

# Novo modelo experimental de indução de cistite intersticial por estresse oxidativo utilizando instilação intravesical de gel doador de óxido nítrico

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

Thais Figueiredo Palma<sup>1</sup>, Márcia Lanzoni de Alvarenga<sup>2</sup>, Amedea Barozzi Seabra<sup>3</sup>,  
Marcelo Ganzarolli de Oliveira<sup>4</sup>, Cássio Luis Zanettini Riccetto<sup>5</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um modelo experimental para a indução de cistite intersticial, por meio da instilação vesical de uma solução polimérica de gel doador de óxido nítrico S-nitrosoglutationa (GSNO), e compará-lo ao modelo experimental para a indução da cistite intersticial por instilação vesical de protamina e cloreto de potássio. **Métodos:** Foram utilizadas 40 ratas Wistar, divididas em quatro grupos: 1 – dez ratas tratadas com solução salina + GSNO; 2 – dez ratas tratadas com solução salina + solução de polímeros (sem GSNO); 3 – dez ratas tratadas com sulfato de protamina + KCl; 4 – dez ratas tratadas com sulfato de protamina + GSNO. As ratas receberam uma aplicação (cinco animais em cada grupo) ou três aplicações (cinco animais em cada grupo) da substância correspondente através de instilação vesical, e após seis dias (cinco animais em cada grupo) ou nove dias (cinco animais em cada grupo) foram sacrificadas, e a bexiga foi removida para exame macroscópico e estudo histológico. **Resultados:** Na avaliação macroscópica observou-se edema e hiperemia da mucosa em 2 animais (22%) do Grupo 1, em nenhum animal (0%) do Grupo 2, em 10 animais (100%) do Grupo 3, e em 5 animais (50%) do Grupo 4. No grupo protamina + KCl e no grupo solução salina + GSNO, observamos efeitos semelhantes sobre a parede da bexiga. Os animais do Grupo 2 (salina + polímeros) apresentaram significativamente menos congestão vascular que os dos outros grupos após 9 dias de instilação ( $p = 0,0035$ ). Observou-se fibrose significativa nos Grupos 3 e 4, 6 dias ( $p = 0,3781$ ) e 9 dias ( $p = 0,0459$ ) após as instilações, quando comparados com o grupo controle (Grupo 2). Todos os grupos apresentaram infiltrados neutrofílicos de intensidade variável, 6 dias após as instilações ( $p = 0,7277$ ). Após 9 dias, observou-se regressão do infiltrado, sem evidência de acentuada reação neutrofílica em todos os grupos ( $p = 0,2301$ ). **Conclusão:** A resposta inflamatória

à instilação da bexiga com uma solução aquosa de S-nitrosoglutationa foi muito semelhante àquela induzida pela instilação de protamina e KCl. A instilação de uma solução aquosa de S-nitrosoglutationa pode ser considerada um novo modelo experimental para a indução da cistite intersticial.

**Descritores:** Modelos animais de doenças; Cistite intersticial/induzido quimicamente; Protaminas/efeitos adversos; Cloreto de Potássio/efeitos adversos; Ratos Wistar

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to develop an experimental model of inducing interstitial cystitis through intravesical instillation of a polymeric solution containing the NO donor S-nitrosoglutathione (GSNO) and to compare it to the experimental interstitial cystitis induced by vesical instillation of protamine and potassium chloride. **Methods:** A total of 40 female Wistar rats were used and divided into four groups: 1 – ten rats treated with saline solution + GSNO; 2 – ten rats treated with saline solution + polymeric solution (without GSNO); 3 – ten rats treated with protamine sulphate + KCl; 4 – ten rats treated with protamine sulphate + GSNO. The rats received one application (five animals in each group) or three applications (five animals in each group) of the corresponding substance through intravesical instillation, and after six days (five animals in each group) or nine days (five animals in each group) they were euthanized and their bladders were removed for macroscopic evaluation and histological study. **Results:** In the macroscopic evaluation edema and hyperemia of the mucosa were observed in 2 (22%) animals in Group 1, in no (0%) animal in Group 2, in 10 (100%) animals in Group 3, and

Trabalho realizado na Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Mestre, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Doutora, Universidade de Taubaté – UNITAU, Taubaté (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Doutora, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Doutor, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

