



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Isabel Cristina da Silva Soito

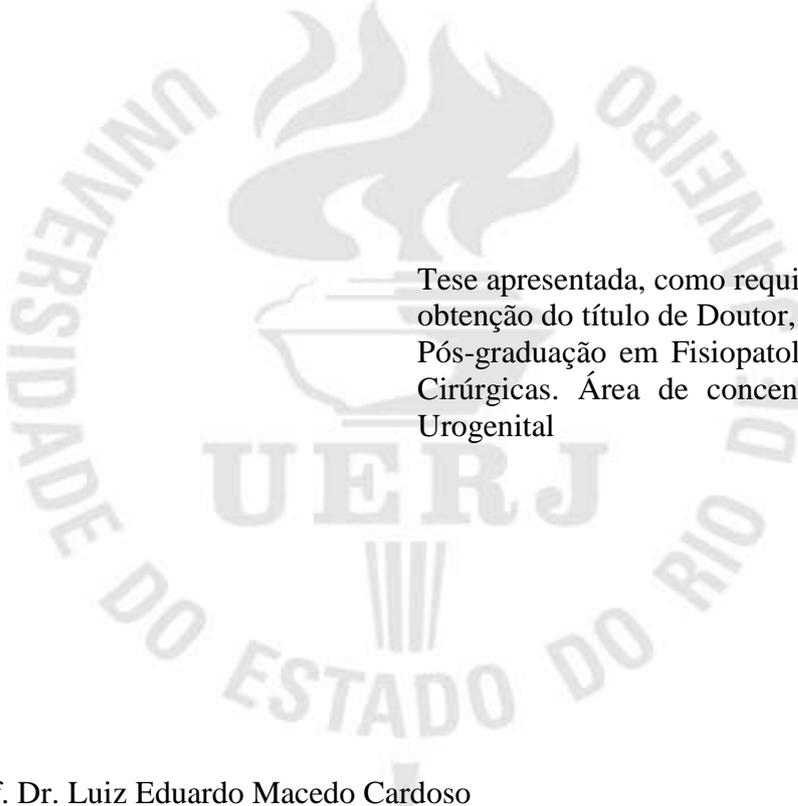
**Excreção urinária de glicosaminoglicanos em crianças com bexiga
neurogênica secundária a mielomeningocele**

Rio de Janeiro

2011

Isabel Cristina da Silva Soito

Excreção urinária de glicosaminoglicanos em crianças com bexiga neurogênica secundária a mielomeningocele



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas. Área de concentração: Sistema Urogenital

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S683 Soito, Isabel Cristina da Silva.
Excreção urinária de glicosaminoglicanos em crianças com
bexiga neurogênica secundária a Mielomeningocele / Isabel
Cristina da Silva Soito.- 2011.
46 f.

Orientador : Luiz Eduardo Macedo Cardoso.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Pós - graduação em
Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Bexiga urinária neurogênica - Teses. 2. Bexiga urinária -
Fisiopatologia - Teses. 3. Cistometria – Teses. 4. Urodinâmica -
Teses. 5. Meningomielocele - Teses. 6. Glicosaminoglicanos -
Teses. 7. Matriz extracelular - Teses. I. Cardoso, Luiz Eduardo
Macedo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.62-008.22-02:616.83

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese/dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Isabel Cristina da Silva Soito

**Excreção urinária de glicosaminoglicanos em crianças com bexiga neurogênica
secundária a mielomeningocele**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências
Cirúrgicas. Área de concentração: Sistema
Urogenital

Aprovada em 25 de janeiro de 2011 .

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso (Orientador)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dr. André Guilherme Lagrega da Costa Cavalcanti
Universidade do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. Dr. Carlos Augusto Pais Cabral
Faculdade de Medicina de Petrópolis - FMP

Prof. Dr. Marcelo Abidu-Figueiredo
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

Rio de Janeiro

2011

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador, Luiz Eduardo de Macedo Cardoso pela orientação efetiva.

A Alan Medeiros, bolsista de iniciação científica, pela colaboração na execução dos procedimentos bioquímicos.

Ao Dr. André Guilherme Cavalcanti, Chefe do Serviço de Urologia do Hospital Municipal Souza Aguiar, por ter disponibilizado o Setor de Uroneurologia, para realização dos exames cistométricos.

RESUMO

SOITO, Isabel Cristina da Silva. *Excreção urinária de glicosaminoglicanos em crianças com bexiga neurogênica secundária a Mielomeningocele*. 2011. 46 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A excreção urinária de glicosaminoglicanos (GAG) está alterada em várias patologias do trato urinário; o padrão de excreção pode estar associado com o estado da doença. A excreção urinária de GAG em crianças com bexiga neurogênica (BN) secundária a mielomeningocele (MMC) pode também estar alterada, mas até a presente data não há detalhamento epidemiológico dos pacientes e não se correlacionou o padrão de excreção com grau de disfunção vesical. Analisamos a excreção urinária de um grupo bem definido de crianças com MMC e correlacionamos os resultados com escore cistométrico. As amostras de urina de 17 pacientes com MMC, 10 meninos e 7 meninas (média de idade \pm DP de $4,6 \pm 2,9$ anos) foram obtidas durante o exame cistométrico. As amostras do grupo controle foram obtidas de 18 crianças normais, 13 meninos e 5 meninas ($6,9 \pm 2,2$ anos). Todas as crianças não estavam com infecção urinária, tinham função renal normal e não estavam sob tratamento farmacológico. A quantificação do GAG urinário total foi expressa em μg de ácido hexurônico / mg de creatinina e a proporção dos diferentes tipos de GAGs sulfatados foi obtida por eletroforese em gel de agarose. A avaliação cistométrica foi realizada utilizando aparelho de urodinâmica Dynapack modelo MPX816 (Dynamed, São Paulo, Brasil), a partir da qual o escore cistométrico foi calculado de acordo com procedimento recente publicado. [14]. Não observamos diferença significativa na excreção urinária de GAG total entre meninos e meninas tanto no grupo com MMC ($0,913 \pm 0,528$ vs $0,867 \pm 0,434$, $p > 0,05$) como no grupo controle ($0,546 \pm 0,240$ vs $0,699 \pm 0,296$, $p > 0,05$). Os resultados mostraram também que a excreção de GAG urinário não se correlacionou com a idade tanto no grupo com MMC ($r = -0,28$, $p > 0,05$) como no grupo controle ($r = -0,40$, $p > 0,05$). Entretanto, a comparação dos dois grupos mostrou que o grupo com MMC excretava 52% a mais de GAG total que o grupo controle ($0,894 \pm 0,477$ vs $0,588 \pm 0,257$, $p < 0,04$). Nesses pacientes a excreção de GAG total não se correlacionou com a complacência vesical isoladamente ($r = -0,18$, $p > 0,05$) mas foi significativa e negativamente correlacionada ao escore cistométrico ($r = -0,56$, $p < 0,05$). Em média, os pacientes com piores escores (< 9) excretaram 81% a mais de GAG que os pacientes com melhor escore (> 9) ($1,157 \pm 0,467$ vs $0,639 \pm 0,133$, $p < 0,04$). O sulfato de condroitin foi o GAG sulfatado predominante nos grupos neurogênico e controles ($92,5 \pm 7,6\%$ vs $96,4 \pm 4,8\%$, respectivamente, $p > 0,05$), enquanto o sulfato do heparan estava presente em quantidades marcadamente menores; o dermatam sulfato não foi detectado. A excreção urinária de GAG em pacientes com MMC é significativamente maior que a excreção das crianças normais e os altos valores encontrados estão correlacionados a um maior comprometimento da função vesical. Evidências em modelos animais com MMC induzida sugerem que alterações no detrusor estão associadas a um elevado turnover da matriz extra celular (MEC) vesical, o que pode explicar a elevada excreção de GAG nos pacientes com MMC. Além disso, esses resultados indicam que a excreção urinária de GAG pode ser usada como fator adjuvante para a caracterização da disfunção vesical em pacientes com MMC.

Palavras-chave: Bexiga. Neurogênica. Disfunção vesical. Cistometria. Urodinâmica. Mielomeningocele. Glicosaminoglicanos. Matriz extra celular.

ABSTRACT

Urinary glycosaminoglycan (GAG) excretion is altered in a number of urinary tract disorders, and the excretion pattern may be associated with disease state and/or outcome. GAG excretion in children with neurogenic bladder secondary to myelomeningocele (MMC) may be affected, but existing data lack more detailed demographics and does not correlate excretion pattern with severity of bladder dysfunction. Here we analyzed GAG excretion in a well defined group of children with MMC and correlated the results with cystometric score. Urine specimens from 17 patients (10 boys, 7 girls) mean age \pm SD, 4.6 ± 2.9 years) were obtained during cystometry. Control specimens were from 18 normal children (13 boys, 5 girls) (6.9 ± 2.2 years). All children were free from urinary infection, had normal renal function, and were not under pharmacological treatment. Total urinary GAG was assayed as μ g hexuronic acid/mg urinary creatinine, and sulfated GAGs were determined by agarose gel electrophoresis. Cystometry was done using a Dynapack MPX816 (Dynamed, São Paulo, Brazil), from which a cystometry score was calculated according to a recent procedure [14]. There were no significant differences in total GAG excretion between male and female individuals in the MMC (0.913 ± 0.528 vs 0.867 ± 0.434 , $p > 0.05$) and control (0.546 ± 0.240 vs 0.699 ± 0.296 , $p > 0.05$) groups. Also, urinary GAG did not correlate with age in the MMC ($r = -0.28$, $p > 0.05$) and control ($r = -0.40$, $p > 0.05$) groups. However, MMC patients excreted 52% more GAG than controls (0.894 ± 0.477 vs 0.588 ± 0.257 , $P < 0.04$). In these patients, total GAG excretion was not associated with vesical compliance alone ($r = -0.18$, $p > 0.05$), but was significantly and negatively correlated ($r = -0.56$, $p < 0.05$) with cystometric score. On average, MMC patients with worst scores (< 9) excreted 81% more GAG than those with better scores (> 9) (1.157 ± 0.467 vs 0.639 ± 0.133 , $p < 0.04$). Chondroitin sulfate prevailed in both groups, but there were no significant differences between them. GAG excretion in MMC patients is significantly greater than in normal children and higher values correlate with a more severely compromised bladder function. Evidences from animal models of MMC suggest that an altered detrusor is associated with higher vesical extracellular matrix turnover, which might explain higher GAG excretion in MMC patients. In addition, these results indicate that urinary GAG excretion might be used as an adjuvant factor for the characterization of vesical dysfunction in patients with neurogenic bladder.

