

Ricardo Reges Maia de Oliveira

**EFEITO DA DEFICIÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO E DA
SILDENAFILA NA FUNÇÃO DO TRATO URINÁRIO:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona*
CO-ORIENTADOR : *Prof. Dr. Edson Antunes*

**UNICAMP
2009**

Ricardo Reges Maia de Oliveira

**EFEITO DA DEFICIÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO E DA
SILDENAFILA NA FUNÇÃO DO TRATO URINÁRIO:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Cirurgia, área de concentração em Cirurgia.

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D’Ancona*
CO-ORIENTADOR : *Prof. Dr. Edson Antunes*

**UNICAMP
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044**

Oliveira, Ricardo Reges Maia de

OL4e

Efeito da deficiência do óbito nítrico e da sildenafil na função do trato urinário: estudo experimental em ratos / Ricardo Reges Maia de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Carlos Arturo Levi D'Ancona, Edson Antunes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Trato urinário. 2. Óxido nítrico. 3. Urodinâmica. 4. Sildenafil. 5. Rato como animal de laboratório. I. D'Ancona, Carlos Arturo Levi.. II. Antunes, Edson. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Effect of nitric oxide deficiency and the action of sildenafil in lower urinary tract: an experimental study in rats

Keywords: • Urinary tract

- Urodynamic
- Sildenafil
- Rats

Titulação: Doutor em Cirurgia

Área de concentração: Cirurgia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona

Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Riccetto

Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva

Prof. Dr. Cristiano Gomes Mendes

Profa. Dra. Fabíola Zakia Taufic Mônica

Data da defesa: 19-08-2009

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Ricardo Reges Maia de Oliveira

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

Membros:

1. Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona -



2. Profa. Dra. Fabíola Zakia Taufic Monica -



3. Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Riccetto -



4. Prof. Dr. Lucio Flavio Gonzaga Silva -



5. Prof. Dr. Cristiano Mendes Gomes -



Curso de pós-graduação em Cirurgia, da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/08/2009

Dedico este trabalho...

***... À minha esposa Danielle e meus filhos
Rayanne e Rennan, que me deram força, me
apoiaram e incentivaram a chegar até aqui com
seu amor, paciência e compreensão.***

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D’Ancona, pelo incentivo e por me aceitar como seu orientando.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Rodrigues Palma, pelo incentivo em ingressar na pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela orientação e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Rodrigues Netto Júnior, pelo incentivo em ingressar na pós-graduação.

Aos meus pais por ter me proporcionado a oportunidade de chegar até esse momento.

Sumário

SUMÁRIO

<i>Símbolos, Siglas e Abreviaturas</i>	<i>vii</i>
<i>Resumo</i>	<i>ix</i>
<i>Abstract</i>	<i>xi</i>
<i>1.Introdução</i>	<i>13</i>
<i>2. Objetivos</i>	<i>20</i>
2.1 <i>Objetivos gerais</i>	20
<i>3. Materiais e Métodos</i>	<i>21</i>
3.1. Drogas:.....	21
3.2. Estudo urodinâmico:.....	22
3.3. Protocolo experimental	23
3.4. Análise estatística.....	24
<i>4. Resultados</i>	<i>26</i>
4.1. Análise comparativa entre Grupos 1 (controle) e 2 (L-NAME)	26
4.2. Análise comparativa entre Grupos 3 (sildenafil) e 4 (sildenafil/L-NAME).....	29
4.3. Análise comparativa múltipla entre os Grupos	33
<i>5.Discussão</i>	<i>37</i>
5.1. Discussão do método	37
5.2. Discussão dos resultados.....	40
<i>6. Conclusões</i>	<i>49</i>
<i>7. Referências Bibliográficas</i>	<i>50</i>

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
FCD	Frequência de Contrações do Detrusor
FM	Frequência de Micção
GMP	Guanosina Monofosfato
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
GTP	Guanosina Trifosfato
HBP	Hiperplasia Benigna da Próstata
HD	Hiperatividade do Detrusor
IP	Intraperitoneal
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
LP	Limiar de pPressão
LV	Limiar de Volume
NANC	Não-Adrenérgico Não-Colinérgico
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NO _x	Níveis de Nitrito/nitrato
OBP	Obstrução Benigna da Próstata
OI	Obstrução Infravesical
PB	Pressão Basal

PDE	Fosfodiesterase
PDE5	Fosfodiesterase Tipo 5
PP	Pressão de Pico
STUI	Sintomas do Trato Urinário Inferior

Resumo

Resumo

Introdução: Sintomas do trato urinário inferior (STUI) estão associados com a piora da Qualidade de Vida dos pacientes e geram custos substanciais para a sociedade. Nos últimos anos houve aumento no conhecimento da fisiopatologia e história natural do STUI e obstrução benigna da próstata (OBP). O óxido nítrico (NO) tem sido implicado como neurotransmissor em vários sítios do sistema nervoso de mamíferos, incluindo as sinapses periféricas do trato urogenital em homens. Estudos recentes avaliaram os efeitos dos inibidores da enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) em pacientes com STUI secundário à OBP e observou-se melhora dos sintomas. Como, atualmente, não se sabe o exato papel da sildenafil no tratamento da disfunção miccional associado à OBP foi sugerido em um desses estudos que novas bases fisiopatológicas seriam necessárias para avaliar o efeito do inibidor da fosfodiesterase no trato urinário inferior. **Objetivos:** Os objetivos deste estudo foram determinar os efeitos urodinâmicos da inibição da síntese de óxido nítrico pela N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), bem como a ação da sildenafil no trato urinário inferior de ratos com deficiência crônica de NO. **Materiais e Métodos:** No estudo foram utilizados 27 ratos da espécie Wistar que foram submetidos a estudo urodinâmico, sendo nove controles (Grupo 1), oito tratado com L-NAME (60mg/Kg/dia dissolvido em água) por 30 dias (Grupo 2), quatro tratados somente com sildenafil (100µg/Kg intravenoso) (Grupo 3) e seis

tratados com L-NAME por 30 dias seguidos de administração aguda de sildenafil intravenoso (100µg/Kg) (Grupo 4). **Resultados:** A administração crônica e sistêmica de L-NAME resultou em aumento significativo no número de contrações não associado à micção ($0,98 \pm 0,75$ versus $2,71 \pm 0,89$), limiar de volume ($1,26 \pm 0,38$ versus $2,8 \pm 1,64$) e frequência dos ciclos de micção ($1,2 \pm 0,65$ versus $1,79 \pm 0,78$), comparando Grupos 1 e 2, respectivamente. A administração intravenosa de sildenafil para os animais do Grupo 3 não alterou a frequência (pré-sildenafil $1,23 \pm 0,37$ versus pós-sildenafil $1,3 \pm 0,15$) e a amplitude dos ciclos de micção (pré-sildenafil $8,5 \pm 3,16$ versus pós-sildenafil $9,0 \pm 2,99$). Foi encontrada diferença significativa entre os Grupos 3 e 4 em relação a frequência dos ciclos de micção após administração da sildenafil ($1,3 \pm 0,15$ versus $0,35 \pm 0,25$). A amplitude, antes da administração da sildenafil foi maior no Grupo 4 ($8,50 \pm 3,16$ versus $27,0 \pm 8,73$; Grupos 3 e 4, respectivamente), porém tornou-se semelhante aos animais do Grupo 3 após a sildenafil ($9,0 \pm 2,99$ versus $7,5 \pm 6,6$; Grupos 3 e 4, respectivamente). **Conclusões:** A redução sistêmica de óxido nítrico promove contrações involuntárias do detrusor e ciclos de micção de menor intervalo. A administração da sildenafil, em animais com deficiência crônica de óxido nítrico, promove diminuição do número de ciclos de micção e da amplitude das contrações.

Abstract

Abstract

Introduction: The lower urinary tract symptoms (LUTS) are associated with a worsening in patients' Quality of Life and lead to substantial costs for society. There is a special interest in the development of effective treatment options, with low morbidity, for detrusor overactivity (DO) secondary to benign prostatic obstruction (BPO). Nitric oxide (NO) has been involved as a neurotransmitter in several sites of the nervous system of mammals, including peripheral synapses of the urogenital tract. Sildenafil has been used in the clinical treatment of men with LUTS associated with BPO, with improvement in symptoms. However, this is just one assumption as it has not been proven by experimental studies and the precise role of sildenafil in the treatment of voiding dysfunction associated with BPO is not known. **Objective:** The aims of this study were evaluate the urodynamic effects of nitric oxide inhibition synthesis by N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), as well the action of sildenafil in the lower urinary tract of rats with chronic deficiency of nitric oxide. **Materials and Methods:** Twenty-seven adult Wistar rats underwent anesthetized cystometrograms: nine controls (Group 1), eight treated with oral L-NAME (60mg/kg/day dissolved in drinking water) for 30 days (Group 2), four treated with sildenafil only (100µg/kg intravenously, IV) (Group 3) and six treated with oral L-NAME for 30 days followed by acute IV sildenafil (100µg/Kg) (Group 4).

Results: The chronic and systemic administration of L-NAME resulted in a significant increase in non voiding contractions ($0,98 \pm 0,75$ versus $2,71 \pm 0,89$), volume threshold ($1,26 \pm 0,38$ versus $2,8 \pm 1,64$) and frequency of micturition cycles ($1,2 \pm 0,65$ versus $1,79 \pm 0,78$), comparing Groups 1 e 2, respectively. The others parameters were not differences. The intravenous administration of sildenafil to Group 3 animals did not significantly alter the frequency (pre-sildenafil $1,23 \pm 0,37$ versus post-sildenafil $1,3 \pm 0,15$) or amplitude of micturition cycles (pre-sildenafil $8,5 \pm 3,16$ versus post-sildenafil $9,0 \pm 2,99$). A significant difference was found between the groups in relation to: void cycles after administration of sildenafil ($1,3 \pm 0,15$ versus $0,35 \pm 0,25$). The amplitude before administration was large in Group 4 ($8,50 \pm 3,16$ versus $27,0 \pm 8,73$; Groups 3 e 4, respectively), however become similar to that of the Group 3 animals after sildenafil ($9,0 \pm 2,99$ versus $7,5 \pm 6,6$; Groups 3 e 4, respectively). **Conclusion:** The systemic reduction of nitric oxide increase non voiding contractions and frequency of micturition cycles. The administration of sildenafil in animals with chronic deficiency of nitric oxide decreases the number of micturition cycles as well as the contractions amplitude.

