

2010

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Projecto Mestrado Integrado em Medicina

ATP e Neurotrofinas Urinárias como marcadores biológicos da bexiga hiperactiva

Curso de Mestrado Integrado em Medicina

ICBAS/UP – HSA/CHP

MODALIDADE: Trabalho de projecto

Aluna: OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA

Orientador: Dr. Miguel Silva Ramos

Co-Orientador: Professor Doutor Paulo Correia de Sá

Ano Lectivo: 2009 / 2010



PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO – RELATÓRIO FINAL

ÍNDICE

RESUMO	4
INTRODUÇÃO	7
MATERIAIS E METODOS.....	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
CONCLUSÕES	27
FONTES DE FINANCIAMENTO	27

ANEXO I

PROPOSTA DE PROJECTO	30
----------------------------	----



PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO
RELATÓRIO FINAL

ATP e Neurotrofinas
Urinárias como
marcadores biológicos da
bexiga hiperactiva

RESUMO

Introdução – A bexiga hiperactiva é um síndrome constituído por imperiosidade miccional com ou sem incontinência, geralmente associada a noctúria e a polaquiúria. Este síndrome afecta cerca de 15% da população adulta e a sua incidência aumenta com a idade tendo um impacto muito grande na qualidade de vida dos doentes e um impacto sócio-económico semelhante à diabetes mellitus.^{6,10} A sua patofisiologia ainda é em grande parte desconhecida, no entanto é reconhecido um papel importante do ATP na mediação quer das aferências, quer das eferências vesicais nestes doentes. Apesar das acções biológicas do ATP serem bem conhecidas na maioria das células, a origem de ATP extracelular e o mecanismo pelo qual as células podem libertar este nucleótido mantêm-se em discussão, bem com os possíveis alvos de manipulação farmacológica. Vários estudos reconhecem que a estimulação mecânica pode causar a libertação de ATP a partir de células epiteliais. Este mecanismo parece estar presente nas células do epitélio das vias urinárias inferiores (urotélío), onde a libertação excessiva de ATP (e de outros mediadores, como a acetilcolina), favorecida pelo aumento de pressão sobre a parede, variações da temperatura e do pH e diversos mediadores inflamatórios, se correlaciona com fenómenos de hiperactividade da bexiga.²⁰ Em trabalhos realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP detectaram-se níveis elevados de ATP em amostras de bexigas humanas colhidas de doentes com obstrução infra-vesical, que se correlacionam com aumentos da regulação purinérgica da contracção do detrusor e da libertação de acetilcolina induzida por estimulação eléctrica (resultados não publicados). No trato urinário, o factor de crescimento nervoso (NGF) é produzido no urotélío e no músculo liso. O NGF parece ter um papel muito importante como factor neurotrófico essencial para a manutenção das fibras sensitivas envolvidas na via nociceptiva. Pensa-se, por isso, que o NGF é responsável pelo aumento de sensibilidade da bexiga e hiperactividade do detrusor, por mecanismos ainda não completamente conhecidos. Existem algumas evidências de que estes neuromoduladores podem constituir um alvo preferencial para o diagnóstico e monitorização da progressão das disfunções do trato urinário inferior.

Objectivos – Neste contexto, o objectivo do presente estudo foi o de avaliar se os doentes portadores de hiperactividade do detrusor ideopática possuíam maior concentração urinária de ATP e de NGF relativamente a uma população controlo e qual

seria o valor predictivo destes mediadores como marcadores biológicos não invasivos no diagnóstico e seguimento da hiperactividade do detrusor.

Metodologia – Neste estudo foram incluídas 38 mulheres de idade semelhante, das quais 19 apresentavam hiperactividade do detrusor e as outras 19 não tinham clínica de bexiga hiperactiva, nem hiperactividade do detrusor no estudo urodinâmico. Foram excluídas do estudo mulheres que apresentavam evidência clínica e laboratorial de infecção urinária. Foram efectuadas duas colheitas de urina para estudo microbiológico e bioquímico; as amostras para doseamento de ATP e NGF foram imediatamente congeladas em azoto líquido e armazenadas a -20°C. Em cada colheita foi determinado o volume total de urina excretado para posterior correcção volumétrica dos valores encontrados. O doseamento do ATP urinário foi realizado por bioluminescência com um *kit* comercial específico (ENLITEN ATP assay system bioluminescence detection kit, Promega, Madison, EUA). O doseamento urinário do NGF foi realizado por ELISA usando um *kit* comercial de elevada sensibilidade (RIA, Promega, Madison, EUA).

Resultados – Os níveis de ATP determinados nas amostras de urina dos dois grupos foram significativamente ($P < 0,01$) diferentes, *i.e.* o ATP urinário do grupo BH foi de $9,82 \pm 8,40$ nM e o do grupo controlo que foi de $3,41 \pm 2,47$ nM ; esta diferença foi confirmada nas duas amostras de urina colhidas sequencialmente a cada indivíduo. A avaliação do ATP urinário apresenta uma AUC: 83,2%, (Intervalo de confiança 95%: 69,7-96,7) para o diagnóstico de bexiga hiperactiva. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os teores de NGF urinário nos dois grupos.

Conclusões - Apesar dos resultados apresentados serem de uma amostra preliminar restrita, que está englobada num estudo de maior dimensão, é possível prever que o doseamento de ATP urinário se venha a tornar um marcador biológico muito útil na identificação e seguimento de doentes com hiperactividade vesical idiopática. A facilidade de colheita e doseamento do ATP urinário, aliada à elevada sensibilidade e especificidade metodológica determinada nesta amostragem (AUC: 83,2%, Intervalo de confiança 95%: 69,7-96,7) constituem as suas principais vantagens, comparativamente com outros marcadores propostos (e.g. NGF).

AGRADECIMENTOS

Considerando este Projecto final do meu curso como resultado de uma caminhada que começou há alguns anos, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição directa na construção deste Projecto de Investigação:

Prof. Doutora Margarida Lima, pela sua ajuda desde do inicio deste projecto até ao seu termino.

Dr. Miguel Silva-Ramos, pelo trabalho como Orientador, pelas contribuições teóricas, pela orientação na escolha do meu tema, e principalmente, por me mostrar na prática como podemos ajudar os doentes.

Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá, pelo trabalho como Co-Orientador, além de me ajudar activamente nesta caminhada, ajudou-me a descobrir a ligação entre o laboratório de farmacologia e a sua ajuda na pratica clínica. Por ser um dos idealizadores desse trabalho, não poupando esforços para me ajudar em todos os momentos, ensinando-me, com seu próprio exemplo, a ter mais responsabilidade e dedicação. Agradeço a sua paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste Projecto de Investigação.

Dr.^a Isabel Silva, pela sua ajuda, força, amizade, carinho e apoio que demonstrou durante este projecto.

Dr.^a Margarida Duarte Araújo pela confiança em mim e em meu trabalho, por sua alegria e simplicidade demonstradas em todos os momentos que me recebeu.

Dr. José Carlos Oliveira e à Dr.^a Fernanda Brava, pela sua gentileza e por toda a ajuda demonstrada e sempre com disponibilidade para a concretização deste Projecto de Investigação.

Este trabalho foi financiado com recurso a fundos disponibilizados pela Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB-215, unidades de I&D da FCT) e pelo ICBAS / Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica - Roche Farmacêutica no âmbito da Disciplina de Iniciação à Investigação Científica do Mestrado Integrado em Medicina. Um agradecimento em particular, sem este financiamento este estudo não seria possível.

A minha eterna gratidão a todos!

INTRODUÇÃO

O Síndrome de Bexiga Hiperactiva (SBH) é definida pela International Continence Society como um quadro clínico caracterizado por imperiosidade miccional, isto é, uma vontade forte, desconfortável e súbita de urina, associada frequentemente a incontinência, noctúria e polquiúria, na ausência de factores locais, infecciosos ou metabólicos. É habitualmente causada por hiperactividade do detrusor, isto é, por contracções involuntárias do músculo detrusor durante a fase de armazenamento do ciclo miccional

SINTOMAS

Clinicamente, a bexiga hiperactiva pode apresentar-se como:

- **Imperiosidade ou urgência miccional** – sentir frequentemente um desejo súbito, intenso e imprevisível de urinar.
- **Aumento de frequência** – mais de oito micções em um período de 24 horas. Os indivíduos podem aumentar a frequência de micções como tentativa de reduzir a pressão da bexiga e evitar episódios de incontinência. Pode incluir **noctúria**: levantar-se duas ou mais vezes durante a noite para urinar.
- **Incontinência por imperiosidade** – episódios de perda involuntária de urina associados com desejo súbito e intenso de urinar.

Estes três sintomas podem aparecer isolados ou em associação, ou seja, o doente pode apresentar somente um e/ou mais sintomas para ter bexiga hiperactiva.¹⁰ Para evitar a perda de grandes volumes de urina, os indivíduos com bexiga hiperactiva tendem a urinar frequentemente, para manterem um volume relativamente baixo de urina na bexiga. No entanto, apesar deste mecanismo adaptativo, a incontinência continua a ser um problema incómodo e limitante para estas pessoas.

PREVALÊNCIA

Há poucos estudos baseados em populações que avaliam a prevalência de Bexiga Hiperactiva. As estimativas da prevalência oscilam bastante de acordo com o estudo ou pesquisa avaliada, variando de 3% a 43% da população, dependendo da faixa etária avaliada. O estudo feito por na América do Norte estimou a prevalência Bexiga Hiperactiva em adultos ≥ 18 anos de 16% em homens e 16,9% em mulheres.^{15, 16} Na

Europa, estimaram a prevalência em adultos ≥ 40 anos de 15,6% para homens e 17,4% em mulheres.^{15, 16} No estudo internacional feito por estimaram a prevalência em adultos ≥ 18 anos sendo 11,8%, sendo 10,8% em homens e 12,8% em mulheres.⁶ A prevalência da Bexiga Hiperactiva aumenta com o avanço da idade, em todos os estudos confirmaram que as mulheres têm maior prevalência de sintomas de Bexiga Hiperactiva comparada com os homens antes dos 60 anos de idade, enquanto os homens têm maior prevalência após os 60 anos de idade.¹¹ Em relação à frequência dos sintomas, geralmente, tanto a frequência quanto a imperiosidade são sintomas muito mais presentes que a incontinência por imperiosidade, especialmente entre as idades de 35 a 55 anos. Mais pessoas são afectadas por sintomas de bexiga hiperactiva do que por doença de Alzheimer ou osteoporose.^{7, 11, 16}

REPERCUSSÕES SOCIAIS

A bexiga hiperactiva é um problema social, generalizado e preocupante, que pode afectar qualquer indivíduo em qualquer idade e compromete a qualidade de vida, sendo causa de isolamento social, frustração e ansiedade. Há estudos que referirem que a depressão é mais comum em doentes com incontinência por imperiosidade (60%) em comparação àquelas com incontinência urinária mista (42%) ou incontinência urinária de esforço (14%) e outros estudos ressaltam que mesmo as doentes com Bexiga Hiperactiva sem perda urinária têm a qualidade de vida bastante comprometida.^{13, 15, 16}

FISIOPATOLOGIA

A bexiga desempenha duas funções primordiais, o armazenamento e a expulsão periódica da urina. A execução destas funções é regulada por mecanismos miogénicos e neurológicos complexos. A micção envolve córtex do cérebro, núcleos da base do cérebro, substância reticular ponto-mesencefálica, sistema límbico, hipotálamo, cerebelo, a medula espinal; inervação sensorial aferente e os componentes anatómicos de tracto urinário inferior. Qualquer perturbação nestas estruturas pode contribuir para os sintomas de bexiga hiperactiva.

Os neurónios motores da bexiga e da uretra estão localizados no no segmento sagrado da medula espinal (S2-S4) e são coordenados pelo centro pontino da micção e pelos núcleos da base do cérebro. O cérebro recebe informações sensoriais da bexiga e do soalho pélvico, sendo importante na manutenção do tónus do soalho pélvico e na

coordenação entre contracção do detrusor e relaxamento do esfíncter. O cerebelo participa, também, activamente da coordenação dos vários músculos envolvidos no acto da micção.

A musculatura lisa da bexiga, a região uretro-trigonal, e a uretra proximal são inervadas por fibras do plexo-pélvico que está localizado profundamente na cavidade pélvica e é composto por fibras mescladas dos nervos pélvicos (parassimpático) e dos nervos hipogástricos (simpático). As fibras parassimpáticas originam-se na substância cinzenta da medula sagrada (S2-S4), possuem vários gânglios próximos a bexiga e fibras pós-ganglionares curtas. Já os nervos hipogástricos (enervação simpática) tem origem na região lateral da substancia cinzenta da medula entre T10 e L2. O nervo pudendo, que inerva o esfíncter uretral externo, tem sua origem no núcleo de Onuf, no corno ventral do segmento sacral da medula S2-S4. Todo controle somático (motor) dependente da vontade é exercido pelo nervo pudendo.

Na fase de enchimento vesical, a continência é mantida pela acomodação vesical associada à total inibição dos impulsos eferentes parassimpáticos e activação dos eferentes simpáticos e somáticos. O córtex cerebral envia impulsos descendentes inibitórios para o centro pontino e para o nervo pélvico (parassimpático) relaxando o detrusor e impulsos excitatórios para o nervo hipogástrico (simpático) e nervo pudendo aumentando a resistência uretral. Os impulsos aferentes vesicais activam, também, os motoneurónios do núcleo de Onuf, aumentando a actividade tónica do esfíncter uretral e, por conseguinte, a resistência da uretra.

Na micção voluntária há diminuição da actividade dos músculos do soalho pélvico e da pressão uretral, que precedem a contracção do detrusor. Esta coordenação é regulada pelo sistema nervoso, através do reflexo miccional espinobulboespinal. Ocorre a liberação do centro pontino, que envia impulsos para a medula sagrada, activando neurónios parassimpáticos desencadeando, assim, a contracção do detrusor. Simultaneamente impulsos da ponte inibem motoneurónios pudendos (núcleos de Onuf) que enervam o esfíncter uretral estriado, relaxando-o. Iniciada a contracção do detrusor, a descarga aferente gerada pela tensão na parede vesical reforça o reflexo miccional. O fluxo de urina pela uretra facilita o esvaziamento, pois também estimula a contracção do detrusor. Quando a micção está chegando ao fim, o soalho pélvico contrai-se, eleva o colo vesical, que se fecha e a pressão do detrusor diminui.

