MARCO ANTONIO NUNES DA SILVA

**Análise do perfil de expressão dos marcadores de angiogênese
e das neurotrofinas na persistência da hiperatividade detrusora
em pacientes submetidos à ressecção transuretral da próstata**

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. Alberto Azoubel Antunes

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 autor

Silva, Marco Antonio Nunes da

Análise do perfil de expressão dos marcadores de angiogênese e das neurotrofinas na persistência de hiperatividade detrusora em pacientes submetidos à ressecção transuretral da próstata / Marco Antonio Nunes da Silva. -- São Paulo, 2014.

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

Orientador: Alberto Azoubel Antunes.

Descritores: 1.Hiperplasia prostática 2.Obstrução do colo da bexiga urinária
3.Bexiga urinária hiperativa 4.Ressecção transuretral da próstata 5.Expressão gênica
6.Reação em cadeia da polimerase 7.Urodinâmica 8.Fator de crescimento neural
9.Fatores de crescimento endotelial 10.Receptor muscarínico M2 11.Receptor
muscarínico M3

USP/FM/DBD-370/14

Dedicatória

Dedico esta tese ao meu bem mais precioso: a Família.

À minha linda e amada mulher, **Theodora**, agradeço toda a inspiração, a insistência e as palavras de carinho e incentivo que sempre me revitalizaram nos momentos difíceis. Certamente o seu amor e seu apoio incondicional contribuíram sobremodo para que eu melhor suportasse o peso das responsabilidades que, durante esse tempo, pesaram sobre meus ombros.

Ao meu precioso filho **Nikolas**, meu presente de Deus, fruto de um amor maior, pela pureza de seus lindos sorrisos mesmo após minhas ausências. Sua presença trouxe um novo sentido na minha vida e na palavra Amor.

Ao meu querido pai, Dr. **João**, meu capitão do mar e da vida, obrigado por ter me guiado e nos conduzido, durante esta encarnação, por águas nem sempre serenas mas sempre seguras. Seus ensinamentos serão transmitidos na forma de amor aos seus descendentes.

À minha querida e generosa mãe, **Maria Glair**, pela renúncia e pela luta por nossa família, pelo encanto e pela fé na vida, pela capacidade de ouvir o silêncio e adivinhar sentimentos, pelo amor incondicional que nada espera em troca.

À minha fiel irmã, **Ana Paula**, admiradora fanática de minhas conquistas. pela presença, ainda que distante, nas adversidades e nos desafios que nos edifica. Sua alma reflete toda meiguice encontrada em minha linda afilhada **Ananda**.

À minha mãe do céu, **Chiquinha**, obrigado pelos embalos nas noites de medo, pelas delicadezas e pelas histórias genuínas que nos transportavam a mundos tão distintos.

Aos meus avós, tios e primos que representam nossas raízes profundas.

Aos meus cunhados e sobrinhos, sempre presentes, pela torcida e carinho verdadeiros.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. **Alberto Azoubel Antunes**, meu amigo e orientador, por colocar-me a frente deste desafio. Neste período sempre demonstrou sua total confiança em mim, esta traduzida por uma liberdade de ação que foi imprescindível para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Seu olhar crítico e construtivista encanta a todos que têm o privilégio de trabalhar ao seu lado. Serei eternamente grato.

À Profa. Dra. **Sabrina Thalita dos Reis**, bióloga e pesquisadora excepcional, responsável pelo sucesso técnico e figura ímpar em todo processo laboratorial e estatístico. Estar ao lado de uma pessoa tão especial está além das expectativas encontradas numa amizade. Felizes são aqueles que conquistam um lugar nesse coração mineirinho.

Ao Prof. Dr. **Miguel Srougi**, pelo exemplo de dedicação e amor à Medicina, pesquisa e a tudo que faz. Agradeço a oportunidade de estar ao lado de uma pessoa incomparável. Seus exemplos em vida nos lapidam e estimulam a tornarmos indivíduos melhores.

À Profa. Dra. **Katia Leite**, Professora chefe do Laboratório de Investigação Médica 55, pela oportunidade de desenvolver esse projeto em um laboratório, que sob seu comando, se destaca pela produção e pela qualidade científica. Agradeço também a todos do LIM, especialmente a **Nayara**, por toda ajuda na captação, armazenamento, processamento e análise das amostras do estudo.

Ao Prof. Dr. **Homero Bruschini**, chefe do grupo de Urologia Feminina/Disfunção Miccional, pelas contribuições e sugestões ao projeto, além de garantir toda infraestrutura necessária a realização dos estudos urodinâmicos.

Ao Prof. Dr. **Carlo Camargo Passerotti**, chefe do programa de pós-graduação em cirurgia robótica do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, por acreditar e inserir-me a frente de um projeto pioneiro e vanguardista, único em todo Brasil.

Aos amigos da Divisão de Clínica Urológica, em especial do Grupo de Próstata: Dr. **Paulo Cordeiro**, Dr. **Élcio Nakano**, Dr. **Eduardo Muracca**, Dr. **Laércio Pachelli**, Dr. **Fabio Oliveira**, Dr. **Luis Henrique Araújo**, Dr. **Karlo Biolo**, Dr. **Alexandre Iscaife**, Dr. **Mario Paranhos**, Dr. **Fernando Fróes**, Dr. **Paulo Sajovic** e Dr. **Yuri Ferreira**.

As secretárias da Urologia que sempre facilitam nossas vidas: **Elisa**, **Teresa** e **Madalena**. Agradeço especialmente aos técnicos de enfermagem **Renato** e **Zilda** pela ajuda inestimável com os estudos urodinâmicos.

Expresso também a minha gratidão e solidariedade a todos os pacientes que, embora no anonimato, prestaram uma contribuição fundamental para que este estudo fosse realizado, e desta forma, colaboraram para o avanço da investigação científica nesta área do conhecimento.

A FAPESP pelos recursos fornecidos a elaboração desta pesquisa (2011/50080-5).

Possuir amigos e tutores que pensam de formas tão distintas, enriqueceu profundamente a minha formação. Agradeço a enorme diversidade que me rodeia e, apesar de me desorientar às vezes, me ajudou a captar diferentes olhares sobre a mesma realidade.

Finalmente a **Deus**, obrigado por tudo!

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

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras e Gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Considerações Gerais	2
1.2	Manifestações Clínicas da HPB	2
1.3	Definição e epidemiologia da Hiperatividade Detrusora	3
1.4	Fisiopatologia da Hiperatividade Detrusora	5
1.5	Angiogênese no músculo vesical	8
1.6	Neuroplasticidade vesical	9
1.7	Justificativa	10
2	OBJETIVOS	
2.1	Objetivo Primário	13
2.2	Objetivo Secundário	13
3	MÉTODOS	
3.1	Desenho do Estudo	15
3.2	Local e Época	15
3.3	Sujeitos	15
3.4	Grupo Controle	16
3.5	Intervenção	16
3.6	Extração do RNA	18

3.7	Transcrição Reversa (RT)	19
3.8	Análise de Expressão de Genes por PCR em Tempo Real Quantitativo	20
3.9	Análise Estatística	21
4	RESULTADOS	
4.1	Características Clínicas	24
4.2	Características Urodinâmicas	27
4.3	Análise das variáveis clínicas e urodinâmicas com resolução da HD	30
4.4	Análise da expressão gênica do grupo estudado	30
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	52
7	PERSPECTIVAS	54
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	APÊNDICE	64

Lista de Abreviaturas

HPB - Hiperplasia Prostática Benigna

ABP - Aumento Benigno da Próstata

OIV - Obstrução Infravesical

HD - Hiperatividade Detrusora

ICS - Sociedade Internacional de Continência

RTUP - Ressecção Endoscópica da Próstata

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

CD105 - Endoglina

NGF - Fator de Crescimento Neural

NGFr - Receptor de Fator de Crescimento Neural

CVI - Contração Vesical Involuntária

IPSS - Escore Internacional de Sintomas Prostáticos

PSA - Antígeno Prostático Específico

CHRM2 - Receptor Muscarínico tipo 2

CHRM3 - Receptor Muscarínico tipo 3

qRT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

RNA - Ácido Ribonucléico

EUD - Estudo Urodinâmico

US - Ultra-som

Lista de Figuras e Gráficos

Figura 1	Sistema TaqMan®	20
Gráfico 1	Expressão relativa dos genes no músculo detrusor em relação ao grupo controle	31
Gráfico 2	Expressão gênica conforme início da HD	36
Gráfico 3	Expressão gênica conforme resolução da HD	37

Lista de Tabelas

Tabela 1	Primers utilizados para quantificação da expressão dos fatores de crescimento, inflamação e angiogênese na HPB	21
Tabela 2	Características clínicas dos 43 pacientes com diagnóstico de HPB e submetidos à RTU de próstata	24
Tabela 3	Características clínicas dos 10 pacientes do grupo controle	26
Tabela 4	Dados urodinâmicos pré-operatórios	27
Tabela 5	Dados urodinâmicos pré e pós-operatórios dos 43 pacientes avaliados	28
Tabela 6	Dados urodinâmicos pós-operatórios (6º mês) em pacientes com HD pré-RTUP	29
Tabela 7	Características clínicas relacionadas a resolução da HD	30
Tabela 8	Média de expressão dos genes estudados comparados ao grupo controle	31
Tabela 9	Nível de expressão relativa dos seis genes em relação a idade e IMC	32
Tabela 10	Nível de expressão relativa dos seis genes em relação ao IPSS e Tempo de sintomas	33
Tabela 11	Nível de expressão relativa dos seis genes em relação a presença de HD e amplitude das CVIs	34
Tabela 12	Nível de expressão relativa dos seis genes em relação ao período de início das CVIs	34
Tabela 13	Nível de expressão relativa dos seis genes em relação a Complacência e Índice de Contratilidade Vesical	35
Tabela 14	Nível de expressão relativa dos seis genes em relação a Persistência de HD após 6 meses de tratamento cirúrgico	36
Tabela 15	Expressão categorizada de CHRM2 e CHRM3 em relação à Persistência de HD após 6 meses de tratamento cirúrgico	37

Resumo

Nunes MA. Análise do perfil de expressão dos marcadores de angiogênese e das neurotrofinas na persistência da hiperatividade detrusora em pacientes submetidos à ressecção transuretral da próstata [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: A HD está presente em aproximadamente 50% dos pacientes com OIV devido HPB e 30% dos casos não apresentarão melhora após o tratamento cirúrgico. Até o momento, nenhuma característica clínica pode prever acuradamente quais pacientes serão beneficiados. Neste estudo nós analisamos o papel de seis marcadores moleculares na resolução da HD após a RTUP.

Método: Um estudo prospectivo e controlado analisou 43 pacientes com OIV devido HPB, submetidos a RTUP de 2011 a 2012. O grupo controle foi composto por espécimes de músculo vesical de 10 pacientes com menos de 60 anos, submetidos a prostatectomia radical devido câncer de próstata, apresentando IPSS menor que 8 e volume prostático menor que 30 gramas. Todos os pacientes realizaram estudo urodinâmico no pré-operatório e com 6 meses de pós-operatório. Nós analisamos a presença, o período de início (primeira vs segunda metade do enchimento vesical) e a amplitude (< 40 vs > 40 cmH₂O) das CVIs, assim como sua resolução após 6 meses de tratamento cirúrgico. Uma biópsia de músculo vesical foi efetuada no final da RTUP para análise do perfil de expressão gênica do NGF, NGFr, VEGF, CD-105, CHRM2 e CHRM3. Para este propósito foi utilizado a técnica de qRT-PCR. Além disso, correlacionamos variáveis clínicas pré-operatórias com a evolução da HD no pós-operatório.

