VALTER DELL' ACQUA CASSÃO

**Análise de Polimorfismos de Nucleotídeo Único na Cistite
Intersticial**

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. Homero Bruschini

São Paulo

2017

Dedicatória

A minha família pelos ensinamentos, pelos exemplos de vida e pelo apoio incondicional. A minha querida esposa e companheira Paula, que sempre me incentivou e tornou possível a realização deste sonho.

“All our science, measured against reality, is primitive and childlike – and yet it is the most precious thing we have”.

Albert Einstein

1879-1955

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Homero Bruschini, pela oportunidade, pela confiança, pelos inúmeros conselhos e ensinamentos que contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Professora Dra. Sabrina Reis pelo carinho e pelos ensinamentos em pesquisa e genética.

Aos colegas urologistas que fazem parte do grupo de Bexiga Neurogênica do HCFMUSP, aos residentes da urologia e aos funcionários da urologia por sua dedicação diária no atendimento e cuidados dos pacientes que participaram neste estudo.

À equipe do LIM 55 que me acolheu com muito carinho e pelo imprescindível auxílio no aprendizado das técnicas moleculares.

Às pacientes com Cistite Intersticial, motivo deste estudo.

À FAPESP pelo apoio ao projeto e financiamento dos materiais.

À Universidade de São Paulo, pela minha formação acadêmica, profissional e de pós-graduação.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Cistite Intersticial e Polimorfismos.....	2
1.2 Justificativa.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo primário	15
2.2 Objetivo secundário.....	15
3. MÉTODOS.....	16
3.1 Local do Estudo	17
3.2 Pacientes	17
3.3 Polimorfismos.....	23
3.4 Extração de DNA	25
3.5 Análise dos genótipos por PCR em tempo real quantitativo	25
3.6 Análise Estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	30
5. DISCUSSÃO	41
6. Conclusões	50
7. Anexos.....	52
8. Referências	68

Lista de abreviaturas e siglas

CI	Cistite Intersticial
IC	Interstitial Cystitis
PBS/BPS	Painful Bladder Syndrome/ Bladder Pain Syndrome
SBD	Síndrome da Bexiga Dolorosa
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Polymerase Chain Reaction
NIDDK	National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
SBHI	Síndrome da Bexiga Hiperativa Idiopática
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
LIM55	Laboratório de Investigação Médica da Divisão de Urologia
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CAPPesq	Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GAGs	Glicosaminoglicanos
ACR	American College of Rheumatology
FM	Fibromialgia

Lista de Figuras

Figura 1. Sistema Taqman®: Identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos.....	28
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Critérios de diagnóstico de Cistite Intersticial - (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases -NIDDK).	7
Tabela 2 - A. Características clínicas das pacientes com Cistite Intersticial – idade, raça, IMC, pontuação escala de dor e questionários O’Leary Sant e PUF, presença de lesão de Hunner e comorbidades associadas.....	21
Tabela 2 - B. Características clínicas do grupo controle.....	22
Tabela 3. Descrição dos SNPs avaliados.	24
Tabela 4. Análise dos genótipos dos polimorfismos nas pacientes com Cistite Intersticial e no grupo controle.	31
Tabela 5. Associação estatística e frequência dos alelos entre os pacientes com CI e o grupo controle.	34
Tabela 6. Associação estatística e frequência dos genótipos entre o grupo de pacientes com CI com maior score de sintomas de dor comparado com os pacientes com menos dor.....	36
Tabela 7. Associação estatística e frequência dos alelos entre o grupo de pacientes com CI com maior score de sintomas de dor comparado com os pacientes com menos dor.	38

Resumo

Cassão VD. *Análise de Polimorfismos de Nucleotídeo Único na Cistite Intersticial* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: A Cistite Intersticial (CI) ou Síndrome da Bexiga Dolorosa (SBD) é uma síndrome crônica caracterizada pela presença de dor ou desconforto vesical ou pélvico e sintomas miccionais como urgência e aumento da frequência miccional diurna e noturna, na ausência de outra afecção identificável que justifique esses sintomas. Não existe até o momento nenhum teste diagnóstico ou marcador que defina a CI. Desta forma seu diagnóstico é predominantemente clínico, baseado nos sinais e sintomas e dependente da exclusão de outras doenças urológicas. A dificuldade no diagnóstico e no tratamento dessas pacientes reflete o pouco que se sabe sobre sua fisiopatologia e sobre as alterações genéticas presentes na doença. A identificação de marcadores pode proporcionar um melhor entendimento e manejo desses aspectos da síndrome. Na tentativa de identificar marcadores genéticos que possam estar associados a CI, avaliamos a presença de alguns polimorfismos genéticos, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), no DNA de pacientes com os critérios diagnósticos de CI e comparamos sua prevalência entre as pacientes e também com um grupo controle representativo da população geral. A correlação desses polimorfismos considerando a CI e a intensidade de dor nessas pacientes ainda não foi estudada na literatura. **OBJETIVOS:** Analisar a presença de polimorfismos (SNP) em amostras de sangue de pacientes com CI e correlacionar a presença dos polimorfismos com o quadro de dor crônica. **MÉTODOS:** Foram selecionadas 34 pacientes do sexo feminino com diagnóstico de CI de acordo com os critérios do NIDDK e 23 pacientes do grupo controle (mulheres saudáveis apenas com incontinência urinária de esforço). As pacientes com o diagnóstico de CI foram estratificadas em dois grupos de acordo com o grau dos sintomas de dor crônica. Foram selecionados 20 polimorfismos para análise: rs1800871, rs1800872, rs1800896, rs1800471, rs1800629, rs361525, rs1800497, rs6311, rs6277, rs6276, rs6313, rs2835859, rs11127292, rs2243248, rs6887695, rs3212227, rs1799971, rs12579350, rs3813034, rs6746030. A genotipagem foi realizada através da técnica de PCR em tempo real (q-PCR) e correlacionada com o diagnóstico de CI e com a intensidade dos sintomas algicos. **RESULTADOS:** O alelo polimórfico (T) do SNP rs11127292 foi mais frequente nas pacientes com CI em relação ao grupo controle ($p:0,01$). O alelo polimórfico (T) do SNP rs6311 foi significativamente mais frequente nas pacientes com dor mais intensa ($p:0,03$). A frequência do alelo selvagem (A) do SNP rs1799971 foi maior em pacientes com dor leve a moderada ($p:0,04$). **CONCLUSÕES:** Foram identificadas algumas diferenças na frequência dos polimorfismos nas pacientes estudadas, o que sugere a existência de um papel relevante dos SNP associados tanto à CI quando na intensidade dos sintomas de dor crônica nestas pacientes.

Descritores: Cistite intersticial; Síndrome de bexiga dolorosa; Síndrome de dor na bexiga; Inflamação; Dor; Polimorfismo; Polimorfismo de nucleotídeo único.

Summary

Cassão VD. *Single Nucleotide Polymorphism Analysis in Interstitial Cystitis* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUCTION: Interstitial cystitis (IC) or painful bladder syndrome (PBS) is a chronic syndrome characterized by the presence of bladder/pelvic pain or discomfort and voiding symptoms such as urgency and increased urinary waking and night-time frequency in the absence of another identifiable cause to justify these symptoms. So far, there is no diagnostic test or marker to establish the presence of IC. Thus, the diagnosis is predominantly clinical, based on signs and symptoms and dependent on the exclusion of other urological diseases. The difficulty in the diagnosis and treatment of these patients reflects the little that is known about IC physiopathology and about the genetic background of the disease. The identification of new markers may provide a better understanding and management of the syndrome. As an attempt to identify genetic markers that may be associated with IC, we evaluated the presence of some genetic polymorphisms, single nucleotide polymorphisms (SNPs), in the DNA of patients with the diagnostic criteria of IC, and we compared their prevalence among IC patients and with a control group representative of the general population. The correlation of these polymorphisms considering IC and pain intensity in these patients has not been studied in the literature. **OBJECTIVES:** To assess the presence of polymorphisms (SNPs) in blood samples from IC patients and to correlate the presence of polymorphisms with chronic pain. **METHODS:** Thirty-four female patients with a diagnosis of IC according to the NIDDK criteria and 23 control subjects (healthy women with stress urinary incontinence) were selected. Patients with the diagnosis of IC were stratified into two groups according to the degree of symptoms of chronic pain. We selected 20 polymorphisms for analysis: rs1800871, rs1800876, rs1800471, rs1800629, rs361525, rs1800497, rs6311, rs6277, rs6276, rs6313, rs2835859, rs11127292, rs2243248, rs6887695, rs3212227, rs1799971, rs12579350, rs3813034, rs6746030. Genotyping was performed using the real-time PCR technique (q-PCR) and correlated with the diagnosis of IC and intensity of pain symptoms. **RESULTS:** The polymorphic allele (T) of the SNP rs11127292 occurred with more frequency in patients with IC compared to the control group ($p=0.01$). The polymorphic allele (T) of SNP rs6311 occurred with more frequency in patients with severe pain ($p=0.03$). The frequency of wild-type (A) SNP rs1799971 was higher in patients with mild to moderate pain ($p=0.04$). **CONCLUSION:** The results indicated differences in polymorphism frequency in the patients studied, suggesting the existence of a relevant role of SNPs associated with both IC and intensity of chronic pain symptoms in these patients.

KEYWORDS: Interstitial cystitis; Painful bladder syndrome; Bladder pain syndrome; Inflammation; Ache; Polymorphism; Single nucleotide polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cistite Intersticial e Polimorfismos

A Cistite Intersticial (CI) ou Síndrome da Bexiga Dolorosa (SBD) é uma síndrome de dor crônica e debilitante que atinge o trato urinário inferior. O diagnóstico é principalmente clínico, de exclusão e baseado na tríade: dor pélvica crônica, normalmente exacerbada pelo enchimento vesical; aumento da frequência urinária e urgência miccional, na ausência de outras causas identificáveis ^(1, 2).

A visualização de hemorragia submucosa (glomerulações), durante a hidrodistensão, ou das clássicas lesões de Hunner na parede vesical, embora pouco comuns, são sinais cistoscópicos típicos, que contribuem para o diagnóstico definitivo da CI ^(2, 3).

Os primeiros relatos de CI como doença foram descritos no século XIX. Provavelmente a primeira descrição foi em 1836 quando Joseph Parrish descreveu 3 casos de pacientes com sintomas de armazenamento do trato urinário inferior refratários, sem causa identificável e os chamou de “*tic douloureux*”, um termo usado para doenças neurológicas álgicas. Em 1887, Skene descreveu uma doença caracterizada pela afecção inflamatória da bexiga com destruição parcial ou total da mucosa vesical e acometimento da parede muscular, que recebeu o nome de Cistite Intersticial ⁽⁴⁾.

Guy Hunner descreveu, em 1915, essa afecção inflamatória da bexiga em 8 mulheres e popularizou a doença com a descrição de lesões da parede vesical que seriam características da doença, chamando-as de “úlceras” de Hunner. Atualmente sabe-se que as mesmas não são úlceras verdadeiras e que a doença apresenta

esse tipo de lesão na minoria dos casos ^(2, 4).

Em 1949, Hand publicou um artigo relatando 223 casos de CI cuja característica foi o achado de pequenas hemorragias submucosas na parede vesical (posteriormente chamadas de glomerulações - Walsh, 1978) e variação na capacidade vesical dessas pacientes ⁽²⁾.

Em 1978, na tentativa de melhorar o diagnóstico e torná-lo mais precoce, Messing e Stamey propuseram que este fosse baseado nos sintomas, nos achados cistoscópicos (cistoscopia com hidrodistensão sob anestesia) de glomerulações e que fosse um diagnóstico de exclusão. Desta forma a CI passava a ser um diagnóstico mais prevalente, menos dependente do achado das lesões de Hunner e também menos focado exclusivamente na bexiga ^(2, 4).

Devido à ampla diversidade e controvérsia no diagnóstico da CI ao longo dos anos e nas diferentes regiões do mundo, em parte devido à falta de critérios ideais, ou de um marcador ou exame objetivo que estabeleça o diagnóstico da CI, os estudos epidemiológicos para definição de prevalência e incidência da doença são muito variáveis e imprecisos ⁽⁴⁾.

De modo geral, podemos dizer que a CI ocorre principalmente em mulheres de raça branca, caucasianas numa proporção variável de cerca de 5 ou mais mulheres para um homem. A faixa etária mais acometida é entre 40- 50 anos e a prevalência é muito variável de acordo a época do estudo e a região avaliada. Em estimativas mais recentes nos EUA foi identificada uma prevalência de até 2,5 a 2,7% das mulheres ⁽⁵⁻⁷⁾.

A dor pode ser caracterizada como dor na bexiga, desconforto, queimação ou sensação de pressão pélvica e/ou dor uretral. Muitas vezes é de difícil caracterização e localização. Tipicamente é acompanhada de sintomas urinários de armazenamento, como aumento da frequência urinária diurna e noturna, urgência e disúria. Devem ser afastadas outras causas de cistite como a cistite bacteriana e a cistite actínica ⁽²⁻⁴⁾.

A urgência deve ser bem caracterizada na tentativa de diferenciar clinicamente sua associação com a CI, em que é mais relacionada com dor e sensação de bexiga cheia, daquela causada pela Síndrome da Bexiga Hiperativa Idiopática (SBHI), que é mais associada com a sensação de perda urinária, porém essa associação nem sempre é presente ^(8, 9).