Introdução

.

1.Introdução

A bexiga tem duas importantes funções: armazenamento e eliminação da urina. O armazenamento da urina ocorre com baixa pressão devido ao relaxamento e ausência de contração da bexiga nessa fase. Disfunção do detrusor nessa fase pode resultar em sintomas do trato urinário inferior (STUI) como urgência, frequência e incontinência.

Para o esvaziamento vesical, é necessária a coordenação entre contração da bexiga e relaxamento da uretra. Alteração na fase de esvaziamento resulta em sintomas como hesitação, jato urinário fraco, sensação de esvaziamento incompleto e gotejamento pós-miccional.

O trato urinário inferior é composto pela bexiga e uretra. Na uretra encontra-se tanto a musculatura estriada como lisa. A bexiga é dividida anatomicamente e funcionalmente em duas partes, corpo vesical e base, composta pelo trígono e junção uretrovesical¹, têm formato esférico e é classificada como uma víscera oca feita de músculo liso, coberta por uma membrana mucosa e envolvida externamente parcialmente, pelo peritônio e fáscia

muscular. O detrusor é estruturalmente diferente da musculatura lisa uretral e trigonal.

A função do trato urinário inferior é regulada por uma complexa interação de fibras aferentes e eferentes originadas no sistema nervoso autônomo e somático². A manutenção da continência por longos períodos bem como o esvaziamento coordenado da bexiga requer uma complexa interação entre as estruturas anatômicas que compõem o trato urinário inferior e o controle do sistema nervoso central.

Na maioria dos mamíferos, a contração vesical é feita por mecanismo colinérgico, bem como por mecanismo não-adrenérgico e não-colinérgico (NANC)^{3,4}. No detrusor de cobaias e coelhos, a acetilcolina produz despolarização, aumento da frequência dos potenciais de ação e contração do detrusor⁵. Estas contrações são intensificadas por inibidores das colinesterases e diminuídas por atropina, portanto mediado por receptores muscarínicos.

O músculo detrusor de várias espécies animais contém todos os subtipos de receptores muscarínicos, mas os receptores muscarínicos M_2 e M_3 são predominantes, com proporção de 3:1^{6,7}. Porém, mesmo com a predominância de receptores M_2 , são os receptores muscarínicos M_3 os responsáveis pela contração da bexiga^{8,9}. Na bexiga de humanos também foi demonstrada a presença de RNA-m para todos os subtipos de receptores (M_1 até M_5). Estes receptores são acoplados à proteína G, mas a sinalização varia com o tipo do receptor. M_1 , M_3 e M_5 ativam o

mecanismo de hidrólise de fosfoinositol, mobilizando cálcio intracelular, já os receptores M_2 e M_4 promovem inibição da atividade da adenilato ciclase¹⁰.

O papel do sistema nervoso simpático para o funcionamento da bexiga de humanos tem sido bastante discutido, particularmente devido à escassez da inervação adrenérgica no detrusor^{11,12}. Na maior parte dos animais é possível provocar contração do detrusor com drogas estimulando α -receptores do detrusor, preferencialmente as seletivas para os receptores α_1 ¹. Porém, sabe-se que a norepinefrina exerce efeito inibitório na função do detrusor através da inervação adrenérgica provocando inibição pré-juncional da ativação parassimpática, ocorrendo tanto no nível do gânglio intramural como nervo terminal^{13,14}.

O relaxamento da bexiga é mediado por receptores β -adrenérgicos, sendo ativados durante o enchimento da bexiga na fase de armazenamento vesical¹⁵. A distribuição dos subtipos de receptores β -adrenérgicos no detrusor varia de espécie para espécie e nos ratos o relaxamento é feito pelos subtipos β_2 e β_3 ¹⁶.

O óxido nítrico (NO) tem sido implicado como neurotransmissor em vários sítios do sistema nervoso de mamíferos, incluindo as sinapses periféricas do trato urogenital em homens^{17,18}. Estudos têm demonstrado a presença da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no urotélio e musculatura detrusora em diferentes espécies animais¹⁹.

Embora as alterações decorrentes da deficiência crônica de NO tenham sido bem documentadas nas doenças cardiovasculares²⁰, apenas recentemente, um estudo avaliou *in vitro* a interação dos receptores muscarínicos, receptores

adrenérgicos e a deficiência crônica de NO no trato urinário inferior de ratos²¹. O NO parece ser o principal responsável pelo efeito inibitório NANC do trato urinário inferior^{22,23,24}). Muito embora, o papel exato do NO no detrusor ainda não tenha sido definido, sabe-se que o NO atuando no detrusor deriva principalmente da enzima óxido nítrico sintase.

Ambas as enzimas, NO sintase constitutiva (NOS neuronal e NOS endotelial) e NO sintase induzível, podem ser demonstrada no trato urinário inferior de animais e humanos^{25,26}. A ativação da enzima óxido nítrico sintase converte o aminoácido L-argina em L-citrulina liberando uma molécula de óxido nítrico. O NO por sua vez, atuando como segundo mensageiro, ativa a enzima guanilato ciclase, fazendo a conversão da guanosina trifosfato (GTP) em GMPc resultando em relaxamento da musculatura lisa.

O GMPc é degradado pela enzima fosfodiesterase para sua forma inativa de guanosina monofosfato (GMP). A concentração de GMPc no músculo liso resulta do balanço entre a intensidade do estímulo do NO e da degradação do GMPc feito pela fosfodiesterase. Portanto, especula-se que, se o NO tem ação de relaxamento do detrusor, seria esperado que drogas as quais atuem aumentando a concentração intracelular de GMPc também promovam relaxamento de detrusor, como por exemplo os inibidores da fosfodiesterases.

Os sintomas do trato urinário inferior estão associados com a piora da Qualidade de Vida dos pacientes e geram custos substanciais para a sociedade^{27,28}. A prevalência e a severidade dos STUI aumentam com a idade²⁹. Portanto, com o

fenômeno do envelhecimento populacional essa condição tornou-se um problema de saúde pública.

Estudo multicêntrico verificou que 90% dos homens com idade entre 50-80 anos queixavam-se de algum STUI. Neste mesmo estudo verificou-se que os sintomas do esvaziamento foram os mais comuns, porém os sintomas do armazenamento tiveram maior impacto negativo na Qualidade de Vida. Embora os STUI sejam altamente prevalentes na mulher, a presença das doenças da próstata no homem aumenta a complexidade do tratamento²⁹.

Os STUI constituídos por urgência, frequência, incontinência urinária de urgência e noctúria são denominados clinicamente de bexiga hiperativa. Estes sintomas estão relacionados com hiperatividade do detrusor (HD) e são referidos como o principal responsável pelo impacto negativo na Qualidade de Vida destes pacientes^{30,31}.

Os mecanismos relacionados com a gênese da HD passam fundamentalmente por alterações na integração do sistema nervoso central, sistema nervoso autônomo e da ultra-estrutura das relações intercelulares da musculatura detrusora.

A origem da HD pode ser multifatorial e em muitas ocasiões pode ser difícil distinguir se há predominância do componente neurogênico (alterações nos mecanismos de aferência/eferência da inervação detrusora) ou miogênico (alterações intrínsecas dos mecanismos de contractilidade). Por outro lado, em

90% dos casos a causa permanece obscura sendo, portanto, denominada HD idiopática.

A hiperatividade do detrusor pode ser consequência de um processo obstrutivo, geralmente infravesical como a OBP, estenose da uretra ou colo vesical. Importante ressaltar que o padrão obstrutivo (não relacionado às complicações de correções cirúrgicas para incontinência urinária de esforço) pode estar presente no sexo feminino. HD está presente em 50% a 75% dos homens com OBP³². Nesses casos a hiperatividade do detrusor pode ser secundária a OBP assim como primariamente devido à disfunção do detrusor³³.

Hiperativa do detrusor de origem neurológica é consequência de enfermidades do sistema nervoso em que estão afetados as vias e centros que interferem na coordenação miccional. Entre as doenças mais prevalentes estão a esclerose múltipla, doenças cerebrovasculares, Parkinson, mielomeningocele e lesões medulares. As lesões que comprometem a medula espinhal (mielomeningocele, esclerose múltipla, traumas ou infartos medulares) promovem um quadro clínico de disfunção ou síndrome do neurônio motor superior e apresentam significativa morbidade com impacto negativo na Qualidade de Vida do paciente. Ocorre perda do controle supraespinal produzindo contrações involuntárias do detrusor, podendo estar associadas à incontinência. Adicionalmente, em muitos casos pode haver dissinergia detrusor-esfincteriana que leva ao aumento das pressões intravesicais durante a micção, com danos da arquitetura vesical, refluxo vesicuretral e subsequentemente a insuficiência renal.

Nos últimos anos têm havido um aumento no conhecimento da fisiopatologia e história natural do STUI e obstrução benigna da próstata (OBP)³⁴. Recentemente observou-se que os STUI podem não estar relacionados exclusivamente às doenças da próstata^{35,36}. Estudos demonstraram que somente 25%-50% dos homens com diagnóstico histológico de hiperplasia benigna da próstata (HBP) têm STUI e esses sintomas podem ser devidos a problemas extraprostáticos como disfunção do detrusor^{37,38}. Em resumo, STUI podem resultar de uma complexa inter-relação fisiopatológica, incluindo as doenças da próstata e as alterações do detrusor. Como não existe tratamento padrão definido para pacientes com a combinação de obstrução e HD, devido ao risco de urgência-incontinência após ressecção transuretral da próstata³⁹, há interesse especial no desenvolvimento de opções efetivas de tratamento, com baixa morbidade, para pacientes com HD secundário OBP³².

