

ALTERAÇÕES FUNCIONAIS DA BEXIGA E URETRA DE RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Sumário

1. Resumo	2
2. Introdução	2
3. Método	3
3.1 Desenho	3
3.2 Materiais	3
3.3 Animais	4
3.4 Medicamento	4
3.5 Anestesia	4
3.6 Técnica cirúrgica	4
3.7 Cistometria	5
4. Resultados	5
5. Discussão	10
6. Conclusão	12
7. Bibliografia	12

1. Resumo:

Este estudo tem como objetivo verificar as alterações do trato urinário inferior de ratos submetidos à inibição da óxido nítrico sintase (ONS) com N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), e conseqüentemente redução de óxido nítrico. Além disso, avalia se drogas que aumentam a oferta de óxido nítrico revertem os efeitos da inibição da ONS, portanto podendo ter utilidade no tratamento de doenças que comprometem o trato urinário inferior, como síndrome da bexiga hiperativa, aumento benigno da próstata e disfunções miccionais de causa neurogênica.

Para tanto, realizou-se grupos pareados de ratos controles e tratados, todos sendo avaliados com estudo urodinâmico. Os parâmetros urodinâmicos durante a fase de enchimento e de micção foram registrados e submetidos à avaliação estatística, para permitir a discussão dos resultados e as conclusões.

2. Introdução:

Frequência, urgência e incontinência urinária são sintomas comuns em homens com obstrução intravesical (OI) devido ao aumento benigno da próstata (ABP).[1] Esses sintomas ocorrem em 50-75% dos pacientes com ABP e correspondem a hiperatividade do detrusor (HD).[2]

Animais com OI causados por obstrução uretral têm HD representado por contrações involuntárias durante na fase de enchimento vesical e observados na cistometria. No entanto, esse modelo animal não avalia a função uretral. [1]

Óxido nítrico (ON) é considerado neurotransmissor que atua em diversos locais do sistema nervoso dos mamíferos, incluindo as sinapses periféricas do trato urogenital.[3] Em estudos farmacológicos experimentais in vitro, verificou-se que o óxido nítrico promove relaxamento dos músculos lisos da bexiga e uretra. [4]

O N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) é um potente inibidor da óxido nítrico sintase, enzima responsável pela síntese de ON. Portanto, animais em uso crônico deste medicamento podem ser usados para avaliar experimentalmente os efeitos in vivo da diminuição do ON não somente no detrusor, como na função uretral. [5]

Os objetivos do estudo foram: verificar se o tratamento crônico com L-NAME induz alterações funcionais no trato urinário inferior de ratos; e avaliar se drogas doadoras de óxido nítrico e inibidores da fosfodiesterase revertem os efeitos da diminuição do ON no trato urinário inferior de ratos em tratamento crônico com L-NAME.

3. Métodos

3.1 Desenho:

Estudo do tipo experimental controlado.

3.2 Materiais:

- Ratos machos da espécie Wistar
- Drogas: L-NAME, uretana, doadores de nitrato e inibidores da fosfodiesterase
- Bomba de infusão contínua
- Sensor de pressão e software para registro e amplificação do sinal de pressão
- Solução salina 0,9%
- Seringas de plástico descartável
- Equipo de soro
- *Scalp* 19G
- Torneira 3 vias
- Materiais de microcirurgia
- Gazes

3.3 Animais:

Ratos com idade de 8 semanas e com peso entre 200-300 gramas, separados em dois grupos:

- Controle: não tratados.
- Grupo de estudo: ratos cronicamente tratados com L-NAME (60 mg/Kg/dia diluídos em água por 30 dias)

3.4 Medicamento:

L-NAME é um potente inibidor da óxido nítrico sintase (ONS), enzima responsável pela formação de ON, portanto a inibição da ONS induz diminuição do ON. O L-NAME já fora exaustivamente estudado no sistema cardiovascular, causando exacerbação do estímulo simpático, provocando hipertensão. Estudos também avaliaram os efeitos do L-NAME no rim e verificou-se que está relacionado alterações renais provocadas pelas alterações hemodinâmicas [3], muito embora alguns trabalhos em que a pressão fora normalizada, ainda assim havia progressão para insuficiência renal. [1] Porém, ainda não foi avaliado seu efeito in vivo no trato urinário inferior, o qual pode ser responsável pelo menos em parte pela insuficiência renal, visto que disfunções miccionais também cursam com alterações renais.

