



MARCY LANCIA PEREIRA

**EFEITOS VESICAIS DA INIBIÇÃO CRÔNICA DA
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM
CAMUNDONGOS COM OBSTRUÇÃO PARCIAL
URETRAL**

**Campinas
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MARCY LANCIA PEREIRA

**EFEITOS VESICAIS DA INIBIÇÃO CRÔNICA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO
NÍTRICO EM CAMUNDONGOS COM OBSTRUÇÃO PARCIAL URETRAL**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D´Ancona

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do
título de Doutora em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA MARCY LANCIA PEREIRA E ORIENTADA
PELO PROF. DR. CARLOS ARTURO LEVI D´ANCONA.

Assinatura do Orientador

Campinas
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P414e Pereira, Marcy Lancia, 1981-
Efeitos vesicais da inibição crônica da produção de
óxido nítrico em camundongos com obstrução parcial
uretral / Marcy Lancia Pereira. -- Campinas, SP : [s.n.],
2014.

Orientador : Carlos Arturo Levi D´Ancona.
Coorientador : Edson Antunes.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Óxido nítrico. 2. Urodinâmica. 3. Bexiga urinária. I.
D'Ancona, Carlos Arturo Levi, 1952-. II. Antunes,
Edson, 1960-. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The effects of chronic nitric oxide synthesis on bladder function
in partial outlet obstructed mice

Palavras-chave em inglês:

Nitric oxide

Urodynamics

Urinary bladder

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Carlos Arturo Levi D´Ancona [Orientador]

Cássio Luís Zanettini Ricetto

Fernanda Bruschi Marinho Priviero

Julio Alejandro Rojas Moscoso

Rogério Simonetti Alves

Data de defesa: 15-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARCY LANCIA PEREIRA

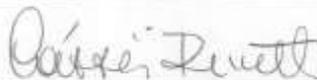
Orientador PROF. DR. CARLOS ARTURO LEVI D'ANCONA

MEMBROS:

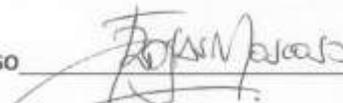
1. PROF. DR. CARLOS ARTURO LEVI D'ANCONA



2. PROF. DR. CÁSSIO LUIS ZANETTINI RICCETTO



3. PROFA. DRA. JULIO ALEJANDRO ROJAS MOSCOSO



4. PROF.DR. ROGÉRIO SIMONETTI ALVES



5. PROFA.DRA. FERNANDA BRUSCHI MARINHO PRIVIERO



Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 15 de julho de 2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Oracy Moral Pereira (*in memorian*) e Maria de Lourdes Lancia Pereira. Vocês são meus maiores exemplos de valorização do conhecimento, honestidade e trabalho.

Ao meu marido, Eder Tombolato, minha fortaleza, meu melhor amigo e companheiro, por seu incentivo e paciência em todos os momentos.

À minha filha Sofia Pereira Tombolato. Depois de você, tudo é para você e por você...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador

Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D´Ancona, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelo constante incentivo, por estar sempre disponível e acessível quando precisei.

Ao meu co-orientador

Prof. Dr. Edson Antunes, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por me ceder seu laboratório e estar sempre de portas abertas.

À prof^a. Dr^a. Fabíola Zakia Taufic Mónica Iglesias, pelos ensinamentos e estar sempre disponível para ajudar.

Agradeço também...

Ao meu querido amigo Julio Alejandro Rojas Moscoso, que sempre me acompanhou nos experimentos, na realização do modelo experimental de obstrução parcial uretral e ensinou muitas coisas, tanto técnicas, quanto da vida.

Ao meu querido amigo Antonio Celso Saragossa Ramos Filho, que me ensinou, auxiliou nos experimentos e esteve sempre disponível para trocar ideias.

À minha amiga Mariana Gonçalves de Oliveira, que me auxiliou com minhas análises, esteve disposta a me ajudar a trocar ideias.

Aos meus amigos da “Casca” Camila Fernandes, Eduardo Costa Alexandre, Fabiano Calmasini, Fábio Henrique da Silva, Lorenzo Pissinatti, Luiz Osório Silveira Leiria, Paulo Gabriel Gonzalez, Rafael Campos, Renan Donomae Iwamoto, Renata Lopes Rodrigues, Tuany Candido, Wagner Faria, que me acolheram com muito carinho e me auxiliaram no que precisei.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP Glaucia Coelho de Mello, Maria Aparecida Moreira Mendes e Elen Cristina Teizem Landucci. Agradeço especialmente a Agnaldo Fernando de Azevedo, Antonio Vilson dos Santos, Denise e Miguel Borges da Silva, que sempre cuidaram com muito zelo e dedicação dos animais do biotério.

À Sueli Chaves, secretária da disciplina de Urologia.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado (2011-2014).

”Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito.”

Martin Luther King

RESUMO

A hiperplasia prostática benigna (HPB) ou aumento benigno da próstata (ABP) leva a disfunção do trato urinário, que pode ser mimetizada em outras espécies animais, como roedores, por meio de obstrução parcial da uretra (OPU). O óxido nítrico (NO), sintetizado a partir da L-arginina por meio de três isoenzimas (iNOS, eNOS e nNOS) vem sendo estudado por ser apontado como responsável por alterações morfológicas e funcionais decorrentes do processo obstrutivo uretral. Este trabalho teve como objetivo caracterizar as alterações vesicais crônicas em camundongos com OPU e tratados cronicamente com L-NAME (inibidor competitivo não seletivo da NOS) e aminoguanidina (inibidor competitivo seletivo para iNOS). Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais: Sham, Sham + L-NAME, Sham + aminoguanidina, OPU, OPU + L-NAME e OPU + aminoguanidina. A realização da OPU foi feita por meio de laparotomia e ligadura parcial ao nível do colo vesical utilizando-se cateter como guia externo. Após 5 semanas do procedimento cirúrgico, os animais foram avaliados quanto a cistometria, estudos farmacológicos em banho para órgão isolado e peso vesical. Os animais OPU apresentaram disfunção vesical observada por meio de aumento de contrações não miccionais (CNM) e da capacidade vesical, além de menor resposta contrátil muscarínica e elétrica. A inibição das três isoformas de NOS levou a diminuição da capacidade vesical em animais OPU. O tratamento com L-NAME levou a aumento de CNM, prevenção ao ganho de peso vesical e aumento das respostas contráteis a estimulação muscarínica e elétrica em animais OPU. A aminoguanidina diminuiu as CNM, mas não evitou o aumento do peso da bexiga em animais OPU e não aumentou as respostas contráteis vesicais. Tais achados sugerem que as NOS constitutivas (eNOS e nNOS) parecem ter papel mais relevante na fisiopatologia da OPU crônica do que a iNOS.

Palavras-chave: óxido nítrico, urodinâmica, bexiga urinária.

ABSTRACT

Benign prostatic hyperplasia (BPH) or Benign prostatic enlargement (BPE) leads to urinary tract dysfunction, which can be seen in experimental models, like rodents, by causing bladder outlet obstruction (BOO). Nitric oxide (NO), synthesized from L-arginine by three isoforms (iNOS, eNOS and nNOS) has been studied because it can be responsible for the urinary morphofunctional alterations. This study aimed to evaluate chronic bladder function in mice with BOO and treated chronically with L-NAME (non-selective NOS inhibitor) and aminoguanidine (iNOS selective inhibitor). Animals were divided into 6 experimental groups: Sham, Sham + L-NAME, Sham + aminoguanidine, BOO, BOO + L-NAME e BOO + aminoguanidine. BOO induction was made by laparotomy and partial ligature of bladder neck with a catheter as external guide. After 5 weeks of surgical procedure, animals were evaluated and filling cystometry, tissue bath contractile studies and bladder weight. BOO animals showed increase of non-voiding contractions (NVC) and bladder capacity, and also less contractile response to Carbachol and Electric Field Stimulation. Inhibition of NOS isoforms diminished bladder capacity in BOO animals. L-NAME caused more NVC, prevented bladder weight gain and led to augmented contractile responses at muscarinic and electric stimulation. Aminoguanidine diminished NVC, but did not avoid bladder weight gain in BOO animals and did not cause increase in contractile responses. These results suggest that constitutive NOS (eNOS and nNOS) seem to be more important in chronic BOO pathophysiology than iNOS.

Keywords: nitric oxide, urodynamics, urinary bladder.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

AMPc: monofosfato cíclico de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

Ca⁺²: íons cálcio

CCh: carbacol

CIC: cálcio induzindo liberação de cálcio

CNM: contrações não miccionais

E_{max}: resposta máxima

eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial

EFS: electric field stimulation (estímulo elétrico de campo)

EPM: erro padrão da média

GCa: guanilil ciclase ativa

GCS: guanilil ciclase solúvel

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GTP: trifosfato de guanosina

HPB: hiperplasia prostática benigna

iNOS: sintase de óxido nítrico induzível

IP₃: inositol trifosfato

L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster

Log [CCh]: M: concentração logarítmica molar de Carbacol

LUTS: lower urinary tract symptoms (sintomas de trato urinário inferior)

M₂: receptor muscarínico do tipo 2

M₃: receptor muscarínico do tipo 3

MLC kinase: quinase cadeia leve miosina

MLC: cadeia leve de miosina

MLCK: quinase da cadeia leve de miosina

MLC-P: fosforilação da cadeia leve miosina

NANC: não adrenérgico não colinérgico

nNOS: sintase de óxido nítrico neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: sintase de óxido nítrico

OPU: obstrução parcial uretral

PDE₅: fosfodiesterase tipo 5

pEC₅₀: potência na qual se atinge 50% da resposta máxima

PKC: proteína quinase C

PKG: proteína quinase G

SR: retículo sarcoplasmático

β₃: receptor beta-3 adrenérgico

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 1.** Parâmetros cistométricos avaliados nos camundongos dos grupos Sham e OPU após 5 semanas do procedimento cirúrgico. * P<0,05 em relação a Sham.39
- Tabela 2.** Valores de resposta máxima (E_{max}) em mN/mg e potência (pEC_{50}) do Carbacol para os grupos experimentais. *P<0,05 em relação a Sham.40
- Tabela 3.** Valores de amplitude contração (mN) produzidos pelas frequências de estimulação em tiras de bexiga (mg). Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 9-10 animais. *P<0,05 em relação a Sham. **P<0,01 em relação a Sham. ***P<0,001 em relação a Sham.41
- Tabela 4.** Razão peso da bexiga pelo peso do camundongo (PB:PC) para os grupos Sham e com obstrução parcial uretral (OPU). Os dados representam média \pm erro padrão da média de 19 animais. *** P<0,001 em relação a Sham.42
- Tabela 5.** Parâmetros cistométricos avaliados para cada grupo experimental. CNM: contrações não miccionais. * P<0,05 em relação a Sham. Os resultados expressam média \pm erro padrão da média de 6-13 camundongos. * P<0,05 em relação ao grupo Sham. # P<0,05 em relação ao grupo OPU. # # P<0,01 em relação ao grupo OPU. ++ P<0,01 em relação ao grupo Sham + L-NAME.45
- Tabela 6.** Valores de resposta máxima (E_{max}) em mN/mg e potência (pEC_{50}) do Carbacol para os grupos experimentais. *P<0,05 em relação a Sham. ***P<0,001 em relação a Sham. ***P<0,001 em relação a Sham + L-NAME. # P<0,05 em relação a OPU.47
- Tabela 7.** Valores de amplitude contração (mN) produzidos pelas frequências de estimulação em tiras de bexiga (mg). Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 3-10 animais. *P<0,05 em relação a Sham. **P<0,01 em relação a Sham. ***P<0,001 em relação a Sham. # P<0,05 em relação a OPU. # # P<0,01 em relação a OPU. + P<0,05 em relação a Sham + L-NAME.48
- Tabela 8.** Razão peso da bexiga pelo peso do camundongo (PB:PC) para os grupos experimentais. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 9-19 animais. *** P<0,001 em relação a Sham. # # # P<0,001 em relação a OPU.49

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Mecanismos reflexos das fases de enchimento (A) e esvaziamento (B). PAG: zona periaqueductal (14).23

Figura 2. Mecanismo de bio-sinalização do receptor muscarínico M_3 : sua ativação pela acetilcolina (ACh) estimula a RhoA e a fosfolipase C (PLC), levando à ativação da Rho-quinase, trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG), respectivamente. O aumento de IP₃ ativa o retículo sarcoplasmático (SR). A entrada de cálcio na célula também ativa o SR (cálcio induzindo liberação de cálcio – CIC) e, assim, ocorre liberação de cálcio para o citoplasma, que ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLC quinase), promovendo sua fosforilação e conseqüentemente a contração. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que inibe a fosfatase de MLC (MLC fosfatase). Ca^{+2} : íons cálcio (21).24

Figura 3. Relaxamento da musculatura lisa pelas vias adrenérgica e não adrenérgica não colinérgica (NANC): a noradrenalina (NOR), liberada pela fibra adrenérgica, liga-se aos receptores β -adrenérgicos e assim ativa a guanilil ciclase (AC), que leva a aumento de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), a qual estimula a proteína quinase A (PKA) a diminuir a sensibilidade ao cálcio e, dessa forma, levando ao relaxamento. A fibra nitrérgica libera óxido nítrico (NO), que se difunde livremente pela célula, liga-se ao grupamento heme da guanilato ciclase solúvel (GCs), levando a aumento da concentração de monofosfato de guanosina (GMPc), que por sua vez ativa a proteína quinase G (PKG), a qual também leva a diminuição da sensibilidade ao cálcio. Ambos GMPc e AMPc são degradados por fosfodiesterases (PDE). (28 - adaptado).....26

Figura 4. Concentrações baixas de óxido nítrico (NO), geradas por óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), têm efeito benéfico na função endotelial e orgânica, enquanto concentrações altas de NO, produzidas pela indução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), podem contribuir para disfunção endotelial, vasodilatação excessiva, extravasamento e lesão tecidual (34 – adaptado).27

Figura 5. Traçados cistométricos de Sham (A) e OPU (B) após 5 semanas do procedimento cirúrgico. As setas indicam momento de micção.37

Figura 6. Parâmetros cistométricos avaliados para os grupos experimentais Sham e OPU (obstrução parcial uretral): contrações não-miccionais (A), frequência de micções (B), pressão limiar (C), pressão de micção (D), capacidade vesical (E) e complacência vesical (F). Os resultados expressam média \pm erro padrão da média de 9-12 camundongos. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Sham.38

