

ARTÍCULO ORIGINAL

Un nuevo modelo experimental de inducción de cistitis intersticial mediante estrés oxidativo empleando instilación vesical de un gel donante de óxido nítrico

T.F. Palma*, A. Seabra, S.C. Souto, L. Maciel, M. Alvarenga, R. Siniscalchi, M. Ganzarolli y C. Ricetto

Hospital Clínico Universitario de la Universidad Estatal de Campinas, Brasil

Recibido el 25 de mayo de 2010; aceptado el 27 de mayo de 2010

PALABRAS CLAVE

Cistitis intersticial;
Óxido nítrico;
Modelo *in vivo*

Resumen

Objetivo: La principal finalidad de este estudio es el desarrollo de un nuevo modelo experimental para la inducción de cistitis intersticial (CI) mediante la instilación vesical de una solución polimérica que contiene el S-nitrosoglutatión donante de óxido nítrico (GSNO), y su comparación con la cistitis intersticial experimental inducida por instilación vesical de protamina y cloruro potásico.

Material y métodos: Para la consecución de nuestro objetivo utilizamos 40 hembras de rata Wistar divididas en cuatro grupos: a) solución salina + GSNO; b) solución salina + solución polimérica (sin GSNO); c) sulfato de protamina + KCl; y d) sulfato de protamina + GSNO. Se realizó bien una aplicación a las ratas (5 animales), bien 3 aplicaciones (5 animales) de la sustancia correspondiente mediante instilación vesical, y al cabo de 6 días (5 animales) o 9 días (5 animales) se les practicó la eutanasia y se les extrajeron las vejigas para su evaluación macroscópica y estudio histológico.

Resultados: En términos de evaluación macroscópica observamos edema e hiperemia de la mucosa en dos (22%) de los animales del grupo 1, en 0 (0%) de los del grupo 2, en 10 (100%) de los del 3 y en 5 (50%) de los animales del grupo 4. En el grupo de protamina + KCl y en solución salina + GSNO se observaron efectos similares en la pared vesical. Los animales del grupo 2 (solución salina + polimérica) mostraban congestión vascular, bastante menos significativa que en el resto después de 9 días de instilaciones ($p=0,0035$). Se observó un aumento de la fibrosis tras las instilaciones en los grupos 3 y 4 a los 6 días ($p=0,3781$) y a los 9 días ($p=0,0459$) respectivamente, en comparación con los controles (grupo 2). En todos los grupos aparecía un infiltrado de neutrófilos con intensidad variable a los 6 días de las instilaciones ($p=0,7277$). Al cabo de 9 días se producía una regresión del infiltrado, y sin evidencias de reacción neutrofílica marcada en todos los grupos ($p=0,2301$).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: thais.palma@gmail.com (T.F. Palma).

KEYWORDS

Interstitial Cystitis;
Nitric Oxide;
In vivo model

Conclusión: La respuesta inflamatoria a la instilación vesical de una solución acuosa de S-nitrosoglutatión fue muy parecida a la inducida por la instilación vesical de protamina y KCl. La instilación de una solución acuosa de GSNO puede considerarse un nuevo modelo para la inducción experimental de cistitis intersticial.

© 2010 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

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

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-nitrosoglutathione (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 40 female Wistar rats were used, divided in four groups: 1. saline solution + GSNO; 2. saline solution + polymeric solution (without GSNO); 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 hyperemia 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 similar effects were observed on the bladder wall. The animals in group 2 (saline + polymeric) showed vascular congestion, significantly smaller than the rest after 9 days instillations ($p=0.0035$). Significant increased fibrosis was observed after instillations in groups 3 and 4, after 6 days ($p=0.3781$) and 9 days ($p=0.0459$) respectively, when compared to control (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 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 GSNO can be considered a new model for experimental induction of interstitial cystitis.

© 2010 AEU. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La cistitis intersticial (CI) es una dolencia caracterizada por dolor vesical, urgencia urinaria, frecuencia y nocturia. La *International Continence Society* (ICS) prefiere el empleo del término síndrome de vejiga dolorosa, que se definiría como el dolor suprapúbico asociado al llenado de la vejiga y a otros síntomas tales como aumento en la frecuencia (durante el día y la noche) en ausencia de infección del tracto urinario u otras enfermedades obvias¹. Se sabe que la CI afecta tanto a hombres como a mujeres, pero predomina sobre todo en estas últimas (en torno al 90% del total de pacientes)². El principal problema para los pacientes es la manera en que la enfermedad afecta negativamente a su calidad de vida³.