<sup>5</sup> Doutor, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

Autor correspondente: Thais Figueiredo Palma – E-mail: thais.palma@gmail.com

Data de submissão: 15/04/2010 – Data de aceite: 26/07/2010

in 5 (50%) animals in Group 4. In the protamine + KCl group and in saline + GSNO, similar effects were observed in the bladder wall. The animals in Group 2 (saline + polymeric solution) showed significantly less vascular congestion compared to the other groups after 9 days of the instillation ( $p = 0.0035$ ). Significant fibrosis was observed in Groups 3 and 4, 6 days ( $p = 0.3781$ ) and 9 days ( $p = 0.0459$ ) after instillations, when compared to controls (Group 2). All groups presented neutrophilic infiltrate of variable intensity, 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 with 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.

**Keywords:** Disease models, animal; Cystitis, interstitial/chemically induced; Protamines/adverse effects; Potassium chloride/adverse effects; Rats, Wistar

## INTRODUÇÃO

A cistite intersticial (CI) é uma doença caracterizada por dor vesical, urgência urinária, poliúria e noctúria. A Sociedade Internacional de Continência (ICS -, *International Continence Society*) prefere o termo “síndrome da bexiga dolorosa”, definido como dor suprapúbica relacionada ao enchimento da bexiga e associada a outros sintomas, como aumento da frequência urinária (diurna e noturna) na ausência de infecção do trato urinário ou de alguma outra evidência clara de doença<sup>(1)</sup>. Sabe-se que, embora a CI acometa tanto homens como mulheres, é predominante em mulheres (aproximadamente 90% de todos os pacientes)<sup>(2)</sup>. O maior problema para os pacientes é o impacto da doença em sua qualidade de vida<sup>(3)</sup>.

A análise histológica da biópsia da parede vesical é um passo importante para confirmar o diagnóstico final da CI. Em geral, nas camadas submucosa e muscular ocorre uma reação inflamatória, composta predominantemente de linfócitos e plasmócitos, e também por macrófagos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos.

Sugeriu-se que a regulação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na urina seja um fator importante na resposta imunológica da CI. Outras teorias incluem uma possível origem infecciosa, inflamação neurogênica e a hipersensibilidade visceral generalizada induzida pela histamina, causada por alterações nos sistemas imunológico ou neuroendócrino<sup>(4)</sup>.

Pelo fato de a cistite ser uma doença idiopática, um modelo experimental novo baseado no estresse oxidativo seria um grande avanço para entender essa afecção. Além disso, permitiria a avaliação experimental de novos tratamentos para a CI. A provável relação entre o óxido nítrico (NO) e o processo inflamatório na CI levou-nos a tentar produzir um modelo experimental uti-

lizando um gel doador de NO para induzir o processo inflamatório. Esse modelo é mais próximo à realidade e mais confiável.

## OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi apresentar um novo modelo experimental para a indução da CI por estresse oxidativo, utilizando um gel doador de óxido nítrico.

## MÉTODOS

Estudaram-se os efeitos de uma solução aquosa polimérica de copolímeros-bloco PEO-PPO-PEO (PEO = poli(óxido de etileno); PPO = poli(óxido de propileno) Plurônico F127, contendo S-nitrosoglutathione (GSNO) como doador de NO) sobre a parede da bexiga de ratas. O GSNO é um S-nitrosotiol endógeno que atua como carreador e doador de NO, aumentando sua meia-vida.

O projeto foi desenvolvido em nossa instituição, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sendo registrado sob protocolo número 1296-1. As ratas foram acomodadas em gaiolas, com cinco animais em cada uma, e foram alimentadas e mantidas sob condições ideais de temperatura, umidade e luz.

