

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

POLIMORFISMO DO GENE *COL1A1* EM MULHERES COM
INCONTINÊNCIA URINÁRIA DE ESFORÇO

ANA MARIA PEARCE BRITO DE ARÊA LEÃO

TERESINA

2009

ANA MARIA PEARCE BRITO DE ARÊA LEÃO

POLIMORFISMO DO GENE *COL1A1* EM MULHERES COM
INCONTINÊNCIA URINÁRIA DE ESFORÇO

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde, área de concentração: Métodos diagnósticos e análise das condições de saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Semiramis Jamil Hadad do Monte

TERESINA

2009

Ana Maria Pearce Brito de Arêa Leão

**POLIMORFISMO DO GENE COL1A1 EM MULHERES COM
INCONTINÊNCIA URINÁRIA DE ESFORÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde, área de concentração: Métodos diagnósticos e análise das condições de saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Semiramis Jamil Hadad do Monte

Aprovada em: 27/04/2009

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Semiramis Jamil Hadad do Monte- UFPI
Presidente

Prof. Dr. Ricardo Muniz Ribeiro- USP
Examinador

Prof. Dr. Alberto Pereira Madeiro- UESPI
Examinador

Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva- NOVAFAPI
Examinador Suplente

Aos meus pais, pelo incentivo
e apoio em todas as etapas
da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois, sem sua ajuda, nada teria sido possível.

À Orientadora Prof^a Dr^a Semiramis Jamil Hadad do Monte, pela confiança, paciência e pelo exemplo de seriedade científica.

Ao Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva por todos os ensinamentos e pela importante participação em todas as etapas desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Adail Fonseca de Castro, pela motivação.

Aos colegas, Rubens Santana, Raimundo Nonato da Silva, Cristina Miranda Borges, Anaregina de Sousa Araújo do Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB), pela disponibilidade e ensinamentos das técnicas de extração de DNA, PCR e RFLP.

A todos os funcionários e técnicos do LIB pela simpatia, dedicação e disposição em colaborar com esta pesquisa.

Aos funcionários do Hospital São Marcos, pela importante colaboração na coleta das amostras de sangue.

Aos meus pais, Ana e Arêa, e irmãos, Suzy, Neuza e Alexandre, por sempre terem me incentivado.

Ao meu esposo, Fernando, pela eterna compreensão e apoio nas horas difíceis.

Aos amigos Joaquim Xavier de Sousa Júnior e Lorena Maria Barros Brito, pelo companheirismo e amizade.

À Maria, a minha mais nova razão de viver.

RESUMO

ARÊA LEÃO, A. M. P. B. **Polimorfismo do gene COLIA1 em mulheres com Incontinência Urinária de Esforço**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Ciências e Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.

INTRODUÇÃO: A etiopatogenia da Incontinência Urinária de Esforço é complexa e não está totalmente compreendida, no entanto, existem evidências de um sinergismo entre fatores ambientais e genéticos no seu desenvolvimento, o que a caracteriza uma doença multifatorial. O presente trabalho teve como objetivo determinar a associação do polimorfismo G/T no sítio Sp1 do intron 1 do gene *COLIA1* e Incontinência Urinária de Esforço. **MÉTODO:** Trata-se de um estudo caso-controle. Foram avaliadas 29 pacientes com Incontinência Urinária de Esforço demonstrada urodinamicamente e 22 pacientes continentas, pareadas para idade, Índice de massa corpórea, número de gestações, tabagismo, transição menopausal, fase do ciclo menstrual e estadiamento do prolapso genital. Os DNAs genômicos foram extraídos de leucócitos do sangue periférico. O fragmento codificante do sítio Sp1 localizado no intron 1 do gene *COLIA1* foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase. A identificação do polimorfismo foi realizada pela *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). As frequências genotípicas GG, GT e TT foram comparadas entre pacientes continentas e incontinentes. Para análise estatística foram utilizados os testes de Fisher e Mann Whitney. **RESULTADOS:** No grupo total, 56,8% (29) das pacientes apresentou o genótipo GG e 43,1% (22), o genótipo GT. A distribuição do genótipo polimórfico GT não apresentou diferença estatisticamente significativa entre pacientes incontinentes (44,8%) e continentas (40,9%) ($p=1$). **CONCLUSÃO:** A diversidade genética do gene *COLIA1* não constitui um dos fatores principais da determinação de diferenças interindividuais de susceptibilidade à Incontinência Urinária de Esforço na população estudada.

Palavras-chave: Polimorfismo Sp1. Gene *COLIA1*. Incontinência Urinária de Esforço.

ABSTRACT

ARÊA LEÃO, A. M. P. B. **Polymorphism of the *COLIA1* gene in women with stress urinary incontinence** . 2009. Dissertation (Master) – Master's Program in Science and Health, Federal University of Piauí, Teresina- PI.

INTRODUCTION: The pathogenesis of stress urinary incontinence is complex and not fully understood; however, there is evidence of a synergism between environmental and genetic factors in its development, which characterizes it as a multi-factorial disease. The aim of this study was to assess the association between the G/T polymorphism at the Sp1 binding site of the gene *COLIA1* gene and stress urinary incontinence. **METHOD:** This is a case-control study. The sample consisted of 29 female patients with urodynamically defined stress urinary incontinence and 22 female continent patients, matched for age, body mass index, number of pregnancies, smoking habits, menopausal status, phase of the menstrual cycle and stage of genital prolapse. Genomic DNAs were extracted from peripheral blood leukocytes. The coding fragment of the Sp1 site located in the intron 1 of the *COLIA1* gene was amplified by a Polymerase Chain Reaction. Identification of the polymorphism was carried out by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). The genotypic frequencies GG, GT and TT were compared between continent and incontinent patients. Fisher and Mann Whitney tests were used for statistical analysis. **RESULTS:** The GG genotype was present in 56.8% (29) of the patients and 43.1% (22) of the patients had the GT genotype. The GT polymorphic genotype distribution showed no statistically significant difference between incontinent (44.8%) and continent (40,9%) patients ($p = 1$). **CONCLUSION:** The genetic diversity of the *COLIA1* gene is not one of the main factors determining inter-individual differences of susceptibility to stress urinary incontinence in the studied sample.

Key Words: Sp1 polymorphism. *COLIA1* gene. Stress urinary incontinence

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACD	Ácido citrato dextrose
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Tri Fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic acid)
ICS	Sociedade Internacional de Continência (International Continence Society)
IMC	Índice de massa corpórea
IU	Incontinência Urinária
IUE	Incontinência Urinária de Esforço
MEC	Matriz extra-celular
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
P1	Primer 1
P2	Primer 2
P3	Primer 3
P4	Primer 4
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
POP-Q	Pelvic Organ Prolapse Quantification
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfism
rs	Reverse
RNAse	Ribonuclease
RNA _m	Ácido Ribonucléico (Ribonucleic acid) mensageiro
SNP	Polimorfismo de base única (Single-nucleotide polymorphism)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Te	Teresina

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Comparação de características clínicas e demográficas de pacientes incontinentes e continentas, com respectivo nível de significância, atendidas no Hospital São Marcos, Teresina, Piauí, no período de 02 de outubro de 2007 a 22 de dezembro de 2008.----- 33
- Tabela 2- Distribuição dos estágios de prolapso genital de acordo com a classificação *Pelvic Organ Prolapse Quantification* (POP-Q) entre pacientes incontinentes e continentas atendidas no Hospital São Marcos, Teresina, Piauí, no período de 02 de outubro de 2007 a 22 de dezembro de 2008.----- 34
- Tabela 3- Freqüências(%) alélicas e genótípicas, com respectivos *odds ratio*, intervalo de confiança e nível de significância, entre pacientes incontinentes e continentas atendidas no Hospital São Marcos, Teresina, Piauí, no período de 02 de outubro de 2007 a 22 de dezembro de 2008.----- 35
- Tabela 4- Dados clínicos das pacientes incontinentes atendidas no Hospital São Marcos, Teresina, Piauí, no período de 02 de outubro de 2007 a 22 de dezembro de 2008.----- 54
- Tabela 5- Dados clínicos das pacientes continentas atendidas no Hospital São Marcos, Teresina, Piauí, no período de 02 de outubro de 2007 a 22 de dezembro de 2008.----- 55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Revisão de literatura.....	13
1.1.1	Mecanismo de Continência Urinária Feminina.....	13
1.1.2	Etiopatogenia da Incontinência Urinária.....	13
1.1.3	Diagnóstico da Incontinência Urinária de Esforço.....	15
1.1.4	Alterações do colágeno na Incontinência Urinária de Esforço.....	16
1.1.5	Fator genético e Incontinência Urinária de Esforço.....	18
1.1.6	Polimorfismo.....	20
1.1.7	Polimorfismo do gene <i>COL1A1</i> e colágeno tipo I.....	21
1.1.8	Polimorfismo do gene <i>COL1A1</i> e Incontinência Urinária de Esforço	22
2	OBJETIVO.....	23
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	24
3.1	Tipo de estudo.....	24
3.2	Local do estudo.....	24
3.3	Amostra.....	24
3.3.1	Critérios de elegibilidade.....	24
3.3.2	Diagnóstico de IUE.....	24
3.3.2.1	Teste de esforço.....	25
3.3.2.2	Estudo urodinâmico.....	25
3.3.2.2.1	Fluxometria.....	25
3.3.2.2.2	Cistometria.....	25
3.3.2.2.3	Estudo miccional.....	26
3.3.2.3	Estadiamento do prolapso genital.....	26
3.3.3	Coleta de dados.....	27

3.4	Variáveis analisadas.....	27
3.5	Análise genética.....	28
3.5.1	Extração do DNA.....	28
3.5.2	Concentração e pureza da amostra.....	28
3.5.3	Armazenamento do DNA.....	29
3.5.4	Iniciadores.....	29
3.5.6	Amplificação do DNA.....	29
3.5.7	Detecção do polimorfismo.....	30
3.6	Análise estatística.....	30
3.6.1	Teste de Mann-Whitney.....	31
3.6.2	Teste exato de Fisher.....	31
3.7	Aspectos éticos.....	31
4	RESULTADOS.....	32
4.1	Pacientes estudadas.....	32
4.2	Freqüência dos genótipos.....	34
5	DISCUSSÃO.....	36
6	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41
	APÊNDICES	50

1 INTRODUÇÃO

A incontinência urinária (IU) é definida como toda perda involuntária de urina (ABRAMS et al, 2002). Devido aos elevados índices de incidência e prevalência e do importante impacto que exerce sobre a qualidade de vida da população, esta condição é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo. Estudos no Brasil mostram taxas de prevalência, em mulheres com idade superior a 40 anos, que variam entre 37,81% e 56,25% (BELLOTE; AGOSTINHO, 2005).

A IU, como sintoma, pode ser classificada em incontinência urinária de esforço (IUE), urge-incontinência e incontinência urinária mista. A IUE é definida como a perda de urina que ocorre após esforços, exercícios físicos, espirros e/ou tosse (ABRAMS et al, 2002). É o tipo mais freqüente de IU, correspondendo a 48% dos casos (HUNSKAAR et al, 2000). A urge-incontinência caracteriza-se pela perda involuntária de urina acompanhada ou imediatamente precedida pela sensação de urgência. Já incontinência urinária mista seria a perda involuntária de urina associada ao esforço e à sensação de urgência (ABRAMS et al, 2002).