Figura 7. Curva concentração-resposta ao Carbacol (Cch) em detrusor isolado de camundongo. Os dados estão expressos como força de contração (mN)/peso da tira (mg). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 9-10 animais. * $P < 0,05$ em relação a Sham.39

- Figura 8.** Curva frequência-resposta (2 a 16 Hz) em detrusor de camundongos Sham e com obstrução parcial uretral (OPU). Os dados estão expressos em amplitude de contração (mN) produzida pelas diferentes frequências de estimulação/peso da tira (mg). Os resultados representam média ± erro padrão da média de 9-10 animais. *P<0,05 em relação a Sham. **P<0,01 em relação a Sham. ***P<0,001 em relação a Sham.40
- Figura 9.** Representação da razão peso da bexiga pelo peso do camundongo (PB:PC) para os grupos Sham e com obstrução parcial uretral (OPU). Os dados representam média ± erro padrão da média de 19 animais. *** P<0,001 em relação a Sham.....41
- Figura 10.** Traçados cistométricos de Sham (A), Sham + L-NAME (B), Sham + aminoguanidina (C), OPU (D), OPU + L-NAME (E) e OPU + aminoguanidina (F). As setas indicam momento de micção.43
- Figura 11.** Parâmetros cistométricos avaliados para cada grupo experimental: contrações não-miccionais (A), frequência de micções (B), pressão limiar (C), pressão de micção (D), capacidade vesical (E) e complacência vesical (F). Os resultados expressam média ± erro padrão da média de 6-12 camundongos. * P<0,05 em relação ao grupo Sham. # P<0,05 em relação ao grupo OPU. # # P<0,01 em relação ao grupo OPU. ++ P<0,01 em relação ao grupo Sham + L-NAME.44
- Figura 12.** Curva concentração-resposta ao Carbacol (Cch) em detrusor isolado de camundongo. Os dados estão expressos como força de contração (mN)/peso da tira (mg). Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 3-10 animais.46
- Figura 13.** Curva frequência-resposta (2-16 Hz) em detrusor de camundongos. Os dados estão expressos em amplitude de contração (mN) produzida pelas diferentes frequências de estimulação/peso da tira (mg). Os resultados representam média ± erro padrão da média de 3-10 animais. *P<0,05 em relação a Sham. **P<0,01 em relação a Sham. ***P<0,001 em relação a Sham. # P<0,05 em relação a OPU. # # P<0,01 em relação a OPU. + P<0,05 em relação a Sham + L-NAME.48
- Figura 14.** Representação da razão peso da bexiga pelo peso do camundongo (PB:PC) para cada grupo experimental. Os dados representam média ± erro padrão da média de 9-19 animais. *** P<0,001 em relação a Sham. # # # P<0,001 em relação a OPU.49

LISTA DE DROGAS

Droga	Procedência
Aminoguanidina	Sigma
$C_6H_{12}O_6$	Mallinckrodt
$CaCl_2$	Merck
Carbacol	Sigma
KCl	Merck
L-NAME	Sigma
$MgSO_4$	Merck
NaCl	Merck
$NaHCO_3$	Merck
$NaHPO_4$	Merck
Quetamina	Ceva
Uretana	Sigma
Xilazina	Syntec

SUMÁRIO

Página

1. Introdução.....	20
1.1. Sintomas de Trato Urinário Inferior e Hiperplasia prostática benigna.....	20
1.2. Fisiologia da micção	22
1.3. Óxido nítrico.....	24
1.4. Fisiopatologia da obstrução infravesical.....	28
2. Justificativa.....	30
3. Objetivos	30
4. Material e Métodos	31
4.1. Animais e grupos experimentais	31
4.2. Obstrução Parcial Uretral (OPU).....	31
4.3. Tratamentos com L-NAME e aminoguanidina.....	32
4.4. Cistometria.....	32
4.5. Estudo funcional de tiras de bexiga.....	33
4.6. Avaliação da proporção peso vesical / peso corporal.....	35
4.7. Análise dos resultados	36
5. Resultados	36
5.1. Caracterização dos efeitos vesicais após a obstrução parcial uretral.....	36
5.1.1. Cistometria	36
5.1.2. Estudo funcional de tiras de bexiga	39
5.1.3. Avaliação do peso vesical.....	41
5.2. Avaliação dos tratamentos após 5 semanas de obstrução parcial uretral	42
5.2.1. Cistometria	42
5.2.2. Estudo funcional de tiras da bexiga	46
5.2.3. Avaliação do peso vesical.....	49
6. Discussão	50
6.1. Discussão de material e métodos	50
6.2. Discussão de resultados	51
7. Conclusão.....	57
8. Referências Bibliográficas	58

1. Introdução

1.1. Sintomas de Trato Urinário Inferior e Hiperplasia prostática benigna

De acordo com a Sociedade Internacional de Continência (*International Continence Society - ICS*), os sintomas de trato urinário inferior (*Lower Urinary Tract Symptoms - LUTS*) podem ser divididos em três grupos: sintomas de armazenamento, eliminação e pós-miccionais. Os sintomas de armazenamento incluem aumento de frequência de micção, noctúria, urgência de micção e incontinência urinária. Os sintomas de eliminação referem-se a jato urinário lento ou fraco e hesitação. Já os relacionados à pós-micção consistem em esvaziamento incompleto. Ainda, pode haver dor em genitais, trato urinário inferior ou durante relações sexuais (1).

Sabe-se que os LUTS trazem impactos sociais e econômicos negativos e que aproximadamente 45,2% da população mundial sofrem com algum LUTS. Estima-se que até 2018 haverá 18,4% de aumento de pessoas acometidas, totalizando 2,3 bilhões de indivíduos (2).

Estudo feito com homens entre 50 e 80 anos da Inglaterra, Estados Unidos, França, Alemanha, Suécia, Itália e Espanha mostrou que 31% sofrem com sinais moderados a graves de LUTS e a prevalência foi de 22% entre 50 e 59 anos e 45% entre 70 e 80 anos (3).

Moreira Júnior et al. (4), no Brasil, observaram que 60% dos pacientes acometidos têm idade entre 30 e 49 anos e a incidência aumenta com a idade. Aproximadamente 81% dos homens e 84% das mulheres entrevistadas apresentam pelo menos um sintoma

relacionado a LUTS. Ainda, a principal queixa, tanto em homens quanto mulheres, é a noctúria, seguido de aumento de frequência e urgência de micção.

Em homens com mais de 50 anos de idade, a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), ou aumento benigno da próstata, tem sido reconhecida como a causa primária mais prevalente de LUTS. A próstata é considerada aumentada quando o peso, mensurado por ultrassonografia transretal, torna-se superior a 20g, na presença de sintomas de disfunção urinária e/ou fluxo urinário máximo menor do que 15 ml/s à avaliação urodinâmica. A HPB tem alta prevalência, já que o acometimento de homens com idade entre 40 e 49 anos é de 13,8% e entre 60 e 69 anos de 43% (5).

A Associação Europeia de Urologia (European Association of Urology - EAU) tem diretrizes quanto a abordagem, terapia e acompanhamento de sintomas sugestivos de formas benignas não neurogênicas de LUTS/HPB, como por exemplo, obstrução prostática benigna (OPB), hiperatividade de detrusor / vesical e poliúria noturna ou noctúria em homens com 40 anos ou mais (6). Este último sintoma acomete cerca de 83% dos pacientes (7, 8). São comuns sintomas de enchimento vesical como aumento de frequência, urgência e urgência com incontinência, além de sintomas de esvaziamento como jato urinário fraco e hesitância, denominados obstrutivos e sintomas pós miccionais como gotejamento terminal e micção incompleta (9). Ainda, a disfunção erétil (DE) também é altamente prevalente na população com HPB (10).

As alterações miccionais, observadas por estudos urodinâmicos, incluem diminuição da capacidade vesical, aumento da pressão do detrusor no fluxo urinário máximo e índice de obstrução infravesical (11).

1.2. Fisiologia da micção

No trato urinário inferior, as fases de enchimento e esvaziamento vesicais são dependentes de atividades dos nervos periféricos parassimpáticos sacrais (pélvicos), simpáticos toracolombares (hipogástricos) e sacrais somáticos (pudendos) (12), como mostra a Figura 1.

Durante a fase de enchimento vesical, a acomodação da urina ocorre por relaxamento da musculatura lisa detrusora por meio da inibição da atividade parassimpática. Há prevalência da atuação dos nervos hipogástricos, que promovem relaxamento do músculo detrusor via ação de noradrenalina nos β -adrenoceptores e simultaneamente estimulam a contração da base da bexiga e esfíncter uretral interno via estimulação dos α 1-adrenoceptores (12) e produção de AMPc (adenosina monofosfato cíclico). O nervo pudendo, somático, estimula a contração do esfíncter uretral externo por meio de receptores nicotínicos, o que permite a continência urinária (13). Durante esta fase, a pressão intravesical permanece baixa e constante e, com o aumento do volume vesical, as fibras musculares vão se distendendo, até que a bexiga atinja sua capacidade máxima. Assim, os receptores de pressão presentes no músculo detrusor sinalizam, por via aferente ao sistema nervoso central, no centro pontino de micção, a informação de repleção vesical (14).

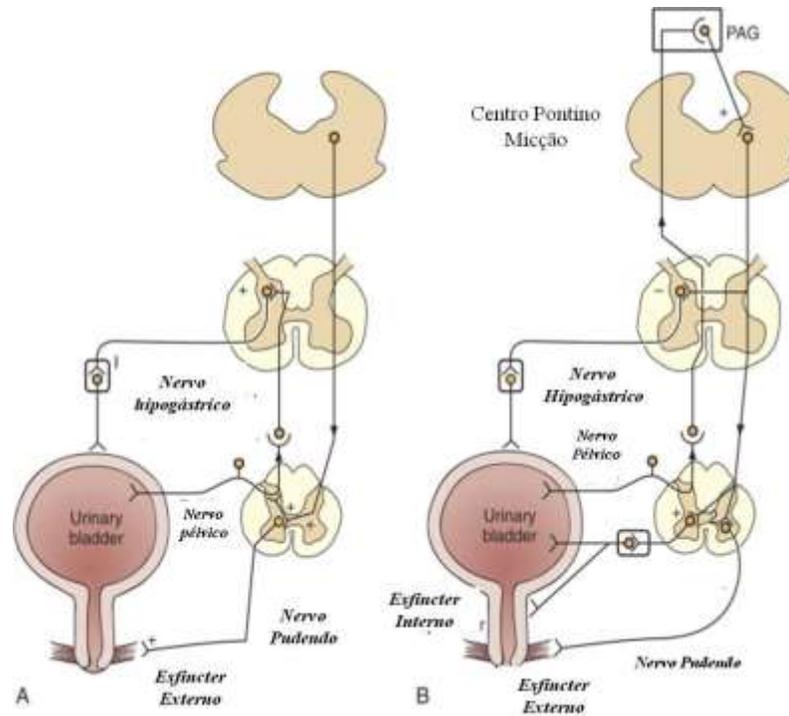


Figura 1. Mecanismos reflexos das fases de enchimento (A) e esvaziamento (B). PAG: zona periaquedutal (14).

Para o esvaziamento vesical, os nervos pélvicos estimulam a contração do detrusor por meio da ação da acetilcolina (ACh), neurotransmissor parassimpático que interage com os receptores muscarínicos M_2 e M_3 . Embora haja evidência de que o subtipo M_2 é expresso em maior quantidade na bexiga (80%), a contração do detrusor é mediada principalmente pelo subtipo M_3 (Figura 2) (15). Além disso, o fluxo urinário é facilitado pelo relaxamento da uretra, mediados pela liberação de óxido nítrico (NO) (16, 17), sintetizado em urotélio, musculatura lisa e fibras neurais (18, 19, 20).

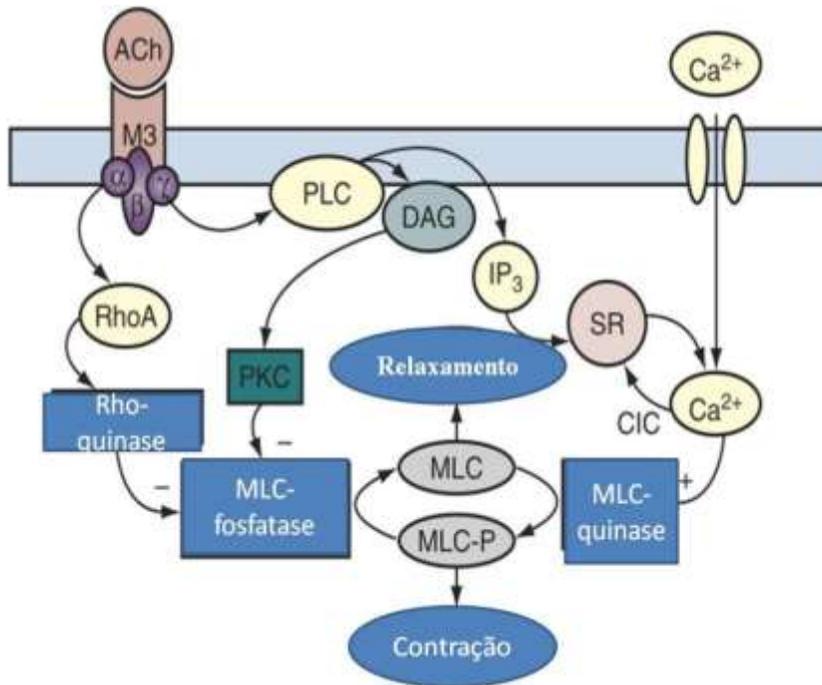


Figura 2. Mecanismo de biosinalização do receptor muscarínico M₃: sua ativação pela acetilcolina (ACh) estimula a RhoA e a fosfolipase C (PLC), levando à ativação da Rho-quinase, trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG), respectivamente. O aumento de IP₃ ativa o retículo sarcoplasmático (SR). A entrada de cálcio na célula também ativa o SR (cálcio induzindo liberação de cálcio – CIC) e, assim, ocorre liberação de cálcio para o citoplasma, que ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLC quinase), promovendo sua fosforilação e conseqüentemente a contração. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que inibe a fosfatase de MLC (MLC fosfatase). Ca⁺²: íons cálcio (21).

