

**THAÍS FIGUEIREDO PALMA**

---

***Novo modelo experimental de indução de cistite intersticial  
por estresse oxidativo usando instilação intravesical de  
solução polimérica contendo o doador de óxido nítrico  
S-nitrosoglutationa***

---

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Orientador: Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Riccetto  
Co-Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Amedea Barozzi Seabra**

**UNICAMP  
2009**

**THAÍS FIGUEIREDO PALMA**

---

***Novo modelo experimental de indução de cistite intersticial  
por estresse oxidativo usando instilação intravesical de  
solução polimérica contendo o doador de óxido nítrico S-  
nitrosoglutationa***

---

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do Título de  
Mestre em Cirurgia, área de Cirurgia  
Experimental

**Orientador: Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Riccetto  
Co-Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Amedea Barozzi Seabra**

**UNICAMP  
2009**

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

**Palma, Thaís Figueiredo**

P18n Novo modelo experimental de indução de cistite intersticial por estresse oxidativo usando instilação intravesical de solução polimérica contendo o doador de óxido nítrico S-nitrosoglutationa / Thaís Figueiredo Palma. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores : Cássio Luís Zanettini Riccetto, Amedea Barozzi Seabra  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cistite intersticial. 2. Óxido nítrico. 3. Modelo experimental. I. Riccetto, Cássio Luís Zanettini. II. Seabra, Amedea Barozzi. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês: A new experimental model for inducing interstitial cystitis by oxidative stress using bladder instillation of a nitric oxide donor gel**

**Keywords:**

- Cystitis, interstitial
- Nitric oxide
- Experimental model

**Titulação:** Mestre em Cirurgia

**Área de concentração:** Cirurgia experimental

**Banca examinadora:**

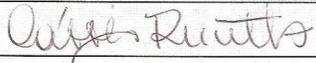
Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Riccetto  
Prof. Dr. Antonio Gugliotta  
Profa. Dra. Telma Guarisi

Data da defesa: 09/12/2009

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**  
Thaís Figueiredo Palma

Orientador: Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Ricetto

**Membros:**

1. Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Ricetto - 

2. Profa. Dra. Telma Guarisi - 

3. Prof. Dr. Antonio Gugliotta - 

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

Data: 09/12/2009

## ***Dedico este trabalho...***

*... Aos meus pais, Paulo e Regina, por terem me incentivado a chegar onde estou e pelo apoio que sempre me deram.*

*Ao meu marido Bruno, por nunca ter deixado de acreditar em mim.*

*Aos meus quatro irmãos: Leticia, Júlio, Fernão e Paula.*

# *Agradecimentos*

---

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Cássio Riccetto, pela orientação e pela enorme paciência.*

*A Sophia Consuelo Souto, pela ajuda e pela boa vontade.*

*Ao William, a Ana e a todos os funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, por terem tornado este trabalho possível.*

*A Sueli Chaves e a Alice Garcia, pelo apoio.*

## *Sumário*

---

# *Sumário*

---

<b>Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....</b>	<b>viii</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>x</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1.Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Revisão da Literatura.....</b>	<b>17</b>
Etiologia.....	17
Diagnóstico.....	20
Aspectos anatomopatológicos.....	21
Modelos experimentais para CI .....	22
Oxido Nítrico e a Fisiopatologia da CI .....	25
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>28</b>
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2.Objetivo específico.....	28
<b>4. Material e Método.....</b>	<b>29</b>
Amostra .....	30
Anestesia e Preparação .....	30
Síntese do doador de NO .....	30

Preparação da solução contendo NO.....	30
Procedimento .....	31
Eutanásia dos animais, exereses da bexiga e preparo das lâminas para estudo microscópico.....	33
Estudo microscópico .....	33
Análise estatística.....	34
<b>5. Resultados .....</b>	<b>35</b>
Avaliação macroscópica.....	35
Estudo microscópico .....	35
Congestão vascular .....	35
Reação Fibroblástica .....	37
Infiltrado neutrofílico .....	38
Edema .....	39
Infiltrado linfomonocitário.....	40
<b>6. Discussão .....</b>	<b>41</b>
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>47</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>48</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>51</b>
9.1. Anexo 1. Aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal.....	51
9.2. Anexo 2. Tabelas da Análise Estatística .....	52
9.3. Artigo: .....	57

## *Símbolos, Siglas e Abreviaturas*

---

# *Símbolos, Siglas e Abreviaturas*

---

<b>CEE/UNICAMP</b>	Comissão de Ética na Experimentação Animal
<b>CI</b>	Cistite Intersticial
<b>eNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase endotelial
<b>IDDKN</b>	National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
<b>g</b>	gramas
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicanos
<b>GSNO</b>	S-nitrosoglutationa
<b>h</b>	hora
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>ICS</b>	International Continence Society
<b>ICSI</b>	Interstitial Cystitis Symptom Index
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase indutível
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>L</b>	Litro
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligrama
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro

<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmol</b>	Milimol
<b>nNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase neuronal
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NOS</b>	Óxido Nítrico Sintase
<b>PEO-PPO-PEO</b>	Poli (óxido de etileno)-Poli(óxido de Propioeno)-Poli(óxido de Etileno)
<b>ppb</b>	partes por bilhão
<b>PRV</b>	Vírus pseudorabies
<b>PUF</b>	Pelvic Pain and Urgency/ Frequency
<b>RANTES</b>	Re-Activated in Normal, T cell-Expressed, Secreted
<b>SBD</b>	Síndrome da Bexiga Dolorosa
<b>SNC</b>	Sistema nervoso Central
<b>SP</b>	Substância P
<b>Tg</b>	Transgênico
<b>µm</b>	micrômetro
<b>Wt%</b>	Weight percent

*Resumo*

---

## *Resumo*

---

**Introdução:** A síndrome da bexiga dolorosa é uma condição crônica caracterizada por dor suprapúbica relacionada ao enchimento vesical, acompanhada por outros sintomas como urgência urinária, aumento de frequência urinária diurna e noctúria, na ausência de infecção urinária ou de outra doença comprovada. Em parte dos pacientes, a síndrome é atribuída ao processo inflamatório crônico inespecífico do interstício da camada muscular própria da bexiga, também denominada de cistite crônica intersticial (CI). Há relatos acerca da participação do óxido nítrico (NO) na fisiopatologia da CI. Dessa forma, o desenvolvimento de modelos de CI baseados na atividade pró-oxidante do NO poderá contribuir para a evolução do conhecimento acerca de novos métodos terapêuticos para essa condição. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi desenvolver um novo modelo experimental de indução de cistite intersticial através da instilação intravesical de solução doadora de óxido nítrico, a S-nitrosoglutationa – (GSNO) e compará-lo com um modelo já descrito na literatura, no qual a CI é induzida através da instilação de sulfato de protamina e cloreto de potássio (KCl). **Material e Métodos:** Foram utilizadas 40 ratas fêmeas (Wistar), divididas em quatro grupos: 1- Solução Salina + GSNO, 2 - Solução Salina + Solução Polimérica (veículo), 3 - Sulfato de Protamina + KCl, 4 - Sulfato de Protamina + GSNO. As ratas receberam uma aplicação (cinco animais) ou três aplicações (cinco animais) da substância

correspondente a cada grupo por meio de instilação intravesical e, após seis dias (cinco animais) e nove dias (cinco animais), foram eutanasiados e suas bexigas foram extraídas para avaliação macroscópica e sob microscopia óptica.

**Resultados:** Na avaliação macroscópica observou-se edema e hiperemia da mucosa em dois (22%) dos animais do grupo 1, em zero (0%) dos animais do grupo 2, em dez (100%) dos animais do grupo 3, e em cinco (50%) dos animais do grupo 4. No grupo 3 (Protamina + KCl) e no grupo 1 (Solução Salina + GSNO) observaram-se efeitos semelhantes no urotélio das ratas. Na análise microscópica, observou-se que os animais do Grupo 2 (solução salina + solução polimérica) apresentaram congestão vascular moderada nos dois momentos estudados, a qual foi significativamente menor que nos grupos 1, 3 e 4, após três instilações ( $p=0,0035$ ). No grupo 3 (protamina +KCl) observou-se a congestão vascular de maior intensidade, sendo acentuada em 33,3% dos animais, nos dois momentos estudados. Em ambos os momentos estudados, a fibrose observada foi ausente ou de leve intensidade, em todos os grupos, sem diferenças significativas entre os grupos protamina e solução salina + GSNO. Observou-se fibrose significativamente maior nos Grupos 3 e 4 após nove dias ( $p = 0,0459$ ), em relação aos animais controle (grupo 2). Todos os grupos apresentaram infiltrado neutrofílico, de intensidade variável, na avaliação realizada após seis dias, sem diferenças significantes ( $p=0,7277$ ). Após nove dias, houve tendência de regressão do infiltrado neutrofílico, sem evidência de infiltrado acentuado em todos os grupos ( $p=0,2301$ ). Após o estímulo inicial, observou-se tendência de regressão do edema ao longo do período de observação. Não foram identificadas diferenças significativas na evolução do edema entre os grupos em ambos os

tempos estudados. **Conclusão:** O modelo proposto reproduziu de forma adequada os aspectos anatomopatológicos da cistite intersticial experimental. Considerando-se que parte das pacientes portadoras de cistite intersticial não apresenta sensibilidade a infusão intravesical de cloreto de potássio, o presente modelo poderá ser empregado para o estudo de novos alvos terapêuticos da cistite intersticial.

*Abstract*

---

## *Abstract*

---

**Introduction:** Painful Bladder Syndrome is a chronic condition characterized by supra-pubic pain related to vesical filling, also presenting other symptoms as urgency, increased frequency and nocturia, in the absence of urinary tract infection or other proven diseases. In some patients, the syndrome is related to an inflammatory process of the detrusor, also denominated interstitial cystitis. There are findings that lead to a role of NO (Nitric Oxide) in patients with IC. The development of experimental models of IC based on the pro-oxidant activity of the NO may contribute to evolution of the knowledge regarding new therapies for this condition. **Objective:** The aim of this project is to develop a new experimental model for inducing IC through vesical instillation of a gel with NO donor, the S-nitrosoglutathione - (GSNO) in rats comparing to the gold standard cystitis induction method with protamine and potassium chloride. **Material and Method:** For that purpose we used 40 female Wistar rats, divided in four groups: 1- saline solution + GSNO, 2- Saline Solution + Polymeric Solution, 3- Protamine Sulphate + KCl, 4- Protamine Sulphate + GSNO. The rats received one dose (five animals) or three doses (five animals) of the corresponding substance through intravesical instillation, and after six days (five animals) or nine days (five animals) they were submitted to euthanasia and their bladders were removed for macroscopic evaluation and anatomic-pathologic study using optic microscopy. **Results:** In the

macroscopic evaluation we observed edema and hiperemia of the mucosa in two (22%) of the animals in group 1, in none (0%) of the animals in group 2, in ten (100%) of the animals in group 3, and in five (50%) of the animals in group 4. In group 3 (Protamine + KCl) and in group 1 (Saline Solution + GSNO) were observed similar effects on the urothelium. In the microscopic analysis, the animals in group 2 (saline = excipient) showed moderate vascular congestion in both times of the stufy. And it was significantly smaller in groups 1, 3 and 4 after three instillations ( $p=0,0035$ ). In group 3 (protamine + KCl) we observed vascular congestion with higher intensity, acute in 33.3% of the animals, in both times. We observed mild fibrosis in all groups, without significant differences between protamine and saline solution+ GSNO. Fibrosis was significantly higher in groups 3 and 4 ( $p=0.0459$ ) after nine days when compared to control (group 2). All groups presented neutrophilic infiltrate of variable intensities after six days, with no statistical differences ( $p=0.7277$ ). After nine days, there was a tendency of regression of the neutrophilic infiltrate, without evidence of acute infiltrate in all groups ( $p=0.2301$ ). After initial stimuli, there was a tendency of regression of edema along the observation period. There were no significant differences in edema evolution in both times, among the groups. **Conclusion:** The proposed model reproduced properly the anatomic-pathologic aspects of the experimental interstitial cystitis. Considering that part of the patients with cystitis is not sensitive to intravesical potassium chloride, this model can be used for the study of new therapies for interstitial cystitis.

## *Introdução*

---

# *1.Introdução*

---

A cistite intersticial (CI), segundo a ICS (International Continence Society), corresponde à síndrome caracterizada por dor suprapúbica relacionada ao enchimento vesical, acompanhada de outros sintomas, como aumento da frequência durante dia e noite, na ausência de infecção urinária ou outra causa diagnosticada, e confirmada por meio de biópsia vesical que deve evidenciar processo inflamatório crônico inespecífico envolvendo o interstício da camada muscular própria. Na ausência de comprovação anatomopatológica, a síndrome clínica é designada como Síndrome da Bexiga Dolorosa (SBD)<sup>1</sup>.