A fisiopatologia da IUE é complexa e não está totalmente compreendida. Já é bem estabelecido que vários fatores, como raça, obesidade, idade avançada, partos vaginais e instrumentalizados, aumentam o risco para esta condição (DANFORTH et al, 2006). O motivo que leva, no entanto, algumas mulheres, na ausência de fatores de risco, a desenvolverem IUE e mulheres, com vários fatores, nunca apresentarem sintomas de incontinência, permanece desconhecido (CHEN et al, 2006).

Como conseqüência do desconhecimento de seu principal fator determinante, podemos enumerar mais de 120 procedimentos cirúrgicos criados, na tentativa de cura para IUE, com taxa de sucesso muito aquém do esperado e inúmeras cesáreas indicadas com objetivos profiláticos, desprovidas de quaisquer evidências científicas (RECHBERGER et al, 1998; DECLERCQ, MENACKER, MACDORMAN, 2005). Uma recente pesquisa realizada nos Estados Unidos mostrou que 65,4% e 29,6% de uroginecologistas e obstetras, respectivamente, realizaram ou realizariam uma cesárea eletiva e que 62,1% dos uroginecologistas justificavam a sua realização para a prevenção de IU a longo prazo (WU; HUNDLEY; VISCO, 2005).

Segundo a teoria integral, o principal mecanismo de continência urinária feminina seria constituído por um suporte suburetral, formado por estruturas musculares e ligamentos, ou seja, tecido conjuntivo de boa qualidade, contra o qual

a uretra seria comprimida, em situações de aumento da pressão abdominal (PETROS; ULMSTEN, 1990). Com o advento desta nova teoria, surgiram numerosos estudos com o objetivo de analisar o papel das diferenças na constituição do tecido conjuntivo, principalmente em relação a alterações qualitativas e quantitativas do colágeno, na gênese da IUE (KEANE et al, 1997; FALCONER et al, 1998a; RECHBERGER et al, 1998; LIAPIS et al, 2000; LANG et al, 2002; COR; BARBIC; KRALJ, 2003; GOEPEL et al, 2003; CHEN et al, 2004). Além disso, trabalhos epidemiológicos também têm demonstrado a associação de fatores genéticos com IUE, através de estudos com familiares de pacientes incontinentes e de estudos com gêmeos mono e dizigóticos (MUSCHKAT; BUKOVSKY; LANGER, 1996; ERTUNC et al, 2004; ROHR, et al 2004).

O colágeno I constitui um dos componentes do tecido conjuntivo mais relacionado, nos estudos, à IUE (KEANE et al, 1997; RECHBERGER et al, 1998; LIAPIS et al, 2000; LANG et al, 2002; GOEPEL et al, 2003). Esta proteína é constituída por três cadeias peptídicas: 2 $\alpha 1(I)$ e 1 $\alpha 2(I)$, ($\alpha 1(I)_2\alpha 2(I)$), sintetizadas pelos genes *COLIA1* e *COLIA2*, respectivamente (KARSENTY; CROMBRUGGHE, 1990). Trabalhos têm demonstrado que o polimorfismo de base única (SNP) G→T, localizado no sítio Sp1 no primeiro *intron* do gene *COLIA1* (rs1800012) afeta a regulação da transcrição do colágeno (BORNSTEIN et al, 1987). Inicialmente, a associação deste polimorfismo foi realizada com a estrutura óssea, constatando-se uma redução da força mecânica e da densidade mineral óssea, além de aumento das fraturas osteoporóticas, em indivíduos portadores do SNP em Sp1 (GRANT et al, 1996). Como o colágeno também é um dos grandes responsáveis pela resistência do tecido conjuntivo, questiona-se se este mesmo polimorfismo não atuaria alterando o poder de sustentação da fásia endopélvica e proporcionando o surgimento da IUE.

A determinação dos fatores genéticos relacionado à IUE será de fundamental importância para a compreensão de sua etiopatogenia, o que pode contribuir para avanços na terapia e prevenção desta afecção.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Mecanismo de Continência Urinária Feminina

Os mecanismos normais de oclusão uretral são constituídos por uma musculatura estriada íntegra e corretamente innervada, por uma mucosa e submucosa adequadamente vascularizadas, por uma musculatura lisa intrínseca e, por fim, por mecanismos de suporte uretral e vaginal intactos (BRUSCHINI, 2005).

Nos últimos 15 anos, após estudos realizados por Petros e Ulmsten (1990) e confirmados por trabalhos de dissecação anatômica de DeLancey (1994), tornou-se claro que o mecanismo principal de continência urinária seria constituído por uma sustentação suburetral, que, durante o esforço, atuaria como um suporte firme, contra o qual seriam comprimidos o trígono, colo vesical e uretra, evitando a perda urinária. É a chamada teoria integral da continência urinária.

Segundo esta teoria, o tecido conjuntivo vaginal teria duas importantes funções relacionadas à continência. A primeira seria a de mediar as diferentes contrações da musculatura perineal, uma vez que sua porção anterior forma uma rede ou *hammock* suburetral, sobre a qual o terço médio uretral se apóia, sofrendo efeito da contratilidade pubo-coccígea. E a segunda seria realizada pelo segmento horizontal vaginal, situado por cima dos músculos elevadores do ânus e fixados posteriormente e lateralmente pelos ligamentos utero-sacros e cardinais, que teria a função de sustentar a uretra proximal e o trígono (CIOFU; HAAH, 2005).

1.1.2 Etiopatogenia da Incontinência Urinária

Considera-se que a IU feminina é o resultado da associação de múltiplos fatores, o que a caracteriza uma condição multifatorial. Apesar de tradicionalmente aceitos, ainda existem grandes controvérsias sobre o exato papel de cada fator. Os principais são o envelhecimento, etnia, gravidez, parto vaginal, menopausa, obesidade, além de fatores genéticos (ERTUNC et al, 2004; DANFORTH et al, 2006).

Sabe-se, por exemplo, que a IU encontra-se associada ao o envelhecimento, com estudos mostrando elevação crescente da perda urinária com a idade, e outros mostrando concentração de casos na perimenopausa ou após os 75 anos

(JOLLEYS, 1988; MILSOM, 2000; BELLOTE; AGOSTINHO, 2005). Com relação à etnia, mulheres caucasianas parecem ter risco superior de desenvolver IU em relação às mulheres afro-descendentes (KIM; HARVEY; JOHNSTON, 2004; DANFORTH et al, 2006).

A gravidez e o parto vaginal são considerados, classicamente, importantes fatores de risco para o desenvolvimento da IUE, uma vez que ocasionam lesão ao suporte pélvico e denervação da uretra e da musculatura perineal (MEYER et al, 1998). No entanto, os achados dos estudos, com diferentes desenhos, são controversos. Enquanto alguns mostram efeito positivo cumulativo de gestações e partos vaginais sobre a incidência de IUE, outros não mostram diferença da prevalência de IUE entre duplas de irmãs nulíparas e múltíparas (MILSOM et al, 1993; BUSCHSBAUM et al, 2005). Assim, o real papel da gravidez, paridade, tipo de parto, traumatismos obstétricos e do peso do neonato ainda estão em investigação.

Com relação à menopausa, os estudos são controversos. O déficit estrogênico poderia levar ao adelgaçamento do epitélio uretral, à esclerose do tecido conjuntivo periuretral, à redução do tônus da musculatura lisa uretral e estriada do assoalho pélvico e à diminuição do plexo vascular submucoso (CAINE; RAZ, 1973; BOHLER; JACQUETIN; RENAUD, 1979). No entanto, apesar das evidências teóricas, ainda não existe consenso sobre o efeito da reposição hormonal em portadoras de incontinência (SHERBURN et al, 2001). Também, não há consenso se a menopausa é fator de risco para esta doença, sendo necessária realização de estudos longitudinais prospectivos, para estabelecer de forma inequívoca a relação de causa e efeito entre menopausa e IU.

A relação da obesidade e IU pode ser explicada pelo enfraquecimento dos músculos e fáscias, por meio de ação mecânica e de lesões neurológicas das estruturas do assoalho pélvico, ocasionadas pelo excesso de peso. Assim, a obesidade poderia tanto ocasionar IU em pacientes susceptíveis, ou ainda, atuar como fator agravante para as perdas (MYDLO, 2004). Trabalho recente demonstrou redução estatisticamente significativa dos episódios de incontinência ao comparar 226 pacientes incontinentes submetidas a um programa de redução de peso com duração de 6 meses, associado à reeducação vesical com 112 pacientes submetidas apenas à reeducação vesical (SUBAK et al, 2009).

1.1.3 Diagnóstico de Incontinência Urinária de Esforço

O diagnóstico de IUE é estabelecido pela anamnese, exame físico e estudo urodinâmico. A anamnese identifica os sintomas e sua relação com a vida social e higiênica da paciente. O exame físico auxilia o clínico a identificar a perda urinária, classificá-la e identificar fatores associados, como distopias genitais, hipoestrogenismo, entre outros (GREEN, 1975).

O estudo urodinâmico é considerado o padrão ouro para o diagnóstico de IUE, sendo de fundamental importância para orientação terapêutica e seguimento das pacientes, além de ser considerado obrigatório, antes do tratamento cirúrgico desta condição (JENSEN; NIELSEN; OSTERGARD, 1994). Consiste na análise das relações entre as pressões abdominal, vesical e uretral, nas diversas fases do armazenamento e do esvaziamento vesical, e tem como objetivo reproduzir as queixas da paciente. Apesar de invasivo, é pouco doloroso e bem tolerado, desde que haja diálogo e compreensão prévia dos objetivos e da importância de sua realização (BRISTOW; HILTON, 2000).

O diagnóstico urodinâmico de IUE é realizado na fase de armazenamento vesical, ou seja, na cistometria, pela constatação da perda involuntária de urina, durante o aumento da pressão abdominal, na ausência de contração do detrusor. Para a caracterização da gravidade da IUE, neste momento do exame, é realizada, também, a medida da pressão de perda ou *abdominal leak point pressure*, definida como a menor pressão intravesical, na qual ocorre perda urinária, devido ao aumento da pressão abdominal, na ausência de contração do detrusor (SCHAFER et al, 2002).

Nesta fase do exame, ainda para a confirmação do diagnóstico, faz-se necessária a exclusão de hiperatividade do detrusor, definida pela presença de contrações involuntárias durante a fase de enchimento, espontâneas ou provocadas, e de quadros mistos, caracterizados pela presença de IUE associada à hiperatividade (SCHAFER et al, 2002).