3.5 Anestesia:

Todos os animais foram anestesiados com injeção peritoneal de uretana, com dose de 1,2 µmg/Kg.

3.6 Técnica cirúrgica:

Depois de anestesiado, faz-se incisão no abdome de 2 cm na linha média, expõe-se a bexiga, posicionando-se uma gaze abaixo.

3.7 Cistometria:

Para realizar a cistometria, faz-se inserção de um *scalp* 19G na cúpula da bexiga. Após esvaziá-la, aguarda-se por 30 minutos para equilíbrio do detrusor, e só então é iniciada a infusão salina na bexiga com velocidade de 4mL/h com bomba de infusão. O cateter vesical (*scalp*) é conectado ao transdutor de pressão e a seringa de infusão por uma torneira de três vias.

A frequência de contrações do detrusor, a pressão máxima do detrusor durante essas contrações na fase de enchimento, o volume infundido até a primeira micção, a pressão no início e o pico de pressão durante a micção, assim como a frequência de ciclos de micção e a pressão máxima do detrusor na fase de micção são registradas durante o estudo urodinâmico.

Estabelece-se como hiperatividade do detrusor a presença de contrações do detrusor com amplitude superior a 4 cmH₂O durante a fase cistométrica no estudo urodinâmico. Define-se, ainda, como hiperatividade do detrusor, o aumento do número de ciclos de micções, bem como a redução do intervalo intermicção.

Considera-se alteração da função uretral a redução do esvaziamento vesical, representada por aumento do volume de solução salina necessário para iniciar a micção.

4. Resultados:

Os Grupos 1 e 2 foram uniformes em relação ao peso. A administração crônica e sistêmica do L-NAME resultou em aumento significativo da FCD e no LV, havendo uma tendência de aumento na FM (Fig. 1 e 2). Não houve diferença significativa ao comparar a LP, PP e PB (Tabela 1). Foi observado, macroscopicamente que os animais do Grupo 2 apresentavam ureterohidronefrose e grandes bexigas, quando comparado com controle (Fig. 3).

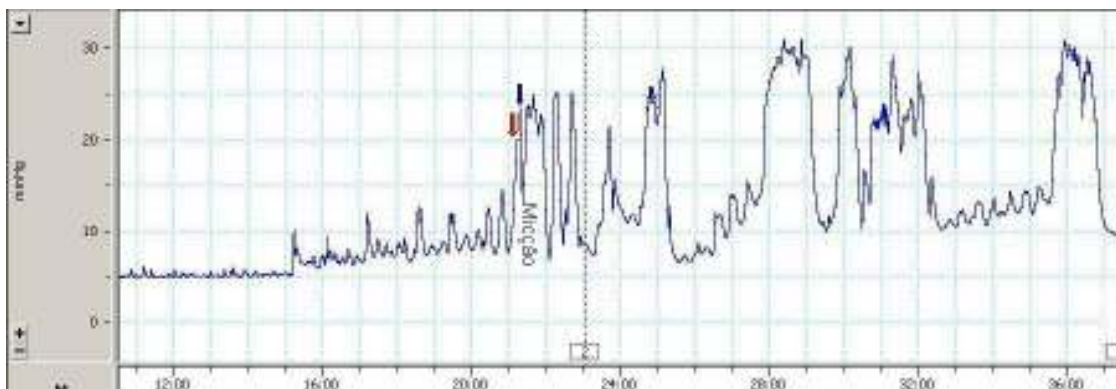


Figura 1. Estudo urodinâmico obtido de um animal do Grupo 1, seta vermelha representa o LP e a azul a PP.