É difícil estabelecer precisamente sua epidemiologia, por falta de uma definição uniforme e de um método validado de diagnóstico, que seja reprodutível e possa ser utilizado na população em geral. Além disso, sua etiologia e fisiopatologia são incertas. Foram estimadas prevalências de dez a cada 100.000 habitantes, de 30 a cada 100.000 habitantes e de 501 a cada 100.000 habitantes, o que mostra a dificuldade na interpretação de estudos epidemiológicos de CI (Ho, 2004).

O diagnóstico da CI também é um fator que dificulta seu estudo. Em 1987 foi estabelecido um critério diagnóstico para CI pelo National Institute of Diabetes

and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) cujo objetivo era padronizar os diagnósticos feitos em estudos clínicos, permitindo comparações entre publicações de diferentes autores. Este método foi, erroneamente, utilizado no diagnóstico de uso clínico, preenchendo a falta de outro que fosse validado. Da mesma forma, outro fator de difícil compreensão é a sua fisiopatologia, postulando-se, inclusive, que a CI não corresponda a uma única doença, mas que apresente vários mecanismos fisiopatológicos que resultem em sintomas similares. Diversas teorias foram apresentadas ao longo dos anos, e muitas delas continuam sendo pesquisadas.

Somente o estudo da fisiopatologia da cistite intersticial permitirá o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. É importante que seja criado um modelo experimental para estudo da cistite intersticial, dada à dificuldade em se conduzir um estudo clínico sob condições controladas, em virtude da diversidade da apresentação clínica dessa

*Revisão da Literatura*

---

## *2. Revisão da Literatura*

---

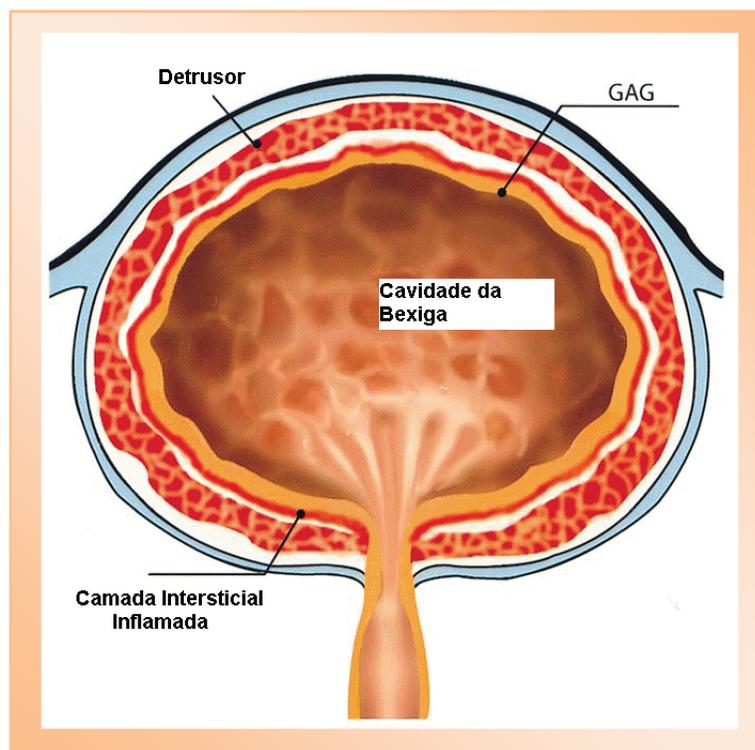
### **Etiologia**

Entre as primeiras publicações conhecidas, há a de Guy Hunner (1918), que relatou infiltrado de linfócitos na submucosa vesical, extravasamento de hemácias e diminuição da espessura do epitélio em portadoras da SBD. Atualmente, artigos referem as diferentes moléculas e marcadores, como óxido nítrico, macrófagos, células inflamatórias, fibrose, entre outros.

O estudo de possíveis alvos terapêuticos implica, em tese, no desenvolvimento de modelos experimentais nos quais os mecanismos de indução da CI sejam conhecidos e reprodutíveis, bem como mimetizem da maneira mais próxima possível o que se verifica na prática clínica. Este aspecto representa ainda um grande desafio ao progresso da pesquisa acerca do tratamento da CI, pois vários mecanismos podem induzir a resposta inflamatória que se verifica nas biópsias dos pacientes.

A etiologia da CI permanece incerta e existem várias teorias que tentam explicá-la. Uma delas se refere ao urotélio, que é revestido por uma camada de glicosaminoglicanos, a qual o protege de microorganismos, possíveis agentes carcinogênicos e constituintes da urina. (Figura 1). Uma das causas da CI parece ser o defeito na camada protetora de glicosaminoglicanos (GAG) da mucosa

vesical, o que permitiria a passagem de urina para o interstício da parede da bexiga, levando a inflamação transmural difusa<sup>3</sup>. Porém, estudos ultra-estruturais da camada de GAG mostraram-na intacta em casos precoces de CI, e experimentos com rádio isótopos não revelaram nenhuma diferença significativa na capacidade de absorção da bexiga, quando comparada a um controle saudável<sup>4</sup>. Ademais, parte dos pacientes com a SBD não apresentam resposta dolorosa a infusão de cloreto de potássio intravesical, o que sugere que a disfunção epitelial não seja significativa nesse grupo de pacientes.



**Figura 1. Bexiga, camada de glicosaminoglicanos (GAG) e interstício inflamado**

Pacientes com CI têm sido frequentemente associados com alterações imunológicas crônicas. Esses pacientes teriam anticorpos contra as células da mucosa ou do músculo, ou vários outros tecidos conectivos componentes da bexiga<sup>2</sup>. Diferentes imunoglobulinas e infiltrados de células inflamatórias são encontrados no urotélio com CI. Estudos com imunofluorescência indireta mostraram maior ligação de anticorpos ao urotélio em bexigas com CI, em comparação ao controle<sup>4</sup>. Os mastócitos parecem ter um papel importante no processo inflamatório da CI; sua maior concentração no detrusor é um achado frequente na CI. A densidade de mais de 20 mastócitos/mm<sup>2</sup> de músculo detrusor tem especificidade de 88% e sensibilidade de 95% para o diagnóstico quando comparada com cistite bacteriana ou bexiga normal<sup>5</sup>.

A regulação da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) urinária tem sido proposta como fator importante na resposta inflamatória da CI. Um estudo de 2003 mediu a concentração de NO na bexiga de pacientes, através de infusão de ar por meio de um cateter, seguida de aspiração e análise do ar. Em pacientes com cistite intersticial a concentração de NO foi significativamente maior. No grupo controle a concentração medida foi de 13+- 2 ppb e no grupo com cistite, 327+- 210 ppb (Ehrém, 2003). Resultados similares foram encontrados em estudo cujo objetivo foi analisar a formação de óxido nítrico e óxido nítrico-sintase na bexiga de pacientes com cistite intersticial. Os pacientes com cistite apresentaram níveis de NO e iNOS maiores do que os controles (284 ± 218 *versus* 2±1 ppb, p=0,01)<sup>6</sup>.

Outras teorias incluem possível origem infecciosa, inflamatória, neurogênica, alérgica (induzida por histaminas) e vulnerabilidade generalizada

associada com hipersensibilidade visceral devida a anormalidades do sistema imune ou neuroendócrino<sup>7</sup>.

## **Diagnóstico**

O diagnóstico de SBD é clínico, baseado nos sintomas e na exclusão de outras doenças da bexiga, uretra e outros órgãos pélvicos, incluindo o sistema músculo esqueléticos, não havendo achados patognomônicos. Vários critérios têm sido utilizados ao longo dos anos, dada a dificuldade em definir a doença. Após a reunião de consenso do National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), foram estabelecidos critérios de inclusão e exclusão para fins de pesquisa, porém estes critérios são considerados muito rigorosos para a prática clínica, já que muitos casos mais leves não preencheriam todos os requisitos<sup>8</sup>. Também foram propostos questionários visando quantificar os sintomas (PUF - Pelvic Pain and Urgency/ Frequency), os quais não se tornaram populares, em virtude da diversidade sintomática. O questionário recentemente validado O'Leary-Sant Symptom Index, também conhecido como Interstitial Cystitis Symptom Index (ICSI) é considerado uma ferramenta eficaz de diagnóstico. Atualmente, a Associação Européia de Urologia sugere que o diagnóstico seja baseado em sintomas, exame físico, exame de urina, cistoscopia com hidrodistensão e biópsia<sup>9</sup>.

## **Aspectos anatomopatológicos**

A análise histológica da biópsia da parede da bexiga é um passo importante na confirmação do diagnóstico definitivo da CI. De forma geral, verifica-se infiltrado de células inflamatórias na submucosa, composto predominantemente por linfócitos e plasmócitos, podendo, também, conter macrófagos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos. Em parte dos pacientes verifica-se predominância de infiltrado mastocítico, o qual, entretanto, não é considerado patognomônico da CI, como se acreditava no passado. Em 1993 foi criada uma base de dados de CI pela NIDDK, na qual os dados de biópsia passaram a ser correlacionados com a gravidade dos sintomas, de tal forma que a CI foi classificada em três grupos anato-clínicos<sup>10</sup>.

C2 (3,4%): infiltrado inflamatório importante da lâmina própria com mastocitose importante, tecido de granulação, pequena proliferação nervosa e completa erosão da superfície urotelial. Em geral os pacientes apresentam sintomas mais graves, com maior frequência noturna e em 24 horas, além de urgência miccional.

C1 (8,4%): não apresenta os achados inflamatórios do grupo C2, mas apresenta erosão completa do urotélio. Em geral, os pacientes apresentam sintomas intermitentes de urgência e frequência.

C0 (88,1%): sem as alterações histológicas descritas nos grupos C2 e C1. O achado predominante é de edema variável da lâmina própria, com urotélio parcialmente intacto. Os pacientes apresentam sintomas mais leves, com menor frequência miccional e urgência.

Entretanto, como atualmente a maioria dos portadores de SBD é tratada sem a realização rotineira de biopsia vesical, a aplicabilidade desta classificação tornou-se restrita a protocolos de pesquisa.

### **Modelos experimentais para CI**

Não existem muitos modelos experimentais descritos na literatura, e muitas tentativas foram frustradas. As primeiras tentativas de desenvolvimento de modelos experimentais de cistite intersticial em animais foram feitas com ácido acético e agonistas de receptores vanilóides. Estes tratamentos não produziram os resultados esperados, seja por terem causado um dano muito grande à bexiga, ou por não reproduzirem a inflamação fidedignamente<sup>11</sup>.

Baseando-se na afirmação de que um epitélio danificado permite a absorção de urina, e que seus componentes participam do processo inflamatório da CI, houve a tentativa de desenvolver um modelo experimental que imitasse a fase aguda deste processo, com a utilização de sulfato de protamina, para quebrar a barreira urotelial, e cloreto de potássio. A solução foi instilada em ratas adultas Sprague-Dawley (150g a 300g de peso). O grupo controle foi dividido em três, recebendo, respectivamente, solução salina, solução salina com 100mmol/L e 500mmol/l de cloreto de potássio. Após duas horas de instilação contínua das três soluções, foram analisadas as amplitudes de contrações vesicais, suas durações, frequência e intervalos entre elas. Não houve diferença entre os três grupos, indicando que a funcionalidade da barreira urotelial não foi afetada pelas soluções salinas com KCl. A combinação da solução controle com sulfato de protamina

produziu irritação na mucosa vesical, e este foi considerado o modelo experimental mais adequado de CI<sup>11</sup>.

Em 2007 foi descrito um modelo de indução de cistite com administração intraperitoneal de ciclofosfamida, um agente anticancerígeno que é metabolizado em acroleína nos rins e se acumula na bexiga, produzindo efeitos tóxicos. Foi comprovado que essa substância não produz lesões histológicas em outros tecidos, somente no urotélio. A ciclofosfamida foi diluída em solução salina a 0,9% e administrada intraperitonealmente. Foram utilizadas doses de 200mg/kg, 300mg/kg e 400mg/kg, e concluiu-se que a dose de 300mg/kg após quatro horas da administração foi a que melhor induziu inflamação e dor<sup>12</sup>.

Outro estudo experimental foi conduzido em gatos que já apresentavam uma forma idiopática de CI, que ocorre naturalmente e apresenta quase todas as características da CI humana, incluindo alguns sintomas. Os animais foram obtidos de doações e tinham histórico de hematúria, polaciúria e micções em locais inadequados. Após o estudo da concentração de NO nas bexigas dos animais com cistite e nas dos controles, observou-se que os níveis de NO eram significativamente maiores nas bexigas de gatos com CI<sup>7</sup>.

O vírus PRV (pseudorabies) atenuado é um alfa-herpesvirus que sofre replicação no sistema nervoso central. Ele causou cistite em ratos quando injetado no músculo da cauda, onde reagiu com neurônios motores. A cistite induzida por PRV é um evento mediado por neurônios, ativado pela ação viral no SNC, e é associada com ativação de mastócitos. Em ratos, o PRV causa expressão urotelial de RANTES (Re-Activated in Normal, T cell-Expressed, Secreted), uma substância

que aumenta a produção de mastócitos e seu acúmulo na lâmina própria. A consequência desse acúmulo é uma inflamação da bexiga que é consistente com a CI humana, onde a presença de lesões uroteliais em biópsias de pacientes corresponde aos sintomas, sugerindo perda de funcionalidade da barreira urotelial<sup>13</sup>.