1.1.4 Alterações do colágeno na Incontinência Urinária de Esforço

O tecido conjuntivo do assoalho pélvico constitui a fáscia endopélvica e exerce importante papel na sustentação dos órgãos sujeitos à pressão intra-abdominal, entre estes, a uretra, garantindo a continência urinária. Este tecido contém relativamente poucas células, com abundante matriz extracelular (MEC), constituída por água, fibras colágenas, elásticas e glicoproteínas. Sabe-se que os principais constituintes do tecido conjuntivo intersticial são as fibras colágenas e elásticas, conferindo força e elasticidade, respectivamente, enquanto as glicoproteínas conferem coesividade (GOH, 2003; WEN; POLAN; CHEN, 2006).

As fibras colágenas são constituídas por uma glicoproteína estrutural denominada colágeno. A molécula do colágeno, por sua vez, é denominada tropocolágeno. Esta molécula é alongada e formada por três cadeias peptídicas, dispostas entrelaçadas em hélice, denominadas cadeias alfa. Há diversos tipos de cadeias alfa; cada uma delas codificada por um gene, o que dá origem a diversos tipos de colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Os colágenos constituem uma família de proteínas, produzidas por diversos tipos de células e que se distinguem pelos tipos de cadeia alfa que participam da sua formação, por suas propriedades físicas e morfológicas, pela distribuição nos tecidos e por suas funções. Na síntese do colágeno, algumas etapas são de fundamental importância, como a hidroxilação da prolina e lisina, à medida que a cadeia alfa se forma; a glicosilação da hidroxilisina; alinhamento das cadeias alfa em grupo de três, determinada pelos peptídeos de registro, para formar a molécula de procolágeno, e, por fim, já no meio extra-celular, a separação dos peptídeos de registro pelas peptidases, determinando a formação das moléculas de tropocolágeno, que se polimerizam para formar as fibrilas colágenas. Denomina-se *cross-link* as estruturas interligadoras das cadeias de colágeno, compostas por três radicais de hidroxiprolina (piridinolina) ou por um resíduo lisina e dois de hidroxiprolina (deoxipiridinolina). Mais de uma dúzia de colágenos já foram descritos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Os tipos de colágeno I, III e V têm sido descritos no tecido conjuntivo vaginal e em outros tecidos de suporte, garantindo resistência (OTTANI et al, 2001). O colágeno tipo I é um dos principais constituintes do tecido conjuntivo. Forma largas fibras e está presente em grandes proporções na pele, ligamentos, fáscias,

cápsulas, cartilagens e tendões. Estas fibras de colágeno são flexíveis, mas oferecem alta resistência à tensão. O colágeno tipo III forma fibras pequenas, de baixa força tênsil, predominando nos tecidos que exigem alta flexibilidade e distensibilidade e que sofrem stress periódico (OXLUND, 1986; FORGACS et al, 2003). O colágeno tipo V é o colágeno menos freqüente. Forma pequenas fibras de baixa força tênsil, tendo sua função nos tecidos de suporte pouco elucidada (BIRK, 2001; GABRIEL et al, 2005). O colágeno I copolimeriza com os colágenos III e V formando fibrilas com diâmetro controlado e que influenciam as características biomecânicas de um determinado tecido (BIRK, 2001; WENSTRUP et al, 2004).

Acredita-se que grande parte das propriedades bioquímicas do tecido conjuntivo seja determinada pelo colágeno, sendo o seu constituinte mais estudado e associado à gênese da IUE. (KEANE et al, 1997; FALCONER et al, 1998a; RECHBERGER et al, 1998; LIAPIS et al, 2000; LANG et al, 2002; COR et al, 2003; GOPEL et al, 2003; GOH, 2003; CHEN et al, 2004).

Keane et al (1997) compararam o conteúdo de colágeno de biópsia vaginal periuretral em 36 pacientes com IUE demonstrada urodinamicamente em relação a 25 pacientes continentas, encontrando uma redução significativa do conteúdo de colágeno total ($p < 0,0001$), da taxa de colágeno I/III ($p < 0,0001$) e do *cross-link* ($p < 0,0001$). Rechberger et al (1998) avaliaram o conteúdo de colágeno da fáscia pubocervical de 56 pacientes com IUE em relação a 26 pacientes com cistocele sem IUE, pareadas para idade e paridade, encontrando uma concentração de colágeno total significativamente menor no grupo com IUE ($p < 0,0005$). Neste trabalho, não foram encontradas diferenças, no entanto, em relação à solubilidade ácida e à pepsina, demonstrando ausência de modificações no *cross-link* nos dois grupos estudados.

Liapis et al (2000) realizaram um estudo com 78 pacientes divididas em três grupos pareados para idade e paridade, um grupo com IUE, outro grupo com IUE e prolapso genital e um grupo sem IUE e sem prolapso genital (controle), para analisar a concentração de colágeno obtida da fáscia pubocervical. Como resultados, os autores encontraram uma redução estatisticamente significativa da quantidade de colágeno tipo I no grupo de pacientes com IUE, independente da presença ou não de prolapso genital ($p < 0,05$). Lang et al (2002) realizaram uma análise comparativa da constituição histológica dos ligamentos cardinais e uterossacros de 78 pacientes, divididas em 2 grupos, com IUE e continentas, constatando que as fibras de

colágeno são significativamente mais largas no grupo com IUE em relação ao controle.

Goepel et al (2003) estudaram o tecido conjuntivo de 29 mulheres com prolapso genital, 15 com IUE e 14 continentas, utilizando a biópsia de fáscia periuretral, em relação à concentração de colágenos tipo I, III, IV, V, VI e glicoproteínas (fibronectina, laminina, vitronectina), encontrando uma redução significativa da concentração de colágeno tipo I, III, VI.

Além disso, a literatura mostra associação entre desordens do tecido conjuntivo, em especial do colágeno, com IUE. Carley e Schaffer (2000) encontraram uma alta taxa de IU e prolapso genital entre pacientes com Síndrome de Ehlers- Danlos.

1.1.5 Fator genético e Incontinência Urinária de Esforço

Trabalhos epidemiológicos têm reforçado a associação de fatores genéticos com IUE. Muschkat, Bukovsky e Langer (1996) compararam a prevalência de IUE em 780 familiares de primeiro grau de pacientes com IUE, diagnosticada urodinamicamente (grupo de estudo), em relação a 474 familiares de pacientes sem queixas de desordens miccionais (grupo controle), pareadas para idade, paridade e peso do maior recém-nascido oriundo de parto vaginal. Como resultado, encontrou uma prevalência significativamente maior para o grupo de estudo, 20,3%, em relação ao grupo controle, 7,8% ($p < 0,05$). A caracterização de IUE entre familiares, neste estudo, foi realizada através da queixa de sintomas de perda urinária ao tossir, espirrar, sorrir ou realizar exercício, pelo menos duas vezes por semana. O estudo urodinâmico confirmou o diagnóstico de IUE em 48 familiares incontinentes que aceitaram realizar o exame.

Ertunc et al (2004) encontraram resultados semelhantes ao comparar a prevalência de IUE entre 413 familiares de primeiro grau de mulheres submetidas à cirurgia para correção de IUE e 372 familiares de primeiro grau de mulheres submetidas a outros procedimentos cirúrgicos, encontrando uma prevalência de IUE de 71,4% entre mães e 24,6% entre irmãs de mulheres incontinentes e de 40,3% entre mães e 11,6% entre irmãs de mulheres continentas, demonstrando uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$). Estas pacientes foram pareadas para idade, altura, peso, índice de massa corpórea (IMC), história obstétrica e

ginecológica, tabagismo, doenças crônicas e uso de medicações. Além disso, neste trabalho, a idade de início dos sintomas foi significativamente menor para os membros dos familiares incontinentes ($p < 0,001$). A caracterização dos sintomas de incontinência, neste trabalho, foi realizada por um questionário, *Bristol Female Lower Urinary Tract Symptoms Questionnaire*, e não pelo padrão ouro, que é o estudo urodinâmico. No entanto, este problema foi contornado com a alta taxa de concordância (100%) de 39 familiares que aceitaram realizar a cistometria e obtiveram diagnóstico clínico e urodinâmico de IUE, validando o questionário utilizado.

Rohr et al (2004) avaliaram a influência genética na gênese da IU, estudando 1168 pares de gêmeos, 548 monozigóticos e 620 dizigóticos, com idade de 46 a 68 anos e 70 a 94 anos, respectivamente, de uma *coorte* obtida do *Danish Twin Registry*. Os resultados deste trabalho mostraram que a correlação tetracórica para urge-incontinência foi significativamente maior para o grupo dos gêmeos monozigóticos em relação aos dizigóticos, tanto para a população de 46 a 68 anos como para a população de 70 a 94 anos, indicando o fator genético na gênese desta condição. A hereditariedade para urge-incontinência nos dois grupos foi de 42% e 49%, respectivamente. Neste trabalho, a incontinência urinária mista também apresentou um importante componente genético. Já, para IUE, esta relação foi menos clara, com uma taxa de hereditariedade de 39%. Vale ressaltar, no entanto, que, neste trabalho, o diagnóstico de urge-incontinência, IUE e incontinência urinária mista foi estabelecido com base em questionários e não, pelo padrão ouro, ou seja, o estudo urodinâmico.

Buschsbaum et al (2005) estudaram 101 pares de mulheres nulíparas e suas irmãs que tiveram 1 parto vaginal, para avaliar o papel deste tipo de parto como fator de risco para IUE. Como resultado, encontraram uma alta concordância de continência e incontinência urinária entre os pares de irmãs, o que demonstra a importância da predisposição familiar para esta condição.

Trabalhos com *microarray* também mostram diferenças na expressão gênica dos tecidos vaginais periuretrais nas diferentes fases do ciclo menstrual, entre mulheres com IUE e continentas, sendo a maior parte destes genes envolvidos no metabolismo do colágeno e das fibras elásticas (CHEN et al, 2003; CHEN et al, 2006).

Na fase proliferativa do ciclo menstrual, foram encontrados os seguintes genes *up* regulados envolvidos na atividade da MEC: o fator transformador de crescimento β 3, laminina e colágeno tipo VI. Entre os genes *down* regulados, foram constatados: a proteína relacionada à laminina, colágeno XII, *serina/threonina* *proteína kinase*, receptor da interleucina 1 tipo II e fator de crescimento derivado de plaqueta - associado à proteína. Com relação à importância destes genes, sabe-se que o fator de crescimento β 3 constitui uma citocina envolvida na regulação do crescimento celular, na diferenciação e estimulação da MEC e na modulação da resposta imune. Além disso, está relacionado a alterações dos níveis de RNAm de colágeno tipo I e III. A laminina está relacionada com a disposição das fibras de colágeno e é um gene relacionado a certos tipos de síndrome de Ehlers-Danlos e outras desordens do tecido conjuntivo. O receptor da interleucina 1 tipo II pode atenuar os efeitos da interleucina 1, com relação à indução da inflamação, atividade da metaloproteinase e síntese de proteoglicanos; o fator de crescimento derivado de plaqueta - associado a proteína parece estar relacionado à proteólise e inibição da protease, de forma que a *down* regulação destes genes pode estar associada ao aumento da degradação da MEC (CHEN et al, 2003).

