Trabalho Académico de Investigação

Distribuição dos receptores purinérgicos P1 e P2 no tecido cavernoso masculino humano por microscopia confocal: Repercussões funcionais

Área de Investigação: Urologia – Disfunção eréctil

Curso de Mestrado Integrado em Medicina
ICBAS/UP – HSA/CHP

Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC)
Responsável: Prof. Doutora Margarida Lima

Aluno: **ISABEL CARVALHO**

Orientador: Prof. Doutor La Fuente de Carvalho
Co-Orientador: Prof. Doutor Paulo Correia de Sá

Ano Lectivo: 2008 / 2009 e 2009 / 2010

ÍNDICE:

TÍTULO 2
PALAVRAS-CHAVE 2
INSTITUIÇÕES, DEPARTAMENTOS E SERVIÇOS 2
UNIDADES DE INVESTIGAÇÃO 2
EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO 2
Constituição 2
Aluno 2
Orientadores 2
Supervisores 3
Funções e responsabilidades 3
Tempo afecto ao projecto 3
DESENHO DO ESTUDO 3
CALENDARIZAÇÃO 3
Duração 3
Datas de início e conclusão 3
Cronograma de execução 4
A. PLANO CIENTÍFICO 5
1. Resumo 5
2. Introdução e estado da arte 6
3. Problemas 8
4. Hipótese de trabalho 8
5. Objectivos 8
6. Implicações 8
7. Enquadramento, motivações e condições de execução 9
Publicações nos últimos anos: 9
12. Desenho do estudo e metodologia 10
7.1. Tipo de estudo 11
7.2. Plano de trabalho 11
13. Resultados esperados 12
14. Indicadores de produção científica 12
15. Bibliografia 12
B. QUESTÕES ÉTICAS 14
C. PLANO FINANCEIRO 15
1. Orçamento 15
2. Financiamento 15
ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS 16
PEDIDOS DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL 17
HSA/CHP 17
PEDIDO DE FINANCIAMENTO 18
Bolsa de iniciação à investigação clínica 18
TERMOS DE RESPONSABILIDADE 19
Investigador Responsável 19
DECLARAÇÕES DE ALUNOS E ORIENTADORES / SUPERVISORES 20

Aluno 20
Orientadores / Supervisores 20

TERMOS DE AUTORIZAÇÃO LOCAL 21
Serviços 21
Departamentos 21

DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P1 E P2 NO TECIDO CAVERNOSO MASCULINO HUMANO POR MICROSCOPIA CONFOCAL: REPERCUSSÕES FUNCIONAIS

INVESTIGADORES

Aluno
Ana Isabel Pereira Carvalho
Aluna do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP.
E-mail: aisabelcarvalho@gmail.com
TM: 937 281 349

Orientador
José Maria Lafuente de Carvalho
Médico, Especialista de Urologia, Chefe de Serviço, Serviço de Urologia, HSA/CHP. Investigador da UMIB/UP, grupo de investigação "Farmacologia e Neurociências".
E-mail: j.lafuente@sapo.pt
TM: 917 601 084

Co-Orientadores
Paulo Jorge da Silva Correia de Sá
Professor catedrático do ICBAS/UP. Director do Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia. Responsável pelo Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia. Coordenador Científico da UMIB/UP. Investigador responsável pelo grupo de investigação "Farmacologia e Neurociências".
E-mail: farmacol@icbas.up.pt
TF: 222 062 242

Supervisor / Responsável pela Disciplina
Margarida Maria de Carvalho Lima
Médica, Especialista de Imunohemoterapia, Assistente Hospitalar Graduada, Serviço de Hematologia Clínica, HSA/CHP. Professora Responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Científica.
E-mail: mmc.lima@clix.pt
TM: 966 327 115

SERVIÇOS DO CHP ONDE O ESTUDO VAI SER REALIZADO
Serviço de Urologia, HSA/CHP.

INSTITUIÇÕES INTERVENIENTES, ALÉM DO CHP
ICBAS/UP – Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia

DATA LIMITE:
Início em Agosto/Setembro de 2009.

VERSÃO do estudo
Novo X

CLASSIFICAÇÃO do estudo
Trabalho Académico de Investigação (Mestrado Integrado) X

DESENHO do estudo

Quanto ao alvo do estudo
Humanos X

Quanto aos Países / Instituições envolvidas
Nacional X Multinstitucional X

Quanto às características do estudo
Observacional X

Quanto à natureza do estudo
Laboratorial X

Quanto à existência de grupo controlo
Não aplicável X

Quanto à selecção dos indivíduos
Não aplicável X

Quanto ao conhecimento
Não aplicável X

Quanto à fase do estudo (se EC)
Não aplicável X

Outros aspectos

Consentimento informado escrito	Não
Recolha de dados clínicos	Não
Realização de análises	Não
Realização de estudos genéticos	Não
Saída amostras outras instituições	Não
Realização de inquéritos / questionários	Não
Realização de entrevistas	Não

DATAS previstas
Início: Agosto / Setembro de 2009.
Conclusão: Maio / Junho de 2010.