Estudos que avaliaram os efeitos dos inibidores da enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) em pacientes com STUI demonstraram melhora dos sintomas^{40,41,42}. Em um destes estudos, foi observado que embora exista melhora dos sintomas, não há alteração do fluxo máximo. Como atualmente, não se sabe o exato papel da sildenafil no tratamento da disfunção miccional associado à OBP sugere-se, nesse estudo, que novas bases fisiopatológicas são necessárias para avaliar o efeito do inibidor da fosfodiesterase no trato urinário inferior⁴³.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos deste estudo foram determinar os efeitos urodinâmicos da inibição da síntese de óxido nítrico pela N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), bem como a ação da sildenafil no trato urinário inferior de ratos com deficiência crônica de NO.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

No estudo foram utilizados 27 ratos machos adultos da espécie Wistar com peso variando de 270g a 340g. Os ratos foram separados em quatro grupos, sendo nove no grupo não tratado (Grupo 1), oito ratos tratados por 30 dias com n-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Grupo 2), quatro ratos tratados com administração sistêmica aguda de sildenafil (Grupo 3) e seis ratos tratados com L-NAME por 30 dias e submetidos à administração sistêmica aguda de sildenafil. Todos os animais foram avaliados com estudo urodinâmico sob anestesia.

O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética animal da Universidade Estadual de Campinas

3.1. Drogas:

O L-NAME foi administrado na dose de 60mg/kg/dia durante 30 dias, diluído na água dos animais.

A sildenafil (100µg/kg) foi administrada por via intravenosa diluída em cremofor, propilenoglicol e água.

3.2. Estudo urodinâmico:

Os animais eram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal (IP) de uretana (1,2g/kg).

Incisão mediana infraumbilical era realizada para exposição da bexiga. Um cateter tipo *Butterfly* com agulha metálica de 18G foi inserido na cúpula vesical, logo após esvaziava-se a bexiga, por aspiração da urina. Antes de iniciar o estudo, aguardava-se 30 minutos para equilíbrio do detrusor.

O cateter intravesical era conectado, via torneira com três vias, ao transdutor de pressão e à bomba de infusão contínua para seringas (Figs. 1 e 2). O transdutor de pressão, por sua vez, ficava conectado ao amplificador do sinal, que era registrado por um software (Power Lab v.5.0 System, ADInstruments – Colorado Springs, CO, EUA). Após o período de equilíbrio, iniciava-se a infusão contínua (4ml/h) de solução salina com a bomba de infusão contínua. Durante o experimento, os animais ficavam sob calor de uma lâmpada incandescente de 60 watts com o objetivo de manter o animal aquecido durante o experimento.

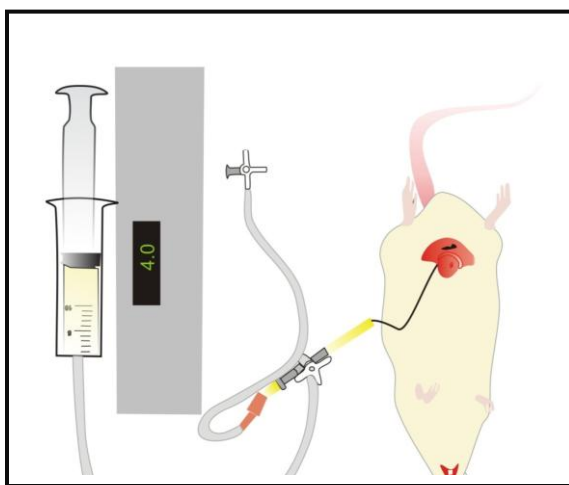


Figura 1. Representação esquemática da disposição do animal e bomba de infusão usada para realização do estudo urodinâmico.

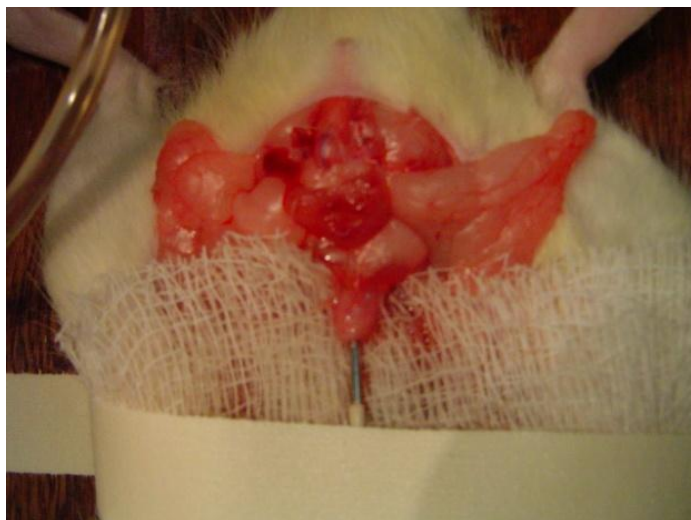


Figura 2. Detalhe da punção da bexiga com o butterfly.

3.3. Protocolo experimental

Para avaliar o comportamento do trato urinário inferior do rato com deficiência de óxido nítrico, foi comparado o Grupo 1 com o Grupo 2 em relação às seguintes variáveis urodinâmicas, na fase de enchimento: frequência de contrações do detrusor por minuto (FCD), limiar de volume (LV) - volume infundido imediatamente antes da primeira micção, limiar de pressão (LP) – pressão imediatamente antes de iniciar o fluxo da primeira micção (pressão de abertura); e na fase miccional: pressão de pico (PP) – nível de pressão mais alto alcançado na primeira micção, frequência dos ciclos de micção por minuto (FM) e pressão basal (PB). Foi considerada contração do detrusor, na fase de enchimento, contrações com amplitude maior que 4mmHg. O LV foi calculado considerando o tempo necessário para primeira micção em minutos $\times 4(\text{ml})/60$ (minutos).

Para avaliar a ação da sildenafil no trato urinário inferior de ratos, foram avaliados os Grupos 3 e 4. O estudo urodinâmico foi feito como descrito anteriormente. Durante a fase de micção, após os ciclos tornarem-se regular, administrava-se o sildenafil intravenoso na jugular direita. Simultaneamente, foi introduzido um cateter na artéria carótida direita, para monitorização hemodinâmica da pressão arterial média. O cateter era conectado ao transdutor de pressão, sendo registrada a pressão arterial simultaneamente ao estudo urodinâmico. Portanto, também foram analisadas as pressões arteriais médias.

As variáveis urodinâmicas avaliadas foram: frequência dos ciclos de micção por minuto (FM) e a amplitude da contração das contrações durante a micção.

3.4. Análise estatística

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo, foram calculadas as estatísticas descritivas com medidas de posição e dispersão (desvio padrão e mediana) e das variáveis contínuas (peso, variáveis urodinâmicas e pressão arterial). Para comparar as variáveis numéricas medidas num único tempo entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney, devido à ausência de distribuição normal das variáveis. Para analisar a evolução dos parâmetros entre os tempos pré e pós-administração do tratamento num único grupo foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas (*Signed Rank test*).

Para comparação simultânea dos parâmetros entre os grupos e entre os tempos pré e pós, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) para medidas

repetidas, seguida pelo teste post-hoc de Tukey para comparar os grupos em cada momento, e o teste de perfil por contrastes (*Profile test*) para analisar a evolução entre os tempos, em cada grupo. As variáveis foram transformadas em postos (*ranks*) devido à ausência de distribuição Normal.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4. Resultados

4.1. Análise comparativa entre Grupos 1 (controle) e 2 (L-NAME)

Os Grupos 1 e 2 foram uniformes em relação ao peso. Comparando-se estes grupos após a administração crônica e sistêmica do L-NAME, foi observado, macroscopicamente que os animais do Grupo 2 apresentavam grandes bexigas, quando comparado com o Grupo 1 (Figs. 3 e 4).

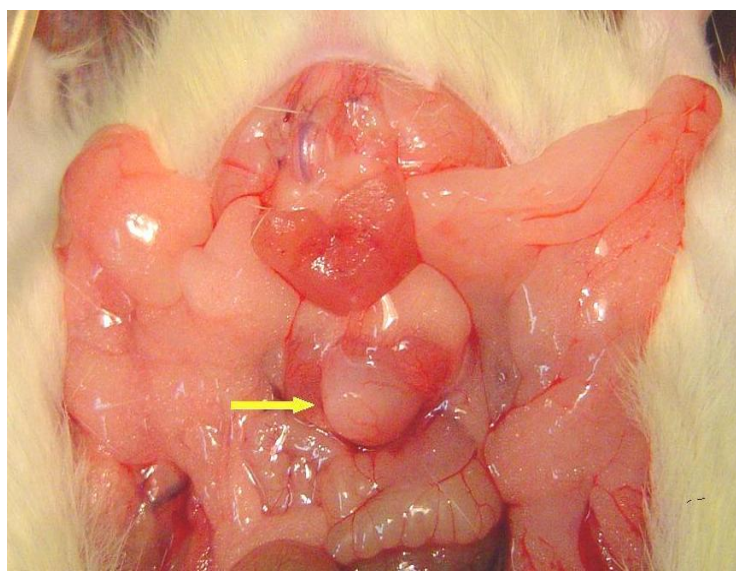


Figura 3. Aspecto da bexiga de animal do Grupo 1.



Figura 4. Bexiga de animal do Grupo 2, em evidência a distensão vesical.

Comparando-se o Grupo 1 e 2, verificou-se aumento significativo da frequência de contração do detrusor, no limiar de volume e na frequência de micção no Grupo 2 (Figs. 5 e 6). Não houve diferença significativa ao se comparar a variável limiar de pressão, pressão de pico e pressão basal (Tabela 1).

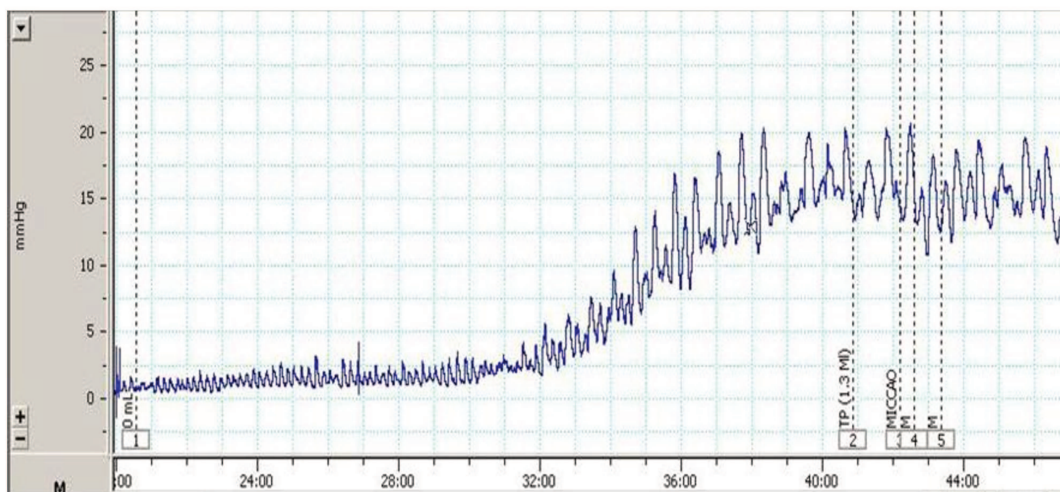


Figura 5. Estudo urodinâmico obtido de um animal do Grupo 1.