Os impulsos aferentes são essenciais para o controlo da micção. Alterações nesta actividade aferente estão implicadas na etiologia da bexiga hiperactiva. Os impulsos aferentes provenientes da bexiga são conduzidos predominantemente por fibras pequenas e mielinizadas do tipo A δ , que são sensíveis à distensão e/ou à contracção vesical. As fibras aferentes do tipo C, localizadas principalmente na região sub-urotelial, não são mielinizadas, são menos sensíveis a estímulos mecânicos e são essencialmente activadas por estímulos químicos, irritativos e térmicos. São relativamente pouco activas na micção normal, mas têm um papel muito importante na génese dos sintomas da bexiga hiperactiva. Vários tipos de receptores foram identificados nestes nervos, como receptores vanilóides, purinérgicos, das neurokininas e receptores do NGF (trk-A). Vários estudos mostram um aumento da activação destes receptores em bexigas hiperactivas, aumentando o sinal aferente ao SNC que pode condicionar um reflexo miccional mais precoce e menos controlado.

Factor de crescimento neuronal (NGF)

O **factor de crescimento neuronal (NGF)** é uma pequena proteína essencial para a sobrevivência e diferenciação neuronal, em particular dos neurónios simpáticos e dos neurónios sensitivos. Após a sua secreção, liga-se e activa receptores presentes nas células neuronais, após o que é internalizado. São conhecidos dois receptores para o NGF: o TrkA (pronuncia-se "Track A"), que é um receptor da cinase da tirosina, de elevada afinidade, e o LNGFR ("Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor").

No trato urinário, o NGF é produzido no urotélio e no músculo liso, e parece ter um papel muito importante como factor neurotrófico essencial na manutenção das fibras sensitivas envolvidas na nocicepção. Tem também sido verificado que as bexigas hipertrofiadas de ratos e humanas têm uma quantidade significativamente maior de NGF por mg de tecido do que as bexigas normais¹⁹ e que a sobreexpressão de NGF na bexiga está associada a hiperactividade do detrusor e alterações miccionais em ratos²⁹.

Estudos clínicos e experimentais têm detectado níveis aumentados de NGF no urotélio e na urina, em condições inflamatórias do aparelho urinário baixo, tais como na cistite intersticial e a prostatite crónica. A descoberta de que a instilação intra-vesical de NGF pode induzir hiperactividade da bexiga em ratos sugere que NGF possa sensibilizar

as fibras aferentes na ausência de inflamação. A instilação intra-vesical de k252a, um inibidor da actividade da cinase da tirosina, ou de anti-soros neutralizantes do NGF, atenua a hiperalgesia associada à cistite induzida em ratos.⁹ Por outro lado, a injeção intravesical de toxina botulínica, um inibidor potente da libertação de acetilcolina pelos terminais nervosos motores utilizado para tratar a espasticidade muscular, reduz o conteúdo vesical e urinário de NGF em doentes com hiperactividade do músculo detrusor.^{13, 14}

Níveis aumentados de NGF também têm sido observados no urotélio e na urina em doentes com hiperalgesia urinária e hiperactividade do detrusor. Há possibilidade que NGF seja responsável pelo aumento de sensibilidade da bexiga e da hiperactividade do detrusor, por mecanismos ainda não conhecidos. Existem algumas evidências de que este neuromodulador pode constituir um alvo preferencial para o diagnóstico e monitorização da progressão de disfunção do tracto urinário inferior.

Trifosfato de Adenosina (ATP)

O urotélio não é só uma barreira para substâncias tóxicas na urina, mas também é um tecido metabolicamente muito activo, capaz de produzir e libertar ATP e outros mediadores celulares (e.g. acetilcolina, prostanóides). O ATP é uma molécula multifuncional que actua não só ao nível intra-celular como fonte de energia, mas também ao nível extra-celular, como um neurotransmissor importante que regula os processos celulares diversos que incluem a transmissão, nocicepção, o transporte de iões, a apoptose, a secreção e a contracção muscular, por exemplo na bexiga. É abundante no citoplasma das células e pode ser libertado para o meio extracelular por diversos mecanismos que incluem o exocitose de vesículas que contêm ATP, mas também processos não excitatórios como os hemicanais, as bombas de efluxo ABC, canais iónicos (P2X₇), entre outros. No meio extracelular o ATP pode activar receptores purinérgicos de membrana da classe P2, que incluem os 8 subtipos de receptores metabotrópicos (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄) e 7 subtipos de receptores ionotrópicos P2X (P2X₁₋₇).

Vários estudos reconhecem que a estimulação mecânica pode causar a libertação de ATP a partir de células epiteliais. Quando estas células são estimuladas pode ocorrer

a libertação de acetilcolina e ATP; a acetilcolina aumenta a produção de ATP induzindo hiperactividade da bexiga.²⁰ A função do ATP no urotélio ainda não é completamente conhecida, apesar de já ter sido demonstrado que o nucleótido é capaz de estimular a sua própria libertação a partir dos reservatórios intracelulares.²⁶

A sinalização purinérgica pode desempenhar um papel importante na regulação da actividade da bexiga. A actividade da bexiga humana normal deve-se quase exclusivamente à activação de receptores muscarínicos M_2 e M_3 pela acetilcolina libertada por células neuronais e não-neuronais. No entanto, durante o envelhecimento e em situações patológicas da bexiga (e.g. síndromes obstrutivas, cistite intersticial) a contracção do detrusor pode depender (~50%) activação de receptores purinérgicos pelo ATP libertado. Existem receptores $P2X_1$ no músculo liso do detrusor através dos quais o ATP pode regular a contractilidade da bexiga. A sensibilidade da fase de armazenamento parece dever-se à activação de receptores $P2X_3$ localizados nos nervos aferentes pélvicos suburotelias e na medula espinhal. Assim o urotélio liberta ATP em resposta a estimulação mecânica da repleção vesical, que estimula receptores $P2X_3$ nas terminações aferentes suburoteliais, sinalizando o enchimento da bexiga.⁸ O urotélio de determinadas espécies animais expressa múltiplos subtipos de receptores purinérgicos, incluindo todos os subtipos de receptores ionotrópicos $P2X$, bem como os receptores metabotrópicos sensíveis aos nucleótidos, $P2Y_1$, $P2Y_2$ e $P2Y_4$, e à adenosina, A_1 , A_{2A} and A_3 . Consequentemente, as purinas parecem exercer uma actividade autócrina/parácrina regulando a via mecanosensitiva aferente da bexiga.

Estudos preliminares realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP detectaram níveis elevados de ATP em amostras de bexigas humanas colhidas de doentes com obstrução infra-vesical. A elevação dos níveis de ATP libertado correlacionam-se com aumentos da regulação purinérgica da contracção do detrusor e da libertação de acetilcolina induzida por estimulação eléctrica (resultados não publicados).

Neste contexto, o objectivo do presente estudo foi o de avaliar se os doentes portadores de bexiga hiperactiva (BH) ideopática possuíam maior concentração urinária de ATP e de NGF relativamente a uma população controlo e qual seria o valor predictivo destes mediadores como marcadores biológicos não invasivos no diagnóstico e seguimento da hiperactividade vesical nos doentes.

MATERIAIS E METODOS

População e Amostra:

A população do estudo consistiu em doentes do sexo feminino observados na consulta de Urologia do Hospital Geral de Santo António / Centro Hospitalar do Porto (HSA/CHP). Foi feita uma pré-selecção de doentes (n=147) de acordo com os critérios de inclusão e exclusão do estudo, baseados num exame urodinâmico compatível com as orientações da International Continence Society (ICS): hiperactividade do detrusor definida como contrações involuntárias e espontâneas do detrusor durante a fase de enchimento. As doentes foram, subsequentemente, divididas em 2 grupos: o 1º grupo onde foram incluídas as doentes com hiperactividade do detrusor (n=52) e um 2º grupo de doentes, sem sintomas de bexiga hiperactiva e sem hiperactividade do detrusor no estudo urodinâmico (Controlo) (n=95). Durante o estudo foram excluídas 109 doentes (33 por recusa de participação, 12 por falta de informação, 11 sujeitas a cirurgia correctiva, 16 por diabétes, 5 com patologia renal e 32 por outros motivos, incluindo infecção urinária e défices neurológicos. Foram assim seleccionadas 19 doentes com bexiga hiperactiva (BH) e 19 doentes sem bexiga hiperactiva (Controlos).

Procedimentos:

O estudo ocorreu em 3 tempos.

T0 - Pré-selecção: onde foi feita uma pré-selecção da população do estudo (n=147), de acordo com o descrito anteriormente (ver acima).

T1 - Visita 1: as doentes foram informadas sobre a natureza da investigação e os seus riscos e benefícios, tendo-lhes sido fornecido um documento com informação sobre o estudo e solicitada a sua participação no trabalho de investigação. As doentes que concordaram em participar no estudo, assinaram o termo de consentimento informado. Estas doentes fizeram um diário de micção de 3 dias consecutivos entre as Visitas 1 e 2. Como critério de prossecução no estudo, cada doente deveria apresentar uma média superior a 8 micções diárias, pelo menos um episódio de imperiosidade diária e uma capacidade vesical funcional inferior a 300 ml. Cumprindo estes critérios, programou-se uma colheita de urina de 24 horas e de uma amostra de sangue para doseamento. Na

urina avaliou-se a creatinina, a taxa de depuração creatinina. o pH e o ionograma (Na^{2+} ; K^+ ; Ca^{2+}) urinários; no sangue determinou-se a creatinina e o ionograma (Na^{2+} ; K^+ ; Ca^{2+}) séricos.

T2 - Visita 2: Após confirmação dos critérios de inclusão foram realizadas duas colheitas de urina, em duas micções consecutivas com a sensação de bexiga cheia. Após cada micção procedeu-se ao registo do volume urinado, à avaliação ecografica do resíduo pós-miccional, à realização de teste com tira reagente para avaliar sumariamente a presença de infecção urinária. Foram recolhidas 3 amostras de urina para exame do sedimento e doseamento de creatinina, ionograma e DHL; foi recolhida uma outra amostra para doseamento do NGF urinário. Estas determinações foram realizadas no Laboratório de Química Clínica do HGSA. O doseamento do ATP urinário foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS. As amostras para doseamento do ATP e do NGF foram congeladas imediatamente em azoto líquido e armazenadas a -20°C até à data da determinação.

Doseamento da concentração urinária de ATP

As amostras foram descongeladas até atingirem a temperatura ideal de 25°C . Seguidamente foram centrifugadas para remover possíveis restos celulares e realizar uma avaliação sumária do sedimento urinário. Adicionou-se ao sobrenadante, uma mistura de luciferina-luciferase (ENLITEN ATP assay system bioluminescence detection kit, Promega, Madison, EUA). A concentração de ATP foi avaliada num luminómetro (20/20n Turner Biosystems Luminometer, Sunnyvale, USA) comparando a luminescência das amostras com uma curva padrão de ATP preparada diariamente. O limite mínimo de detecção foi de 100 pM e a luminescência correlacionou-se linearmente com a concentração de ATP até à concentração de 1000 nM, nestas condições experimentais.

Doseamento urinário da concentração de NGF urinário:

A concentração de NGF urinário foi determinada por ELISA usando um *kit* comercial de elevada sensibilidade (RIA, Promega, Madison, EUA) com limite mínimo de detecção de 7,8 pg/ml. Os procedimentos foram realizados conforme as instruções do fabricante.

Tratamento estatístico:

No estudo estatístico consideraram-se os valores mínimos, máximos e as médias. Foi utilizado o teste-*t* de Student. Considerou-se a existência de significância estatística para valores de $P < 0,05$. A correlação entre os dois factores foi realizada por regressão linear. O *software* utilizado na análise estatística foi o SPSS® 17.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela I, mostra-se que a idade média das doentes incluídas no grupo com Bexiga Hiperactiva (BH) não diferiu significativamente ($P>0.05$) da do grupo controlo.

Tabela I - Analise da idade do grupo BH vs grupo control

	BH	CONTROLOS
<i>n</i>	19	19
Idade Media	55 ± 14	53 ± 10
Mediana	56	51
Idade mínima	22	38
Idade máxima	77	67

Na Tabela II mostram-se os valores da bioquímica urinária (creatinina urinária, depuração creatinina urinária, Na⁺, desidrogenase láctica) e do diário miccional nos dois grupos estudados, BH e controlo. É importante realçar a inexistência de diferenças estatisticamente significativas ($P>0.05$) em qualquer dos parâmetros analisados nos dois grupos de indivíduos. A ausência de variações na actividade da desidrogenase láctica (enzima intracelular) entre o grupo controlo e as doentes com hiperactividade vesical (BH) justifica a assumção de que qualquer variação paramétrica obtida (e.g. teor de ATP) não deve ser originada por lesão celular importante.

Tabela II - Estudo dos principais parâmetros analíticos da urina

	BH	CONTROLOS
Creatinina urinária (umol/l) Urina ocasional	75,28 ± 27,69	74,65 ± 31,44
Depuração creatinina urinária (umol/l)	113,71 ± 25,08	120,58 ± 41,05
Na ⁺ ocasional	117,26 ± 42,66	113,68 ± 44,52
Diário miccional (ml/micção)	170,48 ± 85,73	191,21 ± 61,40
DHL (desidrogenase láctica)	20,76 ± 12,16	27,58 ± 22,30
Volume urina de 24hrs (ml)	1689,21 ± 640,93	1652,63 ± 525,26

Os doentes fizeram um diário miccional de 3 dias consecutivas, onde deviam apresentar, em média entre todos os dias documentados, pelo menos, 8 micções por dia, um episódio de imperiosidade por dia e uma capacidade vesical funcional $\leq 300\text{ml}$, para tentar uniformizar o grupo em estudo. Para tal usamos parâmetros de inclusão no estudo muito rigorosos.