Se ha apuntado la regulación de la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS) como un factor de peso en la respuesta inmune frente a la CI. Otras teorías serían un posible origen infeccioso, inflamación neurogénica e hipersensibilidad visceral generalizada inducida por histamina y producida por anomalías de los sistemas inmune o neuroendocrino⁴.

Para la comprensión de esta afección idiopática un nuevo modelo experimental que se sirviese del estrés oxidativo supondría un enorme avance. Asimismo, permitiría la

evaluación experimental de nuevos tratamientos. El objetivo del presente estudio es presentar un nuevo modelo experimental de inducción de la CI por estrés oxidativo y con el uso de un gel donante de óxido nítrico.

Materiales y métodos

Hemos estudiado los efectos que podría tener sobre la pared vesical de ratas Wistar una solución acuosa polimérica a base del copolímero poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) plurónico F127 conteniendo S-nitrosoglutatión (GSNO) como donante de óxido nítrico. El GSNO es un S-nitrosotiol que actúa como portador y donante de NO aumentando su vida media. El proyecto se desarrolló en nuestra institución tras aprobación por parte del Comité de ética en la investigación y de acuerdo con el protocolo 1296-1. Se alojó a las ratas en jaulas con 5 animales cada una y en condiciones de alimentación, temperatura, iluminación y humedad ideales.

Como proceso de formación para la cateterización de la vejiga de los animales se realizó un estudio piloto con 20 ratas Wistar. En la muestra se incluyeron 40 hembras de rata Wistar de 3 meses de edad. El donante de NO elegido para

este experimento es el S-nitrosoglutatión (GSNO), producido y donado por el Instituto de Química de la Universidad Estatal de Campinas. La síntesis del GSNO se llevó a cabo haciendo reaccionar cantidades equimolares de glutatión con nitrito sódico en ácido hidrociorídico acuoso (HCl 0,5M) y en agitación durante 40 minutos en un baño de hielo. La solución final se precipitó con acetona, filtrándose y lavándose con agua fría y acetona. Se dejó secar el precipitado obtenido durante 24 horas. El GSNO así obtenido se guardó en congelador (- 20°C) protegiéndolo de la luz.

La preparación de la solución del gel de NO plurónico F-127 (25 wt%) en agua con GSNO (100 µM) se realizó en la forma anteriormente descrita. Se añadió plurónico F-127 sólido a agua fría (5°C). Dicha solución permaneció a 5°C durante 12 horas hasta alcanzar una disolución equilibrada del polímero. Se añadió a la solución de plurónico F-127 un volumen adecuado de solución acuosa de GSNO (0,35 mM), agitándola en un baño de hielo para completar su homogeneización. Se anestesió a los animales con una inyección de pentotal sódico en la vena dorsal de la cola y colocándolos a continuación en posición supina para poder realizar la antisepsia con povidona yodada.

Distribución de los grupos

Se procedió a la instilación de acuerdo con la división de los animales en 4 grupos, como muestra la **tabla 1**. En todos los grupos se infundieron las distintas sustancias intravesicalmente (**fig. 1**), hasta conseguir el rebosamiento vesical (1 ml de media). Las sustancias se mantuvieron en la vejiga hasta la siguiente micción de los animales.

1. Grupo 1: se aplicaron a 10 ratas dos sesiones de instilación vesical de solución salina al 0,9% y a 0,04 ml/min con intervalos de 24 horas entre ellas hasta llegar al rebosamiento vesical, para después inyectarles la solución de GSNO en tres dosis, con un intervalo de dos días entre cada dosis, siendo sacrificadas a continuación.
2. Grupo 2: se aplicaron a 10 ratas dos sesiones de instilación vesical de solución salina al 0,9% y a 0,04 ml/min con

intervalos de 24 horas entre ellas hasta llegar al rebosamiento vesical, para después inyectarles la solución de excipiente (sólo la solución polimérica, sin GSNO) en tres dosis, con un intervalo de dos días entre cada dosis, siendo sacrificadas a continuación.