Focando no estudo de doenças autoimunes, um grupo decidiu aproveitar a facilidade de obtenção de ratos OVA-específicos transgênicos (ratos que expressam o modelo Ag OVA), que atualmente representam uma das ferramentas disponíveis para estudos experimentais de indução de doenças de natureza imune. Foi aplicado o sistema OVA no desenvolvimento de uma linha de ratos Tg (URO-OVA) que expressam OVA como auto-Ag no urotélio, o qual se mostrou útil para estudo de cistite auto-imune<sup>14</sup>.

Também é possível encontrar na literatura a indução de cistite experimental em ratas com instilação intravesical de Substância P (SP), um neurotransmissor relacionado a impulsos dolorosos, e lipopolissacarídeo (LPS), uma toxina bacteriana. A SP foi instilada nas bexigas de ratas 24 horas após a exposição ao LPS. Estudos *in vitro* determinaram a capacidade do LPS e da SP de induzir liberação de histaminas e citocinas pela bexiga. O LPS foi absorvido pelas células uroteliais e teve distribuição sistêmica. Após 24 horas da instilação, a inflamação vesical foi caracterizada por edema e infiltração de leucócitos na camada muscular própria da bexiga<sup>15</sup>.

## **Oxido Nítrico e a Fisiopatologia da CI**

O óxido nítrico (NO) é um dos mais importantes sinalizadores intracelulares e intercelulares, e é sintetizado a partir da L-arginina, através da ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A NOS tem três isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e indutível (iNOS). Cada uma delas é codificada por um gene diferente. Ao contrário da eNOS e da nNOS, a iNOS não necessita de influxo de cálcio para ser ativada, e produz quantias relativamente grandes de NO. A NOS utiliza como substrato o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) oxida o grupo guanidina da L-arginina. A atividade da NOS se dá pela presença de diversos cofatores e grupos prostéticos, como a flavina adenina dinucleotídeo (FAD)<sup>16</sup>.

A atividade biológica desse mediador é dependente da sua concentração tecidual. De forma geral, em baixas concentrações, o NO estimula a neoangiogênese, podendo ser útil no tratamento de processos inflamatórios com componente isquêmico significativo. Um estudo em ratas comprovou que quando aplicado em feridas cutâneas acelera a cicatrização e diminui a quantidade de células inflamatórias<sup>17</sup>.

A GSNO foi aplicada em feridas cutâneas de 1cm<sup>2</sup> em ratos, e a cicatrização foi observada durante 14 dias. Os ratos cujas feridas receberam GSNO apresentaram cicatrização significativamente mais rápida do que os ratos do grupo controle<sup>17</sup>.

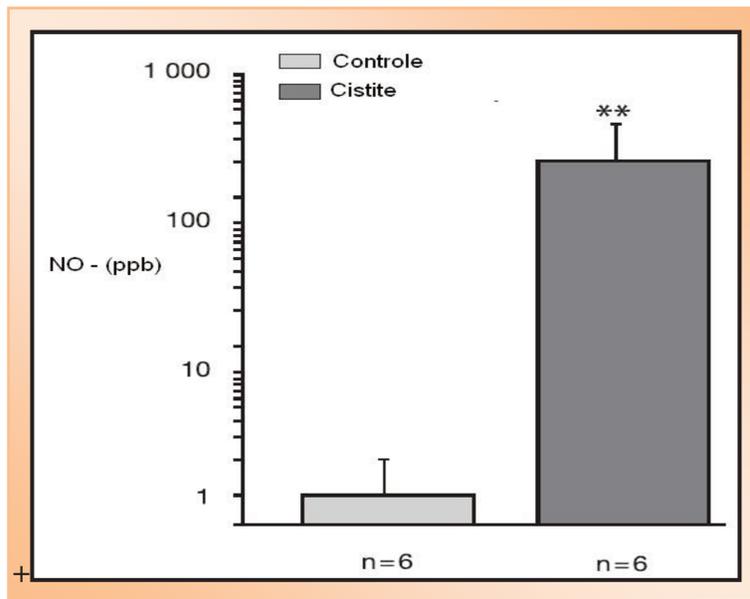
A propriedade de liberação controlada de NO da GSNO foi indicada em estudo para tratamento de feridas, úlceras, e infecções cutâneas tais como a

leishmaniose, onde causaria aumento de fluxo sanguíneo e estímulo de angiogênese. Além disso, seria indicada no aperfeiçoamento de absorção transdérmica de outras drogas<sup>18</sup>.

Outro estudo também cita o fato de que a presença de óxido nítrico pode ser benéfica ou não, dependendo de sua dose. Medidos os níveis de NOS em feridas nos seus pacientes, Paulsen et. al.<sup>19</sup>, observaram aumento da concentração, o que sugere que o óxido nítrico tenha um papel na regulação da cicatrização de feridas<sup>19</sup>.

De forma contrária, em concentrações elevadas no tecido, o NO apresenta ação pró-oxidante, agindo como mediador local do processo inflamatório<sup>12</sup>.

Num estudo clínico, foram mensurados os níveis de NO e de suas enzimas relacionadas em pacientes com CI e em voluntários normais, através de infusão e retirada de ar na bexiga, utilizando-se um cateter. Os níveis de óxido nítrico em pacientes com CI mostraram-se significativamente mais elevados, conforme apresentado na Figura 2<sup>6</sup>.



**Figura 2. Concentração de óxido nítrico na bexiga de pacientes saudáveis e com CI<sup>6</sup>**

Apesar da existência de vários artigos publicados, como os de Koskella (2008)<sup>6</sup> e de Ehrem et al.,(2003)<sup>20</sup>, não há um consenso quanto à relação entre CI e NO.

***Objetivos***

---

## ***3. Objetivos***

---

### ***3.1 Objetivo geral***

Desenvolver um novo modelo experimental de CI com base no estresse oxidativo induzido por uma solução doadora de óxido nítrico.

### ***3.2. Objetivo específico***

Comparar as alterações histológicas sobre o urotélio e a camada muscular própria da bexiga de ratas após instilações de solução aquosa polimérica do copolímero em bloco poli (óxido de etileno)-poli(óxido de propioeno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO), Pluronic F-127, contendo a S-nitrosoglutathione (GSNO), com aquelas induzidas pela instilação de sulfato de protamina e cloreto de potássio.

## ***Material e Método***

---

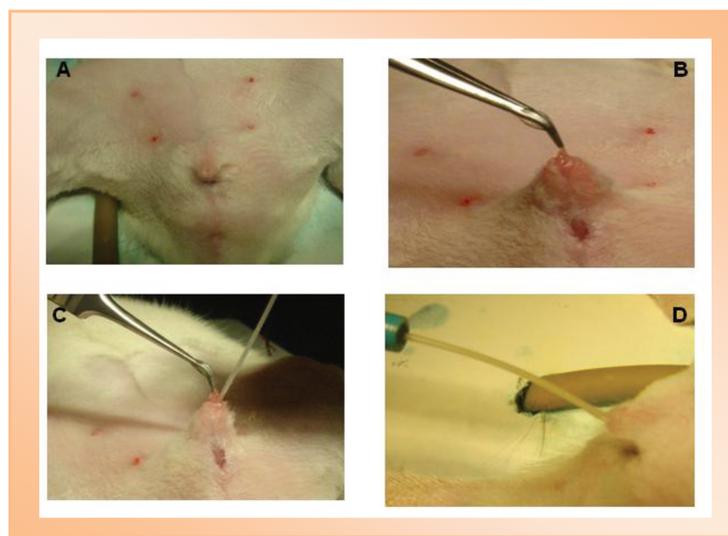
## ***4. Material e Método***

---

Este projeto foi desenvolvido no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas, após aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP (Protocolo nº. 1296-1) (Anexo 1).

As ratas foram acomodadas durante todo o estudo em gaiolas contendo cinco animais cada, sob condições ideais de alimentação, temperatura, luz e umidade.

Um estudo piloto, com vinte ratas, foi realizado com a finalidade de treinamento dos procedimentos de anestesia e do cateterismo uretral dos animais (Figura 3).



***Figura 3. Cateterismo uretral. (A) Tricotomia e assepsia. (B) A uretra é apresentada com uma pinça. (C) O cateter é inserido cuidadosamente. (D) Instilação.***

## **Amostra**

Foram utilizadas 40 ratas Wistar com aproximadamente 90 dias de vida.

## **Anestesia e Preparação**

As ratas foram anestesiadas com injeção de Tiopental sódico (25mg/kg) na veia dorsal da cauda e, em seguida, posicionada em decúbito dorsal. Foi realizada assepsia do abdome e do períneo com polivinil pirrolidona iodo (Povidine<sup>®</sup>).

## **Síntese do doador de NO**

O doador de NO utilizado foi a S-nitrosoglutationa (GSNO). A GSNO foi sintetizada reagindo-se quantidades equimolares de glutathiona com nitrito de sódio em solução aquosa de ácido clorídrico (HCl 0.5 M), sob agitação em banho de gelo por 40 minutos. A solução final foi precipitada com acetona, filtrada e lavada com água gelada e acetona. O precipitado formado foi liofilizado por 24h. A GSNO obtida foi estocada no freezer (- 20 °C) e protegida da luz.

## **Preparação da solução contendo NO**

Gel de Pluronic F-127 (25wt%) em água contendo GSNO (100 $\mu$ M) foi preparado com descrito anteriormente. Pluronic F-127 sólido foi adicionado em água fria (5°C). Esta solução foi deixada a 5°C por 12 horas para atingir o equilíbrio de dissolução do polímero. Volume apropriado de solução aquosa de GSNO (0,35mM) foi adicionado na solução de Pluronic F-127, sob agitação em banho de gelo para completa homogeneização da solução.

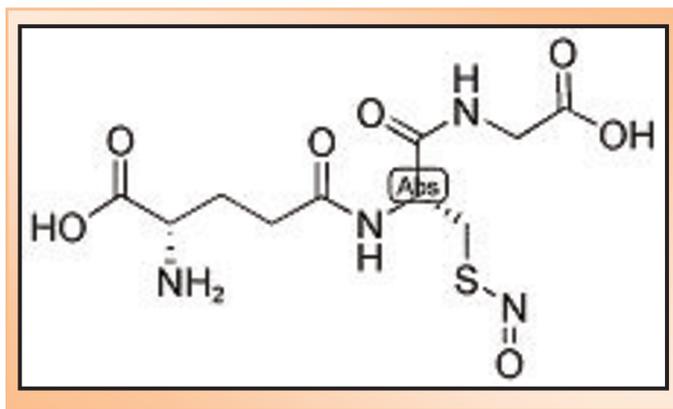


Figura 4. Molécula de S-nitrosoglutationa

## Procedimento

Os animais foram divididos em quatro grupos, conforme descrito na Tabela 1:

Tabela 1. Grupos de Tratamento

Grupo	Tratamento
1	Sol. Salina + GSNO
2	Sol. Salina + Solução polimérica
3	Sol. Salina + Sulfato de Protamina e KCl
4	Protamina e KCl + GSNO

**Grupo 1.** Dez ratas foram submetidas a duas sessões de instilação vesical de solução fisiológica 0,9% a velocidade de 0,04ml/min até que se observasse transbordamento pela uretra. O intervalo entre as instilações foi de 24 horas. A partir do dia seguinte, foram submetidas a três sessões de instilação vesical da solução polimérica contendo a S-nitrosoglutationa ( $20\mu\text{molL}^{-1}$ ), com intervalo de dois dias entre cada instilação. Cinco animais foram eutanasiados no sexto dia e os outros cinco animais foram eutanasiados no nono dia.