Para as mulheres com CI a urgência tende a ser descrita como uma sensação iminente de iniciar a micção, uma maneira de evitar que os sintomas de dor ou equivalente doloroso como pressão ou desconforto se intensifiquem, enquanto para as mulheres com SBHI a urgência é mais usada para descrever um desejo iminente de ir ao banheiro e desencadear a micção para evitar perda urinária ⁽⁹⁾.

Os sintomas geralmente são desproporcionais em relação aos eventuais achados inflamatórios, o que é característico do componente de alodínea e hiperalgesia da síndrome. A graduação dos sintomas pode variar com o estágio da síndrome, grau de insulto vesical e percepção individual da dor ^(9, 10).

A CI apresenta uma ampla variação na sua apresentação clínica, intensidade dos sintomas, no impacto na qualidade de vida, achados cistoscópicos e histopatológicos (biópsia), na resposta ao tratamento e no seu curso clínico ⁽¹⁰⁾.

Devido à falta de entendimento completo da sua fisiopatologia e a dificuldade de diagnóstico, a CI permaneceu como diagnóstico de exclusão e passou por várias mudanças de nomenclatura e na sua definição, sendo hoje cada vez mais considerada como uma doença sistêmica, baseada nos sintomas e não mais apenas limitada a bexiga e com achados cistoscópicos raros e poucos sensíveis como as lesões de Hunner ⁽¹⁰⁾. A CI, inicialmente considerada como uma doença limitada à bexiga, hoje é considerada como uma síndrome de dor crônica, por isso vem sofrendo variações de nomenclatura como Síndrome da Bexiga Dolorosa – SBD ⁽⁹⁻¹²⁾. Neste contexto de transição e de mudança de nomenclatura manteremos o nome CI ou CI/SBD ao nos referirmos da mesma condição estudada nesta tese.

A duração da dor e dos sintomas de armazenamento caracteristicamente é maior que 6 meses. Os pacientes têm importante prejuízo na qualidade de vida tanto devido aos sintomas da doença de difícil controle quanto pelo componente psicossocial, com impacto na vitalidade e saúde mental ⁽¹³⁾. Muitas vezes se associa com sintomas depressivos ou de ansiedade, distúrbios do sono, alergias, síndrome de Sjögren ou mesmo com outras doenças psiquiátricas. Além disso, a CI sendo considerada uma síndrome de dor crônica tem uma maior associação com outras síndromes álgicas muitas vezes com sobreposição dos quadros clínicos. Isso pode acontecer com associações entre a CI e fibromialgia, vulvodínea, síndrome do intestino irritável, disfunção temporomandibular, síndrome de fadiga crônica e dor

pélvica crônica ⁽¹³⁻¹⁶⁾. Alguns estudos mostram que essas síndromes podem ocorrer independentemente ou associadas umas com as outras (isto é, ocorrendo como comorbidades), mesmo fora do contexto da CI ^(13, 14).

Essas associações com outras doenças e síndromes indicam que a fisiopatologia da CI pode ter associação com a fisiopatologia dessas síndromes relacionadas ou ainda pode ter uma via fisiopatológica comum. Sabe-se que os pacientes com CI também podem ter alguns quadros de dor com maior frequência que a população geral como lombalgia, cefaléia, dores articulares, dor em parede torácica, cólicas abdominais ⁽¹⁵⁾.

Em estudo conduzido por Warren et al, os autores concluem que essas síndromes álgicas estariam individualmente associadas a um risco para a CI aumentado e similar, independentemente do tipo da síndrome, e a coexistência de um maior número de síndromes estaria associada à uma prevalência maior da CI ⁽¹⁴⁾. Há referência em estudos mostrando que em pacientes com diagnóstico clínico de CI a associação de outras síndromes álgicas pode estar correlacionada a sintomas mais intensos de dor, pior qualidade de vida, maior associação com quadros depressivos e de disfunção sexual ⁽¹⁷⁾.

Com o intuito de criar uma definição para pesquisa e homogeneizar os pacientes com CI, para que esses pacientes pudessem ser estudados e comparados, o National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) em 1987 estabeleceu um critério para o diagnóstico de CI (Tabela1). Em 2003 um subcomitê do NIDDK propôs uma atualização dos critérios, porém após revisão da literatura, não houve evidências para mudança nos critérios ^(2, 9, 10, 17, 18).

Entretanto devemos ressaltar que os critérios do NIDDK são usados em estudos científicos e pouco usados na prática clínica, em que apenas cerca de um terço das pacientes consideradas por especialistas como sendo portadoras de CI preenchem os critérios do NIDDK ^(8, 17).

Em estudo retrospectivo da NIDDK IC Database foi evidenciado que 90% dos pacientes que preencheram os critérios de CI pelo critério do NIDDK foram realmente considerados pelos especialistas como sendo portadores de CI na prática clínica, enquanto que mais de 60% dos pacientes diagnosticados, por esses mesmos especialistas, na prática clínica como tendo CI não preencheram os critérios do NIDDK ^(9, 10).

Tabela 1. Critérios de diagnóstico de Cistite Intersticial - (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases -NIDDK).

Critérios de Inclusão NIDDK: São Necessários Dois Fatores Positivos para a Inclusão na População com Cistite Intersticial em Estudo
<ol style="list-style-type: none"> 1. Lesões de Hunner à cistoscopia. 2. Glomerulações à cistoscopia. 3. Dor associada à bexiga com o enchimento vesical aliviada com o esvaziamento vesical. 4. Dor suprapúbica, pélvica, uretral, vaginal ou perineal. 5. Diminuição da complacência vesical na cistometrografia. <p>As glomerulações devem ser avaliadas após a hidrodistensão vesical, sob anestesia, com pressão de 80-100 cm H₂O, durante 1-2 min. A bexiga só pode ter sido distendida até no máximo duas vezes antes da avaliação. As glomerulações devem ser difusas e presentes em pelo menos três quadrantes da bexiga e devem haver pelo menos 10 glomerulações por quadrante. As</p>

glomerulações não podem estar ao longo do trajeto do cistoscópio (para eliminar artefatos pelo contato com o cistoscópio).

Critérios de Exclusão NIDDK para definição de Cistite Intersticial

1. Capacidade vesical maior de 350 ml na cistometria com paciente acordado, usando meio líquido ou gasoso.
2. Ausência de forte desejo de miccional com a bexiga enchida com 100 ml de gás ou 150 ml de líquido.
3. Demonstração de contração detrusora involuntária fásica durante o enchimento vesical.
4. Duração dos sintomas menor de 9 meses.
5. Ausência de noctúria.
6. Sintomas aliviados com uso de agentes antimicrobianos, antissépticos urinários, anticolinérgicos ou antiespasmódicos.
7. Frequência miccional enquanto acordado menor de 8 vezes ao dia.
8. Diagnóstico de cistite bacteriana ou prostatite prévia em período de até 3 meses.
9. Cálculo vesical ou ureteral.
10. Herpes genital ativo.
11. Câncer de útero, cérvix, vagina ou uretra.
12. Divertículo de uretra.
13. Cistite causada por ciclofosfamida ou outro agente químico.
14. Cistite causada por tuberculose.
15. Cistite actínica.
16. Tumor de bexiga benigno ou maligno.
17. Vaginite.
18. Idade inferior à 18 anos.

NIDDK, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.

A etiopatogenia e fisiopatologia da CI ainda não são totalmente conhecidas e seus fatores genéticos ainda não foram identificados. Várias teorias têm sido sugeridas, mas nenhuma explica completamente as manifestações da síndrome, sugerindo que seja multifatorial ^(18, 19).

Uma delas envolve a alteração na barreira de glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos do urotélio vesical, com o aumento da permeabilidade urotelial ⁽²⁰⁻²³⁾. No nosso grupo foram realizados estudos avaliando esta teoria. Soler e cols. induziram lesão urotelial em modelos animais com a instilação intravesical de sulfato de protamina, demonstrando um aumento no nível urinário de GAGs sulfatados e de ácido hialurônico ⁽²⁴⁻²⁶⁾. No entanto outros estudos não demonstraram este mesmo padrão ⁽²⁷⁻²⁹⁾. Em trabalho mais recente do grupo, Lucon e cols. realizando biópsia vesical de pacientes com CI demonstraram uma menor expressão tecidual de GAGs sulfatados, assim como de sindecan e das sintases 2 e 3 do ácido hialurônico. Entretanto o mesmo estudo mostrou uma maior expressão tecidual de ácido hialurônico nestas pacientes ⁽³⁰⁾.

Diversas outras teorias também propostas incluem a ativação mastocitária ⁽³¹⁻³³⁾, liberação de mediadores inflamatórios ⁽³⁴⁻³⁶⁾, infecção subclínica ⁽³⁷⁾, alterações neuropáticas ^(38, 39), autoimunidade ⁽⁴⁰⁾, alteração da vascularização da bexiga ⁽⁴¹⁾, causas psiquiátricas ⁽⁴²⁻⁴⁴⁾ e susceptibilidade genética ^(45, 46).

Considerando a dificuldade de diagnóstico, a ampla variedade de apresentações e a associação da CI com outras doenças, é provável que ela represente uma síndrome com múltiplos mecanismos fisiopatológicos e fatores etiológicos. Por isso, é importante identificar marcadores genéticos e fatores de

susceptibilidade envolvidos na CI, o que contribuiria para o avanço no diagnóstico e no tratamento da doença ^(10, 11, 13, 14, 18).

A susceptibilidade à CI pode ser considerada hereditária, pois em estudo conduzido por Warren e colaboradores a prevalência de CI entre mulheres adultas parentes de primeiro grau foi 17 vezes maior do que a encontrada na população geral ⁽⁴⁵⁾. Também há um estudo prévio deste mesmo autor mostrando maior prevalência entre gêmeos monozigóticos comparados com dizigóticos ⁽⁴⁶⁾.

As influências genéticas na etiologia da CI e na percepção dos sintomas provavelmente são poligênicas ⁽⁴⁷⁾. Até o momento poucos estudos analisaram a relação entre variações genéticas e a CI e as diferenças fenotípicas individuais relacionadas à experiência dos sintomas nestas pacientes.

Muitas doenças podem ter associação com mutações ou com polimorfismo genético. As mutações gênicas podem ocorrer por deleção, inserção ou substituição de bases nitrogenadas no DNA (A, T, C, G). Geralmente são mais deletérias e ocorrem com menor frequência que os polimorfismos ⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾.

A sequência de DNA da mesma região de um cromossomo é muito semelhante entre diferentes indivíduos. Um segmento de DNA humano com cerca de 1.000 pares de bases (1kbp), escolhido ao acaso, varia, em média, apenas 1 par de base entre 2 cromossomos homólogos herdados dos pais. Considerando regiões codificadoras, esse número é ainda menor (cerca de um em 2.500 pares de bases) ⁽⁵¹⁾.

Polimorfismos de nucleotídeo único ou SNPs, do inglês Single Nucleotide Polymorphisms, são polimorfismos de DNA em que somente uma base é alterada

em uma frequência mínima de 1% em uma dada população. Atualmente, mais de 100 milhões de SNP já foram identificados no genoma humano ⁽⁵²⁾.

Os SNPs estão dispersos por todo o genoma humano podendo ocorrer tanto em regiões codificadoras como não codificadoras. SNPs que ocorrem em regiões codificadoras podem ser denominados sinônimos (sSNP) ou não sinônimos (nsSNP). Este último ocorre quando há substituição de um aminoácido na sequência proteica podendo haver modificações estruturais e funcionais na proteína e, portanto, tem um maior potencial de reflexo biológico ⁽⁵³⁾. Entretanto, a maior parte dos SNP identificados em genes humanos não resulta em alterações na sequência proteica, graças à sua localização em regiões não traduzidas da molécula de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) ou devido à redundância dos códons na codificação de aminoácidos. Estima-se que apenas 20% a 30% destes SNPs acarretem danos na função da proteína. Apenas uma pequena parcela de SNPs classificados como sinônimos podem modificar a estrutura e estabilidade do RNA mensageiro e afetar a quantidade de proteína produzida ⁽⁵²⁻⁵⁶⁾.

A identificação dos SNPs pode ser empregada em diversas áreas. Na grande maioria das vezes é utilizada como marcador de doenças ^(52, 54). As alterações mais frequentes no DNA são as que envolvem bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, trocas entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (C/T ou T/C) que são denominadas transições. As transversões são substituições de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa ^(51, 54, 55).

Alguns SNPs podem ser encontrados em genes relacionados com a patogênese de uma determinada doença, de modo que nestes casos sua detecção

pode ser usada como marcador diagnóstico. Outros polimorfismos como os nsSNP podem ter significado clínico, com papel direto na patogênese de uma doença específica ⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾.

Muitos polimorfismos têm sido analisados no estudo de síndromes inflamatórias e dolorosas, mas até agora o único estudo de polimorfismo em CI foi o do gene SCN9A ⁽⁵⁷⁾.

Diversos trabalhos têm estudado o papel do polimorfismo do gene SCN9A, que codifica um canal de sódio Nav1.7, localizado nos gânglios da raiz dorsal e em nervos periféricos, com a alteração da percepção de dor e a associação com algumas doenças dentre elas síndromes dolorosas ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾.