Keywords: Neurogenic bladder. Vesical dysfunction. Cystometry. Urodynamic. Myelomeningocele. Glycosaminoglycans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Disrafismos espinhais: não císticos e císticos.....	12
Figura 2 –	Imagem ultra sonográfica pré natal e ectoscopia de paciente com Mielomeningocele.....	13
Figura 3 –	Imagem ultra sonográfica do trato urinário superior demonstrando uretero hidronefrose em paciente com Bexiga Neurogênica (BN) de má complacência e uretrocistografia de paciente com BN com divertículos e refluxo vésico ureteral.....	14
Figura 4 –	Aparelho para estudo urodinâmico, Dynapack MPX 816.....	15
Figura 5 –	Representação esquemática do estudo urodinâmico.....	17
Figura 6 –	Representação esquemática das camadas da parede vesical.....	18
Figura 7 –	Exemplo nº 1 – escore 2,3	25
Figura 8 –	Exemplo nº 2 – escore 15	26

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise da correlação entre a excreção urinária de Glicosaminoglicanos e a idade no grupo neurogênico.....	29
Gráfico 2 – Análise da correlação entre a excreção urinária de Glicosaminoglicanos e no grupo controle.....	30
Gráfico 3 – Média da excreção urinária de GAGs totais no grupo neurogênico e controle.....	31
Gráfico 4 – Percentual de glicosaminoglicanos sulfatados nos grupos neurogênico e controle e controle.....	32
Gráfico 5 – Análise da correlação entre a excreção de glicosaminoglicanos total e a complacência vesical.....	33
Gráfico 6 – Análise da correlação entre a excreção de glicosaminoglicanos total e a gravidade da disfunção vesical determinada por escore cistométrico.....	34
Gráfico 7 – Excreção urinária de Glicosaminoglicanos total em pacientes com menor (<9) e maior escore (>9).....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Componente do escore de MacNeily: Capacidade vesical (EV).....	22
Quadro 2 – Componente do escore de Macneily: Complacência vesical (EV20).....	23
Quadro 3 – Componente do escore de MacNeily: Atividade do detrusor (A).....	23
Quadro 4 – Componente do escore de MacNeily: Sensação de enchimento vesical: (B).....	24
Quadro 5 – Análise da associação entre a excreção urinária de GAG total com a presença de hiperreflexia.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BN –	Bexiga Neurogênica
CM –	Cistometria
GAG –	Glicosaminoglicanos
MMC –	Mielomeningocele
MEC –	Matriz extracelular
UDS –	Urodinâmica
PG –	Proteoglicanos
HexUA -	Ácido Hexurônico

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	12
1	OBJETIVO.....	19
2	PACIENTES E MÉTODOS.....	20
2.1	Pacientes e amostras de urina.....	20
2.2	Cistometria.....	21
2.2.1	<u>Pontuação (Escore) no estudo Cistométrico.....</u>	21
2.2.2	<u>Descrição do cálculo do Escore.....</u>	22
2.3	Isolamento do GAG total nas amostras de urina.....	27
2.4	Análise dos glicosaminoglicanos.....	27
2.5	Outras análises.....	28
2.6	Análise estatística.....	28
3	RESULTADOS.....	29
4	DISCUSSÃO.....	35
5	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39
	APÊNDICE A - Modelo de consentimento informado para o grupo portador de BN.....	44
	APÊNDICE B - Modelo de consentimento informado para o grupo controle.....	45
	ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	46

INTRODUÇÃO

A maioria das anomalias congênitas da medula espinhal resulta de defeitos do fechamento do tubo neural durante a quarta semana de desenvolvimento. Correlações têm sido feitas entre a presença de Defeitos do Tubo Neural (DTN) e fatores nutricionais como também uso de certas substâncias. Há 20 anos constatou-se elevada incidência de DTN na Irlanda e Reino Unido [1,2], estudos evidenciaram que a suplementação de vitamínicos (B12) e de ácido fólico antes da concepção reduz a incidência de DTNs [3]. Entretanto, atualmente, em alguns países como a e Índia, por exemplo, observa-se ainda uma elevada incidência desta má formação congênita [4]. O uso do ácido valpróico (anticonvulsivante) durante a fase inicial da gravidez (4º semana do desenvolvimento), época em que as pregas neurais estão se fundindo, também pode acarretar DTN.

Os defeitos do tubo neural afetam os tecidos sobrepostos à medula espinhal: meninges, arcos vertebrais, músculos e pele. As anomalias envolvendo os arcos vertebrais são denominadas coletivamente espinha bífida; este termo denota a falta de fusão das metades embrionárias dos arcos vertebrais, comum a todos os tipos de espinha bífida [5].

Os disrafismos espinhais ou DTNs (figura 1) são classificados em císticos, que apresentam posterior protrusão dos elementos espinhais através do defeito espinhal (Mielomeningocele, Meningocele, etc); ou não císticos que não apresentam protrusão dos elementos espinhais, apresentam pêlos, sinus, lipoma ou alteração da cor da pele (Lipoma intradural, cisto dermóide ou epidermóide, etc) [1,5].



Figura 1- Disrafismos espinhais: não císticos e císticos.

Espinha bífida é a causa neurogênica mais comum de disfunção do trato urinário baixo na infância. A maioria das crianças portadoras de Espinha Bífida (95%) apresenta inervação vesical anormal e conseqüente algum grau de disfunção vesical. Outras causas de disfunção vesical neurogênica incluem: agenesia sacral, trauma raquimedular e anomalias do Sistema Nervoso Central (ex: paralisia cerebral) [1,5,6]. O diagnóstico pré-natal é feito através de ultrasonografia; níveis elevados de alfa feto proteína antes da 24ª semana de gestação promovem uma forte suspeição (figura 2).



Figura 2- Imagem ultra sonográfica pré natal e ectoscopia de paciente com Mielomeningocele.

As disfunções neurogênicas do trato urinário inferior também são denominadas como bexiga neurogênica (BN). Estas disfunções podem causar desde infecção do trato urinário, aumento da pressão vesical e incontinência urinária até avançados graus de lesão do trato urinário superior, com sensível piora do prognóstico quando não diagnosticados e tratados adequadamente [7] (figura 3). Sabe-se que a conduta expectante na BN de alto risco aumenta em 50% o risco de deterioração do trato urinário superior, enquanto que a introdução precoce em casos específicos, do cateterismo intermitente limpo (CIL) associado ao uso de bloqueadores colinérgicos, resolve 30-50% dos casos de RVU em 2 a 3 anos de instituída a terapêutica [5].



Figura 3 – Imagem ultra sonográfica do trato urinário superior demonstrando ureterohidronefrose em paciente com BN de má complacência e uretrocistografia de paciente com BN com divertículos e refluxo vésicoureteral bilateral

Para o adequado entendimento desta condição torna-se necessário o conhecimento da fisiologia da micção e do padrão de comportamento vesical dessas crianças através do exame urodinâmico [4, 8, 9,10].

O trato urinário inferior representado pela musculatura lisa da bexiga (detrusor) e pelos esfíncteres uretrais atuam de forma sinérgica com o objetivo de armazenar urina a baixa pressão, manter a continência, promover a contração detrusora e conduzir a urina da bexiga ao meio externo. Este evento neurológico é mediado por vias reflexas que estão sob controle voluntário. Desta forma às funções são coordenadas pelo sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso autônomo (SNA) e sistema nervoso somático (SNS) [11]. Estudo recente sobre a etiologia da bexiga hiperativa (síndrome caracterizada por urgência urinária) salienta a participação dos neurotransmissores, tipos celulares da parede vesical (células intersticiais e miofibroblastos) e do fator de crescimento neural (NGF) [12].

A resposta do sistema nervoso e da musculatura lisa vesical após lesões neurológicas são de caráter imprevisível, visto a capacidade de reorganização, de onde surge a necessidade de realização do estudo urodinâmico para adequada avaliação do comportamento vesical.

Entretanto, em casos com diagnóstico de bexiga hiperativa (síndrome caracterizada por queixas como urgência urinária, aumento na frequência de micções, nictúria acompanhada ou não de incontinência) permite-se o início da terapêutica sem a confirmação por exame

urodinâmico [10], em contrapartida, nos casos de disfunção neurogênica do trato urinário baixo, o exame cistométrico, urodinâmico ou vídeo urodinâmico tem indicação absoluta principalmente para definir o tipo de disfunção e a evolução do comportamento vesical durante o tratamento [9].

O estudo urodinâmico investiga a fase de enchimento e esvaziamento vesical e é realizado utilizando-se aparelho específico (figura 4). A denominação cistometria é comumente utilizada para denominar a investigação da fase de enchimento [13].



Figura 4 – Aparelho para Estudo Urodinâmico, Dynapack MPX816

O estudo urodinâmico completo é composto pelo estudo urofluxométrico (micção espontânea), estudo cistométrico (fase de enchimento vesical) e estudo miccional (fase de esvaziamento vesical); em adultos o registro eletromiográfico é realizado durante os dois últimos estudos citados. Em crianças geralmente o registro eletromiográfico não é utilizado, pois a maioria dos pacientes do grupo pediátrico contrai voluntariamente a musculatura do assoalho pélvico durante a fase de esvaziamento na vigência da permanência do cateter uretral assim como em situações de stress, como no caso o estudo urodinâmico [14].

Por existir muitas particularidades envolvendo a análise do exame urodinâmico (cistométrico ou vídeo urodinâmico) no grupo pediátrico, alguns estudos sugerem ser necessários uma padronização da terminologia e o estabelecimento dos instrumentos para avaliação urodinâmica [13]

Néveus descreve observações sobre a técnica a ser utilizada durante o exame urodinâmico (cistométrico) no grupo pediátrico. Entre as considerações realizadas ressalta que as fases de enchimento e esvaziamento vesical no grupo pediátrico são definidas no momento

da análise da curva, ao término do exame, haja vista que as crianças muitas vezes urinam sem avisar ou não atendem a solicitação do urodinamicista de protelar a micção.

Em relação à velocidade de infusão no grupo pediátrico somente o enchimento fisiológico é permitido e a maioria dos estudos sugere uma velocidade de infusão entre 5-10 ml/min [15,16], alguns sugerem 5 a 10% da capacidade vesical estimada para a idade em ml/min [5,13].