INDICADORES de produção
Apresentação da proposta de projecto em reunião do Serviço de Urologia e nas Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica (JIIC) 2009
Organização das JIIC 2010
Apresentação dos resultados em reunião do Serviço de Urologia, nas JIIC 2010 e em Congressos da Especialidade.
Artigo científico.

ORÇAMENTO do estudo
Total: 7800,00 Euros

FINANCIAMENTO do estudo
Total: XXXX,00 Euros
Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica / Roche Farmacêutica

TÍTULO

DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P1 E P2 NO TECIDO CAVERNOSO MASCULINO HUMANO POR MICROSCOPIA CONFOCAL: REPERCUSSÕES FUNCIONAIS

PALAVRAS-CHAVE

Disfunção eréctil vasculogénica; Tecido cavernoso humano; Receptores da adenosina (A_{2A} e A_{2B}); Receptores purinérgicos P2; Ecto-nucleosidases.

INSTITUIÇÕES, DEPARTAMENTOS E SERVIÇOS

Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital de Santo António (HSA) (HSA/CHP)

- Departamento de Cirurgia, Serviço de Urologia

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto (UP) (ICBAS/UP)

- Departamento de Cirurgia, Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia

UNIDADES DE INVESTIGAÇÃO

Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica da Univesidade do Porto (UMIB/ICBAS/UP)

EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO

Constituição

Aluno

- **Isabel Carvalho:** Aluna do Curso de Mestrado Integrado em Medicina, ICBAS/UP e HSA/CHP, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

Orientadores

- **Prof. Doutor José Maria Ferreira Lafuente de Carvalho (Lafuente de Carvalho)**: Médico Especialista de Urologia; Chefe de Serviço do Serviço de Urologia do HSA/CHP; Professor Auxiliar Convidado do ICBAS/UP; Investigador do
- **Prof. Doutor Paulo Correia de Sá (Paulo Correia-de-Sá)**: Professor Catedrático do ICBAS/UP; Coordenador da UMIB; Director do Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia e do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS/UP; Coordenador Científico da UMIB/ICBAS/UP.

Supervisores

- **Prof. Doutora Margarida Lima (Margarida Maria de Carvalho Lima):** Médica Especialista em Imunohemoterapia e Investigadora do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP; Professora Convidada do ICBAS/UP; Responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

Funções e responsabilidades

A execução do projecto, incluindo a revisão bibliográfica, o trabalho de recolha de dados e a sua análise, ficará ao cargo do Aluno. Aos Orientadores caberá a função de orientação da execução do projecto e a de supervisão científica.

Tempo afecto ao projecto

- Aluno: 20% durante cerca de 10 meses
- Orientador e Co-orientadores: 5% durante 10 meses
- Total: 1 Pessoa a 20% durante 10 meses (2.0) + 2 pessoas a 5% durante 10 meses (0.5 X 2 = 1) = 3.0 pessoas*mês

DESENHO DO ESTUDO

Estudo nacional, multinstitucional, observacional, laboratorial, feito em seres humanos.

CALENDARIZAÇÃO

Duração

10 meses

Datas de início e conclusão

Agosto/Setembro de 2009 a Abril/Maio de 2010

Cronograma de execução

Jan. a Abr. 2009	Elaboração da proposta.
Mai. 2009	Entrega da proposta – Submissão à aprovação institucional.
Jun. 2009	Apresentação da proposta em reunião de Serviço de Urologia e do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS. Apresentação da proposta nas JIIC (Jornadas Iniciação à Investigação Clínica)
Jul. A Set. 2009	Preparação para a implementação do projecto. Revisão teórica. Pesquisa de Laboratórios que trabalhem na área.
Set. 2009 a Fev. 2010	Estágio laboratorial para a realização das experiências. Optimização da técnica de preparação de amostras vasculares para imunofluorescência e microscopia confocal. Obtenção de resultados sobre a distribuição regional dos receptores P1 (sensíveis à adenosina) e P2 (sensíveis aos nucleótidos de adenina) no tecido cavernoso humano.
Mar. a Mai. 2010	Análise e interpretação dos resultados. Comparação com os estudos funcionais.
Jun. 2010	Apresentação dos resultados em reunião do Serviço de Urologia e do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS. Apresentação dos resultados nas JIIC.