Resultados: A idade média dos pacientes foi 63 anos (50 a 75). A HD estava presente em 21 (48,8%) pacientes. De acordo com aferições pré-operatórias, a média de expressão gênica do NGF foi 3,3 vezes maior nos pacientes que iniciaram CVI precocemente quando comparados àqueles que iniciaram as contrações na fase final de enchimento vesical ($p=0,047$). A presença e a amplitude das CVIs não apresentaram correlações estatísticas com os genes estudados. Em relação a resolução da HD, a média de expressão de CHRM2 foi 2 vezes maior entre os pacientes que evoluíram com melhora da HD ($p=0,072$). Após 6 meses da RTUP, 77,8% dos pacientes que possuíam expressão aumentada (maior que a mediana) de CHRM2 CHRM3 evoluíram com resolução da HD ($p=0,030$). Além disso, pacientes com menos de 60 anos obtiveram uma probabilidade 5 vezes maior de evoluírem com melhora da HD ($p=0,056$) após 6 meses do tratamento cirúrgico.

Conclusão: Vias neuronais parecem estar relacionadas com o período de início das CVIs durante a fase de enchimento vesical. A idade dos pacientes e a expressão de receptores muscarínicos pode ter um papel prognóstico na resolução da hiperatividade após o tratamento cirúrgico. A análise de um número maior de pacientes é necessário para confirmar estes resultados.

Descritores: Hiperplasia Prostática; Obstrução do Colo da Bexiga Urinária; Bexiga Urinária Hiperativa; Ressecção Transuretral da Próstata; Expressão Gênica; Reação em Cadeia de Polimerase; Urodinâmica; Fator de Crescimento

Neural; Fatores de Crescimento Endotelial; Receptor Muscarínico M2; Receptor Muscarínico M3.

Summary

Nunes MA. Analysis of the expression profile of angiogenesis markers and neurotrophins in the persistence of detrusor overactive after transurethral resection of the prostate for treatment of bladder outlet obstruction due to benign prostatic hyperplasia [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Objective: Non-inhibited contractions (NIC) are present in about 50% of patients with bladder outlet obstruction (BOO) due to benign prostatic hyperplasia (BPH) and 30% of cases persist after surgery. To date, no clinical characteristic can predict accurately which patients are going to improve. We analyzed the role of six detrusor molecular markers in the resolution of NIC after transurethral resection of the prostate (TURP).

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 comprised 10 bladder specimens from patients younger than 60 years who underwent radical prostatectomy with an IPSS < 8 and prostate volume < 30 grams. All patients underwent urodynamic analysis pre and post operatively after 6 months. We analyzed the presence, time to occurrence (first vs second half of the filling phase) and grade (<40 vs >40 cmH₂O) of NIC as well as its resolution after 6 months of surgery. A biopsy of the bladder muscle was performed at the end of TURP for analysis of nerve growth factor receptor (NGFr), nerve growth factor (NGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), endoglin (CD105), muscarinic cholinergic receptor 2 (CHRM2) and muscarinic cholinergic receptor 3 (CHRM3) genes expression. For this purpose, we used the quantitative real time polymerase chain reaction method (qRT-PCR).

Results: Mean patient age was 63 years (50 to 75). NIC were present in 21 (48.8%) patients. According to pre-operative measures, NGF gene expression was 3.3 times greater in patients who presented early NIC as compared to those who presented late contractions ($p=0.047$). The presence or grade of NIC failed to present statistical correlations with the genes. With regard to the outcome, CHRM2 expression was 2.0 times greater among patients who presented resolution of NIC ($p=0.072$). After 6 months of TURP, 77,8% of patients with DO resolution had increased expression of CHRM2 and CHRM3 genes compared with others cases ($p=0,030$). Additionally, patients younger than 60 years obtained a 5.0 times more likely to evolve with improved NIC ($p=0,056$).

Conclusion: Neural pathways seem to be more important in the time to NIC occurrence during the filling phase. Muscarinic cholinergic receptors seem to have a prognostic value in the resolution of NIC after surgery. Analysis of greater number of patients is necessary to confirm these results.

Descriptors: Prostatic Hyperplasia; Obstruction of the Urinary Bladder Neck; Urinary Bladder Overactive; Transurethral Resection of the Prostate; Gene Expression; Polymerase Chain Reaction; Urodynamics; Receptor, Nerve Growth Factors; Endothelial Growth Factors, Muscarinic M2; Receptor, Muscarinic M3.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é uma das principais doenças urológicas, causando um aumento benigno da próstata (ABP) e uma série de sintomas e desconfortos, responsável por grande parte da procura dos pacientes aos urologistas (Thomas, 2000).

O termo HPB deve ser empregado quando alterações hiperplásicas da próstata são confirmadas histopatologicamente, podendo estar ou não associado ao diagnóstico anatômico de ABP, pois somente metade dos homens com HPB desenvolverão ABP (Abrams, 2001). Deste modo, a prevalência da HPB pode ser calculada baseada em critério histológico (número de casos em biópsias) ou em critério clínico (palpação digital da próstata). Pesquisadores analisaram os resultados dos cinco maiores estudos e relataram que a prevalência histológica de HPB aumenta de 42% em homens entre 50 e 59 anos para 88% entre aqueles acima de 80 anos (Berry, 1984). Quando a prevalência é avaliada por palpação digital da próstata, somente 20% dos homens com 50 anos e 45% dos homens com 80 anos de idade apresentam evidências de aumento da glândula.

1.2 Manifestações Clínicas da HPB

O crescimento anatômico da próstata nem sempre se acompanha de manifestações clínicas, as quais são observadas em cerca de um terço dos pacientes com hiperplasia confirmada por histologia; em todas as faixas etárias

o número de pacientes sintomáticos é sempre inferior à frequência com que se identifica o aumento volumétrico da próstata (Abrams, 2001).

As manifestações clínicas da HPB podem incluir sintomas de esvaziamento vesical (jato fraco e intermitente, hesitação, esforço abdominal e gotejamento terminal), que frequentemente resultam da obstrução infravesical (OIV) gerada pela próstata, e/ou sintomas de armazenamento vesical (polaciúria, nictúria, urgência e incontinência urinária), geralmente devido à hiperatividade detrusora (HD).

Os mecanismos através dos quais a HPB produz os sintomas não são completamente compreendidos. A obstrução causada pela ABP decorre de componentes estáticos (aumento da massa tecidual) e dinâmicos (hipertonicidade da musculatura lisa) da próstata. Entretanto, na prática observamos apenas uma pobre correlação entre a presença e severidade dos sintomas e as medidas anatômicas e urodinâmicas de ABP e OIV, respectivamente (Thomas, 2000). Laniado confirmou OIV através de estudo urodinâmico (EUD) em somente 48% dos homens que referiam queixas miccionais de esvaziamento e armazenamento vesical (Laniado, 2004). Por outro lado, os sintomas que são sugestivos de OIV também podem ocorrer devido o enfraquecimento do detrusor ao invés de patologias prostáticas (Abdel-Aziz, 2002).

1.3 Definição e epidemiologia da Hiperatividade Detrusora

A HD é uma causa importante das manifestações miccionais, ocorrendo quando há contrações involuntárias do detrusor durante a fase de enchimento

ou armazenamento vesical, que o paciente não consegue inibir. Em condições normais o detrusor relaxa para permitir que a bexiga aumente sua capacidade volumétrica sem elevar suas pressões (fase de acomodação). Esse sistema de baixa pressão é importante por duas razões: permitir o transporte eficiente de urina através dos ureteres para bexiga e manutenção da continência urinária. Do ponto de vista clínico, foi observado que o comprometimento desta função juntamente com o surgimento de sintomas de armazenamento compromete mais a qualidade de vida do paciente que os sintomas de esvaziamento (Sountoulides, 2010).

A Sociedade Internacional de Continência (ICS) (Abrams, 2003) classifica a HD em idiopática, quando não há uma causa definida, e neurogênica, quando há uma condição neurológica relevante vinculada ao quadro. A HD também pode ser caracterizada dependendo do traçado urodinâmico apresentado. Em 2002, a ICS descreveu dois tipos: (1) HD de fase é definida por uma curva característica, e pode ou não levar a incontinência urinária; (2) HD terminal é definida pela ocorrência única de contração detrusora involuntária durante a capacidade cistométrica que não pode ser suprimida e leva a incontinência que geralmente resulta em esvaziamento vesical completo.

Em geral, a HD de fase tende a ser caracterizada por contrações de amplitudes crescentes a medida que o volume vesical aumenta, sendo este modelo mais comumente visto em HD idiopática. Desta forma, os pacientes podem ser divididos em dois grupos: aqueles com instabilidade primária idiopática e aqueles com instabilidade detrusora associada com obstrução infravesical. A relação entre OIV e HD permanece pouco compreendida (Thomas, 2000).

A HD atinge aproximadamente 16% dos homens nos Estados Unidos (Stewart, 2003) e Europa (Milson, 2001) e a sua prevalência aumenta com a idade. Milson et al. relataram que a prevalência de HD aumenta de 3% entre homens com 40 a 44 anos para 42% naqueles acima de 75 anos (Milson, 2001). A HD e a OIV frequentemente existem simultaneamente. Em um estudo, 45% dos homens com queixas miccionais tinham OIV e HD (Knutson, 2001). Dois estudos independentes observaram que aproximadamente 50% dos homens com sintomas urinários e OIV confirmados pelo estudo urodinâmico possuíam HD (Fusco 2001; Lee, 2004).

Os sintomas, nos homens, frequentemente são causados por OIV ou uma combinação de disfunção vesical, como instabilidade detrusora e falência da contratilidade do detrusor, e OIV. Por outro lado, tais sintomas podem ser gerados exclusivamente por disfunções vesicais independentemente de patologias prostáticas. Este fato é corroborado pela observação de muitos homens com HD que não apresentam OIV, denotando o potencial papel da disfunção vesical primária em sua gênese (Hyman, 2001).

1.4 Fisiopatologia da Hiperatividade Detrusora

Atualmente, as formas de HD poderiam ser explicadas por duas hipóteses principais: teoria miogênica e neurogênica. A separação nestes dois grupos é útil para discutir a etiologia da disfunção, porém, esta divisão é artificial pelo fato das funções musculares e neurais estarem intimamente correlacionadas, e alterações em um secundariamente levarem a mudanças em outro. Alguns estudos, principalmente em modelos animais, observaram as alterações

morfológicas e funcionais no detrusor quando a bexiga permaneceu artificialmente obstruída (Gosling, 1986; Levin, 1986; Sibley, 1985).

Pelo ponto de vista neurogênico, tais estudos mostraram transformações marcantes na inervação vesical onde se observou sua plasticidade, ou seja, capacidade de mudanças dinâmicas com o tempo (Steers, 1988). Evidências histológicas sugeriram que há denervação no detrusor obstruído, com significativa redução dos receptores colinérgicos e, conseqüentemente, levando a supersensibilidade dos receptores muscarínicos a acetilcolina (Sibley, 1987). Além disso, alterações quantitativas e qualitativas nas fibras aferentes periféricas em HD foram observadas, ocorrendo substituição de fibras A-δ em fibras C. As fibras C aferentes medeiam o reflexo de contração vesical após instilação de líquido frio e não estão envolvidas no processo normal de micção (Geirsson, 1993; Geirsson, 1993). Outros possíveis fatores contribuintes postulados são mudanças funcionais nos receptores adrenérgicos (Rohner, 1983) e baixo limiar de ação dos receptores de estiramento vesical (Turner-Warwick, 1983).

A base de teoria miogênica se concentra no papel da célula de músculo liso da bexiga como um caminho comum final em HD. Brading observou que o tecido detrusor na HD, qualquer que seja a causa, se comporta de maneira diferente da bexiga normal não só em relação à atividade, mas também em sua morfologia (Brading, 1994; Brading, 1997). Estudos em microscopia eletrônica demonstraram alterações nas junções intercelulares, responsáveis pela propagação do potencial de ação que originam as contrações sincrônicas e involuntárias da bexiga. A autora argumenta que uma redução dos receptores colinérgicos, como já foi exposta acima, aumentaria tal elo entre as células detrusoras acarretando em hiperatividade.

