *Resultados:* A média dos pacientes estudados foi de 37,5 anos, com complacência vesical variando entre 3,8 e 50 ml/cmH₂O, com média de 11,16ml/cmH₂O. Os pacientes apresentaram superexpressão estatisticamente significativa de TIMP-1 e HIF3 α e subexpressão estatisticamente significativa de MMP-1. A expressão gênica de HIF1 α e HIF2 α também apresentou uma tendência à superexpressão,

apesar de não ser estatisticamente significativa ($p = 0,14$ e $p = 0,11$). Os outros genes avaliados foram expressos de forma heterogênea. *Conclusão:* Em pacientes com DNTUI associados a fibrose vesical e/ou refratariedade ao tratamento conservador, que foram submetidos à cirurgia de ampliação vesical, os fatores relacionados ao aumento da deposição da matriz extracelular e à hipóxia parecem ser relevantes na progressão da disfunção vesical. Esses achados são compatíveis com estudos em modelos animais de obstrução infravesical e hipóxia e reforçam a necessidade de estudos complementares para o melhor entendimento da fisiopatologia da progressão da disfunção vesical na DNTUI.

Descritores: bexiga neurogênica; matriz extracelular; hipóxia; músculo liso; urodinâmica

ABSTRACT

Hemerly TS. *Expression of hypoxia and fibrosis related genes in patients with neurogenic lower urinary tract dysfunction undergoing bladder augmentation surgery* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018

Introduction: The neurogenic lower urinary tract dysfunction (NLUTD) is a common complication of a variety of neurological diseases and can present itself in a diverse and heterogeneous way. NLUTD can be treated with anticholinergic or $\beta 3$ agonists drugs, intravesical botulinum toxin and/or surgical treatment. The bladder augmentation surgery is a classic alternative, used mainly in cases of fibrotic bladders or in patients with refractory symptoms with conservative treatment. The mechanisms that lead to the progression of bladder fibrosis and to conservative treatments failure are not well known. *Objectives:* To evaluate the expression of fibrosis and hypoxia related genes in patients with NLUTD and correlate the pattern of gene expression with urodynamic data of the population studied. *Methods:* We analyzed bladder specimens of 17 patients with NLUTD undergoing bladder augmentation surgery due to bladder fibrosis or conservative treatment failure. Urodynamic tests were performed in all patients. A bladder fragment was obtained during surgery for relative gene expression with quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) of MMP-1, TIMP-1, HIF1 α , HIF2 α , HIF3 α , iNOS, eNOS, VEGF e CTGF. 9 cadaveric organ donors composed the control group. *Results:* The mean age of the patients was 37.5 years. Bladder compliance ranged from 3,8 to 50 ml/cmH₂₀, with a mean of 11,16 ml/cmH₂₀. Patients undergoing bladder augmentation surgery presented a statistically significant overexpression of TIMP-1 and HIF3 α . MMP-1 was statistically significant underexpressed. The gene expression of HIF1 α and HIF2 α also showed a tendency to overexpression, although it was not statistically significant ($p = 0,14$ and $p = 0,11$). The other genes were expressed heterogeneously. *Discussion:* In patients with NLUTD associated with bladder fibrosis and/or failure to conservative

treatment, the gene expression of factors related to increased extracellular matrix deposition and hypoxia appears to be relevant in the progression of bladder dysfunction. These findings are comparable with studies in animal models of bladder outlet obstruction and hypoxia and reinforces the need for complementary studies to better understand the pathophysiology of the progression of bladder dysfunction in the NLTUD.

Descriptors: neurogenic urinary bladder; extracellular matrix; hypoxia; smooth muscle; urodynamics

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e 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. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos, de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Michaelis. Guia prático da nova ortografia: saiba o que mudou da ortografia brasileira. Elaborado por Douglas Tufano. São Paulo: Melhoramentos; 2008.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SNC	Sistema Nervoso Central
TUI	Trato Urinário Inferior
DNTUI	Disfunção Neurogênica do Trato Urinário Inferior
ITU	Infecções do Trato Urinário
IRA	Insuficiência Renal Aguda
OIV	Obstrução infravesical
TUS	Trato Urinário Superior
DVS	Dissinergismo Vesicoesfincteriano
HPB	Hiperplasia Prostatica Benigna
HIF	Fator Induzível por Hipóxia
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
17-DMAG	17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina
NOS	Óxido Nítrico Sintase
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
CTGF	Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo
MEC	Matrix Extracelular
MMP	Metaloproteinases da Matriz
TIMP	Inibidores Teciduais de Metaloproteinase
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

ICIQ-SF	International Consultation on Incontinence Questionnaire – Short Form
ICS	International Continence Society
RNA	Ácido Ribonucléico
LIM	Laboratório de Investigação Médica
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
B2M	beta-2-microglobulina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	24
3 METODOS	26
4 RESULTADOS	34
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÕES	45
7 REFERENCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

O ciclo da micção é composto por duas fases distintas: a fase de armazenamento e fase de esvaziamento. Durante a primeira fase, a musculatura lisa vesical deve estar relaxada, sendo capaz de acomodar o volume urinário sob baixas pressões enquanto a atividade muscular do esfíncter uretral aumenta progressivamente. Na fase de esvaziamento vesical há uma inversão das atividades, com o relaxamento do esfíncter uretral seguido de contração da musculatura detrusora, que leva ao início do fluxo urinário e esvaziamento da bexiga (1-3).

A coordenação destas atividades é estabelecida por uma complexa interação entre o sistema nervoso central (SNC), que controla todas as fases do ciclo miccional através de centros localizados na medula espinhal, ponte e centros suprapontinos (córtex cerebral, cerebelo, gânglios da base, tálamo e hipotálamo) e de uma extensa rede de nervos periféricos eferentes, incluindo nervos simpáticos, parassimpáticos e somáticos, além de vias aferentes da bexiga, uretra e esfíncteres uretrais. A perda do controle adequado destes eventos pode acarretar disfunções miccionais variadas (4).

1.1 Inervação do trato urinário inferior

O controle neurológico sobre o trato urinário inferior (TUI) requer uma complexa rede de interações entre as vias eferentes do sistema nervoso autônomo e somático.

Os nervos simpáticos se originam no segmento medular tóraco-lombar, de T10 a L2, direcionando-se aos órgãos pélvicos através do plexo hipogástrico superior (pré-aórtico) por meio da cadeia simpática.

A inervação parassimpática origina-se no segmento medular sacral, de S2 a S4, sendo conduzida aos órgãos pélvicos pelo nervo pélvico até os gânglios do plexo pélvico.

A inervação somática que inerva a musculatura estriada do esfíncter uretral se origina no núcleo de Onuf, em neurônios motores da medula sacral, de S2 a S4, chegando ao esfíncter uretral através dos nervos pudendos (2).

As informações aferentes provenientes da bexiga são transmitidas ao sistema nervoso central através dos nervos dos plexos pélvico e hipogástrico,

enquanto as fibras aferentes do colo vesical e uretra são transmitidas através dos nervos pudendos e hipogástricos (5).