Em crianças qualquer atividade detrusora observada durante a fase de enchimento é considerada patológica [13]. Alguns estudos consideram contração involuntária do detrusor um aumento na pressão vesical acima de 15 cmH₂O em relação a linha de base [5,13] entretanto MacNeily [14] considera no grupo pediátrico um aumento de 5cmH₂O em relação a linha de base como adequado. Quando contrações involuntárias são observadas em pacientes com lesão medular pode-se dizer que existe hiperreflexia detrusora, entretanto atualmente prefere-se a utilização do termo hiperatividade detrusora neurogênica [17].

O enchimento vesical é interrompido quando a capacidade estimada para a idade é atingida, na presença de dor, ou perda urinária na presença de contrações involuntárias de alta amplitude. Sabe-se que quando a pressão vesical excede 40cmH₂O de forma intermitente ou contínua a filtração glomerular é diminuída e a drenagem pielocalicial e ureteral ficam prejudicadas conduzindo a hidronefrose de caráter obstrutivo e/ou a refluxo vésico ureteral [7,18]. Logo sugere-se também a interrupção no enchimento vesical durante o exame costumétrico quando se atinge o limite superior de 30 cmH₂O.

Em relação à complacência no grupo pediátrico a avaliação qualitativa da curva (se linear ou não) é tão ou mais importante que a avaliação quantitativa [13].

No grupo pediátrico a avaliação da pressão vesical pode ser através da cateterização via punção supra púbica [13,15] ou via uretral. Estudo de Ichino [16] concluiu que altas pressões encontradas durante a fase de esvaziamento vesical em meninos não estava correlacionada ao tamanho do cateter utilizado. Pode-se utilizar cateteres de duplo ou triplo lúmen, assim como dois cateteres de 4 French [19].

Para realização do exame são introduzidas sondas uretral e retal, para aferição da pressão vesical e abdominal respectivamente. O registro da variação das pressões é contínuo durante a fase de enchimento e esvaziamento vesical (figura 5).

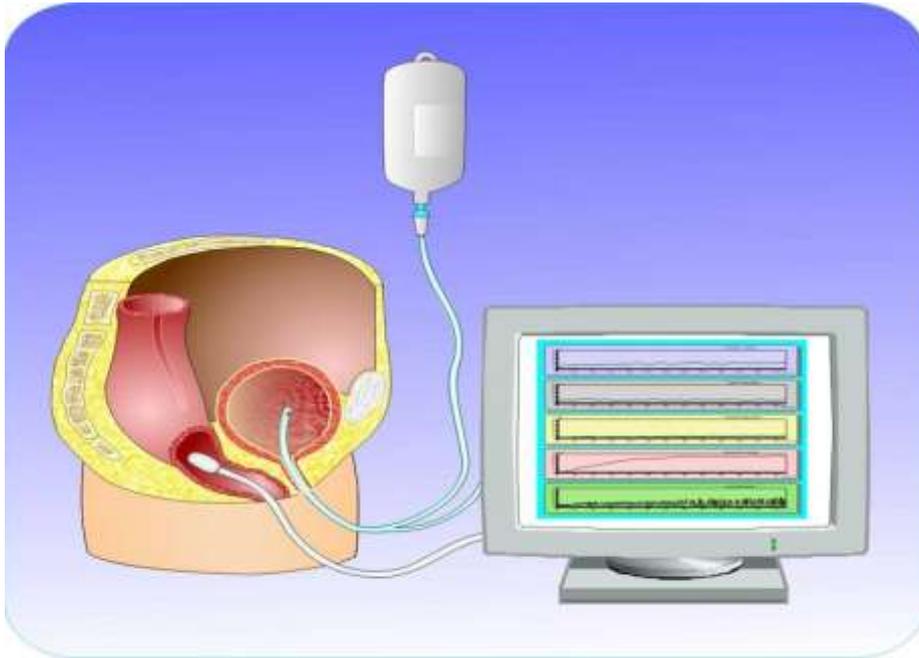


Figura 5 – Representação esquemática do Estudo Urodinâmico

Pacientes com disfunção vesical neurogênica de diferentes etiologias apresentam em estudos *in vitro* [20] e em modelos animais [21,22] alterações estruturais na parede vesical. Ghoniem [20] observou significativa diminuição da contratilidade e aumento na rigidez da parede vesical no grupo com MMC enquanto Nagatomi [21,22] em dosagens bioquímicas identificou baixas concentrações de colágeno e altas concentrações de elastina na parede vesical de ratos com lesão medular, resultados estes que sugerem um remodelamento importante nos tecido.

Estes últimos resultados diferem dos encontrados por Charlton [22] em 2003, que analisou tecidos da parede vesical obtidos de biópsias de pacientes com disfunção vesical neurogênica, o mesmo identificou um aumento na produção de elastina e colágeno, e uma diminuição neural associada à hipertrofia celular. Outros resultados também obtidos de biópsias evidenciaram degeneração axonal associada regeneração [24].

A Matriz extracelular (MEC) é frequentemente denominada de tecido conjuntivo, contém proteínas estruturais (colágeno, elastina, fibrilina); proteínas especializadas (fibronectina, laminina) e proteoglicanos.

Os proteoglicanos são complexos glicoconjugados encontrados na MEC e na superfície das células, e são constituídos de uma proteína central a qual as cadeias de GAGs se ligam covalentemente. Os proteoglicanos e GAGs apresentam várias funções entre elas: organização estrutural da MEC (se ligam entre si, ao colágeno ou a elastina) e interação com fatores do

crescimento modulando seus efeitos nas células. As variações em concentração, no estado de agregação e de ordenação molecular dos seus constituintes é que determinam as diferenças morfológicas e as propriedades viscoelásticas dos diferentes tecidos, permitindo inúmeras funções, tanto em processos normais como patológicos [25] (figura 6).

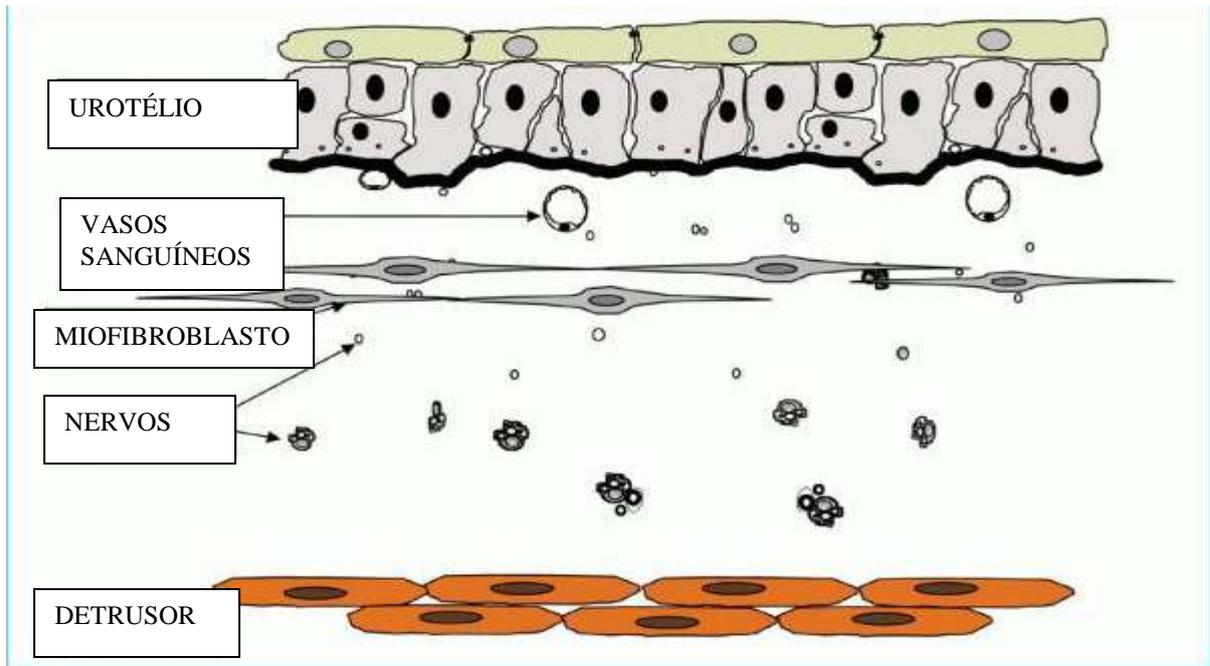


Figura 6- Representação esquemática das camadas da parede vesical

A bexiga contém proteoglicanos em toda a espessura da parede vesical, notadamente na camada muscular, onde desempenham um papel importante em relação à complacência vesical e na superfície luminal do urotélio, onde estão envolvidos com a permeabilidade.

A principal fonte de glicosaminoglicanos na urina decorre do turnover de proteoglicanos presentes no trato urinário [26].

Excreção de GAG encontra-se alterada em condições patológicas como na urolíase, cistite intersticial, infecção urinária e nas disfunções vesicais [27, 28, 29,30].

A excreção urinária de GAGs em crianças com bexiga neurogênica (BN) secundária a mielomeningocele (MMC) pode também estar afetada, conforme descrita por Salvaggio [28] entretanto tal estudo não detalha o perfil do paciente, não correlaciona o padrão de excreção com o grau de disfunção vesical de forma objetiva, não menciona se os pacientes do estudo estavam em uso de medicação específica além de somente fornecer dados sobre a excreção de GAG total, não realizando a quantificação dos GAGs sulfatados; tais questionamentos justificam a realização do presente trabalho.

1 OBJETIVO

Analisar a excreção urinária de glicosaminoglicanos (GAGs) em pacientes pediátricos portadores de bexiga neurogênica (BN) secundária a Mielomeningocele (MMC). Correlacionar a excreção de GAG com o padrão de comportamento vesical na cistometria, através de um escore destinado ao grupo pediátrico [14] que quantifica quatro componentes do exame: capacidade vesical, complacência, contrações involuntárias e sensação vesical.

2 PACIENTES E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê local de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Pedro Ernesto na Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ (registro CEP/HUPE: 2423).