O mecanismo de micção é dependente do reflexo espino-bulbo-espinal, composta por vias aferentes (sensoriais) e eferentes (motoras) que são integradas e coordenadas por centros espinhais e supra-espinhais. As fibras parassimpáticas lombo-sacrais fornecem os estímulos motores para o músculo detrusor, mediadas pela ação da acetilcolina (Ach) nos receptores muscarínicos (CHRM). O músculo detrusor contém todos os subtipos, localizados principalmente na cúpula vesical, porém, na espécie humana, predominam os subtipos M2 (CHRM2) e M3 (CHRM3), sendo que o subtipo M3 é o principal mediador direto da contração vesical apesar da maior densidade de M2. Como as contrações vesicais humanas, sejam elas normais ou anormais, ocorrem predominantemente via receptores M3, estes subtipos podem ser considerados importantes alvos na fisiopatologia e farmacoterapia da HD (Hegde, 2006).

Poucos estudos reunindo pacientes com OIV e sintomas relatados de HD conseguiram correlacionar com acurácia a associação de variáveis clínicas com os resultados da ressecção endoscópica da próstata (RTUP). Como consequência disso, atualmente não existem métodos diagnósticos que possam prever se a presença de HD está relacionada ao processo obstrutivo prostático ou se consiste em uma disfunção primária da bexiga, tendo visto que as mulheres, mesmo sem OIV também apresentam esta disfunção vesical (Choi, 2013). Da mesma forma, também não existem métodos que nos permitam prever se a mesma irá persistir ou desaparecer após a desobstrução urinária através da prostatectomia ou RTUP. Estudos prévios relataram que os sintomas da HD permanecem em 20 a 40% dos pacientes após cirurgia, confirmando que quase metade dos casos pode apresentar disfunções vesicais não relacionadas à desobstrução prostática (Abrams, 1979; Gormley, 1993). Além disso, o

seguimento em longo prazo mostrou recorrências de tais sintomas em torno de 60% dos pacientes submetidos à RTUP, mesmo permanecendo desobstruídos, denotando também o papel do envelhecimento na gênese da HD (Thomas, 1999).

1.5 Angiogênese no músculo vesical

A resposta do músculo detrusor à OIV está associada com o aumento da massa muscular (hipertrofia) e a proliferação das fibras musculares lisas (hiperplasia) resultando em aumento no peso e tamanho da bexiga (Levin, 1995). Pelo fato de que nenhuma proliferação vascular compensatória acompanha essas mudanças, ocorre uma redução relativa no fluxo sanguíneo vesical. Mitterberger et al., através de análise ultra-sonográfica com Doppler colorido de artérias vesicais intramurais, demonstraram que pacientes com OIV apresentam uma redução significativa do fluxo sanguíneo independentemente do seu grau de repleção (Mitterberger, 2007). Em modelos animais, um estado crônico de hipóxia resultou em HD e na expressão de marcadores apoptóticos em neurônios intrínsecos da parede vesical. Pacientes com HD apresentam denervação vesical, sugerindo que períodos de isquemia vesical e morte neuronal podem predispor hiperatividade vesical (Azadzi, 1999).

A hipertrofia e a hiperplasia muscular vesical oriundas de OIV geram um desequilíbrio entre oferta vascular e demanda de oxigênio e nutrientes às células musculares. Nestas situações, como observado em modelos laboratoriais, pode ocorrer a formação de novos vasos sanguíneos, processo chamado de angiogênese, iniciados pela ativação local de genes através da secreção de

mediadores angiogênicos que ativam uma cascata de mecanismos celulares culminando com o crescimento de novos capilares sanguíneos. Entre os principais marcadores angiogênicos disponíveis em clínica, destacam-se o fator de crescimento endotelial vascular - VEGF (Ferrara, 1992), e a endoglin - CD105 cuja expressão parece estar aumentada em alguns tipos de neoplasia maligna (Duff, 2003). Modelos animais que foram submetidos a obstrução infra-vesical apresentaram aumento na expressão de fatores angiogênicos, entre eles VEGF, que levam ao aumento do suprimento sanguíneo na área (Song, 2013). Nenhum relato descreveu até o presente momento o papel desses marcadores na isquemia vesical, em músculo detrusor nos humanos.

1.6 Neuroplasticidade vesical

Atualmente, alguns autores têm sugerido o papel importante das neurotrofinas na fisiopatologia da HD (Steers, 2006). Como destacado anteriormente, fibras neurais tipo C estão, normalmente, quiescentes durante a fase de enchimento. Em certas condições patológicas podem tornar-se ativas e mecano-sensitivas, levando ao desenvolvimento de HD. Isto ocorre através da substituição local de fibras A- δ em fibras C. Esta habilidade do sistema nervoso em aumentar a mecano-sensibilidade das fibras C denomina-se neuroplasticidade, que é mediada através de fatores neurotróficos nas fibras aferentes. Neurotrofinas são fatores de crescimento que participam no processo de diferenciação, crescimento e manutenção celular, com um largo espectro de atuação no sistema nervoso central e periférico nos mamíferos (Allen, 2006). O fator de crescimento neural (NGF), sintetizado tanto por células neurais quanto

não-neuronais, é liberado na bexiga pelo urotélio, músculo liso detrusor e nas terminações nervosas. De modo similar ao encontrado em estudos experimentais, foi postulado que o aumento dos níveis de NGF na urina, em humanos, poderia sensibilizar vias aferentes na bexiga e aumentar os estímulos sensoriais para o sistema nervoso central gerando HD. Corroborando esta hipótese, níveis urinários aumentados de NGF foram encontrados em pacientes com bexiga hiperativa, processos inflamatórios, HD idiopático e neurogênico, cistite intersticial e OIV (Dupont, 2001).

1.7 Justificativa

Como citado acima, apesar da relação causal existente entre OIV e HD, observa-se que cerca de 30 a 40% dos pacientes submetidos a desobstrução prostática permanecem apresentando HD. A identificação destes casos pré-operatoriamente pode ajudar a definir o prognóstico dos sintomas, sobretudo nos casos com predomínio de sintomas de armazenamento. Até o momento nenhuma variável clínica permite apontar quais pacientes irão apresentar resolução da HD. Kageyama et al. demonstraram que pacientes portadores de HD e OIV apresentaram melhora das CVIs após 6 meses do tratamento cirúrgico (RTUP) quando as contrações vesicais iniciavam-se após 160 ml de enchimento vesical no EUD pré-operatório. Aqueles que possuíam CVIs de forma contínua, desde o início do enchimento vesical, apresentaram os piores resultados quanto a resolução da HD na evolução (Kageyama, 2000).

O melhor conhecimento da fisiopatologia da HD em pacientes portadores de HPB e OIV pode ser a chave para o encontro de marcadores moleculares que

permitam identificar quais pacientes terão resolução da HD pós-operatoriamente. Até o presente momento nenhuma análise dos marcadores de angiogênese e das neurotrofinas, em tecido de músculo liso detrusor, foi realizada em pacientes com história de HD e OIV. Desta forma, neste estudo avaliamos a expressão do VEGF e o CD-105 como marcadores de angiogênese, e do NGF assim como de seu receptor (NGFr), como neurotrofinas envolvidas na modulação neuronal em músculo detrusor de pacientes com HD. Além disso, também verificamos a expressão dos receptores muscarínicos tipo 2 (CHRM2) e 3 (CHRM3), que predominam em número na bexiga, e são responsáveis pelo processo de contração vesical (Hegde, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

Determinar o perfil de expressão gênica de marcadores de angiogênese (VEGF e CD-105), neurotrofinas (NGF e NGF receptor) e receptores muscarínicos (CHRM2 e CHRM3) no tecido muscular vesical de pacientes com OIV secundária à HPB, e sua relação com a evolução da HD após a desobstrução prostática.

2.2. Objetivos Secundários

- Correlacionar variáveis clínicas e urodinâmicas com a evolução pós-operatória da HD em pacientes submetidos à desobstrução prostática.
- Avaliar a relação entre os níveis de expressão de marcadores de angiogênese e neurotrofinas com outras variáveis clínicas e urodinâmicas em homens com OIV devido à HPB.

3. MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

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

3.2. Local e época

O estudo proposto foi desenvolvido na Divisão de Clínica Urológica do Hospital das Clínicas e no Laboratório de Investigação Médica 55 (LIM-55) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo executado no período de janeiro de 2011 a setembro de 2013.

3.3. Sujeitos

Foram avaliados 43 pacientes atendidos no Setor de Próstata da Divisão de Clínica Urológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), com queixas de sintomas miccionais secundários à OIV por HPB, candidatos a tratamento cirúrgico através de ressecção transuretral da próstata (RTU-P). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1), sendo este projeto submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisas sob o protocolo número 0829/10 (anexo 2).

Como critérios de exclusão foram estabelecidos: pacientes com mais de 75 anos, antecedente de cirurgia prostática e/ou cirurgia pélvica, pacientes em uso sonda vesical de demora, portadores de bexiga neurogênica, neuropatia

diabética, Doença de Parkinson, em uso de medicamentos que pudessem alterar 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, pacientes que não realizaram estudo urodinâmico.

3.4. Grupo Controle

Neste grupo foram selecionados 10 pacientes que foram submetidos a prostatectomia radical retropúbica devido adenocarcinoma de próstata. Uma amostra de músculo detrusor foi colhida no momento da abertura da bexiga. As características clínicas do grupo estão expostas na tabela 3. Os pacientes tinham idade média de 58 anos, peso de próstata menor que 30 gramas ao ultra-som e sem projeção intra-vesical, escore internacional de sintomas prostáticos (IPSS) menor que 7 e aceitaram participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.5. Intervenção

Todos os participantes realizaram anamnese (incluindo o IPSS) (anexo 3) e exame físico (incluindo toque digital da próstata) direcionado para as queixas miccionais, aferido índice de massa corpórea (IMC) através do cálculo do $\text{Peso (Kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$, medida do antígeno prostático específico (PSA), creatinina, exame de urina tipo I, ultra-som abdominal e pélvico, e estudo urodinâmico completo no pré e pós-operatório (6º mês), de acordo com os padrões

estabelecidos pela sociedade de ICS (Abrams, 2003). As variáveis urodinâmicas avaliadas foram a sensibilidade vesical, presença de HD, amplitude das CVIs, período de início das CVIs, perda urinária, fluxo máximo, índice de contratilidade vesical, complacência vesical, capacidade cistométrica máxima, pressão detrusora de abertura e no fluxo urinário máximo e resíduo pós miccional. Os pacientes realizaram tratamento cirúrgico da OIV, confirmada pelo estudo urodinâmico, através da RTUP. No final do procedimento foi realizada uma biópsia profunda da parede posterior bexiga com a alça de ressecção monopolar para obtenção de amostra do músculo detrusor. Este foi isolado da mucosa vesical através de dissecação manual. Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. Este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisas do HCFMUSP. Os pacientes foram divididos em dois grupos: O grupo 1 incluiu 21 pacientes com HD e no grupo 2 foram incluídos 22 pacientes sem HD, ambos definidos pelo EUD.

A medida de expressão gênica dos marcadores de angiogênese (VEGF e CD-105), Neurotrofinas (NGF e NGFr) e receptores muscarínicos tipo 2 e 3 (CHRM2 e CHRM3) no músculo detrusor de todos os pacientes foi realizado através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Essa técnica é referida como "padrão ouro" para a análise de expressão gênica por apresentar alta especificidade e sensibilidade (Derveaux, 2010).

Os níveis de expressão gênica foram obtidos, primeiramente, através da comparação com o grupo controle, e então confrontados entre os pacientes com e sem HD e avaliados em relação às outras variáveis clínicas e laboratoriais.