Recentemente Reeder, J. E. et al. conduziram um estudo retrospectivo para avaliar se o SNP do gene SCN9A teria associação com a CI. Os autores demonstraram que os pacientes com CI tiveram maior frequência do alelo A do SNP rs6746030 no gene SCN9A do que o encontrado na população geral ⁽⁵⁷⁾. Embora não exista evidência de que o canal Nav1.7 esteja presente na bexiga, e existam estudos controversos em relação a associação do SNP do gene SCN9A com susceptibilidade a dor crônica ⁽⁶⁰⁾, esses achados podem sugerir a influência genética na percepção da dor nesses pacientes com CI ou até que exista um maior risco genético de desenvolvimento de CI em pacientes portadores desse alelo do SNP rs6746030. É evidente que este é um estudo inicial e que novos estudos, prospectivos testando outros SNPs podem identificar novas associações e possíveis marcadores ^(58, 60).

1.2 Justificativa

Existem poucos trabalhos na literatura envolvendo polimorfismos genéticos e a CI. Além disso, poucos estudos analisaram a relação entre variações genéticas e as diferenças fenotípicas individuais relacionadas à experiência dos sintomas das pacientes com CI. Uma das hipóteses na base da fisiopatologia da CI pode ser a existência de uma disfunção nos mecanismos da dor.

Considerando a etiologia e a fisiopatologia da CI ainda não serem completamente conhecidas, além de ser uma síndrome de difícil diagnóstico e tratamento, sem critérios clínicos bem definidos e sem marcadores biológicos com acurácia adequada, e à luz dos conhecimentos com o mapeamento do Genoma Humano e com o avanço na pesquisa genética, selecionamos aqui SNPs que possam estar relacionados ao desenvolvimento da CI e também relacionados a características desta síndrome como, por exemplo, quadros de dor crônica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Avaliar a presença de polimorfismos que possam estar associados à Cistite Intersticial.

2.2 Objetivo secundário

Avaliar se há diferença na prevalência dos polimorfismos entre as pacientes com CI com maior ou menor sintomatologia, baseando-se na intensidade dos sintomas dolorosos.

3. MÉTODOS

3.1 Local do Estudo

As avaliações clínicas foram realizadas no Ambulatório de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) com pacientes que se dispuseram a ser acompanhadas por esse protocolo. As análises dos polimorfismos genéticos nas amostras de sangue das pacientes com CI foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica da Divisão de Urologia (LIM 55) da FMUSP.

3.2 Pacientes

O protocolo do estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HCFMUSP (ANEXO 1). Todas as pacientes envolvidas no estudo foram submetidas a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pela Comissão de Pesquisa, concordando em participar do estudo (ANEXO 2).

Durante o período deste protocolo de pesquisa foi planejado a inclusão de 30 pacientes do sexo feminino captadas no Ambulatório de Urologia Feminina da Divisão de Clínica Urológica do HCFMUSP. Posteriormente subdivididas em 2 grupos: 1- mulheres com diagnóstico bem estabelecido de CI e 2 - um grupo controle com mulheres, que seguem no Ambulatório de Urologia devido à incontinência urinária de esforço. Todas as pacientes do grupo controle devendo

apresentar como único sintoma miccional a perda urinária aos esforços comprovada por exame clínico e urodinâmico.

O projeto foi aprovado e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – (ANEXO3). Inicialmente fizemos a seleção (empírica) de alguns polimorfismos já descritos na literatura médica, a maioria deles relacionados a síndromes álgicas e inflamatórias e que desta forma poderiam, por plausibilidade biológica, estar relacionados de alguma forma à Cistite Intersticial. Foram então selecionados e importados primers disponíveis para essa análise.

Foram aplicados os seguintes critérios de exclusão a todas as mulheres avaliadas: lactantes; antecedente de cistoscopia nos últimos 3 meses; antecedente ou uso de droga investigacional nos últimos 30 dias; terapia intra-vesical nos últimos 6 meses; doença neurológica com potencial alteração da função vesical; procedimentos prévios com potencial sequela vesical, co-existência de Fibromialgia, Síndrome de Intestino Irritável, Vulvodínea, Disfunção Temporomandibular e Dor Orofacial, presença além dos critérios de exclusão presentes nos critérios diagnósticos do NIDDK, de: suspeita de endometriose, sintomas ou sinais de obstrução infravesical, prolapso genital, suspeita de sintomas relacionados a compressão do nervo pudendo ou de dor relacionada à musculatura do assoalho pélvico.

Todas as pacientes foram avaliadas com história clínica completa. Realizaram exame físico geral e ginecológico, exames laboratoriais de rotina, urina tipo 1, urocultura, ultrassonografia de rins e vias urinárias, estudo urodinâmico e completaram um questionário clínico, avaliando idade, data de início dos sintomas,

doenças coexistentes, gravidade dos sintomas, tipos de tratamento pregresso e índice de qualidade de vida e intensidade dos sintomas através dos questionários: 1. The Interstitial Cystitis Symptom Index and Problem Index (O'Leary, Sant et al. 1997 – (ANEXO 4), 2. Pelvic Pain and Urgency/Frequency (PUF) Patient Symptom Scale adaptados à língua portuguesa (ANEXO 5), 3. Questionário McGill de dor crônica (MELZACK, 1975) - versão brasileira validada (Br-MPQ)- (CASTRO, 1999) – (ANEXO 6) e 4. Escala visual analógica (EVA) de quantificação de dor numérica e por cores (ANEXO 7) ⁽⁶¹⁻⁶⁴⁾.

Todas as pacientes realizaram cistoscopia. Biópsia vesical e citologia urinárias foram realizadas apenas em casos específicos, indicados a depender dos achados cistoscópicos. A hidrodistensão vesical foi realizada em todos os casos. Todas as pacientes foram submetidas aos critérios do NIDDK, que são os critérios oficiais para a definição de CI em termos de pesquisa científica. No grupo controle foram incluídas pacientes com incontinência urinária de esforço, com perdas urinárias comprovadas por estudo urodinâmico, sem outros sintomas miccionais.

Ao final do período de seleção, coletamos amostras de sangue de 34 pacientes com Cistite Intersticial e 23 pacientes do grupo controle. O material foi enviado para análise molecular no LIM 55 da FMUSP. Todas as pacientes com CI obtiveram score mínimo de 7 na escala O'Leary – Sant Symptom Index and Problem Index, o que confere uma sensibilidade de 90% e especificidade de 97% para a discriminação entre as pacientes com CI em relação as pacientes sem CI. Todas as pacientes com CI obtiveram score PUF mínimo de 13, o que confere 83% de

sensibilidade e 88% de especificidade na diferenciação entre as pacientes com ou sem o diagnóstico de CI (65).

Foi realizada inicialmente a análise comparativa entre as pacientes com CI e as do grupo controle. A mediana de idade das pacientes com CI foi de 50,5 anos enquanto que a mediana das pacientes do grupo controle foi de 57 anos. Em seguida as pacientes com CI foram estratificadas em 2 grupos na tentativa de dividir as pacientes com um quadro clínico mais intenso das com quadro mais ameno, no intuito de averiguar se algum SNP poderia ser marcador de intensidade e controle dos sintomas, particularmente a dor.

As pacientes foram divididas em dois grupos de acordo com a intensidade da dor no início do tratamento. Foram consideradas pacientes com dor intensa as que relataram dor com intensidade igual ou superior a 7 (sete) na escala visual analógica- EVA- (numérica (0-10) e de cores) ou então as que classificaram sua dor em um dos números mais altos na escala afetiva no questionário McGill de dor crônica (Br-MPQ), como dor “maldita”, “miserável”, “exaustiva”, “insuportável” ou “enlouquecedora”.

As comorbidades existentes e avaliadas nas 34 pacientes do estudo com CI foram: transtorno depressivo (4 pacientes), transtorno afetivo bipolar (2 pacientes), transtorno de ansiedade generalizada (2 pacientes), síndrome do pânico (2 pacientes), retocolite ulcerativa e idiopática (1 paciente). No total foram 9 pacientes com doenças associadas, sendo que 2 delas tiveram mais de uma doença associada (Tabela 2 A). As demais pacientes foram consideradas como sendo sem comorbidades ou com comorbidades leves por não apresentarem doenças que

pudessem estar relacionadas ao quadro de CI, como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, cefaléia episódica e hipotireoidismo. A Tabela 2 B mostra dados clínicos do grupo controle.

Tabela 2 - A. Características clínicas das pacientes com Cistite Intersticial – idade, raça, IMC, pontuação escala de dor e questionários O’Leary Sant e PUF, presença de lesão de Hunner e comorbidades associadas.

	Idade (anos)	Raça	O’ Leary- Sant	PUF	Dor (EVA)	Hunner	Comorbidades	IMC
1	48	Branca	28	25	8	-	-	27,4
2	35	Branca	20	20	6	-	+	29,3
3	42	Branca	31	30	9	-	-	31,1
4	59	Branca	30	27	9	-	+	27,4
5	37	Branca	28	25	9	-	-	29,3
6	41	Branca	19	18	4	-	-	28,6
7	50	Branca	21	16	6	-	-	31,2
8	68	Branca	17	15	4	-	-	29,6
9	48	Não-branca	20	20	5	-	-	27,8
10	52	Branca	24	21	5	-	-	26,8
11	47	Branca	18	16	5	-	+	29,2
12	69	Branca	18	15	6	-	-	30,4
13	56	Não-branca	29	32	9	-	-	26,1
14	62	Branca	18	15	4	-	-	27,7
15	52	Branca	24	23	7	-	+	28,3
16	47	Branca	19	17	5	-	-	28,6
17	65	Branca	24	26	7	-	-	30,3
18	31	Branca	30	25	7	-	-	28,0
19	43	Branca	33	30	9	-	+	27,5
20	67	Branca	26	23	7	-	-	27,3
21	70	Branca	18	15	NA	-	-	29,4
22	60	Não-branca	19	20	4	-	+	25,3
23	53	Branca	18	21	4	-	-	27,9
24	61	Branca	27	23	9	-	-	27,2
25	49	Branca	29	25	9	-	-	28,7
26	46	Branca	19	16	7	+	-	29,0

27	45	Branca	23	19	7	-	+	27,5
28	32	Branca	13	22	7	-	-	28,8
29	62	Branca	29	25	7	-	-	27,6
30	64	Branca	33	33	9	-	+	29,8
31	51	Não-branca	30	27	8	-	-	26,7
32	37	Branca	32	30	9	-	-	27,1
33	31	Branca	27	26	8	-	+	26,2
34	67	Branca	22	18	7	-	-	26,4

Tabela 2 - B. Características clínicas do grupo controle.

	Idade (anos)	Raça	O' Leary-Sant	PUF	Dor (EVA)	Hunner	Comorbidades	IMC
1	51	Branca	-	-	0	-	-	27,3
2	64	Não-branca	-	-	0	-	-	28,6
3	53	Branca	-	-	0	-	-	30,1
4	60	Branca	-	-	0	-	-	26,6
5	47	Branca	-	-	0	-	-	27,8
6	68	Não-branca	-	-	0	-	-	28,9
7	55	Branca	-	-	0	-	-	31,0
8	53	Branca	-	-	0	-	-	26,5
9	65	Branca	-	-	0	-	-	25,6
10	54	Não-branca	-	-	0	-	-	27,4
11	61	Branca	-	-	0	-	-	32,2
12	63	Branca	-	-	0	-	-	28,7
13	68	Branca	-	-	0	-	-	29,7
14	57	Branca	-	-	0	-	-	29,5
15	52	Branca	-	-	0	-	-	26,4
16	51	Branca	-	-	0	-	-	27,8
17	73	Branca	-	-	0	-	-	32,3
18	49	Branca	-	-	0	-	-	26,2
19	66	Branca	-	-	0	-	-	27,0
20	57	Branca	-	-	0	-	-	26,8
21	68	Branca	-	-	0	-	-	27,9
22	53	Branca	-	-	0	-	-	27,5
23	56	Branca	-	-	0	-	-	28,1

3.3 Polimorfismos

Foram avaliados 20 polimorfismos (SNPs). Estes foram escolhidos após pesquisa em bases de dados (PubMed) cruzando os *termos* “*single nucleotide polymorphism*”, “*polymorphism*”, “*SNP*” and “*pain*”, “*pain syndrome*”, “*inflammation*”, “*anxiety*”, “*depression*”, “*psychiatric syndrome/disease*”, “*fibromyalgia*”, “*inflammatory bowel disease*”, “*migraine*”, “*headache*”, “*bladder*”, “*frequency*”, “*urgency*”. Foram selecionados os principais trabalhos e os principais SNPs identificados nestas condições e posteriormente, de acordo com o orçamento e com a disponibilidade dos primers solicitados em empresa norte-americana, foram importados os primers para genotipagem dos polimorfismos na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos SNPs avaliados.