2.1 Pacientes e amostras de urina

Foram incluídos no presente estudo 17 pacientes com MMC, 10 meninos e 7 meninas (média de idade \pm DP de $4,6 \pm 2,9$ anos) que estavam em acompanhamento no ambulatório de Urologia da AACD (Associação de Assistência a Criança Deficiente). Os controles consistiram em 18 crianças saudáveis, 13 meninos e 5 meninas ($6,9 \pm 2,2$ anos) que não apresentavam alteração na micção e que não estavam utilizando medicamentos. Todos os pacientes foram submetidos à correção cirúrgica para MMC logo após o nascimento. A lesão neurológica localizou-se na região torácica em 1 paciente, na região lombar em 11 pacientes e na região lombo-sacra em 5 pacientes.

O exame cistométrico de todas as crianças foi realizado no setor de Uroneurologia do Serviço de Urologia do Hospital Municipal Souza Aguiar. Quando a cistometria foi realizada e as amostras de urina coletadas todos os pacientes com MMC apresentavam os níveis séricos de creatinina e uréia normais. Não havia evidência de refluxo vésico ureteral e ureterohidronefrose conforme determinado pela uretrocistografia miccional, urografia excretora ou ultra-sonografia. Os pacientes apresentavam cultura de urina negativa, não estavam sob tratamento medicamentoso específico por no mínimo de seis meses antes da cistometria e realizavam regularmente o cateterismo intermitente limpo.

Foram utilizados como critérios de exclusão do estudo tanto no grupo de crianças com MMC como no grupo controle pacientes com história de cálculos renais ou vesicais, diabetes mellitus ou outras doenças metabólicas, hipertensão arterial e resultado anormal no dipstick test (veja outras análises).

As amostras de urina de pacientes com MMC foram coletadas através de cateter intravesical durante o esvaziamento vesical para realização da cistometria. As amostras de crianças do grupo controle foram coletadas por micção espontânea. As amostras de urina foram imediatamente congeladas, sem adição de conservantes e armazenadas a -20° C até análises posteriores.

2.2 Cistometria

A avaliação cistométrica foi realizada seguindo as orientações de Nevéus [13]. Foi utilizando o aparelho de estudo urodinâmico MPX816 Dynapack (Dynamed, São Paulo, Brasil) acoplado a um computador com software específico. Os pacientes com MMC realizaram a cistometria em posição supina, não foram submetidos à anestesia geral ou sedação. O procedimento iniciou com a remoção da urina residual. Em seguida foi realizado cateterismo vesical transuretral com dois cateteres 4 French [19], enquanto um cateter balão foi introduzido no reto para o registro da pressão intra-abdominal. O enchimento vesical foi realizado com solução salina aquecida a temperatura corporal com velocidade de infusão de 5 a 10 mL / min. Os cateteres foram preenchidos com solução salina e os transdutores de pressão foram posicionados na sínfise púbica. Como os pacientes com MMC em estudo não relatavam a sensação do enchimento vesical ou desejo miccional o enchimento vesical foi encerrado quando o volume estimado para capacidade vesical máxima foi alcançado, na presença de dor, na perda urinária, na presença de contrações involuntárias de alta amplitude mantidas ou quando a pressão vesical atingiu 30 cm H₂O [31].

2.2.1 Pontuação (Escore) no estudo cistométrico

Esta pontuação (Escore) reflete a qualidade geral da função de armazenamento vesical e varia de 0 (pior condição) a 18 (condição normal). Foi calculada a partir dos dados da cistometria de acordo com um procedimento previamente publicado [14] usando seguintes variáveis: 1) capacidade vesical máxima estimada (ml); 2) complacência vesical (ml / cm H₂O), 3) atividade do detrusor (avaliada por três sub componentes: a) volume infundido no momento da primeira contração involuntária dito em percentual da capacidade vesical estimada, b) o número de contrações involuntárias observadas e c) magnitude das contrações) e 4) a sensação de enchimento vesical (volume vesical observado na primeira sensação). Como a sensação de enchimento vesical esteve ausente em todos os pacientes com MMC, o volume vesical na primeira contração do detrusor (como percentual de capacidade máxima vesical estimada) foi utilizado em sua substituição, conforme recomendado pelo MacNeily [14].

2.2.2 Descrição do cálculo do Escore

➤ Capacidade vesical (EV)

A capacidade vesical foi determinada pela fórmula abaixo amplamente utilizada:

$EV = 30 \times (\text{idade em anos} + 2)$ expressa em ml

Os achados são classificados de 0 a 5 de acordo com o percentual de EV achado.

Quadro 1 – Componente do escore de MacNeily: capacidade vesical (EV)

Pontuação	Percentual de EV encontrado
0	0% ou abaixo de 20%
1	20% - 39%
2	40% - 59%
3	60% - 79%
4	80% - 99%
5	100% EV ou maior

➤ Complacência vesical - EV20

Adequada complacência vesical corresponde à capacidade de armazenamento de urina com baixa pressão.

A maioria das crianças consegue armazenar 95% ou mais de sua capacidade vesical com uma pressão de enchimento abaixo de 20 cm H₂O. O volume mínimo aceitável para o armazenamento com pressão vesical inferior a 20 cm H₂O (EV20) foi caracterizado neste escore pela fórmula linear abaixo:

Volume esperado com pressão vesical inferior à 20 cm H₂O:

$EV20 = 17 \times (\text{idade em anos}) + 55 \text{ ml.}$

Os achados são classificados de 0 a 5 de acordo com percentual de EV20 encontrado.

Quadro 2 – Componente do escore de MacNeily: complacência vesical (EV 20)

Pontuação	Percentual de EV20 encontrado
0	0% à menor que 20%
1	20% - 39%
2	40% - 59%
3	60% - 79%
4	80% - 99%
5	100% EV20 ou maior

➤ Atividade do detrusor (A)

Os autores acreditaram que era importante mensurar os três componentes da atividade do detrusor durante o enchimento vesical: o volume infundido (mensurado em percentual da capacidade vesical estimada) no momento da primeira contração involuntária, o número total de contrações involuntárias e a magnitude da maior contração.

Uma contração involuntária foi definida como um aumento de 5 cm H₂O acima da linha de base da pressão do detrusor.

A pontuação dada a este componente do escore é resultante do somatório dos pontos dados ao volume, número e magnitude das contrações involuntárias dividido por três.

Quadro 3 – Componente do escore de MacNeily: Atividade do detrusor (A)

Volume observado na 1ª contração com %EV		Número total de contrações		Magnitude da maior contração	
0	menor que 25 %	0	5 contrações ou mais	0	60 cm H ₂ O ou mais
1	25% - 49%	1	4	1	45 - 60 cm H ₂ O
2	50% - 74%	2	3	2	30 - 44 cm H ₂ O
3	75% - 100%	3	2	3	15 - 29 cm H ₂ O
4	Enchimento completo	4	1	4	Menor que 15cm H ₂ O
5	Nenhum enchimento	5	Nenhuma	5	Nenhuma

➤ Sensação de enchimento vesical (B)

Pontuação de 0 a 3 foi baseada no volume infundido no momento que o paciente reporta a primeira sensação de bexiga cheia correlacionado com o percentual de EV (capacidade vesical) registrada no momento. Quando a primeira sensação não foi indicada durante o enchimento, a primeira evidencia de atividade do detrusor foi utilizada como substituto da sensação.

Quadro 4 - Componente do escore de MacNeily: Sensação de enchimento vesical: (B)

Pontuação	Percentual de EV encontrado
0	Menor que 10%
1	10% - 19%
2	20% - 29%
3	30% - 49%
3	50% -75%
2	76% -90%
1	91% -100%
0	100% EV ou mais

Pontuação (escore) total

Resulta do somatório da pontuação dos componentes. Teremos um mínimo de 0 em pacientes com um bexiga com capacidade vesical reduzida (pequena), baixa complacência, demonstrando contrações involuntárias do detrusor precoces, freqüentes e de alta amplitude e ausência de sensação de enchimento vesical e o máximo de pontuação em pacientes com parâmetros normais em todos os componentes.

Abaixo dois exemplos de cálculo do escore.