1.3. Óxido nítrico

O NO, um neurotransmissor inibitório liberado por fibras não adrenérgicas não colinérgicas (NANC), é formado a partir da L-arginina, através de uma reação catalisada por uma família de enzimas denominada sintase de óxido nítrico (NOS). Existem três isoformas da NOS, denominadas de endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS). As duas primeiras são constitutivas, produzidas na ordem de nano ou picomols e sua ativação depende da interação com a calmodulina que, por sua vez, é controlada pelas concentrações

de Ca^{+2} (22). Os principais papéis fisiológicos são o controle da distribuição do fluxo sanguíneo, a inibição da agregação e adesão plaquetária à parede vascular, a inibição da adesão leucocitária e da proliferação de células musculares lisas (23). Ainda, o NO promove neovascularização mediada por fatores angiogênicos, como fator de crescimento endotelial vascular e fator de crescimento de fibroblastos (24).

O NO produzido pelas NOS constitutivas promove relaxamento da musculatura lisa por estimulação da guanilil ciclase solúvel (GCs), levando à formação de 3'5' monofosfato de guanosina cíclico (GMP cíclico - GMPc). O mecanismo de ação do NO, de modo geral, envolve a sua ligação na porção heme da GCs, induzindo uma mudança conformacional que leva a enzima a sintetizar GMPc a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (25). Então, o GMPc ativa a proteína quinase G (PKG), que fosforila proteínas e resulta em depleção de cálcio intracelular, levando ao relaxamento da musculatura lisa uretral e da base da bexiga (26), conforme mostra a Figura 3. A PKG ativa os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo K_{ATP} , SK_{Ca} e BK_{Ca} (27) de forma ocorre efluxo transmembrana de cálcio.

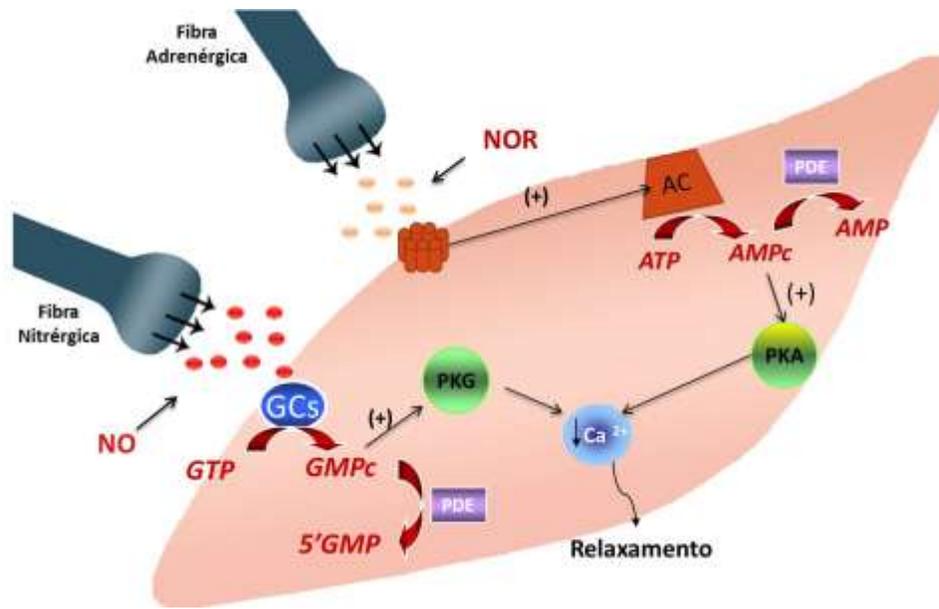


Figura 3. Relaxamento da musculatura lisa pelas vias adrenérgica e não adrenérgica não colinérgica (NANC): a noradrenalina (NOR), liberada pela fibra adrenérgica, liga-se aos receptores β -adrenérgicos e assim ativa a guanilil ciclase (AC), que leva a aumento de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), a qual estimula a proteína quinase A (PKA) a diminuir a sensibilidade ao cálcio e, dessa forma, levando ao relaxamento. A fibra nitrérgica libera óxido nítrico (NO), que se difunde livremente pela célula, liga-se ao grupamento heme da guanilato ciclase solúvel (GCs), levando a aumento da concentração de monofosfato de guanosina (GMPc), que por sua vez ativa a proteína quinase G (PKG), a qual também leva a diminuição da sensibilidade ao cálcio. Ambos GMPc e AMPc são degradados por fosfodiesterases (PDE). (28 - adaptado).

A iNOS, não expressa sob condições normais, é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em células como macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas (22). Esta isoforma requer horas para ser expressa, mas uma vez sintetizada, libera grandes quantidades de NO, na ordem de micromols (Figura 4), que continua até que a L-arginina ou os cofatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra morte celular (29).

A ação citotóxica do NO tem como mecanismo importante sua reação com o superóxido (produzido a partir da redução do oxigênio) para formar peroxinitrito, uma espécie reativa de oxigênio com alto poder oxidante. Em condições normais, as células contêm grandes quantidades de superóxido dismutase, mas o controle se torna crítico quando a

concentração de NO se aproxima da de superóxido dismutase (30), o que ocorre quando da atividade da iNOS. A toxicidade do peroxinitrito deve-se à sua estabilidade como um ânion em pH alcalino, o que permite longevidade e grande oportunidade de se difundir pelas células (31).

A nitrotirosina é o principal produto da reação entre o peroxinitrito e proteínas e tem sido usado como um marcador de lesão oxidativa (32), que leva a disfunção mitocondrial e deficiência na contratilidade da musculatura detrusora (33).

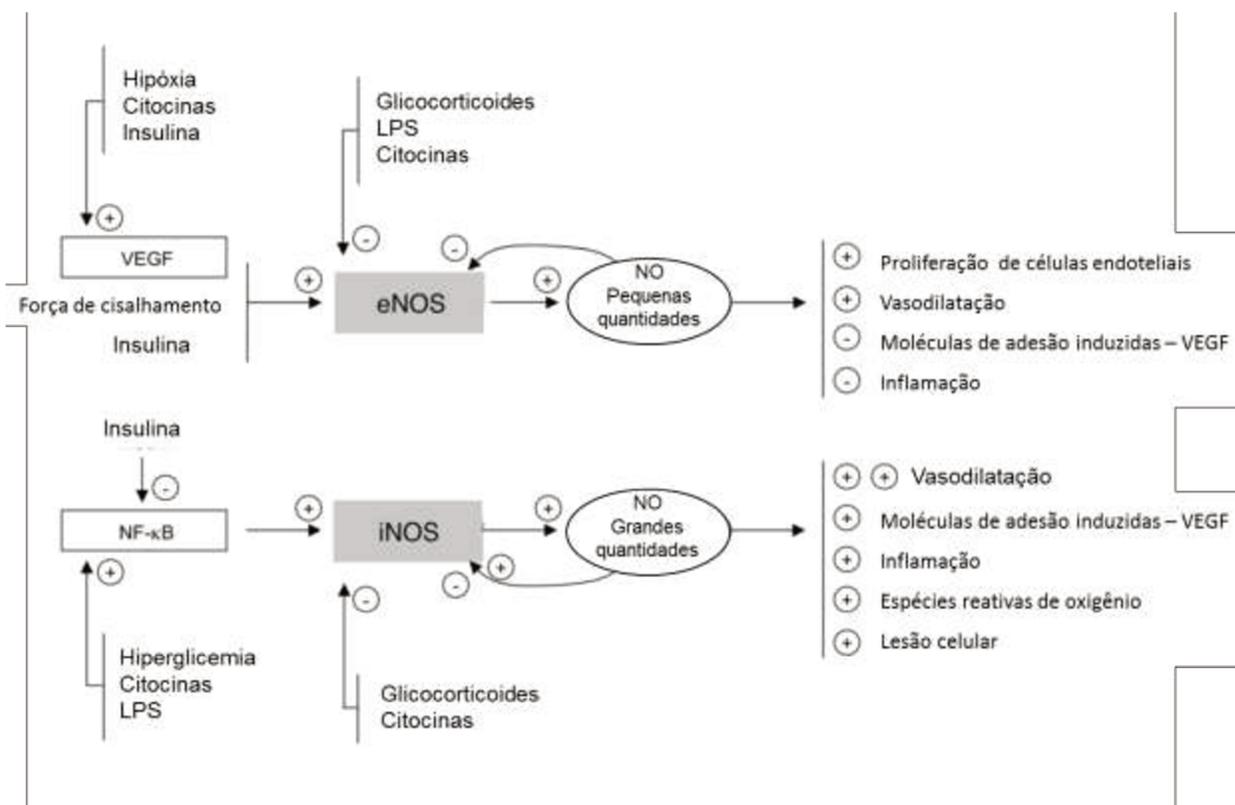


Figura 4. Concentrações baixas de óxido nítrico (NO), geradas por óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), têm efeito benéfico na função endotelial e orgânica, enquanto concentrações altas de NO, produzidas pela indução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), podem contribuir para disfunção endotelial, vasodilatação excessiva, extravasamento e lesão tecidual (34 – adaptado).

1.4. Fisiopatologia da obstrução infravesical

Apesar da alta prevalência da HPB entre homens, os mecanismos responsáveis pela disfunção miccional induzida pela obstrução infravesical ainda não são bem compreendidos. A investigação e o desenvolvimento de terapias adequadas inclui o uso de modelos animais, de forma a entender o controle fisiológico da continência urinária, bem como as condições fisiopatológicas envolvidas na disfunção vesical (35).

Vários estudos utilizaram ratos (36, 37, 38, 39, 40, 41), camundongos (42, 43, 44), coelhos (45, 46), cobaias (47, 48) e suínos (49) como modelos experimentais para o estudo de obstrução parcial uretral (OPU). A indução desta condição nessas espécies leva a alterações estruturais e fisiológicas da parede vesical semelhantes às observadas em homens acometidos por HPB (35).

Em pacientes normais, o fluxo sanguíneo no detrusor mantém-se normal durante as fases de enchimento e esvaziamento vesical (49). Entretanto, há evidências de que, em pacientes com obstrução parcial uretral, as alterações morfofisiológicas ocorram devido a períodos cíclicos de isquemia e reperfusão ao longo da progressão da desordem (50). Em ratos e coelhos obstruídos, nas 24 horas iniciais após o procedimento cirúrgico, ocorre aumento do fluxo sanguíneo vesical pelo aumento da expressão de iNOS (51, 52). Os estímulos para a expressão de iNOS no urotélio e músculo liso em resposta ao processo obstrutivo relacionam-se à liberação de citocinas inflamatórias liberadas logo após a obstrução, ao estresse mecânico na parede da bexiga (53), ao aumento da pressão intravesical e às concentrações baixas de oxigênio. Dessa forma, a produção de NO teria efeito protetor vesical por aumentar o fluxo sanguíneo (54).

Alterações quantitativas e qualitativas do detrusor hipertrofiado incluem modificações nas células musculares e aumento da síntese e deposição de colágeno, que levam a aumento do peso vesical (55, 56).

Após a compensação inicial da função vesical, o fluxo sanguíneo tende a diminuir até voltar ao normal, por volta de 3 a 7 dias após a obstrução em coelhos e 14 dias em ratos (57). Conforme o processo vai se tornando crônico, mais regiões em hipóxia e reperfusão podem ser observadas na camada muscular (39), levando à chamada denervação “em ilhas” ou regiões do detrusor (58) mediada por estresse oxidativo, o que faz com que haja aumento de sensibilidade e perda do sincronismo, que caracteriza a hiperatividade do detrusor (58, 59).

Estudos de imunohistoquímica em cobaias e humanos revelaram que o NO induz o acúmulo de GMPc no músculo liso da uretra proximal, mas este acúmulo não é visto no músculo liso detrusor, apesar de a NOS estar expressa nesta porção da bexiga. A atividade da via NO-GMPc no baixo trato urinário, estando diminuída, faz com que o relaxamento da porção basal da bexiga, assim como da uretra, fique comprometido, gerando assim contrações involuntárias durante a fase de enchimento vesical (60).

A longo prazo, o efeito da obstrução parcial inicial, somado ao aumento da massa vesical pela hipertrofia, levam a diminuição do fluxo sanguíneo e assim pioram a disfunção, fazendo com que haja descompensação (61), caracterizada por redução da resposta a estimulação muscarínica e elétrica, além de diminuição da habilidade de fazer esvaziamento vesical (62).

2. Justificativa

A literatura mostra que a suplementação com precursores ou doadores de NO mostra-se efetiva na redução da disfunção vesical em coelhos com OPU por 2 semanas (63).

Entretanto, a inibição da iNOS seria benéfica para a função vesical de animais com OPU, uma vez que haveria diminuição da fibrose e das alterações funcionais (64). Ainda, a inibição não-seletiva da NOS também pode ser útil na diminuição da apoptose causada pela isquemia-reperfusão pela qual a bexiga passa em obstrução uretral (65, 66, 67). Assim, o presente estudo buscou caracterizar as alterações vesicais de animais sob tratamento crônico com inibidor seletivo para iNOS quanto não seletivo da NOS.

3. Objetivos

Os objetivos do estudo foram:

- a. Caracterizar as alterações funcionais vesicais crônicas em camundongos com OPU;
- b. Avaliar as alterações vesicais de camundongos com OPU tratados cronicamente com inibidor não seletivo da NOS (L-NAME) e seletivo de iNOS (aminoguanidina).

4. Material e Métodos

4.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos adultos da linhagem C57BL/6, com 8 a 9 semanas de idade e peso entre 20 e 25 gramas. Os animais, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB – UNICAMP), ficaram alojados no biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia – UNICAMP, mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), à temperatura de 25°C, em gaiolas tipo “caixa de sapato” (1 a 3 camundongos por gaiola). Ração peletizada e água foram fornecidas *ad libitum*. Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pela *Comissão de Ética no Uso de Animais* (CEUA/UNICAMP-protocolo nº 3170-1).

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais: Sham, Sham + L-NAME, Sham + aminoguanidina, OPU, OPU + L-NAME e OPU + aminoguanidina.

4.2. Obstrução Parcial Uretral (OPU)

Os camundongos foram anestesiados com xilazina (30 mg/kg) e quetamina (2 mg/kg) por meio de injeção intraperitoneal. Posteriormente foi realizada tricotomia, assepsia do abdômen e laparotomia pré-retro umbilical.

Utilizando lupa cirúrgica, expôs-se a bexiga e o colo vesical e junto a ele posicionou-se um cateter de 0,6 mm de diâmetro. A obstrução foi obtida por ligadura simples

com fio de nylon 6-0, preservando-se os ureteres e vasos sanguíneos adjacentes. Em seguida, o cateter foi retirado, os músculos reto abdominal foram aproximados com pontos simples contínuos e pele em pontos simples separados e ambos os planos feitos com fio nylon 6-0.