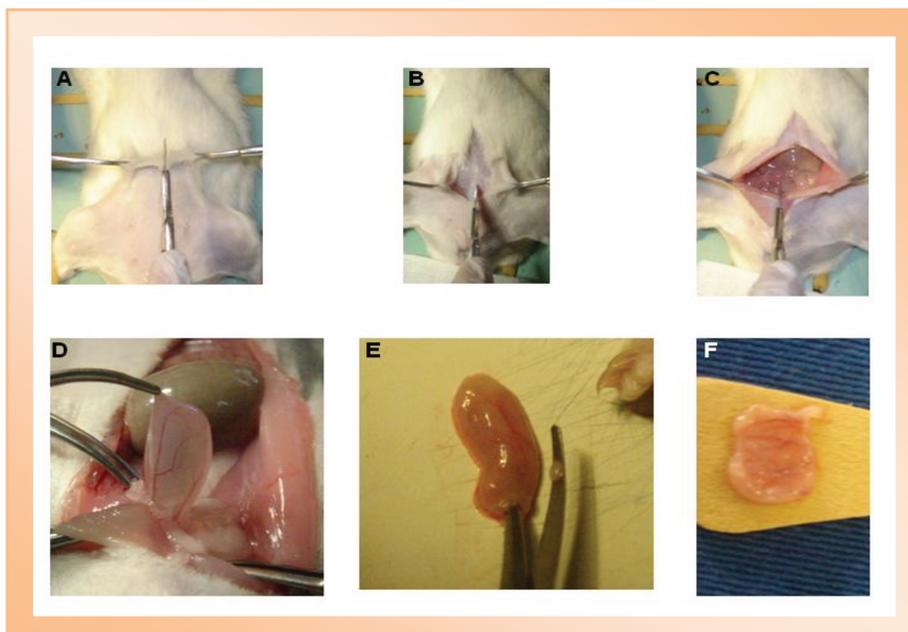
**Grupo 2.** Dez ratas foram submetidas a duas sessões de instilação vesical de solução fisiológica 0,9% a velocidade de 0,04ml/min até que se observasse transbordamento pela uretra. O intervalo entre as instilações foi de 24 horas. A partir do dia seguinte, foram submetidas a três sessões de instilação vesical da solução polimérica sem a S-nitrosoglutationa, com intervalo de dois dias entre cada instilação. Cinco animais foram eutanasiados no sexto dia, e os outros cinco animais foram eutanasiados no nono dia.

**Grupo 3.** Dez ratas foram submetidas a duas sessões de instilação vesical de solução fisiológica 0,9% a velocidade de 0,04ml/min até que se observasse transbordamento pela uretra. O intervalo entre as instilações foi de 24 horas. A partir do dia seguinte, foram submetidas a três sessões de instilação vesical de solução composta de sulfato de protamina (30mg/ml) e KCl (300mM) a velocidade de 0,04ml/min até que se observasse transbordamento pela uretra. O intervalo entre as instilações foi de 24 horas. Cinco animais foram eutanasiados no sexto dia e os outros cinco animais foram eutanasiados no nono dia.

**Grupo 4.** Dez ratas foram submetidas a duas sessões de instilação vesical de solução composta de sulfato de protamina (30mg/ml) e KCl (300mM) a velocidade de 0,04ml/min até que se observasse transbordamento pela uretra. O intervalo entre as instilações foi de 24 horas. A partir do dia seguinte, foram submetidas a três sessões de instilação vesical da solução polimérica contendo a S-nitrosoglutationa ( $20\mu\text{molL}^{-1}$ ), com intervalo de dois dias entre cada instilação. Cinco animais foram eutanasiados no sexto dia e os outros cinco animais foram eutanasiados no nono dia.

## Eutanásia dos animais, exereze da bexiga e preparo das lâminas para estudo microscópico

A eutanásia foi realizada através de dose letal de anestésico. As bexigas de todos os animais foram extraídas, abertas no sentido longitudinal, fixadas em suporte plano e imersas em solução de formalina 1% por 24 horas (Figura 5). A seguir, foram transferidas para solução de álcool a 70%. Os espécimes foram, em seguida, seccionados em cortes de 3mm, perpendiculares ao urotélio e imersos em parafina para confecção de lâminas com 5 $\mu$ m de espessura. Cada lâmina foi montada com cinco cortes, de forma a incluir todas as áreas da bexiga. Todas as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.



**Figura 5.** Preparo dos espécimes para estudo microscópico. (A, B e C) Abertura da cavidade abdominal. (D) Identificação, avaliação macroscópica e exereze da bexiga. (E) Abertura longitudinal parede anterior da bexiga. (F) fixação da bexiga em um suporte plano de madeira.

## Estudo microscópico

O estudo microscópico foi baseado na classificação apresentada a seguir<sup>21</sup>.

**Tabela 2. Classificação dos achados histológicos**

Parâmetros	Intensidade			
	Acentuada	Moderada	Discreta	Ausente
Infiltrado neutrofílico	-3	-2	-1	0
Edema	-3	-2	-1	0
Congestão Vascular	-3	-2	-1	0
Infiltrado linfomonocitário	3	2	1	0
Tecido de Granulação	3	2	1	0
Fibrose	3	2	1	0

A análise de todas as lâminas foi assessorada por um mesmo anatomopatologista, que recebeu as lâminas identificadas somente com números, sem indicação de seus grupos. Os dados foram arquivados em planilhas utilizando-se o programa MS Excel 2003.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com assessoria do Setor de Estatística da Câmara de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Foi realizada análise descritiva através de tabelas de frequências para variáveis categóricas. Para comparação de proporções foi utilizado o teste Exato de Fisher e o nível de significância adotado foi 5%.

## *Resultados*

---

## ***5. Resultados***

---

### **Avaliação macroscópica**

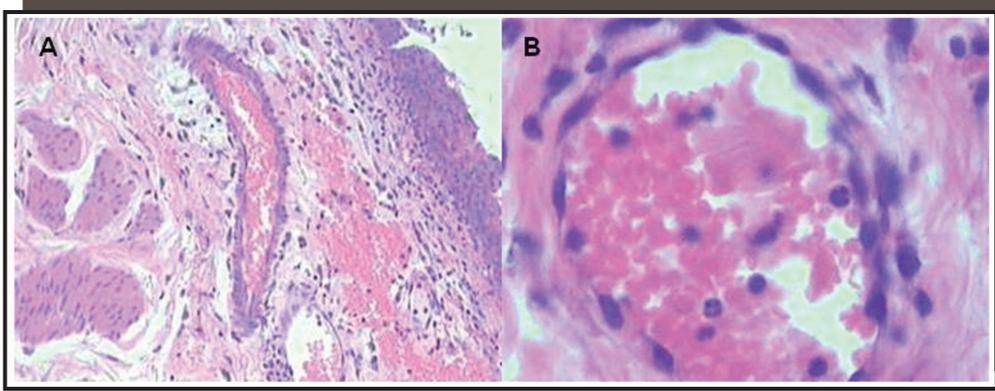
Na avaliação macroscópica observou-se edema e hiperemia da mucosa em dois os animais do grupo 1 (Sol. Salina + GSNO), em zero (0%) dos animais do grupo 2 (Solução salina + Polimérica), em dez (100%) dos animais do grupo 3 (Protamina), e em cinco (50%) dos animais do grupo 4 (Protamina + GSNO).

### **Estudo microscópico**

Foi realizada a estatística descritiva, apresentada em tabelas de frequências para todos os parâmetros histológicos estudados.

### **Congestão vascular**

Não houve diferença significativa na congestão vascular observada nos animais eutanasiados após seis dias ( $p=0,6329$ ). Nos animais avaliados após nove dias, observou-se que a congestão vascular foi significativamente menor no grupo 2 (Solução salina + Polimérica), em relação aos grupos 1 (Sol. Salina + GSNO), 3 ( Protamina) e 4 (Protamina + GSNO) ( $p=0,0035$ ) (Figura 6).



**Figura 6. Congestão vascular em animal do Grupo 4. (A) Secção da parede vesical evidenciando congestão vascular e extravasamento de hemácias intersticial. Discreto infiltrado inflamatório inespecífico (HE, 20 vezes). (B). Detalhe da congestão vascular em vênula intersticial. (HE, 40 vezes).**

Os resultados referentes à análise da congestão vascular encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3. Análise descritiva e comparação da congestão vascular entre grupos (%)**

	<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Acentuada</b>	<b>Moderada</b>	<b>Discreta</b>	<b>Ausente</b>
<b>T = 6</b>	Sol. Salina + GSNO	3	0	80	20	0
	Sol. Salina + Polimérica	4	0	0	0	100
	Protamina	4	33,3	66,67	0	0
	Protamina+ GSNO	5	40	60	0	0
	<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>-3</b>	<b>-2</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>
<b>T = 9</b>	Sol. Salina + GSNO	5	0	80	20	0
	Sol. Salina + Polimérica	5	0	0	0	100
	Protamina	3	33,3	66,67	0	0
	Protamina+ GSNO	5	40	60	0	0

## Reação Fibroblástica

Não houve diferença significativa na reação fibroblástica observada nos animais eutanasiados após seis dias ( $p= 0,3781$ ). Nos animais avaliados após nove dias, observou-se que a fibrose foi significativamente maior no grupo 4 (Protamina + GSNO), em relação aos grupos 1 (Sol. Salina + GSNO) e 2 (Sol. Salina + Polimérica) ( $p= 0,0035$ )

Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 4.

**Tabela 4. Análise descritiva e comparação da reação fibroblástica entre grupos (%)**

	<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Ausente</b>	<b>Discreta</b>
$T=6$	Sol. Salina + GSNO	3	33,33	66,67
	Sol. Salina + Polimérica	4	100	0
	Protamina	4	50	50
	Protamina + GSNO	5	60	40
	<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Ausente</b>	<b>Discreta</b>
$T=9$	Sol. Salina + GSNO	5	100	0
	Sol. Salina + Polimérica	5	100	0
	Protamina	3	33,3	66,67
	Protamina + GSNO	5	40	60

## Infiltrado neutrofílico

Em todos os grupos foi observado infiltrado neutrofílico, de intensidade variável, na avaliação realizada após seis dias. Após nove dias, houve tendência de regressão, sem evidência de infiltrado acentuado em todos os grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos dois momentos estudados ( $p= 0,7277 - T=6$ ;  $p= 0,2301 - T=9$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5. Análise descritiva e comparação de neutrófilos entre grupos (%)**

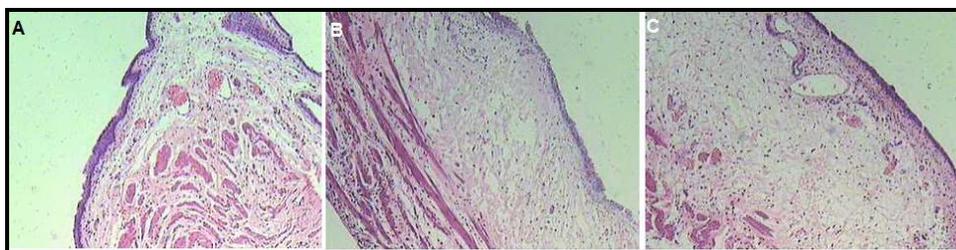
	<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Acentuada</b>	<b>Moderada</b>	<b>Discreta</b>	<b>Ausente</b>
<b>T = 6</b>	Sol. Salina + GSNO	3	33,3	66,67	0	0
	Sol. Salina + Polimérica	4	0	50	50	0
	Protamina	4	25	25	25	25
	Protamina + GSNO	5	40	20	20	20
	<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Acentuada</b>	<b>Moderada</b>	<b>Discreta</b>	<b>Ausente</b>
<b>T = 9</b>	Sol. Salina + GSNO	5	0	20	60	20
	Sol. Salina + Polimérica	5	0	20	20	60
	Protamina	3	0	66,67	0	33,33
	Protamina + GSNO	5	0	20	80	0

## Edema

Após o estímulo inicial, observou-se tendência de regressão do edema ao longo do período de observação. Não foram identificadas diferenças significativas (T6  $p = 0,8096$ ; T9  $p = 0,2478$ ) na evolução do edema entre os grupos. Os achados relativos ao edema encontram-se resumidos na Tabela 6.

**Tabela 6. Análise descritiva e comparação de edema entre grupos (%)**

	Grupo	N	Acentuada	Moderada	Discreta	Ausente
T = 6	Sol. Salina + GSNO	3	66,67	33,33	0	0
	Sol. Salina + Polimérica	4	0	50	25	25
	Protamina	4	25	25	25	25
	Protamina + GSNO	5	40	0	40	20
	Grupo	N	Acentuada	Moderada	Discreta	Ausente
T = 9	Sol. Salina + GSNO	5	0	0	40	60
	Sol. Salina + Polimérica	5	20	20	60	0
	Protamina	3	33,33	0	33,33	33,33
	Protamina + GSNO	5	0	40	60	0



**Figura 7. Edema submucoso e intersticial. (A) Leve (HE, 10 vezes). (B) Moderado (HE, 10 vezes). (C) Acentuado (HE, 10 vezes).**

## Infiltrado linfomonocitário

Os animais eutanasiados após seis dias do estímulo inicial não apresentaram diferenças significativas ( $p = 0,7253$ ). Os animais eutanasiados após nove dias apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados ( $p=0,0459$ ). O grupo tratado com GSNO + solução salina apresentou infiltrado linfomonocitário maior do que os outros. A presença de mastócitos no infiltrado inflamatório não foi observada de forma a permitir sua quantificação e comparação nos diferentes grupos de estudo (Tabela 7).

**Tabela 7. Análise descritiva e comparação da avaliação linfomonocitária entre grupos (%)**

	<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Discreta</b>	<b>Moderada</b>
T = 6	Sol. Salina + GSNO	3	33,33	66,67
	Sol. Salina + Polimérica	4	75	25
	Protamina	4	75	25
	Protamina + GSNO	5	80	20
	<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Discreta</b>	<b>Moderada</b>
T = 9	Sol. Salina + GSNO	5	80	20
	Sol. Salina + Polimérica	5	100	0
	Protamina	3	100	0
	Protamina + GSNO	5	100	0

*Discussão*

---

## *6. Discussão*

---

A cistite intersticial é uma condição que merece atenção, entre outros fatores, pela falta de critérios confiáveis para seu diagnóstico. Apesar de normalmente o diagnóstico basear-se em aspectos clínicos, a cistoscopia e a histologia são aliadas importantes para o investigador.