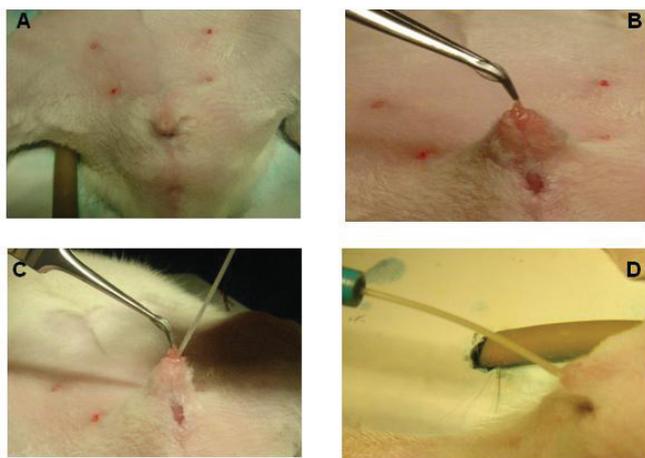
Com a finalidade de treinar a cateterização da bexiga, foi feito um estudo piloto com 20 ratas Wistar. A amostra foi composta por 40 ratas Wistar com 3 meses de idade.

O doador de NO escolhido para esse experimento foi a GSNO, produzida e doada pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas.

A GSNO foi sintetizada por meio da reação de quantidades equimolares de glutathione com nitrito de sódio em uma solução de ácido clorídrico (HCl 0,5 M), sob agitação em banho de gelo durante 40 minutos. A solução final foi precipitada com acetona, filtrada e lavada com água fria e acetona. O precipitado formado foi secado durante 24 horas. A GSNO obtida foi armazenada em um congelador (-20°C) e protegida da luz.

A solução contendo gel NO Plurônico F-127 (25% peso) em água contendo GSNO (100 µM) foi preparada conforme a descrição acima. Plurônico F-127 sólido foi adicionado à água fria (5°C). Para obter a dissolução balanceada do polímero, deixou-se a solução descansar a 5°C durante 12 horas. Adicionou-se o volume adequado de solução de GSNO (0,35 mM) à solução de plurônico F-127, agitando a mistura em banho de gelo para completar a homogeneização da solução.

Os animais foram anestesiados com injeção de tiopental sódico na veia dorsal da cauda e, em seguida, posicionados em posição supina, para permitir antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I) (Figura 1).



**Figura 1.** (A) Os ratos são submetidos à tricotomia e assepsia; (B) a uretra é exposta com pinças; (C) inserção cuidadosa da sonda; (D) instilação de líquido de acordo com cada grupo

Os animais foram divididos em quatro grupos, descritos nas tabelas 1 a 4.

**Tabela 1.** Cronograma para o Grupo 1

Solução salina + GSNO					
Tempo	T = 1	T = 2	T = 3	T = 6	T = 9
Dia	1	2	3	6	9
Instilação	Solução salina	Solução salina	GSNO	GSNO	GSNO

\*em T = 6, cinco animais foram sacrificados; GSNO: S-nitrosoglutatona.

**Tabela 2.** Cronograma para o Grupo 2

Solução salina + solução polimérica					
Tempo	T = 1	T = 2	T = 3	T = 6	T = 9
Dia	1	2	3	6	9
Instilação	Solução salina	Solução salina	Solução polimérica	Solução polimérica	Solução polimérica

\*em T = 6, cinco animais foram sacrificados.

**Tabela 3.** Cronograma para o Grupo 3

Solução salina + Protamina e KCl					
Tempo	T = 1	T = 2	T = 3	T = 6	T = 9
Dia	1	2	3	6	9
Instilação	Solução salina	Solução salina	Protamina	Protamina	Protamina

\*em T = 6, cinco animais foram sacrificados.

**Tabela 4.** Cronograma para o Grupo 4

Protamina e KCl + GSNO					
Tempo	T = 1	T = 2	T = 3	T = 6	T = 9
Dia	1	2	3	6	9
Instilação	Protamina	Protamina	GSNO	GSNO	GSNO

\*em T = 6, cinco animais foram sacrificados; GSNO: S-nitrosoglutatona.

**Grupo 1** – composto por 10 ratas submetidas a 2 sessões de instilação vesical com solução salina a 0,9% a uma velocidade de 0,04 ml/min, até extravasamento ve-

sical. O intervalo entre as duas aplicações foi de 24 horas. Posteriormente, foram submetidas à instilação de três doses de solução de GSNO, sendo que, entre a aplicação de cada dose, respeitou-se um intervalo de dois dias, e depois os animais foram sacrificados.