Após seis meses de pós-operatório, os pacientes realizaram novo estudo urodinâmico para avaliação da melhora da HD. Os níveis de expressão dos marcadores de angiogênese, neurotrofinas e seus receptores pré-operatórios foram novamente comparados entre os pacientes que permaneceram e que não permaneceram com HD.

3.6. Extração do RNA

Para extração do RNA total, utilizou-se amostras de músculo detrusor que foram enviados em solução estabilizadora de RNA (RNA later, Applied Biosystems) após sua remoção, e submetidos imediatamente a congelamento em nitrogênio líquido e estocado em freezer -80°C até o processamento. O RNA total foi extraído com o uso do Kit Ambion mirVana (Applied Biosystems), 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 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%. Então a solução foi transferida para um filtro e centrifugada a 10.000 g por 15 seg. No filtro que contém 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 então 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 segundos. O filtrado contendo o RNA foi então armazenado em freezer -80°C até ser utilizado.

A pureza e concentração do RNA eram mensuradas em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientifica, Wilmington, EUA) (260/280 nM) e a integridade verificada em Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, CA, EUA).

3.7. Transcrição reversa (RT)

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

Resumidamente, o RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20 µL. A este volume eram 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 era então armazenado a -20°C até o uso.

3.8. Análise de expressão de genes por PCR em tempo real quantitativo

Os primers utilizados para amplificação dos genes foram desenhados com o auxílio do programa primerExpress (Applied Biosystems, CA, EUA), e as reações realizadas no termociclador ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, CA, EUA) no modo standard. Para quantificação das amostras foi utilizado o reagente TaqMan® (Applied Biosystems, CA, EUA), mostrado na figura 1 a seguir.

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

Figura 1: 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. Imagem apresentada em tese de doutorado e cedida por Sabrina Reis.

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).

Tabela1. Primers utilizados para quantificação da expressão dos fatores de crescimento, inflamação e angiogênese na HPB

Genes	Identificação do ensaio
NGF	Hs00171458_m1
NGFr	Hs00609977_m1
CHRM3	Hs00327458_m1
VEGF	Hs00900055_m1
CD105	Hs00923996_m1
CHRM2	Hs00265208_s1
B2M	Hs99999907_m1

3.9. Análise estatística

O nível de expressão dos genes foi avaliada através da análise de expressão relativa entre os grupos de pacientes com e sem OIV por HPB determinado 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 OIV e a média de expressão de todos indivíduos sem OIV, segundo método validado para análise de expressão relativa de genes (Livak, 2001). No gráfico construído (gráfico 1), 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 OIV (grupo controle), com a qual a expressão dos indivíduos com OIV é comparada. Cada barra representa um único indivíduo com OIV; 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.

4. RESULTADOS

4.1 Características Clínicas

As características clínicas dos pacientes submetidos a RTUP estão demonstradas na tabela 2. Dos 43 homens selecionados, 21 pacientes apresentaram HD no EUD, enquanto que 22 pacientes não possuíam HD.

Os pacientes demonstraram idade média de 63 anos (50 – 75 anos). O tempo de sintomas médio foi de 42 meses (12 – 120 meses) e o IPSS médio foi de 22 (5 – 34). O PSA médio foi de 2,97 ng/mL (0,4 – 10,2 ng/mL) e o tamanho médio da próstata, calculado por US, foi de 54g (22 – 101g), sendo que 67% do total apresentou volume menor que 60g

A tabela 2 demonstra que os grupos foram bastante homogêneos, isto foi observado através da semelhança entre os dados pré-operatórios, em relação a idade do paciente, tempo de sintomas, IIEF, QoL, IMC, presença e tipo de comorbidades, valor do PSA e tamanho da próstata no US. As únicas variáveis que demonstraram-se diferentes foi a presença clínica de urgência miccional ($p=0,000$) e o escore de sintomas ($p=0,047$).

Tabela 2. Características clínicas dos 43 pacientes com diagnóstico de HPB e submetidos à RTU de próstata.

Variável Clínica	HD (n=21)	Sem HD (n=22)	Total (n=43)	p
Idade (anos)				
Média	65	61,18	63	0,094 *
Mediana	64	62,5	63	
Desvio Padrão	7,4	5,9	6,9	
Variação	51 - 75	50 -75	50 – 75	
Tempo de sintomas (meses)				
Média	43	41,8	42	0,940 *
Mediana	36	36	36	
Desvio Padrão	27,0	29,8	28,2	
Variação	12 – 120	12 - 120	12 – 120	

Tabela 2. Características clínicas dos 43 pacientes com diagnóstico de HPB e submetidos à RTU de próstata (continuação).

Variável Clínica	HD (n=21)	Sem HD (n=22)	Total (n=43)	p
IPSS (score)				
Média	25	19	22	0,047 *
Mediana	27	21	25	
Desvio Padrão	6,0	8,0	7,4	
Variacão	12 – 34	5 – 29	5 – 34	
IIEF (score)				
Média	13	17,8	14	0,128 *
Mediana	15	18	16	
Desvio Padrão	6,6	4,6	6,4	
Variacão	0 – 21	11 – 22	0 – 22	
Qualidade de Vida (score)				
Média	5	4,27	5	0,188 *
Mediana	5	4	4	
Desvio Padrão	0,7	0,9	0,8	
Variacão	4 – 6	3 – 6	3 – 6	
Urgência Miccional				
Sim	19	5	24	0,000 **
IMC				
Média	27,88	28,17	28,02	0,851 *
Mediana	26,10	28,38	28,06	
Desvio Padrão	5,4	4,1	4,8	
Variacão	21.7 – 43.80	22.5 – 38.5	21.7 – 43.80	
Comorbidades				
HAS	12	11	23	0,639 **
Diabetes Mellitus	7	2	9	0,346 **
Dislipidemia	4	2	6	0,051 **
Tabagismo	5	4	9	0,650 **
PSA (ng/mL)				
Média	3,07	2,87	2,97	0,785 *
Mediana	2,,30	2,30	2,30	
Desvio Padrão	2,5	2,3	2,3	
Variacão	0.4 – 9.20	0.5 – 10.2	0.4 – 10.2	
Tamanho da próstata (g) (US)				
Média	55	53,26	54	0,779 *
Mediana	54	53	54	
Desvio Padrão	20,1	15,3	17,6	
Variacão	22 – 97	28,7 – 101	22 – 101	
≥ 60g n(%)	9	5	14	
< 60g n (%)	12	17	29	

*Teste T ** Teste Mann-Whitney

As características clínicas dos pacientes que participaram como grupo controle, estão demonstradas na Tabela 3, abaixo.

Tabela 3. Características clínicas dos 10 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 Clínico (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

Neste grupo os pacientes selecionados eram, na média, mais jovens, possuíam tamanho prostático menor e apresentavam-se relativamente assintomáticos quanto a queixas miccionais, apesar de não realizarem estudo urodinâmico que comprovasse ausência de obstrução infra-vesical.

4.2 Características Urodinâmicas

Como relatado anteriormente, todos os pacientes submetidos a RTUP realizaram estudo urodinâmico completo como protocolo de avaliação pré-operatória. Em todos os casos foi confirmado o diagnóstico de OIV, associado ou não à presença de HD. Os dados são observados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados urodinâmicos pré-operatórios.

Hiperatividade Detrusora (HD)	Sim	Não	p
Número de pacientes (n)	21	22	
Amplitude da CVI (cmH ₂ O)			#
Média	72	0	
Qmax (ml/seg)			0,005 *
Média	9,6	6,62	
Pdet Qmax (cm H ₂ O)			0,296 *
Média	72	81,27	
Índice de contratilidade vesical (Pdet Qmax + 5 Qmax)			0,505 *
Média	120	114,3	
CCM (ml)			0,380 *
Média	379	411	
Pabertura (cmH ₂ O)			0,981 *
Média	69	69,0	
Período da CVI (n)			#
Precoce	10	0	
Tardio	10	0	
Integral	1	0	
Perda urinária (n)	11	0	0,000 *
Complacência (ml/cmH ₂ O)			0,523 **
Média	36,81	55,36	
Sensibilidade (n)			0,212 **
Diminuída	0	3	
Normal	15	14	
Aumentada	7	5	
Resíduo pós-miccional (ml)			0,145 *
Média	61	110,9	

* Teste T ** Teste do Qui-quadrado # Estatística não-pertinente

Abreviações: CVI (contrações vesicais involuntárias); Qmax (Fluxo máximo); Pdet Qmax (pressão do detrusor no fluxo máximo); CCM (capacidade cistométrica máxima); Pabertura (pressão do detrusor no início da micção).

Exceto pelas características inerentes às contrações vesicais involuntárias (CVI) e fluxo urinário máximo aferido, não observamos diferenças estatísticas entre a maioria das variáveis analisadas, tais como pressão do detrusor no fluxo máximo e no início da micção, índice de contratilidade vesical, capacidade cistométrica máxima, resíduo pós miccional, complacência e sensibilidade vesical. Em contrapartida, a presença de CVI levou a presença de perdas urinárias em 52,3% dos pacientes com HD, o que ocorreu em nenhum paciente do outro grupo. Essas contrações possuíam amplitude média de 72 cmH₂O e tiveram início de forma similar tanto na primeira metade (CVI precoce) quanto na metade final da fase de enchimento vesical (CVI tardio).

Após 6 meses da RTUP os pacientes realizaram EUD de controle. Os dados obtidos estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5. Dados urodinâmicos pré e pós-operatórios dos 43 pacientes avaliados

Características Urodinâmicas	Pré	Pós	p
Número de pacientes (n)	43	43	
Qmax (ml/seg) Média (DP)	8,0 (3,5)	19,3 (5,8)	0,000 *
Pdet Qmax (cm H ₂ O) Média (DP)	77,0 (27,1)	32,1 (10,7)	0,000 *
CCM (ml) Média (DP)	395,4 (119,6)	409,8 (98,2)	0,454 *
Pabertura (cmH ₂ O) Média (DP)	69,0 (22,7)	28,5 (13,4)	0,000 *
Amplitude da CVI (cmH ₂ O) Média (DP)	34 (44,7)	10,0 (24,2)	0,002 *
Hiperatividade Detrusora (n)	21	7	0,002 **
Perda urinária (n)	11	3	0,127 *
Complacência (ml/cmH ₂ O) Média (DP)	46,7 (63,6)	94,0 (115,7)	0,043 *
Resíduo pós-miccional (ml) Média	88 (108,6)	0	#

* Teste T pareado ** Teste do Qui-quadrado # Estatística não-pertinente

Analizando os pacientes dos dois grupos em conjunto, obtivemos melhora na maioria das variáveis urodinâmicas analisadas em relação aos dados pré-operatórios, comprovando que houve desobstrução infra-vesical importante, com aumento significativo do fluxo máximo e da complacência vesical, assim como a diminuição da pressão de abertura uretral e pressão do detrusor no fluxo máximo. Dos 21 pacientes que apresentaram HD pré-RTUP, em 10 (47,6%) houve persistência de HD, porém com diminuição significativa da amplitude média das CVIs aferidas.

Quando comparamos somente o grupo de HD pré-RTUP, não encontramos diferenças estatísticas entre as variáveis urodinâmicas daqueles que persistiram ou não com HD após tratamento, como observado na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6. Dados urodinâmicos pós-operatórios (6º mês) em pacientes com HD pré-RTUP.