Além das dificuldades já citadas, é importante que seja criado um modelo experimental para estudo da cistite intersticial, dada à dificuldade em se conduzir um estudo clínico sob condições controladas, em virtude da diversidade da apresentação clínica dessa síndrome. Em um dos poucos estudos conduzidos com pacientes<sup>6</sup>, além do número limitado de pacientes estudados, houve dificuldade para a coleta de amostras. As amostras foram coletadas em pacientes que haviam sido encaminhadas para cirurgia por alguma outra condição de bexiga, assim não foi necessário submeter nenhuma paciente ao procedimento somente para coleta da amostra. Os pesquisadores introduziram 25mL de ar na bexiga das pacientes por meio de cateterismo uretral, o qual foi aspirado e analisado após cinco minutos, e a concentração de NO foi comparada com a do ar do ambiente. Apesar de o estudo ter apresentado diferenças estatisticamente significativas entre as pacientes com diagnóstico clínico de CI e as controles, tal procedimento mostrou-se tecnicamente complexo e pouco útil para emprego em pacientes na prática clínica diária.

Com base em estudos que sugeriram haver uma concentração elevada de NO em pacientes com CI<sup>2,5,6,7,20</sup>, faz-se necessário um aprofundamento no estudo de seu papel no processo inflamatório na parede vesical.

Não existem muitos modelos experimentais descritos na literatura, e muitas tentativas foram frustradas. Entre os modelos já propostos para reproduzir em âmbito experimental, a cistite intersticial aguda em animais, podem-se citar aquelas que empregaram ácido acético, ciclofosfamida, lipopolissacarídeos, sulfato de protamina e agonistas de receptores vanilóides. Todos estes indutores de cistite apresentam críticas, seja por terem causado dano muito grande à bexiga, ou por não reproduzirem o padrão inflamatório classicamente descrito na síndrome, baseado no significativo edema intersticial e intensa congestão vascular que são maiores que o do urotélio.

Baseando-se na afirmação de que o urotélio com alterações da permeabilidade e danificado permitiria a absorção de componentes da urina, que participariam do processo inflamatório da CI, houve a tentativa de desenvolver um modelo experimental que imitasse a fase aguda deste processo, com a utilização de sulfato de protamina, para quebrar a barreira urotelial, seguida da instilação vesical de cloreto de potássio, que funcionaria como indutor do processo inflamatório no interstício. A solução foi instilada em ratas adultas Sprague-Dawley (150g a 300g de peso). O grupo controle foi dividido em três, recebendo, respectivamente, solução salina, solução salina com 100mmol/L e 500mmol/L de cloreto de potássio. Após duas horas de instilação contínua das três soluções, foram analisadas as amplitudes de contrações vesicais, suas durações, frequência e intervalos entre elas. Não houve diferença funcional entre estes três grupos,

indicando que a barreira urotelial não fora afetada pelas soluções controle. A combinação da solução controle com sulfato de protamina produziu alterações inflamatórias na mucosa vesical, que levou os autores a considerarem o sulfato de protamina como o modelo experimental adequado para CI<sup>20</sup>. Consideramos que modelos no qual a resposta inflamatória concentra-se no interstício, como no presente estudo, se mostram mais adequados e podem reproduzir melhor a condição observada na clínica.

Em 2007 foi descrito um modelo de indução de cistite em ratas com administração intraperitoneal de ciclofosfamida, um agente anticancerígeno que é metabolizado em acroleína nos rins e se acumula na bexiga, produzindo efeitos tóxicos locais. Foi comprovado que essa substância não produz lesões histológicas em outros tecidos, somente no urotélio. A ciclofosfamida foi diluída em solução salina a 0,9% e administrada intraperitonealmente. Foram utilizadas doses de 200mg/kg, 300mg/kg e 400mg/kg, e concluiu-se que a dose de 300mg/kg após quatro horas da administração foi a que melhor induziu inflamação e dor<sup>12</sup>. O modelo apresenta a desvantagem de empregar uma substância com alta toxicidade, por ser anticancerígena. Ademais, a metodologia para aferição de dor em modelos animais é complexa e de difícil reprodutibilidade.

Outro estudo experimental foi conduzido em gatos que já apresentavam uma forma idiopática de CI que ocorre naturalmente e apresenta quase todas as características da CI humana. Os animais foram obtidos de doações e tinham histórico de hematúria, polaciúria e micções em locais inadequados. Após o estudo da concentração de NO nas bexigas com cistite e nas dos controles, observou-se que os níveis de NO eram significativamente maiores nas bexigas de

gatos com CI<sup>7</sup>. Apesar das semelhanças anatomopatológicas neste caso, a cistite não foi induzida, já que os animais apresentavam a condição naturalmente, o que exigiria a manutenção de uma linhagem de gatos naturalmente portadores da condição para a realização de experimentos.

O vírus PRV (pseudorabies) atenuado é um alfa-herpesvirus que sofre replicação no sistema nervoso central. Ele causou cistite em ratos quando injetado no músculo da cauda, onde reagiu com neurônios motores. A cistite induzida por PRV é um evento mediado por neurônios, ativados pela ação viral no SNC, e é associada com ativação de mastócitos. Em ratos, o PRV causa expressão urotelial de RANTES (Re-Activated in Normal, T cell-Expressed, Secreted), uma substância que aumenta a produção de mastócitos e seu acúmulo na lâmina própria do urotélio. A consequência desse acúmulo é uma inflamação da bexiga que é consistente com algumas formas de CI humana, na qual a presença de lesões uroteliais em biópsias de pacientes sugere uma perda de funcionalidade da barreira urotelial<sup>13</sup>. Neste modelo a cistite associou-se com o acúmulo de mastócitos, porém não se sabe ao certo se esse acúmulo seria a causa ou a consequência da cistite. De forma contrária, no nosso modelo de cistite causada por estresse oxidativo induzido pelo NO, não houve acúmulo de mastócitos, o que sugere que a via da resposta inflamatória não tem relação com a ativação do sistema imune.

Focando no estudo de doenças auto-imunes, um grupo decidiu aproveitar a facilidade de obtenção de ratos OVA-específicos Tg (ratos que expressam o modelo Ag OVA), que atualmente representam uma das ferramentas para estudos experimentais de indução de doenças de natureza imune. Foi aplicado o sistema

OVA no desenvolvimento de uma linha de ratos Tg (URO-OVA) que expressam OVA como auto-Ag no urotélio, o qual se mostrou útil para estudo de cistite auto-imune<sup>14</sup>. Como se considera que a cistite intersticial não representa uma única entidade do ponto de vista fisiopatológico, pesquisas como esta são importantes, para explorar os outros possíveis mecanismos envolvidos.

Também se pode encontrar na literatura a indução de cistite experimental em ratas com instilação intravesical de Substância P (SP), relacionada à transmissão de impulsos dolorosos, e lipopolissacarídeos (LPS), um dos componentes principais da membrana exterior de bactérias gram-negativas. Por se tratar de uma endotoxina, provoca uma forte resposta por parte de sistemas imune de animais normais. A SP foi instilada nas bexigas de ratas 24 horas após a exposição ao LPS. O LPS foi absorvido pelas células uroteliais e teve distribuição sistêmica. Após 24 horas da instilação, a inflamação da bexiga foi caracterizada por edema e infiltração de neutrófilos na parede da bexiga<sup>15</sup>. Estudos *in vitro* determinaram a capacidade do LPS e da SP de induzir liberação de histaminas e citocinas pela bexiga. No nosso modelo também verificamos uma forte resposta neutrofílica, que se prolongou de forma moderada e intensa até o sexto dia de observação, regredindo parcialmente após nove dias.

A cistite intersticial é uma condição habitual muito grave, com forte impacto negativo na qualidade de vida. As inúmeras terapias já propostas permitem afirmar que mais de um mecanismo fisiopatológico esteja envolvido, o que também é atestado pela freqüente necessidade de combinação de tratamentos num mesmo paciente. Os resultados encontrados no nosso estudo indicam que o presente modelo poderá contribuir para o estudo de novos alvos terapêuticos para a CI,

particularmente quando se considerar fármacos com reconhecida ação no metabolismo do NO.

*Conclusões*

---

## *7. Conclusões*

---

- A resposta inflamatória causada pela instilação vesical de solução aquosa de S-nitrosoglutathione mostrou-se similar a induzida pela instilação vesical de protamina e KCl.
- A instilação de solução aquosa de S-nitrosoglutathione pode ser considerada um novo modelo para indução experimental de cistite intersticial.

## *Referências Bibliográficas*

---

---

## ***8. Referências Bibliográficas***

---

1. Hanno P. Painful Bladder Syndrome (including Interstitial Cystitis) In: Abrams, P. Incontinence United States of America, International Continence Society, vol 2. 2005. p.1455.
2. Ho MH, Bhatia NN, Khorram O. Physiologic role of nitric oxide and nitric oxide synthase in female lower urinary tract. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16:423-9.
3. Mamas MA, Reynard JM, Brading AF. Nitric oxide and the lower urinary tract: current concepts, future prospects. *Urology* 2003; 61:1079-85.
4. Thompson AC, Christmas TJ. Interstitial cystitis--an update. *Br J Urol* 1996; 78:813-20.
5. Oktem G, Altay B, Turna B, Aktug H, Yavasoglu A, Yilmaz O, et al. Determination of nitric oxide synthase activity and apoptosis of germ cells in different obstruction models. *Acta Histochem* 2009; 111:119-26.
6. Koskela LR, Thiel T, Ehren I, De Verdier PJ, Wiklund NP. Localization and expression of inducible nitric oxide synthase in biopsies from patients with interstitial cystitis. *J Urol* 2008; 180:737-41.
7. Birder LA, Wolf-Johnston A, Buffington CA, Roppolo JR, de Groat WC, Kanai AJ. Altered inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in the bladder of cats with feline interstitial cystitis. *J Urol* 2005; 173: 625-9.

8. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology* 2003; 61:37-49.
9. Fall, M, Baranowski AP, Elneil S, Engeler D, Hughes J, et al. EAU Guidelines on Chronic Pelvic Pain. *Eur Urol* 2009.
10. Leiby BE, Landis JR, Propert KJ, Tomaszewski JE. Discovery of morphological subgroups that correlate with severity of symptoms in interstitial cystitis: a proposed biopsy classification system. *J Urol* 2007; 177:142-8.
11. Fraser MO, Chuang YC, Lavelle JP, Yoshimura N, de Groat WC, Chancellor MB. A reliable, nondestructive animal model for interstitial cystitis: intravesical low-dose protamine sulfate combined with physiological concentrations of potassium chloride. *Urology* 2001; 57:112.
12. Wantuch C, Piesla M, Leventhal L. Pharmacological validation of a model of cystitis pain in the mouse. *Neurosci Lett* 2007; 421:250-2.
13. Rudick CN, Bryce PJ, Guichelaar LA, Berry RE, Klumpp DJ. Mast cell-derived histamine mediates cystitis pain. *PLoS One*. 2008; 3:2096.
14. Liu W, Evanoff DP, Chen X, Yi Luo Y. Urinary bladder epithelium antigen induces CD8<sub>T</sub> Cell tolerance, activation, and autoimmune response. *J Immunol* 2007; 178:539-46.
15. Saban MR, Saban R, Hammond TG, Haak-Frendscho M, Steinberg H, Tengowski MW, et al: LPS-sensory peptide communication in experimental cystitis *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002; 282(2):F202-F210.
16. Mónica, FZT. Efeitos da inibição crônica de óxido nítrico em músculo liso detrusor isolado de rato. Campinas, 2009. [Dissertação – Mestrado – Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp].

17. Amadeu TP, Seabra AB, de Oliveira MG, Monte-Alto-Costa A. Nitric oxide donor improves healing if applied on inflammatory and proliferative phase. *J Surg Res* 2008; 149:84-93.
18. Seabra AB, Silva R, Oliveira MG. Polynitrosated polyesters: preparation, characterization, and potential use for topical nitric oxide release. *Biomacromolecules* 2005, 6:2512-20.
19. Paulsen SM, Wurster SH, Nanney LB. Expression of inducible nitric oxide synthase in human burn wounds. *Wound Repair Regen* 1998; 6:142-8.
20. Ehrem I, Hosseine A, Lundbrg J, Morcos I, Wiklund NP. Nitric Oxide- An Objective Marker for detection of inflammatory disorders in the urinary bladder. *Eur Urol* 2003; 2(Suppl):17.
21. Vizzotto AO, Noronha L, Scheffel DLH, Campos, ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39:143-9.
22. Fraser MO, Chuang YC, Lavelle JP, Yoshimura N, de Groat WC, Chancellor MB: A reliable, nondestructive animal model for interstitial cystitis: intravesical low-dose protamine sulfate combined with physiological concentrations of potassium chloride. *Urology*. 2001; 57(6 Suppl 1):112.