Na fase secretória do ciclo menstrual, foram encontrados os seguintes genes envolvidos no metabolismo da MEC *up* regulados: elafina (*skin-derived protease inhibitor 3*), *keratina 16*, colágeno XVII e *platophilina1*. Entre estes, destaca-se a elafina, que constitui uma serina inibidora da protease envolvida na degradação da elastina. Assim, sua *up*-regulação reforça a relação entre a homeostase das fibras elásticas e disfunção do assoalho pélvico (CHEN et al, 2006).

1.1.6 Polimorfismo

O polimorfismo de base única (SNP) é qualquer substituição, inserção ou deleção de um único nucleotídeo em um gene com uma frequência populacional de 1% ou mais. O polimorfismo pode ou não alterar a proteína codificada pelo gene, podendo ou não alterar o fenótipo. Alguns polimorfismos do genoma podem ser detectados pela comparação de mapas de restrição de diferentes indivíduos, utilizando, como critério, a mudança no padrão de fragmentos produzidos pela clivagem com uma enzima de restrição. No entanto, o mapa de restrição é independente da função gênica, de forma que um polimorfismo pode ser detectado,

independente da alteração da seqüência afetar ou não o fenótipo (FERREIRA, 2001).

Alguns polimorfismos de restrição com importância fenotípica ocorrem próximos a qualquer gene-alvo considerado. Estes marcadores de restrição podem ser identificados graças à estreita relação que apresentam com o fenótipo mutante. Assim, para avaliar se determinado polimorfismo está relacionado a um determinado fenótipo, como por exemplo, uma doença, devemos comparar o mapa de restrição do DNA de pacientes que sofrem a doença com o DNA de pessoas normais, verificando se um determinado sítio de restrição está sempre presente, ou sempre ausente, nos pacientes (FERREIRA, 2001).

Grande parte dos estudos de investigação genética e IUE são do tipo associação de SNP de genes candidatos e a doença. Pompeu (2004) estudou a associação de um SNP (A/G) localizado no exon 20 do gene da elastina e IUE, não encontrando diferença estatisticamente significativa em relação à prevalência do genótipo polimórfico entre pacientes continentais e incontinentes. O ponto de partida para o estudo desta região genética foi a associação prévia deste SNP e hérnia inguinal. Outro polimorfismo estudado em associação à IU foi o T102C no gene do receptor 2A da serotonina, encontrando-se uma maior prevalência do genótipo polimórfico TT em pacientes com IU. No entanto, esse trabalho foi realizado com pacientes do sexo feminino e masculino e não trouxe a diferenciação urodinâmica do tipo de IU (SCHWANKE et al, 2007).

1.1.7 Polimorfismo do gene *COLIA1* e colágeno tipo I

O colágeno tipo I corresponde à principal proteína do tecido conjuntivo, sendo constituído por três cadeias: 2 $\alpha 1(I)$ e 1 $\alpha 2(I)$, ($\alpha 1(I)_2\alpha 2(I)$). Sabe-se que os genes que codificam as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$, *COLIA1* e *COLIA2*, respectivamente, possuem sua expressão coordenada e estritamente regulada (KARSENTY; CROMBRUGGHE, 1990).

O gene *COLIA1* encontra-se localizado no cromossomo 17, na região 17q21.23, sendo responsável pela codificação do maior componente do colágeno tipo I (KARSENTY; CROMBRUGGHE, 1990). Um estudo mostrou, inicialmente, que o polimorfismo, caracterizado pela substituição da guanina por timina, no sítio Sp1 localizado no primeiro *intron* do gene *COLIA1* (rs1800012) e que ocasiona três

diferentes genótipos, homozigoto (GG), heterozigoto (GT) e homozigoto (TT), poderia afetar a regulação da transcrição do colágeno (BORNSTEIN et al, 1987). Outros estudos mostraram que este polimorfismo interfere na expressão deste gene, alterando a afinidade de ligação do fator de transcrição Sp1 à cadeia de DNA. A principal consequência destas alterações genéticas é o aumento da porção de proteínas produzidas pelo gene *COLIA1* em relação ao gene *COLIA2*, com alteração dos níveis de RNAm destes genes, o que, conseqüentemente, ocasiona alteração da estrutura do colágeno tipo I (MANN et al, 2001).

1.1.8 Polimorfismo do gene *COLIA1* e Incontinência Urinária de Esforço

As associações do SNP (G→T) do gene *COLIA1* foram feitas inicialmente com a estrutura óssea, constatando-se uma redução da força mecânica e da densidade mineral óssea, com aumento das fraturas osteoporóticas, em indivíduos com genótipo polimórfico (GRANT et al, 1996). Skorupski et al (2006) compararam a prevalência deste polimorfismo em 50 mulheres com IUE e 50 mulheres continentas, pareadas para idade, estadiamento de prolapso genital, IMC, transição menopausal e paridade, encontrando maior prevalência do genótipo polimórfico GT no grupo de pacientes incontinentes.

2 OBJETIVO

Determinar a ocorrência do polimorfismo de base única G→T no sítio Sp1, localizado no primeiro *intron* do gene *COL1A1*, em mulheres com Incontinência Urinária de Esforço.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo caso-controle.

3.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado no ambulatório de ginecologia e no Laboratório de Urodinâmica do Hospital São Marcos. A análise genética foi realizada no Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB) da Universidade Federal do Piauí.

3.3 Amostra

3.3.1 Critérios de Elegibilidade

O grupo de estudo foi constituído por pacientes com diagnóstico de IUE, após a realização do estudo urodinâmico. Foram excluídas as pacientes com antecedentes de distúrbios neurológicos.

O grupo controle foi constituído por pacientes submetidas à consulta ginecológica de rotina sem queixa clínica de IU, sem antecedentes de cirurgias para correção de cistocele, para correção de IUE ou perineoplastia e com teste de esforço negativo ao exame físico. Foram excluídas as pacientes nulíparas.

Todas as pacientes foram submetidas à leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

3.3.2 Diagnóstico de IUE

O diagnóstico de IUE foi realizado pelo pesquisador, com base na história clínica, exame físico (teste de esforço positivo) e confirmado por estudo urodinâmico.

3.3.2.1 Teste de Esforço

Solicitou-se que a paciente, em posição ginecológica, com a bexiga repleta, realizasse manobra de esforço (tosse). A perda de urina síncrona ao esforço reforçava o diagnóstico de IUE. Quando não se constatava a perda de urina com a paciente em posição ginecológica, repetia-se o exame com a paciente em posição ortostática.

3.3.2.2. Estudo urodinâmico

Este exame foi realizado conforme a padronização da Sociedade Internacional de Continência (SCHAFER *et al*, 2002).

3.3.2.2.1 Fluxometria

Foi solicitado que a paciente urinasse sobre uma cadeira de fluxo, sob a qual, encontrava-se um fluxômetro.

3.3.2.2.2 Cistometria

Realizou-se a assepsia dos órgãos genitais externos e introduziu-se 2 cateteres uretrais de 6 e 4 Fr, respectivamente para infusão de líquido e aferição da pressão intra-vesical. A aferição da pressão abdominal foi realizada por meio de um cateter com balão preenchido por líquido, sem bolhas de ar, introduzido no reto. A aferição da pressão detrusora foi realizada pela diferença entre a pressão intra-vesical e abdominal. Após a passagem dos cateteres, foi avaliado o volume residual.

O enchimento vesical foi realizado utilizando-se soro fisiológico à temperatura ambiente, na velocidade de 50 ml/minuto, com a paciente sentada na cadeira de fluxo. Durante o enchimento, foi solicitado à paciente que revelasse qualquer sensação vesical.

Após infusão de 200 a 250 ml de volume, foi solicitado que a paciente realizasse manobras de esforço, tosse e valsava, para a verificação da perda urinária. Neste momento, foi realizada a medida da pressão de perda. Em caso de

ausência de perda urinária, tais manobras foram repetidas na capacidade cistométrica máxima, retirando-se o cateter de infusão.

A infusão foi interrompida quando a paciente referia forte desejo miccional.

3.3.2.2.3 Estudo miccional

Após retirada do cateter de infusão, solicitou-se que a paciente urinasse sobre a cadeira de fluxo. Após a micção, avaliou-se novamente o volume residual.

3.3.2.3 Estadiamento do prolapso genital

O prolapso genital foi avaliado segundo a classificação da Sociedade Internacional de Continência (ICS) e a Sociedade dos Cirurgiões Ginecológicos (BUMP *et al*, 1996), por meio do estadiamento de *Pelvic Organ Prolapse Quantification* (POP-Q), no qual se definem dois pontos de referência na parede vaginal anterior (ponto Aa e Ba), dois pontos na parede vaginal posterior (ponto Ap e Bp), dois pontos na parede superior da vagina (ponto C e D), além do comprimento vaginal total (cvt), hiato genital (hg) e corpo perineal (pb), que correspondem, respectivamente, às medidas da maior profundidade vaginal, do meato uretral externo até a linha posterior do hímen ou fúrcula e da fúrcula até o centro do orifício anal.

A relação entre esses pontos e o plano imaginário que passa pelo hímen determinou o estágio do prolapso:

Estágio 0: não há prolapso. Os pontos Aa, Ap, Ba e Bp estão em -3cm, e os pontos C e D estão entre o CVT e o CVT -2cm.

Estágio 1: o ponto de maior prolapso está localizado a 1 cm acima do hímen.

Estágio 2: o ponto de maior prolapso está entre 1 cm acima e 1 cm abaixo do hímen.

Estágio 3: o ponto de maior prolapso está localizado mais de 1 cm abaixo do hímen, porém não se desloca mais que o comprimento total da vagina menos 2cm.

Estágio 4: eversão completa. A porção mais distal do prolapso se desloca, no mínimo, o comprimento total da vagina menos 2 cm.

3.3.3 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada, na ocasião da realização do estudo urodinâmico e na consulta ginecológica, por meio de entrevista realizada pelo pesquisador para preenchimento da ficha de coleta de dados, conforme apêndice B.

3.4 Variáveis analisadas

- Frequência genotípica
- Etnia, caracterizada com base em características morfológicas faciais (forma do nariz, boca e olhos), tipo de cabelo e cor da pele e por questões a respeito da origem de seus parentes próximos e distantes para obtenção de informação de ancestralidade. As participantes foram classificadas em caucasóides, afro-descendentes, mestiças e ameríndias.
- Idade (anos completos)
- Índice de massa corpórea (IMC)(Kg/m²)
- Número de gestações
- Número de partos vaginais
- Tabagismo prévio ou atual
- Transição menopausal, sendo definida menopausa como ausência de menstruação por um período igual ou superior a 1 ano, ou pela dosagem do hormônio Folículo Estimulante superior a 30 mUI/ml, em pacientes hysterectomizadas.
- Fase do ciclo menstrual, considerando-se fase proliferativa quando a data da última menstruação encontrava-se há 10 dias ou menos; fase ovulatória, quando a data da última menstruação tinha ocorrido entre 11 e 17 dias e fase secretória quando a data da última menstruação encontrava-se há 18 dias ou mais.
- Presença ou não de prolapso genital, avaliado de acordo com o *Pelvic Organ Prolapse Quantification System (POP-Q)* (BUMP *et al*, 1996)
- Idade de início dos sintomas no grupo de estudo
- Pressão de perda no grupo de estudo

3.5 Análise genética

3.5.1 Extração do DNA

Para extração de DNA foram utilizadas amostras de sangue (8 ml) coletadas em tubos de ensaio contendo anticoagulante ACD. O DNA foi extraído a partir da papa de mononucleares, utilizando-se o kit de extração *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison- US).