3. Grupo 3: se aplicaron a 10 ratas dos sesiones de cate-terización vesical de solución de protamina (30 mg/ml) y de 300mM de KCL a 0,04 ml/min con intervalos de 24 horas entre ellas hasta llegar al rebosamiento vesical (el momento en que se llegó a la máxima capacidad de la vejiga), para después inyectarles la solución de excipiente (sólo la solución polimérica, sin GSNO) en tres dosis, con un intervalo de dos días entre cada dosis, siendo sacrificadas a continuación.
4. Grupo 4: se aplicaron a 10 ratas dos sesiones de cate-terización vesical de solución de protamina (30 mg/ml) y de 300mM de KCL a 0,04 ml/min con intervalos de 24 horas entre ellas hasta llegar al rebosamiento vesical (el momento en que se llegó a la máxima capacidad de la vejiga), para después inyectarles la solución de GSNO en tres dosis, con un intervalo de dos días entre cada dosis, siendo sacrificadas a continuación.

Análisis

Se sacrificó a la mitad de las ratas de cada grupo con una dosis letal de anestésico el sexto día, sacrificándose la otra mitad a los 9 días. Se diseccionaron las capas cutánea y muscular, abriéndose la pared abdominal. Se procedió a identificar y extraer la vejiga (**fig. 2**). Tras la apertura de la vejiga se preparó para su fijación en formaldehído durante 24 horas, y después en alcohol etílico al 70%, antes de introducirla en parafina y analizar la presencia o ausencia de CI. Los portas histológicos se hicieron con cortes histológicos de entre 3 y 4 micrómetros de ancho, tiñéndose con HE. El estudio patológico se basó en la clasificación siguiente de acuerdo con los grupos terapéuticos (**tablas 2 y 3**).

El análisis de los portas histológicos fue realizado por un patólogo, que los recibió identificados únicamente por números y sin indicación alguna de grupo. Se procedió al

Tabla 1 Distribución temporal para los grupos 1 a 4

Grupo 1. Solución salina + GSNO					
Hora	T = 1	T = 2	T = 3	T = 6	T = 9
Día instilación	1	2	3	6	9
	Solución salina	Solución salina	GSNO	GSNO	GSNO
Grupo 2. Solución salina + solución polimérica					
Hora	T = 1	T = 2	T = 3	T = 6	T = 9
Día instilación	1	2	3	6	9
	Solución salina	Solución salina	Sol. polimérica	Sol. polimérica	Sol. polimérica
Grupo 3. Solución salina + protamina y KCl					
Hora	T = 1	T = 2	T = 3	T = 6	T = 9
Día instilación	1	2	3	6	9
	Solución salina	Solución salina	Protamina	Protamina	Protamina
Grupo 4. Protamina y KCl + GSNO					
Hora	T = 1	T = 2	T = 3	T = 6	T = 9
Día instilación	1	2	3	6	9
	Protamina	Protamina	GSNO	GSNO	GSNO

*En T = 6 se sacrificaron 5 animales.

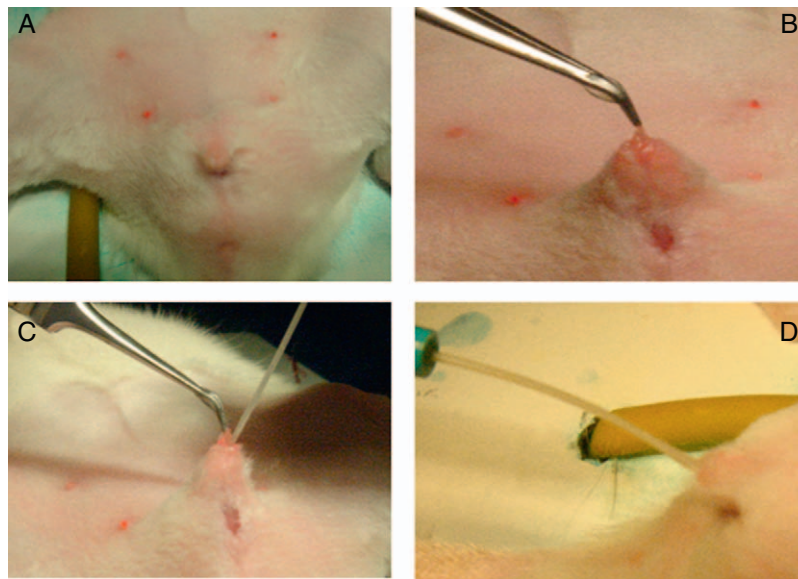


Figura 1 A. Se somete a las ratas a tricotomía y asepsia. B. La uretra se muestra con pinzas. C. Inserción cuidadosa del catéter. D. Instilación del líquido en la forma correspondiente a cada grupo.