Persistência de Hiperatividade Detrusora após 6 meses	Sim	Não	p
Número de pacientes (n)	10	11	
Qmax (ml/seg)			0,887 **
Média	20,7	19,7	
Pdet Qmax (cm H ₂ O)			0,813 **
Média	37	30,7	
CCM (ml)			0,094 *
Média	322	398	
Pabertura (cmH ₂ O)			0,504 *
Média	34	27,4	
Amplitude da CVI (cmH ₂ O)			#
Média	47,4	0	
Perda urinária (n)	3	0	0,023 **
Complacência (ml/cmH ₂ O)			0,242 *
Média	35,7	106	
Resíduo pós-miccional (ml)			#
Média	0	0	

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney #Estatística não-pertinente

4.3 Análise das variáveis clínicas e urodinâmicas com resolução da HD

Realizando uma análise univariada de todas variáveis clínicas em associação com resolução da HD, observou-se que pacientes com idade abaixo de 60 anos possuíram probabilidade 5 vezes maior de apresentarem melhora da HD ($p=0,056$) após 6 meses de tratamento cirúrgico para desobstrução prostática quando comparados àqueles com idade igual ou maior que 60 anos, conforme observado na tabela 7.

Tabela 7. Características clínicas relacionadas a resolução da HD.

Variável Clínica	P
HAS	0,906 *
Dislipidemia	0,949 *
Diabetes Melitus	0,787 *
Tabagismo	0,323 *
Urgência Miccional	0,388 *
IMC	0,116 *
Idade	0,056 *
Tempo de sintomas	0,110 *
IPSS	0,906 *

* Teste do Qui-quadrado

Porém, numa análise multivariada de todas as características clínicas e urodinâmicas em associação com resolução da HD, nenhum item mostrou correlação com a resolução da mesma.

4.4 Análise da expressão gênica do grupo estudado

A análise da expressão gênica de todos os pacientes foi comparada ao grupo controle, representada pela linha de base do gráfico, pela técnica de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os resultados estão expostos no gráfico 1 e na tabela 8 a seguir:

Gráfico 1. Expressão relativa dos genes no músculo detrusor em relação ao grupo controle.

Tabela 8. Média de expressão dos genes estudados comparados ao grupo controle.

Expressão Gênica				
Genes	Média (DP)	Mediana	Superexpressão n (%)	Subexpressão n (%)
NGFr	3,32 (7,29)	1,03	22 (51,2)	21 (48,8)
NGF	1,18 (1,37)	0,87	20 (46,5)	23 (53,5)
CHRM3	16,82 (23,13)	10,91	36 (83,8)	7 (16,2)
CHRM2	11,53 (8,81)	10,46	39 (90,7)	4 (9,3)
VEGF	3,39 (3,87)	2,19	33 (76,8)	10 (23,2)
CD-105	1,47 (2,51)	0,46	13 (30,2)	30 (60,8)

Em relação ao grupo controle, observamos uma expressão média 3 vezes maior de NGFr nos pacientes obstruídos. O CHRM3 foi superexpresso em 83,8% destes pacientes, com uma expressão média 16 vezes maior, assim como o

CHRM2 que estava superexpresso em 90,7% dos obstruídos, com uma expressão média 11 vezes maior. O VEGF também foi superexpresso em 76,8% dos pacientes, com uma média de expressão 3 vezes maior. O CD-105 apresentou-se subexpresso em 60,8% dos pacientes com uma expressão média 4 vezes menor.

O nível médio de expressão relativa dos genes tendo em consideração as características clínicas dos pacientes está demonstrado nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Nível de expressão relativa dos seis genes em relação a idade e IMC.

Genes	Idade			IMC		
	Média (desv. padrão)			Média (desv. padrão)		
	<60 anos (n=12)	≥60 anos (n=31)	p	<30 (n=29)	≥30 (n=14)	p
NGFr	2,712 (3,888)	3,570 (8,353)	0,747*	3,089 (8,060)	3,970 (4,846)	0,748*
NGF	1,225 (1,539)	1,163 (1,332)	0,896*	0,983 (1,113)	1,755 (1,897)	0,276**
CHRM3	16,369 (14,955)	16,999 (25,826)	0,937*	15,291 (23,892)	21,280 (21,175)	0,466*
CHRM2	15,292 (11,268)	10,079 (7,375)	0,082*	11,981 (9,665)	10,234 (5,857)	0,577*
VEGF	2,529 (1,477)	3,727 (4,451)	0,369*	3,984 (4,313)	1,673 (1,020)	0,092**
CD-105	1,449 (2,011)	1,491 (2,710)	0,961*	1,517 (2,784)	1,369 (1,562)	0,869*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

Tabela 10. Nível de expressão relativa dos seis genes em relação ao IPSS e Tempo de sintomas.

Genes	IPSS			Tempo de sintomas		
	Média (desv. padrão)			Média (desv. padrão)		
	<19 (n=8)	≥19 (n=35)	p	<24 meses (n=9)	≥24 meses (n=34)	p
NGFr	2,972 (3,659)	2,163 (3,411)	0,594*	2,155 (1,708)	3,632 (8,172)	0,618*
NGF	1,433 (1,869)	0,927 (1,076)	0,382*	1,129 (1,003)	1,194 (1,469)	0,902*
CHRM3	10,703 (7,362)	21,720 (31,521)	0,343*	12,467 (13,040)	17,977 (25,164)	0,532*
CHRM2	10,754 (3,977)	8,579 (7,003)	0,421*	12,039 (7,969)	11,400 (9,133)	0,849*
VEGF	3,090 (0,970)	3,303 (4,404)	0,894*	3,060 (2,853)	3,480 (4,136)	0,776*
CD-105	1,428 (1,952)	1,847 (3,344)	0,745*	1,079 (1,187)	1,585 (2,762)	0,596*

* Teste T

No geral, não houve nível de expressão gênica com diferença significativa entre as variáveis estudadas, porém, homens com idade abaixo de 60 anos tiveram uma média de expressão maior de CHRM2 quando comparado àqueles com idade igual ou superior a 60 anos ($p=0,082$). Além disso, pacientes obesos apresentaram médias de expressão menores de VEGF comparados aos não obesos ($p=0,092$).

O nível médio de expressão relativa dos genes em relação as características do estudo urodinâmico pré-operatório dos pacientes está demonstrado nas tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11. Nível de expressão relativa dos seis genes em relação a presença de HD e amplitude das CVIs.

Genes	HD			Amplitude da CVI		
	Média (desv. padrão)			Média (desv. padrão)		
	Sim (n=21)	Não (n=22)	p	<40 cm H2O (n=6)	≥40 cm H2O (n=15)	p
NGFr	1,977 (3,229)	4,531 (9,548)	0,288*	3,011 (5,123)	1,460 (1,820)	0,352*
NGF	0,882 (1,066)	1,465 (1,587)	0,167*	0,568 (0,498)	1,008 (1,215)	0,407*
CHRM3	22,576 (30,936)	11,332 (9,696)	0,382**	22,187 (25,941)	22,732 (33,568)	0,972*
CHRM2	12,594 (10,123)	10,529 (7,458)	0,448*	7,765 (5,564)	14,526 (11,015)	0,173*
VEGF	2,711 (2,717)	4,043 (4,701)	0,265*	1,413 (1,071)	3,231 (3,021)	0,172*
CD-105	1,157 (1,444)	1,787 (3,228)	0,418*	0,710 (0,813)	1,336 (1,619)	0,383*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

Tabela 12. Nível de expressão relativa dos seis genes em relação ao período de início das CVIs.

Período da CVI			
Média (desv. padrão)			
Genes	Precoce (n=11)	Tardio (n=10)	p
NGFr	3,174 (4,293)	0,780 (0,701)	0,233**
NGF	1,317 (1,321)	0,403 (0,318)	0,047*
CHRM3	11,389 (8,552)	34,882 (41,525)	0,324**
CHRM2	10,554 (5,672)	14,839 (13,464)	0,888**
VEGF	2,259 (2,947)	3,210 (2,496)	0,437*
CD-105	0,997 (1,063)	1,333 (1,819)	0,607*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

Tabela 13. Nível de expressão relativa dos seis genes em relação a Complacência e Índice de Contratilidade Vesical.

Genes	Complacência			Índice de Contratilidade Vesical			
	Média (desv. padrão)			Média (desv. padrão)			
	<15 cmH ₂ O/ml (n=10)	≥15 cm H ₂ O/ml (n=33)	p	<100 (n=12)	100-150 (n=26)	>150 (n=4)	p
NGFr	7,746 (14,763)	2,142 (2,919)	0,562***	9,324 (13,575)	1,486 (1,654)	1,287 (1,428)	0,014**
NGF	1,825 (2,208)	0,985 (0,968)	0,452***	1,766 (2,065)	0,941 (0,961)	0,848 (1,300)	0,224**
CHRM3	21,274 (39,342)	15,475 (16,091)	0,494*	13,994 (14,742)	17,700 (25,403)	20,534 (33,185)	0,868**
CHRM2	14,334 (8,419)	10,686 (8,880)	0,256*	15,631 (11,440)	10,407 (7,651)	6,250 (4,463)	0,122**
VEGF	4,434 (4,941)	3,077 (3,522)	0,338*	4,021 (4,496)	3,048 (3,704)	2,227 (1,777)	0,670**
CD-105	1,897 (2,298)	1,353 (2,592)	0,554*	1,880 (2,359)	1,394 (2,795)	0,835 (0,852)	0,765**

* Teste T ** ANOVA *** Teste de Mann-Whitney

Na análise conjunta dos pacientes, demonstrou-se que houve uma expressão significativamente maior de NGFr naqueles que possuíam índice de contratilidade vesical abaixo de 100 ($p=0,014$), com uma média de expressão 8 vezes maior que os outros grupos.

A presença e a amplitude das CVIs falharam em demonstrar correlações estatísticas com os genes.

Quando observamos somente os pacientes portadores de HD, A expressão gênica do NGF apresentou significância estatística em relação ao período de ocorrência das CVIs, conforme também demonstrado no Gráfico 2. Sua expressão foi 3,3 vezes maior naqueles que apresentaram CVIs precocemente,

comparados aqueles que as iniciaram na segunda metade do enchimento vesical ($p=0.047$).

Gráfico 2. Expressão gênica conforme início da HD

Os níveis de expressão gênica de acordo com a resolução ou persistência da HD após 6 meses de tratamento cirúrgico para OIV estão ilustrados na Tabela 14 abaixo:

Tabela 14. Nível de expressão relativa dos seis genes em relação a Persistência de HD após 6 meses de tratamento cirúrgico.

Persistência de HD			
Média (desv. padrão)			
Genes	Sim (n=10)	Não (n=11)	p
NGFr	3,077 (4,289)	0,877 (1,022)	0,258**
NGF	0,977 (1,384)	0,796 (0,729)	0,707*
CHRM3	13,165 (20,250)	31,132 (37,094)	0,191*
CHRM2	8,217 (4,691)	16,574 (12,188)	0,072**
VEGF	1,787 (1,729)	3,552 (3,232)	0,141*
CD-105	0,586 (0,543)	1,677 (1,811)	0,468**

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

O único gene que se destacou foi o CHRM2. O nível médio de expressão deste foi 2 vezes maior entre os pacientes que obtiveram interrupção das CVIs ($p=0.072$), como observamos no gráfico 3 abaixo:

Gráfico 3. Expressão gênica conforme resolução da HD.

Para a avaliação subsequente da persistência da HD categorizamos os pacientes em dois grupos, aqueles que tinham expressão gênica menor e pacientes com expressão gênica maior que a mediana, e comparamos os dados com a persistência da HD. Os resultados estão ilustrados na tabela 15 a seguir:

Tabela 15 - Expressão categorizada de CHRM2 e CHRM3 em relação à Persistência de HD após 6 meses de tratamento cirúrgico.