**Grupo 2** – composto por 10 ratas submetidas a 2 sessões de instilação vesical com solução salina a 0,9% a uma velocidade de 0,04 ml/min, até extravasamento vesical. O intervalo entre as duas aplicações foi de 24 horas. Posteriormente, foram submetidas à instilação de três doses de solução de excipiente (solução de polímeros sem GSNO), sendo que entre a aplicação de cada dose respeitou-se um intervalo de dois dias e depois os animais foram sacrificados.

**Grupo 3** – composto por 10 ratas submetidas a 2 sessões de instilação vesical com solução de protamina (30 mg/ml) e cloreto de potássio (KCl) 300 mM, a uma velocidade de 0,04 ml/min, até extravasamento vesical (quando se obtém o máximo de capacidade vesical). O intervalo entre essas duas aplicações foi de 24 horas. Posteriormente, foram submetidas à instilação de três doses de solução de excipiente (solução de polímeros sem GSNO), sendo que, entre a aplicação de cada dose, respeitou-se um intervalo de dois dias e depois os animais foram sacrificados.

**Grupo 4** – composto por 10 ratas submetidas a 2 sessões de instilação vesical com solução de protamina (30 mg/ml) e KCl 300 mM, a uma velocidade de 0,04 ml/min, até extravasamento vesical (quando se obtém o máximo de capacidade vesical). O intervalo entre essas duas aplicações foi de 24 horas. Posteriormente, foram submetidas à instilação de três doses de solução de GSNO, sendo que, entre a aplicação de cada dose, respeitou-se um intervalo de dois dias e depois os animais foram sacrificados.

Os grupos foram divididos de acordo com a tabela 5.

**Tabela 5.** Grupos de tratamento

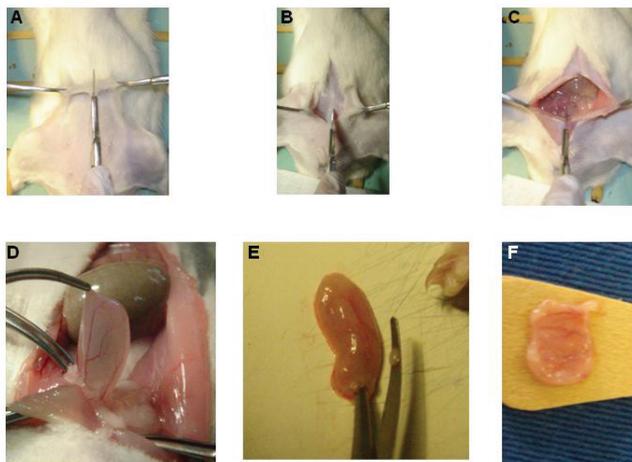
Grupo	Tratamento
1	Solução salina + GSNO
2	Solução salina + Excipiente
3	Protamina + Excipiente
4	Protamina + GSNO

GSNO: S-nitrosoglutatona.

Em todos os grupos as substâncias foram infundidas dentro da bexiga até o ponto de extravasamento desta (em média 1 ml). As substâncias permaneceram na bexiga até a próxima micção dos animais.

### Eutanásia

Metade das ratas de cada grupo foram sacrificadas 24 horas após a última instilação no dia 6, e a outra metade, após 9 dias. Para a eutanásia, usou-se uma dose letal de anestésico. As bexigas foram removidas, submetidas à inclusão em parafina e análise para a presença de CI, conforme pode ser observado na figura 2.



**Figura 2.** (A) Corte da pele; (B) corte da camada muscular; (C) abertura da parede abdominal; (D) identificação e remoção da bexiga; (E) abertura da bexiga; (F) a bexiga é preparada para ser fixada em formol

## Análise

As bexigas urinárias foram fixadas em formol durante 24 horas e depois fixadas em álcool etílico 70%. As lâminas para análise histológica foram confeccionadas com cortes de 3 a 4 mm corados com HE. O estudo patológico baseou-se na classificação apresentada na tabela 6.