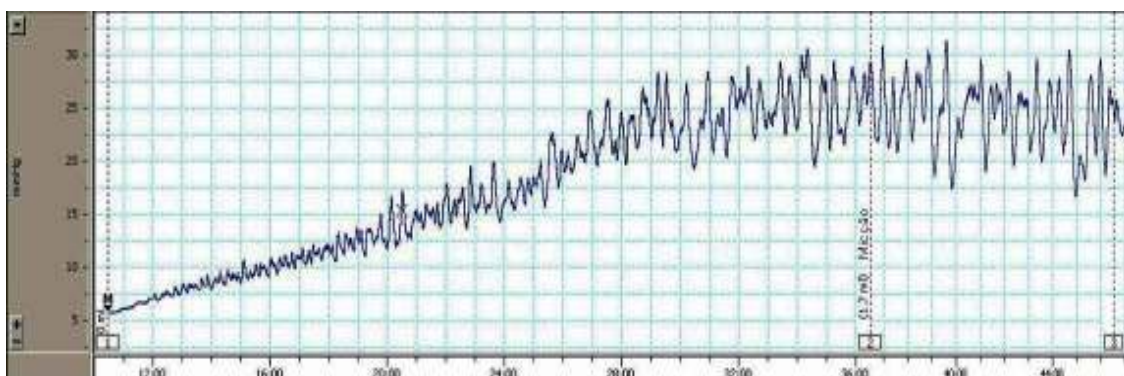


Figura 2. Urodinâmica de um animal tratado com L-NAME; presença de grande número de contrações do detrusor, limiar de volume de 1,7ml e maior frequência do número de ciclos de micção.



Figura 3. Seta amarela mostrando a bexiga do animal controle



Figura 4. Bexiga de animal tratado com L-LAME, distendida e com paredes finas.

Tabela 1. Análise descritiva e comparativa das variáveis contínuas entre os Grupos 1 e 2.

Grupo controle							Grupo tratado							
Variável	N	Média	DP	Min	Mediana	Max	Variável	N	Média	DP	Mín	Mediana	Máx	P [*]
FCD	9	1.17	0.75	0.5	0.98	3.04	FCD	8	2.62	0.89	1.13	2.71	3.60	P=0.004
LV	9	1.18	0.38	0.53	1.26	1.80	LV	8	2.83	1.64	0.80	2.80	6.00	P=0.012
LP	9	19.14	3.02	16.20	17.60	25.20	LP	8	19.13	2.90	15.20	19.20	22.40	P=0.860
PP	9	21.14	3.06	16.20	20.80	26.50	PP	8	20.05	2.93	16.20	20.55	23.40	P=0.555
FM	9	1.08	0.65	0.17	1.2	1.84	FM	8	1.97	0.78	1.15	1.79	3.45	P=0.052
PB	9	11.69	6.77	2.7	12.30	20.30	PB	8	13.73	3.35	7.00	15.05	15.70	P=0.906
Peso	9	332.56	7.75	321.00	332.00	345.00	Peso	8	334.77	7.95	319.15	335.00	347.00	P=0.336

p-valores referentes ao teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos controle e tratado.

FCD – frequência de contrações do detrusor por minuto; LV – limiar de volume; LP – limiar de pressão; PP – pico de pressão; FM – frequência dos ciclos de micção por minuto; PB – pressão basal durante as micções

Os animais dos Grupos 3 e 4 foram semelhantes quanto ao peso. A administração venosa do sildenafil nos animais controles (Grupo 3) não alterou significativamente a frequência ou a amplitude dos ciclos de micção (Fig. 4). Pelos resultados descritivos das variáveis para caracterização dos grupos, e a comparação dos parâmetros entre os controles (Grupo 3) e os tratados (Grupo 4), nos tempos pré-Sildenafil (1) e pós-Sildenafil (2), verifica-se diferença significativa entre os grupos para: FM no tempo pós (menor no Grupo 4) e amplitude no tempo pré (maior no Grupo 4). A amplitude no tempo 2 (pós-sildenafil) dos animais tratados com L-NAME foi semelhante ao dos animais controle. (Tabela 2)