1.2 Disfunção neurogênica do trato urinário inferior

O controle neurológico sobre o TUI é essencial para seu funcionamento. Dessa forma, patologias que afetam o sistema nervoso podem alterar o controle miccional e colocar em risco a integridade dos seus órgãos, tornando o TUI diferente de outras estruturas viscerais, que são capazes de manter um certo nível de função mesmo após a interrupção de seus circuitos neuronais(6).

O termo disfunção neurogênica do trato urinário inferior (DNTUI) engloba todas as disfunções do TUI decorrentes de sequelas causadas por doenças neurológicas. Entre elas, as principais são: traumatismos raquimedulares, doenças cerebrovasculares, alterações de fechamento do tubo neural, doenças desmielinizantes, doenças do neurônio motor inferior e doenças inflamatórias (7-9).

Os pacientes que sofrem dessa condição estão sujeitos a graves problemas, como infecções urinárias (ITU) de repetição e deterioração do trato urinário superior (TUS) por aumento da pressão intravesical, além outros sintomas ocasionando diminuição da qualidade de vida: incontinência urinária, diminuição da capacidade vesical, retenção urinária entre outros sintomas(10).

Apesar de ser uma condição de alta prevalência e de grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, a incidência e prevalência de DNTUI é desconhecida no Brasil, tanto por falta de notificação quanto por falta de treinamento adequado para o reconhecimento dessa condição.

Um estudo norte-americano utilizando o banco de dados Medicare, identificou 46.271 pacientes com DNTUI no ano de 2007, com aproximadamente 70% dos pacientes apresentando ao menos uma complicação relacionada a esse diagnóstico, como: ITU de repetição, sepse, retenção urinária, uropatia obstrutiva, insuficiência renal aguda (IRA), hematúria e constipação intestinal (10). O custo anual estimado desses pacientes no ano 2000 foi de 12.02 bilhões de dólares apenas nos Estados Unidos(11).

1.3 Fisiopatologia da disfunção neurogênica do trato urinário inferior

O padrão da disfunção do TUI ocasionado pelas lesões neurológicas depende principalmente do local do sistema nervoso acometido (Fig. 1), além do tempo de duração da doença e da extensão da lesão (12).

Pacientes com lesões suprapontinas, como doenças cerebrovasculares, traumatismos cranioencefálicos e doença de Parkinson, apresentam predominantemente hiperatividade detrusora pela perda do efeito inibitório do centro pontino da micção no reflexo miccional. Geralmente esses pacientes apresentam apenas sintomas de armazenamento (urgência miccional, aumento da frequência urinária e urge-incontinência), com baixo risco de comprometimento funcional ao TUS(13).

Nas lesões espinhais suprasacrais, causadas principalmente por lesões medulares traumáticas cervicais e torácicas, doenças desmielinizantes e mielomeningoceles, o padrão vésico-esfincteriano mais observado é o de hiperatividade detrusora com dissinergismo vésico-esfincteriano (DVS) (14). As altas pressões detrusoras que podem acometer estes pacientes constituem fator de risco importante para a deterioração vesical e lesões ao TUS. A longo prazo, muitos pacientes com essas características acabam evoluindo com fibrose vesical e perda de complacência vesical (15, 16).

Em lesões sacrais e infra-sacrais, como nas causadas em pacientes com síndrome da cauda equina, cirurgias pélvicas radicais e neuropatias periféricas, os sintomas são predominantemente de esvaziamento, causados pela acontratilidade/hipocontratilidade detrusora e eventualmente por incompetência esfinteriana (8).

As alterações vesicais secundárias à obstrução de origem neurogênica foram pouco estudadas até o momento. A maioria dos estudos celulares e moleculares sobre OIV baseia-se em modelos animais de obstrução infravesical por ligadura parcial da uretra. Sabe-se que, em bexigas contraídas de pacientes com obstrução infravesical ocorre aumento da deposição de matriz extracelular, com aumento da proporção de colágeno, alteração também observada em pacientes com fibrose vesical por DNTUI (17). Entretanto, o

papel da hipóxia no seu desenvolvimento e as alterações celulares e moleculares que levam à progressão da disfunção vesical ainda não foram estudados nas disfunções neurogênicas do TUI.

Fig. 1: Padrões de disfunção do TUI de acordo com o local da lesão neurológica. Adaptado de Panicker et al., 2015(7).

1.4 Os efeitos da hipóxia na disfunção vesical

O fluxo sanguíneo adequado à bexiga é essencial para que o órgão possa obter oxigênio e funcionar corretamente. Diversos estudos demonstraram que em modelos animais de OIV, o aumento da pressão detrusora durante a fase de esvaziamento vesical resulta em aumento da tensão intramural com compressão dos vasos sanguíneos e redução do fluxo sanguíneo, levando a uma hipóxia tecidual (18-21).

Outros autores estudaram os efeitos da isquemia crônica em bexigas de modelos animais, demonstrando que a isquemia vesical resulta em perda da contratilidade detrusora, diminuição da complacência vesical, lesões mitocondriais, fibrose e danos permanentes à microvasculatura e inervação vesical (22-25).

Inicialmente a bexiga responde à hipóxia através da hipertrofia da musculatura detrusora, com consequente aumento da pressão intravesical para manter o fluxo urinário adequado. Entretanto, isso causa uma redução ainda maior do fluxo sanguíneo vesical, podendo levar à descompensação vesical, com hipocontratilidade detrusora, fibrose vesical e perda de complacência (26).

A maioria dos modelos animais de OIV é causada de forma aguda, com a obstrução sendo causada de maneira artificial. Em humanos, a progressão da OIV geralmente é lento, tornando o estudo dos efeitos crônicos da OIV na bexiga humana mais difíceis de serem estudados. Estudos realizados in vitro com células de bexiga humana também mostraram que a hipóxia possui efeitos deletérios, inibindo a proliferação de células musculares lisas (27).

Em pacientes com DNTUI, mecanismo semelhante pode acontecer para ocasionar um estado de hipóxia na bexiga, principalmente nos pacientes com lesões espinhais supra sacrais e DVE, como descrito anteriormente.

Apesar disso, tanto pela dificuldade em conseguir um modelo animal semelhante ao humano, quanto pela própria dificuldade em se obter o material necessário para realização de pesquisas, o papel da hipóxia na disfunção vesical neurogênica praticamente não foi estudado até o momento.

1.5 Fator induzível por hipóxia (HIF)

Os HIF's são fatores de transcrição induzíveis por hipóxia, responsáveis por muitos dos processos envolvidos na homeostase e regulam a transcrição de diversos genes alvo relacionados nesses processos (28).

A família do HIF se caracteriza por uma estrutura heterodimérica e consiste em três fatores conhecidos: HIF1, HIF2 e HIF 3. Cada um destes possui uma subunidade β , estável e distribuída de forma uniforme e uma subunidade α , sensível ao oxigênio e induzível pela hipóxia. Durante os

períodos de hipóxia a subunidade α é estabilizada via inibição de prolil-hidroxilase e se dimeriza com a subunidade β . O dímero α - β é o fator de transcrição que leva a produção de genes alvo, em especial na ativação de fatores de angiogênese, síntese de óxido nítrico e de fatores de crescimento (29).

