EDISON DANIEL SCHNEIDER MONTEIRO

**Quantificação digital da imunoexpressão de
receptores adrenérgicos e terminações nervosas no
detrusor de portadores da síndrome de *prune belly***

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

Área de Concentração: Urologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Tibor Dénes

São Paulo

2008

A meus pais, Lydia e Samuel, que me
doaram o bem maior, a vida;

A minha esposa Karla, pelo amor,
compreensão e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu primeiro e maior agradecimento. Ele me tem feito um filho feliz. Tem sido meu sustentáculo em todos os momentos difíceis, tem me proporcionado momentos de alegria, me tem dado sua paz e serenidade para superar os obstáculos, e juntamente com Ele alcançar êxito. “Porque por Ele, por meio dEle e para Ele foram feitas todas as coisas”.

Sendo esta tese dedicada a minha esposa Karla, agradeço assim seu apoio, desde o período mais difícil na Alemanha, no início do trabalho, quando suas palavras de encorajamento e otimismo me fizeram perseverar e avançar. Sou grato também por sua compreensão nos períodos de ausência e concentração na confecção desta tese.

Registro minha honra e gratidão a meus pais, a quem dedico esta tese. Com esforço e abnegação, desde o primeiro choro, souberam me conduzir, aparando arestas, reforçando qualidades e, acima de tudo, me dando um exemplo vivo de determinação, dignidade, sabedoria, humildade e amor. A meus irmãos Cleide, Caleb e Jackson, que me apoiaram de perto, proporcionando suporte nas horas difíceis e incentivo para prosseguir, comemorando comigo as vitórias, comumente conquistadas.

Manifesto minha gratidão e apreço a meu melhor amigo, Dr. Edison Kioshi Yajima. Desde os tempos de calouro temos compartilhado grandes aventuras, tanto pessoais quanto acadêmicas. Sua atitude tem ultrapassado o apoio e estímulo que se espera de um verdadeiro amigo, tornando-se, principalmente nas horas aflitas, mais chegado que um irmão. Sou especialmente grato pelos comentários e sugestões no preparo dos manuscritos desta tese.

Aos pacientes, destinatários da ciência médica, que propiciam com sua dádiva o desenvolvimento de métodos terapêuticos mais eficazes. Este gesto de generosidade e bondade não se limitou a fronteiras políticas, geográficas ou sócio-econômicas.

Numerosos foram os que participaram do desenvolvimento deste trabalho, tanto no Brasil como na Alemanha, direta ou indiretamente, e desde já agradeço a todos indistintamente, ressaltando que as possíveis omissões são involuntárias.

Sou especialmente grato ao Prof. Francisco Dénes, meu orientador, por seu estímulo e apoio na decisão de realizar doutorado-sanduíche na Alemanha. Trabalhador incansável, não apenas no âmbito da assistência clínica, mas também da produção científica, tem sido referencial não apenas para mim, mas para todos aqueles que buscam exercer medicina e ciência em harmonia e com qualidade.

Manifesto meu carinho e gratidão ao Prof. Frederico Queiroz e Silva, que acompanhou meus primeiros passos acadêmicos na Urologia, tendo sido meu professor de aula prática no 4º ano da Faculdade de Medicina.

Registro meu agradecimento ao Prof. Emérito Sami Arap, que possibilitou formar-me urologista num serviço da maior excelência – HC-FMUSP. Graças a seu reconhecimento internacional e por meio de sua recomendação foram-me abertas portas de estágios em Londres, Detroit e Mainz.

Agradeço ao Prof. Titular Dr. Miguel Srougi, por sua maestria na condução da Clínica, especialmente no estímulo do desenvolvimento científico e acadêmico de seus membros, bem como pelo salto que promoveu no nível da pós-graduação, o

que dignifica todos os que aqui se graduam.

Gratidão devo também ao Prof. Homero Bruschini, por sua visível dedicação e empenho na condução dos trabalhos relacionados à pós-graduação. Merecedor do mérito de ter conduzido a melhora da conceituação da pós-graduação da Disciplina de Urologia da FMUSP.

Agradeço à Dra. Kátia Leite por suas sugestões na metodologia, na confecção dos grupos controle, no auxílio abnegado no preparo e processamento de parte do material coletado e na correção dos manuscritos, bem como suas sugestões como membro da Banca de Qualificação. Nosso convívio após meu retorno da Alemanha me tem sido muito enriquecedor.

Especialmente importantes na elaboração e correção do corpo textual da tese, devo imensa gratidão, com um misto de admiração e apreço, ao casal Dr. João Carlos das Neves Pereira e Dra. Elaine Stabenow. Além de amigos de longa data, me ajudaram desde o desenho da tese até a versão final. Demonstraram seu altruísmo e amizade dedicando horas de trabalho seja na aquisição de imagens ao microscópio, na análise estatística ou precisão terminológica.

Manifesto minha gratidão aos membros da Banca de Qualificação desta tese, Prof. Dr. William Nahas, Dra. Kátia Leite e Dr. Marcos Machado, pela atenção dedicada e valoroso auxílio.

Pelo estímulo, conselho, encorajamento e apoio desde que os conheço, agradeço a meus amigos docentes da Clínica Urológica Affonso Piovesan, Cristiano Mendes Gomes, Fabio Baracat, Flavio Trigo, Ioannis Antonopoulos, Jorge Hallak, José Luis Borges Mesquita e Leopoldo Alves Ribeiro Filho.

Aos amigos e companheiros ligados ao Setor de Urologia pediátrica da Clínica Urológica do HC-FMUSP, Prof. Dr. Amílcar Martins Giron, Dr. Marcos Gianetti Machado, sou grato pelo companheirismo e apoio.

Agradeço ao Dr. José de Bessa Júnior, amigo e colega de pós-graduação, por seu constante incentivo e estímulo na produção científica, bem como pelas discussões de análise estatística.

Devo gratidão ao Sr. Nilton Fontes Neuman (SVOC-USP) pelo auxílio na coleta do material de cadáver de crianças, e ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pasquallucci pela pronta autorização do projeto.

Por ter me ajudado a decidir e incentivado a ir para um *Fellowship* na Alemanha, manifesto minha gratidão e apreço ao Sr. Phillipe Carrasco.

Sou grato também pelas palavras de apoio e encorajamento que tenho recebido ulteriormente do casal Sr. Antonio e Sra. Alzira de Oliveira, bem como pelo carinho com que me receberam em sua família.

Na Alemanha, em particular, agradeço ao Prof. Dr. Thüroff, por me receber, e colocar sua clínica à disposição para o aprendizado e desenvolvimento de trabalhos de pesquisa. Com ele aprendi a seriedade no trabalho, e a gentileza no convívio social.

Ao Prof. Dr. Christian Hampel, por me orientar de perto nas pesquisas, possibilitando a concretização deste trabalho. Discutimos toda a metodologia deste trabalho, criticamos os resultados e continuamos trabalhando com afinco, desenvolvendo uma parceria internacional em trabalhos conjuntos.

Meu carinhoso agradecimento às técnicas de laboratório do Departamento de Urologia de Mainz, Sras. Tamara Trobisch e Manuela Hemmerlein-Thomas, por

terem me relembrado conceitos básicos de laboratório, me auxiliado no dia-a-dia das atividades laboratoriais, e por se dedicarem com afinco na realização das reações imunohistoquímicas do material estudado.

À amável Dra. Walburgis Brenner, chefe do Laboratório de Pesquisas do Departamento de Urologia de Mainz, por todo o apoio científico e logístico que me proporcionou em minha estadia na Alemanha.

Agradeço ao Prof. Biesterfeld, Prof. Müller-Klieser e Sra. Renate pelo apoio nas definições e padronização da análise quantitativa realizada.

Registro ainda meu agradecimento aos residentes (especialmente ao Dr. Frederick Roos) e assistentes do Departamento de Urologia de Mainz, pelo afável convívio e por coletarem, no intra-operatório, o material necessário para a pesquisa.

Devo agradecimento especial, pelo grande auxílio e apoio pessoal prestado na Alemanha, à família do Sr. Willi Schneider, e ao casal Martin e Heike Hügel.

Por participarem comigo da formação em língua alemã na cidade de Marburg, propiciando um convívio caloroso naquele severo inverno, agradeço a meus amigos, também bolsistas da CAPES/DAAD, Beatriz, Danielle, Eduardo, Zemar e Rodrigo.

À secretária da pós-graduação da Disciplina de Urologia da FMUSP, Sra. Elisa Maria Cruz e Silva, por sua disposição em ajudar, solucionar problemas, sempre com a mesma dedicação e carinho.

Agradeço a Sra. Maria Iones Souza Vancini, Sr. Rafles Cabral, Sra. Madalena Quintino e Sra. Maria de Lourdes Possari pelo incansável apoio logístico aos acadêmicos, residentes e pós-graduandos, tanto na secretaria geral como no ambulatório e enfermaria.

Agradeço à sempre amável Sra. Irene Keenan, por corrigir os manuscritos dos trabalhos em inglês.

Aos amigos e urologistas que têm me acolhido em sua prática clínica diária, me proporcionando novos conhecimentos e experiências profissionais, Dr. Davi Abe e Dr. Sergio Águida, o meu reconhecimento e gratidão. Nosso amável convívio tem me tornado um profissional mais capacitado.

Por fim, agradeço à CAPES e ao DAAD, por me possibilitarem o estágio de doutorado-sanduíche na Alemanha, proporcionando o aprendizado da língua alemã, e oferecendo condições para que eu pudesse permanecer naquele país dedicando-me ao aprimoramento da formação e produção científica.

“Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos!”

(Romanos 11:33)

Esta tese obedece:

As recomendações do Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, segundo o Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias, elaborado por Cunha AC, Freddi MJAL, Crestana MF, Aragão MS, Cardoso SC, Vilhena V. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação, 2004.

As normas de referências bibliográficas adaptadas do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos da *List of Journals Indexed in the Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. SÍNDROME DE <i>PRUNE-BELLY</i>	2
1.2. FISIOLOGIA DA MICÇÃO	15
1.2.1. ADRENORECEPTORES α_1	19
1.2.2. ADRENORECEPTORES β_3	23
1.3. TERMINAÇÕES NERVOSAS NO DETRUSOR	24
1.4. IMUNOHISTOQUÍMICA	26
2. OBJETIVO	29
3. CASUÍSTICA E MÉTODO	31
3.1. DESENHO DO ESTUDO E PESQUISA DOS DADOS DA CASUÍSTICA.....	32
3.2. COLETA DO FRAGMENTO DE BEXIGA.....	34
3.3. AVALIAÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA.....	35
3.3.1. TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE VAN GIESON.....	35
3.3.2. ANÁLISE DIGITAL DA RELAÇÃO MÚSCULO/TECIDO CONECTIVO	36
3.4. REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA	38
3.4.1. TÉCNICA DE COLORAÇÃO	38
3.4.2. QUANTIFICAÇÃO DIGITAL DA IMUNOEXPRESSÃO	41
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. RESULTADOS RELATIVOS À CASUÍSTICA.....	47
4.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PRÉ-OPERATÓRIAS	48
4.1.2. TRATAMENTO CIRÚRGICO.....	48
4.1.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PÓS-OPERATÓRIAS.....	48
4.2. RESULTADOS RELATIVOS AO ESTUDO HISTOLÓGICO DO DETRUSOR.....	49
4.3. RESULTADOS RELATIVOS AO ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO NO DETRUSOR.....	50
4.3.1. RESULTADOS DAS TERMINAÇÕES NERVOSAS MARCADAS PELO ANTICORPO ANTI-PROTEÍNA S100	50
4.3.2. RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS.....	51
4.3.2.1. Receptor Alfa-1a	51
4.3.2.2. Receptor Alfa-1b	53
4.3.2.3. Receptor Alfa-1d	54
4.3.2.4. Receptor Beta-3	55
5. DISCUSSÃO.....	56

5.1. DISCUSSÃO SOBRE O MÉTODO	57
5.2. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	63
6. CONCLUSÕES.....	70
7. ANEXOS.....	72
7.1. ANEXO A	73
7.2. ANEXO B	75
7.3. ANEXO C	76
8. REFERÊNCIAS	78
Apêndice	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\alpha 1$	receptor alfa 1
$\alpha 1a$	receptor alfa 1a
$\alpha 1b$	receptor alfa 1b
$\alpha 1d$	receptor alfa 1d
$\beta 3$	receptor Beta 3
$\alpha 1AR$	adrenoreceptor Alfa 1
$\beta 3AR$	adrenoreceptor Beta 3
AMP	adenosina monofosfato
ANOVA	análise de variância
Cap.	capítulo
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP
DAAD	<i>Deutscher Akademischer Austauschdienst</i>
DAB	3-3'-diaminobenzamidina
DAG	diacilglicerol
ed.	edição
et al.	e colaboradores
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GC1	grupo controle 1
GC2	grupo controle 2
HC	Hospital das Clínicas
IPSS	<i>International Prostatic Symptom Score</i>
IP3	inositol trifosfato
K	valor do teste Kruskal-Wallis

LSAB-HPR	<i>Large Streptavidin-Biotin – System Peroxidase</i>
M2	receptor muscarínico M2
M3	receptor muscarínico M3
n	número
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
HE	hematoxilina-eosina
p.	página
pbs	tampão fosfato de sódio
PBS	síndrome de prune belly
PCR	<i>polimerase chain reaction</i>
P2X	receptor purinérgico 2X
QR	quantidade relativa de receptores
RNA _m	ácido desoxirribonucléico mensageiro
RGB	<i>red, green, blue</i>
S100	proteína S100
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
SVOC-USP	Serviço de verificação de óbitos da capital – Universidade de São Paulo
U	valor do teste Mann-Whitney

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
cm	centímetro
µl	microlitro
µm	micrômetro
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
%	porcentagem
=	igual a
/	dividido
<	menor que
±	mais ou menos
X	vezes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diluição e especificações dos anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica.....	39
Tabela A1: Dados clínicos de pré-operatório.	73
Tabela A2: Dados clínicos de pós-operatório.....	74
Tabela A3: Resultados da relação área muscular/área de tecido conectivo e área de positividade imunohistoquímica/área muscular para a proteína S100 e para os adrenoreceptores $\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ e $\beta 3$	75
Tabela AP1: Causa do óbito das crianças submetidas à autópsia (GC2)	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo da estrutura secundária (A) e terciária (B) dos adrenoreceptores $\alpha 1$ (adaptado com permissão de Hampel, 2004) ⁹⁰	20
Figura 2 – Ilustração do mecanismo de ação dos adrenoreceptores $\alpha 1$ nas células musculares lisas (adaptado com permissão de Hampel, 2004) ⁹⁰	22
Figura 3 – Fotomicrografia de lâmina corada por van Gieson em aumento de 100x. A: Área total; B: Excluídos área branca e artefactos; C: Seleção da parte muscular; D: Seleção do tecido conectivo	37
Figura 4 – Fotomicrografias de lâminas coradas por imunohistoquímica para a proteína S100 (A) e adrenoreceptor $\alpha 1d$ (B), em aumento de 400x. Notam-se hemácias não coradas na luz do vaso, representativos de controle interno negativo, e observa-se nos nervos da parede dos vasos o controle interno positivo (setas).	40
Figura 5 – Fotomicrografia de lâminas coradas por imunohistoquímica em aumento de 400x. (A) Expressão de adrenoreceptor $\alpha 1a$ predominantemente na membrana celular; (B) expressão de adrenoreceptor $\alpha 1b$ na membrana e citoplasma; (C) expressão citoplasmática de adrenoreceptor $\alpha 1d$; (D) expressão citoplasmática de adrenoreceptor $\beta 3$	41
Figura 6– Ilustração do uso do Adobe Photoshop® na exclusão de áreas brancas e artefactos (A), com seleção da área muscular e medida de pixels (seta vermelha) desta, pelo histograma (B)	43
Figura 7 – Ilustração do uso do Adobe Photoshop® na seleção das áreas positivas, mudança da cor castanho (áreas positivas) para preto (A) e medida da área de cor preta, em pixels (seta vermelha em B)	44
Figura 8 – Gráfico representativo da relação área muscular/área de tecido conectivo no detrusor entre os grupos PBS, GC1 e GC2	50
Figura 9 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para proteína S100 e a área de tecido muscular entre os grupos PBS, GC1 e GC2 (teste Kruskal Wallis, $p=0,003$, teste Mann-Whitney, $p=0<0,001$).	51
Figura 10 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para adrenoreceptor $\alpha 1a$ e a área de tecido muscular	52
Figura 11 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para adrenoreceptor $\alpha 1b$ e a área de tecido muscular	53
Figura 12 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para adrenoreceptor $\alpha 1d$ e a área de tecido muscular	54
Figura 13 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para adrenoreceptor $\beta 3$ e a área de tecido muscular	55
Figura A1 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para proteína S100 e a área de tecido muscular.	77

RESUMO

Schneider-Monteiro ED. *Quantificação digital da imunoexpressão de receptores adrenérgicos e terminações nervosas no detrusor de portadores da síndrome de prune belly* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

INTRODUÇÃO

A síndrome de *prune belly* (PBS) é caracterizada por uma tríade com flacidez da parede abdominal, criptorquidia bilateral e malformações do trato urinário que compreende bexiga de capacidade aumentada, com complacência elevada, hipossensibilidade, hipocontratilidade, com divertículo ou fístula uracal e resíduo pós-miccional elevado. Alguns autores recomendam tratamento clínico, porém outros propõe correção cirúrgica, com reconstrução da via urinária incluindo ureteroplastia e cistoplastia redutoras, orquidopexia e abdominoplastia. Mesmo após a cirurgia, alguns doentes necessitam de cateterismo limpo intermitente.

A inervação vesical determina seu funcionamento, mediado por neuroreceptores na junção neuromuscular. Os adrenoreceptores $\alpha 1$ estão relacionados à contratilidade detrusora e o $\beta 3$ ao seu relaxamento, e certas condições como obstrução infravesical levam à hiperexpressão de receptores $\alpha 1$.

O objetivo da presente pesquisa é verificar se no detrusor de doentes com PBS há alteração na densidade de terminações nervosas, hiper ou hipoexpressão de receptores adrenérgicos $\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ e $\beta 3$ e proporção anormal dos tecidos muscular e conectivo.

MÉTODO

Trata-se de estudo retrospectivo de caso-controle que envolveu 14 espécimes de detrusor de doentes com PBS operados entre 1985 a 2005 no Hospital das Clínicas da FMUSP. Dois grupos foram constituídos como controle: 13 fragmentos de bexiga de doentes submetidos à prostatectomia radical no Departamento de Urologia da Universidade de Mainz, com urodinâmica pré-operatória normal (GC1), e cinco fragmentos de bexiga de crianças submetidas à necrópsia no SVOC-USP, sem anomalias neurológicas e de trato urinário. A coloração de van Gieson foi realizada para análise da proporção músculo/tecido conectivo, e a reação imunohistoquímica para os anticorpos policlonais anti-proteína S100 e anti-adrenoreceptores $\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ e $\beta 3$. A coloração castanho foi considerada evidência da expressão do adrenoreceptor na célula. Cinco a dez imagens digitais foram tomadas por meio de câmara digital e microscopia óptica. Estas foram analisadas pelo programa Adobe Photoshop CS2®. A quantidade relativa de receptores foi calculada e a análise estatística realizada pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

RESULTADOS

A média de idade foi de $1,28 \pm 1,14$ ano no grupo caso (PBS), e de $64 \pm 5,22$ anos e $1,41 \pm 1,11$ ano, nos grupos GC1 e GC2, respectivamente. A mediana da relação músculo/tecido conectivo foi de 1,08 para o grupo PBS, 1,59 para o GC1 e para o GC2 de 1,28 ($p=0,173$). A mediana da proporção S100/tecido muscular foi de 0,21 para o grupo caso (PBS), de 0,20 para o GC1 e para o grupo GC2 de 0,01 ($p=0,003$). A mediana da relação $\alpha 1a$ /tecido muscular foi de 0,06 para o grupo PBS, de 0,16 para o GC1 e para o grupo GC2 de 0,14 ($p=0,026$). Para $\alpha 1b$, as medianas foram 0,06 no grupo PBS, 0,006 no GC1 e 0,007 no GC2 ($p=0,781$). No $\alpha 1d$, as

medianas foram 0,04 (PBS), 0,04 (GC1) e 0,05 (GC2) ($p=0,618$). Com relação ao $\beta 3$, as medianas foram 0,07 no grupo PBS, 0,14 no GC1 e 0,10 no GC2 ($p=0,378$).