Não observamos diferenças no diário miccional dos doentes com hiperactividade da bexiga comparativamente aos grupos controlo, que pode ser justificada pelo facto de serem os doentes/controlos de cada grupo que registavam o seu próprio diário miccional, podendo nem todos serem rigorosos neste registo, além de que, outro factor que poderá justificar a ausência de diferenças entre os dois grupos poderá ser a consequência do grupo com BH urinar mais vezes, compensando o facto de urinar menos quantidade, contrariamente ao grupo controlo que urinavam menos vezes mas em mais quantidade.

Tabela III - Estudo dos volumes urinários e volumes residuais pós-miccionais nas colheitas urinárias dos grupos em estudo

	BH	CONTROLOS
Média do volume urinado 1ª colheita (ml)	261,58 ± 165,72	240,00 ± 126,82
Média do volume residual pós-miccional (ml)	58,84 ± 54,57	49,75 ± 35,67
Média do volume urinado 2ª colheita (ml)	310,26 ± 132,69	357,63 ± 151,83
Média do volume residual pós-miccional – 2ª colheita (ml)	57,66 ± 40,07	58,68 ± 35,01

A Tabela III apresenta a média do volume urinado na 1ª colheita e 2ª colheita e do volume residual pós-miccional nos dois grupos em estudo. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($P > 0.05$) nos parâmetros em estudo, seja, média do volume urinário e média do volume residual pós-miccional nas duas colheitas, nos dois grupos em estudo. No entanto, deveria ter-se tomado em atenção ao tempo de enchimento da bexiga entre as duas colheitas, e analisar este tempo consoante o grupo em estudo. Assim, supõe-se e, futuramente seria necessária confirmação, que

provavelmente os doentes com BH devem demorar mais tempo a encher a bexiga completamente, sendo que terão contracções e sensação de urinar durante o processo de enchimento. Sendo também sugerível neste estudo fazer uma comparação da capacidade vesical com o volume urinado durante a micção, e verificar se os doentes com BH chegam efectivamente a encher por completo a bexiga.

A determinação do pH das amostras de urina que foram recolhidas e congeladas não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($P > 0.05$) entre os dois grupos analisados (Tabela IV).

Tabela IV - Determinação do pH da urina nos dois grupos

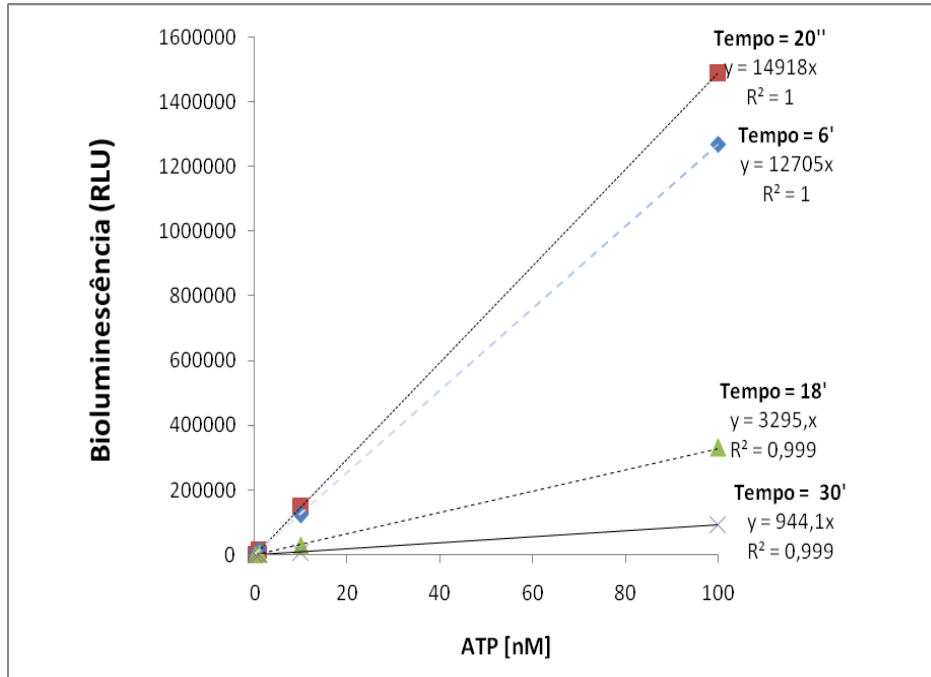
	BH	CONTROLOS
pH	6,05 ± 0,97	6,54 ± 0,90
Reacção Luciferina-luciferase → pH - óptimo 7.75		

Uma vez que o *kit* de determinação do teor de ATP por bioluminescência (Promega, Madison, EUA) sugeria que a reacção entre a luciferina e a luciferase deveria ocorrer a um pH óptimo de 7,75, foram realizados ensaios para determinar a influência do pH na eficiência da determinação do ATP urinário. A análise das curvas-padrão representadas na Figura 1, construídas com amostras de urina a pH 5,5, 6,5 e 7,7, mostra que o pH urinário não é um factor determinante de erro na quantificação do ATP na urina dos doentes. O facto de não haver necessidade de correcção do pH urinário antes da realização dos ensaios facilita o procedimento e evita a manipulação excessiva das amostras que pode ser fonte de contaminação biológica e, conseqüentemente, de erros na determinação do ATP urinário.

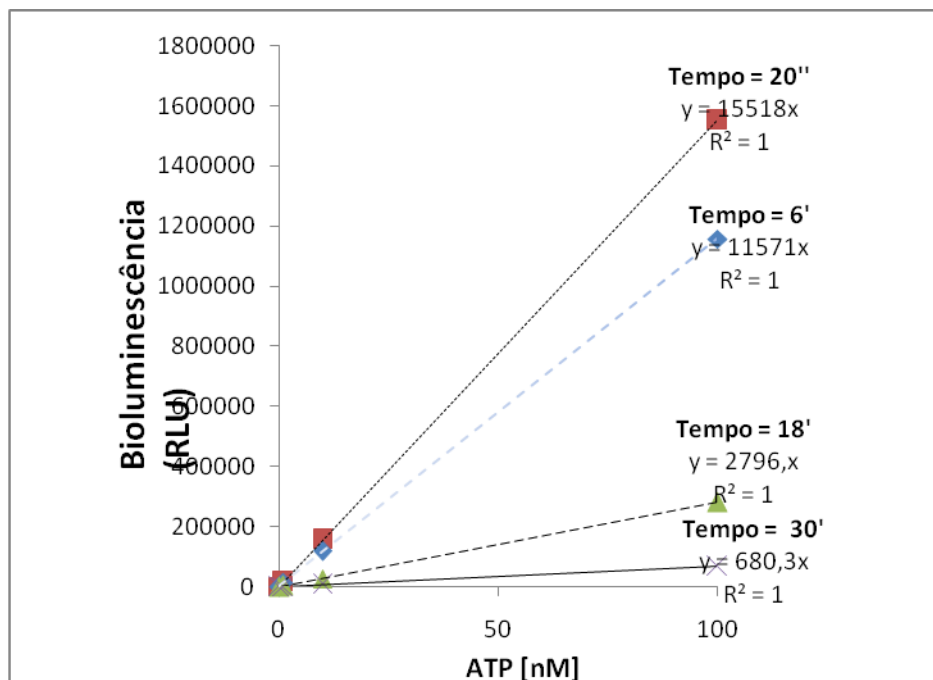
Figura 1 – Curvas padrão de ATP

- Interferência do tempo de reacção e do pH urinário-

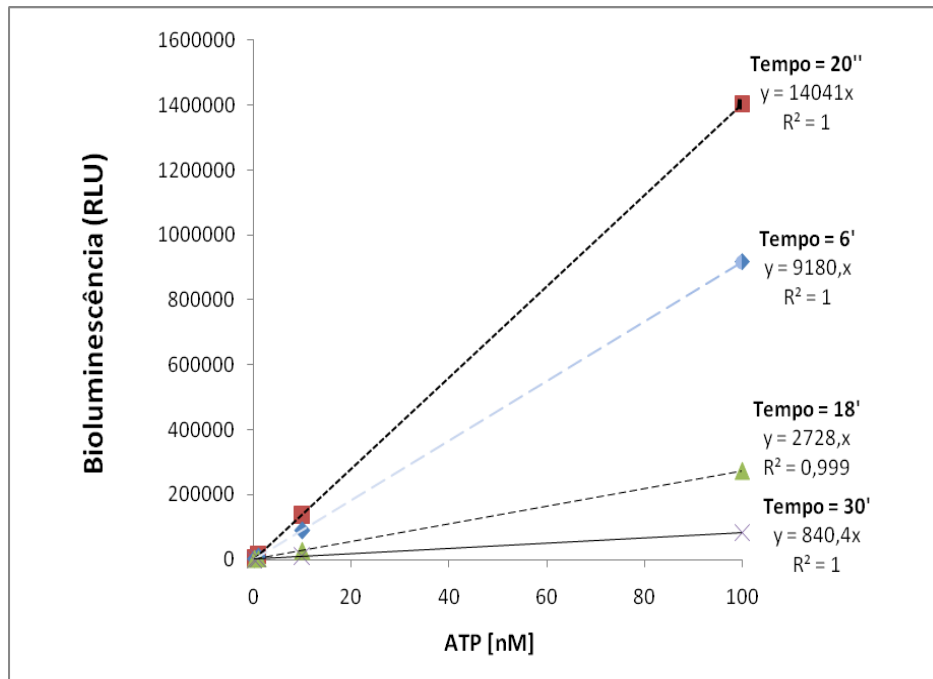
pH = 5,5 (Tempos 20'' - 6' - 18' - 30')



pH = 6,5 (Tempos 20'' - 6' - 18' - 30')



pH = 7,7 (Tempos 20'' - 6' - 18' - 30')



Determinação do teor de ATP urinário

O doseamento do ATP foi realizado avaliando a luminescência (RLU's) gerada pelas amostras de urina do grupo controlo e BH após dois períodos de reacção distintos (20 segundos e 6 minutos) com a luciferina-luciferase (Tabela V). Todos os doseamentos foram realizados em duplicado.

Tabela V – Quantificação do ATP urinário: influência do tempo de incubação com a luciferina-luciferase

	ATP aos 20 SEGUNDOS (nM/ml)					
	1ª Amostra		2ª Amostra		Média das 2 amostras	
	BH	Controlo	BH	Controlo	BH	Controlo
Mediana	7,43	3,57	12,59	6,07	9,15	5,08
Média	9,82 ± 8,40	3,41 ± 2,47	14,46 ± 9,97	7,71 ± 5,65	12,14 ± 7,45	5,56 ± 3,52
P=	0.007		0.05			

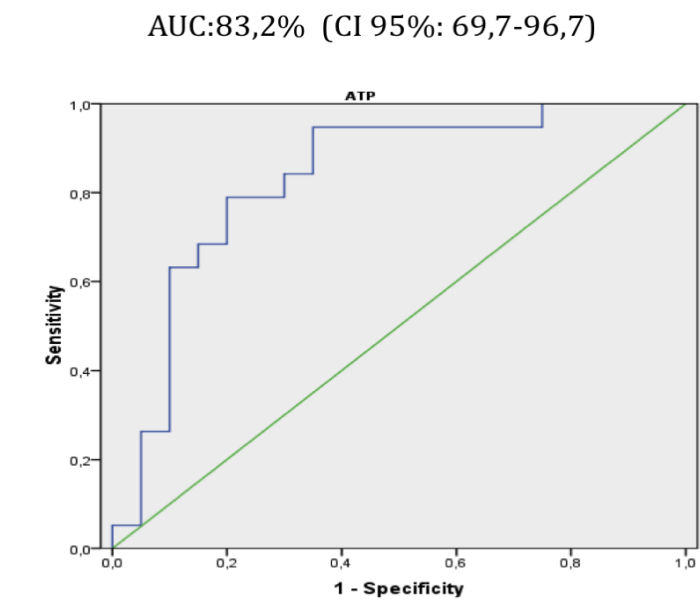
	ATP aos 6 MINUTOS (nM/ml)					
	1ª Amostra		2ª Amostra		Média das 2 amostras	
	BH	Controlo	BH	Controlo	BH	Controlo
Mediana	9,88	3,06	12,19	6,95	11,91	5,24
Média	11,35 ± 7,67	3,91 ± 2,97	16,27 ± 10,67	8,07 ± 6,03	13,81 ± 6,93	5,99 ± 3,79
P=	0,001		0.006			

Os níveis de ATP determinados na urina das doentes com hiperactividade vesical foram consistentemente maiores do que os observados no grupo controlo (ver Tabela V), independentemente do período de tempo de reacção com a luciferina-luciferase. Esta diferença foi consistente nas duas amostras de urina colhidas a cada indivíduo após micções consecutivas com a sensação de bexiga cheia. A ausência de variações na actividade da desidrogenase do lactato (DHL, enzima intracelular) nos dois grupos de indivíduos mostra que as diferenças encontradas nos teores de ATP urinário não se devem a lesão celular significativa (ver acima).