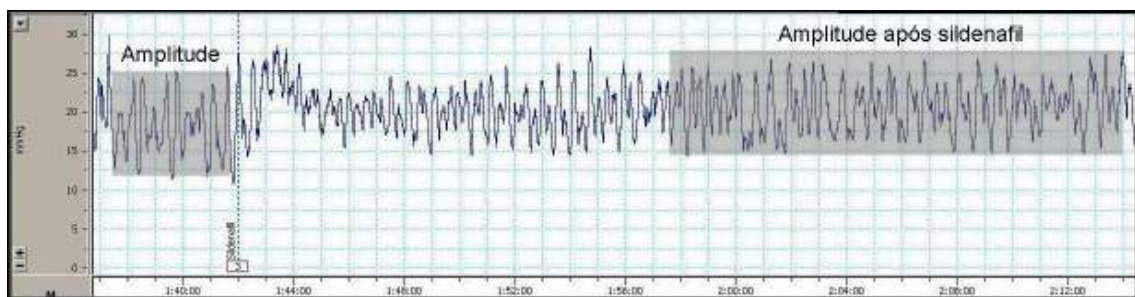


Figura 5. A amplitude e frequência dos ciclos miccionais não se alteraram após administração do sildenafil aos animais controles.

Tabela 2. Análise descritiva e comparativa das variáveis contínuas entre grupos.

GRUPO 'CONTROLE'							GRUPO 'TRATADO L-NAME'							
VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX	VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX	P-VALOR*
Peso	4	327.75	5.91	320.00	328.50	334.00	Peso	6	312.50	24.03	270.00	320.00	335.00	P=0.330
FM1	4	1.27	0.37	0.92	1.23	1.69	FM1	6	1.27	0.37	0.60	1.37	1.57	P=0.831
Amplitude1	4	9.00	3.16	6.00	8.50	13.00	Amplitude1	6	25.67	8.73	10.00	27.00	34.00	P=0.025
FM2	4	1.33	0.15	1.20	1.30	1.50	FM2	6	0.30	0.25	0.00	0.35	0.60	P=0.010
Amplitude2	4	8.75	2.99	5.00	9.00	12.00	Amplitude2	6	9.00	6.60	2.00	7.50	21.00	P=0.668

* p-valores referentes ao teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos controle e tratado.

As estatísticas descritivas e comparativas das diferenças (ou deltas) dos parâmetros entre os tempos pré-Sildenafil (1) e pós-Sildenafil (2), para controles e tratados demonstra-se diminuição significativa entre os tempos para FM e Amplitude no grupo tratado (redução entre tempos pré e pós administração de Sildenafil) (Fig. 5). Porém, não há alteração significativa da pressão arterial (Tabela 3).