A. PLANO CIENTÍFICO

1. Resumo

As purinas (ATP e adenosina), originadas a partir dos elementos figurados do sangue, do endotélio vascular, das fibras musculares lisas e dos *vasa nervora*, são mediadores importantes no tecido cavernoso humano capazes de regular a iniciação e a manutenção da erecção peniana. Em muitos territórios vasculares, o ATP actua como agente contráctil através da activação de receptores P2X. No entanto, os nucleótidos de adenina podem causar vasodilatação directamente, através da activação de receptores metabólicos P2Y localizados no endotélio e fibras musculares lisas, ou indirectamente, por via da adenosina gerada pelas ecto-nucleosidases. Através de ensaios miográficos realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP, demonstrou-se que o tecido cavernoso humano possui receptores dos subtipos A_{2A} e A_{2B} localizados respectivamente nas fibras musculares lisas e no endotélio vascular. Resultados preliminares permitem concluír que os receptores P1 sensíveis à adenosina co-existem com receptores $P2X_1$ do ATP, cuja activação desencadeia uma resposta contráctil no tecido cavernoso humano, que é contrabalançada pela activação de receptores ($P2Y_1$, $P2Y_{12}$ e/ou $P2Y_{13}$) activados pelo ADP resultante do catabolismo extracelular do ATP. O conhecimento dos níveis de expressão e da distribuição tecidular dos recepores purinérgicos, P1 e P2, no tecido cavernoso humano é fundamental para se delinearem estratégias farmacológicas de compensação em situação de falência dos mecanismos endógenos de controlo do tónus do tecido cavernoso. Este conhecimento é tanto mais importante quanto se demonstrou que a disfunção endotelial pode ser correlacionada com a perda da actividade dos receptores A_{2B} (e P2) nos vasos penianos de homens com disfunção eréctil de origem vasculogénica. Este conceito inovador pode ter repercussões ainda por explorar se considerarmos que a disfunção endotelial associada à disfunção eréctil de origem vasculogénica pode ser um sinal de alerta de gravidade de uma doença cardiovascular subjacente e ainda não detectável clinicamente.

Assim, este estudo tem como principal objectivo estudar a expressão e a distribuição dos receptores purinérgicos, P1 e P2, nos vários tecidos que constituem o corpo cavernoso humano por técnicas de imunofluorescência aplicadas à microscopia confocal, tendo por base os resultados obtidos previamente nos estudos funcionais. Os tecidos analisados terão origem em amostras provenientes de indivíduos controlo e de portadores de disfunção eréctil vasculogénica grave submetidos a cirurgia de implantação de próteses penianas, que foram previamente testados do ponto de vista funcional e que compõem a biblioteca de tecidos existente no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP.

2. Introdução e estado da arte

A disfunção sexual masculina denota a incapacidade de se atingir uma relação sexual satisfatória, o que pode envolver uma erecção inadequada, ou problemas com a emissão, ejaculação ou orgasmo. A disfunção eréctil (DE) ocorre quando não é possível atingir ou manter repetidamente uma erecção peniana que permita o acto sexual (General Urology, McGraw-Hill 2004).

Em Portugal, não se conhece a incidência e prevalência da DE. Em estudos americanos, nomeadamente, o Massachusetts Male Aging Study, que abrange homens entre os os 40 e os 70 anos, 52% referiram algum grau de DE, dos quais, 10% referiram DE completa. No National Health and Social Life Survey, que abrange homens entre os 18 e os 59 anos, apesar de se terem obtido valores muito inferiores para a DE, constatou-se que as restantes disfunções sexuais são bastante prevalentes, tais como: ejaculação precoce, ausência de líbido, ansiedade relacionada com a performance sexual e anorgasmia (General Urology, McGraw-Hill, 2004). Por analogia, presume-se que a DE seja bastante prevalente na população portuguesa. Trata-se de um problema bastante negligenciado e com grande impacto na qualidade de vida dos doentes.

A DE pode ter uma causa orgânica, ou então psicogénica. As causas orgânicas abrangem a DE neurogénica, hormonal, arterial, cavernosa e induzida por fármacos. A forma mais comum é a mista, com componente orgânica e componente psicogénica. Muitas doenças sistémicas podem apresentar-se com DE, tais como Diabetes Mellitus, doença pulmonar grave como doença pulmonar obstrutiva crónica, angina ou enfarte agudo dp miocárdio prévio, insuficiência renal crónica, cirrose ou caquexia. Nem sempre é fácil diagnosticar a causa, mesmo com uma abordagem completa e sistemática do doente, o que é de extrema importância para a correcta e eficaz orientação terapêutica (Campbell-Walsh urology, Saunders, 2007). Por outro lado, existe um elevado grau de correlação entre a gravidade da DE vasculogénica e as doenças cardiovasculares, já que ambas partilham a disfunção endotelial como pedra angular da fisiopatologia destas entidades clínicas, provavelmente com vantagem para a DE relativamente à precocidade do diagnóstico (Billups, 2005).

Em termos de tratamento, estão disponíveis várias classes de fármacos utilizados na terapêutica oral, das quais de destacam os inibidores da fosfodiesterase de tipo V pela sua divulgação na sociedade. A terapia farmacológica oral corresponde à primeira linha de tratamento. Em caso de insucesso, em segunda linha, pode-se optar pelo aparelho de vácuo, terapêutica intra-cavernosa e terapêutica intra-uretral. Para os casos mais graves, que não respondem às medidas prévias, pode partir-se, em terceira linha, para a cirurgia vascular ou para a prótese peniana (General Urology, McGraw-Hill, 2004).