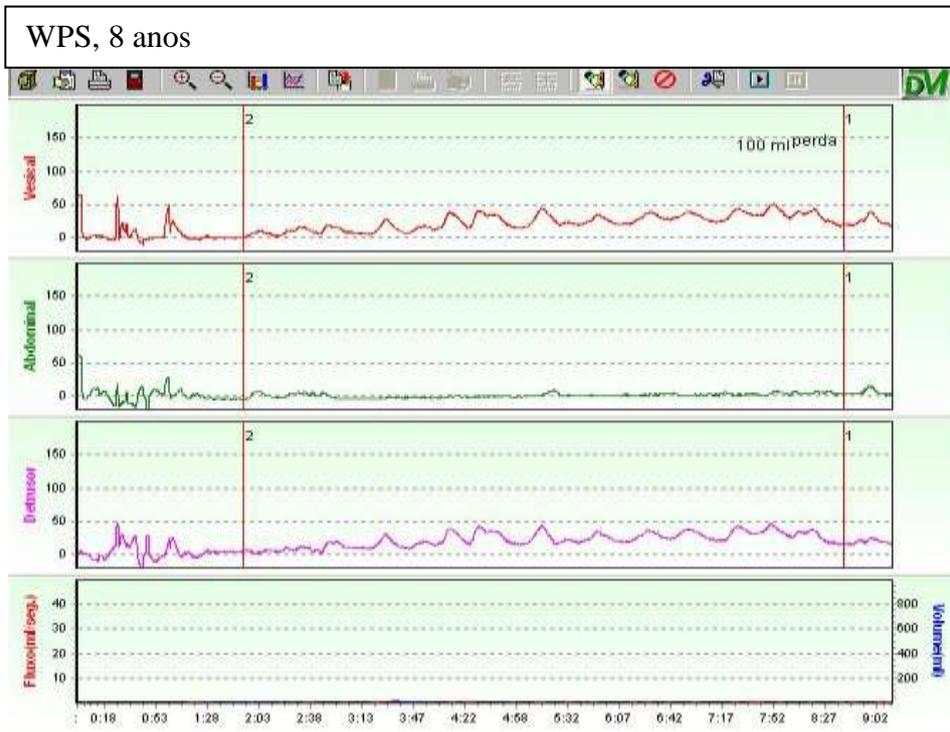


Figura 7 – Exemplo nº 1 – Escore 2,3

ESCORE = 2.3

EV (8 anos + 2 x 30 = 300ml) ----- 100ml /30% ---- 1 pt

EV 20 (17X8 anos + 55=191ml) ----- 23% ----- 1 pt

Ativ. Det. [(0 + 0 + 1) ÷ 3 = 0.3] ----- 0.3 pt

S (sensação vesical) -----CI <10%EV----- 0 pt

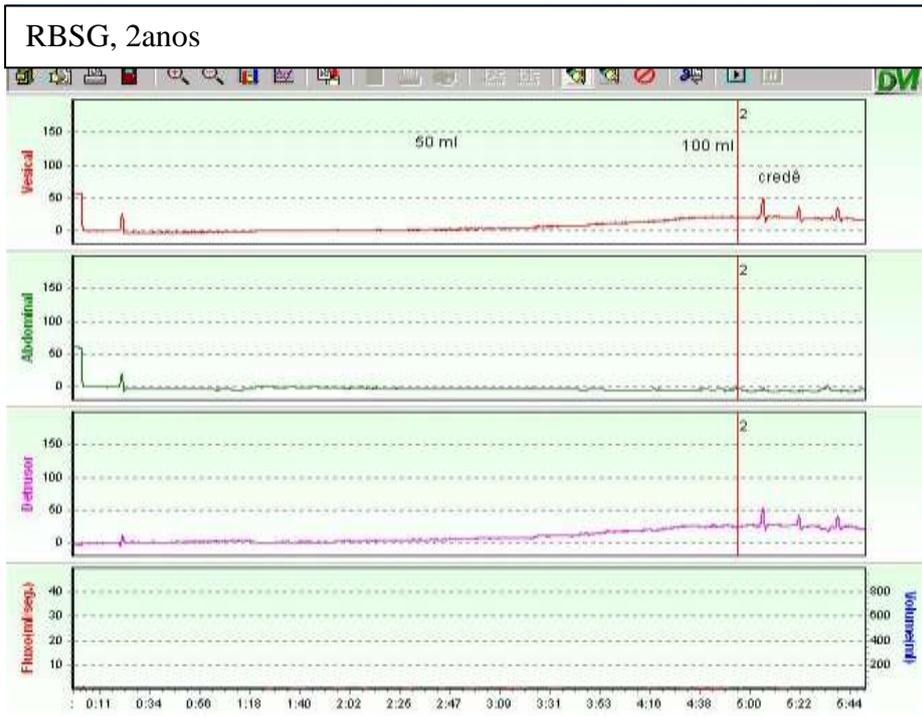


Figura 8 – Exemplo nº 2 – Escore 15

ESCORE = 15

EV (2 anos + 2 x 30 = 120ml) ----- 120ml /100% ----- 5 pt

EV 20 (17X 2 anos + 55=89ml) ----- >100%----- 5 pt

Ativ. Det. [(5 + 5 + 5) ÷ 3 = 5] ----- 5pt

S (sensação vesical)----- 0pt

2.3 Isolamento do GAG total das amostras de urina

O processamento das amostras de urina foi realizado no Laboratório de bioquímica da matriz extracelular da Unidade de Pesquisa Urogenital (Departamento de Anatomia).

O GAG total foi isolado em separado de cada amostra de urina de acordo com um protocolo previamente descrito [32]. Resumidamente, as amostras de urina foram descongeladas, filtradas em papel-filtro padrão e suas densidades foram ajustadas para <1.020 por adição de água destilada. Cloreto de cetilpiridínio foi então adicionado à urina diluída para uma concentração final de 0,1% e após 24 horas à temperatura ambiente os precipitados foram coletados por centrifugação (3000 x gravidade, 30 minutos). O precipitado foi então dissolvido em NaCl 2M e as cadeias de GAGs foram precipitadas pela adição de três volumes de etanol absoluto. Após 24 horas a -20°C a mistura foi centrifugada (3000 x gravidade, a 30 minutos) e o precipitado foi lavado com uma série de soluções de etanol. O precipitado final que consistia de GAG urinário total foi seco a 60°C , dissolvido em água destilada e mantido a -20°C até análises posteriores.

2.4 Análise dos glicosaminoglicanos

A concentração de GAG urinário total em cada uma das amostras foi determinada pela dosagem do ácido hexurônico através do método do carbazol [33] utilizando a glucuronolactona (Sigma, St. Louis, EUA) como padrão. Os resultados para a quantificação total de GAG foram então normalizados para a concentração de creatinina urinária de cada amostra, e expressos em μg de ácido hexurônico por miligramas de creatinina (μg hexua/mg creatinina).

A proporção dos diferentes tipos de GAG sulfatados (heparan sulfato, condroitin sulfato e dermatan sulfato) foi obtida por eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão pH 9,0 de 50 mM de 1,3 diaminopropano (Merck, Darmstadt, Alemanha) da preparação de GAG total juntamente com degradações específicas com condroitina-liases (Sigma, St Louis, Missouri, EUA), conforme descrito por Marocolo [32]. As placas de gel foram digitalizadas a 300 dpi em um scanner de mesa e bandas GAG em imagens digitais foram quantificadas usando a versão do software 1,43 Image J (NIH, Bethesda, Maryland, EUA). A proporção de cada tipo de GAG sulfatado foi expressa como percentual do total de GAG sulfatado.

2.5 Outras análises

As amostras de urina foram testadas com dipsticks (Multistix 10G, Bayer, Tarrytown, Nova Iorque, EUA) para os leucócitos, eritrócitos, pH, densidade, proteína total e glicose . A creatinina urinária foi determinada por um ensaio enzimático automatizado (Sera-Pack, a Bayer, Tarrytown, Nova Iorque, EUA).

2.6 Análise estatística

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados de acordo com Sokal e Rohlf [34]. Comparações entre as médias dos dois grupos foram feitas utilizando Two-tailed test (teste bicaudal). Correlação entre as variáveis foi determinada por regressão linear e pela execução do Teste t para o coeficiente de correlação. Todos os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão e significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Sabe-se que os hormônios sexuais femininos podem afetar a excreção urinária de GAG em mulheres em idade fértil [32,35], por isso primeiro foi avaliada a excreção deste metabólito em meninos e meninas separadamente. Como esperado, os resultados mostraram que a excreção urinária de GAG em meninos não foi significativamente diferente da encontrada em meninas, tanto no grupo com MMC ($0,913 \pm 0,528$ vs $0,867 \pm 0,434$, $p > 0,05$) como no controle ($0,546 \pm 0,240$ vs $0,699 \pm 0,296$, $p > 0,05$). Também foi investigada se a idade poderia afetar a excreção urinária de GAG em cada grupo. Os resultados mostraram que a excreção de GAG urinário não se correlacionou com a idade tanto no grupo com MMC ($r = -0,28$, $p > 0,05$) como no grupo controle ($r = -0,40$, $p > 0,05$) (gráfico 1 e 2). Em vista destes resultados, todas as subsequentes análises foram realizadas sem a estratificação por idade e sem distinção do sexo.

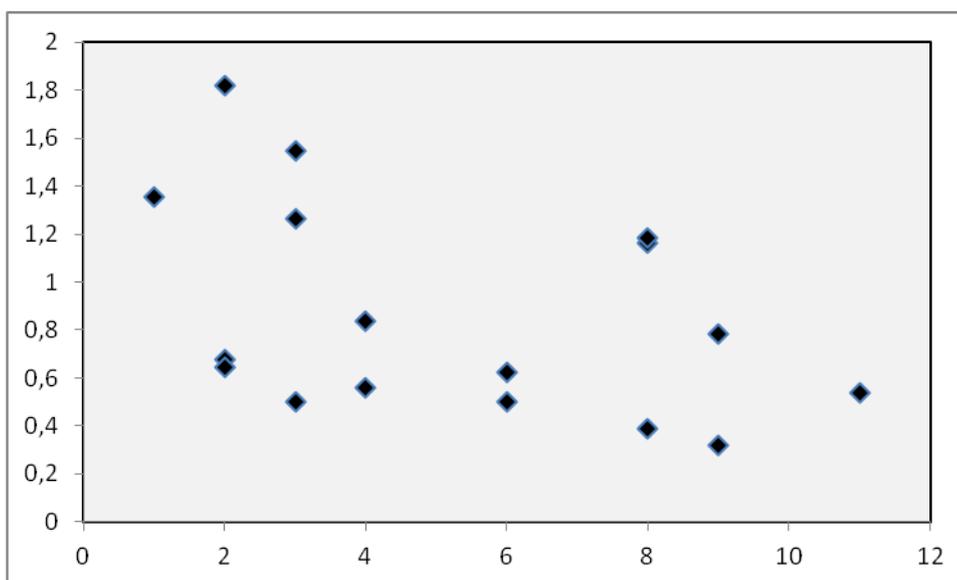


Gráfico 1 – Análise da correlação entre a excreção urinária de GAG expressa em μg de HexUA por mg de creatinina (eixo y) e a idade em anos (eixo x) no grupo com MMC. ($r = -0,28$, $p > 0,05$)

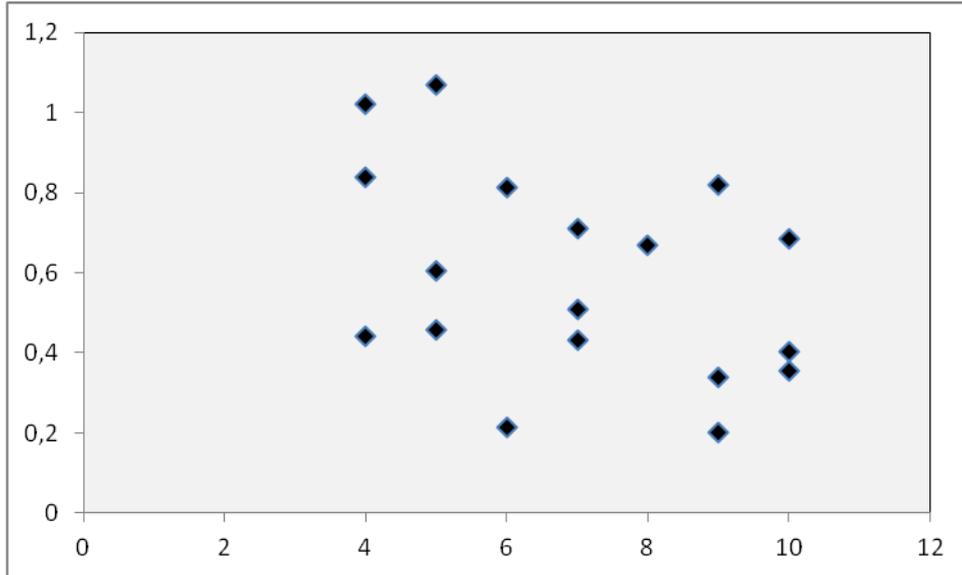


Gráfico 2 – Correlação entre a excreção urinária de GAG expressa em μg de HexUA por mg de creatinina (eixo y) e a idade em anos (eixo x) no grupo controle ($r = -0,40$, $p > 0,05$).