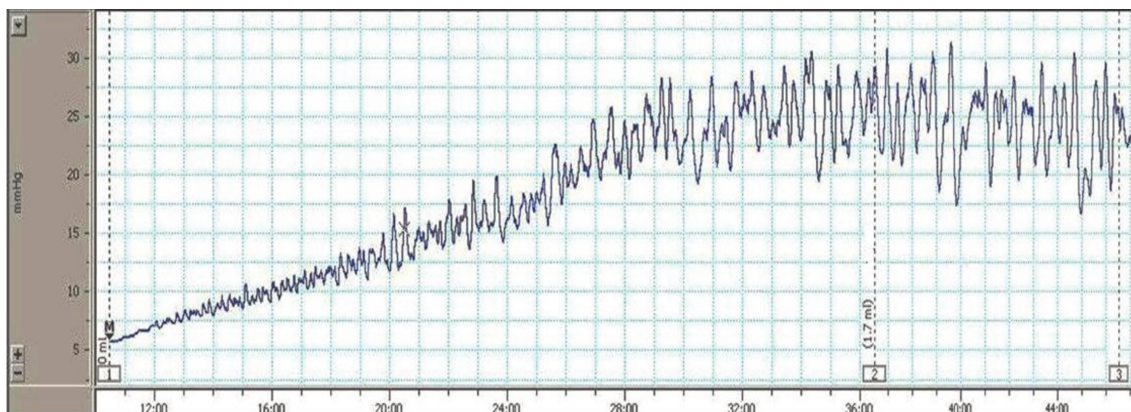


Figura 6. Urodinâmica de um animal do Grupo 2; presença de grande número de contrações do detrusor, limiar de volume de 1,7ml e maior frequência de ciclos de micção.

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

Grupo 1				Grupo 2				
Variável	N	Mediana	DP	Variável	N	Mediana	DP	P
FCD (N/min)	9	0,98	0,75	FCD (N/min)	8	2,71	0,89	0,004
LV (mmHg)	9	1,26	0,38	LV (mmHg)	8	2,80	1,64	0,012
LP (mmHg)	9	17,60	3,02	LP (mmHg)	8	19,20	2,90	0,860
PP (mmHg)	9	20,80	3,06	PP (mmHg)	8	20,55	2,93	0,555
FM (N/min)	9	1,20	0,65	FM (N/min)	8	1,79	0,78	0,05
PB (mmHg)	9	12,30	6,77	PB (mmHg)	8	15,05	3,35	0,906
Peso (g)	9	332,00	7,75	Peso (g)	8	335,00	7,95	0,335

p- valores referentes ao teste de Mann-Whitney para comparação entre os Grupos 1 e 2.

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. As variáveis de pressão são expressas em mmHg, os períodos são calculados em frequência/min e de peso em gramas.

4.2. Análise comparativa entre Grupos 3 (sildenafil) e 4 (sildenafil/L-NAME)

Os animais dos Grupos 3 e 4 foram semelhantes quanto ao peso. A administração venosa da sildenafil nos animais do Grupo 3 não alterou significativamente a frequência ou a amplitude dos ciclos de micção (Fig. 7). Pelos resultados descritivos das variáveis para caracterização dos grupos, e a comparação dos parâmetros entre os animais do Grupo 3 e os animais do 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 do Grupo 4 com L-NAME foi semelhante ao dos animais do Grupo 3 (Tabela 2).

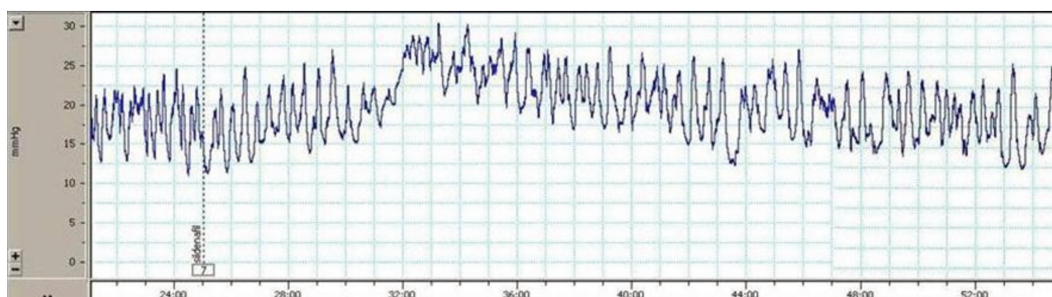


Figura 7. Estudo urodinâmico de animal do Grupo 3, onde observa-se que a amplitude e frequência dos ciclos miccionais não se alteraram após administração da sildenafil.

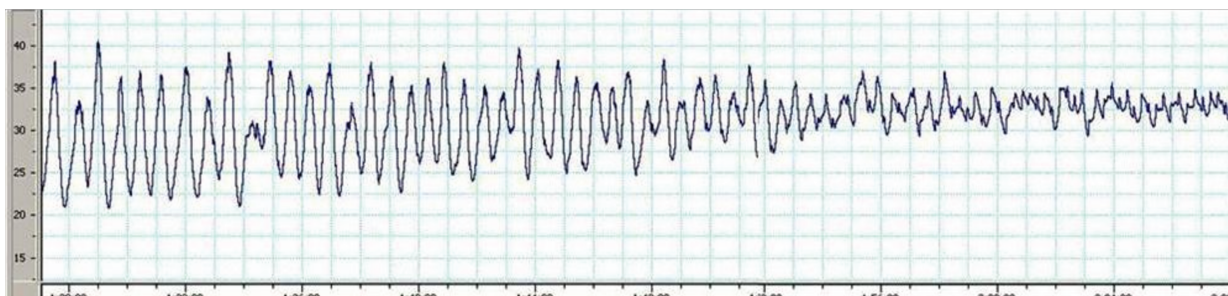


Figura 8. Estudo urodinâmico de animal do Grupo 4, onde observa-se diminuição da amplitude da contração do detrusor durante os ciclos de micção após administração do sildenafil.

Tabela 2. Análise descritiva e comparativa das variáveis contínuas entre grupos 3 e 4

Grupo 3				Grupo 4				
Variável	N	Mediana	DP	Variável	N	Mediana	DP	P
Peso (g)	4	328,50	5,91	Peso (g)	6	320,00	24,03	0,330
FM1 (N/min)	4	1,23	0,37	FM1 (N/min)	6	1,37	0,37	0,05
Amplitude1 (mmHg)	4	8,50	3,16	Amplitude1 (mmHg)	6	27,00	8,73	0,025
FM2 (N/min)	4	1,30	0,15	FM2 (N/min)	6	0,35	0,25	0,010
Amplitude2 (mmHg)	4	9,00	2,99	Amplitude2 (mmHg)	6	7,50	6,60	0,668

* p- valores referentes ao teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos 3 e 4. DP – Desvio padrão.

FM1 – Frequência de micção previamente à administração de sildenafil; FM2 - Frequência de micção após administração de sildenafil; Amplitude1 – Amplitude de pressão dos ciclos de micção previamente à administração de sildenafil; Amplitude2 - Amplitude de pressão dos ciclos de micção após administração de sildenafil.

As estatísticas descritivas e comparativas das diferenças (ou deltas) dos parâmetros entre os tempos pré-sildenafil¹ e pós-sildenafil², para os Grupos 3 e 4, demonstra diminuição significativa entre os tempos para FM e Amplitude no Grupo 4 (redução entre tempos pré e pós-administração de sildenafil) (Fig. 8). Porém, não há alteração significativa da pressão arterial (Tabela 3).

Tabela 3. Análise descritiva e evolutiva das variáveis contínuas entre tempos pré e pós-administração de sildenafil entre os Grupos 3 e 4

Grupo 3					Grupo 4				
Variável	N	Mediana	DP	P	Variável	N	Mediana	DP	P
DIF FM (mmHg)	4	0,13	0,25	0,875	DIF FM (mmHg)	6	-0,93	0,34	0,031
DIF AMPLIT (mmHg)	4	-0,50	1,71	0,999	DIF AMPLIT (mmHg)	6	-17,50	11,72	0,031
					DIF PA	6	-18,60	23,74	0,318

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

DP – Desvio Padrão

DIF FM – Diferença (Delta) entre frequência de micção; DIF AMPLIT – Diferença (Delta) amplitude entre amplitude dos ciclos de micção; DIF PA – Diferença (Delta) entre a pressão arterial

Pelos resultados das análises de variância para medidas repetidas (*repeated measures - ANOVA*) para comparação simultânea dos parâmetros entre os Grupos 3 e 4 e entre os dois tempos (pré e pós-Sildenafil), verifica-se diferença significativa entre grupos para FM e amplitude (menores valores no Grupo 4 no tempo pós administração de Sildenafil), (Tabela 4) e (Figs. 9 e 10). O tempo médio para resposta a sildenafil foi de 21,58 ($\pm 13,18$).

Tabela 4 - Resultados da ANOVA para medidas repetidas na comparação entre os Grupos 3 e 4 e entre tempos pré e pós-administração de sildenafil

Variáveis*	Comparação entre Grupos (3 vs 4)	Comparação entre Avaliações (Pré e Pós sildenafil)	Interação Grupos vs Tempos
FM	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): Grupo 3≠Grupo 4 no Pós; diferenças significativas entre tempos (Perfil): Pré≠Pós para Grupo 4.
 (b) efeito significativo da interação grupo vs tempo: diferenças significativas entre grupos (Tukey): Grupo 3≠Grupo 4 no Pré; diferenças significativas entre tempos (Perfil): Pré≠Pós para Grupo 4.