A transmissão purinégica é importante para a iniciação e manutenção da erecção peniana. É interessante constatar que a injecção intracavernosa de adenosina foi um dos primeiros métodos utilizados

para o diagnóstico diferencial da DE de origem vasculogénica ou de outra causa (Kilic et al., 1994), mercê da sua semi-vida muito curta (minutos) e da pequena propensão deste mediador endógeno para causar hipotensão postural quando comparada com outros agentes vasodilatadores intra-cavernosos (e.g. prostaglandinas, inibidores não selectivos das fosfodiesterases) (Takahashi et al., 1992).

As purinas, ATP e adenosina, libertadas por elementos sanguíneos, endotélio e músculo liso vascular são potentes reguladores da hemodinâmica vascular. Em muitos leitos vasculares, o ATP actua através de receptores P2X em células do músculo liso vascular para mediar a sua vasoconstrição. Alternativamente, os nucleótidos de adenina podem causar vasodilatação directamente, via receptores P2Y localizados no endotélio e fibras de músculo liso, ou indirectamente, através da adenosina gerada pela via das ecto-nucleotidases. Através de estudos funcionais e de cinética enzimática recentes (Faria et al., 2008), presume-se que nos doentes com disfunção eréctil vasculogénica a actividade dos receptores purinérgicos P2 esteja diminuída devido à acumulação extracelular de ATP (dessensibilização) motivada por uma aparente redução da expressão e/ou actividade da enzima NTPDase 1/ CD 39. Em consequência deste facto, é provável que a formação de adenosina derivada do catabolismo extracelular do ATP também esteja comprometida e, com isso, o seu papel como agente relaxante endógeno no tecido cavernoso humano.

Através da utilização de agonistas e antagonistas selectivos dos receptores da adenosina foi possível caracterizar os seus receptores, que medeiam o relaxamento de tecido cavernoso previamente contraído (Faria et al., 2006). Foram caracterizados dois tipos de receptores através de estudos funcionais: os receptores A_{2A}, presentes no músculo liso e os receptores A_{2B}, presentes no endotélio vascular. Ao contrário do que ocorre na população controlo, não é possível obter um relaxamento completo do tecido cavernoso dos doentes com DE de origem vasculogénica através da aplicação de adenosina ou do seu análogo estável 5`-N-etil-carboxamida adenosina (NECA), devido a uma presumível ausência de receptores endoteliais A_{2B}.

Os resultados obtidos nos estudos bioquímicos e funcionais carecem de validação morfológica em ensaios de co-localização com recurso à microscopia confocal, no sentido de avaliar a expressão e a distribuição regional dos principais receptores purinérgicos, P1 e P2, no tecido cavernoso humano em indivíduos controlo (dadores de órgãos) e em doentes portadores de disfunção eréctil vasculogénica grave submetidos a cirurgia para implantação de próteses penianas. É importante realçar que a DE dos doentes incluídos neste estudo foi comprovada através de estudos hemodinâmicos e foi considerada resistente aos vasodilatadores habituais (e.g. sildenafil, alprostadil); a maioria destes doentes apresentava multiplos factores de risco endotelial (e.g. diabetes tipo II, hipercolestrolémia, hipertensão, hábitos tabágicos severos). Além disso, a informação clínica foi cruzada com os resultados experimentais obtidos *in vitro*, através da prova de que o tecido cavernoso dos doentes com DE vasculogénica era resistente ao relaxamento pela acetilcolina, demonstrando a falta de integridade do endotélio vascular.

3. Problemas

Os ensaios de co-localização por imunofluorescência para a detecção de receptores de membrana, P1 e P2, no tecido cavernoso humano não estão optimizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP, nem existem relatos da sua utilização na literatura internacional. Este facto constitui, em si mesmo, um desafio aliciante pelo pioneirismo e consequências práticas dos resultados obtidos. Por outro lado, sabe-se que a estrutura trabecular do corpo cavernoso humano não auxilia o processo de fixação, corte fino do tecido e montagem das preparações histológicas para observação microscópica, mesmo quando se dispõe de um microscópio confocal capaz de realizar observação em profundidade e reconstituições 3D do tecido. Existe, ainda, um problema associado à elevada auto-fluorescência dos tecidos vasculares, que será necessário resolver recorrendo à manipulação dos espectros de excitação e emissão de fluorocromos para comprimentos de onda na gama baixa. Alternativamente, poder-se-ia recorrer a técnicas de imuno-histoquímica clássicas com eventual benefício na detecção de sinais pequenos, mercê do fenómeno de amplificação que é possível nesta técnica. Contudo, seria difícil trabalhar com cortes espessos e estabelecer rigorosamente os padrões de co-localização dupla / tripla pretendidos neste estudo.