A amostra foi devidamente homogeneizada e transferida (300 µl) para um novo microtubo contendo 900 µl de solução de lise celular, seguidos de homogeneização em *vórtex* por 3 minutos, incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido até que este não mais demonstrasse presença de eritrócitos. A segunda solução utilizada foi a de lise nuclear. Transferiu-se 300 µl desta solução para o microtubo em processamento e a solução foi homogeneizada vigorosamente em *vórtex* por 5 minutos, seguida pela adição de 100 µl de solução para precipitação de proteínas. O material foi agitado em *vórtex* e centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos. Durante esta etapa, um novo microtubo foi preparado contendo 300 µl de isopropanol absoluto gelado (Merk, Brasil). Ao término da centrifugação, o sobrenadante desta etapa foi transferido cuidadosamente para o microtubo contendo isopropanol e invertido até a visualização do DNA. A seguir, o material foi centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o microtubo mantido aberto e invertido sobre papel filtro para secagem de suas paredes. Na próxima etapa, foram acrescentados 300 µl de etanol 70% (Merk, Brasil), seguido de inversão (3x) e centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o microtubo foi novamente invertido sobre papel filtro para secagem. Por fim, o *pellet* foi ressuscitado em 30 µl de água autoclavada, estéril e livre de RNase (Invitrogen), incubado por 1 minuto e mantido a 47°C para hidratação.

3.5.2 Concentração e pureza da amostra

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por meio da espectrofotometria, utilizando-se um nanoespectrofotômetro (ND-1000

Spectrophotometer, Nanodrop Technologies- Wilmington, Delaware-US). A absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 230, 260, 280 nm. A pureza foi determinada pela razão de leitura na absorbância de 260 e 280 nm. A amostra foi considerada satisfatória em termos de pureza, quando a razão encontrava-se entre 1,8 e 2,0, acertando-se a concentração de DNA para 100 ng/μl.

3.5.3 Armazenamento do DNA

O DNA extraído foi armazenado a -80°C, até o momento da amplificação.

3.5.4 Iniciadores

Foram utilizados 4 iniciadores, conforme Skorupski et al (2006): 2 iniciadores para a primeira etapa da reação de PCR: P1, 5'-GGAAGACCCGGGTTATTGCT-3'(forward) e P2, 5'-CGCTGAAGCCAAGTGA-AATA-3' (reverse) e 2 iniciadores para a segunda etapa da reação: P3, 5'-TAACTTCTGGACTATTTGCGGACTTTTTGG-3'(forward) e P4, 5'-GTCCAGTCCAGCCCTCATCCTGGCC-3'(reverse).

3.5.5 Amplificação do DNA

Realizou-se a Reação em cadeia da polimerase (PCR) em duas etapas. Inicialmente amplificou-se o DNA molde utilizando-se os dois pares de iniciadores externos (P1 e P2) e, a seguir, utilizou-se uma alíquota do amplificado, para o molde da segunda etapa da PCR, utilizando-se os dois pares de iniciadores internos (P3, P4).

As concentrações da primeira etapa da reação de PCR foram: 200 ng de DNA, 1,25 μl de iniciadores P1 e P2 (10 pmolar) (Invitrogen), 2 μl de dNTP Mix (Promega) (200 mM/ μl), 1,5 μl MgCl₂ (Promega) (25 mM), 2,5 μl de solução tampão(10x) (Promega) e 1 μl Taq DNA polimerase (Promega) (5 U/ μl). Esta etapa foi realizada em 37 ciclos: 1 ciclo inicial de desnaturação do DNA molde a 99°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação, com anelamento dos iniciadores P1 e P2 a 57°C por 1 minuto, hibridização da cadeia complementar a 72°C por 1 minuto e então, novamente, desnaturação a 94,5°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

A segunda etapa da reação de PCR foi realizada da seguinte forma: 1 ciclo de desnaturação a 99°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de anelamento a 58°C por 1 minuto, utilizando os iniciadores P3 e P4, hibridização a 72°C por 45 segundos, desnaturação a 94,5°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. Para esta segunda etapa, foram utilizados: 1 µl do amplificado da primeira etapa, 1,25 µl de iniciadores P3 e P4 (10 pmolar) (Invitrogen), 2 µl de dNTP Mix (Promega) (200 mM/µl), 1,5 µl de MgCl₂ (Promega) (25 mM), 2,5 µl de solução tampão(10x) (Promega) e 1 µl de Taq DNA polimerase (Promega®) (5 U/ µl).

Os produtos da PCR foram revelados por eletroforese no GenePhor™, utilizando-se o GeneGel Excel 12,5/24 Kit (GE Healthcare Bio-Sciences AB-Sweden).

3.5.6 Detecção do polimorfismo

O reconhecimento do tipo de polimorfismo do sítio Sp1 foi realizado com base na técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*), utilizando-se a enzima *BalI* (*MscI*)(Biolabs-New England), que reconhece o sítio de restrição 5'-TGGCCA-3'. Os produtos do PCR foram digeridos com *BalI* utilizando-se 5 µl DNA, 2,5 µl de tampão e 1 µl da enzima, por 1 hora à temperatura de 37°C.

Os produtos da RFLP foram revelados por eletroforese no GenePhor™, utilizando-se o GeneGel Excel 12,5/24 Kit (GE Healthcare Bio-Sciences AB-Sweden). Uma única banda (260 pb) correspondeu ao genótipo GG, 2 bandas (260 e 242 pb) ao heterozigoto (GT) e uma única banda (242 pb) ao genótipo TT .

3.6 Análise estatística

Foram utilizados testes não-paramétricos para análise dos resultados, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas. Em todos os testes, foi estabelecido em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade. Para a realização dos cálculos, foi utilizado programa Graph Pad Prism 5.

3.6.1. Teste de Mann-Whitney

Este teste foi utilizado com o propósito de analisar as medianas de duas amostras independentes, como idade, IMC, número de gestações e partos vaginais de pacientes continentas e incontinentes.

3.6.2. Teste exato de Fisher

Este teste foi utilizado para comparar as frequências genotípicas e alélicas, os estágios de prolapso genital (POP-Q), o número de mulheres com antecedente atual ou prévio de tabagismo, mulheres que estavam ou não na menopausa e as fases do ciclo menstrual, entre pacientes continentas e incontinentes.

3.7 Aspectos éticos

Em todas as etapas, a pesquisa obedeceu, rigorosamente, aos preceitos do Código de Ética Médica para utilização científica de dados de pacientes, respeitando os princípios da Declaração de Helsinque (2000) e da Resolução N° 196/96, emitida pelo Conselho Nacional de Saúde (Brasil, 1996).

Os pacientes foram informados sobre as vantagens e desvantagens de sua participação e, aos que aceitarem participar do estudo, foi solicitada assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice A).

O projeto foi submetido à avaliação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí em 28/08/2007 e aprovado em 02/10/2007(CAAE:0189.0.045.000-07).

4 RESULTADOS

4.1. Pacientes estudadas

Foram estudadas 51 pacientes, no período de 02 de outubro de 2007 a 22 de dezembro de 2008, 29 pacientes com IUE e 22 pacientes continentas. As pacientes apresentavam etnia mestiça e eram procedentes do Piauí e Maranhão.

No grupo de pacientes com IUE, a idade, IMC, número de gestações e partos vaginais variaram, respectivamente, de 28 a 60 anos, 19,6 a 34,7 kg/m², 0 a 5 gestações e 0 a 5 partos vaginais, com mediana, respectivamente, de 50 anos, 26,3 Kg/m², 3 gestações e 2 partos vaginais. Dez (34,5%) pacientes relatavam tabagismo atual ou prévio e 12 (41,4%) pacientes encontravam-se na menopausa. Entre as pacientes no menacme, 5 (29,4%) encontravam-se na fase proliferativa e 11 (64,7%) encontravam-se na fase secretória, sendo que 1 foi submetida à histerectomia, não tendo sido realizada avaliação da fase do ciclo. Com relação à idade do início dos sintomas, 16 (55,2%) pacientes iniciaram os sintomas de incontinência com idade igual ou inferior a 40 anos e 13 (44,8%) com idade entre 41 a 60 anos. Com relação à pressão de perda, 21 (72,4%) apresentaram pressão de perda ≥ 90 cmH₂O, e 8 (27,6%), pressão de perda < 90 cmH₂O.

Entre as pacientes continentas, a idade, IMC, número de gestações e paridade variaram, respectivamente, de 35 a 67 anos, 16,5 a 38,1 kg/m², 2 a 7 gestações e 1 a 7 partos vaginais, com mediana, respectivamente, de 42 anos, 23,9 Kg/m², 4 gestações e 3 partos vaginais. Cinco pacientes (22,7%) apresentavam antecedente atual ou prévio de tabagismo e 8 pacientes (36,4%) encontravam-se na menopausa. Entre as pacientes no menacme, 4 (28,6%) encontravam-se na fase proliferativa e 9 (64,3%) encontravam-se na fase secretória, com 1 paciente com antecedente de histerectomia, não tendo sido realizada avaliação da fase do ciclo.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre pacientes continentas e incontinentes, em relação à idade, IMC, número de gestações, prevalência de tabagismo, menopausa e fase do ciclo menstrual. O grupo de pacientes continentas apresentou um número de partos vaginais significativamente maior em relação às pacientes incontinentes (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação de características clínicas e demográficas de pacientes incontinentes e continentas, com respectivo nível de significância, atendidas no Hospital São Marcos, Teresina, Piauí, no período de 02 de outubro de 2007 a 22 de dezembro de 2008.

Características	Incontinentes	Continentes	<i>P</i> *
Idade (mediana)	50	42	0,08
Gestações (mediana)	3	4	0,13
Partos vaginais (mediana)	2	3	0,02
IMC (mediana)(Kg/m ²)	26,3	23,9	0,2
Pré-menopausa (n°)	17	14	0,8
Proliferativa (n°)	5	4	1
Secretória (n°)	11	9	1
Pós-menopausa (n°)	12	8	0,8
Tabagistas (n°)	10	5	0,5
Não Tabagistas (n°)	19	17	0,5

Fonte: Crédito da autora, Te, 2009

* valores de *P* calculado pelo teste de Mann-Whitney para idade, gestações, paridade e IMC e pelo teste de Fisher, para pré e pós menopausa, tabagistas e não tabagistas, fase do ciclo proliferativa ou secretória

Com relação à presença de prolapso genital, todas as pacientes, tanto continentas como incontinentes, apresentavam estágio de POP-Q ≤ 2 , não havendo diferença estatisticamente significativa em relação às freqüências dos estágios de prolapso entre os dois grupos ($P = 0,3$) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos estágios de prolapso genital de acordo com a classificação *Pelvic Organ Prolapse Quantification* (POP-Q) entre pacientes incontinentes e continentes atendidas no Hospital São Marcos, Teresina, Piauí, no período de 02 de outubro de 2007 a 22 de dezembro de 2008

POP-Q	Incontinentes	Continentes
0	14	6
1	8	10
2	7	6
Total	29	22

Fonte: Crédito da autora, Te, 2009

4.2. Frequência dos genótipos

No grupo total estudado, 29 (56,8%) pacientes apresentaram o genótipo GG e 22 (43,1%) pacientes, o genótipo GT. Não foi detectado nenhum genótipo TT.