Os resultados obtidos foram semelhantes aos estudos feitos previamente no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP num modelo de bexiga hiperactiva induzida pelo ácido acético no rato, onde se demonstrou que a irritação vesical pelo ácido causa um aumento significativo da excreção de ATP na urina comparativamente com o grupo controlo. Num trabalho recente, constataram que o teor em ATP no fluido recolhido após a realização de testes urodinâmicos era semelhante no

grupo controlo (portadoras de incontinência de stresse) e em doentes com hiperactividade do detrusor. Esta aparente discrepância nos resultados obtidos por estes autores e os apresentados neste trabalho pode ser justificada pela grande dispersão etária (28 aos 87 anos) das doentes incluídas no estudo publicado comparativamente com o presente trabalho, bem como nas características do fluido analisado. O mesmo grupo avaliou o teor em ATP existente no fluido utilizado para perfundir a bexiga durante os testes urodinâmicos. Esta prática causa uma diluição significativa do conteúdo vesical, que é contrária ao protocolo implementado no presente trabalho que procura concentrar o ATP na urina esvaziada voluntariamente. Apesar disso, os mesmos autores verificaram que o nível de ATP detectado na urina controlo (e doente) se correlacionava inversamente com a capacidade cistométrica máxima e com o volume esvaziado, sugerindo que o ATP tem um papel relevante na fisiologia normal da bexiga modulando a sensação de preenchimento. Nos doentes com hiperactividade vesical, também mostraram a existência de uma relação positiva entre os níveis de ATP no perfusado e a primeira sensação de desejo de urinar, sugerindo que o ATP urinário pode ter um importante papel na etiologia da sensação de urgência urinária nos doentes com BH.

Figura 2 – Especificidade e Sensibilidade do ATP como marcador biológico.



Para percebermos se este estudo não estaria a ser falseado por eventualmente o ATP não ser considerado um bom marcador biológico, ou não muito fidedigno, fez-se a

correlação da sua sensibilidade vs especificidade. Desta forma e conforme podemos constar na figura 2, a facilidade de colheita e doseamento do ATP urinário, aliada à elevada sensibilidade e especificidade metodológica determinada nesta amostragem (AUC: 83,2%, Intervalo de confiança 95%: 69,7-96,7), realçam as suas principais vantagens, comparativamente com outros marcadores propostos (e.g. NGF).

O ATP é um neurotransmissor principal dos neurónios motores e sensitivos.^{1; 23} Apesar de ser difícil de comprovar que o ATP urinário deriva principalmente do urotélio, estudos têm demonstrado que nas bexigas provenientes de doentes com hiperactividade vesical idiopática o ATP é libertado maioritariamente a partir de células não-neuronais sujeitas a stresse mecânico ou a estimulação eléctrica.²² A contrário foi observado em situações de bexiga neurogénica, onde o ATP deriva da activação de fibras nervosas não-mielinizadas de tipo C localizadas na camada suburotelial. Usando culturas primárias de células uroteliais demonstrou-se que as mesmas libertam grandes quantidades de ATP em resposta à activação de receptores TRPV₁, a mediadores inflamatórios e a alterações do pH e da temperatura do meio; esses teores são significativamente aumentados em doentes com cistite intersticial.^{4; 16}

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NGF NA URINA

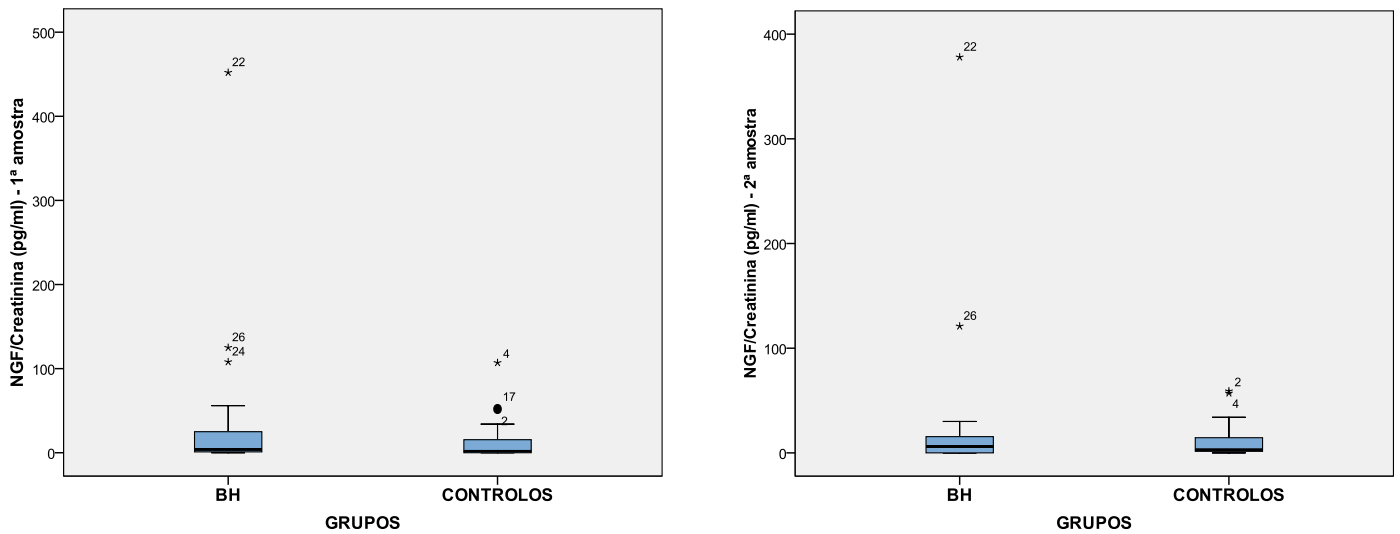
A contribuição do NGF para o funcionamento da bexiga não é ainda bem conhecida, mas tem sido sugerido em vários estudos que existe uma correlação directa entre a BH e a elevação do teor de NGF na urina.¹⁸ Estudos realizados em ratos, demonstraram um aumento da quantidade de NGF na bexiga correlacionado com situações de hiperactividade vesical.⁵ Outros trabalhos sugerem a existência de aumentos no teor urinário de NGF na cistite intersticial, que pode ser responsável pela sensibilização sensorial e aumento da hipersensibilidade somática.^{2, 12, 28}

Tabela VI – Quantificação do NGF

	NGF (pg/ml)			
	1ª Amostra		2ª Amostra	
	BH	Controlos	BH	Controlos
Média	43,26	15,42	33,46	11,88
P=	0,279		0,326	

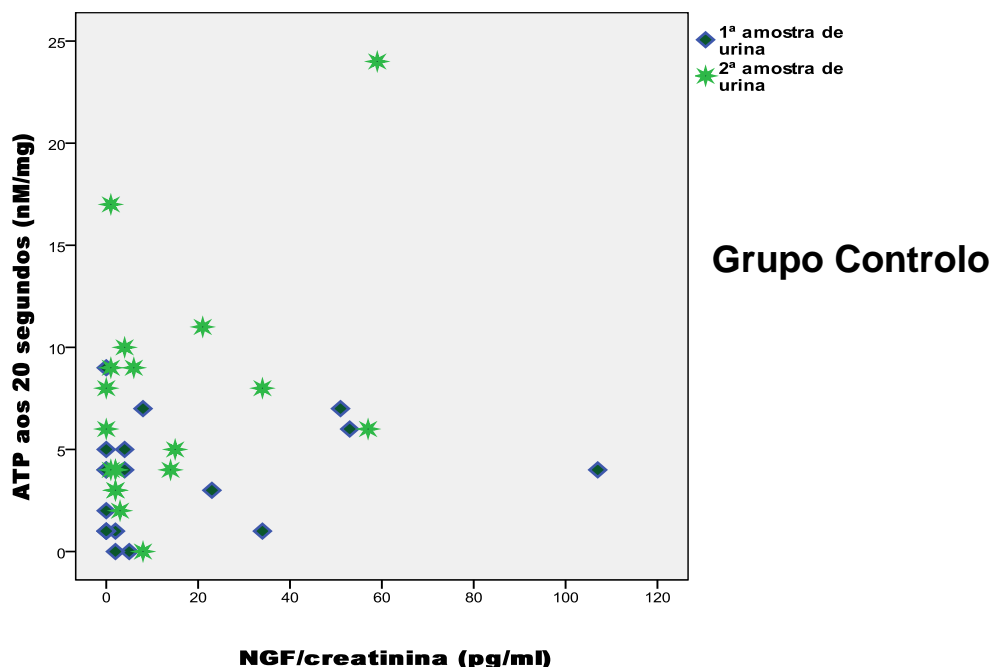
Da análise da Tabela VI e da Figura 3 (abaixo), pode constatar-se que o teor de NGF urinário nos dois grupos de indivíduos, BH e controlo, não apresenta diferenças estatisticamente significativas ($P>0.05$). Este resultado sugere que o NGF urinário não constitui um bom biomarcador de hiperactividade vesical idiopática, ao contrário do que foi recentemente descrito por um trabalho que estudou diferentes tipos da patologia de BH de etiologia específica (e.g. bexiga neurogénica, cistite intersticial).^{13, 14} Não obstante, os resultados obtidos devem ser interpretados com alguma cautela atendendo à grande dispersão dos valores determinados, que podem ser atribuídos a dificuldades técnicas havidas na utilização do *kit* de doseamento do NGF na fase inicial do ensaio.

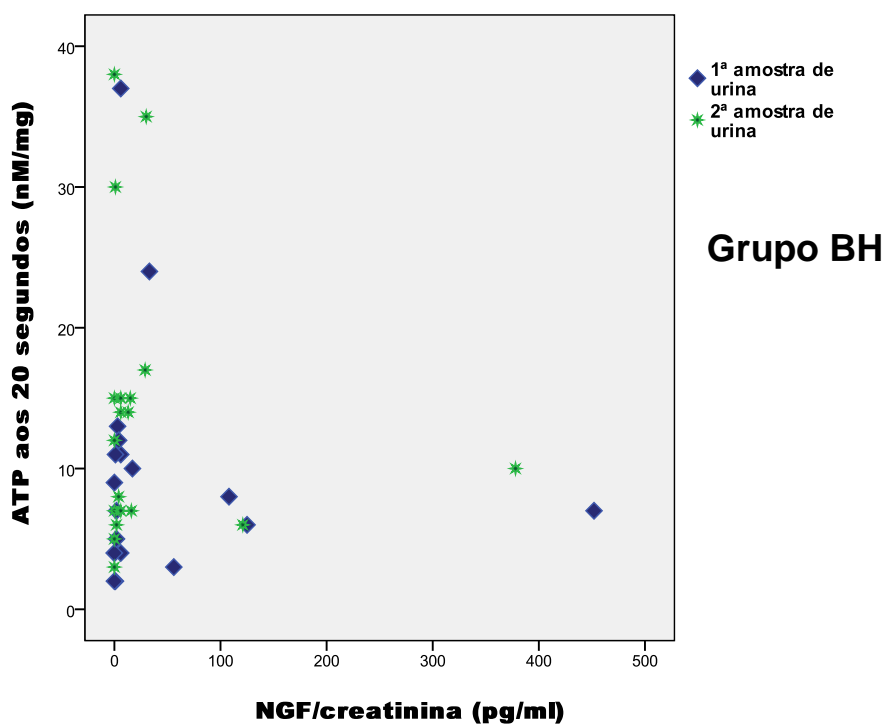
Figura 3 – Comparação nas duas amostras de urina dos teores de NGF urinários corrigidos para os valores da creatinina



Os resultados obtidos quer para os valores brutos de NGF, quer para quando estes valores são corrigidos com os valores de creatinina não são muito conclusivos, como já anteriormente foi dito. No entanto, tentou-se perceber se haveria alguma correlação dos níveis de NGF, com os níveis de ATP determinados nas mesmas amostras de urina, figura 4.

Figura 4 – Ausência de correlação entre os níveis de ATP e NGF nas duas amostras de urina





CONCLUSÕES

Apesar dos resultados apresentados reflectirem o que se passa numa amostra preliminar restrita, que está englobada num estudo de maior dimensão, é possível prever que o doseamento de ATP urinário se venha a tornar um marcador biológico muito útil na identificação e seguimento de doentes com hiperactividade vesical idiopática. A facilidade de colheita e doseamento do ATP urinário, aliada à elevada sensibilidade e especificidade metodológica determinada nesta amostragem (AUC: 83,2%, Intervalo de confiança 95%: 69,7-96,7) constituem as suas principais vantagens, comparativamente com outros marcadores biológicos propostos (e.g. NGF) e com os métodos urodinâmicos invasivos. Contudo, o doseamento do ATP urinário pode ser influenciado por infecções da bexiga e por situações de insuficiência renal, cuja análise foi excluída do presente trabalho através dos critérios de selecção clínica dos doentes.

Perante os resultados apresentados e os dados disponíveis na literatura, antevê-se que o aumento da amostragem possa contribuir decisivamente para colocar o doseamento de ATP urinário como um marcador biológico determinante na avaliação dos doentes com síndromes de hiperactividade da bexiga. No futuro, seria muito útil investigar se os níveis deste marcador se relacionam ou não com a severidade sintomatológica observada, no sentido de obter uma escala objectiva de estadiamento dos doentes.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado com recurso a fundos disponibilizados pela Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB-215, unidades de I&D da FCT) e pelo ICBAS / Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica - Roche Farmacêutica no âmbito da Disciplina de Iniciação à Investigação Científica do Mestrado Integrado em Medicina.