4. Hipótese de trabalho

O conhecimento dos níveis de expressão e da distribuição tecidular dos receptores purinérgicos, P1 e P2, no tecido cavernoso humano é fundamental para se delinearem estratégias farmacológicas de compensação em situação de falência dos mecanismos endógenos de controlo do tónus dos tecido cavernoso.

5. Objectivos

Este projecto tem como principal objectivo estudar a expressão e a distribuição regional dos receptores purinérgicos, P1 e P2, nos vários tecidos que constituem o corpo cavernoso humano, isolado de indivíduos controlo (dadores de órgãos) e de doentes portadores de DE vasculogénica grave submetidos a cirurgia para implantação de próteses penianas, por técnicas de imunofluorescência aplicadas à microscopia confocal, tendo por base os resultado obtidos previamente nos estudos funcionais.

6. Implicações

A optimização da técnica de detecção da expressão e distribuição geográfica dos receptores purinérgicos, P1 e P2, no tecido cavernoso humano de indivíduos controlo (dadores de órgãos) e de doentes portadores de disfunção eréctil vasculogénica grave submetidos a cirurgia protésica, poderá ser útil para complementar a informação fornecida pelos estudos funcionais. Este conhecimento é tanto mais importante

quanto se demonstrou que a disfunção endotelial pode ser correlacionada com a perda da actividade dos receptores A_{2B} (e P2) nos vasos penianos de homens com disfunção eréctil de origem vasculogénica. Este conceito inovador pode ter repercussões ainda por explorar se considerarmos que a disfunção endotelial associada à disfunção eréctil de origem vasculogénica pode ser um sinal de alerta de gravidade de uma doença cardiovascular subjacente e ainda não detectável clinicamente.

7. Enquadramento, motivações e condições de execução

PROF. DOUTOR LAFUENTE DE CARVALHO: É o responsável pela consulta de Disfunção Eréctil do HSA/CHP e tem-se dedicado, durante os últimos anos, ao diagnóstico, tratamento e investigação clínica da disfunção eréctil.

PROF. DOUTOR PAULO CORREIA DE SÁ: No Laboratório de Farmacologia do ICBAS/UP têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos anos, em colaboração com o Serviço de Urologia do CHP/HSA, numerosos projectos de investigação na área da urologia, nomeadamente na Disfunção Eréctil de origem vasculogénica. Destes projectos resultaram numerosos artigos publicados em revistas científicas internacionais. O Co-orientador do projecto, Prof. Doutor Paulo Correia de Sá tem assumido a liderança científica desta linha de investigação e dos projectos e publicações associadas. Este investigador é também o Coordenador da Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB/ICBAS/UP), uma Unidade de Investigação reconhecida pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e o Investigador Responsável pelo grupo de investigação "Farmacologia e Neurociências" integrado nesta unidade.

Publicações nos últimos 6 anos:

- M. A. Timóteo, M. Faria, P. Correia-de-Sá (2003) Eur. J. Pharmacol., 462, 115-125.

- M. Faria, L. Oliveira, M. A. Timóteo, M. G. Lobo, P. Correia-de-Sá (2003) Synapse, 49, 77-88.

- M. T. Magalhães-Cardoso, M. F. Pereira, L. Oliveira, J. A. Ribeiro, R. A. Cunha, P. Correia-de-Sá (2003) J. Physiol. (London), 549.2. 399-408.

- M. Duarte-Araújo, C. Nascimento, M. A. Timóteo, M. T. Magalhães-Cardoso, P. Correia-de-Sá (2004) Br. J. Pharmacol., 141, 925-934.

- M. Duarte-Araújo, M. A. Timóteo, P. Correia-de-Sá (2004) Neurochem. Int., 45, 641-651.

- L. Oliveira, M. A. Timóteo, P. Correia-de-Sá (2004) J. Physiol. (London), 560.1, 157-168.

- L. Oliveira, P. Correia-de-Sá (2005) Neurosignals 14, 262-272.

- L. Oliveira, P. Correia-de-Sá (2006) Signal Transduction 6, 19-31.

- P. Correia-de-Sá, S. Adães, M. A. Timóteo, C. Vieira, T. Magalhães-Cardoso, C. Nascimento, M. Duarte-Araújo (2006) Autonom. Neuroscience: Basic and Clinical 126-127, 211-224.

- M. Faria, T. Magalhães-Cardoso, J.-M. Lafuente-de-Carvalho, P. Correia-de-Sá (2006) J. Pharmacol. Exp. Ther. 319, 405-413.

- J. Costa, M. G. Lobo, P. Correia-de-Sá (2006) Eur. J. Pharmacol. 544, 39-48.