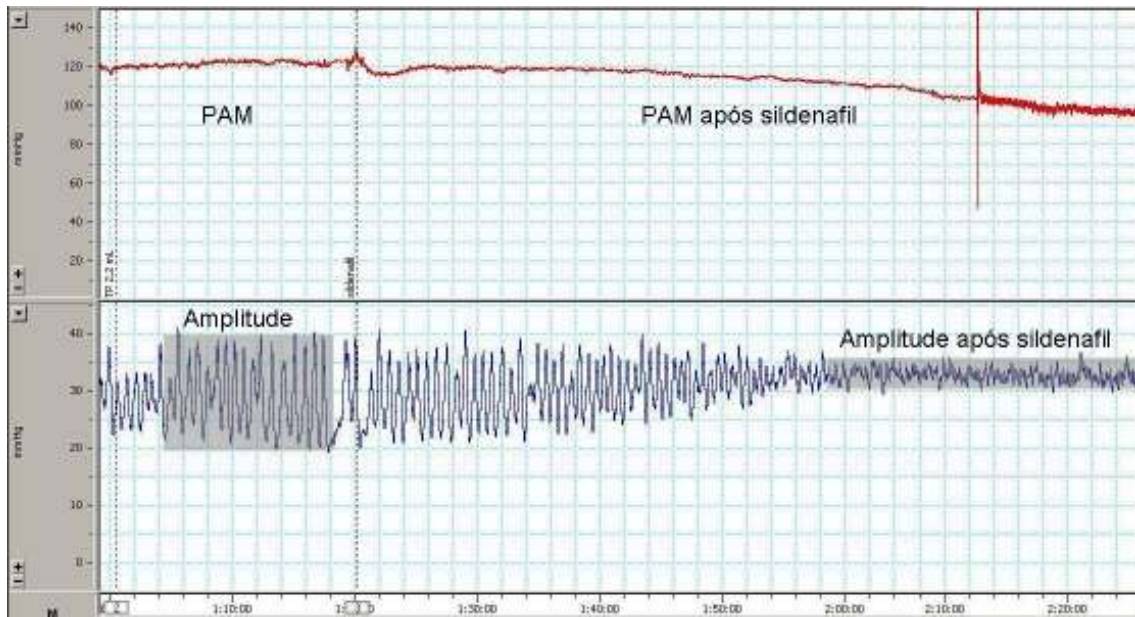


Figura 6. Diminuição da amplitude da contração do detrusor durante os ciclos de micção após administração do sildenafil no rato tratado com L-NAME

Tabela 3. Análise descritiva e evolutiva das variáveis contínuas entre tempos, por grupo.

GRUPO 'CONTROLE'								GRUPO 'TRATADO L-NAME'							
VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX	P-VALOR*	VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX	P-VALOR*
DIF_MC	4	0.06	0.25	-0.29	0.13	0.28	P=0.875	DIF_MC	6	-0.97	0.34	-1.57	-0.93	-0.60	P=0.031
DIF_AMPLIT	4	-0.25	1.71	-2.00	-0.50	2.00	P=0.999	DIF_AMPLIT	6	-16.67	11.72	-32.00	-17.50	-2.00	P=0.031
								DIF_PA	6	-11.38	23.74	-38.00	-13.60	25.50	P=0.313

* p-valores referentes ao teste de Wilcoxon para amostras relacionadas para comparação entre os tempos pré e pós, para cada grupo.

Pelos resultados das análises de variância para medidas repetidas (*repeated measures ANOVA*) para comparação simultânea dos parâmetros entre os 2 grupos (controle e tratado) e entre os 2 tempos (pré e pós-Sildenafil), verifica-se diferença significativa entre grupos para FM e amplitude (menores valores no grupo tratado no tempo pós administração de Sildenafil) (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados da ANOVA para medidas repetidas para comparação entre grupos e tempos.

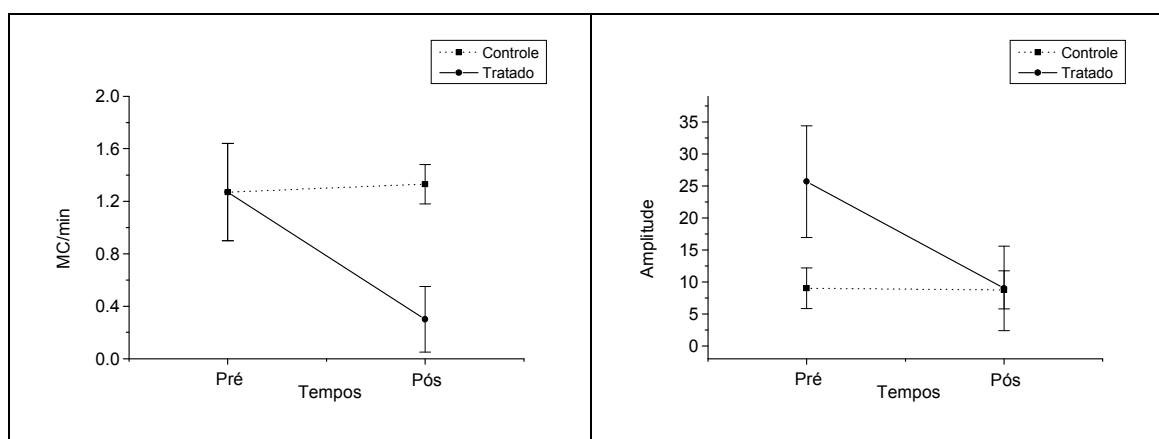
Variáveis*	Comparação entre	Comparação entre	Interação
	Grupos (Controle vs Tratado)	Avaliações (Pré e Pós)	Grupos vs Tempos
MC/min	P=0.063	P=0.011^a	P=0.007^a
Amplitude	P=0.165	P=0.024^b	P=0.027^b

* variáveis transformadas em postos (ranks) para os testes devido à ausência de distribuição Normal.