CONCLUSÕES

Comparando-se fragmentos de detrusor de doentes com PBS e bexigas normais não se observou alteração na densidade de terminações nervosas. Observou-se hipoexpressão do adrenoreceptor $\alpha 1a$, e não houve alteração dos adrenoreceptores $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ e $\beta 3$. Também não se observou alteração entre a proporção de tecido muscular e conectivo no detrusor destes doentes. Investigações adicionais, com diferentes métodos e incluindo outros receptores, são necessárias antes de se aplicar esses conhecimentos na prática clínica.

Descritores: 1.Síndrome de *prune belly* 2. Bexiga urinária/anatomia & histologia 3. Receptores adrenérgicos 4. Terminações nervosas 5.Imunoistoquímica/método 6. Interpretação de imagem assistida por computador

SUMMARY

Schneider-Monteiro ED. *Digital quantification of the imunoexpression of adrenergic receptors and nervous terminations in the detrusor of patients with prune belly syndrome* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

INTRODUCTION

Prune belly syndrome (PBS) is characterized by a triad of abdominal wall flaccidity, bilateral cryptorchidism and urinary tract malformation, that includes a large-capacity bladder, with high detrusor compliance, low sensibility and contractility, associated to urachal diverticulum or fistula and elevated post void residual volumes. Some authors recommend clinical treatment, but others propose surgery correction, with urinary tract reconstruction, including reductive ureteroplasty and cystoplasty, orchidopexy and abdominoplasty. Even after surgery, some patients need intermittent catheterism.

The detrusor innervation determines its function, mediated by neuroceptors at the neuromuscular junction. The $\alpha 1$ adrenoceptors are related to detrusor contractility and $\beta 3$ to relaxation, and some conditions, like infravesical obstruction, lead to $\alpha 1$ adrenoceptor up-regulation.

The objective of this work is to verify whether, in the detrusor from patients with PBS, there is altered nerve density, up or down-regulation of $\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ and $\beta 3$ adrenergic receptors and if there is an abnormal proportion between muscle and connective tissue.

MATERIALS AND METHODS

A retrospective case-control study was performed involving 14 detrusor specimens from patients with PBS, who underwent surgical treatment between 1985 and 2005 at University of São Paulo, Medical School Hospital. Two groups were taken as control: 13 bladder fragments from patients who underwent radical prostatectomy at Department of Urology of Mainz University, with normal urodynamic study prior to the surgery (GC1) and 5 bladder fragments from children submitted to autopsy at SVOC-USP, with no neurological or urinary tract malformation (GC2). Staining was performed using the van Gieson dye to analyse the proportion between muscle and connective tissue, and immunohistochemical reaction was employed, with polyclonal antibodies against S100 protein, as well as $\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ and $\beta 3$ adrenoceptors. Brown colour was considered as evidence of adrenoceptor cell expression. Five to ten digital images were captured on an optic microscope with a digital camera. These images were analysed with Adobe Photoshop CS2® software. The relative quantity of receptors was calculated and the statistic analysis was done with the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.

RESULTS

Mean age was 1.28 ± 1.14 year in PBS patients, and 64 ± 5.22 yrs. and 1.41 ± 1.11 yrs. in GC1 and GC2, respectively. The median proportion between muscle and connective tissue was 1.08 in PBS, 1.59 in GC1 and in GC2 of 1.28 ($p=0.173$). The median proportion of S100/muscle area was 0.21 in PBS, 0.20 in GC1 and in GC2 of 0.01 ($p=0.003$). The median relative quantity of receptors of $\alpha 1a$ was 0.06 in PBS, 0.16 in GC1 and 0.14 in GC2 ($p=0.026$). In $\alpha 1b$, the median values were 0.06 in PBS group, 0.006 in GC1 and 0.007 in GC2 ($p=0.781$). In $\alpha 1d$, the median values were 0.04 (PBS), 0.04 (GC1) and 0.05 (GC2) ($p=0.618$). Regarding $\beta 3$, the median values were 0.07 in PBS, 0.14 in GC1 and 0.10 in GC2 ($p=0.378$).

CONCLUSION

Comparing detrusor fragments from patients with PBS and normal bladders, there was no alteration in the density of nerve endings. We observed downregulation of α 1a adrenoceptors, but no alteration in the α 1b, α 1d and β 3 receptors. Furthermore, there was no alteration of the proportion between muscle and connective tissue areas. Further investigations, with different methods and including other receptors, are necessary to transfer this knowledge to clinical use.

Descriptors: 1.Prune belly syndrome 2.Urinary bladder/anatomy & histology 3.Receptors, adrenergic 4.Nerve endings 5. Immunohistochemistry 6.Image interpretation, computer-assisted

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os doentes portadores da síndrome de *prune belly* (PBS) freqüentemente apresentam uma bexiga de capacidade aumentada, hipocontratilidade detrusora e hipossensibilidade, podendo ter resíduo pós-miccional aumentado¹⁻³. Mesmo com o tratamento cirúrgico incluindo cistoredução, alguns doentes permanecem com dificuldade de esvaziamento vesical e necessitam, por vezes, de cateterismo intermitente. Esta tese avalia a presença de hiper ou hipoexpressão de adrenoreceptores e terminações nervosas no detrusor, procurando correlacionar os achados com a disfunção miccional presente na PBS.

Para a fundamentação das bases conceituais vigentes na literatura, esta introdução está dividida em tópicos: 1.1) Síndrome de *prune belly*, 1.2) Fisiologia da micção, 1.3) Terminações nervosas mielínicas e 1.4) Imunohistoquímica.

1.1. SÍNDROME DE *PRUNE-BELLY*

A PBS, também chamada de síndrome de Eagle-Barret ou síndrome tríplice, é caracterizada por uma tríade de anomalias: deficiência ou ausência da musculatura da parede abdominal, criptorquidia bilateral e malformação do trato urinário^{2, 4-6}. Outras anomalias podem estar presentes, dentre elas cardiovasculares (defeitos do septo atrial e ventricular), musculoesqueléticas (equinovaro), respiratórias (pneumotórax, pneumomediastino, hipoplasia pulmonar), gastrointestinais (malformações

ano-retais, gastrosquise, onfalocele) e de sistema nervoso central (anomalias oculares e malformações angiomasas cerebrais)^{7, 8}. Descreve-se correlação clínica com a síndrome do hipoperistaltismo de megabexiga-microcólon-intestinal (MMIHS), mais freqüente em meninas, porém com casos de membros da mesma família com as duas síndromes (menino com PBS e menina com MMIHS) e um caso de menino com as duas síndromes, e alguns autores indicam a possibilidade de patogênese semelhante, decorrente de processos análogos na sua formação^{9, 10}.

As anomalias urológicas podem se apresentar com graus variados de displasia renal, dilatação uretero-pélvica e redundância ureteral, bexiga de capacidade aumentada, eventualmente associada a divertículo ou fístula uracal e com resíduo pós-miccional elevado^{1, 11, 12}. Refluxo vesicoureteral pode estar presente em até 75% dos casos e em alguns há hipoplasia ou atresia uretral, o que prejudica o esvaziamento vesical^{13, 14}.

A manifestação clínica da PBS foi citada pela primeira vez por Frohlich apud Skoog¹⁵ em 1839. Entretanto, foi Parker apud Smith³ que identificou os elementos essenciais da síndrome. A denominação "*prune-belly*" é creditada a Osler apud Smith³, que em 1901 publicou um relato de caso. Eagle e Barrett, em 1950, identificaram a doença como uma síndrome, ao relatarem 9 casos, passando então a ser também denominada Eagle-Barrett⁵.

A incidência estimada da PBS é de 1:35 000 a 1:50 000 nascidos vivos e predomina maciçamente no sexo masculino (somente 3-5% dos casos em meninas)¹⁶⁻¹⁸. Por sua raridade, estudos com grandes casuísticas são limitados, e relatos de casos ainda são publicados atualmente^{19, 20}. Estudo

epidemiológico da década passada sugere que a PBS é mais freqüente em gemelares, negros e filhos de mães jovens²¹.

Várias teorias têm sido propostas para se esclarecer sua etiologia. A ocorrência de PBS em gêmeos e primos, e sua predominância no sexo masculino sugerem uma base genética, possivelmente autossômica dominante ligada ao sexo²²⁻²⁴. Estudo recente, entretanto, baseado em 11 casos de PBS familiar sugere fortemente um padrão de herança autossômica recessiva ligada ao sexo²⁵. Snow e Duckett propuseram que um retardo na canalização da membrana uretral, gerando um período embriológico de obstrução urinária, produziria maciças dilatações do trato urinário e deficiência no desenvolvimento da musculatura lisa. A canalização posterior aliviaria a dilatação do trato urinário mas deixaria as seqüelas observadas na síndrome²⁶. Outros autores também postulam que uma obstrução urinária temporária durante o período embrionário seria a causa das manifestações urinárias da PBS²⁷⁻³¹. Ainda outra teoria aventa a possibilidade de a obstrução do trato urinário no período embrionário levar a uma ascite urinosa severa e transitória, produzindo pressão abdominal elevada e levando à atrofia muscular da parede abdominal durante seu período crítico de diferenciação³²⁻³⁴. Stephens propôs em 1983 a teoria do mal desenvolvimento do saco vitelínico e alantóide, comprometendo a formação da bexiga e uretra³⁵.

Uma das teorias mais aceitas postula a ocorrência de uma disembrigênese mesenquimatosa nas placas lateral e para-axial intermediária entre a 3ª e 10ª semanas de gestação, determinando alterações estruturais do aparelho urinário, parede abdominal e trato genital².

^{3, 36}. No trato urinário determina a dilatação das vias excretoras e displasia renal^{15, 16, 37}. Na parede abdominal determina o comprometimento da diferenciação e migração das células da musculatura estriada determinando a flacidez da parede abdominal^{2, 38}. Nos testículos determina a criptorquidia intra-abdominal, resultante das anormalidades no mesênquima do gubernáculo (falha genética mesenquimal)³⁹, que o tornam refratário ao estímulo hormonal, bem como da diminuição da pressão intra-abdominal (decorrente da flacidez da parede abdominal) e da obstrução mecânica no trajeto (causada pelo sistema urinário dilatado e bexiga de grande volume)¹⁵. A disembrigênese seria responsável também pela hipoplasia prostática^{38, 40, 41}.

Apesar das várias teorias propostas, até o presente nenhuma delas foi aceita como sendo a real descrição etiológica das malformações da PBS.

No período pré-natal a PBS pode ser diagnosticada por meio da combinação de achados ultrassonográficos, tais como: bexiga aumentada, dilatação ureteral bilateral e sinais de flacidez da parede abdominal; sinais estes visualizados a partir da 12ª semana de gestação^{42, 43}. Embora seja possível o diagnóstico pré-natal, muitas vezes é difícil a diferenciação entre a PBS e sinais decorrentes da válvula de uretra posterior e atresia uretral⁴³. Alguns autores realizaram descompressão intra-útero com punção e derivação vésico-amnióticos, com relatos de melhora na evolução, porém a eficácia destes procedimentos ainda não está claramente estabelecida na literatura atual^{43, 44}.

As alterações clínicas da PBS se manifestam em grau variado no trato urinário, tanto entre os doentes, como entre os dois rins/ureteres de um

mesmo doente. Embora os rins possam ser normais, displasia renal e hidronefrose são comuns. Mais de 50% dos casos apresentam displasia renal, com graus variáveis de gravidade e geralmente assimétrica²⁸. O grau de dilatação pielocalicial está relacionado à deficiência intrínseca da musculatura lisa do sistema coletor³. Mesmo nos rins mais dilatados, o parênquima renal pode estar preservado, mantendo a função renal. Os casos de displasia mais acentuada estão associados à obstrução ao nível uretral^{11, 15}. A deterioração da função renal no período neonatal resulta de displasia renal, enquanto em crianças mais velhas a insuficiência renal está relacionada aos episódios de pielonefrite, provocados pela obstrução e refluxo^{3, 45}.

Os ureteres apresentam dilatação e tortuosidade em graus variáveis, em 81% dos casos, que se alternam com segmentos de calibre normal, podendo ocorrer até mesmo estenose^{2, 3}. Os segmentos distais do ureter são mais comprometidos. Os estudos anátomo-patológicos demonstram uma diminuição de células de músculo liso, substituídas por tecido conectivo e fibrose, mais pronunciada nos casos em que há refluxo vésico-ureteral (75%)^{46, 47}. À fluoroscopia, o ureter pode apresentar acentuada diminuição do peristaltismo ou eventualmente ser inerte^{2, 48}.

A bexiga apresenta capacidade aumentada e paredes espessadas, porém não trabeculadas, sendo facilmente palpada no hipogástrico. A cúpula vesical freqüentemente apresenta divertículo derivado do úraco que se fixa à cicatriz umbilical. Na presença de obstrução uretral esse divertículo se permeabiliza na cicatriz umbilical, formando uma fístula uracal. O colo vesical é aberto na sua junção com a uretra prostática^{3, 15, 49}. Kinahan et al.

descreveram 3 padrões de urofluxometria: início e fluxo máximo normais com desaceleração e prolongamento ao final da micção; fluxo prolongado, porém mantido e baixo, e um padrão intermitente¹. À avaliação urodinâmica, na fase de enchimento, observa-se complacência vesical elevada, diminuição da sensibilidade vesical com retardo do primeiro desejo de urinar e pressão detrusora normal ao final. A capacidade vesical pode atingir o dobro do volume normal¹³. A fase miccional, segundo Nunn et al. e Williams et al., geralmente apresenta pressão vesical e fluxo normais^{2, 48}. Porém, Kinahan et al. em 1992 demonstraram que a capacidade de contração do detrusor é diminuída pela freqüente presença de refluxo vésico-ureteral e hipocontratilidade detrusora¹. Apesar destas alterações, quase 50% dos doentes conseguem desencadear micção espontânea, melhorando o esvaziamento vesical com manobra de Credé ou Valsalva, e alguns poucos apresentam pressão de micção e fluxo normais, com pequeno resíduo pós-miccional^{1, 2, 13}. Alguns apresentam hiperatividade detrusora não associada à obstrução infravesical ou podem ter incoordenação vésico-esfincteriana^{12, 13, 50}. Tanto melhora espontânea quanto deterioração da eficácia miccional com o tempo têm sido observada, sendo que, na quase totalidade dos casos nos quais há resíduo pós-miccional significativo, não há evidência anatômica ou urodinâmica de obstrução e a pressão de micção não é elevada^{13, 48}.

Histologicamente, segundo Smith e Woodard, há substituição do tecido muscular liso por tecido conectivo. A parede vesical pode encontrar-se muito espessada, embora não haja trabeculação à avaliação macroscópica³. Nunn et al. estudando cinco natimortos e dois cadáveres de recém-nascidos com PBS encontraram variações da camada muscular, incluindo ausência em um

caso e vários graus de deficiência em outros². Workman et al. estudaram a histologia da parede vesical e encontraram duas populações diferentes em oito bexigas fetais: cinco eram fibróticas, com pouca musculatura e porcentual relativo de tecido conectivo aumentado (sem evidência de obstrução infravesical na autópsia) e três tinham massa muscular aumentada, embora com aumento proporcional do colágeno (autópsia com evidências de obstrução infravesical)⁵¹. Em contraposição, Rubinstein et al. estudando colágeno e elastina na parede vesical de doentes adultos com obstrução infravesical observaram aumento da proporção destes componentes (tecido conectivo) no detrusor, comparando-se com controles normais⁵². Quanto à inervação autonômica da bexiga, Henley e Hyman observaram ausência de gânglios na bexiga e ureter em 2 casos⁵³, porém outros autores, estudando maior número de casos, não comprovaram esta alteração concluindo que a distribuição das células ganglionares na bexiga é normal². Smith e Woodard afirmam que não há anormalidade na inervação vesical, porém sem a referência de estudo específico³.

Hipoplasia ou disgenesia prostática estão presentes na maioria dos doentes, com ausência de elementos epiteliais^{2, 34, 40, 54}. Devido a essa hipoplasia, a uretra prostática tem aspecto dilatado à avaliação radiográfica, afunilando-se na uretra membranosa, ao nível do diafragma urogenital. A parede posterior deste segmento é maior que a anterior, o que pode causar angulação da uretra durante a micção, com conseqüente obstrução funcional^{15, 34}. De fato, obstrução anatômica verdadeira da uretra posterior por atresia, estenose segmentar ou válvula de uretra posterior é raramente observada nas crianças sobreviventes^{6, 28, 55}. A hipoplasia da próstata

contribui para a infertilidade presente na síndrome, tanto pela falta de tecido secretor da próstata, como pela dilatação da uretra prostática e alargamento do colo vesical, que favorecem a ejaculação retrógrada na maioria dos doentes^{56, 57}. Em uma série de necrópsias de fetos e neonatos acometidos, Stephens e Gupta mostraram que, em alguns casos, as vesículas seminais são rudimentares ou ausentes, os vasos deferentes têm atresia segmentar e a adesão do testículo ao epidídimo é tênue⁵⁸.

Na maioria dos doentes com PBS a uretra anterior e o pênis são normais. Entretanto têm sido descritas hipospádias, rotação peniana, corda ventral ou dorsal, e agenesia peniana^{59, 60}. Também podem ocorrer atresia ou hipoplasia de uretra anterior, em associação com fístula uracal, cujos portadores geralmente têm pior prognóstico^{11, 61}. Megalouretra congênita, dos tipos escafóide ou fusiforme, também pode estar presente na síndrome.
49, 62-64.

A criptorquidia bilateral é parte essencial da síndrome e os testículos são intra-abdominais, localizados junto aos segmentos ureterais dilatados, na altura dos vasos ilíacos¹⁶. Nunn e Stephens observaram que a histologia testicular de fetos portadores da síndrome era igual à de fetos-controles², porém outros observaram diminuição do número de espermatogônias e hiperplasia das células de Leydig⁶⁵. A hipoplasia epitelial prostática e o colo vesical aberto tornam a ejaculação retrógrada comum e a análise do fluido seminal e urina pós-ejaculação revelam geralmente azoospermia. Porém Woodard apud Smith³ recentemente observou espermatozóides viáveis na urina após ejaculação de doente pós-puberal, no qual tinha sido realizada orquidopexia na tenra infância³. Existe pouca informação disponível quanto à

função sexual de homens com PBS, entretanto, sabe-se que a libido está presente, com ereção e orgasmo normais, porém a ejaculação anterógrada é rara e nenhum caso de paternidade espontânea foi relatado⁵⁷.