***Anexos***

---

## 9. Anexos

### 9.1. Anexo 1. Aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal



Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEA/UNICAMP

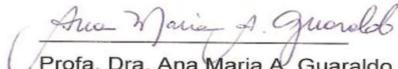
CERTIFICADO

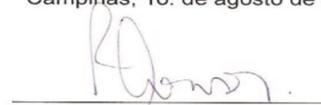
Certificamos que o protocolo nº **1295-1** sobre **“Novo modelo experimental de indução de cistite intersticial por stress oxidativo usando instilação intravesical de solução doadora de óxido nítrico”** sob a responsabilidade de **Prof. Cássio Luiz Zanettini Ricetto / Thaís Figueiredo Palma,** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/UNICAMP em **1º de agosto de 2007.**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1295-1**, entitled **“A new experimental model for inducing interstitial cystitis by oxidative stress using bladder instillation of a nitric oxide donor gel”** is in agreement with the Ethical Principles for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas – UNICAMP) on **August 1, 2007.**

Campinas, 1o. de agosto de 2007.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
Telefax: (19) 3521-6356  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

## 9.2. Anexo 2. Tabelas da Análise Estatística

Quadro 1 – Análise descritiva e comparação da congestão vascular entre grupos (soro+NO, soro+solução, protamina+solução e protamina+NO) em cada tempo (6 e 9 dias).

Tempo 6				Tempo 9			
Grupo	Congestão Vascular			Grupo	Congestão Vascular		
Frequência				Frequência			
Porcentagem				Porcentagem			
Classificação	-3	-2	Total	Classificação	-3	-2	-1
-----+				-----+			
Protamina+soluçã	2	2	4	Protamina+soluçã	1	2	0
o	12.50	12.50	25.00		3	0.00	0.00
	50.00	50.00		o	5.56	11.11	0.00
-----+				-----+			
Protamina+NO	4	1	5		16.67	33.33	66.67
	25.00	6.25	31.25			0.00	0.00
	80.00	20.00		-----+			
-----+				-----+			
Soro+NO	1	2	3	protamina+NO	2	3	0
	6.25	12.50	18.75		5	11.11	16.67
	33.33	66.67			27.78	40.00	60.00
-----+				-----+			
Soro+solução	3	1	4			0.00	0.00
	18.75	6.25	25.00	-----+			
	75.00	25.00		-----+			
-----+				-----+			
Total	10	6	16	soro+NO	0	4	1
	62.50	37.50	100.00		5	0.00	22.22
-----+				-----+			
p-valor=0.6329 (Fisher)					27.78	0.00	80.00
						20.00	0.00
				-----+			
				-----+			
				soro+solução	0	0	0
					5	0.00	0.00
						0.00	27.78
					27.78	0.00	0.00
						0.00	100.00
				-----+			
				-----+			
				soro+solução	0	0	0
					5	0.00	0.00
						0.00	27.78
					27.78	0.00	0.00
						0.00	100.00
				-----+			
				-----+			
				Total	3	9	1
				18	16.67	50.00	5.56
				100.00	27.78		
				-----+			
				-----+			
				p-valor=0.0035 (Fisher) agrupando 0 e -1			
				diferenças:			
				soro+solução e soro+NO			
				soro+solução e Protamina+solução			
				soro+solução e protamina+NO			

Quadro 2 – Análise descritiva e comparação dos neutrófilos entre grupos (soro+NO, soro+solução, protamina+solução e protamina+NO) em cada tempo (6 e 9 dias).

Tempo 6						
Grupo	Neutrófilos				p-valor=0.7277 (Fisher) agrupando -1 e 0	
Frequência						
Porcentagem						
Classificação	-3	-2	-1	0	Total	
Protamina+soluçã	1	1	1	1	4	
o	6.25	6.25	6.25	6.25	25.00	25.00
	25.00	25.00	25.00	25.00		
Protamina+NO	2	1	1	1	5	
	12.50	6.25	6.25	6.25	31.25	31.25
	40.00	20.00	20.00	20.00		
Soro+NO	1	2	0	0	3	
	6.25	12.50	0.00	0.00	18.75	18.75
	33.33	66.67	0.00	0.00		
Soro+solução	0	2	2	0	4	
	0.00	12.50	12.50	0.00	25.00	25.00
	0.00	50.00	50.00	0.00		
Total	4	6	4	2	16	16
	25.00	37.50	25.00	12.50	100.00	100.00

Tempo 9						
Grupo	Neutrófilos				p-valor=0.2301 (Fisher)	
Frequência						
Porcentagem						
Classificação	-2	-1	0	Total		
Protamina+soluçã	2	0	1	3		
o	11.11	0.00	5.56	16.67	16.67	16.67
	66.67	0.00	33.33			
protamina+NO	1	4	0	5		
	5.56	22.22	0.00	27.78	27.78	27.78
	20.00	80.00	0.00			
soro+NO	1	3	1	5		
	5.56	16.67	5.56	27.78	27.78	27.78
	20.00	60.00	20.00			
soro+solução	1	1	3	5		
	5.56	5.56	16.67	27.78	27.78	27.78
	20.00	20.00	60.00			
Total	5	8	5	18	18	18
	27.78	44.44	27.78	100.00	100.00	100.00

Quadro 3 – Análise descritiva e comparação do edema entre grupos (soro+NO, soro+solução, protamina+solução e protamina+NO) em cada tempo (6 e 9 dias).

Grupo	Edema				p-valor=0.8096 (Fisher)
Frequência					
Porcentagem					
Classificação	-3	-2	-1	0	Total
-----+-----+-----+-----+-----+					
Protamina+solução	1	1	1	1	4
	6.25	6.25	6.25	6.25	25.00
	25.00	25.00	25.00	25.00	
-----+-----+-----+-----+-----+					
Protamina+NO	2	0	2	1	5
	12.50	0.00	12.50	6.25	31.25
	40.00	0.00	40.00	20.00	
-----+-----+-----+-----+-----+					
Soro+NO	2	1	0	0	3
	12.50	6.25	0.00	0.00	18.75
	66.67	33.33	0.00	0.00	
-----+-----+-----+-----+-----+					
Soro+solução	0	2	1	1	4
	0.00	12.50	6.25	6.25	25.00
	0.00	50.00	25.00	25.00	
-----+-----+-----+-----+-----+					
Total	5	4	4	3	16
	31.25	25.00	25.00	18.75	100.00

Grupo	Edema				p-valor=0.2478 (Fisher)
Frequência					
Porcentagem					
Classificação	-3	-2	-1	0	Total
-----+-----+-----+-----+-----+					
Protamina+solução	1	0	1	1	3
	5.56	0.00	5.56	5.56	16.67
	33.33	0.00	33.33	33.33	
-----+-----+-----+-----+-----+					
protamina+NO	0	2	3	0	5
	0.00	11.11	16.67	0.00	27.78
	0.00	40.00	60.00	0.00	
-----+-----+-----+-----+-----+					
soro+NO	0	0	2	3	5
	0.00	0.00	11.11	16.67	27.78
	0.00	0.00	40.00	60.00	
-----+-----+-----+-----+-----+					
soro+solução	1	1	3	0	5
	5.56	5.56	16.67	0.00	27.78
	20.00	20.00	60.00	0.00	
-----+-----+-----+-----+-----+					
Total	2	3	9	4	18
	11.11	16.67	50.00	22.22	100.00

Quadro 4 – Análise descritiva e comparação da avaliação monomorfonuclear entre grupos (soro+NO, soro+solução, protamina+solução e protamina+NO) em cada tempo (6 e 9 dias).

Grupo	Monomorfonuclear		grupo	Monomorfonuclear	
Frequência			Frequência		
Porcentagem			Porcentagem		
Classificação		1  2	Classificação		1  2
Total			Total		
-----+-----+-----+					
Protamina+soluçã		3   1	Protamina+soluçã		3   0
4			3		
		18.75   6.25			16.67   0.00
25.00			16.67		
		75.00   25.00			100.00   0.00
-----+-----+-----+					
Protamina+NO		4   1	Protamina+NO		5   0
5			5		
		25.00   6.25			27.78   0.00
31.25			27.78		
		80.00   20.00			100.00   0.00
-----+-----+-----+					
Soro+NO		1   2	Soro+NO		4   1
3			5		
		6.25   12.50			22.22   5.56
18.75			27.78		
		33.33   66.67			80.00   20.00
-----+-----+-----+					
Soro+solução		3   1	Soro+solução		5   0
4			5		
		18.75   6.25			27.78   0.00
25.00			27.78		
		75.00   25.00			100.00   0.00
-----+-----+-----+					
Total		11 5	Total		17 1
16			18		
		68.75 31.25			94.44 5.56
100.00			100.00		
p-valor=0.7253 (Fisher)					

Quadro 5 – Análise descritiva e comparação da avaliação da fibrose entre grupos (soro+NO, soro+solução, protamina+solução e protamina+NO) em cada tempo (6 e 9 dias).

Grupo	Fibrose		Grupo	Fibrose	
Frequência			Frequência		
Porcentagem			Porcentagem		
Classificação	0	1	Classificação	0	1
Total			Total		
-----+-----+-----+					
Protamina+soluçã	2	2	Protamina+soluçã	1	2
4			3		
o	12.50	12.50	o	5.56	11.11
25.00			16.67		
	50.00	50.00		33.33	66.67
-----+-----+-----+					
Protamina+NO	3	2	Protamina+NO	2	3
5			5		
	18.75	12.50		11.11	16.67
31.25			27.78		
	60.00	40.00		40.00	60.00
-----+-----+-----+					
Soro+NO	1	2	Soro+NO	5	0
3			5		
	6.25	12.50		27.78	0.00
18.75			27.78		
	33.33	66.67		100.00	0.00
-----+-----+-----+					
Soro+solução	4	0	Soro+solução	5	0
4			5		
	25.00	0.00		27.78	0.00
25.00			27.78		
	100.00	0.00		100.00	0.00
-----+-----+-----+					
Total	10	6	Total	13	5
16			18		
	62.50	37.50		72.22	27.78
100.00			100.00		
p-valor=0.3781 (Fisher)			p-valor= <b>0.0459</b> (Fisher)		
			Diferenças:		
			protamina+NO e soro+NO		
			protamina+NO e soro+solução		

### 9.3. Artigo:

***A new experimental model for inducing interstitial cystitis by oxidative stress using bladder instillation of a nitric oxide donor gel***

Thais Figueiredo Palma, Márcia Lanzoni de Alvarenga, Amedea Barozzi Seabra, Marcelo Ganzarolli de Oliveira, Cássio Luis Zanettini Ricetto

University Hospital of State University of Campinas

Keywords: Interstitial Cystitis, Nitric Oxide,

#### **Corresponding Author:**

***Thais Figueiredo Palma***

Hospital de Clínicas da Unicamp/ Departamento de Cirurgia/Urologia

Rua Vital Brasil, 251 - 2º andar

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas - SP

CEP -13083-888

Fone: (19) 9681 0100

[thais.palma@gmail.com](mailto:thais.palma@gmail.com)

## Abstract

**Purpose** The aim of this study is to develop a new experimental model of inducing interstitial cystitis (IC) through vesical instillation of a polymeric solution containing the NO donor S-nitroglutathione (GSNO) and to compare it to the experimental interstitial cystitis induced by vesical instillation of protamine and potassium chloride.

**Material and Method** For that purpose were used 40 female Wistar rats, divided in four groups: **1** – saline solution + GSNO; **2** – Saline solution + polymeric solution (without GNSO); **3** - protamine sulphate + KCl; **4** - protamine sulphate + GSNO. The rats received one application (5 animals) or 3 applications (5 animals) of the corresponding substance through intravesical instillation, and after 6 days (5 animals) or 9 days (5 animals) they were euthanized and their bladders were removed for macroscopic evaluation and histological study. **Results** In the macroscopic evaluation we observed edema and hiperemia of the mucosa in 2 (22%) of the animals in group 1, in 0 (0%) of the animals in group 2, in 10 (100%) of the animals in group 3, and in 5 (50%) of the animals in group 4. In the protamine + KCl group and in saline + GSNO were observed similar effects on the bladder wall. The animals in group 2 (saline + polymeric) showed vascular congestion significantly smaller than the other groups after 9 days of the instillations ( $p=0.0035$ ). Significant fibrosis was observed in groups 3 and 4 after 6 days ( $p=0.3781$ ) and 9 days ( $p=0.0459$ ) after instillations, when compared to control (group 2). All groups presented neutrophilic infiltrate of variable intensities, 6 days after instillations

( $p=0.7277$ ). After 9 days, there was a regression of the infiltrate, with no evidence of accentuated neutrophilic reaction in all the groups ( $p=0.2301$ ).

**Conclusion** The inflammatory response to bladder instillation of an aqueous solution of S-nitrosoglutathione was very similar to that induced by bladder instillation of protamine and KCl. Instillation of an aqueous solution of S-nitrosoglutathione can be considered a new model for experimental induction of interstitial cystitis.