**Tabela 6.** Classificação dos achados histológicos (HE)

Parâmetros	Gravidade			
	Aguda	Moderada	Leve	Ausente
Neutrófilos	-3	-2	-1	0
Edema	-3	-2	-1	0
Congestão vascular	-3	-2	-1	0
Monomorfonucleares	3	2	1	0
Tecido de granulação	3	2	1	0
Fibrose	3	2	1	0

A análise das lâminas foi feita por um patologista, que as recebeu apenas identificadas por números, sem indicação dos grupos. Analisaram-se todos os parâmetros descritos na tabela 6, e os dados foram analisados estatisticamente. A análise estatística foi feita com auxílio do Departamento de Estatística do Conselho de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. A análise descritiva foi feita utilizando-se tabelas de frequência para as variáveis categorizadas. Para comparar proporções utilizou-se o teste exato de Fisher com um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

Na avaliação macroscópica, observou-se edema e hiperemia da mucosa em 2 animais (22%) do Grupo 1, em nenhum animal (0%) do Grupo 2, em 10 animais (100%) do Grupo 3, e em 5 animais (50%) do Grupo 4. No grupo protamina + KCl e no grupo

solução salina + GSNO foram observados efeitos semelhantes sobre a parede da bexiga.

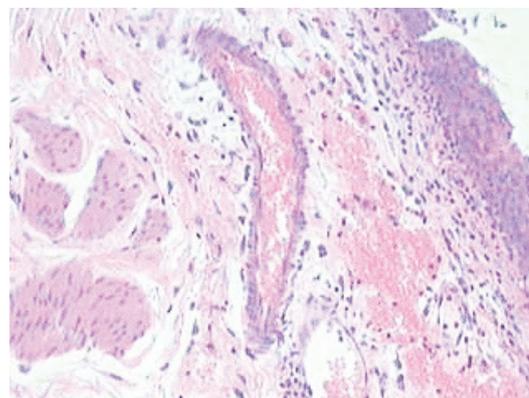
A avaliação microscópica foi feita por um patologista, de acordo com os parâmetros citados na tabela 6.

A avaliação microscópica não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à congestão vascular nos animais em T = 6 dias ( $p = 0,6329$ ). Após 9 dias, a congestão vascular foi significativamente menor no Grupo 2 (solução salina + excipiente) do que nos Grupos 1, 3, e 4 ( $p = 0,0035$ ), conforme descrição na tabela 7. A congestão vascular pode ser observada nas figuras 3 e 4.

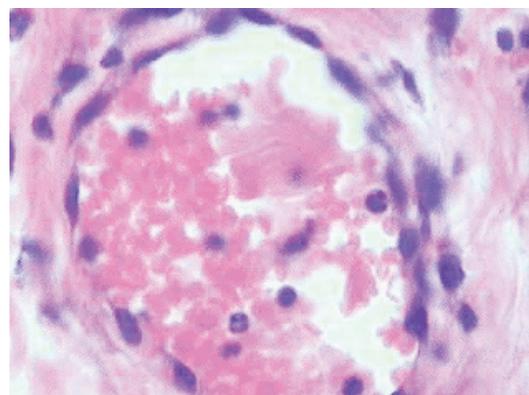
**Tabela 7.** Análise descritiva e comparação de congestão vascular entre os grupos (%)

Grupo	n	Aguda	Moderada	Leve	Ausente
Solução salina + GSNO	3	0	80	20	0
<b>T = 6</b> Solução salina + Excipiente	4	0	0	0	100
Protamina	4	33,3	66,67	0	0
Protamina + GSNO	5	40	60	0	0
Grupo	n	Aguda	Moderada	Leve	Ausente
Solução salina + GSNO	5	0	80	20	0
<b>T = 9</b> Solução salina + Excipiente	5	0	0	0	100
Protamina	3	33,3	66,67	0	0
Protamina + GSNO	5	40	60	0	0

GSNO: S-nitrosoglutatona.



**Figura 3.** Congestão vascular em animal do Grupo 4. Lâmina da parede vesical mostra congestão vascular e extravasamento intersticial de hemácias. Discreto infiltrado inflamatório (HE, 20 X)



**Figura 4.** Congestão vascular em animal do Grupo 4. Congestão vascular em vênula intersticial (HE, 40 X)

Não houve diferença entre os grupos em relação à fibrose T = 6 ( $p = 0,3781$ ). Após 9 dias, a fibrose foi significativamente maior no Grupo 4 (protamina + GSNO), quando este foi comparado aos Grupos 1 e 2 ( $p = 0,0035$ ), de acordo com a tabela 8.