No grupo Sham, os mesmos procedimentos cirúrgicos da OPU foram realizados, entretanto não houve ligadura uretral.

4.3. Tratamentos com L-NAME e aminoguanidina

Os tratamentos crônicos com L-NAME e aminoguanidina foram conduzidos de acordo com estudos prévios (60, 68). As drogas foram dissolvidas em água e oferecidas *ad libitum*, nas doses aproximadas de 150 mg/Kg/dia e 20 mg/Kg/dia, respectivamente.

Os animais Sham + L-NAME, Sham + aminoguanidina, OPU + L-NAME e OPU + aminoguanidina receberam tratamento por 5 semanas a partir do pós-operatório imediato.

4.4. Cistometria

Os camundongos foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg por via intraperitoneal). A bexiga urinária foi puncionada com escalpe nº25 e este conectado a bomba de infusão de solução salina (Harvard Apparatus, Holliston, MA) e a um transdutor de pressão (AD Instruments, Austrália). Os registros das mudanças pressóricas intravesicais foram obtidos em sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (Software versão 6.0, AD Instruments, Austrália). Após período de estabilização de pressão intravesical por

aproximadamente 2 minutos, procedeu-se à infusão intravesical de salina (0,9% NaCl) em velocidade constante de 0,6 ml/hora à temperatura de 22 a 28°C.

Os parâmetros avaliados foram:

- a. contrações não miccionais (CNM): contrações vesicais ≥ 4 mmHg durante a fase de enchimento vesical, que não resultaram em micção;
- b. frequência de micções: ciclos miccionais a partir da primeira micção, por minuto, durante 30 minutos;
- c. pressão limiar: pressão em mmHg imediatamente anterior à micção;
- d. pressão de micção: pressão em mmHg no momento da micção;
- e. capacidade vesical: capacidade da bexiga em ml até o momento da primeira micção, levando-se em consideração o volume de solução infundido;
- f. complacência vesical: razão entre capacidade vesical em ml e a pressão limiar em mmHg.

Após a avaliação cistométrica, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e as bexigas foram pesadas.

4.5. Estudo funcional de tiras de bexiga

Isolamento e montagem dos tecidos

Os animais foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados por inalação de CO₂. As bexigas foram rapidamente isoladas e imersas em solução de Krebs-Henseleit contendo 117 mM de NaCl, 25 mM de NaHCO₃, 11 mM de C₆H₁₂O₆, 4,7 mM de KCl, 1,2 mM de NaHPO₄, 1,2 mM de MgSO₄·7H₂O e 2,5 mM de CaCl₂·2H₂O.

As bexigas foram pesadas e cortadas ao meio em sentido transversal. Utilizando-se a metade do corpo da bexiga (região do músculo detrusor), duas tiras longitudinais de aproximadamente 2 x 2 x 10 mm foram obtidas. Cada uma foi montada em câmara para órgão isolado (10 mL) e preenchida com solução de Krebs-Henseleit continuamente aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ : 5% de CO₂), à temperatura de 37°C e pH 7,4. Uma das pontas da tira foi suspensa por um fio de algodão conectado a transdutor de força. Aplicou-se tensão de 5 mN e essa foi ajustada a cada 15 minutos simultaneamente com a troca da solução de Krebs, no período total de 60 minutos. As variações de tensão foram mensuradas por meio de transdutores isométricos da AD Instruments e registradas em sistema PowerLab versão 7.0.

Avaliação da resposta contrátil das tiras de bexiga

Avaliação do efeito contrátil ao agonista muscarínico carbacol

Foram realizadas curvas concentração-efeito ao carbacol (CCh - de 1 nM a 30 µM). Ao final de cada experimento, as tiras foram pesadas para correção pelo peso úmido de tecido, sendo assim a resposta contrátil expressa em mN/mg. Foram determinadas a potência (pEC₅₀) e a resposta máxima (E_{max}) do CCh para cada grupo experimental.

Avaliação do efeito contrátil a estímulo elétrico

As tiras receberam estímulo elétrico de campo (*Electric Field Stimulation* - EFS) sob voltagem de 50 V com duração de 0,2 ms durante 10 segundos nas frequências de 2, 4, 8 e 16 Hz e intervalo de 2 minutos entre os pulsos.

Parâmetros Farmacológicos

Os dados foram analisados por meio do programa computacional GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Os valores de potência (pEC_{50}) e respostas máximas (E_{max}) foram calculados pela seguinte equação:

$E = E_{max} / [1 + (10c/10x)^N + \Phi]$, em que E é a elevação do tônus basal, E_{max} é a máxima resposta que o agonista pode produzir, “c” é o logaritmo da EC_{50} , que é a contração do agonista que produz 50% da resposta máxima; “x” é o logaritmo da concentração do agonista, o expoente “N”, significa a inclinação da curva concentração-resposta e Φ é a resposta observada na ausência do agonista.

As análises de regressões não lineares para determinar os parâmetros E_{max} , $\log EC_{50}$ e o “n” foram feitas utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism, considerando o parâmetro Φ como zero.

4.6. Avaliação da proporção peso vesical / peso corporal

As bexigas de todos os animais estudados foram excisadas cuidadosamente na região de inserção dos ureteres e junção colo vesical. Após, foram suavemente secas em papel toalha e pesadas. Os camundongos também foram pesados para normalização dos valores e assim os resultados obtidos foram utilizados para cálculo do PB:PC, ou seja, razão peso da bexiga (em mg) pelo peso do camundongo (em g).

4.7. Análise dos resultados

A representação dos resultados foi feita como média \pm erro padrão das médias (EPM) de um número experimental (n).

Para as comparações entre os grupos Sham e OPU, utilizou-se o teste t de Student. Para avaliação entre os 6 grupos de tratamentos, foi feito o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste de Bonferroni. O programa InStat (GraphPad Software) foi usado para as análises e o nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($P < 0,05$).

5. Resultados

5.1. Caracterização dos efeitos vesicais após a obstrução parcial uretral

5.1.1. Cistometria

Um total de 9 animais Sham e 12 OPU foram avaliados. A Figura 5 representa o perfil dos traçados cistométricos obtidos após 5 semanas do procedimento cirúrgico para os grupos experimentais.

Os camundongos OPU apresentaram aumento de contrações não-miccionais e capacidade vesical em relação aos Sham ($P < 0,05$, Figura 6 e Tabela 1).

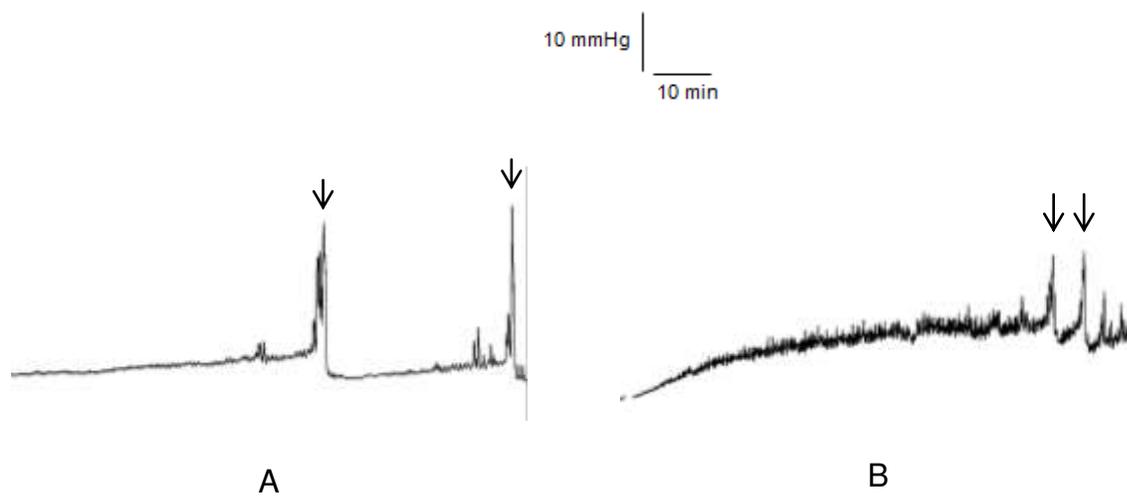


Figura 5. Traçados cistométricos de Sham (A) e OPU (B) após 5 semanas do procedimento cirúrgico. As setas indicam momento de micção.

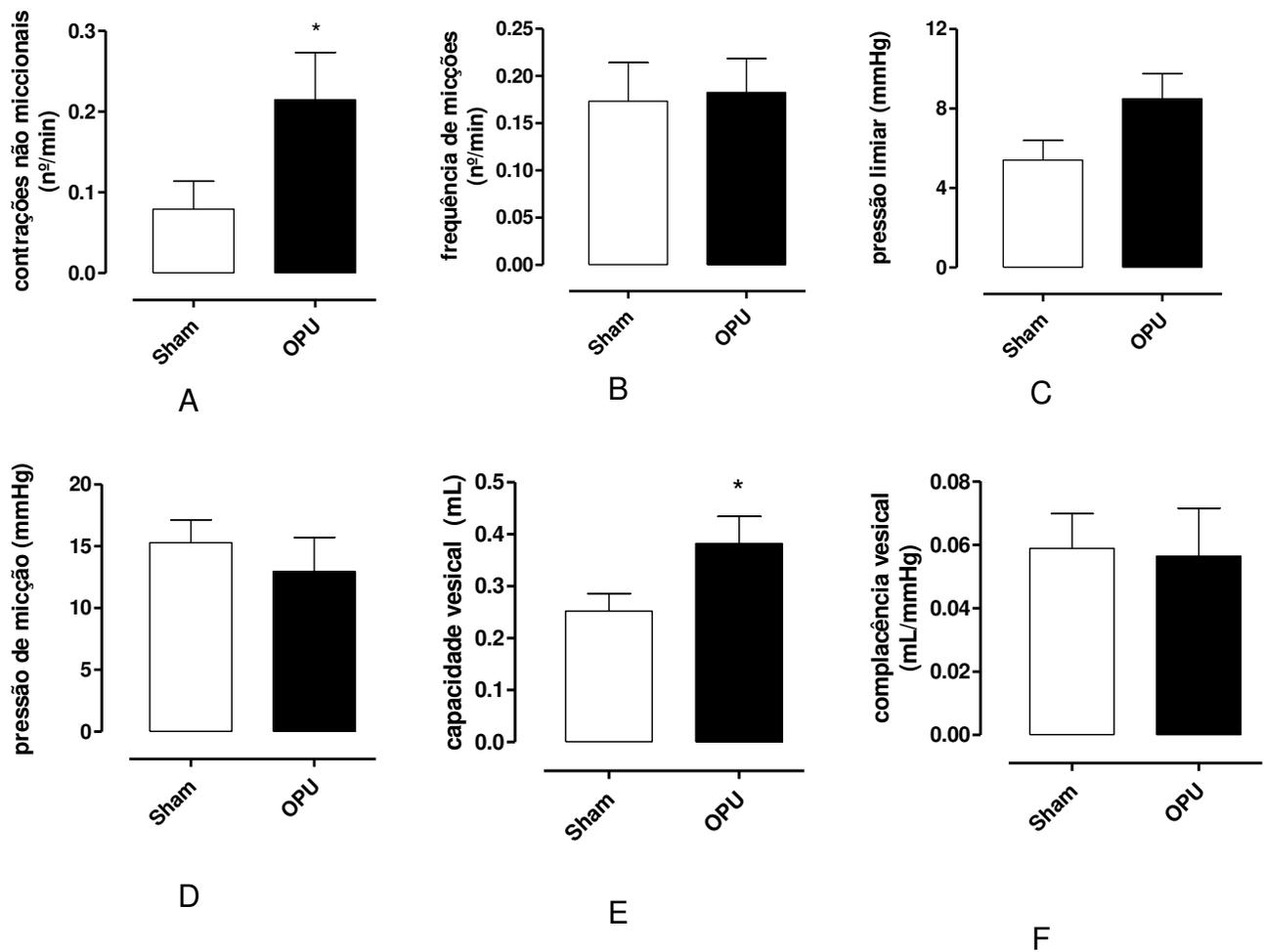


Figura 6. Parâmetros cistométricos avaliados para os grupos experimentais Sham e OPU (obstrução parcial uretral): contrações não-miccionais (A), frequência de micções (B), pressão limiar (C), pressão de micção (D), capacidade vesical (E) e complacência vesical (F). Os resultados expressam média ± erro padrão da média de 9-12 camundongos. * P<0,05 em relação ao grupo Sham.

Tabela 1. Parâmetros cistométricos avaliados nos camundongos dos grupos Sham e OPU após 5 semanas do procedimento cirúrgico. * P<0,05 em relação a Sham.

Parâmetro cistométrico	Sham (n=9)	OPU (n=12)
Contrações não miccionais (nº/min)	0,079 ± 0,034	0,215 ± 0,059 *
Frequência de micções (nº/min)	0,173 ± 0,041	0,183 ± 0,036
Pressão limiar (mmHg)	5,406 ± 0,985	8,496 ± 1,294
Pressão de micção (mmHg)	15,288 ± 1,859	12,965 ± 2,741
Capacidade vesical (ml)	0,252 ± 0,034	0,382 ± 0,052 *
Complacência vesical (ml/mmHg)	0,059 ± 0,011	0,056 ± 0,015

5.1.2. Estudo funcional de tiras de bexiga

Avaliação do efeito contrátil ao agonista muscarínico carbacol

Um total de 9 animais Sham e 10 OPU foram avaliados. As contrações máximas induzidas pelo CCh no detrusor dos camundongos do grupo OPU foi significativamente menor do que do grupo Sham (P<0,05, Figura 7 e Tabela 1). Entretanto, a potência (pEC₅₀) não se mostrou diferente entre os grupos avaliados (Tabela 1).

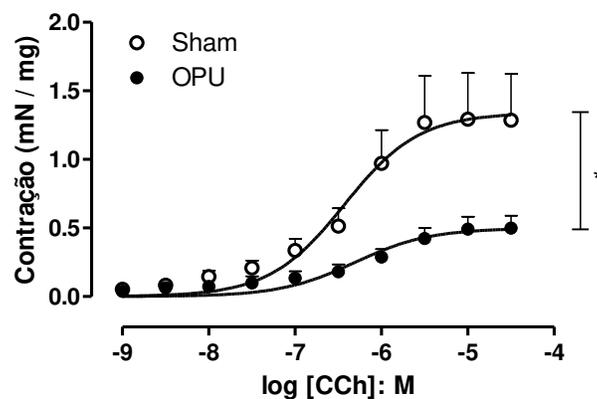


Figura 7. Curva concentração-resposta ao Carbacol (Cch) em detrusor isolado de camundongo. Os dados estão expressos como força de contração (mN)/peso da tira (mg). Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 9-10 animais. * P<0,05 em relação a Sham.