## Introduction

Interstitial cystitis (IC) is a condition characterized by bladder pain, urinary urgency, frequency and nocturia. The International Continence Society (ICS) prefers the term painful bladder syndrome defined as the supra-pubic pain related to the bladder filling, and with other symptoms as increased frequency (day and night) in the absence of urinary tract infection or some other obvious disease (1). It is known that IC affects both men and women, but it is predominantly present in women (around 90% of all the patients). (2). The main problem for the patients is the repercussion of the disease in their quality of life. (3)

Histological analysis of biopsy of the bladder wall is an important step in confirming the final diagnosis of CI. In general, there is infiltration of inflammatory cells in the submucosa, composed predominantly of lymphocytes and plasma cells, and may also contain macrophages, neutrophils, mast cells and eosinophils.

The regulation of the nitric oxide sintase enzyme (NOS) in the urine was suggested as an important factor in the immune response of IC. Other theories

include a possible infectious origin, neurogenic inflammation and histamine induced generalized visceral hypersensitivity caused by abnormalities in the immune or neuroendocrine system (4).

Because interstitial cystitis is an idiopathic disease, a new experimental model using oxidative stress would be a major advance for the understanding of this condition. Besides, it would allow for the experimental evaluation of new treatments for IC. The probable relation between nitric oxide and the IC inflammatory process leads to an attempt of producing an experimental model that is closer to reality and more reliable, with a NO donor gel to start up the inflammatory process.

The objective of this study is to present a new experimental model of IC induction by oxidative stress using a nitric oxide donor gel.

## **Material and Method**

We studied the effects of a polymeric [aqueous solution](#) of the copolymer poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) Pluronic F127, containing S-nitrosoglutathione (GSNO) as a nitric oxide donor over the bladder wall of the bladder of the rats. The GSNO is an endogenous S-nitrosothiol that acts as a carrier and donor of NO, increasing its half life.

This project was developed at our institution, after approval by the Research Ethics Committee, protocol 1296-1. The rats were accommodated in cages containing five animals each, under ideal feeding, temperature, humidity and light conditions.

A pilot study including 20 Wistar rats was made as a training process for bladder catheterization in the animals. The sample size included 40 female Wistar rats aged 3 months.

The Nitric Oxide donor chosen for this experiment is the S-nitrosoglutathione (GSNO), produced and donated by the Chemistry Institute of the State University of Campinas.

The GSNO was synthesized by reacting in equimolar amounts of glutathione with sodium nitrite in aqueous hydrochloric acid (HCl 0.5 M) under stirring in an ice bath for 40 minutes. The final solution was precipitated with acetone, filtered and washed with cold water and acetone. The precipitate formed was dried for 24 hours. The GSNO obtained was stored in the freezer (- 20 ° C) and protected from light.

Preparation of the solution containing NO Gel Pluronic F-127 (25wt%) in water containing GSNO (100  $\mu$ M) was prepared as described previously. Pluronic F-127 solid was added to cold water (5 ° C). This solution was left at 5 ° C for 12 hours to reach equilibrium dissolution of the polymer. Appropriate volume of aqueous solution of GSNO (0.35 mM) was added to the solution of Pluronic F-127 by stirring in an ice bath to complete homogenization of the solution.

The animals underwent anesthesia by the injection of sodium thiopental in the dorsal vein of the tail and then placed in the supine position, so that the antisepsis could be done with PVPI- Iode (Figure 1a,b,c,d).



**Fig. 1. A, The rats undergo tricotomy and asepsis B,The urethra is shown with tweezers. C, Insert the catheter carefully. D, Instillation of the liquid according to each group.**

**The animals were divided in four groups, as shown in tables 1, 2, 3 and 4 (Tables 1, 2, 3 and 4)**

**Table 1- Time Table of group 1**

**Group 1 . Saline Solution + GSNO**

<b>Time</b>	<b>T = 1</b>	<b>T= 2</b>	<b>T=3</b>	<b>T=6</b>	<b>T=9</b>
<b>Day</b>	1	2	3	6	9
<b>Instillation</b>	Saline Solution	Saline Solution	GSNO	GSNO	GSNO

**Table 2- Time Table of group 2**

**Group 2. Saline Solution+ Polymeric Solution**

<b>Time</b>	<b>T = 1</b>	<b>T= 2</b>	<b>T=3</b>	<b>T=6</b>	<b>T=9</b>
<b>Day</b>	1	2	3	6	9
<b>Instillation</b>	Saline Solution	Saline Solution	Polymeric Sol.	Polymeric Sol.	Polymeric Sol.

**Group 2. Saline Solution+ Polymeric Solution**

<b>Time</b>	<b>T = 1</b>	<b>T= 2</b>	<b>T=3</b>	<b>T=6</b>	<b>T=9</b>
<b>Day</b>	1	2	3	6	9
<b>Instillation</b>	Saline Solution	Saline Solution	Polymeric Sol.	Polymeric Sol.	Polymeric Sol.

**Table 3 – Time Table of group 3**

**Group 3. Saline Solution + Protamine and KCl**

<b>Time</b>	<b>T = 1</b>	<b>T= 2</b>	<b>T=3</b>	<b>T=6</b>	<b>T=9</b>
<b>Day</b>	1	2	3	6	9
<b>Instillation</b>	Saline Solution	Saline Solution	Protamine	Protamine	Protamine

**Group 3. Saline Solution + Protamine and KCl**

<b>Time</b>	<b>T = 1</b>	<b>T= 2</b>	<b>T=3</b>	<b>T=6</b>	<b>T=9</b>
<b>Day</b>	1	2	3	6	9
<b>Instillation</b>	Saline Solution	Saline Solution	Protamine	Protamine	Protamine

**Table 4 – Time Table of group 4**

**Group 4. Protamine and KCl + GSNO**

<b>Time</b>	<b>T = 1</b>	<b>T= 2</b>	<b>T=3</b>	<b>T=6</b>	<b>T=9</b>
<b>Day</b>	1	2	3	6	9
<b>Instillation</b>	Protamine	Protamine	GSNO	GSNO	GSNO

**Group 1** Ten rats underwent two sessions of bladder instillation with a 24 hours interval between them of saline solution 0,9% at 0,04 ml/min until bladder overflow is achieved and then they were injected with GSNO solution in 3 doses, 2 days between each dose and after that they were euthanized.

**Group 2** Ten rats underwent two sessions of bladder instillation with a 24 hours interval between them of saline solution 0,9% at 0,04 ml/min until bladder overflow is achieved and then they were injected with excipient solution(only the polymeric solution, without the GSNO) in 3 doses, 2 days between each dose and after that they were euthanized.

**Group 3** Ten rats underwent two sessions of bladder catheterization with a 24 hours interval between them using protamine solution (30 mg/ml) and KCl 300mM 0,04 ml/min until bladder overflow (when the maximum vesical capacity is obtained) and then they were injected with excipient solution(only polymeric solution without GSNO) in 3 doses, 2 days between each dose and after that they were euthanized.

**Group 4** Ten rats underwent two sessions of bladder catheterization with a 24 hours interval between them using protamine solution (30 mg/ml) and KCl 300mM 0,04 ml/min until bladder overflow (when the maximum vesical capacity is obtained) and then they were injected with GSNO solution in 3 doses, 2 days between each dose and after that they were euthanized.

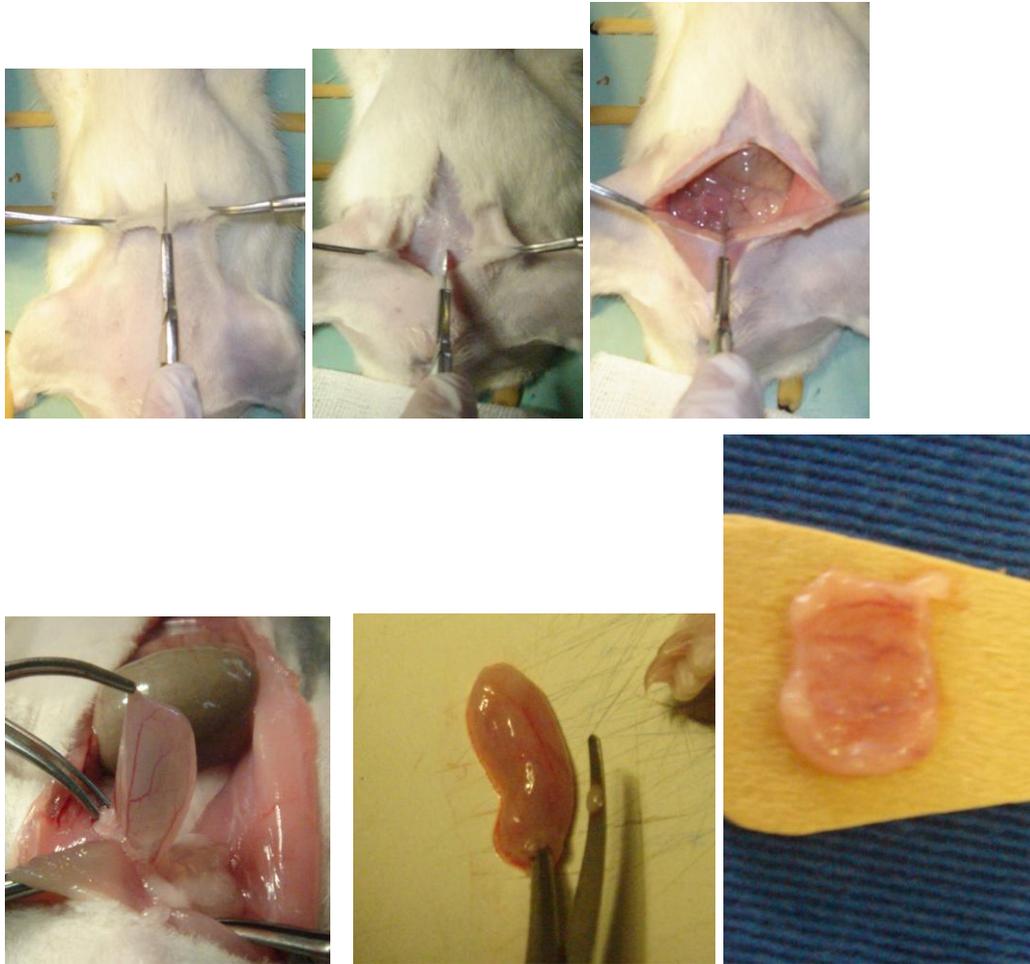
**Table 5. Groups of treatment**

Group	Treatment
1	Saline + GSNO
2	Saline+ Excipient
3	Protamine + Excipient
4	Protamine + GSNO

All the groups received the substances intravesically, until bladder overflow was achieved, which was approximately 1 mL, and the solution was not removed.

## Euthanasia

Half of the rats of each group were euthanized 24 in day six, and the other half after nine days, with lethal dose of anesthetic. Their bladders were extracted, included in paraffin and analyzed for the presence of IC.(Figure 2 a,b,c,d,e,f)



**Fig. 2. A, Skin cut. B, Muscle layer cut. C, Opening of the abdominal wall. D, Identification and removal of the bladder. E, Opening the bladder. F, The bladder is put on a stick to be fixated in formol**

## Analysis

The bladders were fixed in formaldehyde for 24 hours and then in ethylic alcohol 70%. The histological slides were made with histological cuts of 3 to 4 mm and HE stained. The pathological study was based on the following classification shown in table 6:

**Table 6. Classification of histological findings of HE**

Parameters	Severity			
	Acute	Moderate	Mild	Not Present
Neutrophilos	-3	-2	-1	0
Edema	-3	-2	-1	0
Vascular Congestion	-3	-2	-1	0
Monomorphonuclear	3	2	1	0
Granulation Tissue	3	2	1	0
Fibrosis	3	2	1	0

The analysis of the histological slides was performed by a pathologist, who received them identified only by numbers, with no indication of the groups. All the parameters of the table were analyzed and the data were analyzed statistically. Statistical analysis was performed with assistance of the Department of Statistics of the Research Board of the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas. Descriptive analysis was conducted using frequency tables for categorical variables. For comparison of proportions, the Fisher exact test was used and the level of significance was 5%.

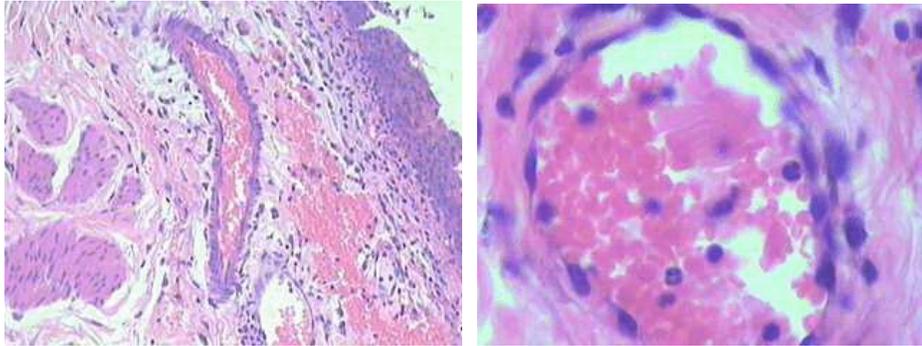
## Results

In the macroscopic evaluation we observed edema and hiperemia of the mucosa in 2 (22%) of the animals in group 1, in 0 (0%) of the animals in group 2, in 10 (100%) of the animals in group 3, and in 5 (50%) of the animals in group 4. In the protamine + KCl group and in saline + GSNO were observed similar effects on the bladder wall.