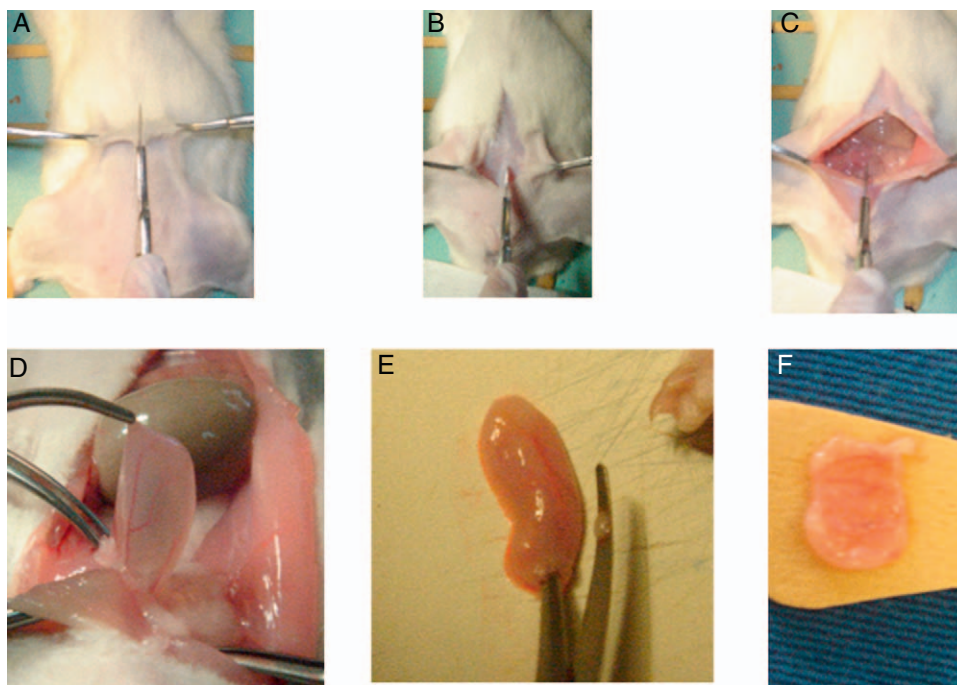


Figura 2 A. Incisión de la piel. B. Disección de la capa muscular. C. Apertura de la pared abdominal. D. Identificación y extracción de la vejiga. E. Apertura de la vejiga. F. La vejiga se coloca en un bastoncillo para su fijación en formol.

análisis de todos los parámetros de la tabla, realizándose también el análisis estadístico de los datos. Este último se hizo con ayuda del Departamento de Estadística del Comité de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Estatal de Campinas. El análisis descriptivo se realizó empleando tablas de frecuencia para las variables de categorías. En cuanto a la comparación de proporciones se utilizó la prueba exacta de Fisher, siendo el nivel de significación del 5%.

Resultados

Macroscópicamente observamos edema e hiperemia de la mucosa en dos (22%) de los animales del grupo 1, en 0 (0%) de los animales del grupo 2, en 10 (100%) de los animales del grupo 3 y en 5 (50%) de los animales del grupo 4. En el grupo de protamina + KCl y en el de solución salina + GSNO se observaron efectos similares en la pared vesical. La evaluación microscópica fue realizada por

Tabla 2 Grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento
1	Salina + GSNO
2	Salina+ excipiente
3	Protamina + excipiente
4	Protamina + GSNO

Tabla 3 Clasificación de los resultados histológicos con HE

Parámetros	Gravedad			
	Aguda	Moderada	Leve	Sin presencia
Neutrófilos	3	2	1	0
Edema	3	2	1	0
Congestión vascular	3	2	1	0
Monomorfonucleares	3	2	1	0
Tejido granulado	3	2	1	0
Fibrosis	3	2	1	0

un patólogo, de acuerdo con los parámetros indicados en la **tabla 3**.