Com o advento das técnicas de fertilização *in vitro*, Kolettis et al. relataram, em 1999, o primeiro caso de paternidade em portador da PBS, através de injeção intracitoplasmática de espermatozóide. Em outro caso, coletaram espermatozoides a partir da microaspiração de esperma do epidídimo⁶⁶. Estes achados sustentam a orquidopexia precoce nestes doentes, possibilitando a futura paternidade, com auxílio de técnicas de fertilização assistida⁶⁷.

A flacidez abdominal característica é variável nos diversos doentes. A presença de pregas cutâneas na região periumbilical sugere semelhança com a superfície da ameixa seca, e por isso o nome da síndrome – *prune belly*. É dependente da deficiência da musculatura subjacente, sendo mais acentuada nos segmentos mediais e inferiores. À histopatologia observa-se agenesia⁶⁸, atrofia³⁷ ou hipoplasia do tecido muscular⁶. A deficiência muscular não é simétrica, podendo haver áreas de maior flacidez que outras¹⁵. Funcionalmente, o comprometimento da musculatura acarreta dificuldade para sentar-se, a partir da posição supina, além de retardar o início da deambulação³. Também contribui para uma maior incidência de infecção do trato respiratório, por falta de suporte abdominal para a respiração, particularmente no período pós-operatório^{3, 16}. Igualmente são descritas lordose e obstipação intestinal por consequência da falta de musculatura abdominal^{7, 69}.

Dado que a apresentação clínica da PBS é muito variável, foi proposta

uma classificação no intuito de facilitar sua caracterização e abordagem clínica, de acordo com o grau de comprometimento anatômico e funcional do trato urinário e pulmonar, ao nascimento^{6, 69}. Conforme esta classificação os doentes são divididos em 3 grupos:

Grupo I: São os casos mais graves, incluindo os neonatos com displasia pulmonar ou renal severas, que por estes fatores agravantes podem falecer nos primeiros dias de vida, mesmo quando submetidos a derivações urinárias de urgência. Alguns apresentam o úraco patente e obstrução uretral completa. Correspondem a cerca de 20% dos casos¹⁶.

Grupo II: Estes doentes têm o potencial de sobreviverem no período neonatal, devido à ausência de hipoplasia pulmonar. Têm características externas da síndrome e o trato urinário é difusamente dilatado, com hidronefrose. Pode haver displasia renal unilateral ou bilateral menos severa que aquela do grupo I. Entretanto, a contaminação bacteriana do trato urinário e conseqüente pielonefrite pode deteriorar a função renal rapidamente, levando 30% dos casos a óbito nos dois primeiros anos, por insuficiência renal ou sepse¹⁶.

Grupo III: São crianças com estigmas somáticos e manifestações clínicas mais suaves da síndrome, com comprometimento discreto ou moderado do trato urinário, função renal estável e boa sobrevida. A presença de infecção urinária associada ao refluxo vésico-ureteral ou dilatação pode comprometer essa evolução.

Devido a sua manifestação multiforme e intensidade de comprometimento variável dos órgãos acometidos, existem controvérsias quanto à forma de tratamento. Não há uma padronização terapêutica,

particularmente do trato urinário. Enquanto a maioria dos doentes do grupo I raramente se beneficia de qualquer forma de tratamento, as crianças do grupo II necessitam de acompanhamento urológico intensivo, devido à acentuada dilatação dos rins e ureteres, ao refluxo vésico-ureteral e à conseqüente infecção urinária, que alteram a função renal a partir do nascimento. Os doentes do grupo III raramente necessitam cirurgia no trato urinário, no entanto, se beneficiam da orquidopexia e da plástica da parede abdominal.

Alguns autores defendem uma abordagem mínima para todos os doentes, com antibioticoprofilaxia e acompanhamento, assumindo que a função renal poderá se estabilizar com a eventual melhora espontânea do trato urinário e ausência de infecção, observadas em alguns doentes do grupo II e na maioria do grupo III, reservando cirurgia apenas para os casos de má evolução e para tratamento da criptorquidia^{48, 70-74}. Esta abordagem, entretanto, implica na necessidade de seguimento regular e intensivo, com antibioticoprofilaxia de longa duração, sendo o resultado tardio não homogêneo. Dada a difícil estabilização e o insucesso da conduta conservadora em muitos casos, outros autores preferem uma abordagem cirúrgica ampla de início, que elimina a estase, corrige o refluxo vésico-ureteral e melhora a drenagem do trato urinário superior, incluindo reconstrução completa do sistema coletor dilatado, com modelagem ureteral seguida de reimplante ureterovesical (quando necessário), nefrectomia unilateral (nos casos de exclusão funcional), excisão uracal, cistoplastia redutora, orquidopexia e abdominoplastia^{12, 69, 75-78}. Entretanto a idade ideal para esta abordagem ainda não foi definida, e muito se discute sobre a

conveniência de se realizar estes procedimentos concomitantemente à orquidopexia e abdominoplastia, como proposto por Randolph et al. em 1981⁷⁹.

Aqueles que advogam ampla correção cirúrgica para o tratamento da PBS defendem que a cistoplastia redutora associada à abdominoplastia e ao reimplante ureteral pode auxiliar na melhora da fisiologia miccional. A cistoplastia redutora, por remover a cúpula vesical hipocontrátil; o reimplante ureteral, por eliminar o refluxo vésico-ureteral e a abdominoplastia, melhorando o tônus da parede abdominal. Porém, mesmo após a correção ampla, nem todos os doentes evoluem com micção espontânea, sendo necessária em alguns a introdução de cateterismo limpo intermitente¹².

Devido à baixa prevalência da PBS, não há estudos que comparem o tratamento conservador com o cirúrgico. Na Clínica Urológica do HC-FMUSP, após uma experiência prévia de tratamento conservador com maus resultados, com freqüentes complicações urológicas e elevada incidência de insuficiência renal, desde 1984 estes doentes têm sido abordados de forma cirúrgica, com reconstrução simultânea do trato urinário, orquidopexia e abdominoplastia^{80, 81}. A reconstrução do trato urinário foi individualizada, conforme a necessidade, incluindo ureteroplastia redutora, nefroureterectomia, pieloureteroplastia e anastomose urétero-ureteral. Após 17 anos de seguimento e 32 doentes operados, os autores concluíram que a abordagem cirúrgica precoce e concomitante com reconstrução do trato urinário individualizada, abdominoplastia e orquidopexia pode ser realizada com baixo índice de complicações e excelentes resultados a longo prazo. Além de simplificar o tratamento, esta abordagem diminui a necessidade de

seguimento por longo prazo, por estabilizar o trato urinário¹².

Com relação ao tratamento da bexiga, órgão-alvo do presente estudo, a cistoplastia redutora não é necessária em todos os doentes, e deve ter sua indicação individualizada. Seu objetivo é maximizar a eficácia do detrusor hipocontrátil, removendo a cúpula vesical com o divertículo uracal, geralmente tubuliforme, conferindo à bexiga uma conformação mais esférica, o que faz aumentar a tensão da superfície e, conseqüentemente, a eficácia da contração detrusora, de acordo com a lei de Laplace⁸². Pode-se obter uma melhora considerável na dinâmica miccional após uma cistoplastia com grande redução de volume vesical. Entretanto, no seguimento de longo prazo, não há evidência de manutenção desta melhora, e a grande capacidade vesical pode, em alguns casos, recorrer com o tempo⁸³. Realizando apenas uma cistoplastia regrada, com excisão do divertículo uracal, Dénes et al. observaram alguns doentes com hipotonicidade detrusora recorrente e hipossensibilidade, resultando em incontinência por transbordamento e resíduo pós-miccional. A maioria porém evoluiu com micção presente, com auxílio de Credé e Valsalva. Somente 9,4% dos doentes necessitaram de alguma forma de drenagem vesical¹². Inclusive, baseados nesta evolução insatisfatória de alguns casos, Liguori et al. associaram apendicovesicostomia ao procedimento cirúrgico de quatro doentes com PBS de forma eletiva, defendendo que o cateterismo vesical intermitente precoce reduz o resíduo pós-miccional inicial, diminuindo a freqüência de infecções, o que, na opinião dos autores, melhoraria a evolução clínica destes doentes, com mínima morbidade⁸⁴.

Dada a hipocontratibilidade detrusora presente na síndrome e eventual

esvaziamento vesical incompleto, mesmo após cistoplastia redutora, a possibilidade de se empregar um tratamento medicamentoso que tenha ação coadjuvante na contração detrusora e esvaziamento vesical mais eficiente teria um impacto extremamente positivo para estes doentes.

Nesta direção, Austin et al. relatam em 1999 o emprego do alfa-bloqueador doxazosina no intuito de melhorar o esvaziamento vesical em crianças com disfunção miccional, incluindo um doente com PBS, com boa resposta, porém sem individualizar o resultado do doente com PBS⁸⁵.

Até o momento, não existem trabalhos que se dedicaram a estudar as alterações estruturais da bexiga destes doentes, que justifiquem os achados clínicos e possibilitem o emprego de medicações específicas e apropriadas.

1.2. FISILOGIA DA MICÇÃO

Com o intuito de se resumir as bases anátomo-funcionais da bexiga, facilitando a posterior discussão fisiopatogênica da PBS, recordaremos a fisiologia da micção.

A bexiga é um órgão sacular que se aloja na cavidade pélvica quando vazia, e que pode atingir a cicatriz umbilical, quando repleta, funcionando como um reservatório de urina. Pode ser dividida em duas partes, a saber, o corpo (cranialmente aos meatos ureterais) e a base (formada pelo colo e trígono). Os ureteres penetram a bexiga na sua face posterior, látero-inferiormente, atravessando obliquamente a parede vesical, formando assim um trajeto submucoso, que tem ação anti-refluxiva. O trígono é um triângulo presente na porção póstero-inferior da bexiga, cuja base é formada pela

barra interureteral (ligando os dois meatos), sendo seu ápice o colo vesical, e constitui-se numa estrutura anátomo-funcional importante na fisiologia da micção, apresentando maior concentração de terminações nervosas aferentes suburoteliais. O colo vesical, situado na parte mais distal da bexiga, é formado pela convergência das paredes posterior e ínfero-lateral, abrindo-se na uretra⁸⁶⁻⁸⁸.

A inervação da bexiga se dá tanto por nervos simpáticos (nervo hipogástrico) como parassimpáticos (plexo pélvico), que formam o plexo nervoso vesical. Os primeiros, advindos dos ramos de T11 a L2, atuam na fase de enchimento vesical. Os nervos parassimpáticos, por sua vez, vêm dos ramos de S2 a S4 e vêm à bexiga pelo nervo pélvico e plexo hipogástrico inferior. Estes nervos são importantes para a micção porque atuam na contração das fibras da muscular própria, que produzem tração sobre o colo vesical, abrindo o esfíncter interno da bexiga. A bexiga ainda tem nervos sensoriais que estão junto aos nervos pélvico e hipogástrico, e são responsáveis pela dor à distensão vesical^{86, 88}. Estímulos aferentes vesicais também estão envolvidos e são da maior importância na regulação dos mecanismos de continência e micção, através das fibras aferentes lombosacras, e nervos pudendo e hipogástrico. Na bexiga os nervos aferentes têm localização suburotelial e no detrusor. Logo abaixo da linha urotelial eles formam plexos, que são mais densos no trígono e colo vesical. A aferência mais importante no processo miccional é formada por fibras mielinizadas (A-delta) e desmielinizadas (fibras C)⁸⁷. Todos os sistemas nervosos se correlacionam, através de um complexo arco reflexo, controlado (principalmente de forma inibitória) pelo centro supraespinal pontino (Centro

da micção, Cortex)⁸⁹.

Sabe-se que a parede vesical é formada, de dentro para fora, por uma camada de epitélio de transição (urotélíio, lâmina própria e musculatura lisa), detrusor e adventícia. O urotélíio tem uma espessura de seis a sete células com a bexiga vazia e de duas a três células, com a bexiga repleta. A lâmina própria se situa logo abaixo da camada urotelial, e é composta por tecido conectivo denso, com uma rica trama vascular, linfática, terminações nervosas e fibras elásticas. A muscular própria da bexiga é formada pelo músculo liso denominado detrusor. Na base da bexiga o detrusor constitui-se por três camadas, a saber, longitudinal interna, camada central circular e longitudinal externa. No corpo da bexiga estas camadas longitudinais e circulares se misturam livremente, na forma de fascículos musculares de direção randomizada. A formação histológica do trígono, devido à inserção dos ureteres, compreende a mucosa, e logo abaixo uma combinação entre as camadas de músculo liso longitudinal do ureter e o músculo detrusor, que fixam a porção intramural dos ureteres na bexiga. O colo é constituído pela musculatura trigonal (camada longitudinal do ureter e bainha de Waldeyer), músculo detrusor e músculo uretral. Na bexiga, a espessura da muscular própria varia de acordo com a repleção vesical, porém certas patologias, principalmente as obstrutivas, podem provocar seu espessamento reacional^{86, 88}. Jequier et al. estudaram a espessura da parede vesical em crianças, comparando-as com a de adultos e mostraram que esta varia minimamente com a idade e sexo⁹⁰.

Os mecanismos fisiológicos da micção incluem duas fases, a de enchimento e de esvaziamento vesical, e envolvem uma complexa e

integrada atividade das vias neurais aferentes e eferentes do trato urinário inferior. Durante o enchimento vesical a bexiga acumula progressivamente maior quantidade de urina com manutenção de baixos níveis pressóricos no seu interior. Nesta fase predomina a ação do sistema nervoso simpático, originário dos núcleos intermediolaterais da medula espinhal, entre T10 e L2, mediado pela noradrenalina. Os efeitos predominantes da atividade simpática são a inibição da atividade parassimpática e a contração da musculatura lisa ureteral e da base da bexiga. Simultaneamente, a musculatura estriada uretral e do assoalho pélvico são estimuladas pelos nervos pudendos, levando à sua contração. As contrações da musculatura do esfíncter externo e interno mantêm a pressão uretral maior que a vesical. Esta é a base do mecanismo da continência. A fase de esvaziamento vesical baseia-se na contração detrusora, neurologicamente mediada. Esta ocorre não apenas por um ato reflexo, mas envolve a coordenação de vias supra-espinhais e controle voluntário. Nesta fase cessa a atividade simpática e inicia-se a parassimpática, que leva à contração detrusora. Simultaneamente, interrompe-se a estimulação dos nervos pudendos sobre a musculatura estriada uretral e assoalho pélvico, determinando seu relaxamento, o que possibilita a expulsão da urina com mínima resistência. De fato, acredita-se que a micção se inicia com o relaxamento voluntário dos músculos perineais e músculos estriados do esfíncter externo localizado na uretra posterior, levando à diminuição da resistência uretral e desencadeando a contração da musculatura lisa do trigono e do restante da bexiga. O principal mediador é a acetilcolina⁸⁸.

Ao nível da junção neuromuscular uma série de reações bioquímicas

determinam a contração ou relaxamento da fibra detrusora, a partir dos neurotransmissores que se ligam aos receptores adrenérgicos ($\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ e $\beta 3$), muscarínicos (M2 e M3) e purinérgicos (P2X)⁸⁸.

Nos últimos anos, os neuroreceptores vesicais e suas respectivas funções têm sido cada vez mais estudados, como por exemplo, os 3 adrenoreceptores específicos $\alpha 1$ ($\alpha 1a$, $\alpha 1b$ e $\alpha 1d$) relacionados à contratilidade detrusora e o adrenoreceptor $\beta 3$, relacionado ao relaxamento detrusor, após liberação do mediador simpático noradrenalina⁹¹⁻⁹⁶. Sabe-se, por exemplo, que no corpo da bexiga a concentração de adrenoreceptores $\beta 3$ é bem maior que a de $\alpha 1$, enquanto que no colo esta relação se inverte ($\alpha 1 > \beta 3$). Isto explica porquê durante a fase de enchimento, sob o mesmo comando (simpático/noradrenalina), ocorre relaxamento do corpo e contração do colo vesical⁸⁹.

Baseando-se nestas descobertas, muitas drogas têm sido desenvolvidas, atuando diretamente sobre os neuroreceptores vesicais (agonistas ou antagonistas), contribuindo de forma significativa para o tratamento medicamentoso das disfunções miccionais.

1.2.1. ADRENORECEPTORES α_1

A família de $\alpha 1$ -adrenoreceptor ($\alpha 1AR$) é membro da superfamília de receptores proteína G acoplados à membrana, que mediam as ações das catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina. Estes receptores têm uma estrutura composta por 7 domínios transmembrana conectados por

alças hidrofílicas, com exposição intra e extracelular alternadas (Figura 1) ⁹⁷⁻

100

Figura 1 – Modelo da estrutura secundária (A) e terciária (B) dos adrenoreceptores α_1 (adaptado com permissão de Hampel, 2004)⁸⁹

Os adrenoreceptores foram classificados em 1948 por Ahlquist apud Langer¹⁰¹ em dois subtipos α e β . Na década de 1970 observou-se a divisão dos receptores pré e pós-juncionais, e Langer sugeriu a designação α_1 e α_2 ¹⁰². Em meados dos anos 1980 foram descritos três genes codificando diferentes subtipos de α_1 AR, a saber, α_{1a} , α_{1b} e α_{1d} ^{95, 101, 103-108}.

O neurotransmissor (noradrenalina) liga-se à porção terminal do adrenoreceptor, no extracelular, determinando a mudança conformacional com dissociação das unidades da proteína G (proteína G pertussis toxina-insensível da família $G_{q/11}$) que, por sua vez, ativam a fosfolipase C, que hidrolisa o fosfatidil inositol bifosfato, liberando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3) no citoplasma.^{89, 104, 106, 109, 110}. O IP_3 interage na membrana do retículo endoplasmático abrindo canais de cálcio e liberando-os para o meio intracelular. Estes ativam os canais de cloreto na membrana celular e

desencadeiam a despolarização da célula, que abre canais de cálcio na membrana (modo voltagem-dependente), aumentando a concentração de cálcio intracelular. O DAG liberado ativa a proteína quinase C que leva à abertura dos canais de cálcio da membrana (modo voltagem-independente). Este influxo maciço de cálcio no citoplasma da célula muscular lisa determina sua contração (Figura 2)^{89, 97, 98, 110-112}.

Figura 2 – Ilustração do mecanismo de ação dos adrenoreceptores α_1 nas células musculares lisas (adaptado com permissão de Hampel, 2004)⁸⁹

A localização celular dos adrenoreceptores, inicialmente considerada na superfície da célula, ainda não está completamente elucidada. Dados recentes sugerem uma localização variada, e diversos autores têm encontrado expressão destes receptores em compartimentos intracelulares¹¹³. McGrath afirma que 40% do total de receptores α_1 têm expressão intracelular^{114, 115}. Piascik et al. estudando cultura de fibroblastos e de células musculares lisas de vasos pelo meio da imunocitoquímica identificaram a presença do receptor α_{1a} tanto na superfície celular como intracelular, α_{1b} na superfície celular e α_{1d} predominantemente intracelular^{97, 100, 116}.