Tabela 2. Valores de resposta máxima (E_{max}) em mN/mg e potência (pEC_{50}) do Carbacol para os grupos experimentais. * $P < 0,05$ em relação a Sham.

Grupo experimental	E_{max} (mN/mg)	pEC_{50}
Sham (n=9)	$1,29 \pm 0,33$	$6,43 \pm 0,21$
OPU (n=10)	$0,49 \pm 0,09$ *	$6,30 \pm 0,17$

Avaliação da resposta contrátil ao estímulo elétrico

A estimulação elétrica levou à resposta contrátil dependente da frequência na bexiga de todos os grupos experimentais e foi obtida maior resposta a 16 Hz. O grupo OPU mostrou diminuição de resposta contrátil em relação ao Sham em todas as frequências avaliadas (Figura 8 e Tabela 3).

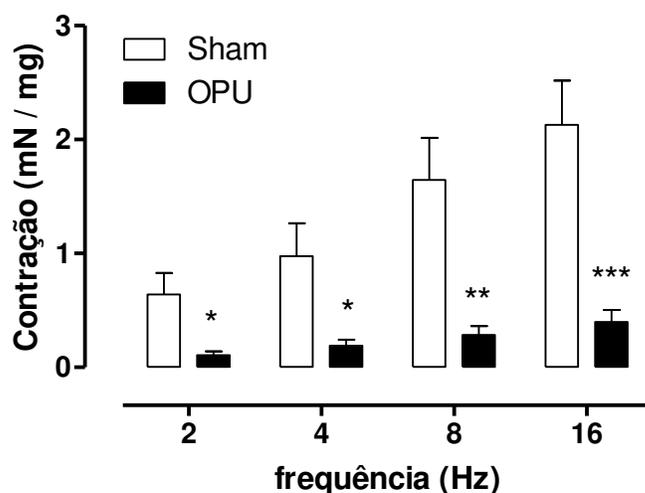


Figura 8. Curva frequência-resposta (2 a 16 Hz) em detrusor de camundongos Sham e com obstrução parcial uretral (OPU). Os dados estão expressos em amplitude de contração (mN) produzida pelas diferentes frequências de estimulação/peso da tira (mg). Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 9-10 animais. * $P < 0,05$ em relação a Sham. ** $P < 0,01$ em relação a Sham. *** $P < 0,001$ em relação a Sham.

Tabela 3. Valores de amplitude contração (mN) produzidos pelas frequências de estimulação em tiras de bexiga (mg). Os resultados representam média ± erro padrão da média de 9-10 animais. *P<0,05 em relação a Sham. **P<0,01 em relação a Sham. ***P<0,001 em relação a Sham.

Grupo experimental	2 Hz	4 Hz	8 Hz	16 Hz
Sham (n=9)	0,639 ± 0,190	0,977 ± 0,288	1,645 ± 0,372	2,129 ± 0,388
OPU (n=10)	0,108 ± 0,031 *	0,191 ± 0,052 *	0,285 ± 0,077 **	0,398 ± 0,106 ***

5.1.3. Avaliação do peso vesical

Um total de 19 animais Sham e 19 OPU foram avaliados. Após 5 semanas do procedimento cirúrgico, os animais do grupo OPU apresentaram aumento de peso significativo da bexiga (P<0,001) em relação ao grupo Sham, representado pela razão PB:PC (Figura 9 e Tabela 4).

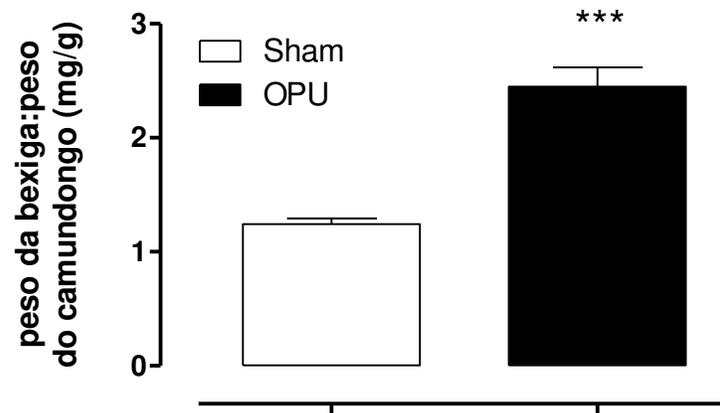


Figura 9. Representação da razão peso da bexiga pelo peso do camundongo (PB:PC) para os grupos Sham e com obstrução parcial uretral (OPU). Os dados representam média ± erro padrão da média de 19 animais. *** P<0,001 em relação a Sham.

Tabela 4. Razão peso da bexiga pelo peso do camundongo (PB:PC) para os grupos Sham e com obstrução parcial uretral (OPU). Os dados representam média \pm erro padrão da média de 19 animais. *** $P < 0,001$ em relação a Sham.

Grupo experimental	PB:PC (g)
Sham (n= 19)	1,244 \pm 0,050
OPU (n=19)	2,45 \pm 0,168 ***

5.2. Avaliação dos tratamentos após 5 semanas de obstrução parcial uretral

5.2.1. Cistometria

Um total de 9 Sham, 6 Sham + L-NAME, 6 Sham + aminoguanidina, 13 BOO, 8 BOO + L-NAME e 7 BOO + aminoguanidina foram avaliados. A Figura 10 representa o perfil dos traçados cistométricos obtidos após 5 semanas do procedimento cirúrgico para cada grupo experimental.

Não houve diferença significativa entre os grupos quando avaliada a frequência de micções. Além dos OPU terem apresentado mais CNM em relação aos Sham, os OPU tratados com L-NAME também apresentaram aumento significativo de CNM em relação a Sham, enquanto os animais OPU tratados com aminoguanidina mostraram diminuição significativa das CNM em comparação aos OPU. Em relação à capacidade vesical, os animais OPU mostraram aumento em relação aos Sham + L-NAME e os OPU + L-NAME e OPU + aminoguanidina mostraram diminuição em relação aos OPU. Para a complacência vesical, os animais Sham e OPU tratados com L-NAME e aminoguanidina mostraram diminuição. Não houve diferenças significativas para os parâmetros frequência de micção, pressão limiar e pressão de micção (Figura 11 e Tabela 5).

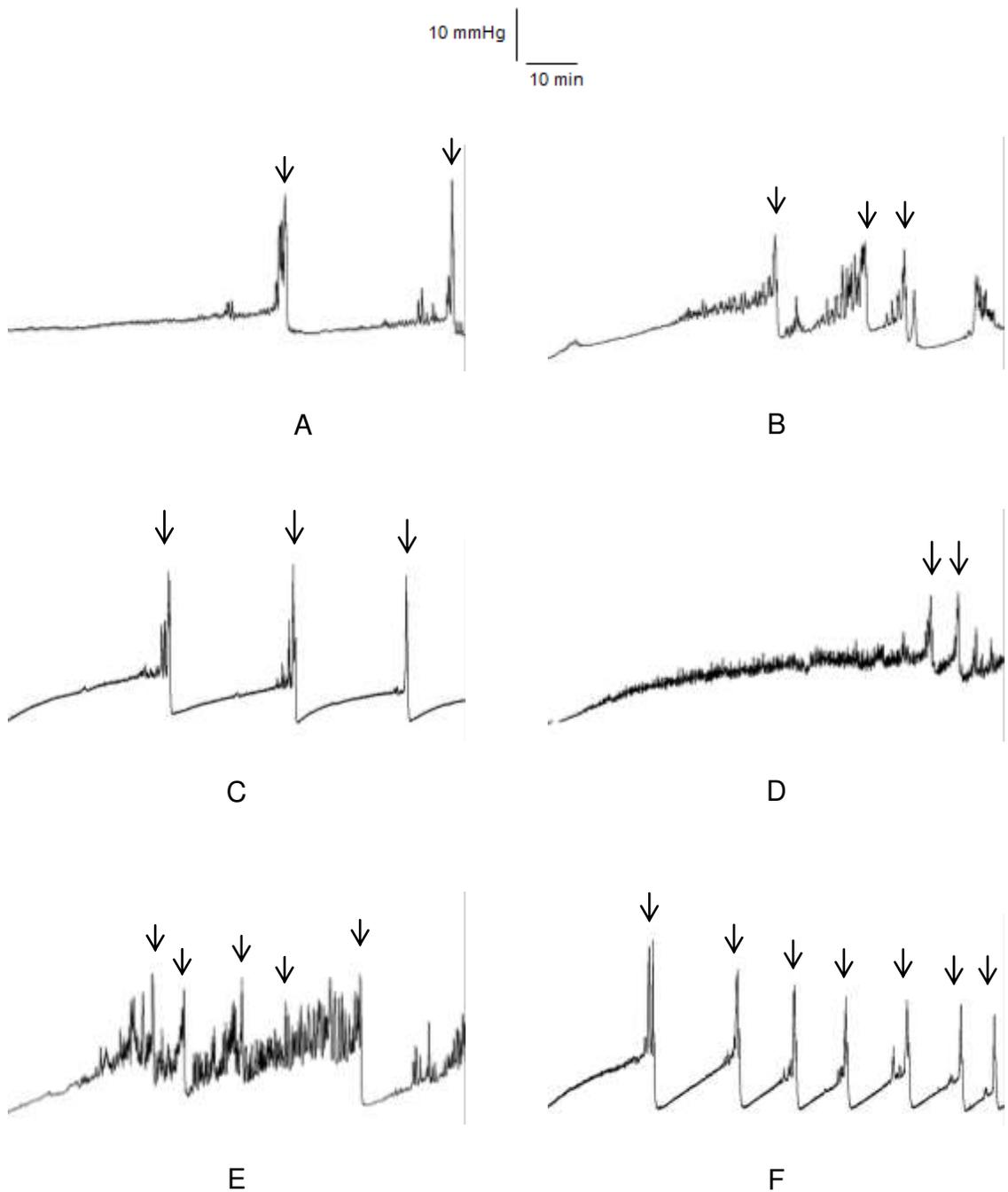


Figura 10. Traçados cistométricos de Sham (A), Sham + L-NAME (B), Sham + aminoguanidina (C), OPU (D), OPU + L-NAME (E) e OPU + aminoguanidina (F). As setas indicam momento de micção.

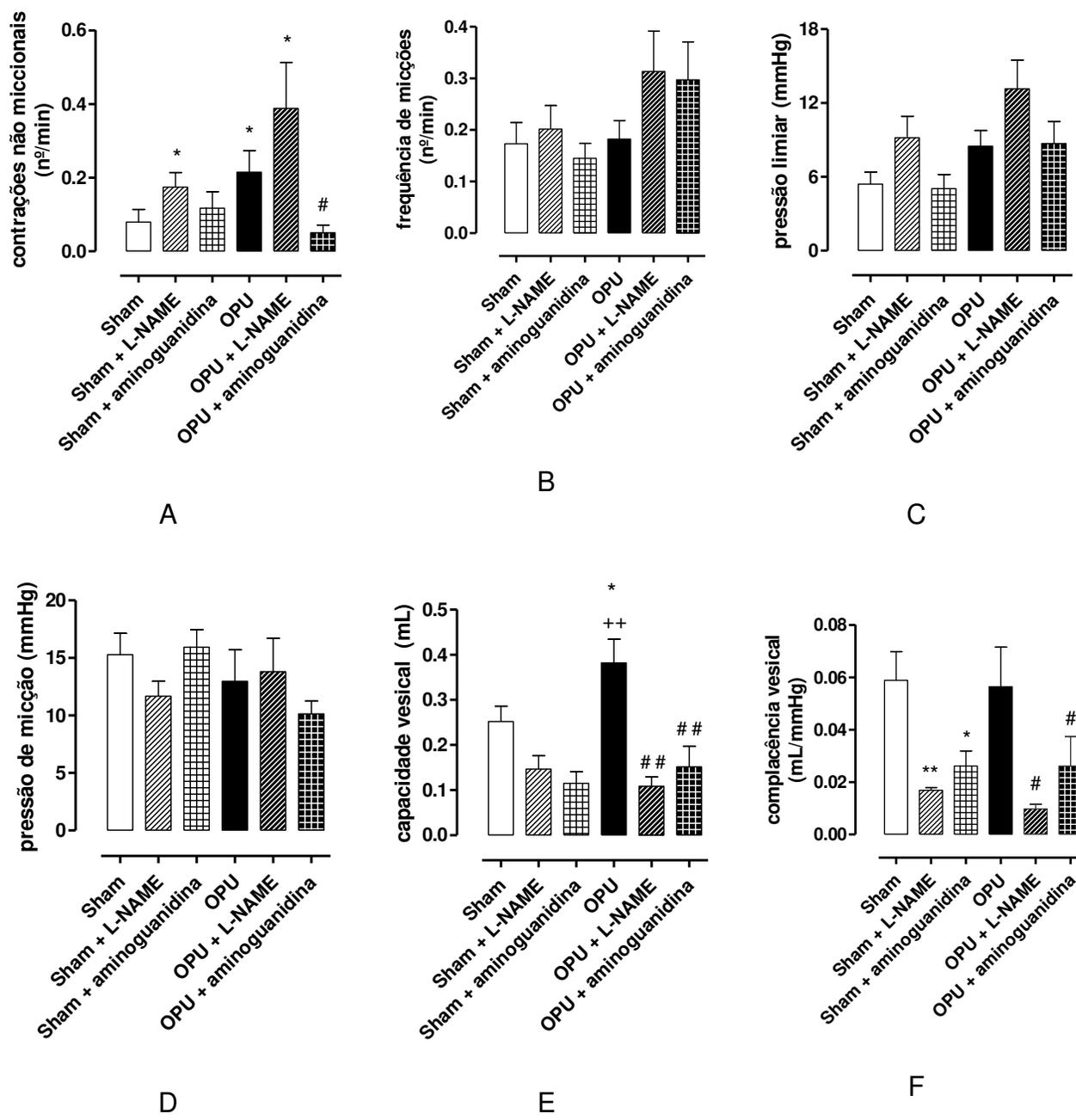


Figura 11. Parâmetros cistométricos avaliados para cada grupo experimental: contrações não-miccionais (A), frequência de micções (B), pressão limiar (C), pressão de micção (D), capacidade vesical (E) e complacência vesical (F). Os resultados expressam média \pm erro padrão da média de 6-12 camundongos. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Sham. # $P < 0,05$ em relação ao grupo OPU. ## $P < 0,01$ em relação ao grupo OPU. ++ $P < 0,01$ em relação ao grupo Sham + L-NAME.