Resolução da HD	Expressão Gênica % (n)		p
	Menor que a mediana	Maior que a mediana	
Genes			
CHRM3	27,3% (3)	72,7% (8)	0,050*
CHRM2	27,3% (3)	72,7% (8)	0,050*
CHRM3 / CHRM2	22,2% (2)	77,8% (7)	0,030*

* Teste do Qui-quadrado

Nesta análise conjugada, observamos que, entre os pacientes que evoluíram com resolução da HD no pós-operatório, houve expressão gênica dos receptores muscarínicos tipo 2 e 3 maior que a mediana em um número significativamente maior de pacientes, tanto na comparação isolada de um receptor, como na avaliação conjunta de ambos ($p=0,030$).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo observamos, através de confirmação objetiva, melhora significativa das principais variáveis urodinâmicas aferidas em ambos os grupos, como Qmax, Pdet Qmax, Pabertura e resíduo pós-miccional após o tratamento cirúrgico da OIV. A persistência de HD ocorreu em 47,6% (10 dos 21 pacientes), sendo notado um risco 5 vezes maior de persistência da HD naqueles acima de 60 anos, após 6 meses da RTUP. Resumidamente, nos pacientes obstruídos, o marcador de angiogênese VEGF estava superexpresso na grande maioria dos casos, com uma média de expressão 3 vezes maior. Contudo apresentaram níveis superiores naqueles que não possuíam hiperatividade pré-operatória e naqueles que evoluíram com resolução da mesma após o tratamento.

Nossos resultados também denotam uma expressão média 3 vezes maior de NGFr nos pacientes obstruídos, porém com uma expressão média 2 vezes menor do NGF e NGFr nos pacientes portadores de HD. Neste grupo, notou-se a superexpressão significativa de NGF nos pacientes que apresentaram início das CVIs na primeira fase de enchimento vesical. Em relação a evolução pós-operatória no grupo portador de HD, observou-se uma expressão relativa maior das neurotrofinas naqueles que persistiram com hiperatividade após a cirurgia. Outro dado relatado foi a superexpressão do CHRM3 em 83,8% dos pacientes obstruídos, com uma expressão média 16 vezes maior, assim como o CHRM2 que estava superexpresso em 90,7% dos obstruídos, com uma expressão média 11 vezes maior. Os pacientes que evoluíram com melhora urodinâmica pós-operatória da HD apresentaram uma expressão média 2 vezes maior dos CHRMs comparado aos que mantiveram tais contrações.

Nos últimos anos, OIV e HD foram estudadas como as duas principais alterações decorrentes da HPB nos homens. Trabalhos pré-clínicos e da área

de pesquisa básica humana vem trazendo novas percepções sobre o entendimento da fisiopatologia dos sintomas do trato urinário inferior. Muitas evidências suportam o papel funcional do urotélio na expressão de receptores sensoriais, muscarínicos, nicotínicos e canabinóides, assim como de fatores neurotróficos, óxido nítrico, acetilcolina e prostaglandinas. Em paralelo, células intersticiais e miofibroblastos localizados no suburotélio e no detrusor, que se encontram em justa aposição a fibras nervosas e ligadas através de “gap junctions”, ou seja, canais que permitem o movimento de moléculas e íons diretamente de uma célula para outra, expressão receptores para diversos neurotransmissores e neuropeptídeos que podem gerar contrações detrusoras espontâneas.

Essas descobertas suportam a base da teoria miogênica, que em conjunto com o papel revisado do urotélio e suburotélio, tem alimentado a idéia de que as estruturas da parede vesical funcionam como um sincício intrinsecamente interativo (Apostolidis, 2011). Porém, poucos estudos reunindo pacientes com OIV e sintomas relacionados a HD correlacionaram a associação de variáveis clínicas e urodinâmicas com os resultados finais do tratamento cirúrgico. Neste sentido, também não existem métodos que nos permitam prever se tais sintomas irão persistir ou desaparecer após a desobstrução prostática.

Sabe-se que até 60 % dos homens submetidos a RTUP apresentarão recorrência de sintomas após um período longo de seguimento (Thomas, 1999), resultando num efeito negativo na qualidade de vida. Alguns estudos como de Tanaka e cols (2006) demonstraram os resultados após 3 meses da RTUP em 92 pacientes. A eficácia da cirurgia foi maior na medida em que o grau de obstrução também aumentava. A presença de HD ou de hipocontratilidade vesical não

influenciaram os resultados. Seki e cols (2006) analisaram 384 homens com HPB e, após 12 meses da RTUP, o grau de obstrução prostática inicial foi um preditor positivo de melhora do IPSS e QoL no pós-operatório, enquanto que a presença de HD comportou-se como um preditor negativo. O mesmo autor também observou 190 homens com OIV e HD sendo observado que o grau de obstrução prostática inicial influencia de forma positiva na melhora final do Qmax, enquanto que a idade deles influenciava de forma negativa (Seki, 2006).

A conclusão que pode ser tirada desses trabalhos é que o grau de obstrução é o fator mais crítico na eficácia final do tratamento cirúrgico da HPB, enquanto que HD e hipocontratilidade podem, especialmente na ausência de OIV, ter efeitos negativos indesejados. No presente estudo foi observado objetivamente, através de confirmação urodinâmica, melhora significativa das principais variáveis aferidas em ambos os grupos, como Qmax, Pdet Qmax, Pabertura e resíduo pós-miccional. Resultados de estudos prévios notaram que sintomas relacionados a bexiga hiperativa, como urgência e frequência, persistiram em 20 – 40% dos pacientes após prostatectomia (Abrams, 1978; Abrams, 1979). Estes dados corroboram com nossos achados, pois observamos a persistência de CNL em 47,6% (10 dos 21 pacientes) no grupo com HD. Embora seja relatado na literatura que a persistência de HD após RTUP é mais frequente em homens acima de 80 anos (Gormley, 1993), em nossa análise achamos uma correlação significativa naqueles acima de 60 anos, que apresentaram uma probabilidade 5 vezes maior de não evoluírem com melhora urodinâmica após 6 meses de desobstrução prostática.

A alteração mais proeminente na evolução da obstrução infra-vesical é o aumento da massa vesical. Modelos animais experimentais, frequentemente

usados para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos da OIV em HPB, mostram que a bexiga responde, inicialmente, com hipertrofia do músculo detrusor e aumento da pressão intravesical para manter um fluxo urinário constante (Mostwin, 1991). Esse aumento de massa varia de acordo com o grau e tempo de obstrução, levando a diminuição do fluxo sanguíneo detrusor e, conseqüentemente, a um estado de hipóxia.

A isquemia já mostrou produzir modificações significativas na função vesical, levando a perda de complacência e estados de hiperreflexia (Azadzi, 1999). Em pacientes idosos, a isquemia vesical oriunda de doenças vasculares foi implicada no papel fisiopatológico do desenvolvimento dos sintomas miccionais (Ponholzer, 2006). Em mamíferos, a resposta celular ao estado de hipóxia é baseada na ação da transcrição do fator induzível por hipóxia (HIF - hypoxia inducible factor) (Semenza, 2001). Este é um ativador transcricional oxigênio-dependente que ativa genes envolvidos no transporte e metabolismo da glucose, levando a supra-regulação de produtos pró-angiogênicos como o VEGF, no intuito de aumentar o suprimento sanguíneo local.

O presente estudo analisou a expressão deste fator pró-angiogênico e do CD-105, que possui importante papel como marcador angiogênico em neoplasia maligna de bexiga. No geral, ambos os genes foram superexpressos, na média, nos pacientes obstruídos em relação ao grupo controle, denotando a presença de um estado hipóxico no músculo detrusor perante a OIV. Contudo, apresentaram níveis superiores naqueles que não possuíam hiperatividade e estavam, na média, expressos duas vezes mais naqueles que evoluíram com melhora da HD após o tratamento. Estes dados reforçam a teoria do papel da isquemia vesical na etiologia da hiperatividade mas também a destacam como

um fator relevante na evolução e prognóstico da patologia. Além disso, algumas evidências apoiam a hipótese de que muitas proteínas implicadas no desenvolvimento vascular e linfático também são requisitadas na orientação axonal. Já está estabelecido que o VEGF desempenha um papel crucial no desenvolvimento do sistema nervoso, e quando desregulado, contribui no surgimento de várias desordens neurodegenerativas (de Almodovar, 2009). A subexpressão do VEGF relatada naqueles que persistiram com HD pode reforçar este conceito.

Atualmente, alguns autores têm sugerido o papel importante das neurotrofinas na fisiopatologia da HD (Steers, 2006). Como destacado anteriormente, fibras neurais tipo C estão, normalmente, quiescentes durante a fase de enchimento. Em certas condições patológicas podem tornar-se ativas e mecano-sensitivas, levando ao desenvolvimento de HD. Isto ocorre através da substituição local de fibras A- δ em fibras C, mediadas pela ação das neurotrofinas.

O NGF é uma neurotrofina, produzida extensamente também pelo músculo liso detrusor e por células uroteliais, indispensáveis na promoção do crescimento e manutenção das fibras simpáticas e nervos sensoriais, que são vitais para o funcionamento normal da bexiga. Níveis urinários elevados de NGF podem gerar aumento de sensibilidade vesical ou causar HD por uma via indeterminada ainda (Lamb, 2004).

O NGF também é considerado um mediador na modulação da resposta inflamatória urotelial e sinalizador da via de dor. Estudos clínicos e experimentais tem reportado um vínculo entre o aumento dos níveis urinários de NGF e a sintomatologia de bexiga hiperativa, OIV e síndrome de dor pélvica crônica (Kuo,

2010). Uma pesquisa quantificou os níveis de NGF no tecido vesical através de teste imunoenzimáticos (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), coletadas através de biópsias vesicais realizadas antes e após 1 e 3 meses da injeção de toxina botulínica A (BTX-A) no músculo detrusor em pacientes com HD neurogênica (Giannantoni, 2006). Assim como houve melhora das variáveis urodinâmicas neste período, os níveis teciduais de NGF também diminuíram significativamente. Isto sugere que a BTX-A pode reduzir os níveis de neurotransmissores que, de outra maneira, estimulariam a produção e liberação de NGF.

Em biópsias vesicais de pacientes portadores de cistite intersticial/ Síndrome da bexiga dolorosa foi observado a superexpressão de NGF mRNA que também apresentou redução naqueles que obtiveram melhora da dor após 2 semanas da terapia intravesical de BTX-A (Liu, 2007). Curiosamente, apesar da correlação da expressão do NGF com o escore de dor, não houve mudança na capacidade vesical máxima, sugerindo um papel mais relevante do NGF na percepção da dor. Este achado é apoiado pela ação do NGF nos receptores neurotróficos tirosino-quinase tipo I (TrkA), mediando a liberação de substância P que esta implicada nas respostas inflamatórias e nocicepção (Henry, 1993). Outro estudo demonstrou que a expressão do NGF no músculo detrusor de pacientes obstruídos com HD foi significativamente maior que nos obstruídos sem HD e no grupo controle (Liu, 2004).

O presente estudo é o primeiro que busca correlacionar níveis de expressão do NGF e seu receptor (NGFr) no músculo detrusor de pacientes obstruídos, portadores ou não de HD, e sua relação com a evolução pós-operatória da HD em pacientes submetidos a desobstrução prostática. Em

discordância com a literatura, nossos resultados mostraram níveis de expressão de NGF e NGFr quase 2 vezes menor no grupo portador de HD. Neste grupo, notou-se a superexpressão de NGF nos pacientes que apresentaram início das CVIs na primeira fase de enchimento vesical ($p=0,047$). Outra análise observou uma expressão relativa maior de ambos os genes em pacientes que possuíam baixa complacência vesical, e significativamente maior de NGFr entre os pacientes com baixo índice de contratilidade vesical ($p=0,014$). Em relação a evolução pós-operatória no grupo portador de HD, observou-se uma expressão relativa três vezes maior deste gene naqueles que persistiram com HD após 6 meses de tratamento, apesar de não exibirem correlação estatística. No geral, a superexpressão do NGF e NGFr foi associada a fatores prognósticos desfavoráveis como persistência de HD, assim como baixa complacência vesical e início precoce das CVIs.