In the microscopic evaluation there was no significant difference between the groups regarding vascular congestion in the animals in T=6 days ( $p= 0.6329$ ). After 9 days, vascular congestion was significantly smaller in group 2 (saline solution + Excipient) than in groups 1, 3 and 4 ( $p= 0.0035$ ), as described in table 7.

**Table 7: Descriptive Analysis and comparison of vascular congestion among groups (%)**

		<b>Group</b>	<b>n</b>	<b>-3</b>	<b>-2</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>
T = 6		Saline + GSNO	3	0	80	20	0
		Saline + Excipient	4	0	0	0	100
		Protamine	4	33,3	66,67	0	0
		Protamine+GS NO	5	40	60	0	0
		<b>Group</b>	<b>n</b>	<b>-3</b>	<b>-2</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>
T = 9		Saline + GSNO	5	0	80	20	0
		Saline + Excipient	5	0	0	0	100
		Protamine	3	33,3	66,67	0	0
		Protamine+GS NO	5	40	60	0	0



**Fig 3. Vascular congestion in animal of Group 4. Section of the bladder wall showing vascular congestion and interstitial overflow of red blood cells. Discrete inflammatory infiltrate (HE, 20 times)**

**Fig 4. Vascular congestion in animal of Group 4. Vascular congestion in interstitial venule. (HE, 40 times)**

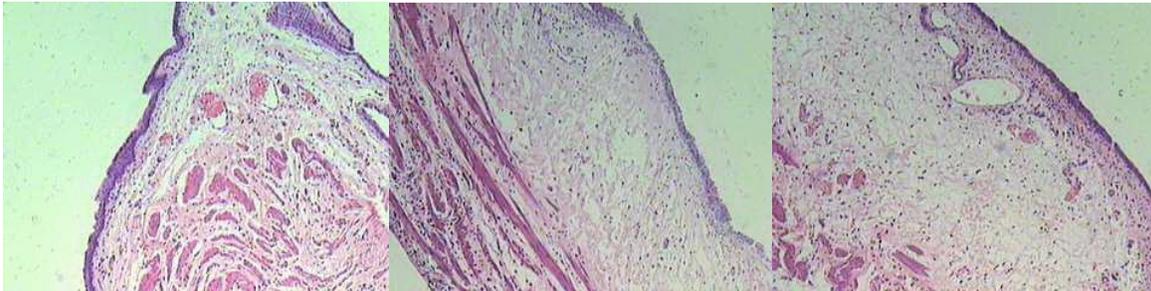
There was no difference between the groups regarding fibrosis in T=6 ( $p=0.3781$ ). After 9 days, fibrosis was significantly higher in group 4 (protamine + GSNO) when compared to groups 1 and 2 ( $p=0.0035$ ), according to table 8.

**Table 8: Descriptive analysis and comparison of fibrosis among groups (%)**

		<b>Group</b>	<b>n</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>T = 6</b>		Saline + GSNO	3	33,33	66,67
		Saline + Excipient	4	100	0
		Protamine	4	50	50
		Protamine+GS NO	5	60	40
		<b>Group</b>	<b>n</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>T = 9</b>		Saline + GSNO	5	100	0
		Saline + Excipient	5	100	0
		Protamine	3	33,3	66,67
		Protamine+GS NO	5	40	60

In all groups was observed neutrophilic infiltrate of variable intensities, after 6 days. After 9 days was observed a tendency of regression, without significant differences between groups ( $p=0.7277 - T=6$ ;  $p=0.2301 - T=9$ ).

A tendency of regression was also observed in the edema, in all groups, with no significant differences ( $T6 p = 0.8096$ ;  $T9 p = 0.2478$ ) (**Figures 5, 6 and 7**).



**Fig 5 Mild Submucosal and interstitial edema. (HE, 10 times).**

**Fig 6 Moderate Submucosal and interstitial edema (HE, 10 times).**

**Fig 7. Severe Submucosal and interstitial edema (HE, 10 times).**

The animals euthanized in T=6 did not present any significant differences regarding linfomonocitary infiltrate ( $p = 0.7253$ ). In T=9, there was a significant difference between the groups ( $p=0.0459$ ). In the group treated with GSNO + saline solution the infiltrate was bigger than in the others. The presence of mastocytes in the infiltrate was not observed in a way that allows its quantification and comparison in the groups.

## **Discussion**

Interstitial cystitis is a condition that deserves our attention, within many reasons, for the lack of reliable criteria for diagnosis. Usually a clinical diagnosis is performed, but cystoscopy and histology are also important tools for the investigator.

There are a few classifications available in the literature, but these analyses must be developed in a molecular level. For that reason the in vivo and in vitro experimental models are needed, and the ones previously described do not reproduce the inflammation properly, mostly because its cause is unknown (5).

Previous studies found higher levels of NO in patients with IC, which leads us to the need of further studies about its role in the inflammatory process (6).

Besides the already known difficulties, it is important to create an experimental model to study the IC, since it is so hard to perform a clinical trial. In one of the few trials with patients, (12), besides the small sample, there is the difficulty of collecting material from the patients. Because it causes great discomfort, the patients chosen for the trial were the ones who were already being sent to surgery for some other bladder disorder. In this case, were introduced via catheter 25mL of air in the patient's bladder and after five minutes the air was analyzed and the level of NO were compared to the one in the air of the room. The study found significant differences, proving that the patients with cystitis presented more NO than the healthy ones (7).

There aren't many experimental models of IC described in the literature, and many attempts have failed. The first projects of development of interstitial cystitis in animals used acetic acid, cyclophosphamide, lipopolysaccharides, protamine sulfate and agonist of vanilloid receptors. These substances did not produce the effects they aimed for, either because they damaged the bladder too much, or because they were not reliable.

It has been proposed that impaired barrier function of bladder epithelium and subsequent infiltration of urine contents are important initial events in the pathophysiology of IC. Fraser et al therefore sought to develop a model that would reliably mimic the acute phase of this debilitating disease. To this end, they combined

protamine sulfate (PS) treatment, thought to breakdown urothelial umbrella cell barrier function, and physiologic concentrations of potassium chloride (KCl) in an open cystometrogram animal model. Female Sprague-Dawley rats were anesthetized and transurethral continuous cystometry was performed with normal saline, and 100mmol/L KCl or 00mmol/L KCl as control. Either 10 or 30mg/mL PS was then added to the control solution for a 30-minute period (for modest and severe urothelial barrier breakdown, respectively), after which the control solution was continued for 1 to 2 hours. Bladder contraction amplitudes, durations, frequency, and intercontractile intervals were recorded and analyzed. There were no differences between the saline, 100mmol/L KCl, or 500mmol/L KCl control periods, indicating that barrier function in these animals was not affected by the physical preparation. Of the treatments tested, 100mmol/L KCl with 30mg/mL PS and 500mmol/L KCl (the physiologic concentration of rat urine) with either 10 or 30 mg/mL PS produced reliable irritation, which continued up to 2 hours after cessation of PS administration. These results indicate that the historical use of normal saline, instead of the more physiologic 500 mmol/L KCl, for cystometry greatly biases our understanding of the function of the lower urinary tract in animal models of IC; and modest, noncytotoxic insults to urothelial barrier function can result in dramatic irritative responses, given the proper physiological conditions (8).

In 2007 was described an experimental model of IC with intraperitoneal administration of cyclophosphamide, an anti-tumor agent that is metabolized into acrolein in the kidney and accumulates in the bladder to produce toxic effects, ultimately resulting in visceral pain.

This substance produces histological damage only in the urothelium. The cyclophosphamide was dissolved in 0.9% saline and administered intraperitoneally

(i.p.). Vehicle or CP was administered (200–400 mg/kg, i.p.) and spontaneous and evoked pain behaviors were evaluated simultaneously in the same mice (9).

Another experimental study was performed in cats that already presented idiopathic IC. In some cats there is naturally an idiopathic form of IC that provokes all the characteristics of human IC, including its symptoms. The animals had history of polakiuria, hematuria and micturition in inadequate locations. After the study of NO levels in both control and IC bladders, was observed that the NO levels in the IC bladders were higher (10).

Ruddick et al studied a variety of attenuated pseudorabies virus (Bartha's PRV), an  $\alpha$ -herpesvirus that is taken up by neurons and undergoes retrograde transport and viral replication within the CNS. PRV was originally shown to cause cystitis in rats when injected into the tailbase abductor caudalis dorsalis muscle and taken up by motor neurons. PRV-induced cystitis is a neurally mediated event triggered by viral action in the CNS, and the cystitis is associated with bladder mast cell activation, even though Bartha's PRV is incapable of descending sensory nerves to the bladder. In mice, PRV causes urothelial expression of RANTES (Re-Activated in Normal, T cell-Expressed, Secreted), a chemokine known to promote mast cell trafficking. Thus, the pathophysiology of murine PRV cystitis is consistent with human IC where the presence of urothelial lesions in patient biopsies correlates with IC symptoms, and many IC patients are exquisitely sensitive to instillation of nerve-depolarizing concentrations of KCl into the bladder, a finding that suggests a loss of barrier function (11).

In the literature we can also find IC induction with substance P (SP) and lipopolysaccharides (LPS). The SP was instilled in the bladders of rats 24 hours after exposure to LPS. In vitro studies determined that LPS and SP induce release of

histamine and cytokine by the bladder. The LPS was absorbed by the urothelial cells and systemically distributed. 24 hours after the instillation the bladder inflammation was characterized by edema and leukocyte infiltration on the bladder wall (12).

The probable relation between nitric oxide and the IC inflammatory process leads to an attempt of producing an experimental model that is closer to reality and more reliable, with a NO donor gel to start up the inflammatory process.

The findings in the histology of the bladders of the rats, indicating inflammation, show that it is possible to continue these tests so that the IC studies can be developed even further.

## **Conclusion**

The inflammatory response to bladder instillation of an aqueous solution of S-nitrous glutathione was very similar to that induced by bladder instillation of protamine and KCl. Instillation of an aqueous solution of S-nitrous glutathione can be considered a new model for experimental induction of interstitial cystitis.

## **References**

- Oktem G, Altay B, Turna B, Aktug, H., Yavasoglu, A., Yilmaz, O. et al.  
Determination of nitric oxide synthase activity and apoptosis of germ cells in different obstruction models. *Acta Histochem.* 2008. p.44-9.
- (2) Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths, D., Rosier, P., Ulmsteinn, U., et al. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology* 2003; 61:37-49.
- (3) Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC. DMSO: effect on bladder afferent neurons and nitric oxide release. *J Urol* 1997; 158:1989-95.

- (4) Jones CA, Nyberg L. Epidemiology of interstitial cystitis. *Urology*. 1997; 49:(5A Suppl):2-9. Review.
- (5) Cartledge JJ, Davies AM, Eardley I. A randomized double-blind placebo-controlled crossover trial of the efficacy of L-arginine in the treatment of interstitial cystitis. *BJU Int*. 2000; 85:421-6.
- (6) Erickson DR. Urine markers of interstitial cystitis. *Urology*. 2001;57: 15-21.
- [7] Koskela LR, Thiel T, Ehren I, De Verdier PJ, Wiklund NP. Localization and expression of inducible nitric oxide synthase in biopsies from patients with interstitial cystitis. *J Urol* 2008; 180:737-41.
- (8) Fraser MO, Chuang YC, Lavelle JP, Yoshimura N, de Groat WC, Chancellor MB. A reliable, nondestructive animal model for interstitial cystitis: intravesical low-dose protamine sulfate combined with physiological concentrations of potassium chloride. *Urology* 2001; 57:112-5.
- (9) Wantuch C, Piesla M, Leventhal L. Pharmacological validation of a model of cystitis pain in the mouse. *Neurosci Lett* 2007; 421: 250-22-9.
- (10) Birder LA, Wolf-Johnston A, Buffington CA, Roppolo JR, de Groat WC, Kanai AJ. Altered inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in the bladder of cats with feline interstitial cystitis. *J Urol* 2005; 173:625-9.
- (11) Ruddick C, Bryce, P, Guichellar L, Berry R, Klumpp D. Mast Cell-Derived Histamine Mediates Cystitis Pain *Plos One* May 2008.
- (12) Saban MR, Saban R, Hammond TG, Haak-Frendscho M, Steinberg H, Tengowski MW, Bjorling DE. LPS-sensory peptide communication in experimental cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Feb;282(2):F202-10.