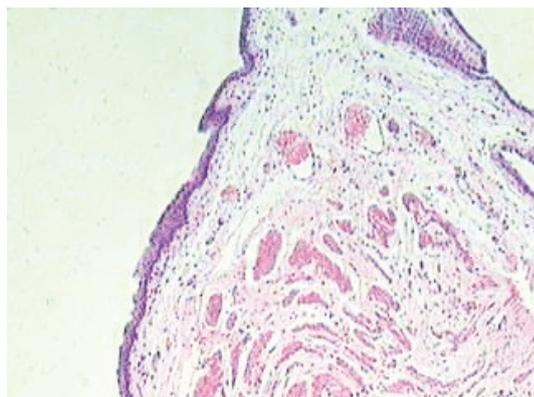
**Tabela 8.** Análise descritiva e comparação de fibrose entre os grupos (%)

	Grupo	n	Ausente	Leve
<b>T = 6</b>	Solução salina + GSNO	3	33,33	66,67
	Solução salina + Excipiente	4	100	0
	Protamina	4	50	50
	Protamina + GSNO	5	60	40
	Grupo	n	Ausente	Leve
<b>T = 9</b>	Solução salina + GSNO	5	100	0
	Solução salina + Excipiente	5	100	0
	Protamina	3	33,3	66,67
	Protamina + GSNO	5	40	60

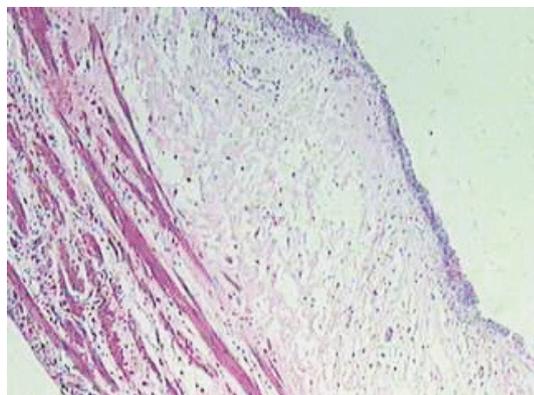
GSNO: S-nitrosoglutationa.

Após seis dias, todos os grupos apresentaram infiltrado neutrofilico de intensidade variável. Após nove dias, observou-se uma tendência de regressão sem diferenças significantes entre os grupos ( $p = 0,7277$ , T = 6;  $p = 0,2301$ , T = 9).

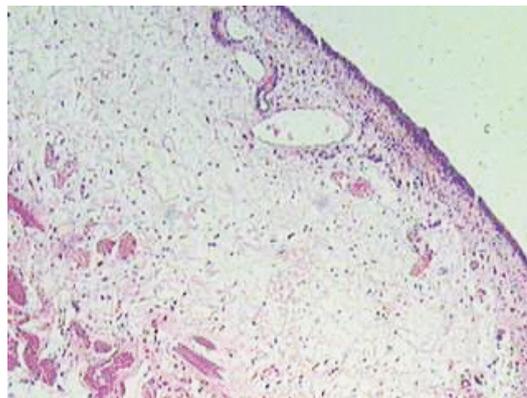
A tendência de regressão também foi observada em relação ao edema em todos os grupos, sem diferenças significantes (T = 6,  $p = 0,8096$ ; T = 9,  $p = 0,2478$ ). Edema pode ser observado nas figuras 5 a 7.



**Figura 5.** Edema submucoso e intersticial leve (HE, 10 X)



**Figura 6.** Edema submucoso e intersticial moderado (HE, 10 X)



**Figura 7.** Edema submucoso e intersticial grave (HE, 10 X)

Os animais sacrificados em T = 6 não apresentaram diferenças significantes em relação ao infiltrado mononuclear ( $p = 0,7253$ ). Em T = 9, houve diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,0459$ ). No grupo tratado com GSNO + solução salina, o infiltrado foi maior que nos demais. A presença de mastócitos no infiltrado não foi observada de forma que permitisse quantificar e fazer comparações entre os grupos.