BIBLIOGRAFIA

1. Andersson KE (2002) Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology*. 59, 43-50
2. Bielefeldt K, Lamb K, Gebhart GF. Convergence of sensory pathways in the development of somatic and visceral hypersensitivity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G658–G665, 2006
3. Brown JS, McGhan WF, Chokroverty AS. Comorbidities associated with overactive bladder. *Am J Managed Care* 2001; 6 (Suppl): S574-S579.
4. Charrua A, Cruz CD, Narayanan S, Gharat L, Gullapalli S, Cruz F, Avelino A (2009) GRC-6211, a new oral specific TRPV1 antagonist, decreases bladder overactivity and noxious bladder input in cystitis animal models. *J Urol* 181:379–386
5. Clemow DB, Spitsbergen JM, McCarty R, Steers WD, Tuttle JB: Altered NGF regulation may link a genetic predisposition for hypertension with hyperactive voiding. *J Urol* 1999, 161(4):1372-1377.
6. Debra E. Irwin, Ian Milsom, Steiner Hunskar, Kate Reilly, et al. Population-Based Survey of Urinary Incontinence, Overactive Bladder, and other Lower Urinary Tract Symptoms in Five Countries: Results of the EPIC Study. *European Urology* 50 (2006); 1306-1315
7. Diokno AC. Epidemiology and psychosocial aspects of incontinence. *Urol Clin North Am* 1995; 22:481-485.
8. Ferguson DR, Ian Kennedy and Burton TJ. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes – a possible sensory mechanism? *Journal of Physiology*, 1997; 505.2, pp 503-511.
9. Guerios SD, Wang ZY, Boldon K, Bushman W, Bjorling DE. Blockade of NGF and trk receptors inhibits increased peripheral mechanical sensitivity accompanying cystitis in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
10. Hampel C, Wienhold D, Benken n, Eggersmann C, Thuroff JW. Definition of overactive bladder and epidemiology of incontinence. *Urology* 1997; 50(Suppl6A):4-14
11. Jackson S. the patient with an overactive bladder – Symptoms and quality-of-life issues. *Urology* 1997; 50:18-22, 1997
12. Liang R, Ustinova EE, Patnam R, Fraser MO, Gutkin DW, Pezzone MA. Enhanced expression of mast cell growth factor and mast cell activation in the bladder following the resolution of trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) colitis in female rats. *Neurourol Urodyn* 26: 887–893, 2007.
13. Liu HT, Chancellor MB, Kuo HC. Urinary Nerve Growth Factor Levels are elevated in Patients with Detrusor Overactivity and Decreased in Responders to Detrusor Botulinum Toxin-A Injection. *Eur Urol*. 2008 [Epub ahead of print]
14. Liu HT, Kuo HC. Urinary Nerve Growth Factor Levels are increased in Patients with Bladder Outlet Obstruction with Overactive Bladder Symptoms and Reduced after Successful Medical Treatment. *Urology* 2008; 72:104-108.
15. Milson I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thüroff J, Wein AJ. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU International* 2001; 87:760-766.

16. Milson I, Stewart W, Thuroff J. Prevalence of overactive bladder. *Am J Managed Care* 2000; 6(Suppl):S565-S573
17. Pandita RK, Andersson KE. Intravesical ATP stimulates the micturition reflex in awake, freely moving rats. *J. Urol.* 2002; 168: 120-1234.
18. Peter Zvara and Margaret A Vizzard. Exogenous overexpression of nerve growth factor in the urinary bladder produces bladder overactivity and altered micturition circuitry in the lumbosacral spinal cord. *BMC Physiology* 2007, 7:9
19. Steers WD, S Kolbeck S, Creedon D, Tuttle JB. Nerve growth factor in the urinary bladder of the adult regulates neuronal form and function. *J Clin Invest.* 1991; 88:1709-1715.
20. Sugaya K et al. *Neuroscience letters* 2007; 429:142-146.
21. Sun Y, Keay S, De Deyne PG and Chai TC (2001) Augmented stretch activated adenosine triphosphate release from bladder uroepithelial cells in patients with interstitial cystitis. *J Urol* 166, 1951-1956
22. Vivek Kumar, Christopher R. Chapple, Derek Rosario, Paul R. Tophill, Russell Chess-Williams. In Vitro Release of Adenosine Triphosphate from the Urothelium of Human Bladders with Detrusor Overactivity, Both Neurogenic and Idiopathic *European Urology*, Volume 57, Issue 6, June 2010, Pages 1087-1092
23. Vizi ES, Liang SD, Sperl agh B, Kittel A and Jur anyi Z (1997) Studies on the release and extracellular metabolism of endogenous ATP in rat superior cervical ganglion: support for neurotransmitter role of ATP. *Neuroscience* 79, 893-903.
24. Vlaskovska M, Kasakov I, Rong W, et al. P2X3 knock-out mice reveal a major sensory role for urothelially released ATP. *J Neuroscience* 2001; 21:5670-7.
25. Y. Uehara, M. Yanai, K. Kumasaka. Evaluation of renal damage using urinary ATP analysis, *Nippon Jinzo Gakki Shi* 46 (2004) 693-699.
26. Yan Sun and Toby C. Chai. Augmented extracellular ATP signalling in bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290:C27-C34
27. Ying Cheng, Kylie J. Mansfield, Wendy Allen, Colin A. Walsh, Elizabeth Burcher and Kate H. Moore. Does Adenosine Triphosphate Released into Voided Urodynamic Fluid Contribute to Urgency Signaling in Women with Bladder Dysfunction?. *The Journal of Urology* Vol. 183, 1082-1086, March 2010.
28. Yoshimura N, Bennett NE, Hayashi Y, Ogawa T, Nishizawa O, Chancellor MB, de Groat WC, Seki S. Bladder overactivity and hyperexcitability of bladder afferent neurons after intrathecal delivery of nerve growth factor in rats. *J Neurosci* 26: 10847–10855, 2006.
29. Zvara P, Vizzard MA. Exogenous overexpression of nerve growth factor in the urinary bladder produces bladder overactivity and altered micturition circuitry in the lumbosacral spinal cord. *BMC Physiology* 2007; 7:9.



ANEXO I

PROPOSTA DE PROJECTO

Trabalho Académico de Investigação

ATP e Neurotrofinas Urinárias como marcadores biológicos da bexiga hiperactiva

Área de Investigação: Disfunções Miccionais

Curso de Mestrado Integrado em Medicina

ICBAS/UP – HSA/CHP

Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC)

Responsável: Prof. Doutora Margarida Lima

Aluna: **OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA**

Orientador: Dr. Miguel Silva Ramos

Co-Orientador: Professor Doutor Paulo Correia de Sá

Ano Lectivo: 2008 / 2010

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar / UP e Hospital de Santo António / CHP

Aluna: Olga Oliveira

Ano lectivo: 2009/2010

ÍNDICE:

FOLHA DE ROSTO DO ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO	33
TÍTULO DO PROJECTO	33
INSTITUIÇÕES, DEPARTAMENTOS E SERVIÇOS INTERVENIENTES.....	33
EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO.....	33
DESENHO DO ESTUDO	34
CALENDARIZAÇÃO	35
A) PLANO CIENTÍFICO.....	36
INTRODUÇÃO.....	36
2. OBJECTIVOS.....	40
3. PLANO DE TRABALHO	40
4. RESULTADOS ESPERADOS	44
5. INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA	44
PEDIDOS DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL	50
HSA / CHP.....	50
ICBAS / UP.....	51
PEDIDO DE FINANCIAMENTO.....	51
Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica	51
TERMOS DE RESPONSABILIDADE.....	52
Investigadores	52
DECLARAÇÕES.....	53
Aluno	53
Orientadores / Supervisores	53
TERMOS DE AUTORIZAÇÃO LOCAL	54
Serviços.....	54
Departamentos	54
BIBLIOGRAFIA.....	55



TP E NEUROTROFINAS URINÁRIAS COMO MARCADORES BIOLÓGICOS DA BEXIGA HIPERACTIVA

INVESTIGADORES**Aluno****Olga Maria dos Santos Oliveira**

Aluna do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP

E-mail: oliveira.olga@gmail.com

Telemóvel: 93 613 53 12

Orientador**Miguel Silva Ramos**

Médico, Assistente hospitalar de Urologia HSA/CHP; Investigador da UMIB, Assistente da disciplina de Urologia do ICBAS/UP.

E-mail: miguel.silva_ramos@sapo.pt

Telemóvel: 96 909 00 89

Co-Orientador**Paulo Correia de Sá**

Professor e Investigador do ICBAS/UP, Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia, ICBAS/UP

E-mail: farmacol@icbas.up.pt

Telemóvel: 93 426 09 77

Supervisor / Responsável pela Disciplina**Margarida Lima**

Médica, Assistente Hospitalar de Imunohemoterapia, Assistente Hospitalar Graduada, Serviço de Hematologia Clínica, CHP/HSA; Directora do DEFI, CHP; Professora Responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Científica (DIIC).

E-mail: mmc.lima@clix.pt

TM: 96 632 71 15

Outros Investigadores**José Carlos Oliveira**

Médico, Assistente Hospitalar de Patologia Clínica, Chefe de Serviço, Director do Serviço de Química Clínica, CHP/HSA.

SERVIÇOS DO CHP ONDE O ESTUDO VAI SER REALIZADO

Serviço de Urologia do HSA/CHP.

Serviço de Química Clínica do HSA/CHP.

INSTITUIÇÕES INTERVENIENTES, ALÉM DO CHP

ICBAS/UP.

DATA LIMITE: Início em Setembro de 2008.

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 Institucional X

Quanto às características do estudo

Prospectivo X Transversal X

Observacional X Analítico X

Quanto à natureza do estudo

Clínico X Laboratorial X

Quanto à existência de grupo controlo

Controlado X

Quanto à selecção dos indivíduos

Não aleatória X

Quanto ao conhecimento

Aberto (não cego) X

Quanto à fase do estudo (se Ensaio Clínico)

Não aplicável X

Outros aspectos

Saída amostras p/ instituições privadas Não

Consentimento informado escrito Sim

Realização de estudos genéticos Não

Realização de inquéritos Não

Recolha de dados clínicos Sim

DATAS previstas

Início: Setembro de 2008.

Conclusão: Junho de 2009.

INDICADORES de avaliação

Relatório final.

Organização do Congresso de Iniciação à Investigação Clínica.

Apresentação do trabalho no Congresso a organizar pelos alunos da DIIC e em Congresso da Especialidade.

ORÇAMENTO do estudo

Total: 7500,00 Euros

HGSA: 4500,00 Euros

ICBAS: 2700,00 Euros

Outros: 300,00 Euros

FINANCIAMENTO do estudo

Interno: Não.

Externo: Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica / Roche Farmacêutica.

TÍTULO DO PROJECTO

ATP E NEUROTROFINAS URINÁRIAS COMO MARCADORES BIOLÓGICOS DA BEXIGA HIPERACTIVA

INSTITUIÇÕES, DEPARTAMENTOS E SERVIÇOS INTERVENIENTES

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

- Departamento de Cirurgia, Serviço de Urologia
- Departamento de Patologia Laboratorial, Serviço de Química Clínica
- Departamento de Ensino, Formação e Investigação (DEFI), Ensino Médico Pré-Graduado, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica

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

- Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia, Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia

EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO

Constituição

Aluna

- Olga Maria dos Santos Oliveira: Aluna do Mestrado Integrado em Medicina, ICBAS/UP e HSA/CHP, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

Orientadores

- Dr. Miguel Silva-Ramos: Médico, Assistente Hospitalar de Urologia HSA/CHP; Investigador da UMIB, Assistente da disciplina de Urologia do ICBAS/UP.
- Prof. Doutor Paulo Correia-de-Sá: Professor e Investigador do ICBAS/UP; Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia, Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia, ICBAS/UP.

Supervisores

- Prof. Doutora Margarida Lima: Médica, Assistente Hospitalar Graduada 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 (DIIC).

Outros Investigadores

- Dr. José Carlos Oliveira, Médico, Assistente em Patologia Clínica e Investigadora do Serviço de Química Clínica do HSA/CHP; Director do Serviço de Química Clínica do HSA/CHP.

Técnicos de investigação

- Técnica Júlia Reis, Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública, Técnica de Diagnóstico e Terapêutica do Serviço de Química Clínica do HSA/CHP.
- Técnica Madalena Cruz, Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública, Técnica de Diagnóstico e Terapêutica do Serviço de Química Clínica do HSA/CHP.

Funções e Responsabilidades dos Investigadores

- Olga Oliveira: Aluna responsável pela concepção orientada do trabalho, recolha e tratamento dos dados e elaboração do respectivo relatório.
- Dr. Miguel Silva-Ramos: responsável pela orientação do trabalho, nomeadamente no que respeita à sua vertente clínica e a todos os procedimentos realizados no CHP.
- Prof. Doutor Paulo Correia-de-Sá: responsável pela co-orientação do trabalho, nomeadamente no que respeita aos estudos de investigação efectuados no ICBAS/UP.
- Prof. Doutora Margarida Lima: responsável pela supervisão global do trabalho e pelo seu enquadramento na Disciplina de Iniciação à Investigação Científica.
- Dr. José Carlos Oliveira, responsável pela validação das análises efectuadas no HSA/CHP e pela articulação com o ICBAS/UP (recepção, processamento e envio dos produtos biológicos).
- Técnicas Júlia Reis e Madalena Cruz: responsáveis pela realização das análises efectuadas no Serviço de Química Clínica do HSA/CHP.

Tempo afecto ao Projecto

Total: 5,20 pessoas*mês

- Olga Oliveira: 2,0 pessoas*mês (20% do tempo completo semanal durante 10 meses)
- Dr. Miguel Silva-Ramos: 1,5 pessoas*mês (15% do tempo completo semanal durante 10 meses)
- Prof. Doutor Paulo Correia-de-Sá: 1,0 pessoas*mês (10% do tempo completo semanal durante 10 meses)
- Prof. Doutora Margarida Lima: 0,25 pessoas*mês (2.5% do tempo completo semanal durante 10 meses)
- Dr. José Carlos Oliveira: 0,25 pessoas*mês (2,5% do tempo completo semanal durante 10 meses)
- Técn. Júlia Reis: 0,10 pessoas*mês (1,0% do tempo completo semanal durante 10 meses).
- Técn. Madalena Cruz: 0,10 pessoas*mês (1,0% do tempo completo semanal durante 10 meses).

DESENHO DO ESTUDO

- Estudo nacional, institucional, observacional, analítico, transversal, de tipo “coorte”, clínico e laboratorial, feito em seres humanos.

CALENDARIZAÇÃO

Duração

- 22 meses

Datas de início e conclusão

- Setembro de 2008 a Junho de 2010.

Cronograma de execução

- Setembro de 2008: Preparação para o início do Estudo (apresentação do Estudo em Reunião do Serviço de Urologia; implementação dos procedimentos na Consulta de Urologia).
- Outubro de 2009 – Fevereiro de 2010: Execução do Estudo.
- Março – Abril de 2010: Recolha e tratamento de dados.
- Maio de 2010: Elaboração do Relatório do Estudo e de Trabalho para apresentação.
- Junho de 2009 e Junho 2010: Apresentação do trabalho em Congresso de Iniciação à Investigação Clínica, a organizar pelos alunos da DIIC.