Na bexiga pode haver uma alteração na expressão de neuroreceptores, de acordo com regime funcional ao qual a bexiga é exposta. Por exemplo, nos doentes com obstrução infra-vesical há uma hiperexpressão de adrenoreceptores α_1 , evidenciada pela inibição da resposta contrátil do detrusor em banho de órgão, na presença do antagonista $\alpha_{1a/d}$ -AR tamsulosina¹¹⁷. Esta hiperexpressão de α_1 AR pode estar presente também na presença de hiperatividade detrusora¹¹⁷⁻¹¹⁹.

1.2.2. ADRENORECEPTORES β_3

Os adrenoreceptores β foram inicialmente divididos em dois tipos, β_1 e β_2 , através de diferentes respostas a agonistas e antagonistas endógenos ou sintéticos¹²⁰. Posteriormente, um terceiro tipo de adrenoreceptor β foi identificado, por não responder aos antagonistas clássicos de β_1 e β_2 , sendo

chamado de β_3 ¹²¹. Os três tipos podem ser ativados por adrenalina ou noradrenalina. Porém, enquanto o adrenoreceptor β_1 responde semelhantemente às duas catecolaminas, o β_2 é mais responsivo à adrenalina e o β_3 à noradrenalina. Os receptores beta adrenérgicos são acoplados à proteína G, e determinam a ativação da adenilciclase, que eleva o AMP cíclico intracelular, levando ao relaxamento da célula muscular lisa, através da interação com canais de cálcio e potássio. Vias independentes do AMP cíclico também são ativadas, contribuindo para o relaxamento muscular^{122, 123}.

Adrenoreceptores β_3 foram identificados no tecido adiposo, coração, músculo liso do aparelho digestivo e trato urinário (bexiga e ureter)¹²⁴. No tecido adiposo o β_3 AR está envolvido na regulação da lipólise e termogênese. No músculo detrusor de mamíferos, incluindo os humanos, o β_3 AR atua como mediador do relaxamento detrusor durante a fase de armazenamento^{96, 125-127}. Em modelos animais, agonistas β_3 AR aumentam a capacidade vesical, e têm sido considerados promissores no futuro tratamento da hiperatividade detrusora, realidade limitada pelos efeitos colaterais (tremor e taquicardia) dos agonistas atuais, buscando-se ainda drogas seletivas ao β_3 AR humano^{125, 128}.

1.3. TERMINAÇÕES NERVOSAS NO DETRUSOR

A inervação do detrusor determina sua capacidade de contração e o crescimento dos nervos periféricos é regulado por componentes da matriz

extracelular (laminina e colágenos tipo I e IV). Nos doentes com extrofia vesical há retardo na maturação do colágeno, e Mathews et al. estudando a inervação do detrusor nestes indivíduos observaram uma expressiva redução na concentração de fibras mielinizadas¹²⁹. Shapiro et al., nos doentes com mielomeningocele, também observaram uma acentuada diminuição da inervação periférica da parede vesical, bem como um hipodesenvolvimento na musculatura detrusora, postulando que o desenvolvimento adequado do sistema nervoso periférico é importante para a formação de uma musculatura lisa normal¹³⁰. Pesquisando-se na literatura atual não se encontrou estudo referindo alterações de colágeno ou inervação da parede vesical de doentes com PBS.

A densidade de terminações nervosas mielínicas pode ser avaliada através da reação imunohistoquímica, utilizando-se o anticorpo policlonal anti-proteína S100^{129, 131-136}. Van Poppel et al., estudando a inervação intrínseca da bexiga normal, demonstraram que esta técnica tem resultado semelhante à técnica enzimática da acetilcolinesterase, evitando-se manipular material congelado, de mais fácil leitura e permitindo exame histológico convencional¹³⁴.

A proteína S100, originalmente isolada no cérebro, é composta por duas subunidades que podem ser α e/ou β . S100b ($\beta\beta$) é encontrada nas células de Schwann, e de Langehans da pele. A reação imunohistoquímica através do anticorpo anti-proteína S100 revela as terminações nervosas mielínicas, corando as células de Schwann^{129, 135}. Gu et al. encontraram acentuado aumento da imunorreatividade de proteína S100 na bexiga de doentes com esclerose múltipla, comparando com controles normais,

indicando hiperplasia das células de Schwann. De acordo com os autores, este achado sugere uma lesão neuronal local com conseqüente hiperplasia reacional das células de Schwann, fato este também observado por van Poppel et al. em bexigas de pacientes diabéticos^{136, 137}.

1.4. IMUNOHISTOQUÍMICA

Imunohistoquímica é o procedimento pelo qual é feita a marcação de moléculas celulares e componentes da matriz extracelular com anticorpos conhecidos, para permitir sua identificação ou quantificação. Ultimamente tem sido largamente utilizada não apenas como análise qualitativa, mas também quantitativa das estruturas celulares positivamente coradas¹³⁸.

Quantificação da imunoexpressão de proteínas/receptores

O método de determinação do índice de positividade da imunoexpressão mais difundido desde 1988 é a técnica de contagem de pontos (*point counting*) semi-quantitativa baseada nos estudos de Gundersen¹³⁹. Mais recentemente têm sido introduzidas técnicas de análise digital, que objetivam quantificar de forma numérica a positividade do material estudado.

Esta análise digital da imagem é o exame de imagens capturadas por fotografia digital, realizado com o auxílio de programas de informática. Permite a determinação de valores numéricos para exprimir características da imagem¹⁴⁰. A combinação de imunohistoquímica e análise da imagem assistida por programa de computador possibilitam a quantificação objetiva e reprodutível das estruturas coradas em relação à arquitetura tecidual.

Programas comerciais de análise de imagem colorida utilizam o sistema RGB (*red, green and blue*), que emprega filtros de imagem nas cores vermelho, verde e azul¹³⁸.

Nas duas últimas décadas vários programas foram utilizados para a separação e quantificação das cores em lâminas de imunohistoquímica, tais como o IBAS 2000¹⁴¹, BQ MEG IV Vista color system¹⁴², MAPPS-II¹⁴³, VIDAS¹⁴⁴, Quantimed 600¹⁴⁵, COSAS¹⁴⁶, MAGICSCAN¹⁴⁷ e NIH image¹³⁸.

Lehr et al. em 1997 descreveram a aplicação e eficácia do programa comercial de análise de imagem Photoshop® na quantificação da imunoexpressão de receptores hormonais em câncer de mama¹⁴⁸. Em 1999, o mesmo autor (Universidade de Mainz - Alemanha), em conjunto com autores da Universidade de Amsterdã e do Instituto de pesquisa em imunohistoquímica de Seattle, publicaram estudo utilizando o mesmo programa Photoshop® para diferenciação e quantificação percentual de positividade em estudo imunohistoquímico duplo. Chamam a atenção para o fato de que os programas anteriormente utilizados empregavam uma seleção de cores previamente definida e igual para todas as lâminas estudadas, enquanto o Photoshop® possibilita um controle manual da sensibilidade, o que contempla a variação de espectro existente entre as lâminas de imunohistoquímica¹⁴⁹. Mais recentemente outros autores têm descrito a utilização do Photoshop® na análise imunohistoquímica quantitativa.¹⁵⁰⁻¹⁵³

A reação imunohistoquímica tem sido utilizada para se determinar a localização de adrenoreceptores, seus subtipos e sua distribuição celular¹⁵⁴ e em 2002 Wang et al. publicaram estudo de análise imunohistoquímica

quantitativa de $\alpha 2$ -adrenoreceptores na medula de ratos¹⁵⁵.

Frente a essas considerações e levando-se em conta que na literatura atual não há estudos sobre a densidade de terminações nervosas nas bexigas de portadores da PBS e sobre a concentração de neuroreceptores, o intuito da presente pesquisa foi verificar a possível hipo ou hiperexpressão de terminações nervosas e neuroreceptores nas bexigas de portadores da PBS que justifiquem as alterações miccionais observadas, e que permitam a utilização de medicações agonistas ou antagonistas destes receptores, no intuito de otimizar o tratamento, do ponto de vista miccional. Além disso, aproveitando-se desta rica casuística, estudou-se também a proporção da área muscular/área de tecido conectivo no detrusor para se avaliar o conceito vigente na literatura atual.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo da presente pesquisa foi verificar:

2.1. Hipóteses principais

2.1.1. Se no detrusor de doentes com PBS há alteração na densidade de terminações nervosas mielínicas;

2.1.2. Se no detrusor de doentes com PBS há alteração da imunoexpressão de receptores adrenérgicos $\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ e $\beta 3$.

2.2. Hipóteses secundárias

2.2.1. Se no detrusor de doentes com PBS há diferença na proporção de tecido muscular e tecido conectivo.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

O presente estudo teve aprovação das duas instituições envolvidas, a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Apêndice A), e o Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Mainz, Alemanha (Apêndice B), tendo sido realizado em conjunto com a Clínica Urológica desta universidade. Por meio de convênio instituído entre o DAAD – serviço de intercâmbio acadêmico alemão – e a CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, o pesquisador recebeu Bolsa de Estudos para Doutorado-sanduíche no exterior.

3.1. DESENHO DO ESTUDO E PESQUISA DOS DADOS DA CASUÍSTICA

Trata-se de estudo observacional retrospectivo, de caso-controle não pareado.

No período de 1985 a 2005, 36 doentes com PBS foram operados na Divisão de Clínica Urológica do Departamento de Cirurgia do HC-FMUSP. Destes, 32 foram submetidos à ressecção da cúpula vesical com o divertículo uracal. Quatorze espécies emblocados em parafina foram encontradas nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do HC-FMUSP e separadas para estudo histológico e imunohistoquímico, formando o grupo caso (PBS).

Foram tomados dois grupos controle. O primeiro (GC1) foi formado a partir de fragmento de detrusor removido de 13 doentes submetidos à prostatectomia radical na Clínica urológica da Universidade de Mainz, Alemanha (Klinik und Poliklinik für Urologie – Johannes Gutenberg Universität), que tinham estudo urodinâmico normal previamente à cirurgia. O segundo (GC2) constituído por cinco fragmentos de parede de bexiga (cúpula vesical) coletados de necrópsia de crianças realizada no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC-USP).

Critérios de inclusão e exclusão

Para o grupo caso (PBS) o critério de inclusão foi disponibilidade dos blocos de parafina de cúpula vesical encontrados no arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do HC-FMUSP.

Os critérios de inclusão do grupo GC1 foram a disponibilidade dos blocos de parafina de parede anterior da bexiga de pacientes submetidos à prostatectomia radical com ausência de queixas urinárias e a presença de estudo urodinâmico normal no pré-operatório (num período de 2 semanas). No grupo GC2 foram incluídos fragmentos de cúpula vesical de crianças menores de 10 anos de idade removidos por ocasião da necrópsia no SVOC-SP. A causa do óbito está detalhada no Apêndice C.

Os critérios de exclusão no grupo GC1 foram doentes diabéticos, portadores de déficits neurológicos e aqueles com sintomas obstrutivos ou irritativos do trato urinário (IPSS>8). No GC2, foram excluídas crianças com evidências de mal-formação do trato urinário na necrópsia.

Revisão de prontuários

Foi realizada a revisão dos prontuários dos 14 doentes com PBS, recuperados da Divisão de Arquivo Médico do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no intuito de se pesquisar sintomas miccionais pré e pós-operatórios, e avaliar o estudo urodinâmico destes doentes, quando presentes.

3.2. COLETA DO FRAGMENTO DE BEXIGA

No grupo caso, foram obtidos todos os espécimes da cúpula vesical de crianças portadoras de PBS, removidos por ocasião do tratamento cirúrgico e conservados nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do HC-FMUSP.

No GC1, por ocasião da prostatectomia radical foi retirado um fragmento de músculo detrusor da parede anterior da bexiga, local da realização da cistostomia, tempo cirúrgico rotineiro na técnica realizada em Mainz, numa extensão de 2x1cm. No GC2, o material obtido da necrópsia de crianças foi um fragmento de espessura total da parede vesical, de 2x1cm, na região da cúpula. Estas amostras teciduais foram armazenadas em solução de formalina 10% e mantidas a 4°C. Posteriormente foram submetidas a processamento habitual e emblocados em parafina para análise histológica e imunohistoquímica.

3.3. AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA

Todos os fragmentos encontravam-se incluídos em blocos de parafina, após fixação prévia em formalina 10% tamponada. Cortes histológicos de 4 µm de cada bloco foram montados sobre lâminas e corados pela técnica de Van Gieson, que possibilita a diferenciação entre músculo e tecido conectivo, corando-os respectivamente de amarelo e vermelho.

3.3.1. TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE VAN GIESON

A coloração de Van Gieson foi realizada no Laboratório de Pesquisa da Clínica urológica da Universidade de Mainz - Alemanha.

Primeiramente o tecido foi desparafinado pela imersão em xylol aquecido a 95°C por 20 minutos, seguido de lavagem em xilol a temperatura ambiente. O tecido foi então hidratado pela imersão das lâminas em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 70%, respectivamente.

Em seguida, saindo do álcool 70%, as lâminas foram imersas em solução alcoólica de hematoxilina com cloreto de ferro por 5-10 minutos. Seguiu-se lavagem com água destilada e água corrente por cerca de 5-10 minutos.

Foi então realizado controle no microscópio para se avaliar a coloração dos núcleos celulares, que se apresentavam azuis-amarronzados. Se a coloração de fundo estava muito escura, nova lavagem era realizada com solução alcoólica de ácido clorídrico 0,1%.

Seguiu-se lavagem rápida em água destilada e as lâminas foram

imersas na solução de Van Gieson (Picrofucsina), por cerca de 2,5 minutos. Logo após, realizou-se a imersão por 2-3 minutos em 2 soluções de isopropanol 96%, seguida de imersão por 1-2 minutos em isopropanol absoluto.

Por fim, as lâminas foram imersas em etanol absoluto por 2 minutos e então em 3 soluções de xylol, finalizando-se com a colocação da lamínula sobre o tecido corado.

3.3.2. ANÁLISE DIGITAL DA RELAÇÃO MÚSCULO/TECIDO CONECTIVO

Inicialmente, no Departamento de Fisiopatologia da Universidade de Mainz, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Zeiss Axiophot®) sob a mesma intensidade de luz e altura do condensador. A camada muscular foi identificada e as imagens foram obtidas com aumento de 100x.

Para a captura digital da imagem dos campos microscópicos, em aumento de 100x, foram realizadas fotomicrografias de 2272 x 1704 *pixels*, em 5 campos consecutivos e não coincidentes por lâmina, com câmera digital (Canon PowerShot® G3) em abertura de condensador F/5 e distância focal de 25mm, com *flash* desligado.

As imagens obtidas foram transferidas para um computador e analisadas através do programa comercial de análise de imagem Adobe Photoshop® CS2 versão 9.0.

Da imagem inicial foram removidas as áreas em branco e artefatos, sendo calculadas as áreas restantes – muscular e tecido conectivo – através do histograma, em número de pixels; então, foi obtida a relação

músculo/tecido conectivo (Figura 3). O número de pixels corresponde à área da porção selecionada e sua relação pode ser expressa em porcentagem ou em μm^2 ¹⁴⁹.

Figura 3 – Fotomicrografia de lâmina corada por van Gieson em aumento de 100x. A: Área total; B: Excluídos área branca e artefactos; C: Seleção da parte muscular; D: Seleção do tecido conectivo

Cálculo realizado para as imagens da figura 1:

- Pixels excluídos: 74368 pixels
- Músculo: 2377391 pixels
- Tecido Conectivo: 3871488 (área total) – 74368 (branco+artefacto) – 2377391 (músculo) = 1419729
- Relação músculo / tecido conectivo = 2377391/1419729 = 1,64

3.4. REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

3.4.1. TÉCNICA DE COLORAÇÃO

Todas as reações para a análise imunohistoquímica dos receptores adrenérgicos foram realizadas no Laboratório de Pesquisa da Clínica urológica da Universidade de Mainz – Alemanha. A reação para identificação da proteína S100 foi realizada no departamento de Patologia da mesma universidade.

A reação para a proteína S100 foi realizada por meio de técnica automatizada, em cortes de 4 µm de espessura, em lâminas silanizadas, utilizando-se o equipamento Dako REAL[®] Detection System (Dako Denmark[®], Glostrup, Denmark), conforme protocolo publicado pelo fabricante. Utilizou-se para as reações o anticorpo policlonal de coelho Dako *Rabbit Anti-Cow S100* (Dako Denmark[®], Glostrup, Denmark), na diluição 1:2500. As demais reações imunohistoquímicas foram realizadas conforme o seguinte protocolo: os blocos selecionados foram cortados em fragmentos de 4 µm de espessura e estes, montados sobre lâminas silanizadas de microscopia, sem coloração. Primeiro o tecido foi desparafinado pela imersão em 3 soluções de xilol por 15 minutos cada banho, seguido de 2 banhos de 5 minutos em isopropanol 100%. O tecido foi então hidratado pela imersão das lâminas em etanol 96% e etanol 70%, por 2-3 minutos, seguido de lavagem em água destilada. Seguiu-se o bloqueio das peroxidases endógenas por meio de banho de 5 minutos em solução bloqueadora da peroxidase (Dako Denmark[®], Glostrup, Denmark) em câmara úmida,

realizando-se logo após lavagem com água destilada.

A recuperação dos epítomos dos antígenos, que permite melhor acessibilidade do anticorpo ao antígeno foi realizada por meio da reação com a proteinase K (Dako Denmark®, Glostrup, Denmark) por 3 minutos, na câmara úmida, seguida de lavagem com água destilada.

Os anticorpos primários foram diluídos separadamente em diluente de anticorpo (Dako Denmark®, Glostrup, Denmark), conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Diluição e especificações dos anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica.

Anticorpo	Clone	Diluição	Firma	Código comercial
anti- α 1a-AR	Policlonal	1:10	Santa Cruz Biotechnology®, Heidelberg, Germany	sc-1477
anti- α 1b-AR	Policlonal	1:20	Santa Cruz Biotechnology®, Heidelberg, Germany	sc-1476
anti- α 1d-AR	Policlonal	1:20	Santa Cruz Biotechnology®, Heidelberg, Germany	sc-1475
anti- β 3-AR	<i>Human /Canine B3AR</i>	1:150	Alpha Diagnostic®, San Antonio, USA	B3AR12-S

α 1aAR = Alfa 1a *adrenergic receptor*; α 1b-AR = Alfa 1b *adrenergic receptor*; α 1dAR = Alfa 1d *adrenergic receptor*; β 3-AR = Beta 3 *adrenergic receptor*

Sobre os cortes de tecido foram colocados 20 μ l de cada solução resultante que permaneceram incubados em câmara úmida e em geladeira durante 18 horas. Após esse período, as lâminas foram lavadas em tampão *Wash Buffer* (Dako Denmark®, Glostrup, Denmark) e em seguida, incubadas por uma hora a 37°C com o anticorpo secundário LSAB-HRP (*Large Streptavidin-Biotin – System Peroxidase*; k-0690; Dako Denmark®, Glostrup, Denmark), conforme as instruções do fabricante. As lâminas foram então

lavadas em tampão *Wash Buffer* (Dako Denmark®, Glostrup, Denmark) e incubadas pela peroxidase estreptavidina-biotinilada por 30 minutos a 37°C. Após a lavagem em *Wash Buffer* (Dako Denmark®, Glostrup, Denmark), procedeu-se à revelação, na qual as lâminas foram colocadas no cromógeno (3-3'-diaminobenzamida – DAB 100mg em 70 ml de tampão pbs + 3 ml de água oxigenada; Sigma Diagnostics®, St. Louis, USA), por 5 minutos e lavadas em água destilada, contracoradas em hematoxilina de Mayers (Merck®, Darmstadt, Germany) por 30 segundos, seguido pela imersão em etanol 70%, etanol 96%, isopropanol e em solução de xilol. Finalmente as lâminas foram montadas com lamínula e entelan, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas.