Tabela 5. Parâmetros cistométricos avaliados para cada grupo experimental. CNM: contrações não miccionais. * P<0,05 em relação a Sham. Os resultados expressam média ± erro padrão da média de 6-13 camundongos. * P<0,05 em relação ao grupo Sham. # P<0,05 em relação ao grupo OPU. ## P<0,01 em relação ao grupo OPU. ++ P<0,01 em relação ao grupo Sham + L-NAME.

Grupo experimental	CNM (nº/min)	Frequência de micções (nº/min)	Pressão limiar (mmHg)	Pressão de micção (mmHg)	Capacidade vesical (ml)	Complacência vesical (ml/mmHg)
Sham (n=9)	0,079 ± 0,034	0,173 ± 0,041	5,406 ± 0,985	15,288 ± 1,859	0,252 ± 0,034	0,059 ± 0,011
Sham + L-NAME (n=6)	0,174 ± 0,039	0,201 ± 0,046	9,168 ± 1,753	11,673 ± 1,306	0,147 ± 0,029	0,017 ± 0,001 **
Sham + aminoguanidina (n=6)	0,117 ± 0,045	0,145 ± 0,029	5,045 ± 1,146	15,933 ± 1,542	0,115 ± 0,026	0,026 ± 0,006 *
OPU (n=12)	0,215 ± 0,059 *	0,183 ± 0,036	8,496 ± 1,294	12,965 ± 2,741	0,382 ± 0,052 * ++	0,056 ± 0,015
OPU + L-NAME (n=8)	0,388 ± 0,125 *	0,314 ± 0,078	13,155 ± 2,329	13,808 ± 2,905	0,108 ± 0,021 ##	0,001 ± 0,001 ##
OPU + aminoguanidina (n=6)	0,050 ± 0,021 #	0,297 ± 0,074	8,717 ± 1,785	10,133 ± 1,114	0,151 ± 0,046 ##	0,026 ± 0,011 ##

5.2.2. Estudo funcional de tiras da bexiga

Avaliação do efeito contrátil ao agonista muscarínico carbacol

Um total de 9 animais Sham, 3 Sham + L-NAME, 4 Sham + aminoguanidina, 10 OPU, 6 OPU + L-NAME e 3 OPU + aminoguanidina foram avaliados. As contrações máximas induzidas pelo CCh no detrusor dos camundongos dos grupos Sham + L-NAME foram significativamente maiores do que dos grupos Sham, Sham + aminoguanidina e OPU + aminoguanidina ($P < 0,001$, Figura 12 e Tabela 4). Entretanto, a potência (pEC_{50}) não se mostrou diferente entre os grupos avaliados (Tabela 2).

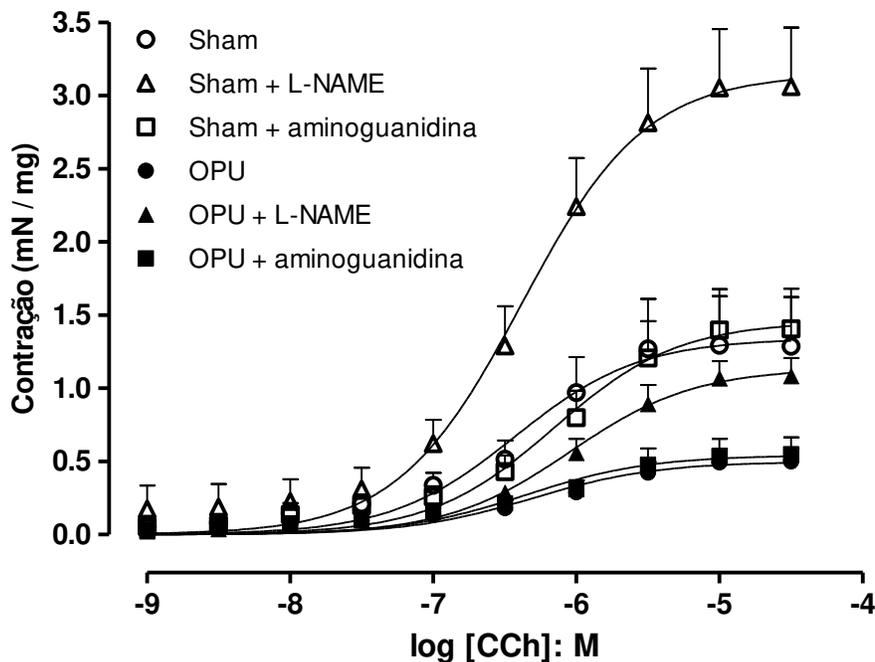


Figura 12. Curva concentração-resposta ao Carbacol (Cch) em detrusor isolado de camundongo. Os dados estão expressos como força de contração (mN)/peso da tira (mg). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 3-10 animais.

Tabela 6. Valores de resposta máxima (E_{max}) em mN/mg e potência (pEC_{50}) do Carbacol para os grupos experimentais. * $P < 0,05$ em relação a Sham. *** $P < 0,001$ em relação a Sham. +++ $P < 0,001$ em relação a Sham + L-NAME. # $P < 0,05$ em relação a OPU.

Grupo experimental	E_{max} (mN/mg)	pEC_{50}
Sham (n=9)	1,29 ± 0,33	6,43 ± 0,21
Sham + L-NAME (n=3)	3,06 ± 0,40 ***	6,38 ± 0,17
Sham + aminoguanidina (n=4)	1,40 ± 0,27	6,15 ± 0,16
OPU (n=10)	0,49 ± 0,09 *	6,30 ± 0,17
OPU + L-NAME (n=6)	1,08 ± 0,12 +++ #	6,04 ± 0,10
OPU + aminoguanidina (n=3)	0,55 ± 0,11*	6,35 ± 0,17

Avaliação da resposta contrátil ao estímulo elétrico

Um total de 9 animais Sham, 5 Sham + L-NAME, 4 Sham + aminoguanidina, 10 OPU, 8 OPU + L-NAME e 3 OPU + aminoguanidina foram avaliados. A estimulação elétrica levou à resposta contrátil dependente da frequência na bexiga de todos os grupos experimentais e foi obtida maior resposta a 16 Hz. Além do grupo OPU ter mostrado diminuição de resposta contrátil em relação ao Sham em todas as frequências avaliadas, houve diminuição de resposta para OPU + L-NAME em relação a Sham + L-NAME para 2 e 4 Hz e entre aumento de resposta para OPU + L-NAME em relação a OPU para 8 e 16 Hz. Não houve diferença entre os animais Sham tratados e nem entre OPU + aminoguanidina em relação aos demais grupos (Figura 13 e Tabela 7).

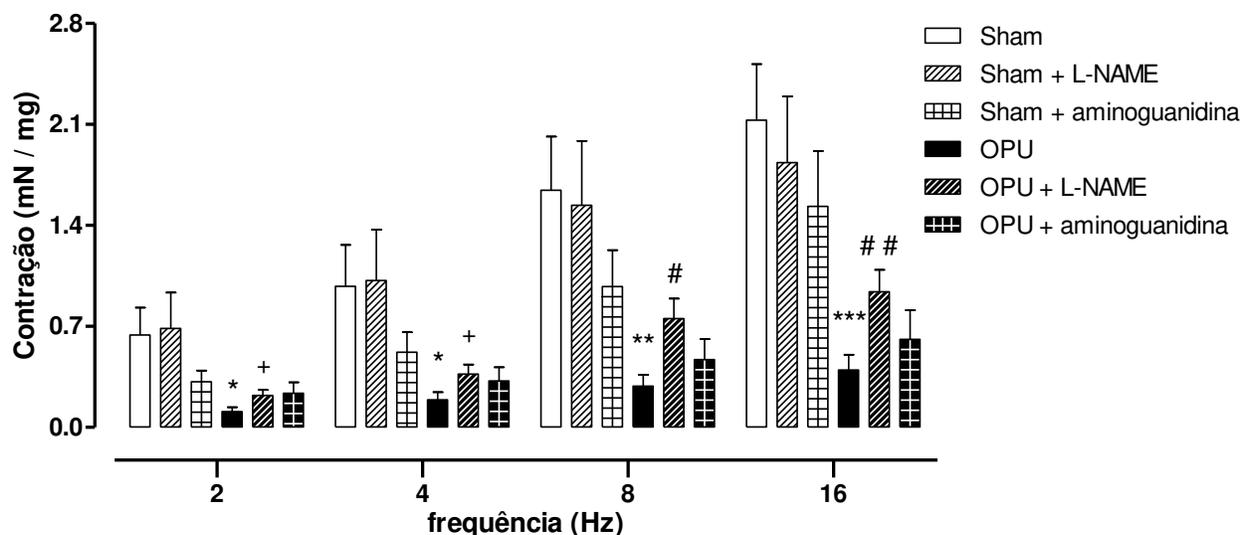


Figura 13. Curva frequência-resposta (2-16 Hz) em detrusor de camundongos. Os dados estão expressos em amplitude de contração (mN) produzida pelas diferentes frequências de estimulação/peso da tira (mg). Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 3-10 animais. *P<0,05 em relação a Sham. **P<0,01 em relação a Sham. ***P<0,001 em relação a Sham. # P<0,05 em relação a OPU. ## P<0,01 em relação a OPU. + P<0,05 em relação a Sham + L-NAME.

Tabela 7. Valores de amplitude contração (mN) produzidos pelas frequências de estimulação em tiras de bexiga (mg). Os resultados representam média \pm erro padrão da média de 3-10 animais. *P<0,05 em relação a Sham. **P<0,01 em relação a Sham. ***P<0,001 em relação a Sham. # P<0,05 em relação a OPU. ## P<0,01 em relação a OPU. + P<0,05 em relação a Sham + L-NAME.

Grupo experimental	2 Hz	4 Hz	8 Hz	16 Hz
Sham (n=9)	0,639 \pm 0,190	0,977 \pm 0,288	1,645 \pm 0,372	2,129 \pm 0,388
Sham + L-NAME (n=5)	0,686 \pm 0,249	1,018 \pm 0,352	1,539 \pm 0,445	1,836 \pm 0,459
Sham + aminoguanidina (n=4)	0,316 \pm 0,077	0,520 \pm 0,138	0,976 \pm 0,252	1,532 \pm 0,382
OPU (n=10)	0,108 \pm 0,031 *	0,191 \pm 0,052 *	0,285 \pm 0,077 **	0,398 \pm 0,106 ***
OPU + L-NAME (n=8)	0,220 \pm 0,038 +	0,369 \pm 0,066 +	0,754 \pm 0,139 #	0,939 \pm 0,153 ##
OPU + aminoguanidina (n=3)	0,236 \pm 0,076	0,322 \pm 0,095	0,469 \pm 0,143	0,610 \pm 0,203

5.2.3. Avaliação do peso vesical

Um total de 19 animais Sham, 18 Sham + L-NAME, 10 Sham + aminoguanidina, 19 OPU, 17 OPU + L-NAME e 9 OPU + aminoguanidina foram avaliados. Após 5 semanas do procedimento cirúrgico, os animais do grupo OPU apresentaram aumento de peso significativo da bexiga, enquanto os do grupo OPU + L-NAME apresentaram diminuição do ganho de peso quando comparados ao grupo OPU, representados pela razão PB:PC. O tratamento com aminoguanidina não influenciou no ganho de peso vesical dos camundongos OPU (Figura 14 e Tabela 8).

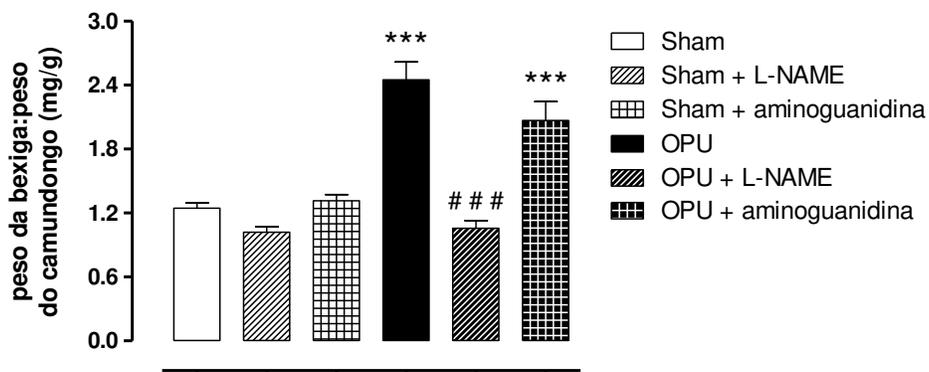


Figura 14. Representação da razão peso da bexiga pelo peso do camundongo (PB:PC) para cada grupo experimental. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 9-19 animais. *** $P < 0,001$ em relação a Sham. ### $P < 0,001$ em relação a OPU.

Tabela 8. Razão peso da bexiga pelo peso do camundongo (PB:PC) para os grupos experimentais. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 9-19 animais. *** $P < 0,001$ em relação a Sham. ### $P < 0,001$ em relação a OPU.

Grupo experimental	PB:PC (g)
Sham (n= 19)	1,244 \pm 0,050
Sham + L-NAME (n=18)	1,020 \pm 0,051
Sham + aminoguanidina (n=10)	1,314 \pm 0,060
OPU (n=19)	2,45 \pm 0,168 ***
OPU + L-NAME (n=17)	1,056 \pm 0,074 ###
OPU + aminoguanidina (n=9)	2,068 \pm 0,178 ***

6. Discussão

6.1. Discussão de material e métodos

O método escolhido para causar OPU foi a ligadura parcial ao nível do colo vesical. Em estudo piloto, foram comparados o uso da ligadura com nylon, de anel de borracha e anel metálico e o primeiro método foi preferido devido à facilidade de execução, menor índice de mortalidade no período pós-operatório e por promover obstrução infravesical de maneira mais homogênea entre os animais.