A nivel microscópico no se encontraron diferencias significativas entre los grupos respecto a congestión vascular en los animales al sexto día ($p=0,6329$). A los 9 días la congestión vascular se había reducido de forma significativa en el grupo 2 (solución salina + excipiente) en comparación con los grupos 1, 3 y 4 ($p=0,0035$) (**tabla 4**). No se observaron diferencias entre los grupos en cuanto a fibrosis el día 6 ($p=0,3781$). Al cabo de 9 días la fibrosis era mucho mayor

en el grupo 4 (protamina + GSNO) en comparación con los grupos 1 y 2 ($p=0,0035$) (**tabla 5**).

Se observó un infiltrado de neutrófilos de intensidad variable en todos los grupos a los 6 días ($p=0,7277$), así como tendencia a la regresión a los 9 días, sin que se llegase a diferencias con relevancia estadística entre los grupos ($p=0,2301$). También se observó tendencia a la regresión en todos los grupos en cuanto a la presencia de edema, sin observarse tampoco diferencias significativas ($p=0,8096$ a los 6 días; $p=0,2478$ a los 9 días). Los animales sacrificados el 6 día no mostraron diferencias significativas en cuanto al infiltrado linfomonocitario ($p=0,7253$); no obstante, sí que se observó una diferencia significativa entre grupos el día 9 ($p=0,0459$). En el grupo tratado con GSNO + solución salina el infiltrado aparecía en mayor extensión que en el resto. No se observó entre grupos una presencia diferencial de mastocitos en el infiltrado.

Exposición

La CI es una dolencia merecedora de atención clínica, sobre todo por la inexistencia de criterios diagnósticos fiables. Los modelos clásicos no reproducen adecuadamente el estado inflamatorio, sobre todo por desconocimiento de la causa⁵. En estudios anteriores se encontraron niveles de NO más altos en estos pacientes⁶; sin embargo, son muchas las dificultades en la recogida de material procedente de los pacientes incluidos en estudios clínicos, ya que produce gran malestar. Se hizo un estudio en pacientes en los que se introdujeron 25 ml de aire en la vejiga mediante un catéter, comparándose el nivel de NO con el del aire en la sala. Las

Tabla 4 Análisis descriptivo y comparación de la congestión vascular entre grupos (%)

T = 6	Grupo	N	Aguda	Moderada	Leve	Sin presencia
	Salina + GSNO	3	33,3	66,67	0	0
	Salina + excipiente	4	75	25	0	0
	Protamina	4	50	50	0	0
	Protamina+GSNO	5	80	20	0	0
T = 9	Grupo	N	Aguda	Moderada	Leve	Sin presencia
	Salina + GSNO	5	0	80	20	0
	Salina + Excipiente	5	0	0	0	100 (*)
	Protamina	3	33,3	66,67	0	0
	Protamina+GSNO	5	40	60	0	0

(*): Reducida en el grupo 2 (solución salina + excipiente) en comparación con los grupos 1, 3 y 4 ($p=0,0035$).

Tabla 5 Análisis descriptivo y comparación de la fibrosis entre grupos (%)

T = 6	Grupo	N	Sin presencia	Leve
	Salina + GSNO	3	33,33	66,67
	Salina + excipiente	4	100	0
	Protamina	4	50	50
	Protamina +GSNO	5	60	40
T = 9	Grupo	N	Sin presencia	Leve
	Salina + GSNO	5	100	0
	Salina + Excipiente	5	100	0
	Protamina	3	33,3	66,67
	Protamina +GSNO	5	40	60 (*)

(*): Aumentada en el grupo 4 (protamina + GSNO) en comparación con los grupos 1 y 2 ($p=0,0035$).

diferencias encontradas resultaron ser significativas, probándose que el nivel de NO en pacientes con cistitis es mayor que en individuos sanos⁷.