Entre as pacientes com IUE, 55,2% (16) apresentou o genótipo GG e 44,8% (13), o genótipo GT. Entre as pacientes continentes, as frequências genotípicas foram: 59,1% (13) com genótipo GG e 40,9% (9) com genótipo GT. A distribuição das frequências alélicas e genotípicas não apresentou diferença estatisticamente significativa, entre os dois grupos ($P=1$)(Tabela 3).

Comparando-se a frequência do genótipo polimórfico GT entre pacientes que iniciaram a apresentação dos sintomas com idade ≤ 40 anos e pacientes continentes com idade ≤ 40 anos, também não se encontrou diferença estatisticamente significativa ($P=1$).

Comparando-se a distribuição dos genótipos entre pacientes com pressão de perda menor e maior ou igual a 90 cmH₂O, não se constatou diferença estatisticamente significativa ($P=1$).

Tabela 3. Freqüências (%) alélicas e genotípicas, com respectivos *odds ratio*, intervalo de confiança e nível de significância, entre pacientes incontinentes e continentas atendidas no Hospital São Marcos, Teresina, Piauí, no período de 02 de outubro de 2007 a 22 de dezembro de 2008

	Incontinentes(%)	Continentes(%)	Odds Ratio	Intervalo confiança a 95%	<i>P</i> *
G	77,6	79,5	0,89	0,34-2,32	1
T	22,4	20,4	1,12	0,43-2,93	1
GG	55,2	59,1	0,85	0,28-2,62	1
GT	44,8	40,9	1,17	0,39-3,60	1
TT	0	0	-	-	-

Fonte: Crédito da autora, Te, 2009

* valor de *P* calculado pelo teste de Fisher

4 DISCUSSÃO

A etiopatogenia da IUE, assim como outras condições multifatoriais, ainda é mal compreendida. Apesar da susceptibilidade individual ser demonstrada em vários estudos de epidemiologia, a busca de um modelo genético ainda parece distante.

O presente trabalho foi o segundo realizado no Brasil que demonstrou a presença do polimorfismo do gene *COL1A1* e o primeiro no país que buscou a sua associação com IUE (BARROS et al, 2002). Seus resultados não mostraram uma diferença estatisticamente significativa na frequência do genótipo polimórfico GT entre pacientes continentais e incontinentes. Também não mostraram uma associação positiva entre as variantes genótípicas e a gravidade desta condição, estabelecida pela pressão de perda e idade de início dos sintomas. Esta falta de associação não exclui a participação deste gene na etiopatogenia da IUE, mas indica que sua variabilidade não tem impacto no risco de desenvolvimento desta doença na população estudada.

Após uma ampla revisão de literatura, podemos constatar que a associação do polimorfismo do gene *COL1A1* e IUE é ainda pouco estudada. Conseguimos localizar apenas um trabalho que mostrou associação deste polimorfismo com IUE e outro trabalho que não encontrou associação deste polimorfismo com distopias genitais (SKORUPSKI et al, 2006; SKORUPSKI et al, 2007). Ao contrário, para distúrbios da MEC da estrutura óssea, a literatura é farta e os resultados são concordantes de que a variabilidade do gene *COL1A1* está associada à redução da massa óssea e aumento das fraturas osteoporóticas, com comprovação a nível biomolecular (GRANT et al, 1996; LANGDAHL et al, 1998; UITTERLINDER et al, 1998; MANN et al, 2001; BERNAD et al, 2002).

Em relação ao estudo de Skorupski et al (2006), a nossa amostra distingue-se, basicamente, pela ancestralidade. Enquanto as pacientes do estudo polonês apresentavam etnia caucasóide, as pacientes do presente estudo eram mestiças. Este é um fator importante, que talvez tenha sido decisivo para o resultado encontrado, já que a ocorrência de uma determinada variabilidade gênica pode diferir entre as diversas etnias. Estudos de ancestralidade, tendo como base o DNA mitocondrial, mostram que o *pool* gênico dos mestiços do Nordeste brasileiro é trihíbrido, sendo constituído por 34% de caucasóides, 44% de africanos e 22% de ameríndios (PENA, 2002). Logo, se a variabilidade do gene *COL1A1* estiver

associada à etnia caucasóide, a baixa representatividade desta etnia em nossa amostra poderia ter enfraquecido a capacidade de detectarmos maior ocorrência do genótipo polimórfico GT entre as pacientes incontinentes.

Não constatamos, em nossa amostra, o genótipo TT, provavelmente porque a frequência alélica T é muito baixa. Estudos prévios realizados em população holandesa e brasileira caucasóide mostram frequências do genótipo TT de 3% e 2,27%, respectivamente (BARROS et al, 2002; VAN DER SLUIS et al, 2002). De forma que, para esta população, de natureza trihíbrida, em que a frequência dos genes caucasóides é baixa, a detecção do genótipo TT exigiria um maior tamanho amostral, o que permitiria uma maior representatividade das três heranças étnicas.

É certo que ainda existem muitas contradições na literatura, dentro da complexidade da constiuição da fásia endopélvica, de qual ou quais proteínas estariam envolvidas na etiopatogenia da IUE, dificultando a busca dos genes responsáveis por esta condição. Tratando-se de doença multifatorial, é pouco provável que apenas um gene ou uma proteína esteja envolvida nesta doença. Estudos com *microarray*, por exemplo, mostram alteração da expressão de outros genes envolvidos na atividade da MEC, relacionados principalmente ao metabolismo de fibras colágenas e elásticas. (CHEN et al, 2003; CHEN et al, 2006).

Além disso, existem estudos comparativos entre pacientes com IUE e continentes que vêm ressaltando o papel de outras proteínas da MEC na etiopatogenia desta afecção (FELDNER et al, 2006; GOEPEL; THOMSEN, 2006; LIU et al, 2006; TUNN et al, 2005; TRABUCCO et al, 2007). As fibras elásticas, por exemplo, parecem exercer importante papel nas propriedades mecânicas do tecido conjuntivo do assoalho pélvico, ao permitir que este se distenda até um grau limite, retornando a sua posição original, sem prejuízos. (GOH, 2003). Uma pesquisa realizada com macacos demonstrou que a falha no remodelamento das fibras elásticas no pós-parto, ocasionada ou por alterações genéticas ou por efeito do envelhecimento, poderia contribuir para a instalação de disfunções do assoalho pélvico em mulheres (LIU et al, 2006).

A distribuição das fibras elásticas também apresentou diferenças em mulheres com IUE com uretras hipotônicas e normotônicas, constatando-se uma distribuição irregular e fragmentada da elastina no primeiro grupo de pacientes, o que, provavelmente, pode ter contribuído para a redução da extensibilidade do

tecido e para a perda da estabilidade periuretral, prejudicando, provavelmente, o mecanismo de fechamento uretral (GOEPEL; THOMSEN, 2006).

Outros constituintes da MEC que apresentaram diferentes distribuições entre pacientes continentais e incontinentes foram os glicosaminoglicanos totais; dermatam sulfato; a fibromodulina, um tipo especial de proteoglicano, responsável pela organização das fibrilas de colágeno e a actina. (GOSLING, 1985; FELDNER et al, 2006; TRABUCCO et al, 2007; TUNN et al, 2007).

Até mesmo em relação ao colágeno, ainda existem muitas dúvidas de como ocorre sua alteração na IUE, ou seja, se seria uma alteração de síntese ou degradação, qualitativa ou quantitativa. Estudos publicados sobre este tema apresentam uma diversidade de achados, uma vez que avaliam a constituição do tecido conjuntivo, utilizando diferentes sítios de biópsia e testes bioquímicos não uniformes, além da heterogeneidade das populações estudadas (KEANE et al, 1997; FALCONER et al, 1998a; FALCONER et al, 1998b; RECHBERGER et al, 1998; LIAPIS et al, 2000; LANG et al, 2002; GOEPEL et al, 2003; COR; BARBIC; KRALJ, 2003; GOH, 2003; CHEN et al, 2004).

Alguns trabalhos, por exemplo, têm ressaltado as diferenças na degradação do colágeno em pacientes com IUE em relação a pacientes continentais, não encontrando alterações da síntese do colágeno, mas, por outro lado, demonstrando maior expressão de metaloproteinases (RNAm), proteínas responsáveis pela degradação e remodelamento do colágeno, e uma menor expressão de seus inibidores, nos tecidos de pacientes acometidas por esta doença (FALCONER et al, 1998a; CHEN et al, 2002).

Nos últimos anos, podemos observar um avanço importante na compreensão das desordens do assoalho pélvico, o que levou o desenvolvimento de inúmeras técnicas cirúrgicas, com resultados bem mais animadores em relação a antigas cirurgias de correção perineal (GOEPEL, 2007). Observamos, ainda, que grande parte dessas novas técnicas envolve a colocação de próteses (ULMSTEN, 1998), ou seja, sabemos, que, apesar de inúmeros outros fatores exógenos, o problema básico encontra-se no tecido conjuntivo da paciente acometida por IUE.

Apesar dos grandes avanços em relação à terapêutica cirúrgica, os estudos voltados para associação entre as diferenças histológicas e o padrão genético responsável por estas diferenças e IUE ainda são contraditórios (GOEPEL, 2007). Como resultado, vivenciamos que, nos dias atuais, a prevenção da IUE ainda é

dificultada e seu tratamento é limitado à minimização ou eliminação dos sintomas, ou seja, objetiva mantê-la sob controle, mas não curada.

Assim, estudos posteriores, com grandes amostras, com a mesma ou outra etnicidade, são necessários para elucidar a real participação deste polimorfismo, assim como, da variante proteica na etiopatogenia da IUE. Considerando tratar-se de condição complexa, estudos do tipo *genomic wild* tornam-se necessários para apontar outras regiões até então não exploradas, permitindo a investigação de novos genes na etiopatogenia desta afecção.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo, podemos afirmar que a diversidade do gene *COLIA1* não constitui um dos fatores principais da determinação de diferenças interindividuais de susceptibilidade à Incontinência Urinária de Esforço na população estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, P. et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardization Sub-committee of the International Continence Society. **Am J Obstet Gynecol**, v. 187, n.1, p.116-126, 2002.

BARROS, E. R. et al. Bone mineral density in young women of the city of São Paulo, Brazil: correlation with both collagen type I alpha 1 gene polymorphism and clinical aspects. **Braz J Med Biol Res**, v.35, n. 8, p. 885-893, 2002.

BELLOTE, G. M. H.; AGOSTINHO, A. D. **Prevalência de Incontinência Urinária, sintomas do trato urinário inferior e qualidade de vida em mulheres na comunidade**. 2005. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, 2005.