(a) efeito significativo da interação grupo vs tempo: diferenças significativas entre grupos (Tukey): Controle≠Tratado no Pós; diferenças significativas entre tempos (Perfil): Pré≠Pós para grupo Tratado.

(b) efeito significativo da interação grupo vs tempo: diferenças significativas entre grupos (Tukey): Controle≠Tratado no Pré; diferenças significativas entre tempos (Perfil): Pré≠Pós para grupo Tratado.

Figura 7. Queda da frequência de micção (MC/min) e retorno da amplitude das contrações para valores semelhantes ao Grupo controle.



Tempo médio para resposta ao sildenafil foi de 21,58 ($\pm 13,18$).

5. Discussão:

Sintomas do trato urinário inferior (STUI) decorrentes das afecções da próstata são motivos de procura freqüente do urologista e novos medicamentos que atuem nessas condições são de grande importância.

Historicamente, muitos termos como prostatismo e hiperplasia prostática benigna (HBP) têm sido usados para descrever os STUI em homens. Porém, atualmente recomenda-se que estas denominações sejam eliminadas do vocabulário médico, uma vez que nem todos os sintomas do armazenamento e esvaziamento são relacionados à próstata [1.6 e 1.7]. Deste modo, sugere-se a expressão sintomas do trato urinário inferior (STUI). Estudos demonstraram que somente 25-50% dos homens com diagnóstico histológico de HBP têm STUI e esses sintomas podem ser devidos a problemas extra-próstáticos como disfunção miccional [1.10 e 1.11]. Em suma, STUI podem resultar de uma complexa inter-relação fisiopatológica, incluindo as doenças da próstata e as alterações do detrusor.

Sintomas de bexiga hiperativa (urgência, frequência, incontinência urinária de urgência e noctúria) compõem um subtipo de STUI na fase de armazenamento. Estes sintomas estão relacionados com hiperatividade do detrusor (HD) [1.20] e são reportados como o principal responsável pelo impacto negativo na Qualidade de Vida destes pacientes [1.16, 1.20].

OI resulta em isquemia do detrusor, deposição de colágeno, alterações nas propriedades de condução dos estímulos nervosos e reorganização do reflexo medular da micção em modelos experimentais [1.5 e 1.26]. Óxido nítrico tem ação de relaxamento da musculatura lisa do trato urinário inferior, portanto, poderia resultar na melhora dos STUI.

No presente estudo, foi avaliado, experimentalmente in vivo, o papel do óxido nítrico no trato urinário inferior. As variáveis urodinâmicas analisadas e a metodologia utilizada para fazer a cistometria estão de acordo com a descrita na literatura [4]. Inicialmente foi desenvolvido diminuição sistêmica de óxido nítrico pelo L-NAME. Comparado com o grupo controle, os animais tratados tiveram maior número de contrações do detrusor na fase de enchimento e tendência ao aumento no número dos ciclos de micção. O limiar de volume também foi maior que o controle. Desse modo, necessitam de maior volume para iniciar a micção sugerindo diminuição na capacidade de esvaziamento vesical pela falta de relaxamento uretral, visto que os ratos tratados urinam com pressões detrusora adequadas. Este fato é corroborado por estudos farmacológicos in vitro, os quais demonstram que o óxido nítrico proporciona relaxamento da musculatura lisa uretral [3.11-15]. Esses resultados sugerem que em animais tratados de maneira crônica e sistêmica com L-NAME, o óxido nítrico tem efeito inibidor tanto na bexiga como na uretra. Em conclusão, a privação sistêmica de óxido nítrico causa hiperatividade do detrusor com diminuição do relaxamento funcional da uretra, situação semelhante à observada em pacientes com OI e HD secundário ao ABP.