Em estudo realizado in vitro com células de bexiga humana, os níveis de HIF1 α , HIF2 α e HIF3 α se elevaram de forma significativa após serem expostos à níveis reduzidos de oxigênio, com o HIF1 se elevando rapidamente após a exposição à hipóxia, seguidos do HIF2 e HIF3 respectivamente(30).

Koritsiadis et al. mostraram que a presença de HIF1 α no tecido vesical de pacientes submetidos a ressecção endoscópica de próstata por hiperplasia prostática benigna (HPB) encontrava-se significativamente aumentada nos pacientes com menos de dez anos de duração da doença e naqueles que apresentavam retenção urinária, enquanto nos pacientes com mais de dez anos de duração da doença os níveis de HIF1 α encontravam-se inalterados (31).

A inibição da via do HIF parece melhorar a contratilidade detrusora e diminuir os efeitos deletérios da disfunção vesical crônica. Em modelos de ratos com OIV induzida por cirurgia (ligadura parcial da uretra), a utilização do 17-DMAG (17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina) diminuiu significativamente a progressão da obstrução infravesical quando comparada ao grupo controle (32).

Pelos mesmo motivos descritos anteriormente, ainda não existe nenhum trabalho publicado até a presente data estudando o papel dos HIFs na progressão da disfunção vesical em pacientes com DNTUI.

1.6 Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)

O VEGF é um fator de crescimento endotelial que encontra-se intimamente relacionado aos HIFs. A hipóxia é o principal estímulo para aumentar a expressão de VEGF tecidual, responsável por estimular a proliferação endotelial e angiogênese(33).

Estudos prévios em modelos animais mostraram que na presença de hipóxia controlada (cultura celular com O₂ a 1%), ocorre um aumento da expressão de VEGF, mostrando um papel potencial na fisiopatologia da disfunção vesical, enquanto outros trabalhos mostraram que o VEGF é um fator importante no desenvolvimento embrionário normal da bexiga(34).

Youssif et al. analisaram o efeito do VEGF em matrizes acelulares de bexigas de ratos, observando que o tratamento tecidual com injeções de solução de VEGF resultou no aumento da angiogênese, neurogênese e regeneração muscular, além de estimular a diferenciação de células musculares lisas(34, 35).

São necessários estudos adicionais para o melhor entendimento da função do VEGF e suas implicações na fisiopatologia do DTNUI.

1.7 Óxido nítrico sintase (NOS)

O óxido nítrico (NO) é produzido pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS), através da transformação de L-arginina em L-citrulina. Existem duas categorias de NOS: isoformas constitutivas, cálcio-dependentes, encontradas no tecido neuronal (NOS neuronal ou nNOS) e em células endoteliais (NOS endotelial ou eNOS) e as isoformas cálcio independentes, encontradas nos tecidos mesenquimatosos ou parênquimais (NOS induzível ou iNOS)(36).

Na fisiologia vesical, o NO participa na regulação do tônus arteriolar e no relaxamento da musculatura lisa. Em pacientes com OIV o NO diminui a hipóxia tecidual e parece aumentar o relaxamento do colo vesical. Em modelos animais, foi demonstrado o aumento da expressão de nNOS associado ao aumento do relaxamento da musculatura lisa uretral e o aumento da produção de NO decorrente das eNOS (37).

Felsen et al. avaliaram 24 ratos Sprague-Dawley submetidos à ligadura parcial da uretra e mostraram que nos ratos com deleção do gene para produção de iNOS e nos ratos tratados com um inibidor específico do iNOS, as alterações vesicais induzidas pela obstrução, como fibrose vesical e redução da capacidade cistométrica, foram menores do que quando comparadas ao

grupo controle. Esse achado sugere que o NO liberado pela iNOS durante a resposta à OIV possui um papel prejudicial à bexiga (38, 39).

1.8 Fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF)

O CTGF é uma citocina fibrogênica rica em cisteína que é expressa no endotélio, fibroblastos, condrócitos e células musculares lisas, promovendo a proliferação endotelial e fibroblástica. Essas citocinas foram comprovadamente envolvidas no processo fibrótico de diversos órgãos, como: fígado, pulmão, rim e coração (40).

Metcalf et al. avaliaram a expressão gênica de 27 ratos submetidos a ligação parcial da uretral e mostraram que os níveis de CTGF aumentam na resposta inicial da bexiga à distensão causada na OIV, resultando em fibrose vesical, com aumento da deposição de colágeno e matriz extracelular (41).

O HIF1 α possui papel importante na regulação da produção de CTGF através de estimulação direta. Além disso, outro estudo demonstrou uma correlação direta entre HIF1 α e CTGF, mostrando que ratos deficientes na produção de HIF1 α não foram capazes de produzir CTGF durante a hipóxia tecidual (42).

1.9 Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é o componente mais abundante do tecido conjuntivo e o aumento da deposição de MEC nas camadas do detrusor é o principal responsável pela diminuição da complacência vesical (43, 44).

A deposição de MEC depende da regulação entre as atividades das enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores, chamados de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)(45).

Na bexiga a MMP-1 é a principal responsável pela degradação dos principais tipos de colágenos presentes na bexiga, em especial, os colágenos

tipo I e tipo III, enquanto a TIMP-1 se liga à MMP-1 inibindo sua atividade proteolítica. A alteração no balanço entre MMP-1 e TIMP-1 é responsável pelo aumento da deposição de MEC, levando à diminuição da complacência vesical após modelos animais de OIV (46). Lin et al. confirmaram esses dados após indução de OIV com ligadura parcial de uretra em 40 coelhos, observando que nos coelhos que apresentavam diminuição dos níveis de MMP-1 e aumento dos níveis de TIMP-1, havia redução da complacência vesical, com aumento importante no volume relativo de colágeno infiltrado na musculatura detrusora (43)

1.10 Justificativa

As adaptações iniciais da bexiga à hipóxia resultante da OIV parecem estar intimamente ligadas à patogênese da disfunção vesical. Na população de pacientes com DTNUI com fibrose vesical ou hiperatividade severa, o mecanismo inicial parece ser similar, mas ainda não foi estudado. Com o melhor entendimento da fisiopatologia e do papel dos HIFs, VEGFs, MMPs, TIMPs, NOS e CTGF, pode ser possível intervir na descompensação vesical dos pacientes com DNTUI antes que esta se torne irreversível e desenvolver novas drogas alvo para tratamento desse grave problema.

2 OBJETIVOS

- Estudar a expressão gênica dos fatores relacionados à hipóxia nos pacientes com disfunção vesical de origem neurogênica.
- Estudar a expressão gênica dos fatores relacionados à fibrose vesical nos pacientes com disfunção vesical de origem neurogênica.
- Correlacionar o padrão de expressão gênica com as características urodinâmicas dos pacientes estudados.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

O estudo consistiu na análise de espécimes cirúrgicos de 17 pacientes com disfunção vesical de origem neurogênica com indicação de cirurgia de ampliação vesical. Foram considerados fatores de exclusão: a) radioterapia pélvica; b) cirurgia prévia da próstata; c) câncer de bexiga; d) câncer de próstata.