SNP	Gene	Alelo	Selvagem	Polimórfico
rs1800871	IL10	A/G	A	G
rs1800872	IL10	T/G	T	G
rs1800896	IL10	T/C	T	C
rs1800471	TGF β 1	G/C	G	C
rs1800629	TNF α	A/G	A	G
rs361525	TNF α	A/G	A	G
rs1800497	ANKK1/DRD2	A/G	A	G
rs6311	HTR2A	C/T	C	T
rs6277	DRD2	A/G	A	G
rs6276	DRD2	C/T	C	T
rs6313	HTR2A	A/G	A	G
rs2835859	KCNJ6	C/T	C	T
rs11127292	MYT1L	C/T	C	T
rs2243248	IL4	G/T	G	T
rs6887695	IL12B	C/G	C	G
rs3212227	IL12B	G/T	G	T
rs1799971	OPRM1	A/G	A	G
rs12579350	ANO2	A/G	A	G
rs3813034	SLC6A4	A/C	A	C
rs6746030	SCN9A	A/G	A	G

3.4 Extração de DNA

Para análise dos polimorfismos, primeiramente foi feita a extração de DNA das amostras enviadas, utilizando o *kit QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen®). Para execução deste método, as amostras foram equilibradas a temperatura ambiente e a quantidade de 200µl foi retirada de cada uma delas para extração. A esse volume foram adicionados 20µl de protease, e posteriormente 200µl de solução de lise (*Buffer AL*). As amostras foram então incubadas a 56°C por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados e foram adicionados 200µl de etanol (96 – 100%) e as amostras foram agitadas e centrifugadas. A mistura desse passo foi então transferida para um novo tubo contendo uma coluna fornecida pelo kit e as amostras foram centrifugadas para passagem da mistura pela coluna. O filtrado foi então descartado e foram realizadas etapas de lavagem da coluna com 500µl das soluções *Buffer AW1* e *Buffer AW2*, respectivamente. Após as lavagens, as colunas foram transferidas para um novo tubo, no qual foram adicionados 200µl da solução de eluição (*Buffer AE*), incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas. A pureza e concentração do DNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280nm).

3.5 Análise dos genótipos por PCR em tempo real quantitativo

Realizamos a análise da detecção dos polimorfismos por q-PCR de 57 amostras (pacientes), sendo 34 diagnosticadas com CI e 23 controles. Utilizamos a

técnica de identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos (Taqman®) (figura 1), amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise em tempo real.

Nessa abordagem foram utilizados *primers* flanqueando a região polimórfica para amplificação dos produtos por PCR, além de duas sondas que se anelam sobre uma pequena sequência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos. Em uma das extremidades de cada sonda está fixada uma molécula fluorescente (*dye reporter*), e na outra uma molécula não fluorescente, denominada *quencher*.

Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre as moléculas *dye reporters* e as *quenchers* impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de PCR, a Taq polimerase, por sua ação exonucleásica, quebra a sonda ligada ao fragmento, causando a liberação do *dye reporter* e a emissão de fluorescência. Como apenas a sonda específica para um determinado alelo é capaz de se ligar a ele, apenas a fluorescência emitida por ela será detectada. Cada sonda é marcada com uma fluorescência diferente e através da leitura da fluorescência emitida é possível determinar o genótipo da amostra. É importante citar que além do *dye reporter* e da molécula *quencher*, uma molécula denominada MGB (*Minor Groove Binder*) também está afixada à sonda, tendo a função de elevar a sua temperatura de anelamento, permitindo uma ligação mais específica, e evitando que ela se ligue inespecificamente à sequência correspondente ao outro alelo.

A detecção da fluorescência emitida na reação é feita por uma câmera CCD localizada no aparelho ABI-7500 (Applied Biosystems), capaz de detectar diferentes

comprimentos de onda e os genótipos são determinados de acordo com o perfil de emissão das fluorescências ao final da reação de PCR. Os oligonucleotídeos e sondas foram adquiridos da empresa Applied Biosystems.

Para amplificação dos fragmentos desejados utilizamos as seguintes condições de reação: 5,0 μ l do Master Mix TaqMan, 0,25 μ l de primer específico de cada polimorfismo, 2,75 μ l de água destilada e 2,0 μ l de DNA, totalizando um total de 10 μ l para cada reação. Para amplificação as amostras foram submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15" e 60°C por 1', precedidos por 2' a 50°C, e 10' a 95°C. O produto foi então analisado por PCR em tempo real, que faz a discriminação alélica através da emissão de luz em um comprimento de onda característico.

Figura 1. Sistema Taqman®: Identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos. Nesta abordagem além do primer são desenhadas um par de sondas que se anelam sobre uma pequena sequência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos (polimórfico e tipo selvagem). Em uma das extremidades de cada sonda está fixada uma molécula fluorescente (*dye reporter*), e na outra uma molécula não fluorescente, denominada *quencher*. Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os *dye reporters* e os *quenchers* impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de PCR, a Taq DNA polimerase, por sua ação exonucleásica, quebra a sonda ligada ao fragmento, causando a liberação do *dye reporter* e a emissão de fluorescência (Fonte: Reis ST).

3.6 Análise Estatística

A verificação do grau de significância da comparação entre as frequências observada e esperada nos grupos controle e de pacientes com CI foi feita pelo teste de qui-quadrado (χ^2).

Foram analisados 34 pacientes com CI e 23 pacientes do grupo controle. A frequência de 20 polimorfismos foi avaliada entre estes dois grupos, e além disso foram feitas análises dentro do grupo de pacientes com CI, analisando o grau de

intensidade do quadro de sintomas álgicos (de acordo com as escalas escala visual analógica, questionário McGill de dor crônica (Br-MPQ), escala de O'Leary –Sant e escala PUF).

Foi avaliada, quando possível, a força de associação entre cada um dos polimorfismos e o grupo através do cálculo de *odds ratio* (OR) e seu respectivo intervalo de confiança a 95% (IC 95%).

As análises estatísticas foram realizadas no *software* SPSS 19.0 para Windows, e em toda a análise o p foi considerado significativo quando menor ou igual a 0,05 (95% confiabilidade).

4. RESULTADOS

Foram realizadas as análises de frequência da distribuição dos genótipos e alelos dos 20 SNPs previamente selecionados em todas as amostras de DNA das 34 pacientes com CI e das 23 pacientes do grupo controle. Na tabela 4 demonstramos a frequência dos genótipos. Podemos observar que para o SNP rs11127292 embora a maioria apresente o genótipo homozigoto selvagem, nos casos de CI, 23,5% apresentam genótipo heterozigoto, enquanto no grupo controle nenhum indivíduo é portador do SNP, tanto em homozigose quanto em heterozigose ($p= 0,01$).

Tabela 4. Análise dos genótipos dos polimorfismos nas pacientes com Cistite Intersticial e no grupo controle.

SNP	Genótipo	CI (n)	Controle (n)	p
rs1800871				
	AA*	5,9% (2)	4,3% (1)	0,61
	AG	85,3% (29)	78,3% (18)	
	GG	8,8% (3)	17,4% (4)	
rs1800872				
	TT*	8,8% (3)	0% (0)	0,17
	TG	91,2% (31)	95,7% (22)	
	GG	0% (0)	4,3% (1)	
rs1800896				
	TT*	44,1% (15)	26,1% (6)	0,31
	TC	50% (17)	60,9% (14)	
	CC	5,9% (2)	13% (3)	
rs1800471				
	GG*	0% (0)	0% (0)	0,25
	GC	8,8% (3)	13% (3)	
	CC	91,2% (31)	87% (20)	
rs1800629				
	AA*	0% (0)	0% (0)	0,06
	AG	76,5% (26)	95,7% (22)	
	GG	23,5% (8)	4,3% (1)	
rs361525				
	AA*	0% (0)	0% (0)	0,48

	AG	55,9% (19)	65,2% (15)	
	GG	44,1% (15)	34,8% (8)	
rs1800497				
	AA*	3% (1)	13% (3)	
	AG	91,2% (31)	82,6% (19)	0,10
	GG	5,8% (2)	4,3% (1)	
rs6311				
	CC*	20,6% (7)	30,4% (7)	
	CT	64,7% (22)	39,1% (9)	0,14
	TT	14,7% (5)	30,4% (7)	
rs6277				
	AA*	14,7% (5)	13% (3)	
	AG	58,8% (20)	52,2% (12)	0,79
	GG	26,5% (9)	34,8% (8)	
rs6276				
	CC*	8,8% (3)	13% (3)	
	CT	44,1% (15)	39,1% (9)	0,81
	TT	47,1% (16)	47,9% (11)	
rs6313				
	AA*	14,7% (5)	21,7% (5)	
	AG	44,1% (15)	39,1% (9)	0,78
	GG	41,2% (14)	39,1% (9)	
rs2835859				
	CC*	8,8% (3)	4,3% (1)	
	CT	47,1% (16)	52,2% (12)	0,79
	TT	44,1% (15)	43,5% (10)	
rs11127292				
	CC*	76,5% (26)	100% (23)	
	CT	23,5% (8)	0% (0)	0,01
	TT	0% (0)	0% (0)	
rs2243248				
	GG*	0% (0)	0% (0)	
	GT	91,2% (31)	95,7% (22)	0,51
	TT	8,8% (3)	4,3% (1)	
rs6887695				
	CC*	23,5% (8)	17,4% (4)	
	CG	35,3% (12)	52,2% (12)	0,44
	GG	41,2% (14)	30,4% (7)	
rs3212227				
	GG*	23,5% (8)	47,8% (11)	
	GT	32,4% (11)	17,4% (4)	0,14
	TT	44,1% (15)	34,8% (8)	
rs1799971				
	AA*	47,1% (16)	26,1% (6)	0,28

	AG	50% (17)	69,6% (16)	
	GG	2,9% (1)	4,3% (1)	
rs12579350				
	AA*	2,9% (1)	0% (0)	
	AG	17,6% (6)	17,4% (4)	0,70
	GG	79,4% (27)	82,6% (19)	
rs3813034				
	AA*	14,7% (5)	21,7% (5)	
	AC	82,4% (28)	73,9% (17)	0,745
	CC	2,9% (1)	4,3% (1)	
rs6746030				
	AA*	5,9% (2)	13% (3)	
	AG	20,6% (7)	26,1% (6)	0,52
	GG	73,5% (25)	60,9% (14)	

*Genótipo Homozigoto Selvagem

A tabela 5 mostra a distribuição dos alelos entre casos e controles. Demonstramos que também para o SNP rs11127292 houve diferença significativa em que 100% (N=23) das pacientes do grupo controle foram identificadas como portadoras do alelo selvagem (C) e em nenhum foi identificado o alelo polimórfico (T). Em contrapartida, a prevalência do alelo selvagem (C) nas pacientes com Cistite Intersticial foi de 76,5% (N= 26) e o alelo polimórfico foi encontrado em 23,5% (N=8) das pacientes com CI ($p = 0,01$). Embora estatisticamente significante, como a prevalência do alelo polimórfico nas mulheres do grupo controle foi 0% não foi possível estimar o odds ratio (OR).

Tabela 5. Associação estatística e frequência dos alelos entre os pacientes com CI e o grupo controle.

SNP	Alelo	CI (n)	Controle (n)	Odds Ratio	p
rs1800871					
	A*	5,9% (2)	4,3% (1)	1	0,79
	G	94,1% (32)	95,7% (22)	0,72 [0,06 – 8,52]	
rs1800872					
	T*	8,8% (3)	0% (0)	–	0,14
	G	91,2% (31)	100,0% (23)		
rs1800896					
	T*	44,1% (15)	26,1% (6)	1	0,16
	G	55,9% (19)	73,9% (17)	0,44 [0,14 – 1,41]	
rs1800471					
	G*	0% (0)	0% (0)	–	–
	C	100,0% (34)	100,0% (23)		
rs1800629					
	A*	0% (0)	0% (0)	–	–
	G	100,0% (34)	100,0% (23)		
rs361525					
	A*	0% (0)	0% (0)	–	–
	G	100,0% (34)	100,0% (23)		
rs1800497					
	A*	2,9% (1)	13,0% (3)	1	0,14
	G	97,1% (33)	87,0% (20)	4,50 [0,48 – 50,89]	
rs6311					
	C*	20,6% (7)	30,4% (7)	1	0,39
	T	79,4% (27)	69,6% (16)	1,68 [0,50 – 5,69]	
rs6277					
	A*	14,7% (5)	13,0% (3)	1	0,85
	G	85,3% (29)	87,0% (20)	0,87 [0,18 – 4,06]	
rs6276					
	C*	8,8% (3)	13,0% (3)	1	0,70
	T	91,2% (31)	87,0% (20)	1,35 [0,27 – 6,84]	
rs6313					
	A*	14,7% (5)	21,7% (5)	1	0,49
	G	85,3% (29)	78,3% (18)	1,61 [0,40 – 6,35]	
rs2835859					
	C*	8,8% (3)	4,3% (1)	1	0,51
	T	91,2 % (31)	95,7% (22)	0,47 [0,04 – 4,81]	
rs11127292					
	C*	76,5% (26)	100,0% (23)	–	0,01
	T	23,5% (8)	0,0% (0)		

rs2243248					
	G*	0% (0)	0% (0)	–	–
	T	100,0% (34)	100,0% (23)		
rs6887695					
	C*	23,5% (8)	17,4% (4)	1	0,57
	T	76,5% (26)	82,6% (19)	0,68 [0,18 – 2,60]	
rs3212227					
	G*	23,5% (8)	47,8% (11)	1	0,06
	T	76,5% (26)	52,2% (12)	2,97 [0,95 – 9,30]	
rs1799971					
	A*	47,1% (16)	26,1% (6)	1	0,11
	G	52,9% (18)	73,9% (17)	0,39 [0,12 – 1,25]	
rs12579350					
	A*	2,9% (1)	0% (0)	–	0,40
	G	97,1% (33)	100,0% (23)		
rs3813034					
	A*	14,7% (5)	21,7% (5)	1	0,49
	C	85,3% (29)	78,3% (18)	1,61 [0,40 – 6,35]	
rs6746030					
	A*	5,9% (2)	13,0% (3)	1	0,34
	G	94,1% (32)	87,0% (20)	2,40 [0,36 – 15,64]	

* alelo selvagem

O grupo das pacientes com CI foi estratificado em dois subgrupos de acordo com as escalas de dor. Uma das pacientes com CI perdeu o seguimento durante o estudo e, por isso não participou desta segunda etapa do estudo. Foram definidos pelas escalas de dor McGill e EVA um grupo com 12 pacientes com CI e quadro de dor leve a moderada e um segundo grupo com 21 pacientes com quadro de dor intensa. Foi feita então a comparação entre a distribuição dos genótipos (tabela 6) e alelos entre esses dois grupos (tabela 7).