O processo da micção é criticamente dependente do reflexo espino-bulbo-espinhal, composta por vias aferentes (sensoriais) e eferentes (motoras) que são integradas e coordenadas por centros espinhais e supra-espinhais. As fibras parassimpáticas lombo-sacrais fornecem os estímulos motores para o músculo detrusor, mediadas pela ação da acetilcolina (ACh) nos receptores muscarínicos (CHRM). Estes são classificados, com base em critérios moleculares e farmacológicos, em cinco subtipos (M1-M5). Já está bem documentado que o músculo detrusor contém todos os subtipos, localizados principalmente na cúpula vesical, porém, na espécie humana, predominam os subtipos M2 e M3, sendo que o subtipo M3 é o principal mediador direto da contração vesical apesar da maior densidade de M2 (Festcher, 2002).

O papel funcional dos CHRM2 parece estar ligado ao bloqueio do sistema nervoso simpático, dessa forma, liberando o parassimpático para promover a contração vesical. A liberação da Ach durante a fase de enchimento poderia aumentar a atividade contrátil miogênica, o que pode gerar sinais aferentes. A liberação basal não-neuronal de Ach na bexiga humana, originada parcialmente pelo urotélio, mostrou estar aumentada quando as fibras musculares estão estiradas e o urotélio intacto, mostrando que a tensão de cisalhamento do urotélio durante a distensão vesical pode ser um dos mecanismos responsáveis. Além disso, a liberação não-neuronal de Ach aparenta ser idade-dependente e é significativamente maior em pacientes maiores que 65 anos (Yoshida, 2006). De qualquer forma, alterações relacionadas a idade podem contribuir pelo aumento da prevalência de bexiga hiperativa e HD nos idosos. Por outro lado, um aumento significativo da imunorreatividade de CHRM2 e CHRM3 em miofibroblastos foi observada em espécimes vesicais de pacientes portadores de HD idiopática, quando comparada aos controles, mostrando ainda uma correlação significativa com o escore de urgência miccional (Mukerji, 2006).

Baseado nestas evidências, podemos pressupor que uma liberação aumentada de Ach pelo urotélio, assim como uma supra-regulação dos CHRMs nos miofibroblastos e no urotélio, pode acarretar num aumento da atividade aferente e contribuir para o desenvolvimento de HD. Os resultados obtidos em nosso estudo refletem tais comprovações prévias. Observamos uma média de expressão dos CHRMs cerca de dez a quinze vezes maior nos pacientes obstruídos. No caso do subtipo M3, foi notado uma expressão relativa duas vezes maior nos portadores de HD e, neste grupo, três vezes maior entre os pacientes que iniciaram as CVIs na segunda fase de enchimento vesical.

Observamos também uma média de expressão cerca de duas vezes maior dos subtipos M2 e M3 entre os pacientes que evoluíram com melhora urodinâmica pós-operatória da HD, apesar de não haver significância estatística. Porém, numa análise categorizada dos pacientes que evoluíram com resolução da HD, houve expressão relativa maior de ambos os receptores em 77,8% dos pacientes ($p=0,030$), em relação ao valor da mediana de suas expressões gênicas, salientando o papel prognóstico destes receptores na resolução da HD após o tratamento cirúrgico da OIV.

Realizando uma regressão logística de todas variáveis clínicas em associação com resolução da HD, a única que mostrou correlação estatística foi a idade. Pacientes com idade abaixo de 60 anos possuem probabilidade 5 vezes maior de apresentarem melhora da HD ($p=0,056$) após 6 meses de tratamento cirúrgico para desobstrução prostática. Essa observação pode ser legitimada pelo fato de que a expressão relativa de CHRM2 em pacientes abaixo de 60 anos foi marginalmente maior que nos pacientes acima de 60 anos ($p=0,082$) e, como relatado anteriormente, a média de expressão deste gene naqueles que evoluíram com melhora da HD foi duas vezes maior ($p=0,072$).

Como análise crítica e limitações do presente estudo, destacamos o tamanho e a não realização de cálculo amostral, mas, apesar de termos utilizado uma série relativamente pequena, ressaltamos que esta análise é inédita e a maior na literatura que investiga a expressão destes genes em músculo detrusor de pacientes obstruídos. Desta forma não havíamos como calcular uma amostra adequada para um desvio padrão determinado. Além disso, restringimos nossa seleção de pacientes àqueles que apresentavam critérios clínicos e urodinâmicos de indicação cirúrgica para o tratamento da OIV, ou seja, não

podemos inferir se este seria um modelo adequado na avaliação de pacientes com sintomas menos severos, passíveis de tratamento clínico, o que representa até 90% da população com HPB. Outro fato importante refere-se ao grupo controle. Aqui incluímos um número reduzido de pacientes que não realizaram estudo urodinâmico prévio ao tratamento cirúrgico. No entanto, salientamos a grande dificuldade para obter amostras de tecido vesical em um grupo controle ideal (pacientes portadores de HPB, sem OIV confirmada por EUD e sem outras patologias urológicas que possam interferir na análise da expressão gênica do músculo detrusor).

Outro ponto suscetível a crítica é a falta da análise de expressão proteica resultante da ação dos genes em estudo. Sabe-se que a pesquisa da expressão gênica não assegura que os mesmos estejam codificando proteínas que, em última análise, demonstram a atividade real dos genes. Entretanto ressaltamos que embora a 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 (Derveaux, 2010). Por último, destacamos que não houve a verificação de outras variáveis que possam interferir na evolução da HD, como a análise de componentes da matriz extracelular e, até mesmo, outros genes envolvidos na fisiopatologia da HD. Ressaltamos que o envolvimento de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, na matriz extracelular faz parte de outra pesquisa do nosso grupo (dados não publicados, tese de doutorado de Yuri Afonso Ferreira).

6. CONCLUSÃO

A obstrução infravesical está relacionada com uma superexpressão NGFr, CHRM2, CHRM3 e VEGF, e com uma expressão baixa de NGF e CD-105. Em relação a evolução pós-operatória da HD após a desobstrução prostática, isoladamente não houve diferença significativa na expressão gênica dos marcadores de angiogênese (VEGF e CD-105), das neurotrofinas (NGF e NGFr) e dos receptores muscarínicos (CHRM2 e CHRM3) no tecido muscular vesical entre os pacientes que persistiram ou não com HD. Porém, através de uma análise categórica, quando os pacientes apresentavam superexpressão gênica (maior que a mediana) de um ou de ambos os receptores muscarínicos, eles evoluíram com resolução da HD de forma estatisticamente significativa. Apesar disso, as neurotrofinas mostraram uma tendência a superexpressão, enquanto que os marcadores de angiogênese e os receptores muscarínicos apresentaram uma tendência a subexpressão entre os pacientes que persistiram com HD no pós-operatório.

Quando comparamos somente o grupo de HD pré-RTUP, não encontramos diferenças estatísticas entre as variáveis clínicas e urodinâmicas daqueles que persistiram ou não com HD após tratamento. Entretanto, observou-se que pacientes com idade abaixo de 60 anos possuíam probabilidade 5 vezes maior de apresentarem melhora da HD.

7. PERSPECTIVAS

Um biomarcador é um indicador de uma doença em particular. Geralmente são usados para definir a presença (diagnóstico), severidade, progressão de uma determinada condição (prognóstico) e resposta a um tratamento específico. Recentemente tem surgido grande interesse na pesquisa de marcadores urinários que facilitem a avaliação e a conduta de pacientes portadores de HD. Nossas perspectivas futuras, com base nos achados, são analisar a expressão proteica destes genes na bexiga e na urina dos pacientes e tentar identificar aqueles que possuam um papel no prognóstico da resolução da HD após a desobstrução prostática.

Além disso, ampliar os resultados para pacientes com HPB, que não apresentam evolução clínica e critérios urodinâmicos de indicação de tratamento cirúrgico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Aziz KF, Lemack GE. Overactive bladder in the male patient: bladder, outlet, or both? *Curr Urol Rep* 2002; 3:445–51.

Abrams P. Benign prostatic hyperplasia has precise meaning. *BMJ* 2001; 322:106.

Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, Kerrebroeck PV, Victor A, Wein A. The standardization of terminology in lower urinary tract function: report from the standardization sub-committee of the International Continence Society. *Urology* 2003; 61: 306-310.

Abrams PH. The urodynamic changes following prostatectomy. *Urol Int* 1978; 33:181 – 6.

Abrams PH, Farrar DJ, Turner-Warwick RT, et al. The results of prostatectomy: A symptomatic and urodynamic evaluation analysis of 152 patients. *J Urol* 1979; 121:640–2.

Allen SJ and Dawbarn. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci* 2006; 110(2):175-191.

Apostolidis A. Novel Insights and Targets for Managing Overactive Bladder. *J Urol* 2011; 185:2018- 2020.

Armitage P; Berry G. The planning of statistical investigations. In: *Statistical methods in medical research*. 2.ed. Oxford: Blackwell, 1987. p.179-85.

Azadzoi KM, Tarcan T, Kozlowski R, Krane RJ and Siroky MB: Overactivity and structural changes in the chronically ischemic bladder. *J Urol* 1999; 162:1768.

Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol* 1984; 132:474–479.

Brading AF. A Myogenic basis for the overactive bladder. *Urology* 1997; 50 (Suppl. 6):57-67.

Brading AF, Turner WH. The unstable bladder: towards a common mechanism. *Br J Urol* 1994; 73:3-8.

Choi YS, Kim JC, Lee KS, Seo JT, Kim HJ, Yoo TK, Lee JB, Choo MS, Lee JG, Lee JY. Analysis of female voiding dysfunction: a prospective, multi-center study. *Int Urol Nephrol* 2013; 45(4):989-994.

de Almodovar Ruiz C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev* 2009; 89(2):607–648.

Derveaux S, Vandesompele J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 2010, 50:227-230.

Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S: CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003,17(9):984-92.

Dupont MC, Spitsbergen JM, Kim KB, Tuttle JB, Steers WD. Histological and neurotrophic changes triggered by varying models of bladder inflammation. *J Urol* 2001; 166(3):1111-1118.

Festcher C, Fleischman M, Schmidt M, Krege S, Michel MC. M3 muscarinic receptors mediate contraction of human urinary bladder. *Br J Pharmacol* 2002; 136:641–643.

Ferrara N, Davis-Smyth TD. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 10:4 –25.

Fusco F, Groutz A, Blaivas JG, Chaikin DC, Weiss JP. Videourodynamic studies in men with lower urinary tract symptoms: a comparison of community based versus referral urological practices. *J Urol* 2001; 166:910–913.

Geirsson G, Fall M, Lindstrom S. The ice water test - a single and valuable supplement to routine cystometry. *J Urol* 1993; 71:681-685.

Geirsson G, Lindstrom S, Fall M. The bladder cooling reflex in man - characteristics and sensitivity to temperature. *Br J Urol* 1993; 71:675-680.

Giannantoni A, Di Stasi SM, Nardicchi V et al. Botulinum-A toxin injections into the detrusor muscle decrease nerve growth factor bladder tissue levels in patients with neurogenic detrusor overactivity. *J Urol* 2006; 175:2341–2344.

Gosling JA, Dixon JS. Detrusor morphology in relation to bladder outflow obstruction and instability. In Hinman F, ed. *Benign Prostatic Hypertrophy*. Berlin: Springer. 1986:666-71.

Gormley EA, Griffiths DJ, McCracken PN, et al. Effects of transurethral resection of the prostate on detrusor instability and urge incontinence in elderly males. *Neurourol Urodyn* 1993; 12:445–53.

Hegde SS. Muscarinic receptors in the bladder: from basic research to therapeutics. *Br J Pharmacol* 2006; 147:S80-S87.

Henry JL. Substance P and inflammatory pain: potential of substance P antagonists as analgesics. *Agents Actions Suppl* 1993; 41:75–87.

Hyman MJ, Groutz A, Blaivas JG. Detrusor instability in men: correlation of lower urinary tract symptoms with urodynamic findings. *J Urol* 2001;166:550–2.