Como controle, utilizamos nove espécimes obtidos de doadores cadavéricos, sem co-morbidades associadas conhecidas.

As cirurgias de ampliação vesical foram realizadas pelos médicos do grupo de disfunções miccionais do Departamento de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), entre os anos 2014 e 2017, enquanto as cirurgias de captação dos doadores de órgãos, foram realizados pelo grupo de captação de órgãos, também no HCFMUSP, entre os anos 2015 e 2017.

3.2 Ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP sob número 0627/11 (Apêndice 1) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob número 16924 (Apêndice 2).

Todos os pacientes que participaram do estudo ou seus representantes legais, autorizaram a retirada do fragmento de bexiga e o uso do material para pesquisa científica, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 3).

3.3 Avaliação pré-operatória

Os paciente foram submetidos à avaliação clínica no ambulatório de disfunções miccionais do HCFMUSP com avaliação dos seguintes parâmetros: exame físico, tipo de doença neurológica, tempo de duração da doença, nível neurológico da lesão, tipo de manejo vesical (cateterismo limpo intermitente, sonda uretral ou cistostomia), presença de perdas urinárias, tipo e quantidade de forros utilizados por dia, cirurgias prévias, co-morbidades, medicamentos de uso contínuo, presença de infecções urinárias de repetição, questionário ICIQ-SF (Anexo 1), hemoglobina, uréia, creatinina, ultrassonografia de aparelho urinário e avaliação urodinâmica completa.

Durante a avaliação urodinâmica os pacientes realizaram a fluxometria livre, a cistometria e o estudo miccional, de acordo com as recomendações da International Continence Society (ICS)(47). A cistometria de enchimento foi realizada após a passagem de dois cateteres pela uretra. Um cateter de 6Fr de diâmetro foi utilizado para o enchimento vesical por meio da infusão de solução de cloreto de sódio a 0,9% à temperatura ambiente. O outro cateter, de 4Fr, foi conectado ao transdutor de pressão para registro da pressão intravesical. Um cateter de 8Fr com balão foi introduzido por via transretal e acoplado ao transdutor para registro da pressão abdominal. Todas as definições utilizadas nas avaliações foram baseadas na padronização mais atual da ICS(48).

3.4 Procedimento cirúrgico e obtenção da biópsia vesical

Os pacientes foram submetidos à ampliação vesical utilizando a técnica padrão de enterocistoplastia. As cirurgias foram realizadas no período de fevereiro de 2014 a novembro de 2017. De cada paciente foi retirado um fragmento de bexiga de 2,0 x 0,5cm, interessando todas as camadas da bexiga, imediatamente antes de se iniciar o fechamento vesical.

Imediatamente após sua ressecção, os espécimes cirúrgicos foram preparados pelo pesquisador executante deste trabalho, com armazenamento de fragmento vesical de 1cm² em criotubo *Eppendorf* de 1,5mL com 1 mL de

RNA later® (fixador de RNA) e mantidos em freezer a -20°C no Laboratório de Investigação Médica Urológica (LIM55) da FMUSP.

3.5 Extração do RNA

O RNA das amostras foi extraído com a utilização do kit mirVana® (Ambion, Austin, TX, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Ao tecido cortado foi adicionado 10 vezes o seu volume de solução de lise e igual volume de etanol 64%. A solução foi colocada em uma coluna GFX e centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto. À coluna adicionamos 700µl da primeira solução de lavagem do kit, com nova centrifugação nas mesmas condições. Após essa etapa, submetemos a solução a duas lavagens com 500µl da segunda solução de lavagem do kit. Descartamos o filtrado, centrifugamos por mais 1 minuto a 10.000 rpm para secagem da coluna, repassamos a coluna para um novo tubo e adicionamos 50µL de solução de eluição pré-aquecida no centro da coluna. Após 1 minuto à temperatura ambiente, centrifugamos a coluna e armazenamos o RNA a -80°C até sua utilização.

A pureza e concentração do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Wilimington, EUA) (260/280 nM) e a integridade foi verificada em Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA).

3.6 Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 5µg de RNA com a utilização do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando a transcriptase reversa MultiScribe™ e primers randômicos.

O RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20µL. A este volume foram acrescentados 4µL de oligonucleotídeos randômicos (10x), 1,6µL do mix de dNTPs (25x), 4µL do tampão da enzima

(10x), 2µl (50U/µL) da enzima transcriptase reversa e 8,4 µL de água nuclease free. A solução foi então submetida a ciclos de temperatura (25°C por 10min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min) em um termociclador Veridi (Applied Biosystems). Ao final da reação o cDNA foi armazenado a -20°C até o uso.

3.7 Análise da expressão dos genes alvo

A expressão dos genes estudados foi realizada a partir do cDNA utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) usando o sistema ABI 7500 Fast no modo *standard*, com utilização de Master Mix PCR Taqman Universal (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). 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 fluóforo que emite luz quando excitado e por um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluóforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela *Taq* polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Essa 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 a quebra da sonda permite a quantificação indireta do RNA alvo contido na reação após cada ciclo da PCR (Figura 2).

Os *primers* utilizados para amplificação dos genes alvo foram adquiridos da Applied Biosystems (California, EUA) (tabela 1), que desenha *primers* com as características necessárias para os experimentos de PCR em tempo real (RT-PCR). Como controle endógeno dos genes utilizamos o gene β 2-microglobulina (B2M).

Para amplificação dos fragmentos desejados, utilizamos as seguintes condições de reação: 5,0 µl do Master Mix Taqman, 0,5 µl de *primer* (contendo a sonda marcada), 3,5µl de água destilada deionizada e 1,0µl de cDNA, somando um total de 10µl para cada reação. A condição usual de programação dos ciclos foi um passo a 50°C por dois minutos e um passo a 94°C por 10

minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 60 segundos. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Os resultados dos genes que tiveram resultados inconsistentes foram descartados.

Os níveis de expressão dos genes foram obtidos através da quantificação relativa dos níveis de expressão determinados pelo método $\Delta\Delta C_T$, que utiliza a seguinte fórmula: $\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ do gene alvo, amostra de BN} - C_T \text{ do controle endógeno, amostra de BN}) - (C_T \text{ do gene alvo, amostra de doador cadáver} - C_T \text{ do controle endógeno, amostra de doador cadáver})$. O número de vezes que ocorre a mudança de expressão gênica é calculado como $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (49). No gráfico logarítmico, esse método padroniza a expressão do controle normal como uma linha basal (representada pelo número 1), e a expressão relativa de cada gene é demonstrada pelo múltiplo do normal para mais, nos casos de superexpressão, ou para menos nos casos de subexpressão. Todas as reações foram feitas em duplicata.

O perfil de expressão dos genes foi estabelecido apenas quando mais de 60% dos casos exibiam o mesmo padrão de expressão. Se determinado gene apresentasse 60% ou menos de casos com o mesmo perfil, seu padrão de expressão era considerado como sendo variável.