A análise dos genótipos não mostrou diferença entre as pacientes com CI estratificadas pelos sintomas dolorosos.

Tabela 6. Associação estatística e frequência dos genótipos entre o grupo de pacientes com CI com maior score de sintomas de dor comparado com os pacientes com menos dor.

SNP	Genótipo	Dor leve -moderada (n)	Dor intensa (n)	p
rs1800871				
	AA*	8,3% (1)	4,8% (1)	0,13
	AG	74,7% (9)	95,2% (20)	
	GG	16,6% (2)	0% (0)	
rs1800872				
	TT*	16,7% (2)	4,8% (1)	0,25
	TG	83,3% (10)	95,2% (20)	
	GG	0% (0)	0% (0)	
rs1800896				
	TT*	33,3% (4)	47,6% (10)	0,14
	TC	50% (6)	52,4 (11)	
	CC	16,7% (2)	0% (0)	
rs1800471				
	GG*	0% (0)	0% (0)	0,70
	GC	8,3% (1)	9,5% (2)	
	CC	91,7% (11)	90,5% (19)	
rs1800629				
	AA*	0% (0)	0% (0)	0,94
	AG	75% (9)	76,2% (16)	
	GG	25% (3)	23,8% (5)	
rs361525				
	AA*	0% (0)	0% (0)	0,26
	AG	41,7% (5)	61,9% (13)	
	GG	58,3% (7)	38,1% (8)	
rs1800497				
	AA*	0% (0)	4,8% (1)	0,39
	AG	100% (12)	85,7% (18)	
	GG	0% (0)	9,5% (2)	
rs6311				
	CC*	41,7% (5)	9,5% (2)	0,08
	CT	50% (6)	71,4% (15)	
	TT	8,3% (1)	19% (4)	
rs6277				
	AA*	16,7% (2)	14,3% (3)	0,17
	AG	41,7% (5)	71,4% (15)	
	GG	41,7% (5)	14,3% (3)	
rs6276				
	CC*	16,6% (2)	4,8% (1)	0,08

	CT	58,4% (7)	38,1% (8)	
	TT	25,0% (3)	57,1% (12)	
rs6313				
	AA*	8,3% (1)	19% (4)	0,35
	AG	33,3% (4)	47,6% (10)	
	GG	58,3% (7)	33,3% (7)	
rs2835859				
	CC*	16,7% (2)	0% (0)	0,15
	CT	41,7% (5)	52,4% (11)	
	TT	41,7% (5)	47,6% (10)	
rs11127292				
	CC*	66,7% (8)	81% (17)	0,36
	CT	33,3% (4)	19% (4)	
	TT	0% (0)	0% (0)	
rs2243248				
	GG*	0% (0)	0% (0)	0,90
	GT	91,7% (11)	90,5% (19)	
	TT	8,3% (1)	9,5% (2)	
rs6887695				
	CC*	16,7% (2)	28,6% (6)	0,37
	CG	25% (3)	38,1% (8)	
	GG	58,3% (7)	33,3% (7)	
rs3212227				
	GG*	8,3% (1)	33,3% (7)	0,24
	GT	41,7% (5)	42,9% (9)	
	TT	50% (6)	23,8% (5)	
rs1799971				
	AA*	25% (3)	61,9% (13)	0,06
	AG	75% (9)	33,3% (7)	
	GG	0% (0)	4,8% (1)	
rs12579350				
	AA*	0% (0)	4,8% (1)	0,72
	AG	16,7% (2)	19% (4)	
	GG	83,3% (10)	76,2% (16)	
rs3813034				
	AA*	16,7% (2)	14,3% (3)	0,74
	AC	83,3% (10)	81% (17)	
	CC	0% (0)	4,8% (1)	
rs6746030				
	AA*	8,3% (1)	4,8% (1)	0,52
	AG	8,3% (1)	23,8% (5)	
	GG	83,3% (10)	71,4% (15)	

*Genótipo Homozigoto Selvagem

Considerando a distribuição alélica, encontramos que para o polimorfismo rs6311, as pacientes com dor intensa possuíam o alelo polimórfico (T) em 90,5% dos casos, enquanto aquelas com dor leve a moderada apresentava este mesmo alelo em 58,3% dos casos ($p = 0,03$; OR: 6,78 - IC: 1,06 – 43,36).

Em relação ao polimorfismo rs1799971, a comparação entre as pacientes com CI mostrou que nas pacientes com dor leve a moderada houve uma prevalência de 25% (N=3) do alelo selvagem (A) e de 75% (N=9) do alelo polimórfico (G). Entre as pacientes com CI e quadro de dor intensa a prevalência do alelo selvagem (A) foi de 61,9% (N=13) e do alelo polimórfico (G) foi de 38,1% (N=8). Neste caso a presença do alelo polimórfico parece ter um efeito de proteção, diminuindo o risco das pacientes desenvolverem um quadro de dor intensa ($p = 0,04$; OR:0,2 - IC:0,04-0,99).

Tabela 7. Associação estatística e frequência dos alelos entre o grupo de pacientes com CI com maior score de sintomas de dor comparado com os pacientes com menos dor.

SNP	Alelo	Dor leve – moderada (n)	Dor intensa (n)	Odds Ratio	p
rs18008971					
	A*	8,3% (1)	4,8% (1)	1	0,67
	G	91,7% (11)	95,2% (20)	1,81 [0,10– 31,99]	
rs1800872					
	T*	16,7% (2)	4,8% (1)	1	0,25
	G	83,3% (10)	95,2% (20)	4,00 [0,32 – 49,59]	
rs1800896					
	T*	33,3% (4)	47,6% (10)	1	0,42
	G	66,7% (8)	52,4% (11)	0,55 [0,12 – 2,40]	
rs1800471					
	G*	0% (0)	0% (0)	-	-
	C	100,0% (12)	100,0% (21)	-	
rs1800629					

	A*	0% (0)	0% (0)	-	-
	G	100,0% (12)	100,0% (21)	-	
rs361525					
	A*	0% (0)	0% (0)	-	-
	G	100,0% (12)	100,0% (21)	-	
rs1800497					
	A*	0% (0)	4,8% (1)	1	0,44
	G	100,0% (12)	95,2% (20)	1,05 [0,95 – 1,15]	
rs6311					
	C*	41,7% (5)	9,5% (2)	1	0,03
	T	58,3% (7)	90,5% (19)	6,78 [1,06 – 4,36]	
rs6277					
	A*	16,7% (2)	14,3% (3)	1	0,85
	G	83,3% (10)	85,7% (18)	01,20 [0,17 – 8,42]	
rs6276					
	C*	16,7% (2)	4,8% (1)	1	0,21
	T	83,3% (10)	95,2% (20)	4,44 [0,35 – 55,57]	
rs6313					
	A*	8,3% (1)	19,0% (4)	1	0,40
	G	91,7% (11)	81,0% (17)	0,38 [0,03 – 3,92]	
rs2835859					
	C*	16,7% (2)	0% (0)	1	0,06
	T	83,3% (10)	100,0% (21)	0,83 [0,64 – 1,07]	
rs11127292					
	C*	66,7% (8)	81,0% (17)	1	0,35
	T	33,3% (4)	19,0% (4)	0,47 [0,09 – 2,38]	
rs2243248					
	G*	0% (0)	0% (0)	-	-
	T	100% (12)	100% (21)	-	
rs6887695					
	C*	16,7% (2)	28,6% (6)	1	0,44
	T	83,3% (10)	71,4% (15)	0,50 [0,08 – 2,99]	
rs3212227					
	G*	8,3% (1)	33,3% (7)	1	0,10
	T	91,7% (11)	66,7% (14)	0,18 [0,01 – 1,70]	
rs1799971					
	A*	25,0% (3)	61,9% (13)	1	0,04
	G	75,0% (9)	38,1% (8)	0,20 [0,04 – 0,99]	
rs12579350					
	A*	0% (0)	4,8% (1)	1	0,44
	G	100,0% (12)	95,2% (20)	1,05 [0,95 – 1,15]	
rs3813034					
	A*	16,7% (2)	14,3 % (3)	1	0,85
	C	83,3% (10)	85,7% (18)	1,20 [0,17 – 8,42]	

rs6746030					
	A*	8,3% (1)	4,8% (1)	1	0,67
	G	91,7% (11)	95,2% (20)	1,81 [0,10 – 31,99]	

* Alelo selvagem

5. DISCUSSÃO

Como já mencionado anteriormente, a etiologia e a fisiopatologia da CI ainda não são completamente conhecidas. Além disso, esta síndrome possui difícil diagnóstico e tratamento, pois não existem critérios clínicos bem definidos para tais¹⁶. Estudos em biologia molecular vêm ajudando a compreender mecanismos ainda não desvendados de diversas afecções, entretanto considerando a CI, existem poucos estudos na literatura que possam contribuir a respeito desta doença. Sendo assim, selecionamos alguns SNPs que possam estar relacionados ao desenvolvimento da CI e também relacionados a características desta síndrome como, por exemplo, quadros de dor crônica, para contribuirmos com o melhor entendimento da sua fisiopatologia (4, 11, 15, 18).

Encontramos alguns resultados significativos em nosso estudo. Considerando o polimorfismo rs11127292, demonstramos que o alelo selvagem esteve presente em 100% das mulheres do grupo controle, enquanto que nas pacientes com CI houve uma frequência do alelo polimórfico de 23,5%. Entretanto, devemos ressaltar que todas as mulheres com o alelo polimórfico possuíam o genótipo heterozigoto. O genótipo homozigoto polimórfico não foi encontrado em nenhuma das mulheres que participaram de nosso estudo. Considerando a intensidade da dor não encontramos diferenças significantes para este SNP.

Até o momento não existem outros estudos na literatura que tenham associado este SNP a CI. Este polimorfismo foi descrito na literatura em estudo avaliando a susceptibilidade genética à fibromialgia. Esse polimorfismo, localizado no gene MYT1L (*myelin transcription fator 1-like*) foi tanto associado a fibromialgia

(FM), quanto associado à maior sintomatologia em mulheres com FM e baixo índice de comorbidades ⁽⁶⁶⁾.

O gene MYT1L, presente em vias neuronais está envolvido com a diferenciação neuronal e alterações, assim como SNPs deste gene são descritos na literatura associados à distúrbios neuropsiquiátricos e à FM. Esses achados sugerem um papel do sistema nervoso central na susceptibilidade genética à FM ⁽⁶⁶⁾.

Durante a seleção das pacientes, pesquisamos detalhadamente a presença de sintomas relacionados FM baseando-se em história, exame físico e na aplicação dos critérios do American College of Rheumatology (ACR), 1990 e 2010 (ANEXO 8 e 9) ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾. O diagnóstico de FM (assim como o de síndrome do intestino irritável e de vestibulodínea) foi critério de exclusão para a seleção das pacientes no estudo. Assim, nenhuma das pacientes do estudo apresentou diagnóstico de CI e FM concomitante e nenhuma mulher do grupo controle apresentou o diagnóstico de FM.

Acredita-se que a FM e a CI possam ter alterações em comum dos mecanismos nociceptivos e este polimorfismo possa ter relação com a dor presente tanto em pacientes com FM e com CI de forma independente, visto que nosso trabalho encontrou associação deste polimorfismo com a CI e a literatura já demonstrou a associação do mesmo com a FM ⁽⁶⁶⁾.

Existem evidências na literatura de que algumas alterações genéticas nas vias serotoninérgicas também possam estar associadas à patogênese de síndromes dolorosas crônicas ⁽⁷⁰⁾. Os polimorfismos no gene do receptor de serotonina (5HT-2A) têm sido associados a essas síndromes dolorosas crônicas,

como a FM e a vestibulodínea ^(70, 71). O SNP rs6311 analisado por nós está associado ao receptor de serotonina ⁽⁷¹⁾. Em nosso trabalho não encontramos diferença estatística ao se comparar a prevalência do polimorfismo rs6311 em pacientes com CI com as mulheres do grupo controle. Porém analisando o grupo das pacientes com CI, a prevalência do alelo selvagem (C) foi de 9,5% (N=2) nas pacientes com sintomatologia álgica mais intensa, enquanto que para o alelo polimórfico (T) foi de 90,5% (N=19). A presença ao alelo polimórfico aumentou o risco de dor intensa em mais de seis vezes.

Embora não existam trabalhos na literatura associando este SNP com CI, estudos mostram que a presença do alelo polimórfico do SNP rs6311 foi maior em pacientes com vestibulodínea e também maior nas pacientes com dispareunia e dores no corpo concomitantes corroborando os nossos achados ^(70, 71).

Esses achados sugerem que o envolvimento das vias serotoninérgicas já conhecidas e descritas em outras síndromes álgicas crônicas também tenham influência na intensidade da percepção dolorosa nas pacientes com CI. Futuros estudos analisando outros polimorfismos ou marcadores das vias serotoninérgicas podem confirmar esse achado. Em contrapartida a esse achado e à essa hipótese, a análise de outro polimorfismo do gene do receptor de serotonina (5HT-2A), o rs6313, também analisado em nosso estudo não demonstrou diferença significativa entre pacientes com CI e o grupo controle e nem entre as pacientes com CI que foram mais ou menos sintomáticas.