Kageyama S, Watanabe T, Kurita Y, et al.: Can persisting detrusor hyperreflexia be predicted after transurethral prostatectomy for benign prostatic hypertrophy? *Neurourol Urodyn* 2000; 19:233–240.

Kuo HC, Liu HT, Chancellor MB (2010) Can urinary nerve growth factor be a biomarker for overactive bladder? *Rev Urol* 2010; 12:69–77.

Knutson T, Edlund C, Fall M, Dahlstrand C. BPH with coexisting overactive bladder dysfunction—an everyday urological dilemma. *Neurourol Urodyn* 2001; 20:237–47.

Lamb K, Gebhart GF, Bielefeldt K. Increased nerve growth factor expression triggers bladder overactivity. *J Pain* 2004; 5:150–156.

Laniado ME, Ockrim JL, Marronaro A, Tubaro A, Carter SS. Serum prostate-specific antigen to predict the presence of bladder outlet obstruction in men with urinary symptoms. *BJU Int* 2004; 94:1283–6.

Lee JY, Kim HW, Koh JS, Suh HJ, Chancellor MB. Comparison of doxazosin with or without tolterodine in men with symptomatic bladder outlet obstruction and an overactive bladder. *BJU Int* 2004; 94:817–20.

Levin RM, Monson FC, Haugaard N *et al*. Genetic and cellular characteristics of bladder outlet obstruction. *Urol Clin North Am* 1995; 22:263–83.

Levin RM, Wein AJ. Experimental models of urinary bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn* 1986; 5:241–6.

Liu B, Zheng BZ, Zhou ZL, Xu ZH, Cai SL. Change of nerve growth factor mRNA in human detrusor in bladder outlet obstruction with benign prostatic hyperplasia and their implication. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2004; 42(14):874–876.

Liu HT, Kuo HC. Intravesical botulinum toxin A injections plus hydrodistension can reduce nerve growth factor production and control bladder pain in interstitial cystitis. *Urology* 2007; 70:463–8.

Livak JL, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; 25:402–408.

Milsom I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thuroff J, Wein AJ. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU Int* 2001; 87:760–6.

Mitterberger M, Pallwein L, Gradl J, Frauscher F, Neuwirt H, Leunhartsberger N, Strasser H, Bartsch G, Pinggera G-M. Persistent detrusor overactivity after transurethral resection of the prostate is associated with reduced perfusion of the urinary bladder. *BJU Int* 2007; 99:831-35.

Mostwin JL, Karim MA, Van Koeveringe G, Brooks EL. The guinea pig model of gradual urethral obstruction. *J Urol* 1991; 145:854–858.

Mukerji G, Yiangou Y, Grogono J, et al: Localization of M2 and M3 muscarinic receptors in human bladder disorders and their clinical correlations. *J Urol* 2006; 176:367– 373.

Ponholzer A, Temmi C, Wehrberger C, et al. The association between vascular risk factors and lower urinary tract symptoms in both sexes. *Eur Urol* 2006; 50:581-586.

Rohner T. Changes in adrenergic receptors in bladder outlet obstruction. In Hinman F, ed. *Benign Prostatic Hypertrophy*. Berlin: Springer, 1983: 410-3.

Sahlin K, Nielsen JS, Mogensen M et al: Repeated static contractions increase mitochondrial vulnerability toward oxidative stress in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2006; 101:833-839.

Sayer LM, Smith MA and Perry G: Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem* 2001; 8:721-728.

Seki N, Kai N, Seguchi H, Takei M, Yamaguchi A, Naito S. Predictives regarding outcome after transurethral resection for prostatic adenoma associated with detrusor underactivity. *Urology* 2006; 67:306-310.

Seki N, Takei M, Yamaguchi A, Naito S. Analysis of prognostic factors regarding the outcome after a transurethral resection for symptomatic benign prostatic enlargement. *Neurourol Urodyn* 2006; 25:428-32.

Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001; 13:167–71.

Sibley GN. The physiological response of the detrusor muscle to experimental bladder outflow obstruction in the pig. *Br J Urol* 1987; 60:332–6.

Sibley GNA. An experimental model of detrusor instability in the obstructed pig. *Br J Urol* 1985; 57:292-8.

Sountoulides P, van Dijk MM, Wijkstra H, de La Rosette JJ, Michel MC. Role of voiding and storage symptoms for the quality of life before and after treatment in men with voiding dysfunction. *World J Urol* 2010; 28(1):3-8.

Sinha MK, Roy D, Gaze DC, Collinson PO, Kaski JC. Role of “ischemia modified albumin.” a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J* 2004; 21:29-34.

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; 20:116-122.

Steers WD, De Groat WC. Effect of bladder outlet obstruction on micturition reflex pathways in the rat. *J Urol* 1988; 140:864-71.

Steers WD and Tuttle JB. Mechanisms of disease: the role of nerve growth factor in the pathophysiology of bladder disorders. *Nat Clin Pract Urol* 2006; 3: 101-110.

Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, et al. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol* 2003; 20:327–36.

Tanaka Y, Masumori N, Itoh N, Furuya S, Ogura H, Tsukamoto T. Is the short-term outcome of transurethral resection of the prostate affected by preoperative

degree of bladder outlet obstruction, status of detrusor contractility or detrusor overactivity? *Int J Urol* 2006; 13:1398-1404.

Thomas AW, Abrams P. Lower urinary tract symptoms, benign prostatic obstruction and the overactive bladder. *BJU Int* 2000; 85 Suppl 3:57-68.

Thomas AW, Cannon A, Barlett E, et al. The long term urodynamic follow-up of TURP: A study of the prevalence of detrusor instability. *J Urol Suppl* 1999; 161:257.

Turner-Warwick RT. The symptoms of bladder outlet obstruction: dysfunction and the myth of 'prostatism'. In Hinman F, cd. *Benign Prostatic Hypertrophy*. Berlin: Springer, 1983:701-5.

Voss P and Siems W: Clinical oxidation parameters of aging. *Free Rad Res* 2006; 40:1339-45.

Xie Z, Wei M, Morgan TE et al: Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide 1-42 and lipopolysaccharide-activated microglia. *J Neurosci* 2002; 22:3484-89.

Wu AH, Feng YJ, Contois JH, Pervaiz S. Comparison of myoglobin, creatine kinase-MB and cardiac troponin I for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann Clin Lab Sci* 1996; 26:291-300.

Yoshida M, Inadome A, Maeda Y, et al: Non- neuronal cholinergic system in human bladder urothelium. *Urology* 2006; 67:425– 430.

APÊNDICES

Publicações realizadas

Ainda não obtivemos nenhuma publicação referente a este trabalho, entretanto um resumo foi submetido e aprovado para apresentação na AUA 2013, principal congresso mundial de urologia (anexo 4). Apresentado como Pôster moderado na AUA 2013 no dia 07 de Maio de 2013.

Um artigo foi submetido Neurology and Urodynamics.

ANEXO 1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO:
 CIDADE:.....
 CEP: TELEFONE: DDD.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Análise do perfil de expressão dos marcadores de angiogênese e neurotrofinas na persistência da hiperatividade detrusora em pacientes submetidos à ressecção transuretral da próstata

PESQUISADOR : Alberto Azoubel Antunes

CARGO/FUNÇÃO: Médico e Professor assistente da disciplina de urologia da FMUSP
 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: Nº 113877

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de cirurgia, disciplina de urologia

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

O senhor está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa cujo objetivo é avaliar um novo marcador de hiperatividade detrusora. A hiperatividade detrusora é uma doença que acomete muitos homens piorando sua qualidade de vida, até hoje não sabemos ao certo o que faz a bexiga contrair desta forma, por isso encontrar a causa desta doença que atormenta tanto a vida dos homens é o primeiro passo, para estabelecer um tratamento adequado ou até mesmo uma prevenção para esta doença. O trabalho será realizado utilizando parte do tecido que foi retirado durante a sua cirurgia, não acarretará nenhum prejuízo a sua pessoa ou ao próprio material que continuará preservado para seu interesse futuro.

Não será necessário fazer nenhum procedimento adicional.

Portanto esta pesquisa não lhe traz nenhum desconforto e nenhum risco. Não há benefício direto para o senhor, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para os pacientes. Como não há procedimentos adicionais a serem feitos, não existem procedimentos alternativos.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dr. **Alberto Azoubel Antunes**, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255- 7º andar sala 710-F, Telefone (011) 3069 – 8080. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “**Análise do perfil de expressão dos marcadores de angiogênese e neurotrofinas na persistência da hiperatividade detrusora em pacientes submetidos à ressecção transuretral da próstata**”. Eu discuti com o Dr. **Alberto Azoubel Antunes** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Dr. Alberto Azoubel Antunes
(responsável pelo estudo)

Data ____ / ____ / ____

ANEXO 2

APROVAÇÃO

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, em sessão de 02/02/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0829/10**, intitulado: **"ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE ANGIOGÊNESE, DE ISQUEMIA E DE ESTRESSE OXIDATIVO NA PERSISTÊNCIA DA HIPERATIVIDADE DETRUSORA EM PACIENTES SUBMETIDOS À RESSECÇÃO TRANSURETRAL DA PRÓSTATA"** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Alberto Azoubel Antunes**

Pesquisador (a) Executante: **Marco Antônio Silva**

CAPPesq, 03 de Fevereiro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO 3

Questionário do Índice Internacional de Sintomas Prostáticos (IPSS) e Qualidade de Vida (QoL) referente aos sintomas urinários.

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

ANEXO 4

Abstract printed from AUA2013.org

Moderated Poster

The role of angiogenic and neurogenic markers on detrusor overactivity in patients with benign prostatic hyperplasia and bladder outlet obstruction

Authors: Marco A Nunes; Mayara Sakuma; João A Brunhara; Sabrina T Reis; Nayara I Viana; Katia R Leite; Miguel Srougi; Alberto A Antunes

Abstract: 1744

Introduction and Objectives

Detrusor overactivity (DO) is an important cause of symptoms in about 50% of patients with bladder outlet obstruction (BOO) due to benign prostatic hyperplasia (BPH). However, the cellular mechanisms responsible for overactivity are not well described. Clinical and experimental studies have suggested that ischemia and denervation may play important roles. In the present work we investigated the expression of angiogenic and neuronal markers in the detrusor muscle of patients with BPH with confirmed BOO who underwent surgical treatment. Expression levels of muscarinic receptors M2 and M3 were also analyzed.

Methods

We performed a case-control study of 21 patients with diagnosis of BPH and DO. Control group was comprised by 22 cases with BPH without DO. All patients had BOO confirmed through urodynamic analysis and were submitted to transurethral prostatic resection. A biopsy of the bladder muscle was performed at the end of the procedure for analysis of endoglin (CD-105), vascular endothelial growth factor (VEGF), nerve growth factor (NGF), nerve growth factor receptor (NGFr), muscarinic cholinergic receptor 2 (CHRM2) and muscarinic cholinergic receptor 3 (CHRM3) gene expression through the quantitative real time polymerase chain reaction method (qRT-PCR).

Results

Analysis of gene expression in patients with DO related to control group is shown in graphic 1. NGFr and NGF were underexpressed in 76.2% and 57.1% of cases respectively. VEGF and CD-105 were underexpressed in 61.9% and 66.6% of DO cases respectively. CHRM2 was overexpressed in 71.4% and CHRM3 was in 76.2% of cases compared to the control group.

Conclusions

Underexpression of VEGF, CD-105, NGFr and NGF in patients with DO suggests that these genes may have a role in the pathogenesis of the disease. These alterations may lead to a chronic state of hypoxia and alterations of afferent sensory signals respectively.

Date & Time: May 7, 2013 01:00 PM

Session Title: Benign Prostatic Hyperplasia: Epidemiology and Natural History/Evaluation & Markers

Sources of Funding: none