O parâmetro utilizado em animais OPU para avaliar se a cirurgia fora bem sucedida foi o aumento do peso da bexiga. Estudos com camundongos obstruídos mostram que já após 1 semana é possível observar aumento de 22% do peso vesical (69). Dessa forma, animais que não desenvolveram hipertrofia vesical foram excluídos do estudo. O oposto também foi observado, ou seja, alguns animais com obstrução infravesical severa desenvolveram hidronefrose e vieram a óbito entre 2 e 7 dias do período pós-cirúrgico. De acordo com Zderic et al. (62), discrepâncias são possíveis porque a obstrução parcial uretral induzida cirurgicamente leva a resultados heterogêneos. Nenhum modelo de obstrução é perfeito, mesmo para o mesmo cirurgião, porque cada animal responde de maneira diferente ao processo. De acordo com estes autores, ainda, os modelos de OPU feitos em fetos de espécies animais maiores talvez sejam os únicos a levarem a obstrução de forma homogênea.

No estudo piloto, foi testado também o tempo de obstrução de 3 semanas, em que não se observou diferença para resposta contrátil ao carbacol ou estímulo elétrico entre camundongos OPU e Sham. Na avaliação cistométrica, somente o parâmetro frequência de

micções mostrou-se aumentado no grupo OPU, achado consistente com hiperatividade detrusora observada em processo obstrutivo inicial.

Após 5 semanas de obstrução uretral, verificou-se que todos os animais apresentaram alterações funcionais, avaliadas pela cistometria e estudo *in vitro* de contração.

Os camundongos, após 5 semanas de avaliação, destinaram-se para avaliação do ganho de peso vesical, além de estudo cistométrico ou funcional de tiras de bexiga, pois avaliações anteriores do grupo de pesquisa do Departamento de Farmacologia mostraram que pode ocorrer alteração de resultados funcionais quando as bexigas são submetidas previamente à cistometria (dados não apresentados). Tal fato poderia ocorrer devido à exposição do tecido ao meio externo ou à punção realizada pelo escalpe.

O anestésico utilizado para a cistometria foi a uretana, devido à ausência de efeitos na função vesical (70).

O método de eutanásia utilizado neste estudo está de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.

6.2. Discussão de resultados

Neste trabalho, as CNM e a capacidade vesical mostraram-se aumentadas em animais OPU em relação aos Sham, bem como em estudos prévios com camundongos (42, 69) e ratos (71, 72). No processo obstrutivo, alterações no músculo liso detrusor ocorrem como consequência da denervação “em ilhas” ou regiões mediada pelo estresse oxidativo, em que mais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas pelo aumento de

iNOS, associadas à diminuição das concentrações de glutathiona, o tiol não proteico antioxidante mais abundante (73).

A depleção crônica de NO em ratos leva a aumento de CNM e pressão de micção. Tais achados podem ser atribuídos a aumento da espessura da musculatura do trígono vesical (60) e diminuição do reflexo de relaxamento uretral (74). Neste estudo, da mesma forma, a depleção de NO pelo L-NAME em animais Sham levou a mais CNM, o que mostra que a deficiência de NO contribuiu para alteração de contratilidade vesical.

O tratamento com aminoguanidina diminuiu as CNM em animais com OPU, achado semelhante ao observado em ratos tratados com a mesma droga, em que a redução da fibrose foi tida como atenuante da disfunção vesical (64). Estudo utilizando camundongos *knockout* para iNOS também mostrou concordância de resultados, em que os animais apresentaram menor dano isquêmico (64). Dessa forma, comparando a inibição não seletiva da NOS com a seletiva de iNOS, que levaram a resultados opostos para CNMs, verifica-se que as NOS constitutivas têm papel modulatório na contratilidade vesical.

Tanto o L-NAME quanto a aminoguanidina levaram a diminuição da capacidade vesical em animais OPU. A hipótese é que o L-NAME poderia ter evitado o aumento da capacidade vesical pela diminuição de fluxo sanguíneo, atrofia muscular e ausência de deposição de colágeno (67), que seriam os fatores responsáveis pela distensão vesical e acomodação cada vez maior de urina residual em processo obstrutivo crônico. O tratamento com aminoguanidina, uma vez que reduziu as CNM pela provável diminuição de iNOS, contribuiu para a normalização da capacidade vesical em animais OPU. Com relação à complacência, o tratamento com ambos os fármacos levou à diminuição tanto em animais Sham quanto OPU. Isso pode ser atribuído à diminuição da capacidade vesical associada à tendência ao aumento da pressão limiar observada nos animais tratados.

Neste estudo, não se observou alteração da frequência de micções entre os grupos. É sabido que no início do processo obstrutivo ocorre hiperatividade detrusora, em que é possível observar aumento de CNM e frequência de micção após 1 semana da indução da OPU (75). Entretanto, conforme a doença se torna crônica, a descompensação funcional (62) envolve hipoatividade detrusora, em que há aumento progressivo da massa vesical, cada vez mais áreas de denervação e aumento de capacidade vesical. Neste estudo também não houve diferença entre os grupos para pressão limiar e pressão de micção, achados semelhantes aos observados para ratos obstruídos por 6 semanas (71), mas opostos aos observados por O'Connor, Vaughan e Felsen (76) para ratos obstruídos por 28 dias.

Os estudos farmacológicos *in vitro* mostraram que as tiras de bexigas OPU foram capazes de gerar menos tensão em resposta à estimulação colinérgica e elétrica. A função vesical permanece estável por até 3 semanas após o processo obstrutivo, mas conforme o processo se torna crônico, a função vesical inicia descompensação, em que se observa hipotonia vesical (61). Em estudos com ratos obstruídos por 1 e 6 semanas, observou-se que as tiras vesicais foram capazes de gerar menos tensão em resposta ao carbacol e KCl (77). Em camundongos obstruídos por 5 semanas, verificou-se prejuízo à função detrusora (42, 69), achado que também está de acordo com a denervação e diminuição de angiogênese em coelhos com OPU por 8 semanas, vista como áreas de degeneração de pequenos tratos nervosos (67). Segundo estes autores, ainda, a suplementação com L-arginina conferiu papel neuroprotetor e melhorou a resposta contrátil ao carbacol e estímulo elétrico, uma vez que levou a menor geração de nitrotirosina. De acordo com Albrecht et al. (77), a administração de precursores ou doadores de NO faz com que a liberação dessa substância ocorra de forma lenta, compensando a diminuição crônica da produção de NO pelas NOS

constitutivas, diferentemente do que ocorre com a iNOS, uma vez que o aumento da atividade dessa isoforma ocorre no início da injúria de OPU (57).

O tratamento com L-NAME em animais Sham levou a maior resposta contrátil ao carbacol, fato que estaria associado ao aumento da sensibilidade do detrusor a agonistas muscarínicos, pelo aumento dos níveis de trifosfato de inositol (IP₃) e redução do relaxamento mediado por β 3-adrenoceptores (60). Para os animais OPU tratados com L-NAME houve diminuição da resposta contrátil em relação aos Sham tratados, tanto para carbacol quanto para estímulo elétrico, entretanto houve aumento quando se compara aos animais OPU. Embora este achado esteja de acordo com o observado em coelhos com OPU por até 1 (66) ou 2 semanas (67) por menor geração de nitrotirosina e preservação da densidade nervosa, a literatura mostra dados opostos para obstrução crônica, já que a inibição das NOS levaria a piora da vascularização e da densidade nervosa vesical (67).

O tratamento com aminoguanidina não levou a aumento da resposta contrátil em bexigas OPU, sugerindo que a inibição da iNOS não melhorou a função vesical. Este dado difere de trabalho com camundongos *knockout* para iNOS, que apresentaram melhora de função contrátil (69). Este dado também está em discordância com os resultados deste estudo cistométrico, que mostrou que a aminoguanidina melhorou a disfunção vesical em animais com OPU. Deve-se considerar que os estudos foram feitos em animais diferentes, ou seja, as bexigas utilizadas para os estudos *in vitro* não foram as dos mesmos animais avaliados pela cistometria. Ainda, no animal vivo, avalia-se o comportamento miccional como consequência de mecanismos fisiológicos interligados, o que não se observa em estudo com tiras de bexiga, em que vias independentes são avaliadas por meio de diferentes protocolos experimentais.

Os animais OPU mostraram aumento de peso vesical quase 2 vezes maior do que os Sham, semelhante ao observado pela literatura na mesma espécie (78). Camundongos, após 1 semana de obstrução uretral, têm rápido ganho de peso da bexiga, que aumenta 3 e 5 semanas após o procedimento cirúrgico (42). Em coelhos e ratos após 1 dia de obstrução já ocorre aumento de fluxo sanguíneo vesical, que poderia ser o primeiro estímulo para a hipertrofia (51, 52), evento que ocorre em decorrência do estiramento dos componentes da parede vesical, levando a espessamento de epitélio, camada muscular e serosa (79) e aumento na síntese e deposição de colágeno (55). O espessamento da parede e o aumento de distensão da bexiga resultam em ciclos de isquemia e reperfusão durante e após cada ciclo miccional (80, 49) e levam a deterioração progressiva da função vesical (50).

O tratamento com L-NAME mostrou que as bexigas dos animais OPU deixaram de ganhar peso quando comparadas ao controle OPU. Em ratos tratados por 4 semanas com a mesma droga, estudos morfométricos revelaram espessamento da camada muscular do trigono vesical sem prejuízo do músculo detrusor (60). Em estudo com coelhos OPU tratados com L-NAME ou arginina, observou-se que os animais do grupo L-NAME apresentaram denudação da mucosa, atrofia de células musculares e diminuição da vascularização das camadas serosa e muscular após 2 e 8 semanas do procedimento cirúrgico. Já o grupo que recebeu suplementação de L-arginina na dieta teve aumento de fluxo sanguíneo e preservação da morfofisiologia vesical. Tais achados, de acordo com os autores, mostram a influência das NOS constitutivas na manutenção da angiogênese e do fluxo sanguíneo, essenciais para a manutenção da função vesical em processos obstrutivos crônicos (67). Beamon et al. (56) trataram camundongos OPU por 6 semanas com sildenafil, inibidor da PDE₅, e observaram que houve diminuição da hipertrofia muscular e fibrose, além de

melhora da função vesical, uma vez que esse fármaco promoveria vasodilatação e impediria isquemia vesical.

Por outro lado, o tratamento com aminoguanidina não preveniu o aumento de peso vesical em animais OPU. Em ratos com 3 e 6 semanas de obstrução, a atividade da eNOS diminui drasticamente quando comparada a animais Sham, mas mantém-se maior do que a atividade de iNOS (81). Bexigas hipertrofiadas de ratos exibem fraca expressão de iNOS e diminuição drástica da nNOS em urotélio após 3 e 6 semanas de obstrução (59). Isso poderia indicar porque a inibição da iNOS somente não afetou o ganho de peso vesical em animais OPU, embora a inibição das três isoformas de NOS tenha mostrado resultados significativos. Estudo com camundongos *knockout* para iNOS também não revelou diferença entre o peso vesical destes animais e os *wild type* após processo obstrutivo (69). Neste estudo, não foi possível realizar a análise histopatológica das bexigas, que poderia indicar quais componentes estariam alterados.

7. Conclusão

O estudo demonstrou que:

a. Os animais com OPU exibiram aumento de contrações não-miccionais e capacidade vesical, além de diminuição das respostas contráteis muscarínica e elétrica e aumento de peso da bexiga, caracterizando modelo de hipoatividade vesical;

b. A inibição da iNOS somente não modificou os achados observados em animais com OPU, já que não causou aumento das respostas contráteis e nem evitou o ganho de peso vesical em animais obstruídos, embora tenha levado a melhora de parâmetros cistométricos.

c. A inibição das três isoformas de NOS levou a piora de função vesical avaliada à cistometria e aumento das respostas contráteis aos estudos funcionais de contração, o que sugere que a inibição das 3 isoformas parece ter papel mais importante na fisiopatologia da OPU do que somente da iNOS.

8. Referências Bibliográficas

1. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, Van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn.*2002,21:167-78.
2. Irwin DE, Kopp ZS, Agatep B, Milsom I, Abrams P. Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction. *BJU Int.*2011,108:1132-9.
3. Rosen R, Altwein J, Boyle P, Kirby RS, Lukac B, Meuleman E, O'Leary MP, Puppò P, Robertson C, Giuliano F. Lower urinary tract symptoms and male sexual dysfunction: the multinational survey of the aging male (MSAM-7). *Eur Urol.*2003,44(6):637-49.
4. Moreira Júnior ED, Neves RCS, Fernandes Neto A, Duarte FG, Moreira TL, Lobo CFL, Glasser DB. A Population-based survey of lower urinary tract symptoms (LUTS) and symptom-specific bother: results from the Brazilian LUTS epidemiology study (BLUES). *World J Urol.*2013,31(6):1451-8.
5. Garraway WM, Collins GN, Lee RJ. High prevalence of benign prostatic hypertrophy in the community. *Lancet.*1991,338:469–71.
6. Oelke M, Bachmann A, Descazeaud A, Emberton M, Gravas S, Michel MC, N'dow J, Nordling J, de la Rosette JJ. EAU guidelines on the treatment and follow-up of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction. *Eur Urol.*2013;64:118-40.
7. Hernández C, Estivill E, Prieto M, Badía X. Nocturia in Spanish patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia (LUTS/BPH). *Curr Med Res Opin.*2008,24:1033-8.
8. Hernández C, Estivill E, Cantalapiedra A. Impact of nocturia on sleep quality in patients with lower urinary tract symptoms suggesting benign prostatic hyperplasia (LUTS/BPH). The NocSu Study. *Actas Urol Esp.*2010,34(5):450-9.
9. McGuire EJ, Cespeder RD, O'Connell HE. Leak-point pressures. *Urol Clin North Am.*1996,23:253-62.
10. Martín-Morales A, Sánchez-Cruz JJ, Saenz De Tejada I, Rodríguez-Vela L, Jiménez-Cruz JF, Burgos-Rodríguez R. Prevalence and independent risk factors for erectile dysfunction in Spain: results of the Epidemiología de la Disfunción Erectil Masculina Study. *J Urol.*2001,166:569-75.