Usando essa abordagem, a comparação dos dois grupos mostrou que o grupo com MMC excretava 52% a mais de GAG total que o grupo controle ($0,894 \pm 0,477$ vs $0,588 \pm 0,257$, $p < 0,04$) (gráfico 3).

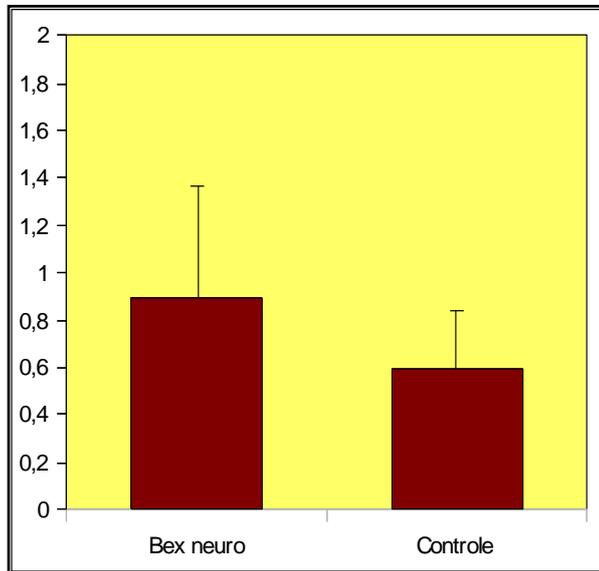


Gráfico 3- Média da excreção urinária de GAGs totais em 17 pacientes com bexiga neurogênica e 18 crianças normais (controles). A excreção urinária de GAG total foi quantificada como μg de ácido hexurônico (HexUA) por mg de creatinina urinária. As barras representam média e desvio padrão. Os dois grupos são significativamente diferentes (teste bicaudal, $p < 0,04$).

Em contraste, a quantificação dos diferentes tipos de GAGs sulfatados apresentaram valores similares para ambos grupos. Assim, o sulfato de condroitin foi o GAG sulfatado predominante nos grupos neurogênico e controles ($92,5 \pm 7,6\%$ vs $96,4 \pm 4,8\%$, respectivamente, $p > 0,05$), enquanto o sulfato do heparan estava presente em quantidades marcadamente menores; o dermatam sulfato não foi detectado (gráfico 4).

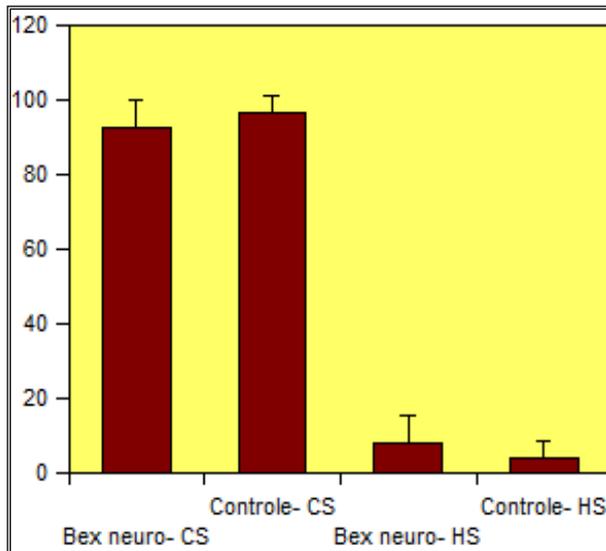


Gráfico 4- Percentual de GAGs sulfatados nos grupos neurogênico e controle

Para investigar se a gravidade da disfunção vesical nos pacientes com MMC estava associada com a excreção urinária de GAG, como demonstrado acima, utilizamos dados cistométricos de 17 pacientes com MMC. Os valores referentes a complacência vesical isoladamente não se correlacionaram com a excreção de GAG total ($r = -0,18$, $p > 0,05$) (gráfico 5). Observamos também que não existe associação entre a excreção de GAGs totais e a presença de hiperreflexia.

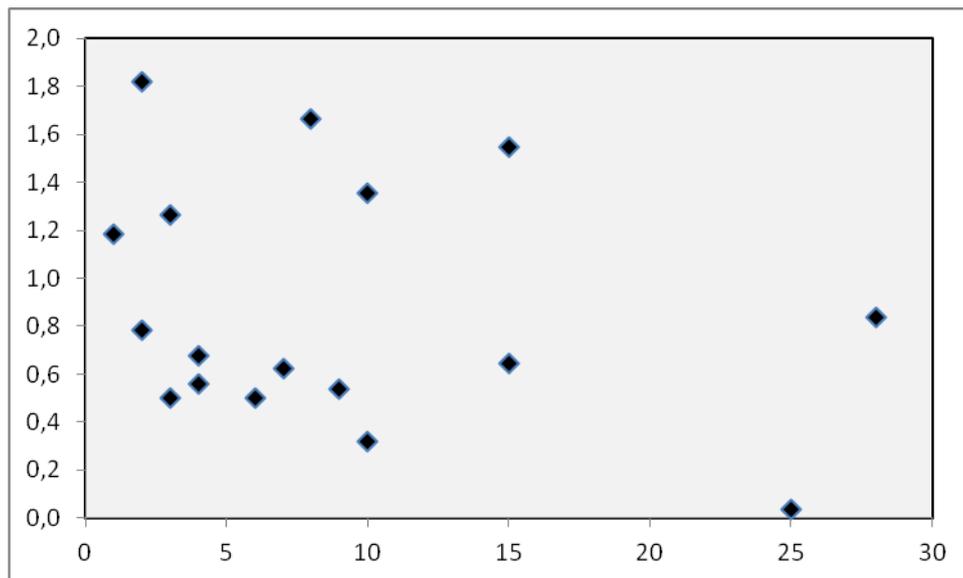


Gráfico 5- Análise da correlação entre a excreção urinária de GAG total expressa em μg de HexUA por mg de creatinina (eixo y) e a complacência vesical (eixo x) ($r = -0,18$, $p > 0,05$)

Quadro 5- Análise da associação da excreção urinária de GAG total com a presença de hiperreflexia (não há associação)

CONCENTRAÇÃO DE GAG TOTAL	HIPERREFLEXIA	
	PRESENTE	AUSENTE
ALTA	6	3
BAIXA	6	2

O escore cistométrico, que combina vários parâmetros e reflete melhor a função vesical [14], em seguida foi calculado. Como é mostrado no gráfico 6, o escore variou muito entre os pacientes, e foi significativa ($p < 0,05$) e negativamente correlacionado com a excreção de GAG total ($r = -0,56$).

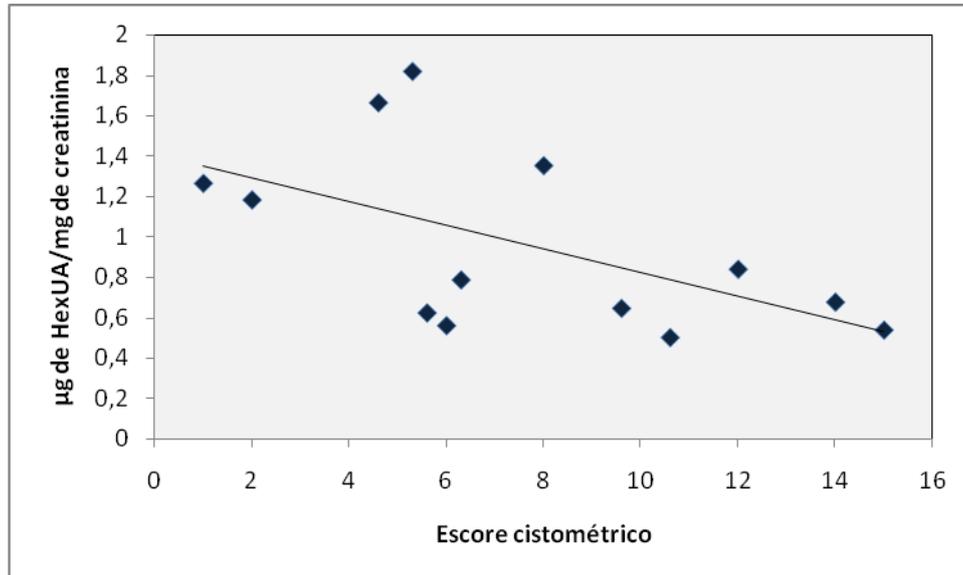


Gráfico 6 – A análise da correlação entre a excreção urinária de GAG (eixo x) e a gravidade da disfunção vesical determinada por escore cistométrico (MacNeily) (eixo y). Os dados plotados são de 13 pacientes com MMC. A regressão linear e o teste para coeficiente de correlação indicam que estas duas variáveis estão negativa e significativamente correlacionadas ($r = -0,56$, $p < 0,05$). A linha de regressão foi determinada por regressão linear e os GAGs totais foram quantificados como μg de HexUA por mg de creatinina urinária

Para melhor caracterizar essa correlação, os pacientes com MMC foram separados em dois grupos, os com maior hostilidade vesical (escores <9 , $n=8$) e os com menor hostilidade vesical (escores >9 , $n=5$). A média da excreção de GAGs totais em cada um destes subgrupos foi então calculada, e os resultados mostraram que em média os pacientes com MMC com maior hostilidade vesical excretaram 81% de GAGs a mais do que os com condições menos graves ($1,157 \pm 0,467$ vs $0,639 \pm 0,133$ respectivamente; $p < 0,04$, gráfico 7).