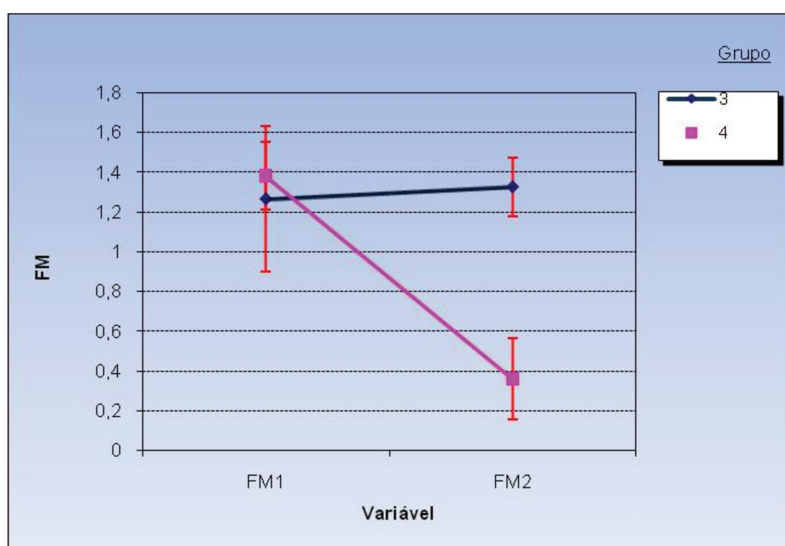


Figura 9. Diminuição da frequência de micção (FM) no Grupo 4, após a administração de sildenafil.

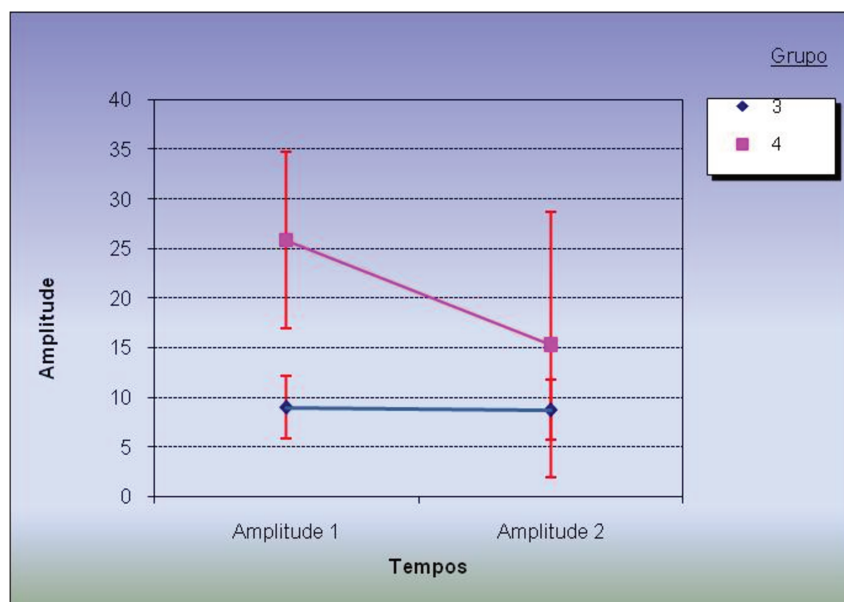


Figura 10. Retorno da amplitude das contrações no Grupo 4 para valores semelhantes ao Grupo 3.

4.3. Análise comparativa múltipla entre os Grupos

Os resultados das análises de variância múltiplas para medidas repetidas (*repeated measures - ANOVA*) para comparação simultânea dos parâmetros entre os quatro grupos demonstraram haver diferença significativa para frequência de contração do detrusor, limiar de volume e frequência de micção (Tabela 5). Comparando-se os grupos em relação à frequência de contração do detrusor, verificou-se que o Grupo 1 era semelhante ao Grupo 3 e o Grupo 2 semelhante ao Grupo 4 (Fig.11). Em relação ao limiar de volume, o Grupo 1 foi semelhante ao Grupo 3 e o Grupo 2 semelhante ao Grupo 4 (Fig. 12) e ao analisar a frequência de micção, o Grupo 1 foi semelhante ao Grupo 3 e o Grupo 2 semelhante ao Grupo 4 (Fig. 13).

Tabela 5. Análise descritiva e comparativa das variáveis entre os quatro grupos de estudo

Grupo	Variável	N	Média	DP	Mín.	Mediana	Max	P
1	FCD	9	1,17	0,75	0,50	0,98	3,04	< 0,001
	LV	9	1,16	0,38	0,53	1,13	1,80	0,011
	LP	9	19,14	3,02	16,20	17,60	25,20	0,06
	PP	9	21,14	3,06	16,20	20,80	26,50	0,497
	FM	9	1,08	0,65	0,17	1,20	1,84	0,05
	PB	9	11,69	6,77	2,70	12,30	20,30	0,21
2	FCD	6	2,62	0,89	1,13	2,71	3,60	
	LV	6	2,83	1,64	0,80	2,80	6,00	
	LP	6	19,13	2,90	15,20	19,20	22,40	
	PP	6	20,05	2,93	16,20	20,55	23,40	
	FM	6	1,97	0,78	1,15	1,79	3,45	
	PB	6	13,73	3,35	7,00	15,05	15,70	
3	FCD	4	0,82	0,30	0,40	0,90	1,07	
	LV	4	1,03	0,54	0,63	0,85	1,80	
	LP	4	21,63	4,50	18,00	20,25	28,00	
	PP	4	23,15	4,77	19,10	21,75	30,00	
	FM	4	1,27	0,37	0,92	1,23	1,69	
	PB	4	16,50	3,11	13,00	16,50	20,00	
4	FCD	6	1,56	0,74	1,09	1,44	2,34	
	LV	6	1,09	0,78	0,90	2,20	2,90	
	LP	6	28,16	11,39	15,00	26,00	45,00	
	PP	6	30,33	11,12	16,00	29,00	46,00	
	FM	6	1,38	0,17	1,18	1,39	1,57	
	PB	6	21,00	14,08	4,00	17,50	42,00	

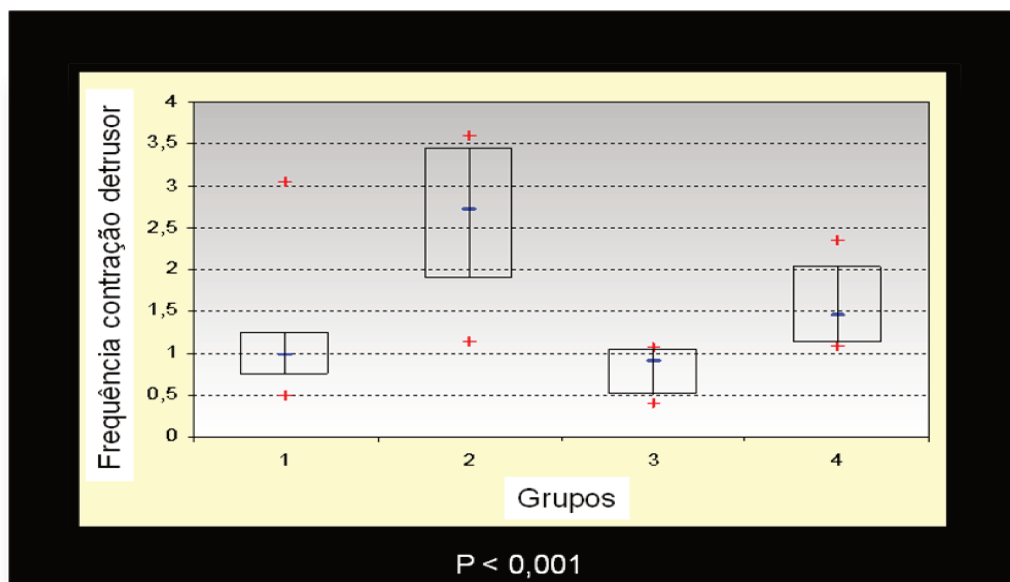


Figura 11. Análise de variância entre grupos comparando-se a frequência de contração do detrusor.

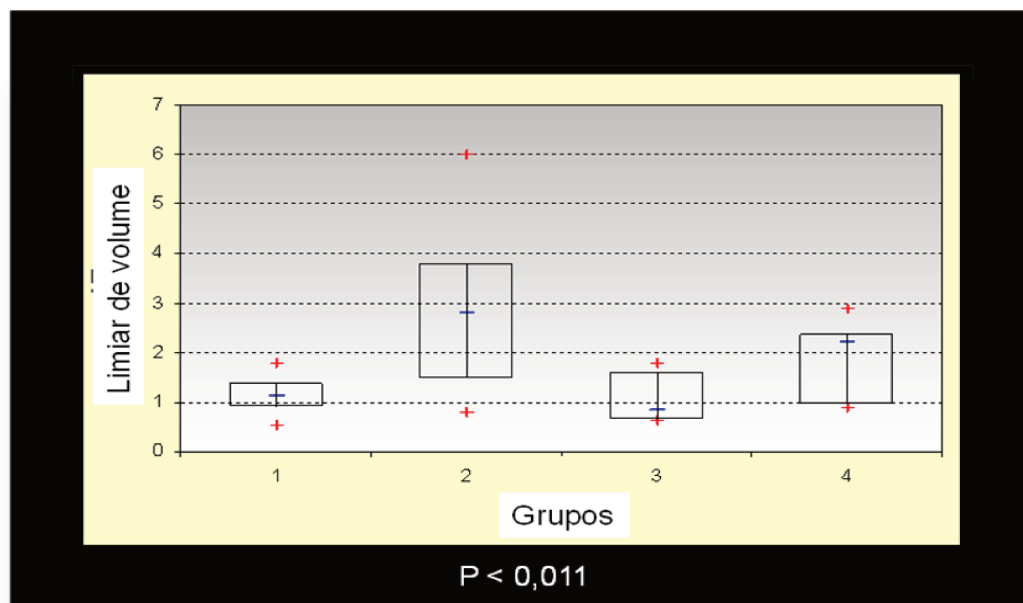


Figura 12. Análise de variância entre grupos comparando-se o limiar de volume.