- A. Barroso, L. Oliveira, E. Campesatto-Mella, C. Silva, M. A. Timóteo, M. T. Magalhães-Cardoso, W. Alves-do-Prado, P. Correia-de-Sá (2007) Br. J. Pharmacol., 151: 541-550.

- M. A. Timóteo, L. Oliveira, E. Campesatto-Mella, A. Barroso, C. Silva, M. T. Magalhães-Cardoso, W. Alves-do-Prado, P. Correia-de-Sá, (2008) Neurochem. Int., 52: 834-845.

- M. Faria, T. Magalhães-Cardoso, J.-M. Lafuente-de-Carvalho, P. Correia-de-Sá (2008) Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids, 27: 761-768.

- M. Duarte-Araújo, C. Nascimento, M. A. Timóteo, M. T. Magalhães-Cardoso, P. Correia-de-Sá (2009) Br. J. Pharmacol. 156: 519-533.

- C. Vieira, M. Duarte-Araújo, S. Adães, T. Magalhães-Cardoso, P. Correia-de-Sá (2009) Neurogastroenterol. Motil. (doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01326.x).

- L. Oliveira, M. A. Timóteo, P. Correia-de-Sá (2009) Neurosci. Lett. 459: 127-131.

ANA ISABEL CARVALHO: A aluna reconhece o impacto que a DE tem na qualidade de vida dos doentes e a dificuldade que muitas vezes surge na sua abordagem. Este projecto permite um contacto mais próximo com a área da Urologia, permitindo um conhecimento mais abrangente da sua área de impacto e de intervenção. Antes do iníciar o curso de Medicina a aluna realizou estágio no Laboratório de Imunogenética do ICBAS pelo que está familiarizada com técnicas de detecção molecular e com a dinâmica laboratorial, pelo que terá esta oportunidade de contactar com novas técnicas.

8. Desenho do estudo e metodologia de trabalho

- Os tecidos analisados terão origem em amostras provenientes de indivíduos controlo (dadores de órgãos) e de portadores de DE vasculogénica grave submetidos a cirurgia de implantação de próteses penianas, que foram previamente testados do ponto de vista funcional e que compõem a biblioteca de tecidos existente no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP.

- Secção do tecido e obtenção de cortes com 20µm de espessura;
- Fixar com 4% paraformaldeído/PBS e bloqueio de ligações não específicas com tampão bloqueante (10% soro fetal bovino, 1% soro de albumina bovino, 0,3% Triton X-100 em PBS) 1 hora a temperatura ambiente; (Serão utilizadas várias técnicas de fixação e fixadores no sentido de obter a melhor preservação da arquitectura do tecido possível)
- Incubar tecidos com anticorpos primários diluídos em tampão (5% soro fetal bovino, 1%soro de albumina bovino, 0,3%Triton X-100 em PBS) durante 16 horas a 4° C;
- Incubar com os anticorpos fluorescentes secundários diluídos no tampão anterior, 1 hora a temperatura ambiente no escuro;
- Para protocolos duplos ou triplos, os anticorpos primários são misturados antes da utilização;
- Preparar controlos de especificidade por omissão de anticorpos primários da solução de reacção;
- Os tecidos são finalmente montados no meio VectaShield (Vector Laboratories) e examinados ao microscópio confocal Olympus FluoView FV1000.

Anticorpos primários que serão utilizados no estudo: anti-A_{2A} de ratinho (Chemicon; # 05-717), anti-A_{2B} de coelho (Chemicon; # AB1589P), anti-$P2X_1$ de coelho (Alomone; # APR-001), anti-$P2Y_1$ de coelho (Alomone; # APR-009), anti-$P2Y_{12}$ de coelho (Alomone; # APR-012), anti-$P2Y_{13}$ de coelho (Alomone; # APR-017), anti-α-actina de músculo liso de ratinho (Sigma; # F3777), anti-Factor de Von Willebrand de ratinho (Dako; # M0616).

Anticorpos secundários fluorescentes: Alexa Fluor 488 obtido em burro anti-IgG de coelho (Molecular probes; # A-21206) e Alexa Fluor 568 obtido em burro anti IgG de ratinho (Molecular probes; # A-10037).

8.1. Tipo de estudo

Estudo nacional, institucional, observacional, laboratorial, feito em seres humanos.

8.2. Plano de trabalho

Tendo em conta o principal objectivo de estudar a expressão e a distribuição regional dos receptores purinérgicos, P1 e P2, nos vários tecidos que constituem o corpo cavernoso humano por técnicas de imunofluorescência aplicadas à microscopia confocal, este trabalho será desenvolvido em várias fases:

- Revisão bibliográfica sobre técnicas de preservação de tecidos e detecção molecular de receptores em vasos sanguíneos.