## DISCUSSÃO

A CI é uma doença que merece nossa atenção por diversos motivos, incluindo a falta de critérios confiáveis para o diagnóstico. Geralmente, se faz o diagnóstico clínico, mas cistoscopia e histologia também são importantes ferramentas para o investigador. Há poucas classificações disponíveis na literatura, e as futuras análises devem ser desenvolvidas em nível molecular. Por essa razão, são necessários modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, já que os descritos anteriormente não reproduzem de forma adequada a inflamação, porque a causa é desconhecida na maioria das vezes<sup>(5)</sup>. Estudos anteriores encontraram níveis maiores de NO em pacientes com CI, o que demonstra a necessidade de mais estudos sobre o seu papel no processo inflamatório<sup>(6)</sup>.

Além das dificuldades já conhecidas, é importante criar um modelo experimental para estudar a CI, pois não é fácil realizar um ensaio clínico. Em um dos poucos estudos com pacientes<sup>(7)</sup>, além da amostra pequena, foi difícil coletar material dos mesmos. Por causar muito desconforto, os pacientes escolhidos para o ensaio clínico foram aqueles que seriam operados devido a algum outro problema da bexiga. Nesse caso, foram introduzidos 25 ml de ar na bexiga do paciente pela sonda e, após 5 minutos, o ar foi analisado e o nível de NO foi comparado ao do ar ambiente. O estudo encontrou diferenças significativas, provando que pacientes com cistite apresentaram mais NO que os pacientes saudáveis<sup>(8)</sup>.

Não há muitos modelos experimentais de CI descritos na literatura e muitas tentativas falharam. Os primeiros

projetos para desenvolver a CI em animais usaram ácido acético, ciclofosfamida lipopolissacárides, sulfato de protamina e agonista de receptores vaniloides. Essas substâncias não produziram os efeitos esperados, por causarem danos excessivos à bexiga ou por não serem confiáveis.

Acredita-se que o comprometimento da função de barreira do epitélio da bexiga e a subsequente infiltração de conteúdo urinário sejam eventos iniciais importantes na fisiopatologia da CI. Por isso, Fraser et al. tentaram desenvolver um modelo que imitasse de forma confiável a fase aguda dessa doença debilitante. Para tal, combinaram o tratamento com sulfato de protamina (SP), que quebra a função de barreira das células “guarda-chuva” (*umbrella cells*) e concentrações fisiológicas de KCl em modelo animal de cistometrograma aberto. Ratas Sprague-Dawley foram anestesiadas e realizou-se cistometria transuretral contínua com solução salina e 100 ou 500 mmol/l de KCl como controle. Adicionaram-se 10 ou 30 mg/ml de SP à solução controle durante 30 minutos (para quebra leve e moderada da barreira urotelial, respectivamente). Em seguida, continuou-se com a solução controle durante uma a duas horas. Foram registrados e analisados dados referentes a amplitude da contração da bexiga, duração, frequência e intervalos entre as contrações. Não houve diferença entre os períodos de controle da solução salina, 100 ou 500 mmol/l de KCl, o que indica que a preparação física não afetou a função de barreira nesses animais. Dos tratamentos testados, 100 mmol/l de KCl com 30 mg/ml de SP e 500 mmol/l de KCl (a concentração fisiológica da urina murina) tanto com 10 ou 30 mg/ml de SP produziram irritação confiável até 2 horas após o término da administração de SP. Esses resultados indicam que, historicamente, o uso de solução salina normal – em vez de uma solução mais fisiológica com 500 mmol/l KCl – para cistometria resultou em um viés considerável no nosso entendimento da função do trato urinário inferior em modelos animais de CI; e lesões discretas, não citotóxicas à função da barreira urotelial podem resultar em respostas irritativas dramáticas em condições fisiológicas adequadas<sup>(9)</sup>.

Em 2007, descobriu-se um modelo experimental de CI por meio da administração intraperitoneal de ciclofosfamida, um agente antitumoral que no rim sofre metabolização para acroleína e acumula-se na bexiga para produzir efeitos tóxicos, resultando em dor visceral. Essa substância produz danos histológicos apenas no urotélio. A ciclofosfamida foi dissolvida em solução salina a 0,9%, que foi administrada por via intraperitoneal (IP). Administrou-se veículo ou CP (200 – 400 mg/kg, IP), e avaliou-se a presença de comportamento evocado por dor simultaneamente nos mesmos camundongos<sup>(10)</sup>.