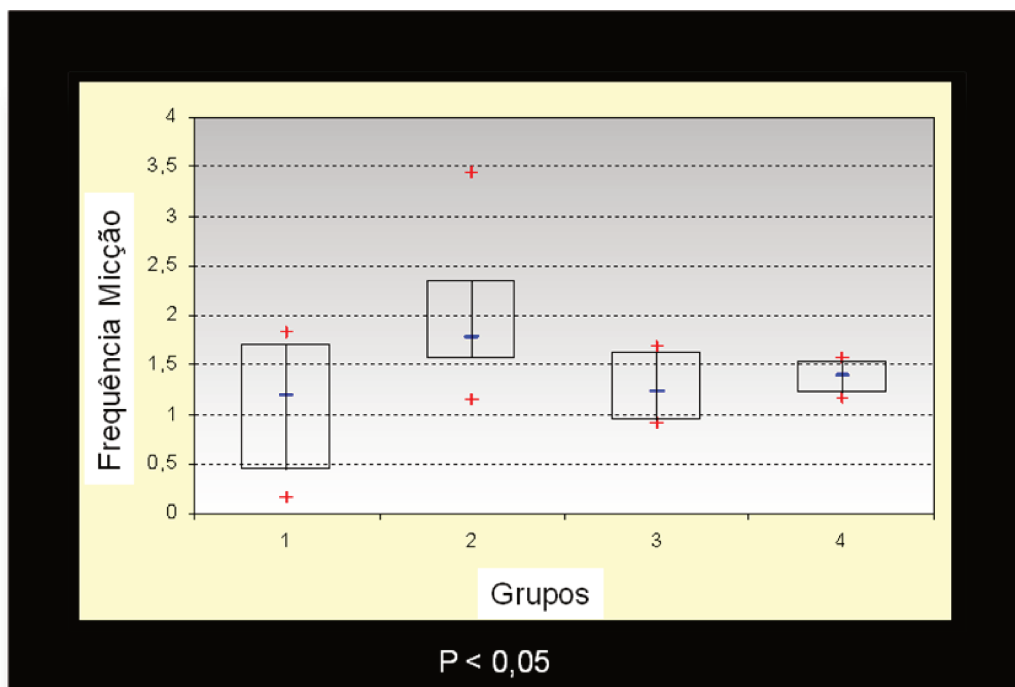


Figura 13. *Análise de variância entre grupos comparando-se a frequência de micção.*

Discussão

5. Discussão

5.1. Discussão do método

O L-NAME por ser um potente inibidor da enzima NOS, a qual é responsável pela síntese de óxido nítrico, pela conversão de L-arginina em citrulina, é uma ferramenta farmacológica utilizada para avaliar a função do NO em diferentes sistemas do organismo. A dose administrada de L-NAME teve como base a observação feita em estudos experimentais, nos quais os animais ingeriam L-NAME dissolvido em água em altas doses, variando de 60-250mg/kg/dia, ou moderada, variando de 40-50mg/kg/dia, por um período de tempo variando de uma a oito semanas. A partir desses estudos, verificou-se que a dose de 60mg/kg/dia de L-NAME diminuiu acentuadamente os níveis de nitrito/nitrato (NOx) no plasma dos animais⁴⁴ e inibiu a enzima NOS no cérebro, íleo e bexiga^{21,45,46}.

Na bexiga foi demonstrada inibição superior a 80% da NOS, significando, portanto, que a inibição da atividade da NOS e conseqüentemente da síntese de NO é quase completa²¹. A função do L-NAME foi permitir avaliar o comportamento in vivo do trato urinário inferior do rato com deficiência do NO.

A dose de sildenafil (100µg/kg), padronizada no presente trabalho, foi definida após obtenção de curvas dose-resposta, no Departamento de Farmacologia da UNICAMP, com doses variando de 100-1000µg/Kg e verificado que doses superiores a 100µg/Kg não poderiam ser usadas por haver acentuada redução na pressão arterial média. Como o L-NAME inibe quase completamente a síntese de óxido nítrico, a ação da sildenafil poderá refletir a inibição da degradação da guanosina monofosfato cíclico (GMPc), permitindo avaliar o seu efeito no trato urinário inferior de ratos com deficiência crônica de NO.

Todos os animais examinados neste estudo foram submetidos a estudo urodinâmico. Para isso, os animais foram anestesiados com uretana que era aplicado na cavidade peritoneal. Em seguida, aguardava-se que o animal ficasse completamente anestesiado (ausência de reflexo corneano e estímulo doloroso).

Inicialmente, houve dúvida sobre a metodologia a ser seguida na realização do estudo urodinâmico, em decorrência da existência de dois métodos descritos na literatura. Um deles realiza o estudo urodinâmico através de cateterismo uretral e outro por punção direta da bexiga.

Decidiu-se por punção da bexiga, em virtude de ter sido utilizado ratos machos, devido ausência de influência do ciclo hormonal presente em ratos fêmeas. Outro fator considerado foi que nos animais machos a sondagem uretral exige cateteres especiais.

Deste modo após a anestesia, foi feita incisão abdominal com exposição da bexiga. Uma vez puncionada, a agulha não podia ser removida ou reposicionada,

visto que ocorria vazamento do líquido infundido e prejuízo irreparável na obtenção dos dados urodinâmicos.

Para evitar perda de animais, inicialmente foi feito estudo urodinâmico em dez ratos como curva de aprendizado e padronização da técnica utilizada. Essa experiência inicial permitiu se trabalhar com o *software* utilizado para aquisição e registro dos dados, bem como calibrar os polígrafos, verificar o funcionamento da bomba de infusão contínua e se esse equipamento resultaria em artefatos por eventuais movimentos peristálticos. Observou-se ainda, a comparação entre as variáveis urodinâmicas obtidas com resultados descritos na literatura. Como a velocidade de infusão utilizada para realizar o estudo urodinâmico em ratos na literatura varia de 3,6ml/hora a 10ml/hora, adotou-se a velocidade de 4ml/hora por ser a mais frequentemente descrita em estudos.

Para comparação dos animais dos Grupos 3 e 4, foi realizado estudo urodinâmico com metodologia idêntica à utilizada para os Grupos 1 e 2. Na fase de micção, confirmado a regularidade dos ciclos, administrava-se sildenafila na veia jugular do animal.

Nesta fase da pesquisa, a dissecação e cateterização dos vasos tinham que ser cuidadosas, pois a punção errada da jugular impossibilitava a administração da sildenafila e durante a cateterização da carótida o cateter poderia dissecar as camadas do vaso resultando em não funcionamento do mesmo ou até perda do animal por sangramento. Para minimizar os problemas relacionados à dissecação, punção e cateterização dos vasos foi usada magnificação ótica com aumento de

três vezes. A cateterização da carótida foi feita para monitoramento da pressão arterial após a infusão da sildenafil.

A metodologia empregada e as variáveis urodinâmicas analisadas neste estudo foram baseadas em outros estudos publicados^{17,47}.

5.2. Discussão dos resultados

Em revisão da literatura no PubMed e Google Scholar não foram encontrados trabalhos *in vivo* avaliando o trato urinário inferior de animais submetidos a deficiência crônica de NO. Portanto, compararam-se os resultados obtidos com um estudo *in vitro* que avaliou o trato urinário inferior de ratos submetidos à deficiência crônica de NO²¹.

Nesse estudo demonstrou-se haver aumento da resposta contrátil do detrusor quando exposto a agonistas muscarínicos, aumento da sensibilidade dos receptores muscarínicos e redução do relaxamento do detrusor normalmente observada com β 3-adrenérgicos. Portanto, estes achados sugerem que a deficiência prolongada de óxido nítrico possa resultar em hiperatividade do detrusor.

Devido a essas observações foi feito este estudo experimental *in vivo* com estudo urodinâmico para avaliar comportamento do trato urinário inferior de ratos submetidos à deficiência crônica de óxido nítrico e observou-se que, corroborando com o estudo citado anteriormente, comparando os animais do Grupo 1 com os animais do Grupo 2, estes últimos tiveram maior número de contrações do

detrusor na fase de enchimento vesical, limiar de volume e aumento no número dos ciclos de micção.

Como o limiar de volume também foi maior, significa que esses animais necessitam de maior volume para iniciar a micção. Isto sugere redução da capacidade de esvaziamento vesical pela falta de relaxamento uretral, pois os ratos do Grupo 2 urinam com pressão detrusora adequada.

Visto que não foi avaliado a pressão uretral e o volume urinado, não se pode comprovar com certeza a hipótese da dificuldade de relaxamento uretral. Porém, mesmo que essas variáveis tivessem sido avaliadas, a falta de nomograma padronizado, a exemplo de nomograma de Griffiths para definir obstrução infravesical (OI) em homens, limitaria a utilidade dos dados.

No entanto, a dificuldade de esvaziamento vesical e a hipótese da falta de relaxamento uretral são reforçadas por estudos farmacológicos *in vitro*, os quais demonstram que o NO proporciona relaxamento da musculatura lisa uretral^{1,48}.

Esses resultados sugerem que o NO tem efeito inibidor tanto na bexiga como na uretra. Portanto, a resposta da bexiga durante a fase de enchimento, relaxamento do detrusor e acúmulo de grandes volumes de urina com baixa pressão, deve-se não somente às propriedades físicas da bexiga, mas também à inibição neural por inibição da atividade parassimpática, estimulação simpática e pela geração de NO vesical.

Como a maior parte do conhecimento da fisiologia do trato urinário inferior foi obtida em modelos experimentais em animais, é importante o desenvolvimento de novas técnicas experimentais que reproduza o mais próximo possível a fisiologia normal.

Visto que, até o presente momento o modelo experimental utilizado para provocar OI e HD em ratos, quer seja para observar o comportamento da bexiga ou avaliar a ação de fármacos nessa condição, envolve a ligadura da uretra, este modelo pode ser uma alternativa mais fisiológica de desenvolver HD e OI do que a ligadura uretral. Para ilustrar essa afirmação, pode-se usar como exemplo a cistometria de um trabalho, onde se avaliou ratos submetidos à obstrução infravesical por ligadura uretral (Fig. 14)⁴⁹, em que se verifica semelhança com os resultados obtidos em ratos do Grupo 2 (Fig. 6).