BERNAD, M. et al. Polymorphism in the type I collagen (COL1A1) gene and risk of fracture in postmenopausal women. **Bone**, v. 30, n.1, p. 223-228, 2002.

BIRK, D. E. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. **Micron**, v. 32, p. 223-237, 2001.

BOHLER, J. L., JACQUETIN, B., RENAUD, R.E. Physiologie du système de cloture cervico-urétrale. **Rev Fr Gynécol Obstet**, v. 74, p. 239, 1979.

BORNSTEIN, P. et al. Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human collagen alpha 1 (I) collagen gene. **Proc Nat Acad Sci**, v. 84, p. 8869-8873, 1987.

BRISTOW, S. E.; HILTON, P. Assessment and investigations for urinary incontinence. **Baillière's Clin Obstet Gynecol**, v. 14 , n. 2, p. 227-249, 2000.

BRUSCHINI, H. Etiopatogenia e classificação da incontinência urinária feminina. In: AMARO, J.L.; HADDAD, J.M.; TRINDADE, J.C.S.; RIBEIRO, R.M. **Reabilitação do assoalho pélvico nas disfunções urinárias e anorretais**. 1ª ed. São Paulo: segmentofarma, 2005. p. 41-45.

BUMP, R. C. et al. The standardization of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction. **Am J Obstet Gynecol**, v. 175, p. 10-7, 1996.

BUSCHBAUM, G. M. et al. Urinary Incontinence in Nulliparous Women and Their Parous Sisters. **Obstet Gynecol**, v.106, n. 6, p.1253-1258, 2005.

CAINE, M.; RAZ, S. **The role of female hormones in stress incontinence**. In: 16 th Society International of Urology Congress. Amsterdam, 1973.

CARLEY, M; SCHAFFER, J. Urinary incontinence and pelvic organ prolapse in women with Marfan or Ehlers-Danlos syndrome. **Am J Obstet Gynecol**, v.182, n.5, p. 1021-1023, 2000.

CHEN, B.H. et al. Collagen metabolism and turnover in women with stress urinary incontinence and pelvic prolapse. **Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct**, v. 13, p. 80-7, 2002.

CHEN, B. et al. Menstrual phase-dependent gene expression differences in periurethral vaginal tissue from women with stress incontinence. **Am J Obstet Gynecol**, v. 189, p. 89-97, 2003.

CHEN, Y. et al. Collagen synthesis is not altered in women with stress urinary incontinence. **Neurourol Urodyn**, v. 23, n. 4, p. 367-73, 2004.

CHEN, B. et al. Microarray analysis of differentially expressed genes in vaginal tissues from women with stress urinary incontinence compared with asymptomatic women. **Hum Reprod**, v.21, n.1, p. 22-9, 2006.

CIOFU, C.; HAAH, F. Mecanismos da continência urinária feminina. In: AMARO, J.L.; HADDAD, J.M.; TRINDADE, J.C.S.; RIBEIRO, R.M. **Reabilitação do assoalho pélvico nas disfunções urinárias e anorretais**. 1ª ed. São Paulo: segmentofarma, 2005. p. 25-31.

COR, A.; BARBIC, M.; KRALJ, B. Differences in the quantity of elastic fibers and collagen type I and type III in endopelvic fascia between women with stress urinary incontinence and controls. **Urol Res**, v. 31, n. 2, p. 61-5, 2003.

DANFORTH, K.N. et al. Risk factors for urinary incontinence among middle-aged women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 194, p. 339-45, 2006.

DECLERCQ, E.; MENACKER, F.; MACDORMAN, M. Rise in “no indicated risk” primary caesareans in the United States, 1991-2001: cross sectional analysis. **BMJ**, v. 330, p. 70-72, 2005.

DELANCEY, J.O. Structural support of the urethra as it relates to stress urinary incontinence: the hammock hypothesis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 170, p.1713, 1990.

ERTUNC, D. et al. Is stress urinary incontinence a familial condition? **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.83, p. 912-16, 2004.

FALCONER, C. et al. Different organization of collagen fibrils in stress-incontinent women of fertile age. **Acta Obstet Gynecol Scand** , v. 77, n.1, p. 87-94, 1998(a).

FALCONER, C. et al. Paraurethral connective tissue in stress-incontinent women after menopause. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 77, n. 1, p. 95-100, 1998(b).

FELDNER, P. C. Jr. et al. Sulfated glycosaminoglycans of the periurethral tissue in women with e without stress urinary incontinence, according to genital prolapse state. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 126, n. 2, p. 250-254, 2006.

FERREIRA, H. B. De Genes a Genomas. In: LEWIS, B. **Genes VII**. 1^a ed. Porto Alegre: ARTMED, 2001. p.35-62.

FORGACS, G.; NEWMAN, S. A.; HINNER, B. Assembly of collagen matrices as a phase transition revealed by structural and rheologic studies. **Biophys**, v. 84, p. 1272-1280, 2003.

GABRIEL, B. et al. Uterosacral ligament in women with or without pelvis organ prolapse. **Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunction**, v. 16, p. 475-479, 2005.

GOEPEL, C. et al. Periurethral connective tissue status of postmenopausal women with genital prolapse with and without stress incontinence. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 82, n. 7, p. 659-64, 2003.

GOEPEL, C.; THOMSEN, C. Changes in the extracellular matrix in periurethral tissue of women with stress urinary incontinence. **Acta histochemica**, v. 108, p. 441-45, 2006.

GOEPEL, C. Differential elastin and tenascin immunolabeling in the uterosacral ligaments in postmenopausal women with and without pelvic organ prolapse. **Acta histochemica**, v. 110, p. 204-209, 2008.

GOH, J. T. W. Biomechanical and biochemical assessments for pelvic organ prolapse. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 15, p. 391-394, 2003.

GOSLING, J. A . The structure of the female lower urinary tract and pelvis floor. **Urol Clin North Am**, v. 12, n. 2, p.207–214, 1985.

GRANT, S. F. et al. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. **Nat Genet**, v. 14, p.203-205, 1996.

GREEN, T. H. Urinary stress incontinence differential diagnosis, pathophysiology and management. **Am J Obstet Gynecol**, v. 122, p. 368, 1975.

HUNSKAAR, S. et al. Epidemiology and Natural History of Urinary Incontinence. **Int Urogynecol J**, v. 11, p. 301-319, 2000.

JENSEN, J. K.; NIELSEN, Jr. F. R.; OSTERGARD, D.R. The role of patient history in the diagnosis of urinary incontinence. **Obstet Gynaecol**, v. 83, p.904-910, 1994.

JOLLEYS, J. Reported prevalence of urinary incontinence in women in a general practice. **Br Med J**, v. 296, p.1300-2, 1988.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p.69-93.

KARSENTY, G.; CROMBRUGGHE, B. Two different negative and one positive regulatory factors interact with a short promoter segment of the alpha 1(I) collagen gene. **J Biol Chem**, v. 265, p.9934-42, 1990.

KEANE, D. P. et al. Analysis of collagen status in premenopausal nulliparous women with genuine stress incontinence. **Br J Obstet Gynecol**, v. 104, p. 994-998, 1997.

KIM, S.; HARVEY, M.; JOHNSTON, S. A Review of the Epidemiology and Pathophysiology of Pelvic Floor Dysfunction: Do Racial Differences Matter? **J Obstet Gynaecol Can**, v. 27, n. 3, p.251-259, 2004.

LANG, J. et al. Clinical study on collagen and stress urinary incontinence. **Clin Exp Obstet Gynecol**, v. 29, n. 3, p.180-182, 2002.

LANGDAHL, B.L. et al. An Sp1 binding site polymorphism in the COL1A1 gene predicts osteoporotic fractures in both men and women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.13, p.1384-1389, 1998.

LIAPIS, A. et al. Changes in the quantity of collagen type I in women with genuine stress incontinence. **Urol Res**, v.28, n.5, p. 323-326, 2000.

LIU, X. et al. Failure of elastic fiber homeostasis leads to pelvic floor disorders. **Am J Pathol**, v. 168, p. 519-528, 2006.

MANN, V. et al. A *COLIA1* Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. **J Clin Invest**, v. 107, p. 899-907, 2001.

MEYER, S. et al. The effects of birth on urinary incontinence mechanisms and other pelvic floor characteristics. **Obstet Gynecol**, v. 92, p. 613-618, 1998.

MILSOM, I. Prevalence of urinary incontinence. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 79, p. 1956-9, 2000.

MILSOM, I. et al. The influence of age, parity, oral contraception, hysterectomy and menopause on the prevalence of urinary incontinence in women. **J Urol**, v. 149, p. 1459, 1993.

MUSHKAT, Y.; BUKOVSKY, I.; LANGER, R. Female urinary stress incontinence- Does it have familial prevalence? **Am J Obstet Gynecol**, v. 174, p. 617-619, 1996.

MYDLO, J. H. The impact of obesity in urology. **Urol Clin North Am**, v. 31, n. 2, p. 275-287, 2004.

OTTANI, V.; RASPANTINI, M.; RUGGERI, A. Collagen structure and functional implications. **Mícron**, v. 32, p. 251-260, 2001.

OXLUND, H. Relationships between the biomechanical properties, composition and molecular structure of connective tissues. **Connect Tissues Res**, v. 15, p. 65-72, 1986.

PENA, S. D. J. Retrato Molecular do Brasil, Versão 2001. In: **Homo brasilis. Aspectos Genéticos, Lingüísticos, Históricos e Socioantropológicos da Formação do Povo Brasileiro**. 1ª ed. Ribeirão Preto: Funpec-RP, 2002. p. 11-28.

PETROS, P.E.; ULMSTEN, U. An integral theory of female urinary incontinence. Experimental and clinical considerations. **Acta Obstet Gynecol Scand Suppl**, v. 153, p. 71, 1990.

POMPEU, H.H. **Mutação no exon 20 do gene da elastina em mulheres com incontinência urinária de esforço decorrente de fatores extrínsecos à uretra**. 2004. Tese(Doutorado em Medicina)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RECHBERGER, T. et al. Role of fascial collagen in stress urinary incontinence. **Am J Obstet Gynecol**, v. 179, p. 1511-1514, 1998.

ROHR, G. et al. Genetic and environmental influences on urinary incontinence: a Danish population-based twin study of middle-aged and elderly women. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 83, p. 978-982, 2004.

SCHAFER, W. et al. International Continence Society. Good urodynamic practices: uroflowmetry, filling cystometry and pressure-flow studies. **Neurol Urodyn**, v. 21, p. 261-274, 2002.

SCHWANKE C.H. et al. Is there an association between T102C polymorphism of the serotonin receptor 2A gene and urinary incontinence? **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n.10, p.1315-1322, 2007.

SHERBURN M. et al. Is Incontinence Associated With Menopause? **Obstet Gynecol**, v. 98, p. 628-633, 2001.

SKORUPSKI, P. et al. An α -1 chain of type I collagen Sp1-binding site polymorphism in women suffering from stress urinary incontinence. **Am J Obstet Gynecol**, v. 194, p. 346-350, 2006.