Como controle interno negativo foram consideradas hemácias não coradas; como positivo, para proteína S100 e adrenoreceptores, a coloração de nervos e parede dos vasos, respectivamente (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografias de lâminas coradas por imunohistoquímica para a proteína S100 (A) e adrenoreceptor $\alpha 1d$ (B), em aumento de 400x. Notam-se hemácias não coradas na luz do vaso, representativos de controle interno negativo, e observa-se nos nervos da parede dos vasos o controle interno positivo (setas).

Como controles externos, positivo e negativo, das reações utilizaram-se: secção de parede intestinal para proteína S100 e de parede intestinal e aorta para os adrenoreceptores. O controle externo negativo foi submetido a todos os passos do processo, exceto à exposição ao anticorpo primário.

O colorido castanho foi considerado como uma evidência da expressão dos antígenos na célula, para cada anticorpo utilizado (proteína S100, $\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ e $\beta 3$), conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – Fotomicrografia de lâminas coradas por imunohistoquímica em aumento de 400x. (A) Expressão de adrenoreceptor $\alpha 1a$ predominantemente na membrana celular; (B) expressão de adrenoreceptor $\alpha 1b$ na membrana e citoplasma; (C) expressão citoplasmática de adrenoreceptor $\alpha 1d$; (D) expressão citoplasmática de adrenoreceptor $\beta 3$.

3.4.2. QUANTIFICAÇÃO DIGITAL DA IMUNOEXPRESSÃO

Inicialmente, no Laboratório de Patofisiologia da Universidade de Mainz

- Alemanha, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Zeiss Axiophot®) sob a mesma intensidade de luz e altura do condensador. A área de maior concentração de células marcadas (*hot spots*), para cada anticorpo, foi escolhida em aumento de 40 e 100x.

Para a captura digital da imagem dos campos microscópicos, em aumento de 400x, foram realizadas fotomicrografias de 3008x2000 *pixels*, em 5-10 campos consecutivos e não coincidentes por lâmina, com câmera digital (Nikon D100®), abertura de condensador F/0 e tempo de exposição de 1/13, com *flash* desligado.

As imagens obtidas foram transferidas para um computador e analisadas através do programa comercial de análise de imagem Adobe Photoshop CS2®.

Para a quantificação da imunoexpressão (Figura 6 e Figura 7) foram removidas inicialmente da fotomicrografia as áreas em branco, com artefacto e outros tecidos que não o muscular. Tendo permanecido apenas o tecido muscular, sem artefactos, foi medida a quantidade de pixels desta área, através do histograma. Foi, a seguir, realizada a seleção das áreas com colorido castanho, com ajuste manual da sensibilidade, adequando-se visualmente a seleção, para incluir todas as áreas coradas. Estas áreas selecionadas foram transformadas para cor preto e, novamente por meio do histograma, foi medido a quantidade de pixels presentes nestas áreas. Dado que o número de pixels reflete a área da imagem estudada, informações espaciais podem ser obtidas para cada cor específica, e portanto a expressão celular de determinado antígeno, podendo ser expressa porcentualmente¹⁴⁹.

Figura 6— Ilustração do uso do Adobe Photoshop® na exclusão de áreas brancas e artefactos (A), com seleção da área muscular e medida de pixels (seta vermelha) desta, pelo histograma (B)

Figura 7 – Ilustração do uso do Adobe Photoshop® na seleção das áreas positivas, mudança da cor castanho (áreas positivas) para preto (A) e medida da área de cor preta, em pixels (seta vermelha em B)

A quantidade relativa de receptores (QR) foi calculada a partir da razão:

$$QR = \frac{\text{número de pixels da área positiva}}{\text{número de pixels da porção muscular}}$$

Cálculo da QR para o exemplo acima:

$$QR = \frac{\text{número de pixels da área positiva}}{\text{número de pixels da porção muscular}}$$

$$QR = \frac{652146}{4519954} = 0,144$$

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram organizados e tabulados em planilhas com auxílio do programa Excell em Windows XP (Microsoft Corporation®, Califórnia, USA).

A escolha das medidas de tendência central (mediana) e dispersão dos valores (intervalo interquartil) para as variáveis contínuas que compõem as amostras, assim como dos testes estatísticos para comparação entre as mesmas, baseou-se no tipo de distribuição - não paramétrica. Para as análises utilizou-se o programa SPSS® versão 8.0 (SPSS® Inc; Illinois, USA).

Para a comparação entre as medianas de duas e três populações amostrais, utilizou-se respectivamente o teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis^{156, 157}. Para a comparação da idade de três populações amostrais utilizou-se o teste de ANOVA com teste post-hoc de Tukey.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em etapas. Na primeira etapa descreve-se a análise da casuística nos grupos caso (14 crianças com PBS), controle 1 (13 doentes com carcinoma de próstata e estudo urodinâmico normal) e controle 2 (cinco crianças falecidas, sem alterações do trato urinário). Na segunda etapa apresenta-se o cálculo da proporção entre músculo e tecido conectivo, na camada muscular da bexiga nos três grupos. Em seguida apresenta-se os resultados da comparação dos índices de imunexpressão das terminações nervosas no detrusor e dos receptores entre os grupos caso e controles (1 e 2).

4.1. RESULTADOS RELATIVOS À CASUÍSTICA

A distribuição segundo o gênero, tanto no grupo caso quanto no grupo controle 1 (GC1) foi de 100% do gênero masculino. No grupo controle 2 (GC2) esta foi de 60% masculino (3/5) e 40% feminino (2/5).

A média de idade foi de $1,28 \pm 1,14$ no grupo caso (PBS) e de $64 \pm 5,22$ e $1,41 \pm 1,11$ anos nos grupos GC1 e GC2, respectivamente. A análise de variância (ANOVA) entre 3 os grupos revelou diferença de idade, e quando associados 2 a 2, observou-se semelhança estatística entre os grupos PBS e GC2, por meio da ANOVA com teste post-hoc de Tukey ($p=0,988$).

Vale registrar que o grupo PBS é um subgrupo de doentes da casuística do Hospital das Clínicas da FMUSP já publicada em 2004¹².

4.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PRÉ-OPERATÓRIAS

Todos os doentes tiveram diagnóstico pré-natal ou logo após o nascimento. Foram então encaminhados ao Ambulatório da Disciplina de Urologia do Hospital das Clínicas. Considerando-se a função miccional, escopo desta tese, apenas em 2/14 doentes foi realizado estudo urodinâmico pré-operatório, que evidenciou bexiga de capacidade aumentada e resíduo pós-miccional elevado. Os demais foram operados apenas com exames de imagem (Anexo A – Tabela A1).

4.1.2. TRATAMENTO CIRÚRGICO

O tratamento cirúrgico foi realizado em todos os doentes com PBS.

Após a investigação diagnóstica completa foram submetidos à correção cirúrgica abrangente, incluindo abdominoplastia, orquidopexia bilateral, reimplante ureterovesical (quando necessário), cistoplastia redutora com ressecção do divertículo uracal e postectomia. A mediana de idade por ocasião da cirurgia foi de 12 meses (Anexo A – Tabela A2).

4.1.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PÓS-OPERATÓRIAS

Com relação à evolução pós-operatória, do ponto de vista miccional, 64% (9/14) urinam bem, sem resíduo. Quatro doentes (29%) necessitam de manobras de auxílio, tais como Credé ou Valsalva, sendo que 1 destes (7%) realiza cateterismo limpo intermitente 3 vezes por dia.

Todos os doentes continuam em acompanhamento periódico, com

monitoração da função renal e padrão miccional.

Estudo urodinâmico pós-operatório foi realizado em apenas 4/14 doentes (29%), não apresentando um padrão específico (Anexo A – Tabela A2).

4.2. RESULTADOS RELATIVOS AO ESTUDO HISTOLÓGICO DO DETRUSOR

A mediana da relação músculo/tecido conectivo foi de 1,08 com intervalo interquartil 25-75% de 0,95-1,39 (mínimo de 0,65 e máximo de 2,12) para o grupo PBS; de 1,59 com intervalo interquartil 25-75% de 1,33-2,46 (mínimo de 0,52 e máximo de 4,76) para o GC1; para o GC2 foi de 1,28 com intervalo interquartil 25-75% de 0,89-1,66 (mínimo de 0,82 e máximo de 1,67) (K=3,508; p=0,173) (Figura 8).

Figura 8 – Gráfico representativo da relação área muscular/área de tecido conectivo no detrusor entre os grupos PBS, GC1 e GC2 (teste Kruskal-Wallis, $p=0,173$)

4.3. RESULTADOS RELATIVOS AO ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO NO DETRUSOR

4.3.1. RESULTADOS DAS TERMINAÇÕES NERVOSAS MARCADAS PELO ANTICORPO ANTI-PROTEÍNA S100

A mediana da relação entre as áreas positiva (terminações nervosas) e do tecido muscular foi de 0,21 com intervalo interquartil 25-75% de 0,16-0,25 (mínimo de 0,05 e máximo de 0,42) para o grupo PBS, de 0,20 com intervalo interquartil 25-75% de 0,14-0,27 (mínimo de 0,06 e máximo de 0,40) para o GC1; para o grupo GC2 foi de 0,01 com intervalo interquartil 25-75% de 0,005-0,021 (mínimo de 0,003 e máximo de 0,02) (Figura 9). A análise

estatística pelo teste de Kruskal-Wallis revelou diferença estatística entre os grupos ($K=11,899$; $p=0,003$). Comparando-se os grupos 2 a 2 obteve-se diferença estatística entre os grupos GC1-GC2 e PBS-GC2, pelo teste de Mann-Whitney ($U<0,001$; $p<0,001$) (Figura 9).

Figura 9 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para proteína S100 e a área de tecido muscular entre os grupos PBS, GC1 e GC2 (teste Kruskal Wallis, $p=0,003$, teste Mann-Whitney, $p=0<0,001$)

4.3.2. RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS

4.3.2.1. Receptor Alfa-1a

A mediana da relação entre as áreas positiva (receptores $\alpha 1a$) e do tecido muscular foi de 0,06 com intervalo interquartil 25-75% de 0,04-0,09

(mínimo de 0,005 e máximo de 0,202) para o grupo PBS, de 0,16 com intervalo interquartil 25-75% de 0,11-0,21 (mínimo de 0,05 e máximo de 0,27) para o grupo GC1; para o GC2 foi de 0,14 com intervalo interquartil 25-75% de 0,13-0,16 (mínimo de 0,10 e máximo de 0,16) (Figura 10). A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis revelou diferença estatística entre os grupos ($K=9,558$; $p=0,008$). Comparando-se os grupos 2 a 2 obteve-se diferença estatística entre os grupos GC1-PBS e PBS-GC2, pelo teste de Mann-Whitney, sendo o valor de $p=0,005$ ($U=27,000$) e $p=0,026$ ($U=10,000$), respectivamente.

Figura 10 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para adrenoreceptor $\alpha 1a$ e a área de tecido muscular (teste Kruskal Wallis, $p=0,008$, teste Mann-Whitney, $p=0,026$)

4.3.2.2. Receptor Alfa-1b

A mediana da relação entre as áreas positiva (receptores $\alpha 1b$) e do tecido muscular foi de 0,06 com intervalo interquartil 25-75% de 0,04-0,08 (mínimo de 0,02 e máximo de 0,10) para o grupo PBS, 0,06 com intervalo interquartil 25-75% de 0,03-0,10 (mínimo de 0,02 e máximo de 0,36) para o GC1; para o grupo GC2 foi de 0,07 com intervalo interquartil 25-75% de 0,05-0,11 (mínimo de 0,03 e máximo de 0,13) (Figura 11). A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferença estatística entre os grupos ($K=0,496$; $p=0,781$).

Figura 11 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para adrenoreceptor $\alpha 1b$ e a área de tecido muscular (teste Kruskal Wallis, $p=0,781$)

4.3.2.3. Receptor Alfa-1d

As medianas da relação entre as áreas positiva (receptores $\alpha 1d$) e do tecido muscular foi de 0,04 com intervalo interquartil 25-75% de 0,030-0,067 (mínimo de 0,004 e máximo de 0,212) para o grupo PBS, de 0,04 com intervalo interquartil 25-75% de 0,029-0,083 (mínimo de 0,007 e máximo de 0,231) para o GC1; para o grupo GC2 foi de 0,05 com intervalo interquartil 25-75% de 0,037-0,078 (mínimo de 0,029 e máximo de 0,221) (Figura 12). A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferença estatística entre os grupos ($K=0,962$; $p=0,618$).

Figura 12 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para adrenoreceptor $\alpha 1d$ e a área de tecido muscular (teste Kruskal Wallis, $p=0,618$)

4.3.2.4. Receptor Beta-3

As medianas da relação entre as áreas positiva (receptores $\beta 3$) e do tecido muscular foi de 0,07 com intervalo interquartil 25-75% de 0,043-0,134 (mínimo de 0,003 e máximo de 0,228) para o grupo PBS; de 0,14 com intervalo interquartil 25-75% de 0,071-0,254 (mínimo de 0,003 e máximo de 0,607) para o GC1; para o grupo GC2 foi de 0,10 com intervalo interquartil 25-75% de 0,035-0,198 (mínimo de 0,033 e máximo de 0,232) (Figura 13). A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferença estatística entre os grupos ($K=1,947$; $p=0,378$).

Figura 13 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para adrenoreceptor $\beta 3$ e a área de tecido muscular (teste Kruskal Wallis, $p=0,378$)

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O desenho deste trabalho consiste num estudo observacional retrospectivo de caso-controle, não pareado. Dado que a PBS é uma doença rara, somente uma casuística acumulada ao longo de décadas possibilitou a presente pesquisa, decorrendo num estudo retrospectivo, com o material armazenado. Embora isto tenha determinado uma restrição metodológica à imunohistoquímica, não sendo possível a utilização de métodos quantitativos mais precisos, como técnicas de PCR (*polimerase chain reaction*) com quantificação de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro), ou funcionais, como o estudo da contratilidade detrusora em banho de órgãos, esta casuística permitiu iniciar uma nova linha de pesquisa ainda não cotejada na literatura atual. Mesmo com as limitações de análise quantitativa da imunohistoquímica e sua precisão, o caráter exploratório inusitado do estudo dos receptores adrenérgicos nesta síndrome demonstra o valor intrínseco desta pesquisa, bem como um novo roteiro de estudos e descobertas que permitam melhorar a abordagem terapêutica destes doentes e sua disfunção miccional, presente mesmo após correções cirúrgicas.

5.1. DISCUSSÃO SOBRE O MÉTODO

O método empregado na avaliação das bexigas de doentes com PBS foi limitado à utilização das peças emblocadas em parafina e a seu estudo histológico e imunohistoquímico. Entretanto, utilizou-se o mesmo método nos controles, o que permitiu uma comparação adequada.

A reação de Van Gieson, que associa hematoxilina e solução de ácido pícrico, tem sido largamente utilizada na representação e diferenciação de músculo e tecido conectivo, e cora o tecido de amarelo (muscular) e de vermelho (tecido conectivo)¹⁵⁸. A análise da predominância ou equivalência de uma das partes pode ser realizada utilizando-se apenas técnicas de estimação, diretamente ao microscópio. Com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS2[®], entretanto, a análise digital das fotomicrografias pode ser realizada de forma automática, definindo-se o espectro de cores a ser selecionado e então quantificando a área demarcada por meio do histograma. Entretanto, para se aumentar a precisão da avaliação da proporção entre as áreas muscular e de tecido conectivo, optou-se por selecionar manualmente as respectivas áreas contornando-as, e então medi-las por meio do histograma no Adobe Photoshop CS2[®], diminuindo-se assim a subjetividade do método.

A técnica de imunohistoquímica foi escolhida por ser bem estabelecida e empregada de rotina na prática clínica e laboratorial¹⁵⁹, sendo realizada a partir do material disponível em parafina, além de permitir a identificação dos receptores adrenérgicos e sua quantificação digital. Em relação ao método de quantificação do número de cópias de RNAm, tem a vantagem de identificar a molécula na sua posição celular natural, além de identificar epítomos da proteína, que é a molécula efetora¹⁶⁰. De fato, muitas variáveis estão relacionadas à reação imunohistoquímica, tais como a área e a espessura dos fragmentos nas lâminas, a natureza e duração da fixação, o grau de variação dia-a-dia e entre laboratórios¹⁶¹. Destarte, tentou-se minimizar esta variação realizando as reações simultaneamente, para cada

anticorpo, no mesmo laboratório, com os mesmos reagentes (mesmo lote e data de fabricação), com a mesma técnica e sequência de reações.

Embora a imunohistoquímica seja um método de diagnóstico classicamente qualitativo, muitos autores a têm utilizado para análise quantitativa^{142-145, 148, 160}. Os métodos de aquisição da imagem historicamente incluíram desde a imagem por câmera de vídeo até a fotomicrografia digital, e as análises quantitativas têm sido realizadas por meio de programas comerciais de informática como o Adobe Photoshop®^{138, 148, 162, 163}. Foi utilizado o programa Adobe Photoshop CS2® e os passos da análise de imagem neste programa foram baseados naqueles descritos por Lehr et al. em 1997¹⁴⁸.

De fato, as lâminas processadas por imunohistoquímica apresentam um espectro de características raramente constantes entre si, p. ex., elas variam com a quantidade de epítomos disponíveis para a reação com o complexo anticorpos/enzima/cromógeno. Outro fator que pode determinar variabilidade na análise das lâminas é a percepção subjetiva da cor pelo observador. Este problema pode ser minimizado pela quantificação dos componentes vermelho, verde e azul (RGB) da cor estudada através de um programa de análise de imagem. Dessa forma, a cor castanho pode ser definida numericamente como resultante de seus componentes em RGB. No programa Adobe Photoshop pode-se adequar a sensibilidade de seleção das áreas positivas para cada caso¹⁴⁹. Alguns autores argumentam que a seleção de uma área de forma observador-dependente seria uma desvantagem, devido ao caráter subjetivo. Entretanto, considerando-se a variação entre as lâminas, este seria, de acordo com Lehr et al., um método

mais preciso^{138, 148, 149, 163}.

Considerando-se o estudo de caso-controle, outra limitação seria o conhecimento prévio, por parte do observador que analisa a lâmina, de qual grupo contém o espécime analisado. O método adequado é aquele no qual o observador não conhece a qual grupo pertence o tecido. Deste modo, codificou-se inicialmente todas as imagens para a realização de uma análise cega. Além disso, neste estudo, o mesmo método foi empregado tanto nos casos como nos controles, o que faz com que algum viés de análise esteja presente em ambos os grupos, minimizando qualquer disparidade recorrente no resultado final. Deve ser enfatizado que, com o objetivo de manter as condições uniformes na aquisição da imagem, o nível de iluminação do microscópio, bem como os parâmetros da câmera foram equalizados e os modos automáticos desligados.