Figura 2. Amplificação dos genes pelo método TaqMan[®]

Tabela 1 – *Primers* utilizados para quantificação da expressão dos genes

Gene	Ensaio
HIF1 α	Hs00153153_m1
HIF2 α	Hs01026149_m1
HIF3 α	Hs00541709_m1
iNOS	Hs01075529_m1
eNOS	Hs01574665_m1
nNOS	Hs00167223_m1
CTGF	Hs00170014_m1
VEGF α	Hs00900055_m1
MMP-1	Hs00899658_m1
TIMP-1	Hs01092512_g1
B2M	Hs00187842_m1

3.8 Análise estatística

Os dados analisados foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão, medianas e intervalos interquartis ou valores absolutos e frações. O teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney U foi usado para comparar variáveis contínuas enquanto variáveis categóricas foram comparadas usando o teste do Qui Quadrado ou teste exato de Fisher. Em todos os testes realizados, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram valor-p inferior a 5% ($p < 0,05$). Os testes foram realizados com a utilização do GraphPad Prism® versão 6.02 para Windows.

4 RESULTADOS

4.1 Dados Clínicos

O grupo estudado foi composto por 17 pacientes (13 homens e 4 mulheres) e a maioria (58,8%) tinha lesão medular traumática como causa da DNTUI. A idade média dos pacientes submetidos à cirurgia foi de 37,5 anos $\pm$ 18,3 (11-60 anos) e o tempo médio de duração da doença neurológica foi de 11,2 anos $\pm$ 4,8 (3-24 anos). No momento da cirurgia 12 (70,5%) dos pacientes faziam uso de cateterismo limpo intermitente, 4 (23,5%) dos pacientes faziam uso de sonda uretral de demora e 1 (5,8%) paciente fazia uso de cistostomia. Oito (47,0%) dos pacientes apresentava dilatação do trato urinário superior à ultrassonografia. A tabela 2 mostra os dados demográficos e comorbidades dos pacientes.

O grupo controle incluiu 7 homens e 2 mulheres, com idade média de 42,1 anos $\pm$ 14,7 (17-55 anos).

Tabela 2 – Dados demográficos dos pacientes

Parametros	Média $\pm$ DP
Idade	37,5 $\pm$ 18,3
Tempo de evolução da doença	11,2 $\pm$ 4,8
Tipo de lesão neurológica	TRM - 58,8%; MMC - 17,6%
Manejo vesical	CLI - 70,5%; Sonda uretral - 23,5%; Cistostomia - 5,8%
Co-morbidades	HAS - 23,5%; DM - 17,6%; HIV - 5,8%
Dilatação do TUS	47,10%
Utilização prévia de antimuscarínicos	82,30%
Utilização prévia de TXB-A	70,50%
ICIQ-SF	16,5 $\pm$ 5,7
Motivo da indicação cirúrgica	Baixa complacência - 58,8%; Hiperatividade detrusora refratária - 41,2%

4.2 Dados urodinâmicos

Todos os pacientes, com apenas uma exceção, realizaram estudo urodinâmico completo antes da cirurgia. O paciente que não conseguiu fazer o exame possuía uma bexiga contraída, associado a fístula uretral e estenose de uretra.

Os achados urodinâmicos, incluindo complacência, capacidade cistométrica máxima e hiperatividade detrusora são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Achados urodinâmicos dos pacientes com DNTUI

Parametros	Média ± DP
Complacência (mL/cm H ₂ O)	17,95 ± 16,8
Capacidade cistométrica máxima	260 ± 63,5
Pressão detrusora final	24,2 ± 17,4
Hiperatividade detrusora	41,10%

4.3 Expressão relativa dos genes estudados

Os pacientes submetidos à ampliação vesical apresentaram aumento significativa da expressão gênica dos níveis de TIMP-1 e HIF3 α ($p=0,002$ e $p=0,03$, respectivamente). MMP-1 apresentou níveis diminuídos de expressão gênica, também com significância estatística ($p=0,03$). A expressão gênica de HIF1 α e HIF2 α mostraram tendência ao aumento de sua expressão, porém de forma não significativa ($p=0,14$ e $p=0,11$). As expressões de VEGF, CTGF, iNOS, nNOS e eNOS se mostraram heterogêneas, não favorecendo nenhum grupo. As informações relacionadas à expressão gênica encontram-se na Tabela 4. O padrão de expressão relativa dos genes estudados encontra-se na Figura 3.

Tabela 4 – Expressão relativa dos genes estudados

Gene	Padrão de expressão gênica	Valor de <i>p</i>
HIF1 α	Superexpressão	0,14
HIF2 α	Superexpressão	0,11
HIF3 α	Superexpressão	0,002*
iNOS	Heterogêneo	0,4
eNOS	Heterogêneo	0,4
nNOS	Heterogêneo	0,25
CTGF	Heterogêneo	0,21
VEGF α	Heterogêneo	0,52
MMP-1	Subexpressão	0,0032*
TIMP-1	Superexpressão	0,0034*

Não encontramos diferenças importantes na expressão gênica baseada nos seguintes subgrupos: Tempo de evolução da doença neurológica, hiperatividade detrusora, déficit acentuado de complacência e dilatação do trato urinário superior.

Figura 3. Padrão de expressão relativa dos genes estudados com padrão de superexpressão ou subexpressão.

5 DISCUSSÃO

A disfunção neurogênica do trato urinário inferior é uma doença comum, podendo ser causada por diversas doenças neurológicas. O padrão de acometimento do trato urinário é altamente dependente do tipo, nível e evolução da lesão neurológica de base(50).

Lesões suprasacrais, como as que ocorrem nas lesões traumáticas cervicais e torácicas da medula espinhal são frequentemente acompanhadas de hiperatividade detrusora e dissinergia vesicoesfincteriana, resultando em altas pressões detrusoras e padrão de obstrução infravesical, que podem levar à deterioração do trato urinário superior e risco de progressão para fibrose vesical e diminuição da complacência vesical(14, 51).

Nos casos em que há progressão da disfunção vesical para fibrose vesical ou em casos de hiperatividade detrusora ao tratamento conservador ou minimamente invasivo, a ampliação vesical é uma opção de tratamento com bons resultados a longo prazo e capaz de mudar a evolução natural da doença, porém trata-se de procedimento de alta complexidade e alto índice de morbidade(52).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na progressão para fibrose vesical nos pacientes com DNTUI não são bem estabelecidos. Sabe-se que a distensão vesical prolongada e repetida que ocorre nesse pacientes causa uma ativação de fibroblastos e aumento da deposição de matriz extracelular(53), levando à deposição de colágeno na musculatura detrusora, com perda de elasticidade, o que leva à diminuição da complacência e eventualmente à fibrose vesical, processo que ocorre de forma semelhante em outros órgãos como fígado e coração(54, 55).

Em modelos animais, foi demonstrado que uma das principais vias que iniciam o processo de remodelação vesical é a induzida pela hipóxia. Diversos estudos demonstraram que a distensão vesical é capaz de aumentar a tensão intramural levando a redução do fluxo sanguíneo e desencadeando a resposta celular e molecular que ocorre nessas situações, sendo o Fator Induzível pela Hipóxia o principal mediador dessas reações (19, 24, 27, 42, 56).