- Pesquisa de laboratórios que realizem estudos análogos em tecido cavernoso, com vista ao estabelecimento de futuros protocolos de colaboração, nomeadamente para fazer pedido de estágio para futura implementação da técnica na nossa instituição.
- Aplicação da técnica a amostras congeladas obtidas em estudos anteriores para validação dos resultados obtidos por técnica de detecção funcional.
- Raciocínio crítico sobre os resultados experimentais obtidos pela técnica de microscopia confocal e sua integração no projecto mais vasto que pretende caracterizar do ponto de vista microscópico, bioquímico e funcional os receptores purinérgicos, P1 e P2, no tecido cavernoso humano em indivíduos controlo e em doentes com DE vasculogénica. Esta etapa permitirá antecipar e necessidade de realizar novas experiências / novas técnicas capazes de comprovar a eventual utilidade clínica dos resultados experimentais e/ou antever a possibilidade de transferência do conhecimento científico para o planeamento de ensaios clínicos.

9. Resultados esperados

Espera-se conseguir determinar qual a melhor metodologia laboratorial para o processamento do tecido cavernoso humano, com a melhor preservação possível da sua arquitectura para que se possam marcar com anticorpos primários e secundários fluorescentes os receptores da adenosina e do ATP, de modo a poder avaliar ao microscópio confocal a sua expressão. Os resultados obtidos serão correlacionados com os ensaios bioquímicos e funcionais realizados previamente pela equipa de investigação do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP.

10. Indicadores de produção científica

A proposta de projecto de investigação será apresentada nas Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica em Junho de 2009 e em reunião do Serviço de Urologia.

A divulgação dos resultados será efectuada nas reuniões de Serviço de Urologia e do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP, nas Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica em Junho de 2010, a organizar no HSA/CHP, pelos alunos da DIIC, e, através de apresentação de poster ou comunicação oral, em encontros científicos nacionais e internacionais.

Prevê-se que, se os resultados forem relevantes, os mesmos possam constituir alvo de uma publicação a submeter a revista internacional indexada com arbitragem científica.

11. Bibliografia

1. Tanagho, E. A.; McAninch, J. W.; Smith´s General Urology; 16th edition; McGraw-Hill; 2004.

2. Wein; Kavoussi; Novick; Partin; Peters; Campbell-Walsh Urology; 9th edition; Saunders; 2007.

3. Billups, K. L.; Erectile dysfunction as an early sign of cardiovascular disease; International Journal of Impotence Research; 17, S19-S24; 2005.

4. Kilic, S.; Salih M.; Anafarta, k.; Baltaci, S.; Kosar, A.; Adenosine: a new agent in the diagnostic of impotence; Int. J. Impot. Res.; 6: 191-198; 1994.

5. Takahashi, Y.; Ishii, N.; Lue, T. F.; Tanagho, E. A.; Effects of adenosine triphosphate on canine penile erection; Int. J. Impot. Res.; 4: 27-34; 1992.

6. Faria, M.; Magalhães Cardoso, T.; Lafuente-de-Carvalho, J. M.; Correia-de-Sá, P.; Decreased ecto-ntpdase 1/CD39 activity leads to desensitization of P2 purinoceptors regulating tonus of corpora cavernosa in impotent men with endotelial disfunction; Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids; 27:761-768, 2008.

7. Faria, M.; Magalhães Cardoso, T.; Lafuente-de-Carvalho, J.M.; Correia-de-Sá, P.; Corpus cavernosum from men with vasculogenic impotence is partially resistant to adenosine relaxation due to endothelial A_{2B} receptor disfunction; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; 319:405-413, 2006.

B. QUESTÕES ÉTICAS

Não haverá convocação de doentes, realização de consultas ou colheita de amostras / produtos biológicos para este projecto de investigação.

Os tecidos analisados terão origem em amostras provenientes de indivíduos controlo e de portadores de DE vasculogénica grave submetidos a cirurgia de implantação de próteses penianas, que foram previamente testados do ponto de vista funcional e que compõem a biblioteca de tecidos existente no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP.

C. PLANO FINANCEIRO

1. Orçamento

Todos os estudos laboratoriais serão efectuados no Laboratório de Farmacologia do ICBAS/UP.

Não serão efectuadas consultas, internamentos, procedimentos, exames ou análises no CHP, pelo que não haverá custos para esta instituição.

	Custo total estimado
Reagentes e produtos químicos: Anticorpos primários e secundários (para imunofluorescência); Reagentes e meios de montagem; Óleo para objectivas de imersão e líquidos para limpeza de lentes (não incluídos na taxa de utilização do microscópio confocal)	5,500 euros
Consumíveis e material descartável: Lâminas, lamelas e meios de montagem; Lâminas de microtomo; Pontas, luvas, caixas de incubação e preservação de lâminas; Outros consumíveis e material descartável / administrativo	1,250 euros
Pequenos equipamentos: Luz fria por intermédio de fibra óptica (para lupa binocular)	750 euros
Poster	50,00 euros
Inscrição aluno em Congresso da Especialidade	200,00 euros
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50,00 euros
TOTAL	**7,800 EUROS**

2. Financiamento

Este estudo será financiado pela Roche Farmacêutica: Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica – Programa Roche/ICBAS/HSA 2008/2010.

ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS

- CHP, Centro Hospitalar do Porto
- DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS
- HSA, Hospitalar de Santo António
- ICBAS/UP, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
- JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica
- UMIB/ICBAS/UP, Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, com sede no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
- DE, Disfunção Eréctil

PEDIDOS DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

HSA/CHP

Carta ao Presidente do Conselho de Administração

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do Centro Hospitalar do Porto
Dr. Sollari Allegro

ANA ISABEL PEREIRA DE CARVALHO, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data Assinatura

Carta à Presidente da Comissão de Ética

Exma. Senhora Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar do Porto
Dra. Luísa Bernardo

ANA ISABEL PEREIRA DE CARVALHO, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data Assinatura

Carta ao Director do Departamento de Ensino, Formação e Investigação

Exma. Senhora Directora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do Centro Hospitalar do Porto
Prof. Doutora Margarida Lima

ANA ISABEL PEREIRA DE CARVALHO, na qualidade de Aluna da da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data Assinatura

PEDIDO DE FINANCIAMENTO

Bolsa de iniciação à investigação clínica

Carta ao Presidente do Conselho Directivo

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Directivo do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Prof. Doutor António Sousa Pereira

ANA ISABEL PEREIRA CARVALHO, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. a atribuição de 7,800 € (sete mil e oitocentos euros) da Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica da Roche Farmacêutica, SA, para financiamento do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com orçamento apresentado.

Data Assinatura

TERMOS DE RESPONSABILIDADE

Investigador Responsável

Termo de Responsabilidade do Investigador Principal e Responsável no CHP

Eu, abaixo assinado, JOSÉ MARIA LAFUENTE DE CARVALHO, Médico, Especialista de Urologia do HSA/CHP, na qualidade de Investigador Principal e Responsável no HSA/CHP, declaro assumir a liderança científica do Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados e com as normas internas da Instituição.

Data Assinatura

DECLARAÇÕES DE ALUNOS E ORIENTADORES / SUPERVISORES

Aluno

Declaração do Aluno

Eu, abaixo assinado, ANA ISABEL PEREIRA CARVALHO, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS / CHP, declaro que durante a realização do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, respeitarei as normas éticas e deontológicas, que a identificação dos doentes não será revelada e que os dados necessários para a realização do trabalho serão mantidos confidenciais e não serão utilizados para qualquer outro fim.

Data Assinatura

Orientadores / Supervisores

Declaração do Orientador

Eu, abaixo assinado, JOSÉ MARIA LAFUENTE DE CARVALHO, Médico, Especialista de Urologia do HSA/CHP, na qualidade de Orientador de ANA ISABEL CARVALHO, Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/ CHP, declaro que me comprometo a acompanhar a aluna nas diferentes fases da sua realização Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, responsabilizando-me por supervisionar a recolha e utilização dos dados necessários para a realização, bem como zelar pelo cumprimento das normas éticas e deontológicas, nomeadamente para que os dados utilizados na realização do referido trabalho sejam mantidos confidenciais e não sejam utilizados para qualquer outro fim.

Data Assinatura

Declaração do Co-Orientador

Eu, abaixo assinado, PAULO CORREIA DE SÁ, Professor Catedrático do ICBAS/UP, na qualidade de Co-Orientadora de ANA ISABEL CARVALHO, Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/ CHP, declaro que me comprometo a acompanhar a aluna nas diferentes fases da sua realização do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, bem como zelar pelo cumprimento das normas éticas e deontológicas, nomeadamente para que os dados utilizados na realização do referido trabalho sejam mantidos confidenciais e não sejam utilizados para qualquer outro fim.

Data Assinatura

Declaração do Supervisor / Responsável pela Disciplina

Eu, abaixo assinado, MARGARIDA MARIA DE CARVALHO LIMA, Médica, Especialista de Imunohemoterapia do HSA/CHP, na qualidade de Professora Responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/ CHP, declaro que me comprometo a acompanhar a aluna SIMÃO CRUZ, Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/ CHP nas diferentes fases da sua realização do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado.

Data Assinatura

TERMOS DE AUTORIZAÇÃO LOCAL

Serviços

Autorização do Director do Serviço de Urologia

FILINTO GOMES MARCELO SILVA, na qualidade de Director do Serviço de UROLOGIA do HSA/CHP, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data Assinatura e carimbo

Departamentos

Autorização do Director do Departamento de Cirurgia

VÍTOR MANUEL RIBEIRO, na qualidade de Director do Departamento de CIRURGIA do HSA/CHP, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data Assinatura e carimbo

Autorização do Director do Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia

PAULO CORREIA DE SÁ, na qualidade de Director do Departamento de IMUNO-FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA do ICBAS-UP declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado e comprometo-me a prestar condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data Assinatura e carimbo