SKORUPSKI, P. et al. Polymorphism of the gene encoding alpha-1 chain of collagen type I and a risk of pelvic organ prolapse--a preliminary study. **Ginekol Pol**, v. 78, n. 11, p. 852-855, 2007.

SUBAK, L.L. et al. Weight Loss to Treat Urinary Incontinence in Overweight and Obese Women. **N Engl J Med**, v. 360, p. 481-490, 2009.

TRABUCCO, E. et al. Role of proteoglycans in the organization of periurethral connective tissue in women with stress urinary incontinence. **Maturitas**, v. 58, p. 395-405, 2007.

TUNN, R. et al. Morphology of the suburethral pubocervical fascia in women with stress urinary incontinence: a comparison of histologic and MRI findings. **Int Urogynecol J**, v. 16, p. 480-486, 2005.

UITTERLINDER, A.G. et al. Relation of alleles of the collagen type I $\alpha 1$ gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. **N Engl J Med**, v. 338, p.1016-1021, 1998.

ULMSTEN, U. et al. A multicenter study of Tension-Free vaginal tape(TVT) for surgical treatment of stress urinary incontinence. **Int Urogynecol J**, v. 9, p. 210-13, 1998.

VAN DER SLUIS, M. et al. Collagen I $\alpha 1$ Polymorphism is Associated with Bone Characteristics in Caucasian Children and Young Adults. **Calcif Tissue Int**, v. 71, p. 393-399, 2002.

WEN, Y.; POLAN, M.L.; CHEN, B. Do extracellular matrix protein expressions change with cyclic reproductive hormones in pelvic connective tissue from women with stress urinary incontinence. **Human Reproduction**, v. 21, n. 5, p. 1266-1273, 2006.

WENSTRUP, R.J. et al. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. **J Bio Chem**, v. 279, p. 53331-53337, 2004.

WU, J. M.; HUNDLEY, A. F.; VISCO, A. G. Elective primary cesarean delivery: attitudes of urogynecology and maternal-fetal medicine specialists. **Obstet Gynecol**, v. 105, p. 301-306, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS E SAÚDE
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A senhora está sendo convidada a participar de uma pesquisa que vai estudar, no seu sangue, se você tem alguma alteração genética que ajudou você a ficar doente. Para participar da pesquisa, a senhora terá que responder a algumas perguntas realizadas por mim, fazer o exame ginecológico e permitir a coleta de 8 ml de seu sangue.

Título da pesquisa

O polimorfismo do gene *COLIA1* em mulheres com Incontinência Urinária de Esforço.

Justificativa e objetivo

Ainda existem dúvidas sobre a principal causa da perda de urina e, ainda, se uma alteração no DNA pode provocar este problema. Os resultados desta pesquisa serão importantes para entender se a genética ajuda a ter perda de urina, o que pode ajudar muito no tratamento futuro desta doença.

Participação do voluntário

Sua participação na pesquisa é responder algumas perguntas como nome, endereço, telefone, idade, quantas vezes ficou grávida, quantos partos vaginais, partos com fórcepe e cesáreas realizou, se está menstruando ou não, data da última menstruação, idade de quando iniciou a perda urinária, se fuma ou não, se usa medicação ou não, se possui ou não outra doença, se já realizou alguma cirurgia prévia para perda urinária ou qualquer outra cirurgia. Depois disso, você doará 8 ml de sangue para análise do seu DNA. Você vai ter direito de:

1. Participar desta pesquisa se quiser.
2. O seu nome e as informações fornecidas não serão revelados para ninguém.
3. Ter conhecimento dos resultados desta pesquisa. O seu material vai ficar guardado no Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Piauí

e poderá ser examinado para outros marcadores que possam ser importantes no problema da perda urinária.

4. Fazer qualquer pergunta que tiver vontade.
5. Não participar do estudo, não sofrendo qualquer penalidade.

Os maiores problemas ocasionados à senhora neste trabalho estão relacionados ao tempo maior de consulta, para perguntas do pesquisador e uma pequena dor da picada da agulha para retirada de sangue.

A senhora não receberá gratificação pela participação nesta pesquisa.

O entrevistador estará à sua disposição para esclarecer qualquer dúvida nos endereços citados abaixo.

A sua participação nesta pesquisa é muito importante e ajudará a entender melhor a causa da perda de urina, se este problema pode ou não ser herdado geneticamente, ou seja, passar de pais para filhos, além de contribuir para a descoberta de futuros tratamentos mais eficazes.

Tendo lido, discutido com os pesquisadores e entendido o que eles vão fazer, aceito de própria vontade participar desta pesquisa.

Teresina (PI), Data: _____

Sujeito de pesquisa ou responsável legal

Pesquisador

Pesquisadores responsáveis:

Profa. Dra. Semiramis Jamil Hadad Monte

Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular do Piauí

Campus Ininga, Bloco 16; CEP:64049-550. Teresina-PI

Tel: (86)215-5690/215-5691/215-5651

Ana Maria Pearce Brito de Arêa Leão

Hospital São Marcos, Rua Olavo Bilac, número 2300.

Tel: (086) 2106-8000.

Comitê de ética em pesquisa- Hospital São Marcos

Rua Olavo Bilac, número 2300.

Tel: (86) 2106-8000.

Comitê de ética em pesquisa- Universidade Federal do Piauí

Campus Universitário, Bloco 6, Bairro Ininga; CEP:64049-550; Tel: (86)3215-5437

APÊNDICE B

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

FICHA DE COLETA DE DADOS

NÚMERO: _____ DATA: _____

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____ DATA DE NASCIMENTO: _____

ETNIA: () CAUCASÓIDE () AFRO-DESCENDENTE () MISTIÇA
() AMERÍNDIA

IDADE: _____ IDADE DE INÍCIO DOS SINTOMAS: _____

IMC: _____

PARIDADE: __GESTA__ PARTOS VAGINAIS __PARTOS CESAREANOS

MENOPAUSA: () SIM () NÃO

FASE DO CICLO MENSTRUAL: () PROLIFERATIVA () SECRETÓRIA

PROLAPSO GENITAL: () SIM () NÃO

ESTADIAMENTO POP Q: _____

TABAGISMO: () SIM () NÃO

CIRURGIAS PRÉVIAS PARA IUE: _____

OUTRAS CIRURGIAS: _____

PRESSÃO DE PERDA: _____

APÊNDICE C

TABELA 4. Dados clínicos das pacientes incontinentes atendidas no Hospital São Marcos, Teresina, Piauí, no período de 02 de outubro de 2007 a 22 de dezembro de 2008.

CASOS	IDADE (anos)	IDADE DE INÍCIO DOS SINTOMAS (anos)	IMC (Kg/m ²)	GESTAÇÕES (N)	PARTOS VAGINAIS (N)	CESÁREAS (N)	MENOPAUSA	FASE DO CICLO	POP-Q	TABAGISMO	PRESSÃO DE PERDA (cm/H2O)
1	45	30	23,6	5	2	1	Não	Proliferativa	1	Não	63
2	57	51	24	5	4	1	Sim	-	1	Não	94
3	43	33	20,4	2	0	2	Não	Secretória	0	Não	63
4	41	41	19,6	7	2	0	Não	Secretória	1	Não	46
5	51	41	20,6	4	3	1	Não	Histerectomizada	1	Não	165
6	38	38	29,6	0	0	0	Não	Secretória	1	Sim	109
7	47	42	26,9	2	0	2	Não	Secretória	0	Não	151
8	40	35	27,3	3	0	2	Não	Proliferativa	0	Não	115
9	28	20	28,7	2	1	1	Não	Secretória	0	Não	112
10	38	37	24,2	6	5	0	Não	Secretória	0	Não	111
11	61	51	32,8	0	0	0	Sim	-	2	Não	108
12	51	49	23	2	2	0	Sim	-	0	Não	73
13	56	40	21,4	4	3	1	Sim	-	2	Não	80
14	60	33	30,9	4	4	0	Sim	-	1	Sim	106
15	40	40	31,8	2	0	2	Não	Secretória	0	Sim	144
16	63	53	24,3	3	3	0	Sim	-	0	Não	106
17	47	58	20,2	5	2	3	Não	Proliferativa	1	Não	109
18	53	52	28,4	0	0	0	Sim	-	0	Sim	122
19	48	36	26,7	5	4	0	Não	Secretória	0	Sim	137
20	53	29	34,7	3	0	3	Sim	-	0	Não	49
21	52	51	29,22	3	3	0	Sim	-	2	Sim	94
22	51	33	32,4	2	2	0	Não	Secretória	1	Sim	90
23	46	45	21	3	2	1	Não	Secretória	2	Sim	71
24	47	40	25,9	3	2	1	Não	Proliferativa	0	Não	91
25	55	50	28,8	5	4	1	Sim	-	2	Não	83
26	52	32	30,7	5	5	0	Sim	-	0	Sim	167
27	57	56	24,2	2	2	0	Sim	-	2	Sim	144
28	50	35	26,7	3	2	1	Não	Secretória	0	Não	105
29	45	40	22,4	3	2	1	Não	Proliferativa	2	Não	98

Fonte: Crédito da autora, Te, 2009

TABELA 5. Dados clínicos das pacientes continentas atendidas no Hospital São Marcos, Teresina, Piauí, no período de 02 de outubro de 2007 a 22 de dezembro de 2008.

CONTROLES	IDADE (anos)	IMC (Kg/m ²)	GESTAÇÕES (N)	PARTOS VAGINAIS (N)	CESÁREAS (N)	MENOPAUSA	FASE DO CICLO	POP-Q	TABAGISMO
1	35	25,4	4	4	0	Não	Proliferativa	1	Não
2	45	32,8	2	2	0	Sim	-	1	Não
3	40	19,9	2	2	0	Não	Secretória	0	Não
4	57	27,5	5	1	1	Sim	-	2	Não
5	49	26,2	5	5	0	Sim	-	1	Não
6	38	20,9	3	3	0	Não	Secretória	1	Não
7	35	19,1	3	2	1	Não	Proliferativa	1	Não
8	36	20,9	5	3	1	Não	Secretória	2	Não
9	42	16,5	3	3	0	Não	Secretória	0	Não
10	54	24,7	7	7	0	Sim	-	2	Não
11	41	23,1	3	2	1	Não	Secretória	1	Não
12	40	26,9	5	4	1	Não	Proliferativa	2	Não
13	43	28,8	5	3	0	Não	Secretória	0	Sim
14	41	23,1	4	3	1	Não	Secretória	1	Sim
15	60	19	5	5	0	Sim	-	2	Não
16	52	26,8	3	2	1	Sim	-	0	Sim
17	62	24,2	9	9	0	Sim	-	1	Não
18	40	23,5	2	2	0	Não	Proliferativa	1	Não
19	46	18,1	4	4	0	Não	Secretória	0	Sim
20	42	25,5	4	2	1	Não	Secretória	1	Não
21	53	38,2	3	3	0	Sim	-	2	Não
22	42	23,4	3	3	0	Não	Histerectomizada	0	Sim

Fonte: Crédito da autora, Te, 2009