A maioria dos estudos para avaliação do efeito da hipóxia na disfunção vesical foi realizada em modelos animais de ligadura parcial da uretra induzindo a obstrução infravesical causada de forma súbita, modelo diferente do observado na fisiopatologia da obstrução infravesical em humanos, seja de

origem neurogênica ou não. Um dos principais motivos para isso é a escassez de material para análise. Houve uma redução importante no número de pacientes submetidos à ampliação vesical após o início da utilização de toxina botulínica para o tratamento destes pacientes. Além disso, a grande heterogeneidade dos pacientes em relação à idade, duração dos sintomas, tipo de lesão neurológica e severidade da disfunção vesical no momento da cirurgia torna mais difícil estudar essa população (50).

Por esses motivos, o papel da hipóxia na progressão da fibrose vesical nos pacientes com DNTUI ainda não foi estudado, porém as altas pressões vesicais que podem ocorrer nesses pacientes nos levam a acreditar que a hipóxia possui um papel importante na fisiopatologia da progressão da disfunção vesical nesses pacientes. Nosso estudo é o primeiro a avaliar a expressão gênica dos fatores relacionados à hipóxia nesse grupo de pacientes.

Avaliamos prospectivamente uma população de pacientes com DNTUI e composta de 17 pacientes, em sua maioria homens, que foram indicados à cirurgia de ampliação vesical por: déficit importante de complacência vesical (9 pacientes), hiperatividade detrusora refratária à tratamento medicamentoso ou endoscópico (6 pacientes), deterioração do trato urinário superior com hidronefrose severa bilateralmente (1 paciente) e opção do paciente por não se sentir confortável em realizar aplicações endoscópicas de toxina botulínica de forma periódica (1 paciente).

Na fase inicial do projeto, representada pelo presente estudo, procuramos correlacionar a expressão gênica dos fatores relacionados à hipóxia e fibrose vesical nessa população de pacientes e correlacioná-los com os parâmetros clínicos e urodinâmicos.

A idade dos pacientes avaliados variou de 11 a 60 anos, com mediana de 40 anos. A maior parcela dos pacientes apresentava DNTUI por lesão traumática da medula espinhal (10 pacientes), com todos os pacientes desse grupo apresentando lesões suprasacrais (nível neurológica entre C4 e L1), compatíveis com o grupo de maior risco para progressão de fibrose vesical e deterioração ao trato urinário superior. Mielomeningocele foi a origem da DNTUI em 4 pacientes, sendo o restante causada por doenças mais raras (Tuberculose do sistema nervoso central, Síndrome de West e Infarto Medular).

Como a maior parte dos pacientes já acompanhava em nossa instituição, a maior parte deles encontrava-se em uso de cateterismo limpo intermitente para o esvaziamento vesical (70,5% dos pacientes), com o restante utilizando drenagem contínua de urina por cateter uretral ou cistostomia.

Oito pacientes já apresentavam sinais ultrassonográficos de dilatação do trato urinário superior no momento da cirurgia, demonstrando a gravidade desses pacientes e o alto risco de lesões permanentes ao trato urinário superior.

O tempo de evolução da doença neurológica variou de 3 a 24 anos, com tempo médio de 11,2 anos $\pm$ 4,8, refletindo uma população heterogênea de pacientes.

Apesar da lesão neurológica, a maioria dos pacientes não apresentavam co-morbidades no momento da cirurgia, com 23,5% dos pacientes hipertensos e 17,6% dos pacientes diabéticos, provavelmente porque a maioria dos pacientes era relativamente jovem (mediana de 40 anos).

Todos os pacientes operados já haviam feito uso de ao menos algum tipo de tratamento conservador ou endoscópico para tratamento dos sintomas de DNTUI durante o período da doença. No momento da indicação da cirurgia 82,3% dos pacientes faziam uso de antimuscarínicos e 70,5% dos pacientes já haviam feito aplicação intravesical de toxina botulínica, sem resposta satisfatória ao tratamento.

Com exceção de um paciente com bexiga contraída e fístula uretral, todos os pacientes foram submetidos à estudo urodinâmico prévio à cirurgia, com os seguintes achados: complacência média de 17,9 $\pm$ 16,8, com 9 pacientes apresentando complacência inferior a 10ml por cm/H₂O. A capacidade cistométrica máxima média foi de 260ml $\pm$ 63,5, com 13 pacientes apresentando capacidade cistométrica máxima inferior a 250ml. 41,1% dos pacientes apresentou contrações detrusoras involuntárias durante a realização do exame.

Selecionamos para grupo controle, indivíduos cadavéricos de órgãos. Apesar de não ser um grupo controle verdadeiro, visto que não respeita os mesmo critérios de inclusão e exclusão dos pacientes (casos). Porém, trata-se de uma população considerada normal em relação ao trato urinário inferior, já

que é composta geralmente por adultos jovens, sem co-morbidades significativas, e com mínima possibilidade de apresentarem alterações funcionais e morfológicas da bexiga decorrente de processo obstrutivo ou neurogênico.

Apresentamos nesse estudo uma análise da expressão de 10 genes potencialmente envolvidos na progressão da disfunção vesical. A maioria destes genes já foi avaliada em modelos animais de obstrução infravesical ou em humanos com hiperplasia prostática benigna, mas nunca foram avaliados em humanos com DNTUI.

As alterações no balanço entre as metaloproteinases e os inibidores de metaloproteinases já foram estudadas na avaliação de pacientes com hiperplasia prostática benigna e modelos animais de OIV. As metaloproteinases têm a função de degradar as proteínas da matriz extracelular e são reguladas pelos seus inibidores, os TIMPs. O processo de renovação da matriz extracelular depende da regulação adequada entre os níveis de TIMPs e MMPs. Nos pacientes com aumento dos níveis de colágeno intravesical foi demonstrado o aumento dos níveis de TIMP-1 e diminuição dos níveis de MMP-1 (43). Nossos achados foram compatíveis com a literatura existente, com aumento significativamente estatístico da expressão gênica de TIMP-1 e diminuição significativa da expressão gênica de MMP-1. Esses resultados sugerem que mesmo em pacientes com disfunção vesical crônica e bexigas já em processo fibrótico, a manutenção do processo de deposição da matriz extracelular depende da regulação da TIMP-1, responsável por inibir diversas metaloproteinases e impedir a degradação adequada do colágeno. Esse achado abre espaço também para investigação de inibidores ou supressores de TIMPs no processo de fibrose vesical, como tentativa de minimizar ou reduzir esse processo.

As alterações celulares e moleculares que acontecem durante períodos de hipóxia já foram amplamente demonstrados e discutidos previamente nesse trabalho(29, 30). Wiafe et al. demonstraram aumento da expressão gênica e da expressão proteica tecidual de HIF1 α , HIF2 α e HIF3 α em células de bexiga humana submetidos à hipóxia in vitro. Nesse estudo o HIF1 α e HIF2 α se elevaram rapidamente, enquanto os níveis de HIF3 α subiram apenas após tempo de hipóxia mais prolongado (72h). Em nosso estudo a expressão gênica

dos HIFs encontrou-se aumentada, embora os níveis de HIF1 α e HIF2 α não tenham atingido significância estatística, a expressão gênica aumentada de HIF3 α apresentou significância estatística. É difícil avaliar esses resultados de forma isolada visto que não há nenhum relato prévio na literatura de análise dos HIFs em situações similares, mas as duas hipóteses principais são: a) os HIFs 1 α e 2 α não mostraram significância estatística pelo tamanho reduzido da amostra e b) conforme demonstrado em outros estudos de OIV por HPB, os níveis de HIF1 só permanecem aumentados pelos dez primeiros anos da doença, atingindo níveis normais, tanto de expressão gênica quanto tecidual após esse período. Como nossa população em geral tem um tempo de evolução prolongado da doença, essa pode ser uma das explicações para não termos encontrado superexpressão gênica de HIF1 α como encontrado em modelos animais.