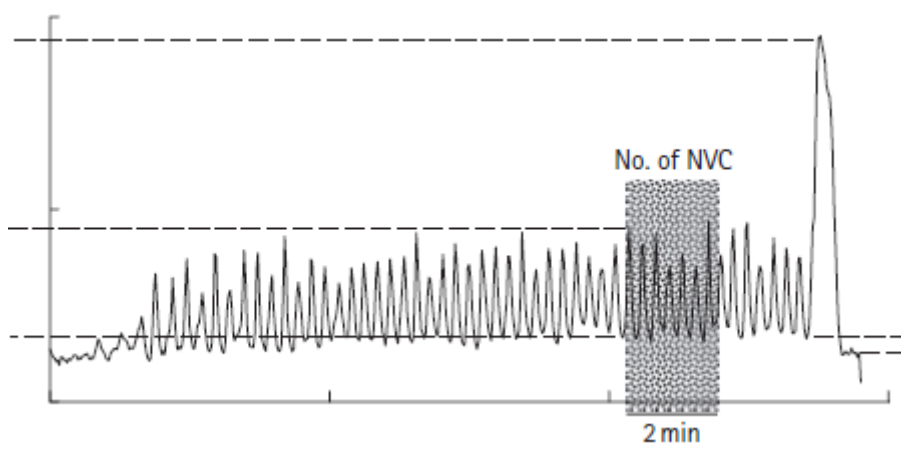


Figura 14. Estudo urodinâmico obtido em rato com ligadura uretral onde se observa alta frequência de contração do detrusor não associada à micção.

Como pode ser observado, ratos com OI causada por oclusão parcial da uretra, desenvolvem frequência aumentada de contrações do detrusor não

associadas à micção observadas na fase de enchimento do estudo urodinâmico. Na literatura, existem referências de que essas contrações são equivalentes às contrações involuntárias observadas em pacientes com HD^{16,46}. A HD com diminuição do relaxamento funcional da uretra constitui situação semelhante à observada em pacientes com OBP e HD (Figs. 3 e 4).

A 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^{50,51}.

Como descrito anteriormente, NO tem ação de relaxamento da musculatura lisa do trato urinário inferior, portanto, tem sido suposto que medicamentos que aumentem a disponibilidade ou potencializem o efeito do NO-GMPc possam ser usados para o tratamento dos STUI. A disfunção erétil é um problema muito prevalente em homens idosos e muitas vezes estão associadas à disfunção miccional⁵².

Estudos recentes avaliaram os efeitos dos inibidores da PDE5 em pacientes com STUI secundário a OI e verificam melhora dos sintomas^{53,54,55}. Em um destes estudos foi avaliado o efeito da sildenafil em pacientes com STUI e disfunção erétil, demonstrando que há melhora dos sintomas, mas não altera o fluxo urinário e sugeriu que novas bases fisiopatológicas fossem investigadas para explicar a etiologia dos STUI e o potencial dos inibidores da PDE5 para tratamento desses casos⁴³.

Atualmente, 11 isoenzimas do grupo das fosfodiesterases (PDE) foram identificados⁵⁶. A PDE5 é a mais prevalente no corpo cavernoso, plaquetas,

musculatura vascular e visceral. As outras isoenzimas são distribuídas em outros tecidos do corpo e são atribuídas aos efeitos colaterais dos inibidores da PDE⁵⁷.

A demonstração de que NO atua não apenas na fisiologia da ereção, como também na resposta contrátil da próstata de cães e humanos, foi realizada por estimulação elétrica em faixas de próstata e, verificado que o nitroprussiato de sódio, um conhecido fármaco doador de NO, provoca relaxamento da mesma^{58,59}. A próstata humana contém uma proteína de aproximadamente 56KDa nomeada PDE11A, a qual é capaz de hidrolisar GMPc em adenosina monofosfato cíclico (AMPc)⁶⁰. Dado as semelhanças entre o relaxamento da musculatura lisa da próstata e o processo envolvido na ereção, supõe-se que a inibição da PDE poderia resultar em relaxamento muscular e, de maneira análoga aos bloqueadores dos receptores alfa-adrenérgicos, causariam melhora dos STUI associados ao OBP. Porém, a correlação entre HD e OBP indica que a origem dos STUI é multifatorial.

Recentemente, tem se focado a atenção na bexiga como responsável pelos STUI associados à OBP, surgindo formas de tratamento com medicamentos isolados ou em combinação³³.

Um estudo experimental demonstrou que a ativação da enzima adenilato ciclase através de agonistas β -adrenérgicos nas células epiteliais provoca aumento do cálcio intracelular, resultando na liberação de NO⁶¹. Portanto, acredita-se que a inibição da enzima PDE5 com consequente potencialização do

efeito do NO seja responsável pelo relaxamento da musculatura lisa do trato urinário inferior, incluindo detrusor, uretra e próstata.

A bexiga de ratos e humanos apresenta tanto o gene como a proteína PDE5, havendo ainda maior expressão da enzima na bexiga que em outros locais do trato urogenital, superando até mesmo os corpos cavernosos^{62,63,64}. Esses mesmos autores demonstraram, também, que a PDE além de estar presente é biologicamente ativa em bexigas de ratos e humanos. Portanto, neste estudo foi avaliado o potencial da sildenafil em reverter a HD observada no trato urinário inferior de ratos com deficiência crônica de NO.

No presente trabalho, observou-se que a sildenafil reverteu às alterações do detrusor, ocorrendo diminuição do número de ciclos de micção bem como da amplitude das contrações, nos animais do Grupo 4, porém não mudou as variáveis cistométricas nos animais do Grupo 3, que não tinham deficiência do NO. Resultado semelhante (redução da frequência de contração do detrusor) também foi observado em estudo avaliando o efeito dos inibidores da PDE5 em ratos com obstrução infravesical por ligadura parcial da uretra⁶².

Sabe-se ainda, que a sildenafil provoca inibição da PDE5, com consequente redução da metabolização de GMPc em bexigas de ratos⁶⁴. A magnitude da resposta encontrada nos animais do Grupo 4 se explica pela grande expressão da PDE5 no detrusor. Logo, também há grande degradação do GMPc; deste modo, a sildenafil, inibindo a PDE5, resultou em reversão das alterações urodinâmicas descritas nos animais com deficiência crônica de NO. Portanto, os

inibidores da PDE5 aumentam a concentração do GMPc e provocam relaxamento da musculatura lisa detrusora⁶².

A ausência de efeito da sildenafil nos animais do Grupo 3, talvez esteja relacionada à observação feita em outros estudos onde doadores de NO como o nitruoprussiato falharam em relaxar bexigas pré-contraídas⁶⁵. Portanto, embora tenha sido comprovado que o NO seja importante inibidor da contração do detrusor, a falta de relaxamento esperada com os doadores de NO, faz pensar que a ação de relaxamento observada nesse estudo seja realmente devido ao GMPc e que o NO não seja um neurotransmissor que cause diretamente relaxamento da musculatura lisa do detrusor.

Por consequência, supõem-se que, como os animais do Grupo 3 tinham concentração normal de NO, a redução da degradação de GMPc não produziu nenhuma alteração no detrusor desses animais. Porém, visto que a sildenafil reduziu a HD (diminuição do número e amplitude de micção) em ratos com deficiência de NO não se pode excluir que o mesmo module o efeito de outros neurotransmissores ou ainda esteja associado a mecanismos inibitórios neuronal operando durante a fase de enchimento (inibição da atividade parassimpática ou aumento da atividade simpática). Por conseguinte, o real mecanismo de ação do NO no trato urinário inferior deve ser confirmado por pesquisas futuras.

Portanto, visto que a deficiência do NO resulta no aumento da sensibilidade dos receptores muscarínicos, na magnificação da resposta contrátil do detrusor provocada por agonistas muscarínicos, na falta de resposta ao relaxamento

quando exposto a agonista adrenérgico, na presença de hiperatividade detrusor confirmada no estudo urodinâmico e na reversão dos achados urodinâmicos após infusão da sildenafil (diminuição da frequência dos ciclos de micção e da amplitude de contração), fica esclarecida a observação feita por McVary de que a melhora dos STUI em pacientes usando sildenafil deve-se às ações observadas experimentalmente neste estudo.

Neste estudo ainda pode ser observado que, após análise de variância múltipla entre os grupos, os dados obtidos do estudo urodinâmico demonstram que os animais usados para controle (Grupo 1 e 3) são semelhantes, ou seja não apresentam hiperatividade do detrusor. Destarte, isto traduz que por ter sido realizado estudo urodinâmico em dois tempos diferentes, avaliando grupos semelhantes, houve reprodutibilidade na metodologia usada na cistometria confirmado pela avaliação estatística.

Ainda com base na comparação múltipla dos grupos, verifica-se que os animais submetidos à redução do NO (Grupo 2 e 4) são semelhantes e apresentam hiperatividade do detrusor. Todavia, comparando-se o Grupo 1 com o Grupo 4, verifica-se que são diferentes, sendo que também observa-se diferença ao comparar o Grupo 2 e 3.

Pacientes com HD e OBP concomitante são de difícil tratamento, pois até mesmo quando tratados cirurgicamente, aproximadamente 60% deles podem manter os sintomas de armazenamento devido HD³⁹. Portanto, pesquisas futuras

são necessárias para avaliar se esse grupo de pacientes poderia ser beneficiado com a sildenafil.

O tratamento da HD tem sido principalmente com uso de medicamentos anticolinérgicos. Porém, o regime de tratamento é longo fazendo com que haja abandono do tratamento principalmente pelos efeitos colaterais frequentemente presente nessa classe de medicamento. A oxibutinina, que é uma amina terciária com ação anticolinérgica e anestésica local, tem sido bastante utilizada no tratamento da HD, porém os efeitos colaterais, principalmente representado pela xerostomia, faz com que até 45% dos pacientes abandonem o tratamento⁶⁶. Portanto, outra vantagem desta opção de tratamento para HD é a ausência de efeitos colaterais muito comuns aos anticolinérgicos como boca seca, visão turva, alterações cognitivas e constipação intestinal.