A) PLANO CIENTÍFICO

INTRODUÇÃO

O Síndrome de Bexiga Hiperactiva (SBH) é definida pela International Continence Society como um quadro clínico caracterizado por imperiosidade miccional, isto é, uma vontade forte, desconfortável e súbita de urina, associada frequentemente a incontinência, noctúria e polquiúria, na ausência de factores locais, infecciosos ou metabólicos. É habitualmente causada por hiperactividade do detrusor, isto é, por contracções involuntárias do músculo detrusor durante a fase de armazenamento do ciclo miccional.

SINTOMAS

Clinicamente, a bexiga hiperactiva pode apresentar-se como:

- **Imperiosidade ou urgência miccional** – sentir frequentemente um desejo súbito, intenso e imprevisível de urinar.
- **Aumento de frequência** – mais de oito micções em um período de 24 horas. Os indivíduos podem aumentar a frequência de micções como tentativa de reduzir a pressão da bexiga e evitar episódios de incontinência. Pode incluir **noctúria**: levantar-se duas ou mais vezes durante a noite para urinar.
- **Incontinência por imperiosidade** – episódios de perda involuntária de urina associados com desejo súbito e intenso de urinar.

Estes três sintomas podem aparecer isolados ou em associação, ou seja, o doente pode apresentar somente um e/ou mais sintomas para ter bexiga hiperactiva.¹⁰ Para evitar a perda de grandes volumes de urina, os indivíduos com bexiga hiperactiva tendem a urinar frequentemente, para manterem um volume relativamente baixo de urina na bexiga. No entanto, apesar deste mecanismo adaptativo, a incontinência continua a ser um problema incómodo e limitante para estas pessoas.

PREVALÊNCIA

Há poucos estudos baseados em populações que avaliam a prevalência de Bexiga Hiperactiva. As estimativas da prevalência oscilam bastante de acordo com o estudo ou pesquisa avaliada, variando de 3% a 43% da população, dependendo da faixa etária avaliada. O estudo feito por na América do Norte estimou a prevalência Bexiga Hiperactiva em adultos ≥ 18 anos de 16% em homens e 16,9% em mulheres.^{15, 16} Na Europa, estimaram a prevalência em adultos ≥ 40 anos de 15,6% para homens e 17,4% em mulheres.^{15, 16} No estudo internacional feito por estimaram a prevalência em adultos ≥ 18 anos sendo 11,8%, sendo 10,8% em homens e 12,8% em mulheres.⁶ A prevalência da Bexiga Hiperactiva aumenta com o avanço da idade, em todos os estudos confirmaram que as mulheres têm maior prevalência de sintomas de Bexiga Hiperactiva comparada com os homens antes dos 60 anos de idade, enquanto os homens têm maior prevalência após os 60 anos de idade.¹¹ Em relação à frequência dos sintomas, geralmente, tanto a frequência quanto a imperiosidade são sintomas muito mais presentes que a incontinência por imperiosidade, especialmente entre as idades de 35 a 55 anos. Mais pessoas são afectadas por sintomas de bexiga hiperactiva do que por doença de Alzheimer ou osteoporose.^{7, 11, 16}

REPERCUSSÕES SOCIAIS

A bexiga hiperactiva é um problema social, generalizado e preocupante, que pode afectar qualquer indivíduo em qualquer idade e compromete a qualidade de vida, sendo causa de isolamento social, frustração e ansiedade. Há estudos que referirem que a depressão é mais comum em doentes com incontinência por imperiosidade (60%) em comparação àquelas com incontinência urinária mista (42%) ou incontinência urinária de esforço (14%) e outros estudos ressaltam que mesmo as doentes com Bexiga Hiperactiva sem perda urinária têm a qualidade de vida bastante comprometida.^{13, 15, 16}

FISIOPATOLOGIA

A bexiga desempenha duas funções primordiais, o armazenamento e a expulsão periódica da urina. A execução destas funções é regulada por mecanismos miogénicos e neurológicos complexos. A micção envolve córtex do cérebro, núcleos da base do cérebro, substância reticular ponto-mesencefálica, sistema límbico, hipotálamo, cerebelo, a medula espinal; inervação sensorial aferente e os componentes anatómicos de tracto urinário inferior. Qualquer perturbação nestas estruturas pode contribuir para os sintomas de bexiga hiperactiva.

Os neurónios motores da bexiga e da uretra estão localizados no no segmento sagrado da medula espinal (S2-S4) e são coordenados pelo centro pontino da micção e pelos núcleos da base do cérebro. O cérebro recebe informações sensoriais da bexiga e do soalho pélvico, sendo importante na manutenção do tónus do soalho pélvico e na coordenação entre contracção do detrusor e relaxamento do esfíncter. O cerebelo participa, também, activamente da coordenação dos vários músculos envolvidos no acto da micção.

A musculatura lisa da bexiga, a região uretro-trigonal, e a uretra proximal são inervadas por fibras do plexo-pélvico que está localizado profundamente na cavidade pélvica e é composto por fibras mescladas dos nervos pélvicos (parassimpático) e dos nervos hipogástricos (simpático). As fibras parassimpáticas originam-se na substância cinzenta da medula sagrada (S2-S4), possuem vários gânglios próximos a bexiga e fibras pós-ganglionares curtas. Já os nervos hipogástricos (enervação simpática) tem origem na região lateral da substancia cinzenta da medula entre T10 e L2. O nervo pudendo, que inerva o esfíncter uretral externo, tem sua origem no núcleo de Onuf, no corno ventral do segmento sacral da medula S2-S4. Todo controle somático (motor) dependente da vontade é exercido pelo nervo pudendo.

Na fase de enchimento vesical, a continência é mantida pela acomodação vesical associada à total inibição dos impulsos eferentes parassimpáticos e activação dos eferentes simpáticos e somáticos. O córtex cerebral envia impulsos descendentes inibitórios para o centro pontino e para o nervo pélvico (parassimpático) relaxando o detrusor e impulsos excitatórios para o nervo hipogástrico (simpático) e nervo pudendo aumentando a resistência uretral. Os impulsos aferentes vesicais activam, também, os motoneurónios do núcleo de Onuf, aumentando a actividade tónica do esfíncter uretral e, por conseguinte, a resistência da uretra.

Na micção voluntária há diminuição da actividade dos músculos do soalho pélvico e da pressão uretral, que precedem a contracção do detrusor. Esta coordenação é regulada pelo sistema nervoso, através do reflexo miccional espinobulboespinal. Ocorre a liberação do centro pontino, que envia impulsos para a medula sagrada, activando neurónios parassimpáticos desencadeando, assim, a contracção do detrusor. Simultaneamente impulsos da ponte inibem motoneurónios pudendos (núcleos de Onuf) que enervam o esfíncter uretral estriado, relaxando-o. Iniciada a contracção do detrusor, a descarga aferente gerada pela tensão na parede vesical reforça o reflexo miccional. O fluxo de urina pela uretra facilita o esvaziamento, pois também estimula a contracção do detrusor. Quando a micção está chegando ao fim, o soalho pélvico contrai-se, eleva o colo vesical, que se fecha e a pressão do detrusor diminui.

Os impulsos aferentes são essenciais para o controlo da micção. Alterações nesta actividade aferente estão implicadas na etiologia da bexiga hiperactiva. Os impulsos aferentes provenientes da bexiga são conduzidos predominantemente por fibras pequenas e mielinizadas do tipo A δ , que são sensíveis à distensão e/ou à contracção vesical. As fibras aferentes do tipo C, localizadas principalmente na região sub-urotelial, não são mielinizadas, são menos sensíveis a estímulos mecânicos e são essencialmente activadas por estímulos químicos, irritativos e térmicos. São relativamente pouco activas na micção normal, mas têm um papel muito importante na génese dos sintomas da bexiga hiperactiva. Vários tipos de receptores foram identificados nestes nervos, como receptores vanilóides, purinérgicos, das neurokininas e receptores do NGF (trk-A). Vários estudos mostram um aumento da activação destes receptores em bexigas hiperactivas, aumentando o sinal aferente ao SNC que pode condicionar um reflexo miccional mais precoce e menos controlado.

Factor de crescimento neuronal (NGF)

O **factor de crescimento neuronal (NGF)** é uma pequena proteína essencial para a sobrevivência e diferenciação neuronal, em particular dos neurónios simpáticos e dos neurónios sensitivos. Após a sua secreção, liga-se e activa receptores presentes nas células neuronais, após o que é internalizado. São conhecidos dois receptores para o NGF: o TrkA (pronuncia-se "Track A"), que é um receptor da cinase da tirosina, de elevada afinidade, e o LNGFR ("Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor").

No trato urinário, o NGF é produzido no urotélio e no músculo liso, e parece ter um papel muito importante como factor neurotrófico essencial na manutenção das fibras sensitivas envolvidas na nocicepção. Tem também sido verificado que as bexigas hipertrofiadas de ratos e humanas têm uma quantidade significativamente maior de NGF por mg de tecido do que as bexigas normais¹⁹ e que a sobreexpressão de NGF na bexiga está associada a hiperactividade do detrusor e alterações miccionais em ratos²⁹.

Estudos clínicos e experimentais têm detectado níveis aumentados de NGF no urotélio e na urina, em condições inflamatórias do aparelho urinário baixo, tais como na cistite intersticial e a prostatite crónica. A descoberta de que a instilação intra-vesical de NGF pode induzir hiperactividade da bexiga em ratos sugere que NGF possa sensibilizar as fibras aferentes na ausência de inflamação. A instilação intra-vesical de k252a, um inibidor da actividade da cinase da tirosina, ou de anti-soros neutralizantes do NGF, atenua a hiperalgesia associada à cistite induzida em ratos.⁹ Por outro lado, a injeção intravesical de toxina botulínica, um inibidor potente da libertação de acetilcolina pelos terminais nervosos motores utilizado para tratar a espasticidade muscular, reduz o conteúdo vesical e urinário de NGF em doentes com hiperactividade do músculo detrusor.^{13, 14}

Níveis aumentados de NGF também têm sido observados no urotélio e na urina em doentes com hiperalgesia urinária e hiperactividade do detrusor. Há possibilidade que NGF seja responsável pelo aumento de sensibilidade da bexiga e da hiperactividade do detrusor, por mecanismos ainda não conhecidos. Existem algumas evidências de que este neuromodulador pode constituir um alvo preferencial para o diagnóstico e monitorização da progressão de disfunção do tracto urinário inferior.

Trifosfato de Adenosina (ATP)

O urotélio não é só uma barreira para substâncias tóxicas na urina, mas também é um tecido metabolicamente muito activo, capaz de produzir e libertar ATP e outros mediadores celulares (e.g. acetilcolina, prostanóides). O ATP é uma molécula multifuncional que actua não só ao nível intra-celular como fonte de energia, mas também ao nível extra-celular, como um neurotransmissor importante que regula os processos celulares diversos que incluem a transmissão, nocicepção, o transporte de iões, a apoptose, a secreção e a contracção muscular, por exemplo na bexiga. É abundante no citoplasma das células e pode ser libertado para o meio extracelular por diversos mecanismos que incluem o exocitose de vesículas que contêm ATP, mas também processos não exocitóticos como os hemicanais, as bombas de efluxo ABC, canais iónicos (P2X₇), entre outros. No meio extracelular o ATP pode activar receptores purinérgicos de membrana da classe P2, que incluem os 8 subtipos de receptores metabotrópicos (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄) e 7 subtipos de receptores ionotrópicos P2X (P2X₁₋₇).

Vários estudos reconhecem que a estimulação mecânica pode causar a libertação de ATP a partir de células epiteliais. Quando estas células são estimuladas pode ocorrer a libertação de acetilcolina e ATP; a acetilcolina aumenta a produção de ATP induzindo hiperactividade da bexiga.²⁰ A função do ATP no urotélio ainda não é completamente conhecida, apesar de já ter sido demonstrado que o nucleótido é capaz de estimular a sua própria libertação a partir dos reservatórios intracelulares.²⁶

A sinalização purinérgica pode desempenhar um papel importante na regulação da actividade da bexiga. A actividade da bexiga humana normal deve-se quase exclusivamente à activação de receptores muscarínicos M₂ e M₃ pela acetilcolina libertada por células neuronais e não-neuronais. No entanto, durante o envelhecimento e em situações patológicas da bexiga (e.g. síndromes obstrutivos, cistite intersticial) a

contração do detrusor pode depender (~50%) activação de receptores purinérgicos pelo ATP libertado. Existem receptores P2X₁ no músculo liso do detrusor através dos quais o ATP pode regular a contractilidade da bexiga. A sensibilidade da fase de armazenamento parece dever-se à activação de receptores P2X₃ localizados nos nervos aferentes pélvicos suburotelias e na medula espinhal. Assim o urotélio liberta ATP em resposta a estimulação mecânica da repleção vesical, que estimula receptores P2X₃ nas terminações aferentes suburoteliais, sinalizando o enchimento da bexiga.⁸ O urotélio de determinadas espécies animais expressa múltiplos subtipos de receptores purinérgicos, incluindo todos os subtipos de receptores ionotrópicos P2X, bem como os receptores metabotrópicos sensíveis aos nucleótidos, P2Y₁, P2Y₂ e P2Y₄, e à adenosina, A₁, A_{2A} and A₃. Consequentemente, as purinas parecem exercer uma actividade autócrina/parácrina regulando a via mecanosensitiva aferente da bexiga.

Estudos preliminares realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP detectaram níveis elevados de ATP em amostras de bexigas humanas colhidas de doentes com obstrução infra-vesical. A elevação dos níveis de ATP libertado correlacionam-se com aumentos da regulação purinérgica da contração do detrusor e da libertação de acetilcolina induzida por estimulação eléctrica (resultados não publicados).

Neste contexto, o objectivo do presente estudo foi o de avaliar se os doentes portadores de bexiga hiperactiva (BH) ideopática possuíam maior concentração urinária de ATP e de NGF relativamente a uma população controlo e qual seria o valor predictivo destes mediadores como marcadores biológicos não invasivos no diagnóstico e seguimento da hiperactividade vesical nos doentes.