Os estudos caso-controle exigem rigor metodológico na formação dos grupos casos e controles. Os indivíduos (espécimes) recrutados no grupo controle devem ter a maior semelhança possível com os do grupo caso, salvo quanto à variável em questão. Deste modo, tentou-se equalizar os grupos quanto à procedência de material removido *in vivo* ou *post mortem* e também quanto à faixa etária. O grupo caso (PBS) foi resultado da coleta de material de uma das maiores casuísticas desta síndrome já publicada¹². Foram coletados 14 espécimes emblocados em parafina. Este tecido foi retirado durante procedimento cirúrgico, ou seja, com o doente vivo, na faixa etária infantil. Para se fidelizar a comparação com reação imunohistoquímica, um dos grupos controle (GC1) foi constituído por material removido também durante procedimento cirúrgico, a prostatectomia

radical, depois de confirmada a normalidade funcional desta bexiga por meio do estudo urodinâmico pré-operatório, sabendo que não há diferença entre a cúpula e a parede anterior da bexiga⁸⁸. Como houve grande diferença de idade entre estes dois grupos de doentes vivos, tomou-se outro grupo controle (GC2), composto por detrusor retirado de necrópsias de crianças que não apresentavam evidências de doenças urológicas e neurológicas. Entre GC2 e PBS observou-se semelhança estatística com relação à idade.

Comparando-se os grupos controles entre si (*in vivo* x *post mortem*), não se observou diferença nos resultados da análise quantitativa de positividade dos receptores adrenérgicos, demonstrando que nesta casuística não houve diferença entre os resultados obtidos do material retirado de doentes vivos ou de cadáveres. Apenas nos resultados das terminações nervosas (proteína S100) houve diferença entre os grupos controles, o que nos fez prosseguir a investigação, aumentando os casos do GC2 e formando um novo grupo controle, constituído por material retirado de necrópsias de adultos (GC3). Os resultados serão apresentados e comentados adiante, no item relativo à discussão sobre os resultados.

No grupo caso observou-se unicidade de gênero (100% masculino), como o habitual na síndrome. O grupo controle adulto (GC1) apresentou idêntica distribuição de gênero, dado que foi formado por doentes submetidos à prostatectomia radical. O grupo controle de crianças (GC2), entretanto, teve constituição mista. Apesar da ausência de evidências de disfunção miccional à necrópsia, poder-se-ia considerar esta heterogeneidade de gênero um viés de recrutamento. Destarte, foi ampliado este grupo com mais oito espécimes de cadáveres masculinos, para reação

imunohistoquímica anti-proteína S100 e, excluindo-se os casos femininos, não se observou diferença estatística nos resultados. De fato, o grupo controle ideal seria formado a partir de tecido removido de meninos submetidos a cirurgia, com a garantia de uma bexiga funcionalmente normal. Entretanto, a formação deste grupo implica em barreiras éticas, dado que, para se comprovar a normalidade funcional da bexiga a avaliação clínica é insuficiente¹⁶⁴, sendo necessário estudo urodinâmico, um exame invasivo e traumático na criança, que deve ser limitado apenas aos casos clinicamente necessários. Além disso, retirar um fragmento de detrusor de uma bexiga normal somente seria aceitável durante cirurgia com vesicotomia necessária, como, por exemplo, nos casos de correção cirúrgica de refluxo vésico-ureteral, garantida a ausência de disfunção miccional. Porém, com o advento e amplo emprego do tratamento endoscópico nestes doentes, estes casos são raramente operados por via aberta. Outro grupo de indivíduos passível de comparação seria formado por crianças masculinas doadoras de órgãos, em morte encefálica. Entretanto, este estudo ficaria temporalmente inviável, dado a raridade de crianças em morte encefálica e doadoras de órgãos.

Outro possível viés de recrutamento decorreu da não disponibilidade de todos os 32 espécimes de detrusor ressecados. Por não ser conhecida a causa da ausência deste material nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do HC-FMUSP, pode haver um viés relacionado a uma eventual característica comum a todos os espécimes ausentes. Por exemplo, isto poderia ocorrer no caso de estudos prévios que incluíssem pacientes mais graves, com piora clínica no pós-operatório, ou até mesmo óbito. Entretanto, ao se analisar os prontuários desses doentes com material

faltante, não foi observada característica comum, ou mesmo óbito, que ratifique tal suposição.

5.2. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A avaliação clínica dos doentes portadores da PBS não necessariamente incluiu documentação da disfunção miccional com estudo urodinâmico, e destes 14 doentes incluídos no estudo apenas dois realizaram este exame no pré-operatório, evidenciando uma já esperada capacidade vesical aumentada, com esvaziamento incompleto, o que atesta a necessidade de tratamento desta disfunção nestes doentes.

Observa-se que nem todos os doentes foram operados nos primeiros meses de vida, sendo um deles operado com mais de 4 anos de idade. Isto se deve à demora com que estes doentes chegaram ao ambulatório de Urologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, considerando-se inclusive que muitos são encaminhados de diversas partes do Brasil, um país de dimensões continentais. Atualmente, prefere-se realizar a cirurgia no primeiro ano de vida.

Os resultados clínicos de pós-operatório demonstraram a eficácia da cistoredução, na medida em que apenas 7% necessitam de cateterismo para esvaziamento vesical completo. Entretanto, a maioria dos doentes não apresenta micção normal, necessitando de manobras de Credé ou Valsalva e micções de horário. Estes se beneficiariam de tratamento medicamentoso adjuvante com o intuito de melhorar a contratilidade detrusora.

A análise histológica quantitativa realizada neste trabalho demonstrou

que não há diferença estatística significativa entre os doentes, adultos e crianças normais, no que se refere à quantidade de músculo detrusor em relação ao tecido conectivo. Este resultado se contrapõe ao conhecimento publicado na literatura atual que classicamente relata substituição do tecido muscular liso por tecido conectivo³. Entretanto, Workman et al. demonstraram equilíbrio desta proporção na presença de obstrução infravesical, havendo uma redução absoluta da musculatura apenas nos casos sem obstrução infravesical⁵¹. Vale ressaltar que estes autores estudaram fetos abortados, em necrópsias, e não indivíduos vivos, nascidos com a síndrome. Semelhantemente, Nunn et al., estudando natimortos e crianças falecidas logo após o nascimento, encontraram desde ausência até vários graus de deficiência muscular². Considerando-se o exposto, pode-se postular um espectro de acometimento vesical, o que estaria de acordo com os achados de semelhança encontrados nos resultados ora apresentados, dado as melhores condições clínicas dos doentes desta casuística.

As terminações nervosas foram marcadas através da reação imunohistoquímica com o anticorpo anti-proteína S100 e os resultados obtidos com a análise digital quantitativa mostraram que há semelhança estatística entre os grupos PBS e GC1, porém uma sensível diminuição na expressão de terminações nervosas no grupo GC2. Dado que esta diferença foi constatada entre o material retirado *in vivo* e o removido *post-mortem*, foi constituído um terceiro grupo controle (GC3), composto por material obtido de cadáveres de adultos, com idade estatisticamente semelhante ao grupo GC1. Foi ainda ampliado o número de casos do grupo GC2 e incluído apenas as crianças de sexo masculino. Os resultados mostraram que as

medianas do GC2 e GC3 são semelhantes e mantêm a diferença com os grupos PBS e GC1, semelhantes entre si (Apêndice D, Figura AP1). Isto demonstra uma clara diminuição de positividade das terminações nervosas nos cadáveres, em relação aos tecidos removidos de indivíduos vivos. Esta diferença pode ser explicada pelas condições heterogêneas de coleta, entre doentes vivos e cadáveres e a sua correspondente disponibilidade de epítomos para a ligação ao anticorpo. A demora de fixação pode implicar em denaturação do antígeno e, de acordo com Leong¹⁶⁵, mudanças bioquímicas podem ocorrer muito rapidamente, dentro de segundos após a morte. Além disso, o material colhido de cadáveres permaneceu em solução de formalina até a embebição em parafina por um tempo bem maior que aquele colhido no intra-operatório e este tempo seria inversamente proporcional à imunorreatividade do tecido estudado¹⁶⁶. Portanto, a partir dos dados ora apresentados depreende-se que não houve diferença na quantidade de terminações nervosas no detrusor de doentes com PBS e de adultos normais (material retirado *in vivo*), e que também não se observou diferença no material retirado durante autópsia de adultos e crianças normais. Esta expressão normal de proteína S100 no grupo PBS atesta a integridade da inervação detrusora, em contraposição aos achados de hiperexpressão observados pelos autores que estudaram detrusor de diabéticos e portadores de esclerose múltipla^{136, 137}.

Quanto aos receptores adrenérgicos, os resultados apresentados mostraram uma diminuição significativa do receptor adrenérgico $\alpha 1a$ e não foi observada diferença na densidade de expressão dos receptores $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ e $\beta 3$. De acordo com Malloy et al, na bexiga normal de humanos, o receptor

mais importante, envolvido na regulação da contratilidade é o $\alpha 1d$ (66%), seguido pelo $\alpha 1a$ (34%)¹⁶⁷. Bouchecouche et al. demonstraram hiperexpressão de receptores adrenérgicos $\alpha 1$ após obstrução infra-vesical em humanos¹¹⁷. Baseando-se nestes estudos pode-se inferir que uma bexiga hipotônica teria hipoexpressão dos receptores relacionados à contratilidade detrusora, o que estaria de acordo com o encontrado nos resultados apresentados nesta tese. Porém, a hipoexpressão encontrada não foi do receptor mais prevalente segundo Malloy et al., o $\alpha 1d$, e sim do $\alpha 1a$ ¹⁶⁷. Vale ressaltar que, na literatura atual, os trabalhos supra citados são os únicos que estudaram adrenoreceptores em bexigas de humanos. Porém, estas bexigas não eram normais, e sim de doentes submetidos a cistectomia radical por câncer de bexiga, sem nenhum estudo prévio de função, baseando-se apenas nos sintomas miccionais destes doentes. Em ratos, Hampel et al. encontraram outra proporção, ou seja, predomínio de $\alpha 1a$ (70%) nas bexigas normais, e uma hipoexpressão após a confecção cirúrgica de obstrução infra-vesical (23%)⁹³. Isto nos leva a questionar os resultados de Malloy, e se não haveria algum grau de obstrução mecânica ou disfunção de contratilidade nestes doentes com tumor vesical que determinariam esta hiperexpressão dos receptores $\alpha 1d$. Considerando-se o exposto e a possibilidade de na bexiga normal o receptor adrenérgico relacionado à contração vesical mais importante ser o $\alpha 1a$, os resultados obtidos nesta tese não estão em desacordo com o conhecimento vigente até o presente. Inclusive, um trabalho paralelo realizado pelo autor desta tese na Universidade de Mainz com bexigas humanas sabidamente normais

comparadas àquelas associadas à obstrução infravesical, em banho de órgão, demonstrou que não há aumento significativo do efeito relacionado exclusivamente ao receptor $\alpha 1d$ nas bexigas com obstrução, mas um aumento do efeito relacionado aos receptores $\alpha 1$ em conjunto ($\alpha 1a$, $\alpha 1b$ e $\alpha 1d$)¹⁶⁸.

Observa-se, contudo, nos resultados dos adrenoreceptores que não houve diferença entre os grupos GC1 e GC2 e que as condições de coleta discutidas por ocasião da análise dos dados referentes à reação anti-proteína S100 não alteraram estes resultados. Conforme a publicação de Leong et al. supracitada, há uma variabilidade na preservação de epítomos relacionada ao tempo de fixação em formalina a 4% e portanto, pode-se presumir, a partir dos resultados apresentados, que não houve denaturação destas moléculas nos adrenoreceptores, quando expostos à solução de formalina a 10% (concentração utilizada em nosso material cadavérico)¹⁶⁶.

Aplicação clínico-cirúrgica dos resultados

Considerando-se os múltiplos possíveis vieses presentes neste estudo, desde as variações e ciladas inerentes às técnicas de imunohistoquímica, passando pelo incipiente conhecimento da relação entre imunoexpressão dos adrenoreceptores e contratilidade detrusora efetiva, e incluindo o grau de subjetividade da análise imunohistoquímica realizada, os resultados obtidos não autorizam o início de qualquer estudo de fase clínica.

Entretanto, o valor da presente pesquisa está no seu caráter pioneiro, aproveitando o raro material de uma casuística expressiva, em se tentar associar a disfunção miccional presente nesta síndrome a alterações da

expressão de receptores adrenérgicos, o que em tese possibilitaria o tratamento clínico, ou adjuvante à cistoredução, principalmente nos casos de esvaziamento vesical incompleto, semelhantemente aos casos de obstrução infravesical.

Perspectivas

Novos conhecimentos têm sido adquiridos e publicados com relação aos neuroreceptores vesicais e ultimamente há referências de que a contração detrusora fisiológica necessária para a micção é mediada predominantemente pelos receptores muscarínicos M2 e M3¹⁶⁹. Além destes, os receptores purinérgicos, recentemente estudados, estão também caracterizados como mediadores da contração detrusora, inclusive com sua hiperexpressão relacionada à obstrução infravesical¹⁷⁰. Destarte, o estudo destes receptores e sua expressão na PBS devem ser estudados e incluídos nos próximos protocolos de pesquisa relativos ao tema.

Além disso, outros métodos mais precisos e sem o componente subjetivo são necessários para confirmar os resultados ora apresentados e quantificar outros neuroreceptores na parede vesical. Esta linha de pesquisa já está estabelecida em nosso meio e a coleta de tecido fresco para a realização de estudos com quantificação de RNAm com a técnica de PCR já está em andamento na Disciplina de Urologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

O advento de novas técnicas de terapia gênica que já tem feito parte do arsenal terapêutico no tratamento de algumas doenças, em caráter experimental, associadas ao conhecimento celular e molecular ora em

investigação, pode no futuro facilitar o controle ou produzir mudanças na expressão dos neuroreceptores vesicais, com o intuito de se melhorar tanto a fisiologia miccional destes doentes quanto sua qualidade de vida, contribuindo assim para o estabelecimento de um tratamento mais eficaz, menos invasivo, com efeitos colaterais limitados e resolutividade duradoura.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas na presente pesquisa foram:

6.1. Com referência às hipóteses principais

6.1.1. No detrusor de doentes com PBS não há alteração na densidade de terminações nervosas mielínicas, comparando-se com bexigas normais;

6.1.2. No detrusor de doentes com PBS observou-se hipoexpressão do adrenoreceptor $\alpha 1a$, e nenhuma alteração da imunoexpressão dos receptores $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ e $\beta 3$.

6.2. Hipóteses secundárias

6.2.1. No detrusor de doentes com PBS não se observou diferença na proporção de tecido muscular e tecido conectivo.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO A

Tabela A1: Dados clínicos de pré-operatório.

<i>Prune belly</i> – caso	Nascimento	Clínica pré-operatória	Exames realizados	Diagnóstico pré-operatório*
1	06.06.1997	ITU de repetição	USG + UCM	RVU bilateral
2	07.10.1998	ITU de repetição	USG + UCM	RVU bilateral
3	06.10.2004	ITU	USG + UCM	RVU bilateral
4	30.08.1999	ITU	USG + UCM	RVU bilateral
5	21.06.2001	Ureterostomia bilateral	USG + UCM + Renograma + UIV	Exclusão renal D + Estenose de JUP E + RVU E
6	02.05.1999	ITU de repetição	USG + UCM	RVU D
7		IRC + dolicomegaureter bilateral	USG + UCM + Renograma	RVU bilateral + dolicomegaureter bilateral + fistula uracal
8	10.10.1999	ITU de repetição	USG + UCM + UIV	RVU E
9	14.02.2001	ITU de repetição	USG + UCM + UIV	Exclusão renal E
10	23.12.1998	Vesicostomia	USG + UCM	RVU bilateral
11	15.07.1991	Jato miccional fraco, ITU de repetição	USG + UCM + UDN	Capacidade vesical muito aumentada (450mL), resíduo aumentado (400mL)
12	10.06.1995	ITU de repetição	USG + UCM + Renograma + UIV + UDN	Exclusão renal D + RVU E + Estenose de JUP E
13	20.03.1996	ITU	USG + UCM	Megaureter bilateral
14	17.11.2004	ITU de repetição + IRC	USG + UCM + Renograma + UIV	Dolicomegaureter bilateral

Legenda:

* Exceto aqueles peculiares à síndrome: criptorquidia bilateral, flacidez da parede abdominal e divertículo uracal, com capacidade vesical aumentada.

ITU: Infecção do trato urinário, USG: ultrassonografia das vias urinárias, UCM: uretrocistografia miccional, UIV: urografia excretora, UDN: estudo urodinâmico, RVU: Refluxo vésico-ureteral.

Tabela A2: Dados clínicos de pós-operatório.

Prune belly – caso	Data da operação	Idade na operação (m)	Procedimento cirúrgico	Clínica pós-operatória	Estudo Urodinâmico	Complicação pós-operatória
1	16.11.2001	53	A+OB+CR+RUB+P	Urina bem, esvaziamento completo, micções de horário	-	-
2	07.02.2000	16	A+OB+CR+RUB+P	Urina bem, esvaziamento adequado, micções de horário	-	-
3	22.12.2004	2	A+OB+CR+RUB+P	Urina bem, esvaziamento adequado, micções de horário	-	-
4	12.11.1999	2	A+OB+CR+RUB+P	Urina bem, esvaziamento adequado, micções de horário	-	-
5	04.09.2002	14	A+OB+CR+NUU+P+PPSTU+RUU	Urina bem, esvaziamento adequado, micções de horário	-	-
6	19.04.2000	11	A+OB+CR+RUU+P	Urina bem, esvaziamento adequado, micções de horário	-	-
7	29.08.1997	1	A+OB+CR+RUB+P + RFU	Micção com bom jato, sem resíduo. Micções de horário.	Capacidade aumentada (400mL) e sensibilidade ausente, sem perdas, fluxo diminuído (5,5ml/s), micção com Valsalva, resíduo 40mL	-
8	02.05.2001	18	A+OB+CR+RUU+P	Urina bem, esvaziamento adequado, micções de horário	-	-
9	27.08.2003	30	A+OB+CR+NUU+RUU+P	Urina bem, esvaziamento adequado, micções de horário	-	-
10	05.11.1999	10	A+OB+CR+RUB+P	Urina bem, esvaziamento adequado, micções de horário	-	-
11	24.09.1993	26	A+OB+CR+P	Urina com Valsalva, esvaziamento adequado, micções de horário	Capacidade 140mL, jato miccional 15ml/s, resíduo desprezível	-
12	16.02.1996	8	A+OB+CR+NUU+PPSTU+P	Resíduo pós-miccional elevado, jato fraco, em CLI 3x/d	Hiperatividade detrusora, resíduo elevado, obstrução infra-vesical	-
13	26.04.1996	1	A+OB+CR+RUB+P	Urina com Valsalva, melhora do esvaziamento após instituição de micções de horário, sem ITUs	Capacidade aumentada (400mL) e sensibilidade diminuída, sem perdas, fluxo normal (16ml/s), micção com Valsalva, resíduo 110mL	Obstrução de reimplante ureteral E. Submetido a novo reimplante ureteral E, com boa evolução
14	09.12.2005	12	A+OB+CR+RUB+P	Micção com Credé, esvaziamento adequado, micções de horário	-	Estenose de junção ureterovesical D e RUU. Brida e enterectomia

Legenda:

A: abdominoplastia, OB: orquidopexia bilateral, CR: cistoplastia redutora, P: postectomia, RUU: reimplante ureteral unilateral, RUB: reimplante ureteral bilateral, NUU: nefroureterectomia unilateral, PPSTU: pieloplastia unilateral, RFU: ressecção de fístula uracal, CLI: cateterismo limpo intermitente.