11. Oh MM, Choi H, Park MG, Kang SH, Cheon J, Bae JH, Moon DG, Kim JJ, Lee JG. Is There a Correlation Between the Presence of Idiopathic Detrusor Overactivity and the Degree of Bladder Outlet Obstruction? *Urol.*2011,77:167-70.
12. Morrison J, Birder L, Craggs M, De Groat WC, Downie J, Drake M, Fowler C, Thor K. Neural control. In: ABRAMS P, CARDOZO L, KHOURY S, WEIN A (org). *Incontinence*. Jersey: Health Publications Ltd, 363-422, 2005.
13. De Groat WC, Fraser MO, Yoshiyama M, Smerin S, Tai C, Chancellor MB, Yoshimura N, Ropollo JR. Neural control of the urethra. *Scand J Urol Nephrol.*2001,35(Suppl. 201),35-43.
14. De Groat WC. Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol.*2006,147:S25-40.
15. Stevens LA, Chapple CR, Chess-Williams R. Human idiopathic and neurogenic overactive bladder and the role of M2 muscarinic receptor in contraction. *Eur Urol.*2007, 52:531-8.
16. Smith PP, McCrery RJ, Appell RA. Current trends in the evaluation and management of female urinary incontinence. *CMAJ.*2006,175:1233-40.
17. Kavia RBC, Dasgupta R, Fowler CJ. Functional imaging and the central control of the bladder. *J Comp Neur.* 2005, 493: 27-32.
18. Zhou Y, Ling EA. Colocalization of nitric oxide synthase and neurotransmitters in the intramural ganglia of the guinea pig urinary bladder. *J Comp Neur.*1998,394:496-505.
19. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.*2004,84:935-86.
20. Fowler CJ, Griffiths D, De Groat WC. The neural control of micturition. *Nat rev Neurosci.*2008,9:453-66.
21. Andersson KE e Hedlund P. Pharmacologic perspective on the physiology of the lower urinary tract. *Urol.*2002,60:13-20.
22. Moncada S, Reesdd, Schulz R, Palmer RMJ. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilator after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.*1991,88:2166-70.
23. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.*1995,9:1319-30.
24. Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N, Perna F, Fabbroni V, Di Felice A, Perigli G, Mazzanti R, Masini E. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.*2004,10:2694–704.

25. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Skvorsov VG, Mandrugina AA, Fedoseev VM. Structure and activity of NO synthase inhibitors specific to the L-arginine binding site. *Biochemistry*.2005,70:8-23.
26. Andersson KE. Pharmacology of lower urinary tract smooth muscle and penile erectile tissues. *Pharmacological Rev*.1993,45:253–308.
27. Christ GJ, Hodges S. Molecular mechanisms of detrusor and corporal myocyte contraction: identifying targets for pharmacotherapy of bladder and erectile dysfunction. *Br J Pharmacol*.2006,147(suppl 2):S41-55.
28. Lue TF. Erectile Dysfunction. *N Eng J Med*.2000,342:1802-13.
29. Dusting GJ, Macdonald PS. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. *Ann Med*.1995,27:395-406.
30. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol*.1996,271:C1424-37.
31. Bohle DS, Hansert B, Paulson SC, Smith BD. Biomimetic synthesis of the putative cytotoxin peroxynitrite, ONOO⁻, and its characterization as a tetramethylammonium salt. *J Am Chem Soc*.1994,116:7423-4.
32. Ischiropoulos HL, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. Peroxynitrite mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*.1992,298 431–7.
33. Levin RM, Haugaard N, O'Connor L, Buttyan R, Das A, Dixon JS, Gosling JA. Obstructive response of human bladder to BPH vs. rabbit bladder response to partial outlet obstruction: a direct comparison. *Neurourol Urodyn*.2000,19:609–29.
34. Langouche L, Vanhorebeek I, Vlasselaers D, Perre SV, Wouters PJ, Skongstrand K, Hansen TK, Van Den Berghe G. Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. *J Clin Invest*.2005,115(8):2277-86.
35. McMurray G, Casey JH, Naylor AM. Animal models in urological disease and sexual dysfunction. *Br J Pharmacol*.2006,147:S62-79.
36. Guarnieri L, Ibba M, Angelico P, Testa R. Effects of oxybutnin, terodiline, and nifedipine on the cystometrogram in conscious rats with infravesical outflow obstruction. *Pharmacol Res*.1991,24(3):263-72.
37. Park JM, Yang T, Arend LJ, Smart AM, Schnermann JB, Briggs JP. Cyclooxygenase-2 is expressed in bladder during fetal development and stimulated by outlet obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*.1997,273: F538-44.
38. Shutherland RS, Baskin LS, Kogan BA, Cunha G. Neuroanatomical changes in the rat bladder after bladder outlet obstruction. *Br J Urol*.1998,82: 895-901.

39. Ghafar MA, Shabsigh A, Chichester P, Anastasiadis AG, Borow A, Levin RM, Burryan R. Effects of chronic partial outlet obstruction on blood flow and oxygenation of the rat bladder. *J Urol.*2002,167:1508-12.
40. Hanai T, Ma FH, Matsumoto S, Park YC, Kurita T. Partial outlet obstruction of the rat bladder induces a stimulatory response on proliferation of the bladder smooth muscle cells. *Int Urol Nephrol.*2002,34:37-42.
41. Kaiho Y, Nishiguchi J, Kwon DD, Chancellor MB, Arai Y, Snyder PB, Yoshimura N. The effects of a type 4 phosphodiesterase inhibitor and the muscarinic cholinergic antagonist tolterodine tartrate on detrusor overactivity in female rats with bladder outlet obstruction. *Br J Urol Int.*2007,101:615-20.
42. Lemack GE, Burkhard F, Zimmern PE, Mcconell JD, Lin VK. Physiologic sequelae of partial infravesical obstruction in the mouse: role of inducible nitric oxide synthase. *J Urol.*1999,161:1015-22.
43. Austin JC, Chacko SK, Disanto M, Canning DA, Zderic SA. A male murine model of partial bladder outlet obstruction reveals changes in detrusor morphology, contractility and myosin isoform expression. *J Urol.*2004,172:1524-8.
44. Banks FCL, Knight GE, Calvert RC, Morgan RJ, Burnstock G. Alterations in purinergic and cholinergic components of contractile responses of isolated detrusor contraction in a rat model of partial bladder outlet obstruction. *Br J Urol Int.* 2005,97:372-8.
45. Harrison SCW, Ferguson DR, Doyle PT. Effect of bladder outflow obstruction on the innervation of the rabbit urinary bladder. *Br J Urol.*1990, 66: 372-9.
46. Gosling JA, Kung LS, Dixon JS, Horan P, Whitbeck C, Levin R. Correlation between the structure and function of the rabbit urinary bladder following partial outlet obstruction. *J Urol.*2000, 163: 1349-56.
47. Mostwin JL, Karim OMA, Koeveringe GV, Brooks EL. The guinea pig as a model of gradual urethral obstruction. *J Urol.*1991,145:854-8.
48. Seki N, Karim OMA, Mostwin JL. Changes in electrical properties of guinea pig smooth muscle membrane by experimental bladder outflow obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol.*1992,262:F885-91.
49. Greenland JE, Brading AF. The effect of bladder outflow obstruction on detrusor blood flow changes during the voiding cycle in conscious pigs. *J Urol.* 2001,165:245-8.
50. Levin RM, Levin SS, Zhao Y, Buttyan R. Cellular and molecular aspects of bladder hypertrophy. *Eur Urol.*1997,32(suppl 1):15-21.

51. Lieb J, Chichester P, Kogan B, Das AK, Leggett RE, Schröder A, Levin RM. Rabbit urinary bladder blood flow changes during the initial stage of partial outlet obstruction. *J Urol.*2000,164(4):1390-4.
52. Shabsigh A, Hayek OH, Weiner D, Saidi J, Kaplan SA, Kiss A, Burchardt M, Buttyan R, Levin RM. Acute increase in blood flow to the rat bladder subsequent to partial bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn.* 2000,19(2):195-206.
53. Miyajima A, Chen J, Kirman I, Poppas DP, Vaughan ED, Felsen D. Interaction of nitric oxide and transforming growth factor- β 1 induced by angiotensin II and mechanical stretch in rat renal tubular epithelial cells. *J Urol.*2000,164:1729-34.
54. Saito M, Miyagawa I. Direct detection of nitric oxide in rat urinary bladder during ischemia-reperfusion. *J Urol.*1999,162:1490-5.
55. Kim JC, Ki DB, Seo SII, Park YH, Hwang TK. Nerve growth factor and vanilloid receptor expression, and detrusor instability, after relieving bladder outlet obstruction in rats. *Br J Urol Int.*2004,94:915-8.
56. Beamon CR, Mazar C, Salkini MW, Phull HS, Comiter CV. The effect of sildenafil citrate on bladder outlet obstruction: a mouse model. *Br J Urol Int.*2008, 104: 252-6.
57. Levin RM, Haugaard N, Hypolite JA, Wein AJ, Buttyan Y. Metabolic factors influencing lower urinary tract function. *Exp Physiol.*1999,84(1);171-94.
58. Lluet P, Barras M, Palea S. Cholinergic and purinergic contribution to the micturition Reflex in conscious rats with long-term bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn.* 2002,21:142-53.
58. Turner, WH, Brading AF. Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Pharmacol Ther.*1997,75(2): 77-110.
59. Johansson R, Pandita RK, Poljakovic M, Garcia-Pascual A, De Vente J, PERSSON K. Activity and expression of the nitric oxide synthase in the hypertrophied rat bladder and the effect of nitric oxide on bladder smooth muscle growth. *J Urol.*2002,168:2689-94.
60. Mónica FZT, Bricola AAO, Báú FR, Lopes Freitas LL, Teixeira SA, Muscará MN, Abdalla FMF, Porto CS, De Nucci G, Zanesco A, Antunes E. Long-term nitric oxide deficiency causes muscarinic supersensitivity and reduces β 3-adrenoceptor-mediated relaxation, causing rat detrusor overactivity. *Br J Pharmacol.*2008,153:1659–68.
61. Schroder A, Chichester P, Kogan BA, Longhurst PA, Lieb J, Das AK, Levin RM. Effect of chronic bladder outlet obstruction on blood flow of the rabbit bladder. *J Urol.*2001,165: 640–6.
62. Zderic SA, Wein AJ, Monson FC, Levin RM. Mechanisms of bladder smooth-muscle hypertrophy and decompensation: lessons from normal development and the response to outlet obstruction. *W J Urol.*1998,16:350-8.

63. Mumtaz FH, Khan MA, Thompson CS, Morgan RJ, Mikhailidis DP. Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological implications. *Br J Urol Int.*2000,85:567-78.
64. Felsen D, Dardashti K, Ostad M, Lemer ML, Gross SS, Chen J, Vaughan ED, Poppas DP. Inducible nitric oxide synthase promotes pathophysiological consequences of experimental bladder outlet obstruction. *J Urol.*2003,169:1569-72.
65. Saito M, Miyagawa I. NG-nitro-L-arginine methylester, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes apoptosis induced by ischemia-reperfusion in the rat bladder. *Neurourol Urodyn.*2002,21:566–71.
66. Conners W, Whitebeck C, Chichester P, Legget R, Johnson A, Kogan B, Levin R, Mannikarottu A. L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes oxidative damage in urinary bladder partial outlet obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol.*2006,290:F357–63.
67. Lin WY, Levin RM, Chichester P, Leggett R, Juan YS, Johnson A, Neumann p, Whitbeck C, Guven A, Kogan B, Mannikarottu A. Effects of L-arginine and L-NAME on chronic partial bladder outlet obstruction in rabbit. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*2007,293:R2390–9.
68. Lintomen L, Souza-Filho LGS, Ferreira T, Camargo EA, Teixeira AS, Muscará MN, Landgraf RG, Jancar S, Mendes GD, De Nucci G, Antunes E. Different mechanisms underlie the effects of acute and long-term inhibition of nitric oxide synthases in antigen-induced pulmonary eosinophil recruitment in BALB/C mice. *Pulm Pharmacol Ther.*2009, 22:1-8.
69. Lemack GE, Zimmern PE, Vazquez D, Mcconnell JD, Lin VK. Altered response to partial bladder outlet obstruction in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J Urol.*2000,163:1981-7.
70. Matsuura S, Downie JW. Effect of Anesthetics on Reflex Micturition in the Chronic Cannula-Implanted Rat. *Neurourol Urodyn.*2000,19:87-9.
71. Malmgren A, Sjögren C, Uvelius B, Mattiasson A, Andersson KE, Andersson PO. Cystometrical evaluation of bladder instability in rats with infravesical outflow obstruction. *J Urol.*1987,137:1291-4.
72. Steers WD, De Groat WC. Effect of bladder outlet obstruction on micturition reflex pathways in the rat. *J Urol.*1988,140(4):864-71.
73. Jongh R, Dambros M, Haenen GRMM, den Hartog GJM, Bast A, van Kerrebroeck PEV, van Koeveeringe GA. Partial bladder outlet obstruction reduces the tissue antioxidant capacity and muscle nerve density of the guinea pig bladder. *Neurourol Urodyn.*2009, 28:461–467.
74. Persson K, Igawa Y, Mattiasson A, Andersson KE. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway in the rat lower urinary tract in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.*1992,107:178-84.

75. Schröder A, Uvelius B, Newgreen D, Andersson KE. Bladder overactivity in mice after 1 week of outlet obstruction. Mainly afferent dysfunction? *J Urol.*2003,170:1017-21.
76. O'Connor LT Jr, Vaughan ED Jr, Felsen D. In vivo cystometric evaluation of progressive bladder outlet obstruction in rats. *J Urol.*1997,158:631–5.
77. Albrecht EWJA, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, Van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.*2003,199:8-17.
77. Yanagi K. Effects of nitric oxide on bladder outlet obstruction in rats. *Yonago Acta Med.*2002,45:19–26.
78. Pandita RK, Fujiwara M, Andersson KE. Cystometric evaluation of bladder function in non-anesthetized mice with and without bladder outlet obstruction. *J Urol.*2000,164(4): 1385-9.
79. Gabella G, Uvelius B. Urinary bladder of rat: fine structure of normal and hypertrophic musculature. *Cell Tis Res.*1990,262:67–79.
80. Greenland JE, Hvistendahl JJ, Andersen H, Jørgensen TM, McMurray G, Cortina-Borja M, Brading AF, Frokiaer J. The effect of bladder outlet obstruction on tissue oxygen tension and blood flow in the pig bladder. *Br J Urol Int.*2000,85(9):1109-14.
81. Yuan X, Wu S, Lin T, He D, Li X, Liu S, Li L, Wei G. Role of nitric oxide synthase in bladder pathologic remodeling and dysfunction resulting from partial outlet obstruction. *Urol.*2011,77:1008.e1–8.