Son escasos los modelos experimentales de CI que pueden encontrarse en la bibliografía. En los primeros proyectos de desarrollo de cistitis intersticial en animales se empleó ácido acético, ciclofosfamida, lipopolisacáridos, sulfato de protamina y agonista de los receptores vanilloides. Estas sustancias no produjeron los efectos perseguidos, bien porque dañaban demasiado la vejiga, bien por su escasa fiabilidad. Fraser et al se plantearon el desarrollo de un modelo que imitase de forma fiable la fase aguda de esta enfermedad debilitante⁸, y al fin combinaron el tratamiento con sulfato de protamina (SP), que se cree que rompe la función de barrera de las células paraguas del urotelio, con concentraciones fisiológicas de cloruro de potasio (KCl) en un modelo animal con cistometrograma abierto. Se anestesiaron hembras de rata Sprague-Dawley realizándose una cistometría continua transuretral con solución salina normal, y con 100 mmol/l de KCl o 0 mmol/l de KCl como control. A continuación se añadieron 10 o 30 mg/ml de SP a la solución control a lo largo de un periodo de 30 minutos (para la ruptura moderada y grave de la barrera urotelial, respectivamente), tras lo cual se siguió con la solución salina entre una y dos horas. Se consignaron y analizaron las amplitudes, duraciones y frecuencia de contracción de la vejiga, así como los intervalos entre contracciones. No se encontraron diferencias entre los periodos de solución salina y los periodos de control a 100 mmol/l de KCl o a 500 mmol/l KCl, lo que indicaría que la preparación física no afectaba a la función de la barrera en estos animales. De los tratamientos probados, los 100 mmol/l de KCl con 30 mg/ml de SP y 500 mmol/l de KCl (la concentración fisiológica de la orina de la rata) con 10 o 30 mg/ml de SP produjeron una irritación comprobable, que se mantuvo hasta dos horas tras la interrupción de la administración de SP. Estos resultados indican que el uso histórico de la solución salina normal, en lugar de la más fisiológica de 500 mmol/l de KCl, sesgan en buena medida en la cistometría nuestra interpretación de la funcionalidad del tracto urinario inferior en modelos animales de CI; y que agresiones modestas no citotóxicas sobre la funcionalidad de la barrera urotelial pueden producir respuestas irritativas acusadas, en presencia de las condiciones fisiológicas adecuadas⁸.

En 2007 se describió un modelo experimental de CI con administración intraperitoneal de ciclofosfamida (CF). Esta sustancia antitumoral se metaboliza en acroleína en el riñón, acumulándose en la vejiga con efecto tóxico, que acaba por producir dolor visceral. Esta sustancia produce daño histológico únicamente en el urotelio al disolverse en solución salina al 0,9% y administrarse intraperitonealmente (i.p.). Se administró un vehículo o CP (200-400 mg/kg, i.p.), evaluándose simultáneamente en el mismo roedor las conductas espontáneas y provocadas asociadas al dolor⁹.

Otro estudio experimental es el realizado en gatos que ya presentaban CI idiopática. En algunos gatos se da de manera natural una forma idiopática de CI que genera todas las características propias de la CI humana, incluyendo sus síntomas. Los animales tenían un historial de polaquiuria, hematuria y micción en lugares inapropiados. Después de

estudiar los niveles de NO en las vejigas, tanto control como con CI, se observó que los niveles de NO en las vejigas con CI eran superiores¹⁰. Otros modelos experimentales de CI incluirían el uso de virus atenuado de pseudorrabia (PRV de Bartha), un α -herpesvirus que absorben las neuronas y que pasa por transporte retrógrado y replicación viral en el sistema nervioso central, e inducción de CI con sustancia P y lipopolisacáridos que inducen la liberación de histamina y citoquina por la vejiga^{9, 10}. La posible relación entre el NO y los procesos inflamatorios propios de la CI supone un modelo experimental más próximo a la realidad con el uso de un gel donante de NO que promueva el inicio del proceso inflamatorio. La respuesta inflamatoria a la instilación vesical de una solución acuosa de S-nitrosoglutatión (GSNO) fue muy similar a la inducida por la instilación vesical de SP y KCl. Por consiguiente, la instilación de GSNO puede considerarse un nuevo modelo de inducción experimental de cistitis intersticial en ratas.

Conflicto de interes

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- 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;111:119–26.
- 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.
- Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC. DMSO: effect on bladder afferent neurons and nitric oxide release. *J Urol.* 1997;158:1989–95.
- Jones CA, Nyberg L. Epidemiology of interstitial cystitis. *Urology.* 1997;49(5A Suppl):2–9.
- 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.
- Erickson DR. Urine markers of interstitial cystitis. *Urology.* 2001;57:15–21.
- 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.
- 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.
- Wantuch C, Piesla M, Leventhal L. Pharmacological validation of a model of cystitis pain in the mouse. *Neurosci Lett.* 2007;421:250–2.
- 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.