7.2. ANEXO B

Tabela A3: Resultados da relação área muscular/área de tecido conectivo e área de positividade imunohistoquímica/área muscular para a proteína S100 e para os adrenoreceptores $\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1d$ e $\beta 3$.

Grupo caso	Músculo/tecido conectivo	Proteína S100	α1a	α1b	α1d	β3	
PBS	1	1,735	0,27	0,20	0,02	0,03	0,04
	2	0,973	0,28	0,09	0,04	0,00	0,08
	3	0,938	0,11	0,02	0,08	0,07	0,07
	4	0,651	0,21	0,04	0,03	0,03	0,21
	5	0,835	0,13	-	0,04	0,07	0,37
	6	1,134	0,23	0,05	0,04	0,04	0,19
	7	1,974	0,23	0,09	0,06	0,03	0,08
	8	1,126	0,42	0,06	0,04	0,04	0,00
	9	1,022	0,05	0,06	0,09	0,08	0,07
	10	1,406	0,19	0,07	0,06	0,02	0,25
	11	2,116	0,19	0,01	0,08	0,21	-
	12	1,351	-	0,19	-	0,06	-
	13	1,044	-	0,08	0,10	0,00	0,61
	14	0,874	-	0,04	0,06	0,04	0,27
GC1	1	1,581	0,19	0,05	0,02	0,01	0,04
	2	-	0,09	-	-	-	-
	3	1,594	0,06	0,13	0,02	0,05	0,08
	4	2,619	0,26	0,06	0,06	0,02	0,07
	5	-	-	0,14	-	0,18	0,21
	6	0,519	0,31	0,21	0,04	0,23	0,37
	7	1,722	0,40	0,19	0,08	0,04	0,19
	8	4,756	0,24	0,27	0,03	0,01	0,08
	9	0,932	0,31	0,18	0,06	0,06	0,00
	10	1,084	0,15	0,11	0,13	0,05	0,07
	11	2,307	0,16	0,22	0,36	0,04	0,25
	12	2,605	0,22	0,11	0,07	0,14	0,61
	13	1,584	0,12	0,23	0,18	0,03	0,27
GC2	1	1,668	0,02	0,16	-	0,22	0,03
	2	1,282	0,01	0,10	0,13	0,05	0,10
	3	0,894	0,02	0,16	0,03	0,03	0,03
	4	1,659	0,00	0,13	0,05	0,08	0,20
	5	0,821	0,00	0,14	0,09	0,04	0,23

7.3. ANEXO C

Representação gráfica do estudo complementar referido na discussão, incluindo-se o grupo controle 3 (GC3), formado por material cadavérico de adultos (n=11). O grupo GC2 foi aumentado (n=11), e incluiu-se apenas o material de necrópsia de crianças masculinas. As respectivas medianas são: PBS=0,21 com intervalo interquartil 25-75% de 0,16-0,25 (mínimo de 0,04 e máximo de 0,42), GC1=0,20 com intervalo interquartil 25-75% de 0,14-0,27 (mínimo de 0,06 e máximo de 0,40), GC2=0,011 com intervalo interquartil 25-75% de 0,008-0,020 (mínimo de 0,005 e máximo de 0,027), GC3=0,014 com intervalo interquartil 25-75% de 0,008-0,019 (mínimo de 0,002 e máximo de 0,035) (Gráfico A1). A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis revelou diferença estatística entre os grupos ($K=33,00$; $p<0,001$). Comparando-se os grupos 2 a 2 obteve-se semelhança estatística entre os grupos PBS-GC1 e GC2-GC3, pelo teste de Mann-Whitney ($U=65,00$; $p=0,976$), e diferença estatística entre os grupos PBS-GC2, PBS-GC3, GC1-GC2, GC1-GC3, pelo teste de Mann-Whitney ($U<0,001$; $p<0,001$).

Figura A1 – Gráfico representativo da relação entre a área de positividade para proteína S100 e a área de tecido muscular. (teste Kruskal Wallis, $p < 0,001$).

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Kinahan TJ, Churchill BM, McLorie GA, Gilmour RF, Khoury AE. The efficiency of bladder emptying in the prune belly syndrome. *J Urol.* 1992;148(2 Pt 2):600-3.
2. Nunn IN, Stephens FD. The triad syndrome: a composite anomaly of the abdominal wall, urinary system and testes. *J Urol.* 1961;86:782-94.
3. Smith EAW, J.R. Prune-Belly Syndrome. In: Walsh PC. Campbell's Urology. 8a ed. Philadelphia: Saunders; 2002. p. 2117-35.
4. Osler W. Congenital absence of abdominal muscles with distended and hypertrophied urinary bladder. *Bull John Hopkins Hosp.* 1901;12:331.
5. Eagle JF, Jr., Barrett GS. Congenital deficiency of abdominal musculature with associated genitourinary abnormalities: A syndrome. Report of 9 cases. *Pediatrics.* 1950;6(5):721-36.
6. Welch KJ, Kraney GP. Abdominal musculature deficiency syndrome prune belly. *J Urol.* 1974;111(5):693-700.
7. Geary DF, MacLusky IB, Churchill BM, McLorie G. A broader spectrum of abnormalities in the prune belly syndrome. *J Urol.* 1986;135(2):324-6.
8. Adebonojo FO. Dysplasia of the anterior abdominal musculature with multiple congenital anomalies. Prune belly or triad syndrome. *J Natl Med Assoc.* 1973;65(4):327-33.
9. Levin TL, Soghier L, Blitman NM, Vega-Rich C, Nafday S. Megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis and prune belly: overlapping syndromes. *Pediatr Radiol.* 2004;34(12):995-8.

10. Oliveira G, Boechat MI, Ferreira MA. Megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome in a newborn girl whose brother had prune belly syndrome: common pathogenesis? *Pediatr Radiol*. 1983;13(5):294-6.
11. Saldanha LB, Dénes FT, Arap S, de Queiroz FA, Silva, de Goes GM. [Agenesis of the abdominal musculature with total urethral atresia, a necroptic study. Report of a case]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1977;32(3):186-9.
12. Dénes FT, Arap MA, Giron AM, Silva FA, Arap S. Comprehensive surgical treatment of prune belly syndrome: 17 years' experience with 32 patients. *Urology*. 2004;64(4):789-93; discussion 793-4.
13. Snyder HM, Harrison NW, Whitfield HN, Williams I. Urodynamics in the prune belly syndrome. *Br J Urol*. 1976;48(7):663-70.
14. Duckett J. The prune belly syndrome. In: King L. *Clinical Pediatric Urology*. Philadelphia: WB Saunders; 1976. p. 615-635.
15. Skoog SJ. Prune-Belly Syndrome. In: Kelalis PPK, L.R.; Belman, A.B. *Clinical pediatric Urology*. Philadelphia: W.B.Saunders; 1992. p. 943-76.
16. Greskovich FJ, 3rd, Nyberg LM, Jr. The prune belly syndrome: a review of its etiology, defects, treatment and prognosis. *J Urol*. 1988;140(4):707-12.
17. Rabinowitz R, Schillinger JF. Prune belly syndrome in the female subject. *J Urol*. 1977;118(3):454-6.
18. Garlinger P, Ott J. Prune belly syndrome. Possible genetic implications. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1974;10(8):173-80.
19. Teixeira RL, Petreca A, Garcia PAT. Síndrome de Prune Belly. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2004;31:400-401.

20. Cabanillas L. P, Albújar B. P, Cisneros I. L. Síndrome de Prunne-Belly. *Rev Chil Pediatr.* 2001;72(2):135-8.
21. Druschel CM. A descriptive study of prune belly in New York State, 1983 to 1989. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1995;149(1):70-6.
22. Harley LM, Chen Y, Rattner WH. Prune belly syndrome. *J Urol.* 1972;108(1):174-6.
23. Adeyokunnu AA, Familusi JB. Prune belly syndrome in two siblings and a first cousin. Possible genetic implications. *Am J Dis Child.* 1982;136(1):23-5.
24. Riccardi VM, Grum CM. The prune belly anomaly: heterogeneity and superficial X-linkage mimicry. *J Med Genet.* 1977;14(4):266-70.
25. Ramasamy R, Haviland M, Woodard JR, Barone JG. Patterns of inheritance in familial prune belly syndrome. *Urology.* 2005;65(6):1227.
26. Snow BS, Duckett JW. The Prune Belly Syndrome. In: Gillenwater J, Grayhack J, Howards S, J. D. Adult and Pediatric Urology: Yearbook Publishers; 1987. p. 1921-38.
27. Pagon RA, Smith DW, Shepard TH. Urethral obstruction malformation complex: a cause of abdominal muscle deficiency and the "prune belly". *J Pediatr.* 1979;94(6):900-6.
28. Rogers LW, Ostrow PT. The prune belly syndrome. Report of 20 cases and description of a lethal variant. *J Pediatr.* 1973;83(5):786-93.

29. Burton BK, Dillard RG. Brief clinical report: prune belly syndrome: observations supporting the hypothesis of abdominal overdistention. *Am J Med Genet.* 1984;17(3):669-72.
30. Housden LG. Congenital absence of the abdominal mucle. *Arch Dis Childh.* 1934;9:219.
31. Stumme EG. Uber die symmetrischen Kongenitale Bauchmuskeldefekt and uber die Kombination derselben it anderen Bildungsanomalien des Rumpfres. *Mitt Grenzigeb Med Chir.* 1903;11:548.
32. Nakayama DK, Harrison MR, Chinn DH, de Lorimier AA. The pathogenesis of prune belly. *Am J Dis Child.* 1984;138(9):834-6.
33. Monie IW, Monie BJ. Prune belly syndrome and fetal ascites. *Teratology.* 1979;19(1):111-7.
34. Moerman P, Fryns JP, Goddeeris P, Lauweryns JM. Pathogenesis of the prune-belly syndrome: a functional urethral obstruction caused by prostatic hypoplasia. *Pediatrics.* 1984;73(4):470-5.
35. Stephens FD. Triad (prune belly) syndrome. In: Congenital malformations of the urinary tract. New York: Praeger; 1983. p. 485-511.
36. Ives EJ. The abdominal muscle deficiency triad syndrome--experience with ten cases. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1974;10(4):127-35.
37. Mininberg DT, Montoya F, Okada K, Galioto F, Presutti R. Subcellular muscle studies in the prune belly syndrome. *J Urol.* 1973;109(3):524-6.
38. Wigger HJ, Blanc WA. The prune belly syndrome. *Pathol Annu.* 1977;12 Pt 1:17-39.

-
39. Rajfer J, Walsh PC. Testicular descent. Normal and abnormal. *Urol Clin North Am.* 1978;5(1):223-35.
40. Deklerk DP, Scott WW. Prostatic maldevelopment in the prune belly syndrome: a defect in prostatic stromal-epithelial interaction. *J Urol.* 1978;120(3):341-4.
41. Elder JS, Isaacs JT, Walsh PC. Androgenic sensitivity of the gubernaculum testis: evidence for hormonal/mechanical interactions in testicular descent. *J Urol.* 1982;127(1):170-6.
42. Christopher CR, Spinelli A, Severt D. Ultrasonic diagnosis of prune-belly syndrome. *Obstet Gynecol.* 1982;59(3):391-4.
43. Perez-Brayfield MR, Gatti J, Berkman S, Eller D, Broecker B, Massad C, et al. In utero intervention in a patient with prune-belly syndrome and severe urethral hypoplasia. *Urology.* 2001;57(6):1178.
44. Shigeta M, Nagata M, Shimoyamada H, Shibata S, Okuno S, Hamada H, et al. Prune-belly syndrome diagnosed at 14 weeks' gestation with severe urethral obstruction but normal kidneys. *Pediatr Nephrol.* 1999;13(2):135-7.
45. Reinberg Y, Manivel JC, Pettinato G, Gonzalez R. Development of renal failure in children with the prune belly syndrome. *J Urol.* 1991;145(5):1017-9.
46. Palmer JM, Tesluk H. Ureteral pathology in the prune belly syndrome. *J Urol.* 1974;111(5):701-7.
47. Gearhart JP, Leonard MP. Reoperative ureteral reimplantation: strategies for management. *J Pediatr Surg.* 1991;26(1):58-63.

-
48. Williams DI, Burkholder GV. The prune belly syndrome. *J Urol*. 1967;98(2):244-51.
 49. Arap S, Dénes F, Silva FAQ, Góes GM. Síndrome tríplice: relato de 8 casos. *Rev. Paul. Med.* 1977;89:68-76.
 50. Palmtag H, Dreikorn K, Rohl L. Urodynamic studies in prune belly syndrome. A case report. *Scand J Urol Nephrol*. 1979;13(1):11-6.
 51. Workman SJ, Kogan BA. Fetal bladder histology in posterior urethral valves and the prune belly syndrome. *J Urol*. 1990;144(2 Pt 1):337-9.
 52. Rubinstein M, Sampaio FJ, Costa WS. Stereological study of collagen and elastic system in the detrusor muscle of bladders from controls and patients with infravesical obstruction. *International braz j urol*. 2007;33:33-41.
 53. Henley WL, Hyman A. Absent abdominal musculature, genitourinary anomalies, and deficiency in pelvic autonomic nervous system. *AMA Am J Dis Child*. 1953;86(6):795-8.
 54. Popek EJ, Tyson RW, Miller GJ, Caldwell SA. Prostate development in prune belly syndrome (PBS) and posterior urethral valves (PUV): etiology of PBS--lower urinary tract obstruction or primary mesenchymal defect? *Pediatr Pathol*. 1991;11(1):1-29.
 55. Aaronson IA. Posterior urethral valve masquerading as the prune belly syndrome. *Br J Urol*. 1983;55(5):508-12.
 56. Hinman F, Jr. Alternatives to orchiopexy. *J Urol*. 1980;123(4):548-51.
 57. Woodhouse CR, Snyder HM, 3rd. Testicular and sexual function in adults with prune belly syndrome. *J Urol*. 1985;133(4):607-9.

58. Stephens FD, Gupta D. Pathogenesis of the prune belly syndrome. *J Urol.* 1994;152(6 Pt 2):2328-31.
59. Kroovand RL, Al-Ansari RM, Perlmutter AD. Urethral and genital malformations in prune belly syndrome. *J Urol.* 1982;127(1):94-6.
60. Kuga T, Esato K, Sase M, Nakata M, Kaneko J, Inoue T. Prune belly syndrome with penile and urethral agenesis: report of a case. *J Pediatr Surg.* 1998;33(12):1825-8.
61. Passerini-Glazel G, Araguna F, Chiozza L, Artibani W, Rabinowitz R, Firlit CF. The P.A.D.U.A. (progressive augmentation by dilating the urethra anterior) procedure for the treatment of severe urethral hypoplasia. *J Urol.* 1988;140(5 Pt 2):1247-9.
62. Sellers BB, Jr., McNeal R, Smith RV, Griswold WR, Mendoza SA. Congenital megalourethra associated with prune belly syndrome. *J Urol.* 1976;116(6):814-5.
63. Shrom SH, Cromie WJ, Duckett JW, Jr. Megalourethra. *Urology.* 1981;17(2):152-6.
64. Appel RA, Kaplan GW, Brock WA, Streit D. Megalourethra. *J Urol.* 1986;135(4):747-51.
65. Orvis BR, Bottles K, Kogan BA. Testicular histology in fetuses with the prune belly syndrome and posterior urethral valves. *J Urol.* 1988;139(2):335-7.
66. Kolettis PN, Ross JH, Kay R, Thomas AJ, Jr. Sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection in patients with prune-belly syndrome. *Fertil Steril.* 1999;72(5):948-9.

67. Woodhouse CR. Prospects for fertility in patients born with genitourinary anomalies. *J Urol.* 2001;165(6 Pt 2):2354-60.
68. Afifi AK, Rebeiz J, Mire J, Andonian J, Kaloustian VMd. The myopathology of the Prune belly syndrome. *J Neurol Sci.* 1972;15(2):153-65.
69. Woodard JR, Parrott TS. Reconstruction of the urinary tract in prune belly uropathy. *J Urol.* 1978;119(6):824-8.
70. Rich MA, Duckett JW. The Prune Belly Syndrome. In: Ball TP, Novick DE. AUA Update Series. Houston: American Urological Assotiation; 1992. p. 130-5.
71. Woodhouse CR, Kellett MJ, Williams DI. Minimal surgical interference in the prune belly syndrome. *Br J Urol.* 1979;51(6):475-80.
72. Duckett JW, Jr. Cutaneous vesicostomy in childhood. The Blocksom technique. *Urol Clin North Am.* 1974;1(3):485-95.
73. Duckett JW. Prune Belly Syndrome. In: Welch KJR, J.G.; Ravitch, M.M. Pediatric Surgery. Chicago: Year Book Medical; 1986. p. 1193-203.
74. Tank ES, McCoy G. Limited surgical intervention in the prune belly syndrome. *J Pediatr Surg.* 1983;18(6):688-91.
75. Fallat ME, Skoog SJ, Belman AB, Eng G, Randolph JG. The prune belly syndrome: a comprehensive approach to management. *J Urol.* 1989;142(3):802-5.
76. Hendren WH. Restoration of function in the severely decompensated ureter. In: Johnston JHS, R.J. Problems in Paediatric Urology. Amsterdam: Excerpta Medica; 1972. p. 1-56.

77. Monfort G, Guys JM, Bocciardi A, Coquet M, Chevallier D. A novel technique for reconstruction of the abdominal wall in the prune belly syndrome. *J Urol.* 1991;146(2 (Pt 2)):639-40.
78. Woodard JR. Prune-belly syndrome: a personal learning experience. *BJU Int.* 2003;92 Suppl 1:10-1.
79. Randolph J, Cavett C, Eng G. Surgical correction and rehabilitation for children with "Prune-belly" syndrome. *Ann Surg.* 1981;193(6):757-62.
80. Arap S, Dénes F, Silva FQ, de Goes GM. [Syndrome of aplasia of muscles of the anterior abdominal wall (author's transl)]. *J Urol Nephrol (Paris).* 1978;84(3):161-71.
81. Dénes FT. *Ureteroplastia e cistoplastia redutivas em associação com abdominoplastia e orquípexia no tratamento da síndrome tríplice em crianças* [Tese de livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1995.
82. Perlmutter AD. Reduction cystoplasty in prune belly syndrome. *J Urol.* 1976;116(3):356-62.
83. Bukowski TP, Perlmutter AD. Reduction cystoplasty in the prune belly syndrome: a long-term followup. *J Urol.* 1994;152(6 Pt 1):2113-6.
84. Liguori R, Barroso Jr U, Matos JT, Ottoni SL, Garrone G, Demarchi GT, et al. Elective appendicovesicostomy in association with monfort abdominoplasty in the treatment of prune belly syndrome. *International braz j urol.* 2006;32:689-696.