Os outros genes analisados, iNOS, nNOS, eNOS, VEGF e CTGF, foram expressos de maneira heterogênea, não havendo diferença em relação ao encontrado no grupo controle. Esses achados são diferentes do que estávamos esperando encontrar e não compatíveis com os estudos publicados em modelos animais ou com análises in vitro de células de bexiga humana. Especialmente as expressões gênicas de VEGF, CTGF e iNOS estão fortemente relacionadas com a expressão de HIF1 α , visto que este é o fator de transcrição capaz de ativar a produção destes genes(20, 34, 38, 42). Nossa principal hipótese para explicar esses achados é que em nossa população de bexigas agredidas cronicamente e apresentando pelo menos algum grau de fibrose vesical na maioria dos pacientes, a capacidade das células de continuar respondendo à hipóxia está diminuída, impedindo o aumento dos genes responsáveis pelo início do processo de remodelação e adaptação vesical.

Apesar de ser um estudo inédito e de levantar questões importantes em relação ao processo de fisiopatologia da descompensação vesical nos pacientes com DNTUI, nosso estudo possui diversas limitações.

A população estudada tem um n pequeno, que pode ter refletido na ausência de significância estatística para alguns dos genes estudados. Além disso é uma amostra heterogênea, composta por pacientes de diferentes idades (11-60 anos) e diferentes mecanismos de doença neurológicas, tornando as análises mais difíceis de se obter resultados como o demonstrado

em modelos animais e in vitro. A dificuldade se conseguir amostras de pacientes ampliados é crescente, principalmente pela melhora nos tratamentos conservadores e minimamente invasivos, reduzindo os pacientes com indicação para realização da cirurgia.

Devido à ausência de tempo hábil, os estudos complementares à expressão gênica como a análise microscópica tecidual e imunohistoquímica para avaliação da expressão proteica dos genes avaliados, ainda estão sendo realizados. Apesar de ser um fator limitante na avaliação dos resultados, os trabalhos realizados anteriormente tiveram uma forte relação entre a expressão gênica e a expressão protéica, nos levando a crer que encontraremos resultados similares quando os estudos complementares forem finalizados.

6 CONCLUSÕES

Esse foi o primeiro estudo que avaliou os genes relacionados à hipóxia e à fibrose vesical em bexigas humanas de pacientes com DNTUI. Apesar das limitações do estudo, identificamos aumento da expressão gênica de TIMP-1 e HIF3 α e diminuição da expressão gênica de MMP-1, mostrando, assim como em modelos animais, um possível papel da via da hipóxia na progressão da disfunção vesical nesses pacientes. Esses achados mostram a necessidade de estudos adicionais para melhor entendimento da fisiopatologia destes doentes e novos alvos terapêuticos a serem estudados para tentar minimizar os efeitos deletérios dessa doença.

7 REFERÊNCIAS

1. de Groat WC, Yoshimura N. Anatomy and physiology of the lower urinary tract. *Handb Clin Neurol*. 2015;130:61-108.
2. Fowler CJ, Griffiths D, de Groat WC. The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(6):453-66.
3. de Groat WC, Griffiths D, Yoshimura N. Neural control of the lower urinary tract. *Compr Physiol*. 2015;5(1):327-96.
4. Andersson KEA, A. Urinary bladder contraction and relaxation-physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 2004;84:935-86.
5. Janig W, Morrison JF. Functional properties of spinal visceral afferents supplying abdominal and pelvic organs, with special emphasis on visceral nociception. *Prog Brain Res*. 1986;67:87-114.
6. Yoshimura N, Ogawa T, Miyazato M, Kitta T, Furuta A, Chancellor MB, et al. Neural mechanisms underlying lower urinary tract dysfunction. *Korean J Urol*. 2014;55(2):81-90.
7. Panicker JN, Fowler CJ, Kessler TM. Lower urinary tract dysfunction in the neurological patient: clinical assessment and management. *The Lancet Neurology*. 2015;14(7):720-32.
8. Dorsher PT, McIntosh PM. Neurogenic bladder. *Adv Urol*. 2012;2012:816274.
9. Drake MJ, Apostolidis A, Cocci A, Emmanuel A, Gajewski JB, Harrison SC, et al. Neurogenic lower urinary tract dysfunction: Clinical management recommendations of the Neurologic Incontinence committee of the fifth International Consultation on Incontinence 2013. *Neurourol Urodyn*. 2016;35(6):657-65.
10. Manack A, Motsko SP, Haag-Molkenteller C, Dmochowski RR, Goehring EL, Jr., Nguyen-Khoa BA, et al. Epidemiology and healthcare utilization of neurogenic bladder patients in a US claims database. *Neurourol Urodyn*. 2011;30(3):395-401.
11. Flack C, Powell CR. The Worldwide Economic Impact of Neurogenic Bladder. *Curr Bladder Dysfunct Rep*. 2015;10(4):350-4.
12. Powell CR. Not all neurogenic bladders are the same: a proposal for a new neurogenic bladder classification system. *Transl Androl Urol*. 2016;5(1):12-21.

13. Georgopoulos P, Apostolidis A. Neurogenic voiding dysfunction. *Curr Opin Urol*. 2017;27(3):300-6.
14. Sacomani CA, Trigo-Rocha FE, Gomes CM, Greve JA, Barros TE, Arap S. Effect of the trauma mechanism on the bladder-sphincteric behavior after spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2003;41(1):12-5.
15. Weld KJ, Graney MJ, Dmochowski RR. Clinical significance of detrusor sphincter dyssynergia type in patients with post-traumatic spinal cord injury. *Urology*. 2000;56(4):565-8.
16. McGuire EJ, Woodside JR, Borden TA, Weiss RM. Prognostic value of urodynamic testing in myelodysplastic patients. *J Urol*. 1981;126(2):205-9.
17. Bellucci CHS, Ribeiro WO, Hemerly TS, de Bessa J, Jr., Antunes AA, Leite KRM, et al. Increased detrusor collagen is associated with detrusor overactivity and decreased bladder compliance in men with benign prostatic obstruction. *Prostate Int*. 2017;5(2):70-4.
18. Greenland JE. The effect of bladder outlet obstruction on tissue oxygenation and blood flow in the pig bladder. *BJU Int*. 2000;85:1109-14.
19. Ghafar MA, Anastasiadis AG, Olsson LE, Chichester P, Kaplan SA, Buttyan R, et al. Hypoxia and an Angiogenic Response in the Partially Obstructed Rat Bladder. *Laboratory Investigation*. 2002;82(7):903-9.
20. Lin AT, Juan YS. Ischemia, Hypoxia and Oxidative Stress in Bladder Outlet Obstruction and Bladder Overdistention Injury. *Low Urin Tract Symptoms*. 2012;4 Suppl 1:27-31.
21. Adam RM, Eaton SH, Estrada C, Nimgaonkar A, Shih SC, Smith LE, et al. Mechanical stretch is a highly selective regulator of gene expression in human bladder smooth muscle cells. *Physiol Genomics*. 2004;20(1):36-44.
22. Lin AT, Monson FC, Kato K, Haugaard N, Wein AJ, Levin RM. Effect of chronic ischemia on glucose metabolism of rabbit urinary bladder. *J Urol*. 1989;142(4):1127-33.
23. Gill HS, Monson FC, Wein AJ, Ruggieri MR, Levin RM. The effects of short-term in-vivo ischemia on the contractile function of the rabbit urinary bladder. *J Urol*. 1988;139(6):1350-4.
24. Azadzoi KM, Yalla SV, Siroky MB. Human bladder smooth muscle cell damage in disturbed oxygen tension. *Urology*. 2011;78(4):967 e9-15.