2. OBJECTIVOS

Este estudo pretende avaliar se os doentes com Bexiga Hiperactiva tem maior concentração urinária de ATP e de NGF relativamente à população controlo e se estes mediadores podem funcionar com marcadores para o diagnóstico de bexiga hiperactiva.

3. PLANO DE TRABALHO

População e Amostra

População: Doentes do sexo feminino observados na Consulta de Urologia do HSA/CHP.

Amostra: 50 doentes do sexo feminino, divididas em 2 grupos:

- 1º → 25 Indivíduos com Bexiga Hiperactiva com músculo detrusor hiperactivo;
- 2º → 25 Indivíduos sem sintomas de Bexiga Hiperactiva comprovada.

Critérios de inclusão

Doentes do sexo feminino com idade ≥ 18 anos e com Síndrome de Bexiga Hiperactiva, da Consulta de Urologia do HSA/CHP, capazes de compreenderem a informação dada e tendo assinado e datado o Termo de Consentimento Informado, de forma livre e esclarecida.

- Doente com diagnóstico de Bexiga Hiperactiva, com ou sem Incontinência de esforço durante pelo menos 6 meses antes da Visita 1.
- Hiperactividade do detrusor confirmado por exame Urodinâmico efectuado 3 meses antes da Visita 1, de acordo com as orientações da ICS: hiperactividade do detrusor definida como contracções involuntárias e espontâneas do detrusor durante a fase de enchimento.
- Diário miccional de 3 dias consecutivos entre as Visitas 1 e 2, e cada doente deve apresentar, em média entre todos os dias documentados:
 - Pelo menos 8 micções por dia e
 - Pelo menos um episódio de imperiosidade por dia e
 - Capacidade vesical funcional ≤ 300 ml.
- Depuração de creatinina < 71 ml/min/1,73m², na urina de 24 hrs que será realizada entre Visita 1 e 2

Critérios de exclusão

Medicação concomitante

- Tratamento com fármacos que afectam a função da bexiga (ex. anticolinérgicos, anti-espasmódicos, inibidores da recaptção da serotonina-noradrenalina) nos 14 dias que precedem a Visita 2;
- Tratamento com toxina botulínica, capsaïcina ou resiniferatoxina nos 6 meses que precedem a Visita 1 ou em qualquer outra altura durante o estudo;
- Utilização de agonistas colinérgicos e de inibidores da colinesterase, por ex. betanecol, donepezil, rivastigmina;

- Doentes que estejam a tomar dadores de nitratos ou de óxido nítrico;
- Utilização de inibidores da PDE5 nos 7 dias que precedem a Visita 1 ou em qualquer outra altura durante o estudo.

Historia clínica anterior ou actual – tracto urinário

- Insuficiência renal;
- Infecções urinárias;
- História de refluxo vesico-uretral secundário;
- Patologia local crónica, persistente, que na opinião do Investigador pode levar a sintomas urinários, tais como um dos síndromas de dor genito-urinária, cistite intersticial;
- Macro e micro-hematúria inexplicável, conforme determinado pelo investigador;
- História de qualquer carcinoma do tracto urogenital;
- Retenção urinária ou obstrução clinicamente significativa do orifício de saída da bexiga, conforme determinado pelo investigador;
- Qualquer cirurgia urogenital (incluindo termoterapia, terapêutica por ultra-sons ou por laser, histerectomia, cirurgia para a incontinência) nos 12 meses que precedem a Visita 1 ou em qualquer outra altura durante o estudo;
- Instrumentação do tracto urinário inferior (incluindo cistoscopia, urodinâmica) nos 14 dias que precedem a Visita 1 ou em qualquer outra altura durante o estudo;
- Biopsia à bexiga nos 30 dias que precedem a Visita 1 ou em qualquer outra altura durante o estudo;
- Qualquer história de radioterapia pélvica;
- Cateter permanente.

História clínica anterior ou actual – gerais

- Qualquer distúrbio clínico, psiquiátrico ou de abuso de substâncias que, na opinião do Investigador, possa afectar a capacidade do doente para completar o estudo ou impossibilitar a participação do doente no estudo;
- História de malignidade em qualquer sistema de órgãos, tratada ou não, nos últimos 5 anos, independente de haver evidência de recorrência local ou metastases;
- Distúrbio hemorrágico;
- Diabetes.

Outros critérios de exclusão

- Mulheres grávidas em período de amamentação;
- Participação num programa de controlo da bexiga ou qualquer terapêutica de electro-estimulação nas 2 semanas que precedem a Visita 1 ou em qualquer outra altura durante o estudo;

- Doentes que receberam qualquer fármacos experimental (incluindo placebo) nos 30 dias que precedem a Visita 1 ou em qualquer outra altura durante o estudo;
- Doentes que, na opinião do Investigador, não iriam aderir ao esquema de procedimentos de estudo;
- Doentes que não estejam dispostos ou que sejam incapazes de completar independentemente o diário de micção ou os questionários;
- Doentes iletrados ou que sejam incapazes de compreender o diário de micção ou os questionários.

Procedimentos

T0 – Pré-Screening

- Consultando os processos dos doentes observados na Consulta de Urologia do HSA/CHP, será feita uma pré-selecção de indivíduos (doentes do sexo feminino), de acordo com os critérios de inclusão e exclusão no estudo, com um Exame Urodinâmico de acordo com as orientações da ICS: hiperactividade do detrusor definida como contracções involuntários e espontâneas do detrusor durante a fase de enchimento.
- As doentes serão divididas em 2 grupos:
 - 1º grupo: com detrusor hiperactivo e
 - 2º grupo: sem Bexiga Hiperactiva comprovada.
- As doentes que preencherem critérios para inclusão no estudo serão convocadas para a Visita 1 através de carta.

T1 - Visita 1

- As Doentes serão informadas sobre a natureza da investigação e os seus riscos e benefícios, ser-lhes-há fornecido um Documento com Informação sobre o Estudo e será solicitada a sua participação no Estudo de Investigação.
- Às Doentes que concordarem em participar no estudo, será pedido que assinem o Termo de Consentimento Informado.
- Será pedido às Doentes que façam um diário de micção de 3 dias consecutivos entre as Visitas 1 e 2. Cada doente deve apresentar, em média entre todos os dias documentados:
 - Pelo menos 8 micções por dia e
 - Pelo menos um episódio de imperiosidade por dia e
 - Capacidade vesical funcional ≤ 300 ml.
- Será programada uma colheita de urina de 24hrs e de uma amostra de sangue para doseamento as seguintes análises (a realizar no Laboratório de bioquímica do HGSA/CHP).
 - Urina: Creatinina; depuração creatinina; pH; Ionograma (Na^{2+} ; K^+ ; Ca^{2+});
 - Sangue: Creatinina; Ionograma (Na^{2+} ; K^+ ; Ca^{2+}).
 - Serão excluídos os doentes com depuração de creatinina < 71 ml/min/1,73m²

- Será agendada a Visita 2

Deslocação do doente ao hospital

- Entrega de uma colheita de urina de 24hrs e de será recolhida uma amostra de sangue para doseamento as seguintes análises (a realizar no Laboratório de bioquímica do HGSA/CHP).

T2 - Visita 2

- Avaliação do diário miccional e dos resultados analíticos e verificação dos critérios de inclusão.
- Após confirmação dos critérios de inclusão serão realizadas 2 colheitas de urina, em duas micções consecutivas com a sensação de bexiga cheia, após cada micção proceder-se-á:
 - Registo do volume urinado e o avaliação ecografica do resíduo pós-miccional
 - Realização de teste com tira reagente para avaliar existência de infecção.
 - Se o teste for negativo serão colectadas 3 amostras de urina para:
 - Exame do sedimento e doseamento de Creatinina, Ionograma e DHL, a realizar no Laboratório de Bioquímica do HSA/CHP
 - Doseamento do NGF urinário, a realizar no Laboratório de Química Clínica do HSA/CHP
 - Doseamento do ATP urinário, a realizar no Laboratório de Farmacologia do ICBAS/UP
- As amostras para doseamento do ATP e do NGF serão congeladas de imediato em azoto líquido e armazenadas a -20°C.

Metodos

Doseamento de Creatinina, depuração da creatinina, pH urinário e Ionograma (Na^{2+} ; K^+ ; Ca^{2+}) urinário; Doseamento de Creatinina e Ionograma (Na^{2+} ; K^+ ; Ca^{2+}) sérico.

- Métodos convencionais utilizados no Serviço de Química Clínica do HSA/CHP

Doseamento urinário da concentração de NGF urinário

- A concentração de NGF urinário será determinada usando um kit de ELISA de alta sensibilidade (Emax ImmunoAssay System, Promega, Madison, EUA) com limite mínimo de detecção de 7,8pg/ml. Os procedimentos serão realizados conforme as instruções do fabricante.

Doseamento urinário da concentração de ATP

- As amostras serão descongeladas até atingir 25°C e a seguir centrifugadas para remover possíveis restos celulares.
- Posteriormente será adicionada uma mistura de Luciferina-luciferase (ENLITEN ATP assay system bioluminescence detection kit, Promega, Madison, EUA) às amostras.
- A concentração de ATP será avaliada usando um luminómetro (20/20n Turner Biosystems Luminómetro, Sunnyvale, USA) comparando a luminescência das amostras com uma curva padrão de ATP realizada diariamente.
- O limite mínimo de detecção é de 100pM e a luminescência correlaciona-se linearmente com a concentração de ATP até 1000nM.

4. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se contribuir para o conhecimento da fisiopatologia da Bexiga Hiperactiva, e para o desenvolvimento de marcadores biológicos desta patologia.

5. INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A divulgação dos resultados será efectuada através de apresentação de poster ou comunicação oral no Congresso de Iniciação à Investigação Clínica, a organizar no HSA/CHP, pelos alunos da DIIC. Está também prevista a apresentação dos resultados em Congresso da Especialidade.

B) QUESTÕES ÉTICAS

As Doentes serão informadas pelo Investigador Responsável no HSA/CHP (Dr. Miguel Silva Ramos) ou pelo Médico que o substitua na Consulta, sobre a natureza e os objectivos da investigação e sobre os seus riscos e benefícios. Será fornecido um Documento com Informação sobre o Estudo e solicitada a participação no Estudo de Investigação.

Só serão incluídas neste estudo Doentes capazes de compreender a informação dada e tendo assinado e datado o Termo de Consentimento Informado, de forma livre e esclarecida.

Não existem custos para os doentes participantes, uma vez que no orçamento do estudo está previsto o pagamento das taxas moderadoras relativas a consultas, exames e análises efectuados no âmbito do estudo de investigação, bem como eventuais despesas de deslocação.

Não existem riscos inerentes à participação no Estudo de Investigação, para além dos associados às colheitas de sangue e à realização dos exames urodinâmicos, procedimentos estes que já são habituais na Consulta de Urologia. Também não existem benefícios imediatos para as Doentes. Os benefícios do estudo serão benefícios a longo prazo, decorrentes de uma melhor compreensão da fisiopatologia da Bexiga Hiperactiva.

No plano financeiro do estudo está prevista o pagamento de eventuais despesas de deslocação das Doentes, bem como das taxas moderadoras das consultas, exames e análises efectuadas para fins de investigação.

INFORMAÇÃO AO DOENTE

A Bexiga Hiperactiva pode afectar qualquer indivíduo e qualquer idade e compromete a qualidade de vida. Embora se saiba que existem vários tipos de Incontinência Urinária, as causas de alguns deles ainda não estão bem esclarecidas.

Gostaríamos de contar com a sua colaboração para participar neste Estudo, que tem como Investigador Responsável o Dr. Miguel Silva Ramos, do Serviço de Urologia.

Este estudo tem como objectivos estudar os mecanismos da Bexiga Hiperactiva. Se concordar, terá que ser observada em duas consultas, fazer o registo das micções durante três dias consecutivos e efectuar alguns exames e análises ao sangue e à urina.

Se desejar, poderá receber o dinheiro que gastar em transportes (valor máximo de 5,00 Euros por deslocação) para vir a essas duas consultas e uma deslocação para fazer análises, mediante apresentação dos respectivos recibos (bilhete de autocarro, talão de gasolina, etc.). Também não terá que pagar as taxas moderadoras das consultas, análises e exames efectuados para fins de investigação. Deve entregar os documentos para pagamento dessas taxas moderadoras e os comprovativos das despesas de deslocação ao Investigador Responsável por este estudo.

A participação neste estudo não acarretará riscos para si. Este estudo terá o objectivo principal para uma melhor compreensão das causas da Bexiga Hiperactiva.

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, abaixo-assinado fui informado de que este Estudo de Investigação se destina a estudar os mecanismos da Bexiga Hiperactiva.

Sei que neste estudo está prevista a realização de consultas, exames (ecografia) e análises (colheita de sangue e urina) tendo-me sido explicado em que consistem. Sei que parte das análises vai ser efectuada no Hospital de Santo António e que outra parte vai ser efectuada no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos participantes neste estudo são confidenciais e que será mantido o anonimato.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado e concordo que sejam efectuados os exames e a colheita de amostras de sangue e urina para realizar as análises que fazem parte deste estudo. Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome completo do participante no estudo

Assinatura

Data

Nome do médico:

Assinatura

Data

C) PLANO FINANCEIRO

1. Orçamento

Total: 7.500,00 Euros

Sub-total	HSA / CHP:	4.500,00 Euros
Sub-total	ICBAS / UP:	2.700,00 Euros
Sub-total	Outros:	300,00 Euros

HSA / CHP

SUB-TOTAL: 4500,00 Euros

Não são incluídos os custos dos procedimentos destinados ao estudo Urodinâmico, uma vez que esse estudo seria feito mesmo que o doente não participasse neste estudo de investigação.