85. Austin PF, Homsy YL, Masel JL, Cain MP, Casale AJ, Rink RC. alpha-Adrenergic blockade in children with neuropathic and nonneuropathic voiding dysfunction. *J Urol.* 1999;162(3 Pt 2):1064-7.
86. Reuter VE. Urinary Bladder, Ureter, and Renal Pelvis. In: Mills SE. *Histology for Pathologists: Lippincott Williams & Wilkins*; 2007.
87. Andersson KE. Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology.* 2002;59(5 Suppl 1):43-50.
88. Chancellor MBY, N. Physiology and pharmacology of the bladder and urethra. In: Walsh PC. *Campbell's Urology*. 8a ed. Philadelphia: Saunders; 2002. p. 831-86.
89. Hampel C. *Untersuchungen zur sympathischen Regulierung der Detrusorkontraktilität bei Blasenauflassobstruktion am Rattenmodell* [Habilitation]. Mainz: Johannes Gutenberg Universität; 2004.
90. Jequier S, Rousseau O. Sonographic measurements of the normal bladder wall in children. *AJR Am J Roentgenol.* 1987;149(3):563-6.
91. Steers W. The future direction of neuro-urology drug research. *Curr Opin Invest Drugs.* 2000;2:268.
92. Hampel C, Gillitzer R, Pahernik S, Melchior SW, Thuroff JW. [Changes in the receptor profile of the aging bladder]. *Urologe A.* 2004;43(5):535-41.
93. Hampel C, Dolber PC, Smith MP, Savic SL, Thuroff JW, Thor KB, et al. Modulation of bladder alpha1-adrenergic receptor subtype expression by bladder outlet obstruction. *J Urol.* 2002;167(3):1513-21.

-
94. Kondo S, Morita T, Y T. Muscarinic cholinergic receptor subtypes in human detrusor muscle studied by labeled and nonlabeled pirenzepine, AFDX-116, and 4-DAMP. *Urol Int* 54:150. 1995;54:150.
95. Langer SZ. Nomenclature and state of the art on alpha1-adrenoceptors. *Eur Urol*. 1998;33 Suppl 2:2-6.
96. Anderson KE. Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev*. 1993;45(3):253-308.
97. Hrometz SL, Edelmann SE, McCune DF, Olges JR, Hadley RW, Perez DM, et al. Expression of multiple alpha1-adrenoceptors on vascular smooth muscle: correlation with the regulation of contraction. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;290(1):452-63.
98. Minneman KP, Esbenshade TA. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1994;34:117-33.
99. Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:101-32.
100. Piascik MT, Perez DM. Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;298(2):403-10.
101. Langer SZ. History and nomenclature of alpha1-adrenoceptors. *Eur Urol*. 1999;36 Suppl 1:2-6.
102. Langer SZ. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol*. 1974;23(13):1793-800.

-
103. Cotecchia S, Schwinn DA, Randall RR, Lefkowitz RJ, Caron MG, Kobilka BK. Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(19):7159-63.
104. Schwinn DA, Lomasney JW, Lorenz W, Szklut PJ, Freneau RT, Jr., Yang-Feng TL, et al. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem*. 1990;265(14):8183-9.
105. Lomasney JW, Cotecchia S, Lorenz W, Leung WY, Schwinn DA, Yang-Feng TL, et al. Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A-adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J Biol Chem*. 1991;266(10):6365-9.
106. Perez DM, Piascik MT, Graham RM. Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1D-adrenergic receptor cDNA. *Mol Pharmacol*. 1991;40(6):876-83.
107. Morrow AL, Creese I. Characterization of alpha 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [3H]WB4104 and [3H]prazosin binding. *Mol Pharmacol*. 1986;29(4):321-30.
108. Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, et al. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev*. 1995;47(2):267-70.
109. Wu D, Katz A, Lee CH, Simon MI. Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *J Biol Chem*. 1992;267(36):25798-802.

110. Pacaud P, Loirand G, Baron A, Mironneau C, Mironneau J. Ca²⁺ channel activation and membrane depolarization mediated by Cl⁻ channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. *Br J Pharmacol*. 1991;104(4):1000-6.
111. Han C, Esbenshade TA, Minneman KP. Subtypes of alpha 1-adrenoceptors in DDT1 MF-2 and BC3H-1 clonal cell lines. *Eur J Pharmacol*. 1992;226(2):141-8.
112. Ljung B, Kjellstedt A. Functional antagonism of noradrenaline responses by felodipine and other calcium antagonists in vascular smooth muscles. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1987;10 Suppl 1:S82-8.
113. Hirasawa A, Sugawara T, Awaji T, Tsumaya K, Ito H, Tsujimoto G. Subtype-specific differences in subcellular localization of alpha1-adrenoceptors: chlorethylclonidine preferentially alkylates the accessible cell surface alpha1-adrenoceptors irrespective of the subtype. *Mol Pharmacol*. 1997;52(5):764-70.
114. Mackenzie JF, Daly CJ, Padiani JD, McGrath JC. Quantitative imaging in live human cells reveals intracellular alpha(1)-adrenoceptor ligand-binding sites. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(2):434-43.
115. McGrath JC, Mackenzie JF, Daly CJ. Pharmacological implications of cellular localization of alpha1-adrenoceptors in native smooth muscle cells. *J Auton Pharmacol*. 1999;19(6):303-10.
116. McCune DF, Edelmann SE, Olges JR, Post GR, Waldrop BA, Waugh DJ, et al. Regulation of the cellular localization and signaling properties of the

alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists.

Mol Pharmacol. 2000;57(4):659-66.

117. Bouchelouche K, Andersen L, Alvarez S, Nordling J, Bouchelouche P. Increased contractile response to phenylephrine in detrusor of patients with bladder outlet obstruction: effect of the alpha1A and alpha1D-adrenergic receptor antagonist tamsulosin. *J Urol.* 2005;173(2):657-61.

118. Restorick JM, Mundy AR. The density of cholinergic and alpha and beta adrenergic receptors in the normal and hyper-reflexic human detrusor. *Br J Urol.* 1989;63(1):32-5.

119. Andersson K. alpha1-adrenoceptors and bladder function. *Eur Urol.* 1999;36 Suppl 1:96-102.

120. Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci.* 1967;6(21):2241-9.

121. Arch JR, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody VE, et al. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature.* 1984;309(5964):163-5.

122. Tanaka Y, Horinouchi T, Koike K. New insights into beta-adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32(7):503-14.

123. Strosberg AD. Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:421-50.

124. Skeberdis VA. Structure and function of beta3-adrenergic receptors. *Medicina (Kaunas)*. 2004;40(5):407-13.
125. Yamaguchi O. Beta3-adrenoceptors in human detrusor muscle. *Urology*. 2002;59(5 Suppl 1):25-9.
126. Yamanishi T, Chapple CR, Yasuda K, Yoshida K, Chess-Williams R. Identification of beta-adrenoceptor subtypes in lower urinary tract of the female pig. *J Urol*. 2002;168(6):2706-10.
127. Takeda M, Obara K, Mizusawa T, Tomita Y, Arai K, Tsutsui T, et al. Evidence for beta3-adrenoceptor subtypes in relaxation of the human urinary bladder detrusor: analysis by molecular biological and pharmacological methods. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;288(3):1367-73.
128. Furuta A, Thomas CA, Higaki M, Chancellor MB, Yoshimura N, Yamaguchi O. The promise of beta3-adrenoceptor agonists to treat the overactive bladder. *Urol Clin North Am*. 2006;33(4):539-43, x.
129. Mathews R, Wills M, Perlman E, Gearhart JP. Neural innervation of the newborn exstrophic bladder: an immunohistochemical study. *J Urol*. 1999;162(2):506-8.
130. Shapiro E, Seller MJ, Lepor H, Kalousek DK, Hutchins GM, Perlman EJ, et al. Altered smooth muscle development and innervation in the lower genitourinary and gastrointestinal tract of the male human fetus with myelomeningocele. *J Urol*. 1998;160(3 Pt 2):1047-53; discussion 1079.
131. Yucel S, Baskin LS. Identification of communicating branches among the dorsal, perineal and cavernous nerves of the penis. *J Urol*. 2003;170(1):153-8.

132. Vaidyanathan S, van Velzen D, Krishnan KR, Parsons KF, Soni BM, Woolfenden A, et al. Nerve fibres in urothelium and submucosa of neuropathic urinary bladder: an immunohistochemical study with S-100 and neurofilament. *Paraplegia*. 1996;34(3):137-51.
133. Ferrandino I, Grimaldi MC. S-100-immunoreactive nerves in the urinary bladder of the rat. *Eur J Histochem*. 1995;39(2):127-32.
134. Van Poppel H, Baert L, Stessens R, Van Stapel MJ, Van Damme B, Carton H. Histochemical assessment of the intrinsic innervation of the normal urinary bladder. *Urol Int*. 1988;43(3):145-8.
135. Cocchia D, Lauriola L, Sentinelli S, Stolfi VM, Maggiano N, Haglid K, et al. Immunohistochemical distribution of S-100 antigen in the urinary system of man and rat. *Cell Biol Int Rep*. 1985;9(10):957-64.
136. Gu J, Polak JM, Deane A, Cocchia D, Michetti F. Increase of S-100 immunoreactivity in the urinary bladder from patients with multiple sclerosis, an indication of peripheral neuronal lesion. *Am J Clin Pathol*. 1984;82(6):649-54.
137. Van Poppel H, Stessens R, Van Damme B, Carton H, Baert L. Diabetic cystopathy: neuropathological examination of urinary bladder biopsies. *Eur Urol*. 1988;15(1-2):128-31.
138. Ruifrok AC. Quantification of immunohistochemical staining by color translation and automated thresholding. *Anal Quant Cytol Histol*. 1997;19(2):107-13.

-
139. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*. 1988;96(5):379-94.
140. Fonseca MI, Brown RD. Immunocytochemical methods for investigating receptor localization. *Methods Mol Biol*. 1997;83:91-106.
141. Deverell MH, Salisbury JR, Whimster WF. Comparison of stains for image segmentation and measurement of nuclear parameters by computerised image analysis using IBAS 2000. *Pathol Res Pract*. 1989;185(5):555-7.
142. Shapiro E, Hartanto V, Lepor H. Quantifying the smooth muscle content of the prostate using double-immunoenzymatic staining and color assisted image analysis. *J Urol*. 1992;147(4):1167-70.
143. Goto M, Nagatomo Y, Hasui K, Yamanaka H, Murashima S, Sato E. Chromaticity analysis of immunostained tumor specimens. *Pathol Res Pract*. 1992;188(4-5):433-7.
144. Willemse F, Nap M, de Kok LB, Eggink HF. Image analysis in immunohistochemistry. Factors with a possible influence on the performance of VIDAS version 2.0, a commercially available true color image analysis system. *Anal Quant Cytol Histol*. 1993;15(2):136-43.
145. Kohlberger PD, Obermair A, Sliutz G, Heinzl H, Koelbl H, Breitenecker G, et al. Quantitative immunohistochemistry of factor VIII-related antigen in breast carcinoma: a comparison of computer-assisted image analysis with established counting methods. *Am J Clin Pathol*. 1996;105(6):705-10.

-
146. Black VH, Rosen S. COSAS 2.0--a Macintosh-based stereological analysis system. *J Struct Biol.* 1996;116(1):176-80.
147. Mosedale DE, Metcalfe JC, Grainger DJ. Optimization of immunofluorescence methods by quantitative image analysis. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(9):1043-50.
148. Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, Santeusanio G, Gown AM. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(11):1559-65.
149. Lehr HA, van der Loos CM, Teeling P, Gown AM. Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(1):119-26.
150. Mofidi R, Walsh R, Ridgway PF, Crotty T, McDermott EW, Keaveny TV, et al. Objective measurement of breast cancer oestrogen receptor status through digital image analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2003;29(1):20-4.
151. Kirkeby S, Thomsen CE. Quantitative immunohistochemistry of fluorescence labelled probes using low-cost software. *J Immunol Methods.* 2005;301(1-2):102-13.
152. Tolivia J, Navarro A, del Valle E, Perez C, Ordonez C, Martinez E. Application of Photoshop and Scion Image analysis to quantification of signals in histochemistry, immunocytochemistry and hybridocytochemistry. *Anal Quant Cytol Histol.* 2006;28(1):43-53.
153. Vilaplana J, Lavialle M. A method to quantify glial fibrillary acidic protein immunoreactivity on the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Methods.* 1999;88(2):181-7.

-
154. Zikopoulos B, Dermon CR. Comparative anatomy of alpha(2) and beta adrenoceptors in the adult and developing brain of the marine teleost the red porgy (*Pagrus pagrus*, Sparidae): [(3)H]clonidine and [(3)H]dihydroalprenolol quantitative autoradiography and receptor subtypes immunohistochemistry. *J Comp Neurol*. 2005;489(2):217-40.
155. Wang XM, Zhang ZJ, Bains R, Mokha SS. Effect of antisense knock-down of alpha(2a)- and alpha(2c)-adrenoceptors on the antinociceptive action of clonidine on trigeminal nociception in the rat. *Pain*. 2002;98(1-2):27-35.
156. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 2a ed. Massachusetts: PWS Publishers; 1986.
157. Dawson BT, R. *Basic and clinical biostatistics*. 2a ed. Norwalk: Lange; 1994.
158. Kernesniuk NL, Sysoeva LF, Lerner Zh A, Getmanova AV, Levchik E, Zyrianov AV. [A method for the differential staining of muscle and connective tissues from organs and their complexes]. *Arkh Patol*. 1990;52(5):59-60.
159. Alves VAF BC, Vassallo J. *Manual de imuno-histoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999.
160. Stabenow E. *Predição do risco de metástase do carcinoma bem diferenciado da glândula tireóide pela quantificação digital da imunoexpressão da galectina-3 nos compartimentos do tireócito maligno* [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.
161. Wick MR, Mills SE. Consensual interpretive guidelines for diagnostic immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(9):1208-10.

162. Fermin CD, Degraw S. Colour thresholding in video imaging. *J Anat.* 1995;186 (Pt 3):469-81.
163. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(9):1204-7.
164. Barroso Jr U, Nova T, Dultra A, Lordelo P, Andrade J, Vinhaes AJ. Comparative analysis of the symptomatology of children with lower urinary tract dysfunction in relation to objective data. *International braz j urol.* 2006;32:70-76.
165. Leong AS. Pitfalls in diagnostic immunohistology. *Adv Anat Pathol.* 2004;11(2):86-93.
166. Leong AS, Gilham PN. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology.* 1989;21(4):266-8.
167. Malloy BJ, Price DT, Price RR, Bienstock AM, Dole MK, Funk BL, et al. Alpha1-adrenergic receptor subtypes in human detrusor. *J Urol.* 1998;160(3 Pt 1):937-43.
168. Schneider-Monteiro ED, Hampel C, Dénes F, Srougi M, Thüroff JW. Receptores adrenérgicos em detrusor de pacientes com bexiga normal, hiperativa e com obstrução infra-vesical: estudo em banho de órgãos. *Int braz j urol.* 2007;33(Suppl. 2):281. (Apresentado no 31. Congresso Brasileiro de Urologia; 2007 Outubro 27 ; Novembro 1; Bahia, Brasil. Abstracts).
169. Frazier EP, Peters SL, Braverman AS, Ruggieri MR, Sr., Michel MC. Signal transduction underlying the control of urinary bladder smooth muscle tone by muscarinic receptors and beta-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2007.

170. Kim JC, Yoo JS, Park EY, Hong SH, Seo SI, Hwang TK. Muscarinic and purinergic receptor expression in the urothelium of rats with detrusor overactivity induced by bladder outlet obstruction. *BJU Int.* 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Aprovação do Protocolo de Pesquisa 02/07 pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) de 14 de fevereiro de 2007.

APÊNDICE B

Aprovação do Protocolo de Pesquisa 07/06 pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Mainz, de 03 de fevereiro de 2006.

Johannes Gutenberg University Mainz

Department of Urology
Chairman: Professor J.W. Thüroff, M

Langenbeckstr. 1
55101 Mainz
Germany
Tel. +(0)6131/17-1
Fax: +(0)6131/176415

February 3, 2006

Research Commission Certificate
Protocol: 07/2006

To whom it may concern

We attest that Dr. Edison Daniel Schneider Monteiro was allowed to do preoperative urodynamic studies and take bladder biopsies from patients submitted to radical prostatectomy at our institution, in accordance with the guidelines of our Ethical and Research Committee. The biopsy material was used in at least two projects: "Human detrusor response variation of adrenergic agonists and antagonists in organ-bath" and "Immunohistochemical expression of neuroreceptors in detrusor from prune belly syndrome comparing with normal bladder". Based on the guidelines for the projects and those of our Committee, there were no ethical or legal conflicts and both projects were approved.

We are delighted to have this cooperation between our university and the University of São Paulo, supported by DAAD (Deutscher akademischer Austauschdienst) and CAPES.

Christian Hampel, MD
Associate Professor
Urology Research Committee President

APÊNDICE C

Tabela AP1: Causa do óbito das crianças submetidas à autópsia (GC2)

GC2 Nº do caso	Idade (meses)	Causa do óbito
1	12	Broncopneumonia + sepse
2	12	Cardiopatía dilatada + pneumonia bilateral
3	0,73	Cardiopatía dilatada + pneumonia aguda
4	24	Bronquite crônica + insuficiência respiratória
5	36	Cardiopatía + congestão pulmonar

APÊNDICE D

Trabalhos relacionados à tese apresentados em congressos nacionais e internacionais:

1. Schneider-Monteiro ED, Dénes FT, Hampel C, Leite KRM, Thüroff J, Srougi M. Estudo comparativo da imunoexpressão de receptores adrenérgicos no detrusor de bexigas de prune belly e normais [Trabalho Oral]. *IX Congresso Paulista de Urologia*. São Paulo, Brasil; Setembro de 2006.
2. Schneider-Monteiro ED, Dénes FT, Hampel C, Leite KRM, Srougi M, Thüroff J. Immunohistochemical expression of adrenergic receptors in detrusor from prune belly syndrome comparing with normal bladder [Poster session]. *European Association of Urology Meeting*. Berlin, Germany; March 2007.
3. Schneider-Monteiro ED, Dénes FT, Hampel C, Leite KRM, Srougi M, Thüroff J. Immunohistochemical expression of adrenergic receptores in detrusor from prune belly syndrome comparing with normal bladder [Oral paper]. *Nephrokids – WCN’07 Satellite Symposium on Pediatric Nephro-Urological Diseases*. São Paulo, Brazil; April 2007. (IPNA AWARDS Julio Toporovski & Carlos Gianantonio).
4. Schneider-Monteiro ED, Dénes FT, Hampel C, Leite KRM, Srougi M, Thüroff J. Prune belly bladder wall: histological study and adrenergic receptor expression [Poster]. *Kongress der Deutsche Gesellschaft für Urologie*. Berlin, Germany; September 2007.
5. Schneider-Monteiro ED, Dénes FT, Hampel C, Leite KRM, Srougi M, Thüroff J. Nerve hypertrophy in detrusor from prune belly syndrome showed through S100 expression and immunohistochemical technic [Poster] *Kongress der Deutsche Gesellschaft für Urologie*. Berlin, Germany; September 2007.
6. Schneider-Monteiro ED, Dénes FT, Hampel C, Leite KRM, Srougi M, Thüroff J. Imunoexpressão de receptores adrenérgicos no detrusor de portadores da síndrome de prune belly [Tema Livre] 31. Congresso Brasileiro de Urologia. Bahia, Brasil; Outubro-Novembro 2007.
7. Schneider-Monteiro ED, Dénes FT, Hampel C, Leite KRM, Srougi M, Thüroff J. Imunoexpressão de fibras nervosas mielínicas na parede vesical da síndrome de prune belly [Tema Livre] 31. Congresso Brasileiro de Urologia. Bahia, Brasil; Outubro-Novembro 2007.