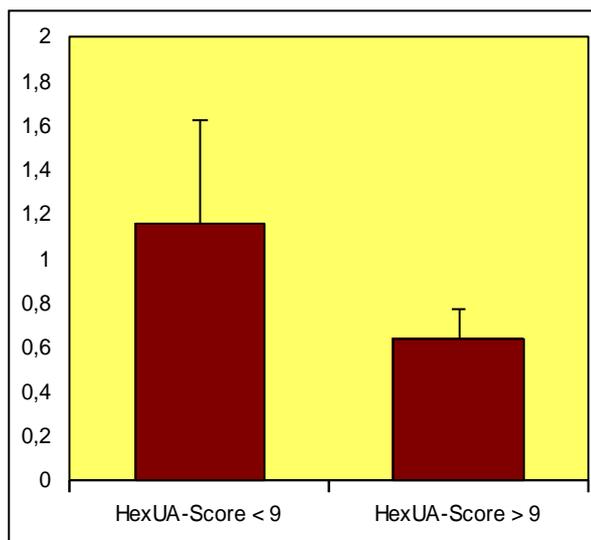


Gráfico 7 - Excreção urinária de GAG total em pacientes com menor escore (escore <9 , $n=8$) e maior escore (escore >9 , $n=5$). As barras representam as médias e desvio padrão. Os dois grupos são significativamente diferentes (teste bicaudal, $p < 0,04$).

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que crianças com bexiga neurogênica secundária a MMC que não faziam uso de medicações específicas (que atuam na contratilidade detrusora) apresentavam excreção urinária de GAG aumentada. Além disso, observamos que uma maior excreção urinária de GAG estava associada a escores cistométricos que correspondiam à maior gravidade da disfunção vesical.

Embora significativamente diferente dos controles, a excreção urinária de GAG nos pacientes com MMC mostrou-se variável, o que foi evidenciado pelo desvio padrão relativamente maior. Isto sugere que o grupo de pacientes com MMC não é homogêneo, o que foi confirmado pela análise de correlação entre a excreção de GAG e o escore cistométrico, mostrando que os pacientes podem ser divididos em grupos com menor ou maior grau de disfunção vesical. Tal fato destaca a importância da avaliação cistométrica nos pacientes com BN secundária a MMC em estudos sobre o metabolismo e a organização dos tecidos, no que se refere ao trato urinário.

Ghoniem [20] observou em análises histológicas de tecidos obtidos de biópsias vesicais, um acúmulo de tecido conjuntivo na parede vesical de crianças com MMC, mais especificamente um aumento do colágeno no sub urotélio e na mucosa. Observou em relação às propriedades ativa e passiva do tecido uma maior rigidez e menor complacência. Por outro lado, estudo em modelo animal com MMC induzida por ácido retinóico sugere que a hiperestimulação das células neurais afeta sensivelmente o conteúdo de colágeno tipo 1, que apresenta-se diminuído [36]. Esses resultados, portanto indicam que o turnover da MEC na parede vesical está alterado na MMC. Isto por sua vez é consistente com o fato de que células musculares lisas que desempenham papel importante na MEC da parede vesical de pacientes com MMC apresentam alterações ultra estruturais [24].

A observação da expressão aumentada do fator de crescimento fibroblástico e de tipos de colágeno em cultura de células musculares lisas obtidas de crianças com MMC [37] indica que essas células são fenotipicamente alteradas e que a maior expressão dessas proteínas não é dependente imediatamente do estímulo neural. Esta possibilidade implica em alteração precoce no desenvolvimento dessas células, o que é consistente com o fato de que crianças que foram submetidas a reparo cirúrgico da MMC intra útero apresentam também alterações urodinâmicas e morfológicas [38], da mesma forma que crianças que foram submetidas à correção cirúrgica pós natal [39, 40].

Além disso, pacientes idosos com sintomas irritativos do trato urinário baixo, que sofrem de hiperatividade detrusora apresentam excreção urinária de GAG diminuída [30] o que fornece mais suporte a idéia de que a alteração no turnover de PG na MMC é mediada por outros fatores além da hiperestimulação do detrusor.

Embora não existam evidências diretas que demonstrem que o turnover de PG está alterado no trato urinário de crianças com MMC, os resultados acima demonstram alterações em outros componentes da MEC e em células musculares do detrusor o que sugere que os PG podem também estar afetados.

De fato, o fator de crescimento fibroblástico é conhecido por promover a síntese de PG [41] e aumentar a expressão da matriz metaloproteinase, grupo de enzimas (endopeptidases) que exercem atividades proteolíticas regulando a composição da MEC [42, 43] e por conseguinte degradando PG.

Estas duas condições seriam favoráveis ao aumento na liberação de cadeias de GAGs no espaço urinário e poderia ser um mecanismo subjacente a excreção urinária aumentada dessas moléculas em crianças com MMC, como demonstrado pelos resultados.

Nossos resultados sugerem que as condições alteradas observadas na MMC atingem de forma semelhante todas as classes de PG envolvidos, já que não houve alterações significativas nas concentrações urinárias de diferentes tipos de GAGs.

Por outro lado, técnicas de imunohistoquímica demonstraram que em humanos há predomínio do sulfato de condroitin na parede vesical, especialmente no urotélio [44]. Na medida em que o turnover de PG no trato urinário é a principal fonte de cadeias de GAGs na urina [26], os resultados desses estudos imunohistoquímicos publicados são consistentes com nossos resultados que demonstram um predomínio do sulfato de condroitin em todas as amostras de urina.

A gravidade da disfunção vesical em pacientes com MMC é variável [45], isto é claramente demonstrado pelos diferentes escores cistométricos encontrados. Além disso, nossos resultados mostraram que os pacientes com MMC com disfunção mais severa, isto é com menores escores cistométricos, apresentavam uma maior excreção de GAG.

Portanto esses pacientes devem ter um turnover de PG mais acentuado, além de alterações já mencionadas relacionadas aos demais componentes da MEC [20, 36,37].

Alterações no conteúdo e na composição da MEC afetam as propriedades viscoelásticas da parede vesical [21,22], portanto a disfunção vesical na MMC pode não estar somente relacionada a modificações na estrutura e função do detrusor, como já demonstrado [24,40], mas também à alterações da MEC.

É interessante notar que a associação entre a gravidade das alterações metabólicas vesicais e modificações na estruturas das células musculares vesicais com o aumento da excreção urinária de GAG, evidencia de forma adicional, de que os metabólitos de PG se originam principalmente do trato urinário, como anteriormente sugerido [26].

Vários estudos demonstraram que a excreção urinária aumentada de GAG está relacionada a determinadas patologias. Por exemplo, na litíase renal as cadeias de GAGs inibem o crescimento de cristais, a aglomeração e a adesão através de interações específicas [46]. Mecanismos moleculares semelhantes explicam outros efeitos dos GAGs urinários tais como contra a infecção urinária [47] e a cistite intersticial [11]. Assim, a excreção urinária aumentada de GAG na BN/MMC como descrita aqui, pode ter repercussões assim como estar relacionada a outras eventuais patologias do trato urinário concomitantes.

5 CONCLUSÃO

A excreção urinária de glicosaminoglicanos em pacientes portadores de bexiga neurogênica é significativamente maior que em crianças normais e está relacionada a um maior comprometimento da função vesical. Esses dados indicam que a quantificação da excreção urinária de glicosaminoglicanos pode ser usada como um fator adjuvante para a caracterização da disfunção vesical em pacientes com bexiga neurogênica secundária à mielomeningocele.

REFERÊNCIAS

1. Sutherland RS, Mevorach RA, Baskin LS, Kogan BA. Spinal dysraphism in children: an overview and an approach to prevent complications. *Urology*. 1995 Sep;46(3):294-304.
2. Van Allen MI, Fraser FC, Dallaire L, Allanson J, McLeod DR, Andermann E, et al. Recommendations on the use of folic acid supplementation to prevent the recurrence of neural tube defects. Clinical Teratology Committee, Canadian College of Medical Geneticists. *CMAJ*. 1993 Nov 1;149(9):1239-43.
3. Forman R, Singal N, Perelman V, Chou S, Hoffman L, Parkin P, et al. Folic acid and prevention of neural tube defects: a study of Canadian mothers of infants with spina bifida. *Clin Invest Med*. 1996 Jun;19(3):195-201.
4. Arora G, Narasimhan KL, Saxena AK, Kaur B, Mittal BR. Risk factors for renal injury in patients with meningocele. *Indian Pediatr*. 2007 Jun;44(6):417-20.
5. Bauer SB. Neurogenic bladder: etiology and assessment. *Pediatr Nephrol*. 2008 Apr;23(4):541-51.
6. Hunter AG, Cleveland RH, Blickman JG, Holmes LB. A study of level of lesion, associated malformations and sib occurrence risks in spina bifida. *Teratology*. 1996 Nov;54(5):213-8.
7. MacLellan DL. Management of pediatric neurogenic bladder. *Curr Opin Urol*. 2009 Jul;19(4):407-11.
8. Blaivas JG. The neurophysiology of micturition: a clinical study of 550 patients. *J Urol*. 1982 May;127(5):958-63.
9. Stohrer M, Blok B, Castro-Diaz D, Chartier-Kastler E, Del Popolo G, Kramer G, et al. EAU guidelines on neurogenic lower urinary tract dysfunction. *Eur Urol*. 2009 Jul;56(1):81-8.
10. Rovner ES, Goudelocke CM. Urodynamics in the evaluation of overactive bladder. *Curr Urol Rep*. 2010 Sep;11(5):343-7.
11. Wei DC, Politano VA, Selzer MG, Lokeshwar VB. The association of elevated urinary total to sulfated glycosaminoglycan ratio and high molecular mass hyaluronic acid with interstitial cystitis. *J Urol*. 2000 May;163(5):1577-83.
12. Lee C, Goldman H. The Overactive Bladder: New Concepts of Etiology and Treatment. *Current Bladder Dysfunction Reports*. 2010 5(3):126-34.
13. Neveus T, von Gontard A, Hoebeke P, Hjalmas K, Bauer S, Bower W, et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function in children and adolescents: report from the Standardisation Committee of the International Children's Continence Society. *J Urol*. 2006 Jul;176(1):314-24.