Consultas:

Taxas moderadoras de consultas (por consulta, Hospital Central): 4,40 Euros
Total / doente (2 consultas /doente): 8,80 Euros
Total / 50 doentes: 440,00 Euros

Análises:

(Consultar Tabela 1 na página seguinte)

Custos de análises

Total / doente: 29,60 Euros
Total / 50 doentes: 1480,00 Euros

Custos de taxas moderadoras de análises

Total / doente: 7,90 Euros
Total / 50 doentes: 395,00 Euros

Custos de análises + taxas moderadoras de análises

Total / doente: 37,50 Euros
Total / 50 doentes: 1875,00 Euros

Exames:

Custo de exames (por exame): Ecografia pós miccional com cálculo de resíduo urinário

Total / por doente: 27,70 Euros
Total / por 50 doentes participantes: 1.385,00 Euros

Deslocação de doentes:

Transporte / deslocação dos doentes (máximo de 5 Euros/dia/deslocação/ doente)

Total / máximo por doente (3 deslocações): 15,00 Euros
Total / por 50 doentes: 750,00 Euros

Outros:

Garrafas de água para realização dos exames: 50,00 Euros (50 garrafas)

Tabela 1: Custos relativos a análises efectuadas no HSA/CHP e respectivas taxas moderadoras

ATP E NEUROTROFINAS URINÁRIAS COMO MARCADORES BIOLÓGICOS DA BEXIGA HIPERACTIVA

CUSTO DAS ANÁLISES (Euros) segundo a Tabela de preços do Sistema Nacional de Saúde (Portaria n.º 110-A/2007)						
	Código IGIF	Custo / análise	Soro	Urina	Custo / doente	Custo / 50 doentes
1ª Colheita – Análises						
Clearance da creatinina	21623	4,10		X	4,10	205,00
Creatinina (s/u)	21620	1,20	X	X	2,40	120,00
Ionograma (Na+, Cl-, K+) (s/u)	22271	1,50	X	X	9,00	450,00
Análise sumária de urina (inclui sedimento e pH)	22954	2,70		X	2,70	135,00
				<i>Sub-total</i>	<i>18,20</i>	<i>910,00</i>
2ª Colheita - Análises						
Creatinina (s/u)	21620	1,20		X	1,20	60,00
Análise sumária urina (inclui sedimento e pH)	22954	2,70		X	2,70	135,00
Exame bacteriológico urina Dipstick				X	1,00	50,00
Desidrogenase láctica (DHL)	21665	1,30		X	1,30	65,00
				<i>Sub-total</i>	<i>6,20</i>	<i>310,00</i>
3ª Colheita - Análises						
Creatinina (s/u)	21620	1,20		X	1,20	60,00
Análise sumária urina (inclui sedimento e pH)	22954	2,70		X	2,70	135,00
Exame bacteriológico urina Dipstick				X	0,00	0,00
Desidrogenase láctica (DHL)	21665	1,30		X	1,30	65,00
				<i>Sub-total</i>	<i>5,20</i>	<i>260,00</i>
				Total Custo Análises	29,60	1480,00
CUSTO DAS TAXAS MODERADORAS (Euros) - Sistema Nacional de Saúde (Portaria n.º 1637/2007)						
	Código IGIF	Taxa / análise	Soro	Urina	Taxas / doente	Taxas / 50 doentes
1ª Colheita - Análises						
Outras análises bioquímicas (clear. creatinina)	288	1,05		X	1,05	52,50
Creatinina (s/u)	244	0,35	X	X	0,70	35,00
Ionograma (Na+, Cl-, K+) (s/u)	264	0,45	X	X	2,70	135,00
Análise sumária urina (inclui sedimento e pH)	285	0,65		X	0,65	32,50
				<i>Subtotal</i>	<i>5,10</i>	<i>255,00</i>
2ª Colheita - Análises						
Creatinina (s/u)	244	0,35		X	0,35	17,50
Análise sumária urina (inclui sedimento e pH)	285	0,65		X	0,65	32,50
Exame bacteriológico urina Dipstick				X	0,00	0,00
Desidrogenase láctica (DHL)	246	0,40		X	0,40	20,00
				<i>Subtotal</i>	<i>1,40</i>	<i>70,00</i>
3ª Colheita - Análises						
Creatinina (s/u)	244	0,35		X	0,35	17,50
Análise sumária urina (inclui sedimento e pH)	285	0,65		X	0,65	32,50
Exame bacteriológico urina Dipstick				X	0,00	0,00
Desidrogenase láctica (DHL)	246	0,40		X	0,40	20,00
				<i>Subtotal</i>	<i>1,40</i>	<i>70,00</i>
				Total Taxas Moderadoras	7,90	395,00
TOTAL (CUSTO ANÁLISES + TAXAS MODERADORAS)					37,50	1875,00

ICBAS/UP

SUB-TOTAL: 2.700,00 Euros

Análises

Tabela 2: Custos relativos a análises efectuadas no ICBAS/UP (por tipo de análise):

Reagentes e produtos químicos

- Kit ATP ENLITEN 500,00 Euros
- Kit NGF ELISA (*) 1.000,00 Euros
- Azoto líquido 300,00 Euros

Consumíveis e material descartável

- Tubos, caixas e ansas de criopreservação; luvas; pontas, etc. 150,00 Euros

Pequenos equipamentos

- Contentor portátil para transporte de azoto líquido 400,00 Euros
- Agitador orbital de microplacas 350,00 Euros

TOTAL

2.700,00 Euros

(*) O kit para doseamento do NGF urinário será fornecido ao Laboratório de Química Clínica do HSA/CHP.

OUTROS

SUB-TOTAL: 400,00 Euros

Apresentação de resultados:

Inscrição da Aluna em Congresso da Especialidade: 200,00 Euros.

Elaboração de Poster: 50,00 Euros.

Contribuição para as despesas de organização do Congresso de Iniciação à Investigação Clínica 2008: 50,00 Euros.

2. Financiamento

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

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

OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Científica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HGSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto 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

OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Científica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HGSA, 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

OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Científica 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 Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

ICBAS / UP

Carta ao Presidente do Conselho Directivo do ICBAS

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

Prof. Doutor António Sousa Pereira

OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA, 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 Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar 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 do ICBAS

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

Prof. Doutor António Sousa Pereira

OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA, 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 7500,00 € (sete mil 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

Investigadores

Termo de Responsabilidade do Investigador Principal e Responsável no CHP

Eu, abaixo assinado, MIGUEL SILVA RAMOS, médico Assistente Hospitalar de Urologia do HSA/CHP, na qualidade de Orientador de OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA, Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Científica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA e de Investigador Principal e Responsável no Centro Hospitalar do Porto, 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

Aluno

Declaração do Aluno

Eu, abaixo assinado, OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA, na qualidade de Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS / HSA, 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 anónimos e não serão utilizados para qualquer outro fim.

Data

Assinatura

Orientadores / Supervisores

Declaração do Orientador

Eu, abaixo assinado, MIGUEL SILVA RAMOS, médico Assistente Hospitalar de Urologia do HSA/CHP, na qualidade de Orientador / Supervisor no HSA/CHP de OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA, Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, declaro que me comprometo a acompanhar o aluno 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 anónimos e não sejam utilizados para qualquer outro fim.

Data

Assinatura

Declaração do Co-Orientador

Eu, abaixo assinado, PAULO CORREIA DE SÁ, Professor e Investigador do ICBAS, na qualidade de Co-Orientador / Supervisor no ICBAS de OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA, Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, declaro que me comprometo a acompanhar o aluno 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 anónimos 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, Assistente Hospitalar 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/HSA, declaro que me comprometo a acompanhar a aluna OLGA MARIA DOS SANTOS OLIVEIRA, Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA nas diferentes fases da sua realização do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado.

Data

Assinatura

TERMOS DE AUTORIZAÇÃO LOCAL

Serviços

Autorização do Director de 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

Autorização do Director de Serviço de Química Clínica

JOSÉ CARLOS AZEVEDO OLIVEIRA, na qualidade de Director do Serviço de QUÍMICA CLÍNICA 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 Patologia Laboratorial

MARIA HELENA S SANTOS RAMOS, na qualidade de Directora do Departamento de PATOLOGIA LABORATORIAL 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

BIBLIOGRAFIA

30. Andersson KE (2002) Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology*. 59, 43-50
31. Bielefeldt K, Lamb K, Gebhart GF. Convergence of sensory pathways in the development of somatic and visceral hypersensitivity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G658–G665, 2006
32. Brown JS, McGhan WF, Chokroverty AS. Comorbidities associated with overactive bladder. *Am J Managed Care* 2001; 6 (Suppl): S574-S579.
33. Charrua A, Cruz CD, Narayanan S, Gharat L, Gullapalli S, Cruz F, Avelino A (2009) GRC-6211, a new oral specific TRPV1 antagonist, decreases bladder overactivity and noxious bladder input in cystitis animal models. *J Urol* 181:379–386
34. Clemow DB, Spitsbergen JM, McCarty R, Steers WD, Tuttle JB: Altered NGF regulation may link a genetic predisposition for hypertension with hyperactive voiding. *J Urol* 1999, 161(4):1372-1377.
35. Debra E. Irwin, Ian Milsom, Steiner Hunskaar, Kate Reilly, et al. Population-Based Survey of Urinary Incontinence, Overactive Bladder, and other Lower Urinary Tract Symptoms in Five Countries: Results of the EPIC Study. *European Urology* 50 (2006); 1306-1315
36. Diokno AC. Epidemiology and psychosocial aspects of incontinence. *Urol Clin North Am* 1995; 22:481-485.
37. Ferguson DR, Ian Kennedy and Burton TJ. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes – a possible sensory mechanism? *Journal of Physiology*, 1997; 505.2, pp 503-511.
38. Guerios SD, Wang ZY, Boldon K, Bushman W, Bjorling DE. Blockade of NGF and trk receptors inhibits increased peripheral mechanical sensitivity accompanying cystitis in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
39. Hampel C, Wienhold D, Benken n, Eggersmann C, Thuroff JW. Definition of overactive bladder and epidemiology of incontinence. *Urology* 1997; 50(Suppl6A):4-14
40. Jackson S. the patient with an overactive bladder – Symptoms and quality-of-life issues. *Urology* 1997; 50:18-22, 1997
41. Liang R, Ustinova EE, Patnam R, Fraser MO, Gutkin DW, Pezzone MA. Enhanced expression of mast cell growth factor and mast cell activation in the bladder following the resolution of trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) colitis in female rats. *Neurourol Urodyn* 26: 887–893, 2007.
42. Liu HT, Chancellor MB, Kuo HC. Urinary Nerve Growth Factor Levels are elevated in Patients with Detrusor Overactivity and Decreased in Responders to Detrusor Botulinum Toxin-A Injection. *Eur Urol*. 2008 [Epub ahead of print]
43. Liu HT, Kuo HC. Urinary Nerve Growth Factor Levels are increased in Patients with Bladder Outlet Obstruction with Overactive Bladder Symptoms and Reduced after Successful Medical Treatment. *Urology* 2008; 72:104-108.
44. Milson I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thüroff J, Wein AJ. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU International* 2001; 87:760-766.

45. Milson I, Stewart W, Thuroff J. Prevalence of overactive bladder. *Am J Managed Care* 2000; 6(Suppl):S565-S573
46. Pandita RK, Andersson KE. Intravesical ATP stimulates the micturition reflex in awake, freely moving rats. *J. Urol.* 2002; 168: 120-1234.
47. Peter Zvara and Margaret A Vizzard. Exogenous overexpression of nerve growth factor in the urinary bladder produces bladder overactivity and altered micturition circuitry in the lumbosacral spinal cord. *BMC Physiology* 2007, 7:9
48. Steers WD, S Kolbeck S, Creedon D, Tuttle JB. Nerve growth factor in the urinary bladder of the adult regulates neuronal form and function. *J Clin Invest.* 1991; 88:1709-1715.
49. Sugaya K et al. *Neuroscience letters* 2007; 429:142-146.
50. Sun Y, Keay S, De Deyne PG and Chai TC (2001) Augmented stretch activated adenosine triphosphate release from bladder uroepithelial cells in patients with interstitial cystitis. *J Urol* 166, 1951-1956
51. Vivek Kumar, Christopher R. Chapple, Derek Rosario, Paul R. Tophill, Russell Chess-Williams. In Vitro Release of Adenosine Triphosphate from the Urothelium of Human Bladders with Detrusor Overactivity, Both Neurogenic and Idiopathic *European Urology*, Volume 57, Issue 6, June 2010, Pages 1087-1092
52. Vizi ES, Liang SD, Sperlách B, Kittel A and Jurányi Z (1997) Studies on the release and extracellular metabolism of endogenous ATP in rat superior cervical ganglion: support for neurotransmitter role of ATP. *Neuroscience* 79, 893-903.
53. Vlaskovska M, Kasakov I, Rong W, et al. P2X3 knock-out mice reveal a major sensory role for urothelially released ATP. *J Neuroscience* 2001; 21:5670-7.
54. Y. Uehara, M. Yanai, K. Kumasaka. Evaluation of renal damage using urinary ATP analysis, *Nippon Jinzo Gakki Shi* 46 (2004) 693-699.
55. Yan Sun and Toby C. Chai. Augmented extracellular ATP signalling in bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290:C27-C34
56. Ying Cheng, Kylie J. Mansfield, Wendy Allen, Colin A. Walsh, Elizabeth Burcher and Kate H. Moore. Does Adenosine Triphosphate Released into Voided Urodynamic Fluid Contribute to Urgency Signaling in Women with Bladder Dysfunction?. *The Journal of Urology* Vol. 183, 1082-1086, March 2010.
57. Yoshimura N, Bennett NE, Hayashi Y, Ogawa T, Nishizawa O, Chancellor MB, de Groat WC, Seki S. Bladder overactivity and hyperexcitability of bladder afferent neurons after intrathecal delivery of nerve growth factor in rats. *J Neurosci* 26: 10847–10855, 2006.
58. Zvara P, Vizzard MA. Exogenous overexpression of nerve growth factor in the urinary bladder produces bladder overactivity and altered micturition circuitry in the lumbosacral spinal cord. *BMC Physiology* 2007; 7:9.