O polimorfismo rs1799971 já foi avaliado em diversos estudos de dor, devido a sua relação com os opióides e a sua alta frequência em diversas etnias, chegando

a 10-15% em caucasianos e até a 50% em asiáticos. O SNP rs1799971 está presente no gene OPRM1, que codifica um receptor envolvido nos mecanismos de dor e sensibilidade aos opióides endógenos e exógenos ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾.

Em nosso estudo as pacientes com CI com menor sintomatologia álgica tiveram uma prevalência de 25% do alelo selvagem e 75% do alelo polimórfico. As pacientes com CI e quadro de dor intensa tiveram uma prevalência de 61,9% do alelo selvagem e 38,1% do polimórfico. Nossos dados sugerem a associação do alelo selvagem a maior sensibilidade dolorosa, assim tendo o alelo polimórfico um efeito protetor aos sintomas nociceptivos nas pacientes.

Corroborando com os nossos achados, estudos mostram que os pacientes com a presença do alelo polimórfico (G) do SNP rs1799971 podem ter uma maior afinidade às β -endorfinas endógenas, porém, em contrapartida, menor sinalização e menor expressão do receptor opióide μ (codificado pelo gene OPRM1). Desta forma sugeriram que o alelo polimórfico (G) tivesse um papel de proteção endógena à dor, mas ao mesmo tempo teriam uma necessidade de doses maiores de opióides exógenos para o controle da dor devido a expressão e sinalização reduzidas do receptor opióide μ ^(73, 74).

No nosso estudo as pacientes com CI com menor sintomatologia álgica tiveram uma prevalência de 25% (N=3) do alelo selvagem (A) e 75% (N=9) do alelo polimórfico (G). As pacientes com CI e quadro de dor intensa tiveram uma prevalência de 61,9% (N=13) do alelo (A) e 38,1% (N=8) do alelo (G).

É importante ressaltar que, embora alguns estudos tenham sugerido essa proteção a sensibilidade dolorosa relacionada ao alelo polimórfico (G), em uma

meta-análise de 14 estudos ⁽⁷⁴⁾ a presença deste alelo resultou em um efeito não-significante na percepção dolorosa, conferindo de modo geral apenas necessidade do uso opióides exógenos em dose discretamente maior para o alívio da dor nos portadores do alelo polimórfico.

Alguns estudos genéticos também avaliaram os efeitos de polimorfismos e mutações no gene SCN9A. Este gene codifica um canal de sódio transmembrana voltagem dependente (Nav1.7) localizado nos neurônios periféricos e tem um papel importante na percepção da dor. Alterações nesse gene são capazes de modificar a percepção do estímulo doloroso, tanto gerando um estado de hipersensibilidade álgica, quanto dependendo da alteração genética, como no caso de uma mutação, gerar uma condição rara de insensibilidade dolorosa ^(75, 76).

Diversos estudos focaram na hipótese de que polimorfismos genéticos envolvendo o gene SCN9A pudessem ser responsáveis por variações no limiar da dor e na sensibilidade álgica entre indivíduos ^(75, 76). Na literatura há um único estudo que mostrou uma maior prevalência dos genótipos homozigoto selvagem (AA) e heterozigoto (AG) do SNP rs6746030 (SCN9A) em 39,6% das pacientes estudadas com CI e em apenas 11,5% das mulheres do grupo controle ($p = 0,036$) ⁽⁵⁷⁾.

Em nosso estudo, avaliamos o SNP rs6746030, presente no gene SCN9A, e não encontramos diferenças significativas quando comparamos pacientes com CI versus grupo controle. Mesmo na avaliação entre as pacientes com CI estratificadas pela intensidade do quadro de dor, não encontramos diferença na frequência deste SNP.

Alguns estudos recentes, usando critérios mais amplos e menos restritivos de diagnósticos da CI/SBD como os dos guidelines da American Urological Association (AUA) e também os propostos pela European Society for the Study of Interstitial Cystitis, tem incluído um número maior de pacientes e mostrado maior associação de doenças e síndromes álgicas com a CI. Isso mostra que o conceito da CI vem evoluindo e se trata de uma síndrome heterogênea, com critérios diagnósticos controversos e com fenótipos clínicos diferentes. Desta forma, o fato de no nosso estudo termos aplicados critérios mais rígidos e objetivos para o diagnóstico da CI/SBD, pode ter selecionado pacientes com um menor espectro de dor somática, fora do contexto da bexiga. Existe uma tendência recente, de ampliar os critérios clínicos para o diagnóstico de algumas síndromes álgicas na prática clínica como a fibromialgia, a síndrome do intestino irritável e a cistite intersticial, facilitando o seu diagnóstico e consequentemente suas associações. Desta forma alguns estudos mais recentes com enfoque no quadro clínico de dor crônica e de qualidade de vida, conseguem recrutar um número maior de pacientes e mostram grandes associações entre essas síndromes. Em contrapartida, esses estudos geraram um grupo de pacientes maior e mais heterogêneo, dificultando a acurácia em pesquisa científica básica na CI/SBD.

Um dos fatores mais debilitantes e impactantes na qualidade de vida das pacientes com CI é a dor. Embora pelos critérios do NIDDK, a presença da dor não seja obrigatória para o diagnóstico da CI, na amostra do estudo ela foi onipresente e na maioria dos casos classificada como intensa (64% dos casos avaliados). Sugere-se que a CI possa ser um dos fenótipos de uma síndrome de dor crônica

podendo ter alterações genotípicas particulares ou comuns às outras síndromes de dor crônica. Nosso estudo embora inicial e com um número amostral relativamente pequeno demonstrou que de fato existem algumas alterações envolvidas no quadro de dor com menor ou maior intensidade relatada por nossas pacientes. O entendimento de alterações genéticas que possam estar envolvidas nos mecanismos da CI e que podem predispor ao quadro de dor crônica ou de estado inflamatório da bexiga pode facilitar a melhor caracterização da doença e permitir um melhor entendimento dos seus mecanismos e no futuro também no tratamento da CI.

Limitações do Estudo

Diversas limitações devem ser consideradas ao se analisar os resultados. Os resultados devem ser considerados com cautela, pois embora as pacientes tenham sido selecionadas com rigor, a CI é uma doença rara, de difícil diagnóstico, em especial para a participação de estudos científicos (critérios NIDDK), e com fenótipos heterogêneos. Além disso, o estudo foi realizado em uma única instituição, que mesmo sendo instituição de referência e provavelmente a maior e mais referenciada do Brasil, o tamanho amostral para a análise dos polimorfismos é limitado. Esse limite de tamanho amostral pode ser responsável por não atingirmos algumas associações estatisticamente significativas.

O diagnóstico e a exclusão das comorbidades foi feita baseado em consenso e critérios, sendo que nem todas as pacientes foram avaliadas por médico

especialista na área relacionada às comorbidades. Nem todas as síndromes ou doenças associadas à CI foram ativamente investigadas na clínica. Nossas pacientes são sempre acompanhadas por um grupo de poucos urologistas com ampla experiência em CI, porém por se tratar de instituição pública de amplo volume que trata pacientes de todo o país, a minoria faz acompanhamento multidisciplinar rotineiro com outras especialidades como neurologista, reumatologista, gastroenterologista, alergista. Desta forma, apesar de submetidas a avaliação clínica pelo urologista e à questionários, algumas doenças associadas podem, eventualmente, ser subdiagnosticadas.

Por último, o estudo trata apenas de mulheres e de uma única região (Brasil) e sabemos que os mecanismos de dor são extremamente complexos, comuns a diversas doenças e podem variar com a região estudada e com a etnia. Além disso, os SNPs são variações genéticas que podem ser mais frequentes em determinadas populações de acordo com a região estudada.

6. Conclusões

Quando comparamos pacientes com CI e o grupo controle encontramos que a prevalência do alelo polimórfico do SNP rs11127292 foi maior no grupo da CI ($p=0,01$).

Quando consideramos o quadro de dor encontramos que o alelo polimórfico do SNP rs6311 foi mais frequente nos casos de dor intensa, enquanto que a presença do alelo polimórfico do SNP rs1799971 foi mais prevalente nos quadros de dor leve a moderada.

7. Anexos

ANEXO 1 – Carta de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A análise dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na cistite intersticial.

Pesquisador: Homero Bruschini

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 18573913.8.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 796.015

Data da Relatoria: 17/09/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo prospectivo que irá analisar os polimorfismos genéticos de pacientes portadoras de cistite intersticial em comparação a um grupo controle, constituído por pacientes com incontinência urinária de esforço.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar prospectivamente a presença de SNPs em amostras séricas com maior expressão nas pacientes com cistite intersticial em relação a um grupo controle sem cistite e com alteração da continência urinária no intuito de identificar marcadores genéticos associados à doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa objetiva agregar informação inexistente na literatura que relaciona-se à fisiopatológica e poderá trazer resultados que contribuam para o diagnóstico no futuro

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 796.015

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores esclareceram os procedimentos assistenciais de rotina e os da pesquisa. Redigiram o TCLE específico para o grupo controle e adequaram as informações básicas do projeto solicitadas.

Recomendações:

Aprovar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 18 de Setembro de 2014

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

 RESPONSÁVEL LEGAL PELA (O) CRIANÇA/ADOLESCENTE

 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº
 APTO:
 BAIRRO: CIDADE

 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** A análise dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na cistite intersticial.

PESQUISADOR : Prof. Dr. Homero Bruschini

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente/Chefe grupo urologia feminina INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 18165

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de cirurgia, disciplina de urologia

3. **AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**

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

4. **DURAÇÃO DA PESQUISA :** 24 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Este estudo tem por objetivo identificar alterações genéticas que possam contribuir para o desenvolvimento da inflamação na sua bexiga que lhe causa tanto desconforto, e que até o momento não se sabe o motivo exato do desenvolvimento, sendo difícil o controle dos sintomas.

2 – Caso aceite participar do estudo, será colhido um frasco de sangue durante sua consulta de rotina, e você assinará este termo de consentimento.

3 – A coleta do sangue será feita através de métodos convencionais de retirada de sangue. Uma enfermeira fará a coleta numa sala destinada a isso no mesmo ambulatório de seu médico.

4 – O único desconforto para o senhor será no momento da retirada do sangue, pois envolverá uma picada com agulha. A coleta de sangue para este protocolo é idêntica a qualquer coleta de sangue que o senhor já tenha feito por outros motivos. A coleta de sangue raramente pode levar à formação de hematoma que regride espontaneamente nos dias seguintes a coleta do exame. Na ocorrência de qualquer problema relacionado à coleta, uma equipe treinada estará no local para tratar adequadamente o problema, independente do momento em que ele ocorra.

5 – Não há benefício direto para você como participante da pesquisa; somente no final do estudo poderemos identificar algum benefício para os pacientes, como por exemplo, a descoberta de alguma alteração genética que possa identificar indivíduos com maior propensão ao desenvolvimento desta inflamação na bexiga; caso isto ocorra, estes indivíduos poderão ser acompanhados de melhor forma, visando prevenção e um tratamento adequado.

6 – Não há procedimentos alternativos em relação a esta análise genética, que é uma potencial novidade na rotina de pacientes com esse tipo de inflamação; o fato de participar ou não do estudo em nada afetará o início ou manutenção do tratamento de sua doença do ponto de vista clínico.

7 – 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 o Prof. Dr. **Homero Bruschini**, que pode ser encontrado no endereço **Av. Dr. Arnaldo, 455, 2º andar, sala 2145**; Telefone: (11) 2661-7183. 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: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – 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;

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente; suas informações poderão ser reveladas ao senhor ou senhora em qualquer momento desde que requisitadas pelo próprio paciente ou representante legal.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – 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. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - 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 "A análise dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na cistite intersticial." Eu discuti com a Prof Dr. **Homero Bruschini** 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.

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO 3 – Carta de aprovação auxílio pesquisa FAPESP

18/05/2016

SAGe - Sistema de Apoio a Gestão

VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo	2013/24209-6
Linha de Fomento	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular - Fluxo Contínuo
Situação	Em Execução
Vigência	01/04/2015 a 31/03/2017
Beneficiário	Homero Bruschini
Responsável	Homero Bruschini
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Medicina/FM/USP

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em : 17/05/2016

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 1	23/03/2016	Aprovado

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Responsável

Comunicamos que o Relatório Científico relativo ao processo acima referido foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.

Para visualizar o parecer, por favor, acesse o Sistema SAGe (www.fapesp.br/sage), clique no menu Processos/Meus Processos e em Mais Informações/Despachos.

Atenciosamente,
Carlos Henrique de Brito Cruz
Diretor Científico da FAPESP

Frases para o Responsável

Não há frases associadas.

Transcrição de Parecer para o Responsável

Parecer do Relatório Científico. Por favor, analise o andamento do projeto, os resultados e as publicações decorrentes do mesmo.

Por favor, emita o parecer, comentários, críticas e sugestões.

Relatório adequado e bem estruturado. Desenvolvimento da pesquisa está sendo cumprido de forma apropriada e coerente, tendo sido atingido parte das metas desejadas. Recrutamento dos sujeitos e desenvolvimento dos ensaios programados estão sendo realizados conforme proposto no projeto inicial. Ainda não há publicações para o momento.

Por favor, analise os relatórios individuais sintéticos dos bolsistas de Treinamento Técnico, se houver

http://internet.caph.fapesp.br/SAGe_WEB/printDispatchExternal.do?method=prePrintDispatch&org.apache.struts.taglib.html.TOKEN=26e28338205a6be853... 1/2

ANEXO 4 – Versão brasileira do Questionário The Interstitial Cystitis Symptom Index and Problem Index (The O’Leary- Sant)

	Versão brasileira aprovada pelos Especialistas
Título	Índice de sintomas e índice de problemas da cistite intersticial
Instrução de preenchimento	Nome: _____ Data: _____ Por favor, circule a resposta que melhor descreve como você se sente em relação a cada questão.
Q1. Índice de sintomas	Durante o último mês, quantas vezes você sentiu forte vontade (necessidade) de urinar de repente (com pouco ou nenhum aviso)? 0. Nenhuma vez 1. Poucas vezes 2. Menos da metade das vezes 3. Quase metade das vezes 4. Mais da metade das vezes 5. Quase sempre
Q2. Índice de sintomas	Durante o último mês, você teve de urinar em menos de duas horas após urinar pela última vez? 0. Nenhuma vez 1. Poucas vezes 2. Menos da metade das vezes 3. Quase a metade das vezes 4. Mais da metade das vezes 5. Quase sempre
Q3. Índice de sintomas	Durante o último mês, quantas vezes você se levantou durante a noite para urinar? 0. Nenhuma vez 1. Uma vez 2. Duas vezes 3. Três vezes 4. Quatro vezes 5. Cinco ou mais vezes
Q4. Índice de sintomas	Durante o último mês, você sentiu dor ou ardência na bexiga? 0. Nenhuma vez 1. Poucas vezes 2. Quase metade das vezes 3. Mais da metade das vezes 4. Quase sempre
Q1. Índice de problemas	Durante o último mês, o quanto urinar muitas vezes durante o dia tem sido problema para você? 0. Nenhum problema 1. Muito pequeno problema 2. Pequeno problema 3. Médio problema 4. Grande problema
Q2. Índice de problemas	Durante o último mês, o quanto levantar-se durante a noite para urinar tem sido problema para você? 0. Nenhum problema 1. Muito pequeno problema 2. Pequeno problema 3. Médio problema 4. Grande problema
Q3. Índice de problemas	Durante o último mês, o quanto a vontade (necessidade) de urinar com pouco aviso tem sido problema para você? 0. Nenhum problema 1. Muito pequeno problema 2. Pequeno problema 3. Médio problema 4. Grande problema
Q4. Índice de problemas	Durante o último mês, o quanto a ardência, a dor, o desconforto ou a pressão na bexiga têm sido problema para você? 0. Nenhum problema 1. Muito pequeno problema 2. Pequeno problema 3. Médio problema 4. Grande problema

ANEXO 5 – Versão brasileira do Pelvic Pain and Urgency/Frequency (PUF) Patient Symptom Scale,

	Versão brasileira aprovada pelos especialistas
Título	Escala de avaliação de sintomas de dor pélvica, urgência/frequência (DUF) do paciente
Q1	Quantas vezes você vai ao banheiro quando está acordado (a) durante 1 dia (24 horas)? 0. 3-6 vezes 1. 7-10 vezes 2. 11-14 vezes 3. 15-19 vezes 4. Mais de 20 vezes
Q2 a	Quantas vezes você vai ao banheiro durante a noite depois que já pegou no sono? 0. 0 vez 1. 1 vez 2. 2 vezes 3. 3 vezes 4. Mais de quatro vezes
Q2 b	Se você acorda durante a noite para ir ao banheiro, o quanto isso o (a) incomoda? 0. Nada 1. Pouco 2. Médio 3. Muito
Q3	Atualmente, você tem RELAÇÃO SEXUAL? SIM _____ NÃO _____
Q4 a	SE VOCÊ É SEXUALMENTE ATIVO (A), você tem ou já teve dor ou forte vontade de urinar durante a relação sexual? 0. Nunca 1. Às vezes 2. Muitas vezes 3. Sempre
Q4 b	Você já evitou ter relação sexual por dor ou forte vontade de urinar? 0. Nunca 1. Às vezes 2. Muitas vezes 3. Sempre
Q5	Você sente dor na bexiga ou na região da pelve (vagina, parte inferior do abdome, uretra, períneo, testículo, pênis ou escroto)? 0. Nunca 1. Às vezes 2. Muitas vezes 3. Sempre
Q6	Você continua com vontade de urinar logo após ir ao banheiro? 0. Nunca 1. Às vezes 2. Muitas vezes 3. Sempre
Q7 a	Se você tem dor na bexiga ou na região da pelve, ela geralmente é: 0. Leve 1. Média 2. Forte
Q7 b	Quando a dor na bexiga ou na região da pelve o (a) incomoda? 0. Nunca 1. Às vezes 2. Muitas vezes 3. Sempre
Q8 a	Se você tem forte vontade de urinar, ela geralmente é: 0. Leve 1. Média 2. Forte
Q8 b	Quando a forte vontade de urinar o (a) incomoda? 0. Nunca 1. Às vezes 2. Muitas vezes 3. Sempre

ANEXO 6 – Questionário de dor de MCGILL adaptado à língua portuguesa,

ALGUMAS PALAVRAS QUE EU VOU LER DESCREVEM A SUA DOR A TUAL, DIGA-ME QUAIS PALAVRAS MELHOR DESCREVEM A SUA DOR, NÃO ESCOLHA AQUELAS QUE NÃO SE APLICAM, ESCOLHA SOMENTE UMA PALAVRA DE CADA GRUPO, A MAIS ADEQUADA PARA A DESCRIÇÃO DE SUA DOR,

1	5	9	13	17
1-vibração	1-beliscão	1-mal localizada	1-amedrontadora	1-espalha
2-tremor	2-aperto	2-dolorida	2-apavorante	2-irradia
3-pulsante	3-mordida	3-machucada	3-terrorizante	3-penetra
4-latejante	4-cólica	4-dóida		4-atraversa
5-como batida	5-esmagamento	5-pesada	14	
6-como pancada			1-castigante	18
	6	10	2-atormenta	1-aperta
2	1-fisgada	1-sensível	3-cruel	2-adormece
1-pontada	2-puxão	2-esticada	4-maldita	3-repuxa
2-choque	3-em torção	3-esfolante	5-mortal	4-espreme
3-tiro		4-rachando		5-rasga
	7		15	
3	1-calor	11	1-miserável	19
1-agulhada	2-queimadura	1-cansativa	2-enlouquecedora	1-fria
2-perfurante	3-fervente	2-exaustiva		2-gelada
3-facada	4-em brasa		16	3-congelante
4-punhalada		12	1-chata	
5-em lança	8	1-enjoada	2-que incomoda	20
	1-formigamento	2-sufocante	3-desgastante	1-aborrecida
4	2-coceira		4-forte	2-dá náusea
1-fina	3-ardor		5-insuportável	3-agonizante
2-cortante	4-ferroada			4-pavorosa
3-estrapalha				5-torturante

ANEXO 7 – Escala Visual Analógica de Dor (EVA)

ANEXO 8 – Critérios para o diagnóstico de fibromialgia do American College of Rheumatology, 1990

- A. História de dor difusa,
Definição: Para ser considerada difusa devem existir os seguintes parâmetros: Dor do lado esquerdo do corpo, dor do lado direito do corpo, dor acima da linha de cintura e dor abaixo da linha de cintura, É necessária a presença concomitante de dor em esqueleto axial (coluna cervical, ou torácica anterior, ou dorsal ou lombar), Nesta definição, a dor em nádega ou ombro é considerada como dor para cada lado envolvido, A dor deve estar presente por pelo menos 3 meses, A dor lombar é considerada como dor em segmento inferior,
- B. Presença de dor em pelo menos 11 dos 18 *tender points*, à palpação digital aplicando-se uma força de aproximadamente 4 kg, para se considerar um *tender point* como “positivo”, o paciente deve declarar que a palpação tenha sido dolorosa,

Somente na presença de ambos os critérios o paciente poderá ser classificado como portador de fibromialgia, A dor difusa precisa estar presente por pelo menos três meses, A presença de um distúrbio clínico secundário não exclui o diagnóstico de fibromialgia, (Wolfe et al,1990)

Os 18 pontos dolorosos (tender-points) pré-estabelecidos são:

1-Ponto occipital	Bilateral, nas inserções do músculo sub-occipital
2-Ponto cervical inferior	Bilateral, na face anterior dos espaços intertransversários de C5 e C7
3-Ponto trapézio	Bilateral, no ponto médio do bordo superior do músculo
4-Ponto supra espinhoso	Bilateral, na origem do músculo acima da espinha da omoplata, junto do bordo interno.
5-Ponto da segunda costela	Bilateral, na junção costo-condral da segunda costela, imediatamente externo à junção e na face superior
6-Ponto epicôndilo	Bilateral, 2 cm externamente ao epicôndilo
7-Ponto glúteo	Bilateral, no quadrante superior externo da nádega, no folheto anterior do músculo
8-Ponto grande trocânter	Bilateral, posterior à proeminência trocantérica
9-Ponto joelho	Bilateral, na almofada adiposa interna, acima da interlinha articular

ANEXO 9 - Critérios de fibromialgia elaborados pelo American College of Rheumatology, 2010,

1) Índice de dor generalizada (widespread pain index, WPI): observar o número de áreas em que o paciente teve dor durante a última semana,

Em quantas áreas é que o paciente teve dor?

Ombro esquerdo	Ombro direito
Braço esquerdo	Braço direito
Antebraço esquerdo	Antebraço direito
Anca esquerda	Anca direita
Coxa esquerda	Coxa direita
Perna esquerda	Perna direita
Mandíbula esquerda	Mandíbula direita
Tórax	Abdómen
Pescoço	Região dorsal
Região lombar	

A pontuação irá estar compreendida entre 0 e 19,

2) Escala de pontuação de gravidade dos sintomas (symptom severity, SS):

Fadiga
Sono não reparador
Sintomas cognitivos
Sintomas somáticos (dor abdominal, cefaleia, dor muscular e articular, etc)

Para cada um dos 3 sintomas acima, indicar o nível de gravidade durante a semana passada utilizando a seguinte escala:

0 = nenhum problema

1 = problema ligeiro, geralmente leve ou intermitente

2 = problema moderado, considerável, muitas vezes presente e / ou em um nível moderado

3 = problema grave: problemas difusos, contínuos e inquietantes e que perturbam a vida,

Considerando os sintomas somáticos em geral, indica-se se o paciente tem:

Dor muscular	Síndrome do intestino irritável
Fadiga / cansaço	Pensar ou lembrar os problemas
Fraqueza muscular	Cefaleia
Dor / cólicas abdominais	Dormência / parestesias
Tonturas	Insónia
Depressão	Obstipação
Dor abdominal superior	Náuseas
Ansiedade	Dor torácica
Visão turva	Febre
Diarreia	Boca seca
Prurido	Sibilos
Fenómeno de Raynaud	Urticária
Zumbidos auditivos	Vómitos
Azia	Úlceras orais
Perda / mudança da sensação de gosto	Convulsões
Olhos secos	Falta de ar
Perda de apetite	Erupção cutânea
Sensibilidade ao sol	Dificuldades de audição
Queda de cabelo	Equimoses fáceis
Micção mais frequente que o normal	Micção dolorosa
Espasmos vesicais	

0 = sem sintomas

1 = alguns sintomas

2 = número moderado de sintomas

3 = grande quantidade de sintomas,

A pontuação SS é a soma da gravidade dos sintomas de 2 (Fadiga, Sono não reparador, Sintomas cognitivos) mais a extensão (gravidade) de sintomas somáticos em geral. A pontuação final está entre 0 e 12,

O doente preenche os critérios de diagnóstico para FM se as 3 condições seguintes estiverem presentes:

1	Índice de Dor Generalizas (WPI) for ≤ 7 e Escala de Gravidade dos Sintomas (SS) ≥ 5 ou WPI 3-6 e Escala SS ≥ 9
2	Sintomas presentes a um nível semelhante durante pelo menos 3 meses
3	Ausência de outra doença que possa explicar a dor

8. Referências

1. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology*. 2003;61(1):37-49.
2. Singh I, W. Strandhoy J, G. Assimos D. *Campbell-Walsh Urology Review 10th Ed* 2012.
3. Nigro D, Wein A. *Interstitial cystitis: clinical and endoscopy features*. Philadelphia: Lippincott-Raven 1997.
4. Nordling J, Wyndaele J, van de Merwe J, Bouchelouche P, Cervigni M, Fall M. *Bladder Pain Syndrome*: Springer; 2012.
5. Curhan GC, Speizer FE, Hunter DJ, Curhan SG, Stampfer MJ. Epidemiology of interstitial cystitis: a population based study. *J Urol*. 1999;161(2):549-52.
6. Jones CA, Harris MA, L N. Prevalence of interstitial cystitis in the United States. *J Urol* 1994. p. 151:423A.
7. Clemens JQ, Meenan RT, O'Keeffe Rosetti MC, Brown SO, Gao SY, Calhoun EA. Prevalence of interstitial cystitis symptoms in a managed care population. *J Urol*. 2005;174(2):576-80.
8. Hanno P, Lin A, Nordling J, Nyberg L, van Ophoven A, Ueda T, et al. *Bladder Pain Syndrome Committee of the International Consultation on Incontinence*. *Neurourol Urodyn*. 2010;29(1):191-8.
9. Hanno PM. Diagnosis of interstitial cystitis. *Urol Clin North Am*. 1994;21(1):63-6.
10. Hanno PM, Landis JR, Matthews-Cook Y, Kusek J, Nyberg L. The diagnosis of interstitial cystitis revisited: lessons learned from the National Institutes of Health Interstitial Cystitis Database study. *J Urol*. 1999;161(2):553-7.
11. Hanno P, Nordling J, van Ophoven A. What is new in bladder pain syndrome/interstitial cystitis? *Curr Opin Urol*. 2008;18(4):353-8.
12. Offiah I, McMahon SB, O'Reilly BA. Interstitial cystitis/bladder pain syndrome: diagnosis and management. *Int Urogynecol J*. 2013;24(8):1243-56.
13. van de Merwe JP, Nordling J, Bouchelouche P, Bouchelouche K, Cervigni M, Daha LK, et al. Diagnostic criteria, classification, and nomenclature for painful bladder syndrome/interstitial cystitis: an ESSIC proposal. *Eur Urol*. 2008;53(1):60-7.
14. Nickel JC, Tripp DA, Pontari M, Moldwin R, Mayer R, Carr LK, et al. Interstitial cystitis/painful bladder syndrome and associated medical conditions with an emphasis on irritable bowel syndrome, fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *J Urol*. 2010;184(4):1358-63.
15. Erickson DR, Morgan KC, Ordille S, Keay SK, Xie SX. Nonbladder related symptoms in patients with interstitial cystitis. *J Urol*. 2001;166(2):557-61; discussion 61-2.
16. Clauw DJ, Schmidt M, Radulovic D, Singer A, Katz P, Bresette J. The relationship between fibromyalgia and interstitial cystitis. *J Psychiatr Res*. 1997;31(1):125-31.
17. Warren JW, Wessellmann U, Morozov V, Langenberg PW. Numbers and types of nonbladder syndromes as risk factors for interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Urology*. 2011;77(2):313-9.