Conclusões

6. Conclusões

6.1. A redução do óxido nítrico promove contrações involuntárias do detrusor e ciclos de micção de menor intervalo.

6.2. A administração da sildenafil, em animais com deficiência crônica de óxido nítrico, promove diminuição do número de ciclos de micção e da amplitude das contrações.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

1. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2004; 84:935-86.
2. Abrams P, Anderson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, et al. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol* 2006; 148:565-78.
3. Ambache N and Zar MA. Non-cholinergic transmission by postganglionic motor neurones in the mammalian bladder. *J Physiol* 1970; 210:761-83.
4. Taira N. The autonomic pharmacology of the bladder. *Ann Rev Pharmacol* 1972; 12:197-208.
5. Callahan SM and Creed KE. Electrical and mechanical activity of the isolated lower urinary tract of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 74: 353–358, 1981.
6. Hegde SS, Eglen RM. Muscarinic receptors subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. *Life Sci* 1999; 419-28.
7. Wang P, Luthin GR, Ruggieri MR. Muscarinic acetylcholine receptor subtype mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 273:959-66.

8. Igawa Y, Zhang X, Nishizawa O, Umeda M, Iwata A, Taketo MM, et al. Cystometric findings in mice lacking muscarinic M₂ and M₃ receptors. *J Urol* 2004; 172:2460-4.
9. Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, et al. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M₃ subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:9579-84.
10. Caulfield MP and Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998; 50:279-290.
11. Gosling JA, Dixon JS, Jen PY. The distribution of noradrenergic nerves in the human lower urinary tract. A review. *Eur Urol* 36 1999; 1:(Suppl):23-30.
12. Lincoln J and Burnstock G. Autonomic innervation of the urinary bladder and urethra. In: *The Autonomic Nervous System*, edited by Maggi CA. London: Harwood Academic, 1993, v.6; p. 33-68.
13. Smet PJ, Jonavicius J, Marshall VR, and de Vente J. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience* 71: 337–348, 1996.
14. Amark P, Nergårdh A, Kinn AC. The effect of noradrenaline on the contractile response of the urinary bladder. An in vitro study in man and cat. *Scand J Urol Nephrol* 1986; 20:203-7.
15. Michel MC, Vrydag W. α 1-, α 2- and β -adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* 2006; 147:S88-S199.

16. Yamazaki Y, Takeda H, Akahane M, Yamazaki Y, Takeda H, Akahane M, et al. Species different in the distribution of β -adrenoceptor subtypes in bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1998; 124:593-9.
17. 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.
18. Moncada S, Palmer RMJ and Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42.
19. Gillespie J, Markerink M, Vente J. cGMP-generating cells in the bladder wall: identification of distinct networks of interstitial cells. *BJU Int* 2004; 94:1114-24.
20. Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six on. *Hypertension* 1998; 32: 958-64.
21. Mônica F, Bricola A, Baú F, Freitas LL, Texeira AS, Muscará MN, et al. 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.
22. Andersson KE. Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev* 1993; 45:253-308.
23. Andersson KE, Persson K. Nitric oxide synthase and the lower urinary tract: possible implications for physiology and pathophysiology. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1995; 175:43-53.
24. Mumtaz FH, Khan MA, Thompson CS, Morgan RJ, and Mikhailidis DP. Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological implications. *BJU Int* 2000; 85:567-78.

25. Dokita S, Smith SD, Nishimoto T, Wheeler MA, and Weiss RM. Involvement of nitric oxide and cyclic GMP in rabbit urethral relaxation. *Eur J Pharmacol* 1994; 266: 269-75.
26. Ehren I, Adolfsson J, Wiklund NP. Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract. *Urol Res* 1994; 22:287-90.
27. Engstrom G., Henningsohn L., Steineck G. and Leppert J. Self assessed health, sadness and happiness in relation to the total burden of symptoms from lower urinary tract. *BJU Int* 2005; 95:810-5.
28. Hu TW, Wagner TH, Bentkover JD, LeBlanc K, Piantentini A, Stewart WF, et al. Estimated economic cost of overactive bladder in the United States. *Urology* 2003; 61:1123-8.
29. Rosen R, Altwein J, Boyle P, Kirby RS, Lukacs B, Meuleman E, 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.
30. Wein AJ. Bladder outlet obstruction an overview. *Adv Exp Med Biol* 1995; 385:3-5.
31. Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, Abrams P, Herzog AR, Corey R, et al. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol* 2003; 20:327-36.
32. D'Ancona C, GriffithsD, Van Kerrebroeck P, Nishizawa O, Nitti V, Tatt FK 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. p. 69-142.

33. 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: 651-9.
34. Roehrborn C, McConell J. Etiology, pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. In: Walsh P, Retik A, Vaughan E, et al., (eds.). *Campbell's Urology*. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2002. p.1297-336.
35. Holtgrewe HL. Current trends in management of men with lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. *Urology* 1998; 51:1-7.
36. Abrams P. New words for old: lower urinary tract symptoms for "prostatism". *BMJ* 1994; 308: 929-30.
37. Ameda K, Sullivan MP, Bae RJ, Yalla SV. Urodynamic characterization of nonobstructive voiding dysfunction in symptomatic elderly men. *J Urol* 1999; 162:142-6.
38. Ziada A, Rosenblum M, Crawford ED. Benign prostatic hyperplasia: an overview. *Urology*. 1999; 53:1-6.
39. 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.
40. Sairam K, Kulinskaya E, McNicholas TA, Boustead GB, Hanbury DC. Sildenafil influences lower urinary tract symptoms. *BJU Int* 2002; 90:836-9.
41. Mulhall JP, Guhring P, Parker M, Hopps C. Assessment of the impact of sildenafil citrate on lower urinary tract symptoms in men with erectile dysfunction. *J Sex Med* 2006; 3:662-7.

42. Chang SH 2006 Influence of sildenafil on lower urinary tract symptoms. *J Urol* 2006; 175:299.
43. McVary KT, Monnig W, Camps JL Jr, Young JM, Tseng LJ, van den Ende G. 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; 177:1071-7.
44. Priviero FB, Teixeira CE, Claudino MA, De Nucci G, Zanesco A, Antunes E. Vascular effects of long-term propranolol administration after chronic nitric oxide blockade. *Eur J Pharmacol* 2007; 571:189-96.
45. Faria MS, Muscará MN, Moreno Júnior H, Teixeira SA, Dias HB, De Oliveira B, et al. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *Eur J Pharmacol* 1997; 323:37-43.
46. Bricola AA, Teixeira SA, De Luca IM, Muscará MN, Abdala FM, Porto CS. Upregulation of muscarinic receptors by long-term nitric oxide inhibition in the rat ileum. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30:168-73.
47. Lecci A, Giuliani S, Santicioli P, Maggi CA. Involvement of spinal tachykinin NK1 and NK2 receptors in detrusor hyperreflexia during chemical cystitis in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 1994; 1:129-35.
48. Parlani M, Conte B, Manzini S, et al. Non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory control of the rat external urethral sphincter: involvement of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265:713-9.
49. Nishiguchi J, Kwon DD, Kaiho Y, Chancellor MB, Kumon H, Snyder PB, et al. Suppression of detrusor overactivity in rats with bladder outlet obstruction by a type 4 phosphodiesterase inhibitor. *BJU Int* 2006; 99:680-6.

50. Peters TJ, Donovan JL, Kay HE, Abrams P, de la Rosette JJ, Porru D, et al. The International Continence Society "Benign Prostatic Hyperplasia" Study: the bothersomeness of urinary symptoms. *J Urol* 1997; 157: 885-9.
51. Steers W. Pathophysiology of overactive bladder and urge urinary incontinence. *Rev Urol* 2002; 4:S7-18.
52. Gacci M, Bartoletti R, Figlioli S, Sarti E, Eisner B, Boddi V, Rizzo M. Urinary symptoms, quality of life and sexual function in patients with benign prostatic hypertrophy before and after prostatectomy: a prospective study. *BJU Int* 2003; 91:196-200.
53. Sairam K, Kulinskaya E, McNicholas TA, Boustead GB, Hanbury DC. Sildenafil influences lower urinary tract symptoms. *BJU Int* 2002; 90:836-9.
54. Mulhall JP, Guhring P, Parker M, Hopps C. Assessment of the impact of sildenafil citrate on lower urinary tract symptoms in men with erectile dysfunction. *J Sex Med* 2006; 3:662-7.
55. Chang SH. Influence of sildenafil on lower urinary tract symptoms. *J Urol* 2006; 175: 299.
56. Gresser U, Gleiter C. Erectile dysfunction: comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil. Review of the literature. *Eur J Med Res* 2002; 7:435-46.
57. Roehrborn CG. Lower Urinary Tract Symptoms, Benign Prostatic Hyperplasia, Erectile Dysfunction, and Phosphodiesterase-5 Inhibitors. *Rev Urol* 2004; 6:121-7.
58. Takeda M, Tang R, Shapiro E, Burnett AL, Lepor H. Effects of nitric oxide on human and canines prostates. *Urology* 1995; 45: 440-6.

59. Burnett AL, Maguire MP, Chamness SL, Ricker DD, Takeda M, Lepor H, et al. Characterization and localization of nitric oxide synthase in the human prostate. *Urology* 1995; 45: 435-9.
60. Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, et al. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:3702-7.
61. Birder LA, Nealen ML, Kiss S, de Groat WC, Caterina MJ, Wang E, et al. Beta-adrenoceptor agonist stimulate endothelial nitric oxide synthase in rat urinary bladder urothelial cells. *J Neurosci* 2002; 22: 8063-70.
62. Filippi S, Morelli A, Sandner P, Fibbi B, Mancina R, Marini M, et al. Characterization and Functional Role of Androgen-Dependent PDE5 Activity in the Bladder. *Endocrinology* 2007; 148:1019-29.
63. Morelli A, Filippi S, Mancina R, Luconi M, Vignozzi L, Marini M, et al. Androgens regulate phosphodiesterase type 5 expression and functional activity in corpora cavernosa. *Endocrinology* 2004; 145:2253-63.
64. Qiu Y, Kraft P, Craig EC, Liu X, Haynes-Johnson D. Identification and functional study of phosphodiesterases in rat urinary bladder. *Urol Res* 2001; 29:388-92.
65. Persson K, Andersson KE. Nitric oxid and relaxation of pig lower urinary tract. *Br J Pharmacol* 1992; 106:416-22.
66. Thuroff JW, Chartier-Kastler E, Corcus J, Humke J, Jonas U, Palmtag H, et al. Medical treatment and medical side effects in urinary incontinence in the elderly. *World J Urol* 1998; 16(Suppl 1):S48-61.