Outro estudo experimental foi feito em gatos que já apresentavam CI idiopática. Alguns gatos apresentam naturalmente uma forma idiopática de CI, com todas as ca-

racterísticas da CI humana, inclusive os sintomas. Os animais tinham histórico de polaquiúria, hematúria e micção em locais inadequados. Após o estudo dos níveis de NO em bexigas de animais controle e com CI, observou-se que os níveis de NO estavam aumentados nas bexigas com CI<sup>(11)</sup>.

Rudick et al. estudaram uma variedade de vírus atenuado da pseudorraiva (PRV) (Bartha), um homólogo do herpes vírus que é incorporado pelos neurônios e sofre transporte retrógrado e replicação viral dentro do sistema nervoso central (SNC). Inicialmente, mostrou-se que o PRV causa cistite em ratos quando injetado no músculo adutor posterior da base da cauda e é incorporado pelos neurônios motores. A cistite induzida pelo PRV é um evento mediado por neurônios e ativado pela ação do vírus no SNC, sendo a cistite associada à ativação de mastócitos, apesar de o PRV de Bartha ser incapaz de infectar os nervos sensoriais descendentes que inervam a bexiga. Em camundongos, o PRV causa a expressão urotelial de RANTES (*Re-Activated in Normal, T cell-Expressed, Secreted*), uma quimiocina conhecida por promover o tráfego de mastócitos. Assim, a fisiopatologia da cistite PRV murina é consistente com a CI humana, na qual a presença de lesões uroteliais em biópsias de pacientes está correlacionada com os sintomas de CI, sendo que muitos pacientes com CI são extremamente sensíveis a instilação vesical de concentrações de KCl que induzem a despolarização dos nervos. Um achado que sugere a perda da função de barreira<sup>(12)</sup>.

Na literatura também encontramos relatos da indução de CI com substância P e lipopolissacárides (LPS). A substância P foi instilada na vesícula de ratos 24 horas após a exposição aos LPS. Estudos *in vitro* determinaram que LPS e substância P induziram a liberação de histamina e citocina pela bexiga. O LPS foi absorvido pelas células uroteliais e, em seguida, distribuído sistemicamente. Vinte e quatro horas após a instilação, a inflamação da bexiga caracterizava-se por edema e infiltrado de leucócitos em sua parede<sup>(8)</sup>.

A provável relação entre o NO e o processo inflamatório da CI levou a uma tentativa de produzir um modelo experimental mais próximo à realidade e também mais confiável, utilizando um gel doador de NO para induzir o processo inflamatório.

Os achados histológicos sugestivos de inflamação encontrados nas bexigas urinárias de ratos demonstram que esses testes podem continuar, de modo a contribuir com o desenvolvimento de estudos da CI.

## CONCLUSÕES

A resposta inflamatória à instilação da bexiga com uma solução aquosa de GSNO foi muito semelhante àquela induzida pela instilação de protamina e KCl. A instilação de uma solução aquosa de GSNO pode ser considerada um novo modelo experimental para a indução da CI.

## REFERÊNCIAS

1. 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.* 2000;111(2):119-26.
2. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsteinn U, Van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A; Standardisation Sub-Committee of the International Continence Society. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology.* 2003;61(1):37-49.
3. Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC. DMSO: effect on bladder afferent neurons and nitric oxide release. *J Urol.* 1997;158(5):1989-95.
4. Jones CA, Nyberg L. Epidemiology of interstitial cystitis. *Urology.* 1997;49(5A Suppl):2-9.
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(4):421-6.
6. Erickson DR. Urine markers of interstitial cystitis. *Urology.* 2001;57(6 Suppl 1):15-21.
7. Koskela LR, Thiel T, Ehrén 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(2):737-41.
8. 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):F202-10.
9. 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.
10. Wantuch C, Piesla M, Leventhal L. Pharmacological validation of a model of cystitis pain in the mouse. *Neurosci Lett.* 2007;421(3):250-2.
11. 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(2):625-9.
12. Rudick CN, Bryce PJ, Guichelaar LA, Berry RE, Klumpp DJ. Mast cell-derived histamine mediates cystitis pain. *PLoS One.* 2008;3(5):e2096.