18. Gillenwater JY, Wein AJ. Summary of the National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases Workshop on Interstitial Cystitis, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, August 28-29, 1987. *J Urol.* 1988;140(1):203-6.
19. Hanno PM, Burks DA, Clemens JQ, Dmochowski RR, Erickson D, Fitzgerald MP, et al. AUA guideline for the diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *J Urol.* 2011;185(6):2162-70.
20. Parsons CL, Lilly JD, Stein P. Epithelial dysfunction in nonbacterial cystitis (interstitial cystitis). *J Urol.* 1991;145(4):732-5.
21. Graham E, Chai TC. Dysfunction of bladder urothelium and bladder urothelial cells in interstitial cystitis. *Curr Urol Rep.* 2006;7(6):440-6.
22. Keay S, Warren JW. A hypothesis for the etiology of interstitial cystitis based upon inhibition of bladder epithelial repair. *Med Hypotheses.* 1998;51(1):79-83.
23. Parsons CL, Greenberger M, Gabal L, Bidair M, Barne G. The role of urinary potassium in the pathogenesis and diagnosis of interstitial cystitis. *J Urol.* 1998;159(6):1862-6; discussion 6-7.
24. Soler R, Bruschini H, Martins JR, Dreyfuss JL, Camara NO, Alves MT, et al. Urinary glycosaminoglycans as biomarker for urothelial injury: is it possible to discriminate damage from recovery? *Urology.* 2008;72(4):937-42.
25. Soler R, Bruschini H, Freire MP, Alves MT, Srougi M, Ortiz V. Urine is necessary to provoke bladder inflammation in protamine sulfate induced urothelial injury. *J Urol.* 2008;180(4):1527-31.
26. Soler R, Bruschini H, Truzzi JC, Martins JR, Camara NO, Alves MT, et al. Urinary glycosaminoglycans excretion and the effect of dimethyl sulfoxide in an experimental model of non-bacterial cystitis. *Int Braz J Urol.* 2008;34(4):503-11; discussion 11.
27. Hurst RE, Parsons CL, Roy JB, Young JL. Urinary glycosaminoglycan excretion as a laboratory marker in the diagnosis of interstitial cystitis. *J Urol.* 1993;149(1):31-5.
28. Akçay T, Konukoğlu D. Glycosaminoglycans excretion in interstitial cystitis. *Int Urol Nephrol.* 1999;31(4):431-5.
29. Erickson DR, Xie SX, Bhavanandan VP, Wheeler MA, Hurst RE, Demers LM, et al. A comparison of multiple urine markers for interstitial cystitis. *J Urol.* 2002;167(6):2461-9.
30. Lucon M BH. Avaliação do metabolismo dos glicosaminoglicanos em pacientes portadores de cistite intersticial: Universidade de São Paulo; 2012.
31. Lynes WL, Flynn SD, Shortliffe LD, Lemmers M, Zipser R, Roberts LJ, et al. Mast cell involvement in interstitial cystitis. *J Urol.* 1987;138(4):746-52.
32. Rudick CN, Bryce PJ, Guichelaar LA, Berry RE, Klumpp DJ. Mast cell-derived histamine mediates cystitis pain. *PLoS One.* 2008;3(5):e2096.
33. Theoharides TC, Kempuraj D, Sant GR. Mast cell involvement in interstitial cystitis: a review of human and experimental evidence. *Urology.* 2001;57(6 Suppl 1):47-55.
34. Senhaji N, Serrano A, Badre W, Serbati N, Karkouri M, Zaid Y, et al. Association of inflammatory cytokine gene polymorphisms with inflammatory bowel disease in a Moroccan cohort. *Genes Immun.* 2016;17(1):60-5.

35. Mao YQ, Dong SQ, Gao M. Association between TNF- α rs1799724 and rs1800629 polymorphisms and the risk of Crohn's disease. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):15811-21.
36. Yang G, Chen J, Xu F, Bao Z, Yao Y, Zhou J. Association between tumor necrosis factor- α rs1800629 polymorphism and risk of asthma: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(6):e99962.
37. Keay S, Schwalbe RS, Trifillis AL, Lovchik JC, Jacobs S, Warren JW. A prospective study of microorganisms in urine and bladder biopsies from interstitial cystitis patients and controls. *Urology.* 1995;45(2):223-9.
38. Liu B, Su M, Tang S, Zhou X, Zhan H, Yang F, et al. Spinal astrocytic activation contributes to mechanical allodynia in a rat model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Mol Pain.* 2016;12.
39. Sugaya K, Nishijima S, Yamada T, Miyazato M, Hatano T, Ogawa Y. Molecular analysis of adrenergic receptor genes and interleukin-4/interleukin-4 receptor genes in patients with interstitial cystitis. *J Urol.* 2002;168(6):2668-71.
40. Jin XW, Liu BK, Zhang X, Zhao ZH, Shao Y. Establishment of a Novel Autoimmune Experimental Model of Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis in C57BL/6 Mice. *Inflammation.* 2017;40(3):861-70.
41. Saban R. Angiogenic factors, bladder neuroplasticity and interstitial cystitis-new pathobiological insights. *Transl Androl Urol.* 2015;4(5):555-62.
42. Harms KC, Kapitza KP, Pahl L, Tran AT, Volkmann L, Buers D, et al. Association of TNF- α polymorphism rs1800629 with multisomatoform disorder in a group of German patients and healthy controls: an explorative study. *Cytokine.* 2013;61(2):389-93.
43. Subaran RL, Talati A, Hamilton SP, Adams P, Weissman MM, Fyer AJ, et al. A survey of putative anxiety-associated genes in panic disorder patients with and without bladder symptoms. *Psychiatr Genet.* 2012;22(6):271-8.
44. Clemens JQ, Brown SO, Calhoun EA. Mental health diagnoses in patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a case/control study. *J Urol.* 2008;180(4):1378-82.
45. Warren JW, Jackson TL, Langenberg P, Meyers DJ, Xu J. Prevalence of interstitial cystitis in first-degree relatives of patients with interstitial cystitis. *Urology.* 2004;63(1):17-21.
46. Warren JW, Keay SK, Meyers D, Xu J. Concordance of interstitial cystitis in monozygotic and dizygotic twin pairs. *Urology.* 2001;57(6 Suppl 1):22-5.
47. Nussbaum RLM, Roderick R, Willard, Huntington F. T hompson & Thompson *Genética Médica* 7ª Ed. ed: ELSEVIER.
48. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes, Sixth Edition.* Neuro-Oncology. 2005;7(2):204-5.
49. TA. B. *Genomes:* Oxford: Wiley-Liss; 2002 [2nd:[Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21128/>].
50. Watson JD. *Recombinant DNA: Genes and Genomes: A Short Course:* W. H. Freeman; 2007.
51. *From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology.* By Jeremy W Dale and Malcolm von Schantz. *The Quarterly Review of Biology.* 2003;78(4):477-.

52. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet.* 1999;22(3):231-8.
53. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291(5507):1304-51.
54. Fredman D, Sawyer SL, Strömquist L, Mottagui-Tabar S, Kidd KK, Wahlestedt C, et al. Nonsynonymous SNPs: validation characteristics, derived allele frequency patterns, and suggestive evidence for natural selection. *Hum Mutat.* 2006;27(2):173-86.
55. Faber K, Glatting KH, Mueller PJ, Risch A, Hotz-Wagenblatt A. Genome-wide prediction of splice-modifying SNPs in human genes using a new analysis pipeline called AASsites. *BMC Bioinformatics.* 2011;12 Suppl 4:S2.
56. Myles S, Davison D, Barrett J, Stoneking M, Timpson N. Worldwide population differentiation at disease-associated SNPs. *BMC Med Genomics.* 2008;1:22.
57. Reeder JE, Byler TK, Foster DC, Landas SK, Okafor H, Stearns G, et al. Polymorphism in the SCN9A voltage-gated sodium channel gene associated with interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Urology.* 2013;81(1):210.e1-4.
58. Reimann F, Cox JJ, Belfer I, Diatchenko L, Zaykin DV, McHale DP, et al. Pain perception is altered by a nucleotide polymorphism in SCN9A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(11):5148-53.
59. Vargas-Alarcon G, Alvarez-Leon E, Fragoso JM, Vargas A, Martinez A, Vallejo M, et al. A SCN9A gene-encoded dorsal root ganglia sodium channel polymorphism associated with severe fibromyalgia. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012;13:23.
60. Holliday KL, Thomson W, Neogi T, Felson DT, Wang K, Wu FC, et al. The non-synonymous SNP, R1150W, in SCN9A is not associated with chronic widespread pain susceptibility. *Mol Pain.* 2012;8:72.
61. O'Leary MP, Sant GR, Fowler FJ, Whitmore KE, Spolarich-Kroll J. The interstitial cystitis symptom index and problem index. *Urology.* 1997;49(5A Suppl):58-63.
62. Victal ML, Lopes MHBdM, D'Ancona CAL. Adaptação à cultura brasileira dos questionários The O'Leary-Sant e PUF, usados para cistite intersticial. *Revista da Escola de Enfermagem da USP.* 2013;47:312-9.
63. Pimenta CAdM, Teixeira MJ. Questionário de dor McGill: proposta de adaptação para a língua portuguesa. *Revista da Escola de Enfermagem da USP.* 1996;30:473-83.
64. Santos CCd, Pereira LSM, Resende MAd, Magno F, Aguiar V. Applicability of the Brazilian version of the McGill pain questionnaire in elderly patients with chronic pain. 2006. 2006;13(2):8.
65. Kushner L, Moldwin RM. Efficiency of questionnaires used to screen for interstitial cystitis. *J Urol.* 2006;176(2):587-92.
66. Docampo E, Escaramís G, Gratacòs M, Villatoro S, Puig A, Kogevinas M, et al. Genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms and copy number variants in fibromyalgia suggest a role for the central nervous system. *Pain.* 2014;155(6):1102-9.

67. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1990;33(2):160-72.
68. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2010;62(5):600-10.
69. Bennett RM. Clinical manifestations and diagnosis of fibromyalgia. *Rheum Dis Clin North Am.* 2009;35(2):215-32.
70. Handan Yıldız S. Assessment of Pain Sensitivity in Patients With Chronic Low Back Pain and Association With HTR2A Gene Polymorphism 2017. 3-9 p.
71. Hedding U, Bohm-Starke N, Grönbladh A, Nyberg F, Nilsson KW, Johannesson U. Serotonin receptor gene (5HT-2A) polymorphism is associated with provoked vestibulodynia and comorbid symptoms of pain. *J Sex Med.* 2014;11(12):3064-71.
72. Gong XD, Wang JY, Liu F, Yuan HH, Zhang WY, Guo YH, et al. Gene polymorphisms of OPRM1 A118G and ABCB1 C3435T may influence opioid requirements in Chinese patients with cancer pain. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(5):2937-43.
73. Ren ZY, Xu XQ, Bao YP, He J, Shi L, Deng JH, et al. The impact of genetic variation on sensitivity to opioid analgesics in patients with postoperative pain: a systematic review and meta-analysis. *Pain Physician.* 2015;18(2):131-52.
74. Haerian BS, Haerian MS. OPRM1 rs1799971 polymorphism and opioid dependence: evidence from a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2013;14(7):813-24.
75. Duan G, Guo S, Zhang Y, Ying Y, Huang P, Wang Q, et al. The Effect of SCN9A Variation on Basal Pain Sensitivity in the General Population: An Experimental Study in Young Women. *J Pain.* 2015;16(10):971-80.
76. Fertleman CR, Baker MD, Parker KA, Moffatt S, Elmslie FV, Abrahamsen B, et al. SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron.* 2006;52(5):767-74.