25. Azadzo KM, Chen BG, Radisavljevic ZM, Siroky MB. Molecular reactions and ultrastructural damage in the chronically ischemic bladder. *J Urol*. 2011;186(5):2115-22.
26. Aizawa N, Igawa Y. Pathophysiology of the underactive bladder. *Investig Clin Urol*. 2017;58(Suppl 2):S82-S9.
27. Galvin DJ, Watson RW, O'Neill A, Coffey RN, Taylor C, Gillespie JI, et al. Hypoxia inhibits human bladder smooth muscle cell proliferation: a potential mechanism of bladder dysfunction. *Neurourol Urodyn*. 2004;23(4):342-8.
28. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510-4.
29. Guillemin KK, Mark A. The Hypoxic Response- Huffing and HIFing. *Cell*. 1997;89:9-12.
30. Wiafe B, Adesida A, Churchill T, Adewuyi EE, Li Z, Metcalfe P. Hypoxia-increased expression of genes involved in inflammation, dedifferentiation, pro-fibrosis, and extracellular matrix remodeling of human bladder smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017;53(1):58-66.
31. Koritsiadis G, Stravodimos K, Koutalellis G, Agrogiannis G, Koritsiadis S, Lazaris A, et al. Immunohistochemical estimation of hypoxia in human obstructed bladder and correlation with clinical variables. *BJU Int*. 2008;102(3):328-32.
32. Iguchi N, Malykhina AP, Wilcox DT. Inhibition of HIF Reduces Bladder Hypertrophy and Improves Bladder Function in Murine Model of Partial Bladder Outlet Obstruction. *J Urol*. 2016;195(4 Pt 2):1250-6.
33. Jones A, Fujiyama C, Blanche C, Moore JW, Fuggle S, Cranston D, et al. Relation of vascular endothelial growth factor production to expression and regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and hypoxia-inducible factor-2 alpha in human bladder tumors and cell lines. *Clin Cancer Res*. 2001;7(5):1263-72.
34. Burgu B, Aydogdu O. Vascular endothelial growth factor and bladder from a different perspective: not only an angiogenic factor. *J Pediatr Surg*. 2010;45(2):447-52.
35. Youssif M, Shiina H, Urakami S, Gleason C, Nunes L, Igawa M, et al. Effect of vascular endothelial growth factor on regeneration of bladder acellular matrix graft: histologic and functional evaluation. *Urology*. 2005;66(1):201-7.

36. Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(1):49-59.
37. Bennett BC, Kruse MN, Roppolo JR, Flood HD, Fraser M, de Groat WC. Neural control of urethral outlet activity in vivo: role of nitric oxide. *J Urol.* 1995;153(6):2004-9.
38. Song YS, Lee HJ, Doo SW, An J, Kim SU. Enhanced angiogenesis and relaxation of bladder as early response to bladder outlet obstruction. *Int J Urol.* 2013;20(1):116-22.
39. Felsen D, Dardashti K, Ostad M, Lemer ML, Gross SS, Chen J, et al. Inducible nitric oxide synthase promotes pathophysiological consequences of experimental bladder outlet obstruction. *J Urol.* 2003;169(4):1569-72.
40. Hong KH, Yoo SA, Kang SS, Choi JJ, Kim WU, Cho CS. Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 2006;146(2):362-70.
41. Metcalfe PD, Wang J, Jiao H, Huang Y, Hori K, Moore RB, et al. Bladder outlet obstruction: progression from inflammation to fibrosis. *BJU Int.* 2010;106(11):1686-94.
42. Haung D, Adah A, Richardson R, Pierce C, Whittington A, Taylor T. Defining the role of hif-1 ? And ctgf in fibrosis - biomed 2009. *Biomed Sci Instrum.* 2009;45:340-5.
43. 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;112(4):E391-7.
44. Lin VK, McConnell JD. Molecular aspects of bladder outlet obstruction. *Adv Exp Med Biol.* 1995;385:65-74; discussion 5-9.
45. 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;272(6 Pt 2):R1960-5.
46. Backhaus BO, Kaefer M, Haberstroh KM, Hile K, Nagatomi J, Rink RC, et al. Alterations in the molecular determinants of bladder compliance at hydrostatic pressures less than 40 cm. H₂O. *J Urol.* 2002;168(6):2600-4.
47. Collins CW, Winters JC, American Urological A, Society of Urodynamics Female Pelvic M, Urogenital R. AUA/SUFU adult urodynamics guideline: a clinical review. *Urol Clin North Am.* 2014;41(3):353-62, vii.

48. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn*. 2002;21(2):167-78.
49. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
50. Phe V, Chartier-Kastler E, Panicker JN. Management of neurogenic bladder in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Urol*. 2016;13(5):275-88.
51. Samson G, Cardenas DD. Neurogenic bladder in spinal cord injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2007;18(2):255-74, vi.
52. Perrouin-Verbe MA, Chartier-Kastler E, Even A, Denys P, Roupret M, Phe V. Long-term complications of continent cutaneous urinary diversion in adult spinal cord injured patients. *Neurourol Urodyn*. 2016;35(8):1046-50.
53. Macarak EJ. Overview of muscle and extracellular matrix in the bladder. *Adv Exp Med Biol*. 1999;462:117-9.
54. Anumanthan G, Tanaka ST, Adams CM, Thomas JC, Wills ML, Adams MC, et al. Bladder stromal loss of transforming growth factor receptor II decreases fibrosis after bladder obstruction. *J Urol*. 2009;182(4 Suppl):1775-80.
55. Lu YT, Tingskov SJ, Djurhuus JC, Norregaard R, Olsen LH. Can bladder fibrosis in congenital urinary tract obstruction be reversed? *J Pediatr Urol*. 2017;13(6):574-80.
56. Ekman M, Uvelius B, Albinsson S, Sward K. HIF-mediated metabolic switching in bladder outlet obstruction mitigates the relaxing effect of mitochondrial inhibition. *Lab Invest*. 2014;94(5):557-68.