O sildenafil reverteu às alterações do detrusor, ocorrendo diminuição do número de ciclos de micção bem como da amplitude das contrações, nos animais tratados, porém não mudou os

parâmetros cistométricos nos animais controles. A inibição da PDE5 aumentando a concentração do GMPc resultando no relaxamento da musculatura lisa detrusora, potencializa o efeito do óxido nítrico disponível. Em recente estudo, randomizado e duplo cego, foi avaliado o efeito do sildenafil em pacientes com STUI e disfunção erétil, demonstrando que há melhoras dos sintomas, mas o fluxo urinário não muda e sugeriu que novas bases fisiopatológicas fossem desenvolvidas para explicar a etiologia dos STUI e o potencial dos inibidores da PDE5 para tratamento desses casos. Esse estudo demonstra que não somente as vias colinérgicas e noradrenérgicas estão envolvidas na fisiologia do trato urinário inferior, como também o mecanismo nitrérgico está relacionado na origem dos STUI e fica demonstrado o papel potencial dos inibidores da PDE5 em tratar esses pacientes.

Pacientes com HD e OBP quando tratados cirurgicamente em até 60% podem manter os STUI. Portanto, provavelmente esse grupo de pacientes se beneficiaria do tratamento com sildenafil. Pois, como foi observado o sildenafil atua diminuindo a frequência das micções e a amplitude das contrações.

6. Conclusão:

Os animais tratados com L-NAME tiveram maior número de contrações do detrusor na fase de enchimento e tendência ao aumento no número dos ciclos de micção e o sildenafil reverteu às alterações do detrusor, ocorrendo diminuição do número de ciclos de micção bem como da amplitude das contrações.

7. Bibliografia:

- [1].Engstron G., Henningsohn L., Steineck G., et al. Self assessed health, sadness and happiness in relation to the total burden of symptoms from lower urinary tract. BJU Int 2005; 95: 810-5.
- [2].Hu TW, Wagner TH, Bentkover JD, et al. Estimated economic cost of overactive bladder in the United States. Urology 2003; 61: 1123-8.

- [3].Rosen R, Altwein J, Boyle P, et al. Lower urinary tract symptoms and male sexual dysfunction: the Multinational Survey of the Aging Male (MSAM-7). *Eur Urol* 2003; 44: 637-49.
- [4]. Chapple CR, Roehrborn CG. A shifted paradigm for the further understanding, evaluation, and treatment of lower urinary tract symptoms in men: focus on bladder. *Eur Urol* 2006; 49: 651-59.
- [5]. Knutson T, Pettersson S, Dahlstrand C. The use of biodegradable PGA stents to judge the risk of post-TURP incontinence in patients with combined bladder outlet obstruction and overactive bladder. *Eur Urol* 2002; 42: 262-7.
- [6]. D'Ancona C, Griffiths D, Van Kerrebroeck P, et al. Lower urinary tract symptoms: etiology, patient assessment and predicting outcome from therapy. In: *Male lower urinary tract dysfunction: evaluation and management*. Health Publications 2006: pp 69-142.
- [7]. McVary KT, Monnig W, Camps JL, et al. Sildenafil citrate improves erectile function and urinary symptoms in men with erectile dysfunction and lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia: A randomized, double-blind trial. *J Urol* 2007; 177: 1071-77.
- [8]. Holtgrewe HL. Current trends in management of men with lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. *Urology* 1998. 51:1-7.
- [9]. Abrams P. New words for old: lower urinary tract symptoms for "prostatism" *BMJ* 1994; 308: 929-30.
- [10]. Arnedo K, Sullivan MP, Bae RJ, et al. Urodynamic characterization of nonobstructive voiding dysfunction in symptomatic elderly men. *J Urol* 1999. 162:142-6
- [11]. Ziada A, Rosenblum M, Crawford ED. Benign prostatic hyperplasia: an overview. *Urology* 1999; 53: 1-6.
- [12]. Wein AJ. Bladder outlet obstruction an overview. *Adv Exp Med Biol* 1995. 385: 3-5.

Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, et al. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol* 2003; 20: 327-36.