14. MacNeily AL, Leonard MP, Metcalfe PD, Casale A, Guerra L, Steinbok P, et al. Development of an objective score to quantify the pediatric cystometrogram. *J Urol*. 2007 Oct;178(4 Pt 2):1752-6; discussion 6-7.
15. Yeung CK, Godley ML, Duffy PG, Ransley PG. Natural filling cystometry in infants and children. *Br J Urol*. 1995 Apr;75(4):531-7
16. Ichino M, Igawa Y, Seki S, Iijima K, Ishizuka O, Nishizawa O. The nature of high-pressure voiding in small boys and its relation with the influence of a transurethral catheter. *Neurourol Urodyn*. 2008;27(4):319-23.
17. Alexander MS, Biering-Sorensen F, Bodner D, Brackett NL, Cardenas D, Charlifue S, et al. International standards to document remaining autonomic function after spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2009 Jan;47(1):36-43.
18. Verpoorten C, Buyse GM. The neurogenic bladder: medical treatment. *Pediatr Nephrol*. 2008 May;23(5):717-25.
19. Silva JA, Gonsalves Mde C, Saverio AP, Oliveira IC, Carrerette FB, Damiao R. Lower urinary tract dysfunction and ultrasound assessment of bladder wall thickness in children with cerebral palsy. *Urology*. 2009 Oct;76(4):942-5.
20. Ghoniem GM, Shoukry MS, Hassouna ME. Detrusor properties in myelomeningocele patients: in vitro study. *J Urol*. 1998 Jun;159(6):2193-6.
21. Nagatomi J, Gloeckner DC, Chancellor MB, DeGroat WC, Sacks MS. Changes in the biaxial viscoelastic response of the urinary bladder following spinal cord injury. *Ann Biomed Eng*. 2004 Oct;32(10):1409-19.
22. Nagatomi J, Toosi KK, Chancellor MB, Sacks MS. Contribution of the extracellular matrix to the viscoelastic behavior of the urinary bladder wall. *Biomech Model Mechanobiol*. 2008 Oct;7(5):395-404.
23. Brierly RD, Hindley RG, Thomas PJ. Focal changes in nerve, muscle and connective tissue in normal and unstable human bladder. *BJU Int*. 2000 Aug;86(3):407.
24. Haferkamp A, Dorsam J, Resnick NM, Yalla SV, Elbadawi A. Structural basis of neurogenic bladder dysfunction. II. Myogenic basis of detrusor hyperreflexia. *J Urol*. 2003 Feb;169(2):547-54.
25. Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Oct;11(5):634-40.
26. Lee EY, Kim SH, Whang SK, Hwang KY, Yang JO, Hong SY. Isolation, identification, and quantitation of urinary glycosaminoglycans. *Am J Nephrol*. 2003 May-Jun;23(3):152-7.
27. Ferrara P, Rigante D, Lambert-Gardini S, Salvaggio E, Ricci R, Chiozza ML, et al. Urinary excretion of glycosaminoglycans in patients with isolated nocturnal enuresis or combined with diurnal incontinence. *BJU Int*. 2000 Nov;86(7):824-5.

28. Salvaggio E, Antuzzi D, Ferrara P, Scanu M, Pulitano S, Venuti L, et al. Glycosaminoglycans: urinary excretion in children with myelomeningocele. *Urol Int*. 2001;66(3):156-9.
29. Harangi F, Gyorke Z, Melegh B. Urinary glycosaminoglycan excretion in healthy and stone-forming children. *Pediatr Nephrol*. 1996 Oct;10(5):555-8.
30. Siracusano S, Cucchi A, Ciciliato S, Lampropoulou N, Vittur F. Urinary levels of glycosaminoglycans in patients with idiopathic detrusor overactivity. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2009 Dec;20(12):1477-80.
31. Norgaard JP, van Gool JD, Hjalmas K, Djurhuus JC, Hellstrom AL. Standardization and definitions in lower urinary tract dysfunction in children. *BJ Urol*. 1998 81(Suppl.3):1-6
32. Maroclo MV, Pereira SD, Sampaio FJ, Cardoso LE. Urinary glycosaminoglycan excretion during the menstrual cycle in normal young women. *J Urol*. 2005 May;173(5):1789-92.
33. Taylor K and Buchanan-Smith J. A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Anal Biochem*. 201:190,1992
34. Sokal R and Rohlf F. *Biometry*, 3rd ed. New York:W.H.Freeman, p.887, 1995.
35. Zamboni MJ, Cabral CA, Sampaio FJ, Cardoso LE. Oral hormonal contraceptives affect the concentration and composition of urinary glycosaminoglycans in young women. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2009 Nov;20(11):1353-9
36. Danzer E, Kiddoo DA, Redden RA, Robinson L, Radu A, Zderic SA, et al. Structural and functional characterization of bladder smooth muscle in fetal rats with retinoic acid-induced myelomeningocele. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jan;292(1):F197-206.
37. Hipp JA, Hipp JD, Yoo JJ, Atala A, Andersson KE. Microarray analysis of bladder smooth muscle from patients with myelomeningocele. *BJU Int*. 2008 Sep;102(6):741-6.
38. Holmes NM, Nguyen HT, Harrison MR, Farmer DL, Baskin LS. Fetal intervention for myelomeningocele: effect on postnatal bladder function. *J Urol*. 2001 Dec;166(6):2383-6.
39. Kessler TM, Lackner J, Kiss G, Rehder P, Madersbacher H. Predictive value of initial urodynamic pattern on urinary continence in patients with myelomeningocele. *Neurourol Urodyn*. 2006;25(4):361-7.
40. Thorup J, Biering-Sorensen F, Cortes D. Urological outcome after myelomeningocele: 20 years of follow-up. *BJU Int*. 2010 Sep 22.
41. Veilleux N, Spector M. Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13:278-86.

42. Pintucci G, Yu PG, Sarony R, Baumann FG, Saponara F, Frasca A, Galloway AC, Moscatelli D, Mignatti P. Induction of stromelysin-1 (MMP-3) by fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in FGF-2/microvascular endothelial cells require prolonged activation of extracellular signal-regulated kinases-1 and -2 (ERK-1/2). *J Cell Biochem.* 2003;90:1015-25.
43. Yasui H, Andoh A, Bamba S, Inatomi O, Ishida H, Fujiyama Y. Role of fibroblast growth factor-2 in the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human intestinal myofibroblasts. *Digestion.* 2004;69:34-36.
44. Slobodov G, Feloney M, Gran C, Kyker KD, Hurst RE, Culkin DJ. Abnormal expression of molecular markers for bladder impermeability and differentiation in the urothelium of patients with interstitial cystitis. *J Urol.* 2004;171:1554-8.
45. Bowman RM, Boshnjaku V, McLone DG. The changing incidence of myelomeningocele and its impact on pediatric neurosurgery: a review from the Children's Memorial Hospital. *Childs Nerv Syst.* 2009;25:801-6.
46. Boevé ER, Cao LC, Verkoelen CF, Romijn JC, de Bruijn WC, Schröder FH. Glycosaminoglycans and other sulphated polysaccharides in calculogenesis of urinary stones. *World J Urol.* 1994;12:43-8.
47. Stabellini G, Calastrini C, Gilli P, Bedani PL. Urinary glycosaminoglycans in recurrent urinary tract infections in kidney transplant patients. *Biomed Pharmacother.* 1999 Jun; 53(5-6):274-7.

APÊNDICE A - Modelo de consentimento informado para o grupo portador de BN



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO – FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA GERAL

**PROGRAMA de PÓS-GRADUAÇÃO em FISIOPATOLOGIA e CIÊNCIAS
CIRÚRGICAS**

Mestrado e Doutorado

<http://www.fisiocirurgiauerj.org/>

CONSENTIMENTO INFORMADO

Prezados pais,

Nós fazemos parte de uma equipe reconhecida internacionalmente no meio médico científico e um dos nossos projetos é sobre a quantificação de certas substâncias (glicosaminoglicanos) excretadas na urina de crianças portadoras de Bexiga Neurogênica.

Solicito a doação de uma (1) amostra de urina de seu filho(a), que será colhida no momento do cateterismo vesical evacuador realizado no exame urodinâmico. A amostra será congelada imediatamente e posteriormente será submetida a dosagem de creatinina urinária, além é claro da quantificação dos glicosaminoglicanos. É importante deixar claro que caso você decida fazer a doação, os resultados de nossos estudos, assim como os resultados destes exames estarão disponíveis para o seu conhecimento.

Eu,

(Nome completo do responsável em letra de imprensa)

declaro estar ciente do que foi exposto acima e autorizo a utilização, para fins científicos da amostra de urina de meu (minha) filho(a) _____
(Nome completo em letra de imprensa)

Rio de Janeiro, ___/ ___/ ___

Rio de Janeiro, ___/ ___/ ___

Doutoranda: Isabel Cristina da Silva Soito
Orientador: Luiz Eduardo Macedo Cardoso

APÊNDICE B - Modelo de consentimento informado para o grupo controle



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO – FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA GERAL

PROGRAMA de PÓS-GRADUAÇÃO em FISIOPATOLOGIA e CIÊNCIAS
CIRÚRGICAS

Mestrado e Doutorado

<http://www.fisiocirurgiauerj.org/>

CONSENTIMENTO INFORMADO

Prezados pais,

Nós fazemos parte de uma equipe reconhecida internacionalmente no meio médico científico e um dos nossos projetos é sobre a quantificação de certas substâncias (glicosaminoglicanos) excretadas na urina de crianças portadoras de Bexiga Neurogênica. Para que o estudo possa ser concluído necessitamos de um grupo de doadores de urina sem patologias abaixo dos 10 anos de idade, para podermos comparar os resultados.

Solicito a doação de uma (1) amostra de urina de seu filho(a), que será colhida por você mesmo(a) em sua própria casa, na parte da manhã. A amostra deverá ser congelada imediatamente e entregue a nós congelada. A amostra será submetida a testes de elementos anormais e sedimento e dosagem de creatinina urinária, além é claro da quantificação dos glicosaminoglicanos. É importante deixar claro que caso você decida fazer a doação, os resultados de nossos estudos, assim como os resultados destes exames estarão disponíveis para o seu conhecimento.

Eu,

 (Nome completo do responsável em letra de imprensa)

declaro estar ciente do que foi exposto acima e autorizo a utilização, para fins científicos da amostra de urina de meu (minha) filho(a) _____ - _____

(Nome completo em letra de imprensa)

 Rio de Janeiro, ___/___/___

 Rio de Janeiro, ___/___/___

Doutoranda: Isabel Cristina da Silva Soito (matrícula D0620636)

Orientador: Luiz Eduardo Macedo Cardoso

ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Rio de Janeiro, 01 de setembro de 2010

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Aut. Isabel Cristina da Silva Soito
Orient. Prof. Luiz Eduardo M. Cardoso

Registro CEP/HUPE: 2423 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)
CAAE: 0053.0.228.000-09

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "EXCREÇÃO URINÁRIA DE GLICOSAMINOGLICANOS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS PORTADORES DE BEXIGA NEUROGÊNICA POR MIELOMENINGOCELE" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sa., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa