ANDRÉ MATOS DE OLIVEIRA

**Papel da atividade física e da dieta nas alterações vesicais
funcionais e moleculares: estudo em modelo experimental
murino**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, André Matos de
Papel da atividade física e da dieta nas
alterações vesicais funcionais e moleculares :
estudo em modelo experimental murino / André Matos
de Oliveira. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.
Orientador: Alberto Azoubel Antunes.

Descritores: 1.Bexiga urinária 2.Exercício
3.Resistência à Insulina 4.Obesidade 5.Bexiga
urinária hiperativa 6.Expressão gênica 7.Óxido
nítrico

USP/FM/DBD-406/18

Dedicatória

*Aos meus amados pais, **Edison Matos de Oliveira** e **Mara Regina de Oliveira**, por todo amor, carinho e dedicação dados a mim nessa jornada. Vocês são meus exemplos de honestidade e retidão. Muito obrigado por sempre estarem ao meu lado, em especial no suporte a minha formação moral e intelectual.*

*A minha querida irmã **Fernanda**, por ser essa pessoa tão especial e amada por todos. Muito obrigado pelo companheirismo, por sempre torcer pelo meu sucesso, e em especial por trazer ao mundo minha linda sobrinha Cecília. Saiba que sempre torcerei pela sua felicidade, e que sempre poderá contar comigo.*

*A minha dedicada esposa **Priscilla**, que em nenhum momento hesitou em me apoiar nessa importante jornada. Ter você ao meu lado é inspirador. Muito obrigado por me proporcionar a experiência em ter uma linda família.*

*A minha amada filha **Marcela**, um presente de Deus em nossas vidas, que chegou a pouco mais de um ano e tornou os meus dias muito mais coloridos.*

Agradecimentos

*A **Deus**, por todas as bênçãos concedidas diariamente nessa existência terrena.*

*Ao meu orientador **Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes**, por toda confiança e suporte desde nosso primeiro contato. Serei eternamente grato pela oportunidade concedida a mim em poder realizar essa enriquecedora jornada, e pelo seu exemplo em sempre buscar a excelência em tudo que faz. Como você mesmo diz: “O céu é o limite”. Muito obrigado.*

*Ao **Prof. Dr. Miguel Srougi**, por sua extraordinária capacidade científica e acima de tudo, por ser um exemplo na medicina nacional de altruísmo e dedicação ao ser humano. Muito obrigado.*

*À **Profa. Dra. Sabrina Reis**, por toda sua paciência e dedicação conosco, alunos da pós-graduação. Agradeço do fundo do meu coração seus ricos ensinamentos científicos e em especial, seu carinho e sua maneira de tratar as pessoas.*

O mural em sua sala, com fotos de todos os alunos que foram auxiliados por você, mostra o quanto você se importa e o quanto isso a torna uma amiga tão especial. Muito obrigado.

*Ao colega **Dr. Fernando Fróes**, por me aceitar como participante desse ousado e valoroso projeto científico. Ter compartilhado contigo muitas horas de trabalho certamente me tornou um ser humano melhor. Obrigado pelas lições de paciência e resiliência. Muito obrigado.*

*Ao **Dr. Luiz Henrique Araújo**, um irmão que a vida me deu, por me apresentar ao Prof. Alberto Antunes, e por sempre me incentivar ao caminho do crescimento e amadurecimento científico. Sem o seu apoio, esse projeto não teria acontecido. Muito obrigado.*

*À **Profa. Dra. Kátia Ramos Leite**, por permitir que eu pudesse utilizar toda a excelente estrutura do LIM-55, e por todos os ensinamentos e orientações ao longo desse projeto. Muito obrigado.*

*Aos amigos do LIM 55, **Nayara, Vanessa, Ísis, Iran, Denis, Caio e Ruan.** Sem a ajuda de vocês, esse projeto não seria concluído. Vocês formam um belo time. Muito obrigado.*

*Aos colegas da Faculdade de Educação Física da Universidade de São Paulo, **Profa. Dra. Edilamar Oliveira, Fátima, Vander, Marcele, Katt e Ney.** Sou muito grato por toda ajuda dada em nosso projeto. A forma com que todos vocês vivenciam a pesquisa científica é absolutamente admirável e respeitável. Muito obrigado.*

*Ao **Prof. Dr. Luiz Ósorio Leiria** (UNICAMP) por todos os ensinamentos teóricos e práticos fundamentais para realização dessa pesquisa, em especial a técnica de realização dos estudos urodinâmicos em animais. Muito obrigado.*

*Aos amigos da pós-graduação, **Dr. Fábio Oliveira, Dr. Karlo Biolo, Dr. Paulo Conti, Dr. Alexandre Iscaife, Dr. Renan Éboli,** por compartilharem suas experiências científicas e de vida comigo. Muito obrigado.*

*Aos colegas do grupo da próstata do Hospital das Clínicas da FMUSP, **Dr. Paulo Cordeiro, Dr. Mário Paranhos, Dr. Alexandre Iscaife, Dr. Elcio Nakano, Dr. Eduardo Muracca, Dr. Elias Chedid** por compartilhar seus valiosos ensinamentos urológicos. Muito obrigado.*

*Às secretárias do serviço de urologia do Hospital das Clínicas, **Teresa e Elisa,** sempre muito prestativas. Muito obrigado por todo o apoio.*

*Aos colegas e amigos de Curitiba, **Dr. Dilermando Almeida Neto, Dr. Thadeu Brenny Filho, Dr. David Kulysz, Dr. Roberto Pilati, Dr. Rodrigo Krebs, Dr. Julio Foiatto, Dr. André Labegalini e Dr. Antonio Brunetto.** Vocês foram fundamentais para a concretização desse projeto, e na minha ausência nunca hesitaram em dar suporte aos meus pacientes. Muito obrigado.*

*Ao meu time de basquete NTB, em especial aos “coaches” **Rogério, Michel e César.** Poder treinar e jogar com vocês comprova na prática todos os benefícios orgânicos e psicológicos da prática de atividade física. Muito obrigado.*

*Ao serviço de urologia do Hospital Amaral Carvalho, em Jaú-SP, em especial ao **Dr. Renato Prado Costa, Dr. Carlos Hermann Schaal, Dr. Fernando Cesar Sala, Dr. André Vanni, Dr. Fernando Maia Dr. Rafael***

Scherer, Dr. Luiz Henrique Araújo, Dr. André Pereira da Silva. Os três anos vividos ao lado de vocês foram de imenso crescimento médico, científico e pessoal. Após essa etapa, aprendi a manter a busca constante ao aprimoramento profissional. Muito obrigado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa sob o número 2014/08368-0.

Epígrafe

*“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”
(Isaac Newton)*

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. Introdução	21
1.1 Obesidade e Síndrome Metabólica	23
1.2 Fatores Metabólicos e STUI/ABP	24
1.3 Fatores Metabólicos e Hiperatividade Detrusora (HD)	25
1.4 Atividade Física e Prevenção dos STUI	27
2. Objetivos	29
2.1 Objetivo Primário	30
2.2 Objetivo Secundário	30
3. Métodos	31
3.1 Tipo de Estudo	32
3.2 Local e Época	32
3.3 Modelo Experimental	32
3.4 Intervenção	32
3.5 Extração de RNA	39
3.6 Síntese de cDNA	40
3.7 qRT-PCR	40
3.8 Análise Estatística	42
4. Resultados	43
4.1 Dados Morfométricos	44
4.2 Dados Metabólicos	48
4.3 Consumo De Oxigênio	54
4.4 Dados Urodinâmicos	55
4.5 Expressão Molecular	62
5. Discussão	67
6. Conclusões	78
7. Referências	80
Apêndices	86

Lista de Abreviaturas

ABP – Aumento Benigno da Próstata
AF – Atividade Física
AKT – Serina Treonina-Quinase
B2M – Beta 2 Microglobulina
Bcompl – Complacência Vesical
Cap – Capacidade Vesical
cDNA – DNA complementar
cGMP – Guanosina Monofosfato Cíclico
DHL – Dieta Hiperlipídica
DM – Diabetes Melitus
DP – Dieta Padrão
eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial
FEO2 – Fração Expirada de Oxigênio
FIO2 – Fração de Oxigênio do ar ambiente
HD – Hiperatividade Detrussora
HDL – Lipoproteína de Alta Densidade
HOMA-IR - Modelo de Avaliação da Homeostase – Resistência a Insulina
ICI – Intervalo entre Contrações Vesicais
IGF-1 - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1
IMC – Índice de Massa Corporal
iPDE5 – Inibidores da fosfodiesterase 5
IRS1 – Substrato do Receptor de Insulina 1
IRS2 – Substrato do Receptor de Insulina 2
LDL – Colesterol de Baixa Densidade
L-NAME – N-Nitro Arginina Metil Éster
nmic – Número de Micções
NO – Óxido Nítrico
OPB – Obstrução Prostática Benigna
PF – Fluxo de Oxigênio
PI3K – Fosfatidil Inositol 3 Quinase
Pmax – Pico de Pressão
Pthres – Limiar de Pressão

PVP – Pressão Pós Micção

QoL – Qualidade de Vida

qRT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

RNA – Ácido Ribonucleico

SED – Sedentário

SM – Síndrome Metabólica

STUI – Sintomas do Trato Urinário Inferior

VO2 – Consumo de Oxigênio

VO2max- Consumo Máximo de Oxigênio

Lista de Tabelas

Tabela 1. Primers utilizados para quantificação dos genes selecionados para estudo.	42
Tabela 2. Valores das características morfométricas dos grupos de ratos submetidos ao estudo (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão).	44
Tabela 3. Valores da pressão arterial e parâmetros laboratoriais dos grupos de ratos submetidos ao estudo (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão).	49
Tabela 4. Parâmetros de consumo de oxigênio dos grupos de ratos submetidos ao estudo (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão).	55
Tabela 5. Parâmetros urodinâmicos dos grupos de ratos submetidos ao estudo (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão).	56
Tabela 6. Expressão dos genes estudados comparando o grupo sedentário com dieta hiperlipídica com o grupo sedentário e dieta padrão (controle).	63

Lista de Figuras

Figura 1. Provável mecanismo molecular da disfunção vesical decorrente da resistência à insulina. (Extraído de Leiria et al., 2013).	26
Figura 2. Treinamento aquático dos grupos 1 e 2.	34
Figura 3. Esteira adaptada em gaiola metabólica para mensuração de consumo de oxigênio.	36
Figura 4. Punção em cúpula vesical para realização de estudo urodinâmico.	37
Figura 5. Dissecção da bexiga urinária do rato.	39
Figura 6. Dissecção da gordura retroperitoneal (A e B) e epididimária (C).	39
Figura 7. Ganho de peso dos grupos de ratos submetidos ao estudo (gramas; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$	45
Figura 8. Peso da gordura epididimária dos grupos de ratos submetidos ao estudo (gramas; média $\pm$ desvio padrão); * $p < 0,05$	46
Figura 9. Peso da gordura retroperitoneal dos grupos de ratos submetidos ao estudo (gramas; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$	47
Figura 10. Peso da bexiga dos grupos de ratos submetidos ao estudo (gramas; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$	48
Figura 11. Glicemia sérica dos grupos de ratos submetidos ao estudo (mg/dl; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$	50
Figura 12. Insulina sérica dos grupos de ratos submetidos ao estudo (ng/ml; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$	51
Figura 13. Índice HOMA dos grupos de ratos submetidos ao estudo (média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$	52
Figura 14. Colesterol sérico dos grupos de ratos submetidos ao estudo (mg/dl; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$	53
Figura 15. Triglicerídeo sérico dos grupos de ratos submetidos ao estudo (mg/dl; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$	54
Figura 16. Número de micções dos grupos de ratos submetidos ao estudo (média $\pm$ desvio padrão); * $p < 0,05$	57
Figura 17. Pressão pós micção dos grupos de ratos submetidos ao estudo (média $\pm$ desvio padrão); * $p < 0,05$	58
Figura 18. Capacidade vesical dos grupos de ratos submetidos ao estudo (ml) (média $\pm$ desvio padrão); * $p < 0,05$	59
Figura 19. Complacência vesical dos grupos de ratos submetidos ao estudo (ml/mmHg) (média $\pm$ desvio padrão); * $p < 0,05$	60
Figura 20. Traçado urodinâmico de rato do grupo atividade física e dieta padrão. ..	61
Figura 21. Traçado urodinâmico de rato do grupo sedentário e dieta hiperlipídica. ..	61
Figura 22. Nível de expressão gênica dos ratos sedentários com dieta hiperlipídica (grupo 4) em comparação com o controle (grupo 3). A linha de base representa a média dos ratos do grupo controle.	62
Figura 23. Nível de expressão gênica dos ratos ativos com dieta padrão (grupo 1) em comparação com o controle sedentário (grupo 3). A linha de base representa a média dos ratos do grupo controle.	63
Figura 24. Nível de expressão gênica dos ratos ativos (grupo 2) em comparação com o controle sedentário (grupo 4), ambos com dieta hiperlipídica. A linha de base representa a média dos ratos do grupo controle.	64

Figura 25. Nível de expressão gênica dos ratos ativos e dieta padrão (grupo 1) em comparação com o controle sedentário e dieta hiperlipídica (grupo 4). A linha de base representa a média dos ratos do grupo controle.65

RESUMO

Oliveira AM. *Papel da atividade física e da dieta nas alterações vesicais funcionais e moleculares: estudo em modelo experimental murino*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: O sedentarismo e obesidade têm sido descritos como fatores de risco relevantes para o desenvolvimento de sintomas do trato urinário inferior (STUI). No presente estudo investigamos o papel da atividade física nas alterações vesicais funcionais e moleculares induzidas por dieta hiperlipídica em ratos. **Material e método:** Ratos machos Wistar com oito semanas de idade foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: 1. atividade física (AF) e dieta padrão (DP); 2. AF e dieta rica em gorduras (DHL); 3. Sedentários (SED) com DP; 4. SED e DHL. Os ratos dos Grupos 1 e 2 foram submetidos a um protocolo de treinamento de natação por 10 semanas. Ao final do protocolo, realizamos estudo funcional vesical (urodinâmico) nos ratos anestesiados, e extraímos o tecido vesical para estudo molecular da via de sinalização da insulina (IRS1/IRS2/PI3K/AKT/eNOS) através do método de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). **Resultados:** Após 10 semanas, os grupos 1 e 2 apresentaram respectivamente menor ganho de peso corporal quando comparados aos grupos 3 (213,89 vs 261,63 gramas, $p=0,04$) e 4 (209,84 vs 257,57 gramas, $p=0,04$), assim como menor peso da gordura epididimária quando comparados aos grupos 3 (14,06 vs 19,74 gramas, $p=0,01$) e 4 (15,26 vs 20,38, $p=0,02$). Na soma das intervenções (sedentarismo e dieta hiperlipídica), o grupo 4 apresentou maior nível de insulina sérica (6,05 vs 4,14 ng/ml, $p=0,038$) e índice HOMA-IR (1,95 vs 1,09, $p=0,006$) em comparação ao grupo 1, sugerindo padrão de resistência à insulina. A análise urodinâmica, na comparação do grupo 4 vs grupo 1, demonstrou padrão de hiperatividade vesical naquele: maior número de micções (13,6 vs 6,0, $p=0,04$), maior pressão pós miccional (8,06 vs 5,08 mmHg, $p=0,04$), menor capacidade (0,29 vs 0,91 ml, $p=0,008$) e complacência vesical (0,027 vs 0,091ml/mmHg, $p=0,016$). Quanto ao estudo molecular da via de sinalização da insulina no tecido vesical, o efeito da dieta hiperlipídica resultou em subexpressão de toda a via (IRS1, IRS2, PI3K, AKT e NOS3). Em contrapartida, o efeito da atividade física resultou em superexpressão da via, em especial quando comparamos ratos com ingesta de gordura (grupo 2 x 4), assim como na comparação dos grupos “extremos” (grupo 1 x 4). **Conclusão:** A exposição dos ratos a DHL resultou em subexpressão molecular da via de sinalização de insulina no tecido vesical, assim como a AF gerou superexpressão desta, em especial nos ratos expostos a DHL. A exposição dos animais a DHL em associação a hábitos sedentários resultou em obesidade, resistência à insulina e padrão sugestivo de hiperatividade vesical em comparação aos expostos a AF e DP.

Descritores: Bexiga; Atividade Física; Resistência à Insulina; Obesidade; Hiperatividade Vesical; Expressão Gênica; Óxido Nítrico.

SUMMARY

Oliveira AM. *Role of physical activity and diet in functional and molecular bladder changes: a study in a murine experimental model*. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Introduction: Sedentary lifestyle and obesity have been described as relevant risk factors for the development of lower urinary tract symptoms. In the present study we investigate the role of physical activity in the functional and molecular bladder alterations resulting from obesity induced by hyperlipidic diet in rats. Material and methods: Wistar male rats at eight weeks of age were randomized into groups: 1. physical activity (AF) and standard diet (DP); 2. AF and high fat diet (DHL); 3. sedentary (SED) with DP; 4. SED and DHL. Group 1 and 2 rats were subjected to a 10-week swimming training protocol. Urodynamic study was performed and expression of genes in bladder tissue (IRS1 / IRS2 / PI3K / AKT / eNOS) was evaluated. Results: Results: Groups 1 and 2 presented lower body weight gain than groups 3 (213.89 vs 261.63 grams (g), $p=0.04$) and 4 (209.84 vs 257.57 g, $p=0.04$), respectively. Group 4 had higher insulin level (6.05 ± 1.79 vs 4.14 ± 1.14 ng/ml, $p=0.038$) and higher homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index (1.95 vs 1.09, $p=0.006$) than group 1. Group 4 had greater number of micturitions (13.6 vs 6.0, $p=0.04$), higher post-void pressure (8.06 vs 5.08, $p=0.04$), lower capacity (0.29 vs 0.91 ml, $p=0.008$) and lower bladder compliance (0.027 vs 0.091 ml/mmHg, $p=0.016$) versus group 1. HFD resulted in underexpression throughout insulin signaling pathway. Physical activity resulted in overexpression of the pathway, especially in comparisons between the rats with fat intake (groups 2 and 4) and the extreme groups (groups 1 and 4). Conclusion: Exposure of rats to hyperlipidic diet in addition to a sedentary pattern resulted in obesity, insulin resistance, urodynamic pattern suggestive of bladder hyperactivity and molecular subexpression of the IRS2 / PI3K / AKT / eNOS pathway in comparison to rats exposed to physical activity and standard diet. Physical activity generated overexpression of this molecular pathway, especially in rats exposed to a hyperlipidic diet.

Descriptors: Bladder; Physical Activity; Insulin Resistance; Obesity; Bladder Hyperactivity; Genetic Expression; Nitric Oxide

1. INTRODUÇÃO

Os sintomas do trato urinário inferior (STUI) representam um importante problema de saúde pública devido à sua elevada prevalência e seus efeitos deletérios. Estudo epidemiológico de grande amostragem nos Estados Unidos, Inglaterra e Suécia (EpiLUTS) mostrou a incidência de ao menos um STUI (exceto incontinência) reportados pelos pacientes como “frequentes” em 47,9% e 52,5%, em homens e mulheres respectivamente ⁽¹⁾. Em nosso meio, análise com 1008 homens encontrou incidência de STUI leves, moderados e severos em 52,3%, 30,9%, e 16,8% dos casos, respectivamente ⁽²⁾. Recente estudo populacional no Brasil pesquisou a prevalência de STUI em 5184 pessoas, e utilizando a definição de sintomas ocorrendo em metade das vezes ou mais (*Likert score* 3-5) encontrou prevalência de 40% e 59% em homens e mulheres respectivamente. ⁽²⁾.

Os STUI são representados principalmente por sintomas de armazenamento (polaciúria, nictúria, urgência miccional) e sintomas de esvaziamento (jato fraco, hesitação, gotejamento terminal). O impacto negativo dos STUI na qualidade de vida dos pacientes é bem estabelecido na literatura. Estudo transversal e multicêntrico europeu, avaliou 480 homens com STUI e indicação de iniciar tratamento medicamentoso, sendo que 65,8% dos pacientes relataram insatisfação caso mantivessem tal padrão miccional o restante da vida. (Escore QoL ≥ 3) ⁽³⁾.

Um dos mecanismos fisiopatológicos para o surgimento dos STUI é a obstrução prostática benigna (OPB), decorrente do aumento benigno da próstata (ABP), comprometendo o esvaziamento vesical e resultando em consequente hipertrofia do músculo detrusor da bexiga. Desta alteração vesical poderá resultar um quadro de bexiga hiperativa, que ocorre em cerca de metade dos pacientes com obstrução infra-vesical ⁽⁴⁾. Entretanto, existe uma pobre correlação entre a presença e a severidade dos STUI com as medidas anatômicas da próstata, assim como com os

achados urodinâmicos de obstrução infra-vesical, sugerindo um processo fisiopatológico mais complexo ⁽⁵⁾. Evidências mais recentes apontam para associação entre os STUI e doenças crônicas como cardiopatias e *diabetes*, assim como a relação entre STUI e estilo de vida ⁽⁶⁾.

1.1 Obesidade e Síndrome Metabólica

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal no indivíduo. Para o diagnóstico em adultos, o parâmetro utilizado mais comumente é o índice de massa corporal (IMC), sendo obesidade caracterizada quando IMC acima de 30 kg/m² ⁽⁶⁾.

A prevalência da obesidade no mundo vem aumentando nas últimas décadas. Entre 1980 e 2008, o IMC médio mundial aumentou em 0,4 kg/m² por década em homens, e 0,5 kg/m² por década em mulheres ⁽⁶⁾. A Organização Mundial de Saúde estima que aproximadamente 13% da população mundial adulta estava obesa em 2014 (11% dos homens e 15% das mulheres) ⁽⁷⁾, sendo que no Brasil, a prevalência de obesidade foi 12,5% entre homens e 16,9% entre mulheres ⁽⁷⁾.

A síndrome metabólica (SM) é descrita como a combinação de várias alterações metabólicas inter-relacionadas: obesidade abdominal, hipertrigliceridemia, redução dos níveis de colesterol HDL, hiperglicemia e hipertensão arterial ^(8,9). A SM está diretamente associada à doença cardiovascular e *diabetes mellitus* (DM) do tipo 2, acarretando um elevado custo sócioeconômico para inúmeros países, sendo hoje considerada uma epidemia mundial ⁽⁸⁾.

A resistência à insulina é o fator central da SM, na qual os tecidos periféricos alvo passam a não responder adequadamente a concentrações normais de insulina

circulante, e acredita-se ser a obesidade o principal fator etiológico que predispõe a resistência à insulina ⁽⁹⁾.

1.2 Fatores Metabólicos e STUI/ABP

Estudo longitudinal com 422 pacientes evidenciou a relação direta entre o ganho de peso e os STUI/ABP. Nesta análise, cada aumento de 1 kg/m² no índice de massa corporal (IMC) correspondeu a um aumento de 0,41 ml no volume da próstata dos indivíduos estudados. Pacientes obesos apresentaram um risco aumentado em 3,5 vezes de possuírem próstatas aumentadas de tamanho na ressonância magnética quando comparados a indivíduos não obesos. Neste mesmo estudo, homens com glicemia de jejum elevada e com o diagnóstico de *diabetes mellitus* eram 2,5 e 3 vezes mais propensos a apresentar STUI, respectivamente ⁽¹⁰⁾.

Apesar das evidências clínicas supracitadas, os mecanismos desta causalidade ainda precisam ser esclarecidos. A *diabetes mellitus* pode influenciar o crescimento da próstata e o surgimento dos STUI pelo aumento do tônus do estroma prostático em decorrência do aumento da atividade simpática induzida pela hiperinsulinemia. A potencial ligação da insulina no tecido prostático devido à similaridade estrutural com o IGF-1 é também considerada um dos mecanismos para a indução de crescimento da glândula. Além disso, a elevação de IGF-1 biodisponível no sangue em consequência da redução nos níveis de sua proteína ligadora secundária ao aumento da insulina sérica poderia potencialmente induzir o crescimento da próstata ^(11, 12).

O mecanismo pelo qual a obesidade pode promover a hiperplasia prostática benigna (HPB) é desconhecido. Uma das hipóteses é a obesidade induzir um estado

de inflamação sistêmica e estresse oxidativo, os quais representam um importante papel no desenvolvimento e progressão da HPB. Estudos têm revelado que a presença de citocinas inflamatórias no tecido prostático estimula a produção de fatores de crescimento e inibe a apoptose das células prostáticas ^(13, 14).

Recentemente tem sido dada crescente importância ao papel das disfunções vesicais como causa dos STUI em pacientes com SM, sugerindo que o aumento benigno da próstata (ABP) não seja o fator causal isolado.

1.3 Fatores Metabólicos e Hiperatividade Detrusora (HD).

Estudo de coorte com 521 mulheres demonstrou que a síndrome metabólica foi significativamente mais prevalente em pacientes com HD do que aquelas com bexigas normais (65% contra 35%) ⁽¹⁵⁾. Entretanto, essa associação (SM e HD) em homens tem sido motivo de controvérsias na literatura atual. Estudo prospectivo japonês, com 1031 homens, mostrou associação positiva entre idade e prevalência de HD, independente da presença de síndrome metabólica ⁽¹⁶⁾.

Embora a obesidade humana seja fortemente influenciada por elevado consumo de dietas hiperlipídicas combinadas com baixo gasto energético (sedentarismo) ⁽¹⁷⁾, poucos estudos experimentais têm focado nas repercussões vesicais da obesidade induzida por tais dietas. Estudo com ratos obesos alimentados com dieta rica em gordura por 24 semanas mostrou aumento nas contrações vesicais miccionais e involuntárias, sugerindo comportamento de hiperatividade vesical nos animais ⁽¹³⁾.

A insulina, hormônio cuja função clássica é a regulação da homeostase glicêmica, também atua como um importante mediador do relaxamento vascular por

mecanismos que envolvem a produção de óxido nítrico endotélio-dependente ⁽¹⁴⁾. A produção de óxido nítrico (NO) mediada pela insulina em células endoteliais resulta da ativação da via RAC- α serina / treonina-proteína-quinase (AKT) ⁽¹⁸⁾, que por sua vez ativa diretamente a NO sintase endotelial (eNOS) ⁽¹⁹⁾. NO medeia a vasodilatação principalmente por difusão pelas células de músculo liso vascular, onde ativa guanilato ciclase solúvel resultando em formação de guanosina mono fosfato cíclico (cGMP) ⁽²⁰⁾. A resistência endotelial à insulina e subsequente comprometimento do relaxamento vascular via NO é proposta como importante mecanismo causador da disfunção vascular secundária ao *diabetes* ^(21, 22).

O endotélio vascular e o urotélio se assemelham em vários padrões anatômicos e funcionais. Atuam como estrutura sensorial altamente especializada e comunicam-se com camada muscular adjacente por intermédio de mediadores químicos ⁽²³⁾.

Recentemente foi descoberto um dos mecanismos no qual a insulina atua no tecido vesical. A insulina ativa a via PI3K/AKT/eNOS na mucosa, liberando NO ao músculo detrusor estimulando o relaxamento muscular. Camundongos obesos e resistentes à insulina exibiram uma inadequada ação insulínica na mucosa vesical, com redução da concentração de eNOS tecidual e aumento na frequência das contrações detrusorianas em estudo urodinâmico ⁽²³⁾.

Figura 1. Provável mecanismo molecular da disfunção vesical decorrente da resistência à insulina. (Extraído de Leiria et al., 2013).

1.4 Atividade Física e Prevenção dos STUI

Consensos internacionais recomendam o combate à obesidade como o principal foco de intervenção para o controle da SM. Estudos comprovam que a perda de peso em associação a um regime de atividade física leve ou moderada (cerca de 30 minutos por dia) reduz as taxas de triglicerídeos, eleva o colesterol HDL, reduz a pressão arterial e a resistência à insulina ⁽²⁴⁾.

Diversos estudos clínicos têm apontado para uma associação entre altos níveis de atividade física e um menor risco de STUI/ABP. Um desses estudos acompanhou uma coorte de 1.019 homens com idade entre 40 e 70 anos por nove anos e revelou que altos níveis de atividade física (maior *versus* menor quartil) estiveram associados a um risco relativo 50% menor de STUI/ABP ⁽²⁵⁾. Em uma análise transversal de 2.797 homens participantes do estudo NHANES III (*Third National Health and Nutrition Examination Survey*), todos os níveis de atividade física moderada e intensa estiveram inversamente associados aos STUI de forma significativa. De modo contrário, indivíduos sedentários apresentaram um risco duas vezes maior de desenvolver STUI em relação à indivíduos ativos ⁽¹¹⁾. Recente meta-análise revelou que indivíduos com uma rotina de atividade física apresentam menor risco de desenvolver STUI/HPB. Através da análise de 11 estudos envolvendo 43.083 homens, os autores observaram que oito estudos mostraram uma relação inversa, dois estudos uma relação nula e um estudo uma relação equívoca entre atividade física e HPB/STUI. A análise conjunta dos dados revelou que homens engajados em uma rotina de atividade física leve, moderada ou intensa apresentaram uma redução de 25 a 30% no risco de STUI/HPB em relação a indivíduos com um estilo de vida sedentário ⁽²⁶⁾.

Apesar de evidências clínicas consistentes, nenhum estudo clínico prospectivo e randomizado até o presente momento avaliou o papel da atividade física como proteção ao desenvolvimento de STUI/ABP. Da mesma forma, os mecanismos biológicos através dos quais a atividade física pode reduzir o desenvolvimento da STUI/ABP são hipotéticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

Avaliar o papel da atividade física nas alterações vesicais funcionais e moleculares na via PI3K/AKT/eNOS resultantes de dieta hiperlipídica em ratos.

2.2 Objetivo Secundário

Validação de modelo experimental murino de atividade física como proteção ao desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina.

3. MÉTODOS

3.1 Tipo de Estudo

Estudo experimental e controlado.

3.2 Local e Época

O estudo foi realizado no Biotério da Faculdade de Medicina da USP, no Biotério da Faculdade de Educação Física da USP e no Laboratório de Investigação Médica 55 da USP (LIM-55) desde o primeiro semestre de 2014, até o primeiro semestre de 2016. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP (374/12).

3.3 Modelo Experimental

Foram utilizados no experimento 28 ratos machos do tipo Wistar (200-220 gramas), com 8 semanas de idade. Os animais foram condicionados por 1 semana antes do experimento com dieta padronizada e ingestão de água *ad libidum*. Todos os animais foram submetidos a ciclos invertidos de 12/12 horas de claro-escuro e condicionados a uma temperatura de 24-27°C.

3.4 Intervenção

Os ratos foram randomizados em 4 grupos de 07 animais e alocados em gaiolas com três a cinco animais. No grupo 1 e grupo 2 utilizamos protocolo de

atividade física (AF) com treinamento aquático, e nos grupos 3 e 4 os animais foram mantidos em rotina sedentária habitual (SED).

No grupo 1 os animais foram expostos a uma dieta padrão (DP) (AIN 93M – Pragsoluções Biociências Ltda) composta por 62% amido, 14% proteínas, 10% sacarose, 4% óleo de soja, vitaminas e minerais em dosagem padrão durante doze semanas. No grupo 2, as cobaias receberam dieta hiperlipídica (DHL) (Pragsoluções Biociências Ltda) composta por 36% amido, 14% proteínas, 30% gorduras (banha de porco), 10% sacarose, 4% óleo de soja, além de vitaminas e minerais em dosagem padrão durante as mesmas doze semanas.

Nos grupos 3 e 4, os animais foram submetidos a uma rotina sedentária habitual durante as mesmas doze semanas. Em analogia aos grupos 1 e 2, as cobaias do grupo 3 ingeriram dieta padrão, e as do grupo 4 dieta hiperlipídica.

As cobaias selecionadas para a rotina de atividade física foram submetidas a sessões de treinamento aquático durante o ciclo escuro, 60 minutos por dia, 5 dias por semana por 10 semanas consecutivas, em aparato adaptado para ratos contendo água morna (30-32°C). A duração e a intensidade do exercício foram aumentadas gradualmente até que as cobaias fossem capazes de realizar o exercício durante 60 minutos utilizando uma carga de peso na cauda equivalente a 5% de seu peso corporal. Após esse período de adaptação, a intensidade e duração do treinamento foram constantes até o término do período de 10 semanas (Figura 2). Os animais foram pesados semanalmente e as cargas foram ajustadas pelas variações de peso. Este protocolo de natação foi descrito previamente como de intensidade leve a moderada e de longa duração, com o intuito de aumentar a capacidade oxidativa muscular ^(27, 28). Os animais selecionados para a rotina

sedentária permaneceram em gaiolas padrões durante todo o período do estudo, se movimentando livremente.

Figura 2. Treinamento aquático dos grupos 1 e 2.

Na 10^a e 11^a semana de experimento, os animais foram submetidos a adaptação em esteira de exercício e no tubo de contenção do aparelho de mensuração da pressão arterial sistêmica não invasiva (tail-cuff). Posteriormente, na 12^a semana do experimento, cada animal realizou teste de consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) através de esteira adaptada em gaiola metabólica hermética com capacidade de mensuração da concentração de oxigênio, com o intuito de mensurar o condicionamento físico dos animais. Após 30 minutos de repouso na esteira adaptada, o consumo de oxigênio (VO_2) basal foi mensurado. O VO_2 foi coletado através da análise do gás expirado durante um protocolo de teste de exercício progressivo, aumentando a velocidade da esteira em 3 metros por minuto a cada 3 minutos, e terminando no momento em que o VO_{2max} do animal foi atingido. O VO_{2max} foi definido como o VO_2 que não elevou mais de 5% a captação de oxigênio

mesmo após o aumento da carga de exercício (Figura 3). O influxo e o efluxo das concentrações de oxigênio foram mensurados continuamente através de um analisador apropriado (S-3A/I, Ametek, Pittsburgh, PA, USA). O VO_2 foi calculado utilizando o fluxo de oxigênio através da gaiola metabólica (PF), definido como 6 litros/minuto, a fração expirada efluente de oxigênio (FEO_2), a fração de oxigênio do ar ambiente (FIO_2) e o peso do animal, através da fórmula descrita a seguir:

$$VO_2((mL/Kg/min)) = pf * (FIO_2 - FEO_2) / Peso$$

O VO_2 de reserva foi calculado através da seguinte fórmula:

$$VO_{2reserva}(mL/Kg/min) = VO_{2máx} - VO_{2basal}$$

Figura 3. Esteira adaptada em gaiola metabólica para mensuração de consumo de oxigênio.

A pressão arterial sistólica também foi medida nestes períodos através do método *tail-cuff* (Kent Scientific, Torrington, CT, USA), método que consiste em envolver um sensor na base da cauda do animal, insuflar um *cuff* inserido no sensor até a pressão de 200 mmHg, e desinsuflar continuamente com o intuito de detectar a pressão sistólica não invasiva no momento da detecção do pulso arterial previamente ocluído.

No dia 90 do experimento os ratos foram anestesiados com 1,2 g/kg de uretana (Sigma Aldrich) por via intraperitoneal e foi realizado estudo de função vesical

(urodinâmico). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal com suas patas imobilizadas e foi realizada incisão transversal em hipogastrio de 2 cm. A bexiga foi exteriorizada e puncionada com agulha 23 G que por sua vez era ligada a um sistema contendo uma bomba de infusão de fluídos (Samtronic Infusion Pump 670) e um transdutor de pressão (Stoelting Co. Wooddale, Illinois, U.S.A.). A bexiga era esvaziada e após isso, iniciava-se a infusão de soro fisiológico na velocidade de 5 ml/hora. (Figura 4) Após a primeira micção espontânea, iniciava-se o exame urodinâmico por um período de 30 minutos. Os parâmetros analisados foram: número de micções (nmic), intervalo entre contrações (ICI), limiar de pressão (Pthres) – pressão imediatamente antes do início da contração vesical, pico de pressão (Pmax) – pressão máxima durante micção, pressão pós micção (PVP) – pressão imediatamente após término da micção, capacidade vesical (Cap) e complacência (Bcompl).

Figura 4. Punção em cúpula vesical para realização de estudo urodinâmico.

Ao término do estudo urodinâmico, ainda sob efeito anestésico, os ratos foram sacrificados por decapitação e submetidos a coleta de sangue. As amostras sanguíneas foram coletadas através da saída livre de sangue da região cervical imediatamente após o sacrifício, posteriormente centrifugadas e o soro armazenado em tubos de eppendorf a -80°C. Através do soro foram realizadas análises da glicemia e insulina sérica, colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos. O índice HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance) foi calculado através da fórmula: $\text{HOMA-IR} = \text{insulina sérica} \times \text{glicose sérica} / 22,5$

Após o sacrifício e coleta de sangue, foi realizado extração, dissecação e pesagem da bexiga, gordura retroperitoneal e gordura epididimária (Figuras 5 e 6). As bexigas foram separadas e armazenadas para posterior análise histológica, e também a - 80 graus Celsius para posterior análise gênica através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) dos substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS1 e IRS2), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), serina-treonina quinase (AKT) e óxido nítrico sintase endotelial (NOS3).

O descarte de animais seguiu as orientações da cartilha de descarte de resíduo no sistema FMUSP-HC.

Figura 5. Dissecção da bexiga urinária do rato.

Figura 6. Dissecção da gordura retroperitoneal (A e B) e epididimária (C).

3.5 Extração de RNA

Ao tecido cortado foi adicionado 10x o seu volume de solução de lise e igual volume de etanol 64%. Repassamos a solução para uma coluna GFX, e centrifugamos a 10.000g por 1 minuto. À coluna adicionamos 700µl de uma solução de lavagem própria do Kit. Centrifugamos novamente nas mesmas condições e fizemos duas

lavagens com 500µl de outra solução de lavagem do Kit. Descartamos o filtrado, centrifugamos por mais 1min a 10.000g para secagem da coluna, repassamos a coluna para um novo tubo e adicionamos 50µl de solução de eluição pré-aquecida no centro da coluna. Após 1 min a temperatura ambiente, centrifugamos a coluna e o RNA foi armazenado a -80°C até sua utilização. A pureza e concentração do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro (260/280 nM).

3.6 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 5µg de RNA utilizando-se o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) o qual utiliza a Transcriptase reversa MultiScribe™ e *primers* randômicos.

O RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20µL. A este volume foram acrescentados 4µL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6 µL do mix de dNTPs (25X), 4µL do tampão da enzima (10X), 2µL (50U/µl) da enzima transcriptase reversa e 8,4µl de água nuclease free. A solução foi então submetida a ciclos de temperaturas (25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min) em um termociclador Veriti (Applied Biosystems). Ao final da reação o cDNA foi armazenado a -20°C até o uso.

3.7 qRT-PCR

A expressão dos genes estudados foi avaliada a partir do cDNA utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) (plataforma Abi7500) utilizando-se o protocolo

TaqMan® (Applied Biosystems). Este protocolo utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela Taq polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* da fluorescência emitida que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite a quantificação indireta do RNA alvo contido na reação após cada ciclo da PCR.

Experimentos iniciais de quantificação absoluta com o gene controle β 2-microglobulina (B2M) validaram o cDNA antes da realização dos experimentos de quantificação do gene de interesse. Para quantificação relativa dos genes em estudo normalizamos a expressão destes em relação à expressão do gene controle B2M. A tabela 1 descreve os genes estudados. Para amplificação dos fragmentos desejados utilizamos as seguintes condições de reação: 5,0 μ l do MasterMix TaqMan, 0,5 μ l de primer (contendo a sonda marcada), 3,5 μ l de água destilada deionizada e 1,0 μ l de cDNA, somando um total de 10 μ l para cada reação. A condição usual de programação dos ciclos foi um passo a 50°C por dois minutos, um passo a 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 60 segundos.

Para calcular a expressão relativa dos genes alvo foi utilizado o método $\Delta\Delta CT$, que utiliza a seguinte fórmula: $\Delta\Delta CT = (CT \text{ do gene alvo, amostra tecidual de rato ativo} - CT \text{ do controle endógeno, amostra de rato ativo}) - (CT \text{ do gene alvo, amostra de rato sedentário} - CT \text{ do controle endógeno, amostra de rato sedentário})$. O número de vezes que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como $2^{-\Delta\Delta CT}$ (29).

Tabela 1. Primers utilizados para quantificação dos genes selecionados para estudo.

Primer	Ensaio
IRS1	Rn02132493_s1
Akt	Rn00690900_m1
PI3K	Rn00564547_m1
IRS2	Rn01482270_s1
NOS3	Rn02132634_s1
B2M	Rn560865_m1

3.8 Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram resumidas através da média e desvio padrão. Para análise estatística foi utilizado o teste t de *Student* para análise univariada e ANOVA para análise multivariada, através do *software* SPSS 19.0. Em toda análise estatística foi adotado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Dados Morfométricos

O ganho de peso dos ratos submetidos a atividade física foi significativamente menor aos sedentários, independentemente da dieta ingerida. Comparando os ratos com dieta padrão, o grupo 1 ganhou 213,89 ($\pm 13,77$) g, e o grupo 3, 261,63 ($\pm 34,20$) g ($p=0,04$). Nos grupos com dieta hiperlipídica, grupo 2 aumentou em 209,84 ($\pm 27,40$) g, e o grupo 4, 257,57 ($\pm 32,95$) g ($p=0,04$) (Tabela 2) (Figura 7).

Tabela 2. Valores das características morfométricas dos grupos de ratos submetidos ao estudo (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão).

	Grupo 1 AF + DP (n=07)	Grupo 2 AF + DHL (n=07)	Grupo 3 SED + DP (n=07)	Grupo 4 SED + DHL (n=07)
Peso Corporal (g)				
Inicial	312,43 ($\pm 21,55$)	321,90 ($\pm 32,49$)	337,33 ($\pm 21,35$)	354,04 ($\pm 15,31$)
Semana 12	526,31 ($\pm 28,69$)	531,74 ($\pm 41,78$)	598,96 ($\pm 45,97$)	611,61 ($\pm 33,38$)
Ganho de Peso (g)	213,89 ($\pm 13,77$) ** ***	209,84 ($\pm 27,40$) # ##	261,63 ($\pm 34,20$)	257,57 ($\pm 32,95$)
Gordura Epididimária (g)	14,06 ($\pm 4,04$) ** ***	15,26 ($\pm 4,53$) # ##	19,74 ($\pm 4,09$)	20,38 ($\pm 3,44$)
Gordura Retroperitoneal (g)	15,35 ($\pm 5,31$) ***	16,62 ($\pm 6,04$)	18,23 ($\pm 3,23$)	21,58 ($\pm 4,53$)
Peso da bexiga (g)	0,19 ($\pm 0,047$) * ***	0,14 ($\pm 0,015$) #	0,18 ($\pm 0,03$) ###	0,13 ($\pm 0,026$)

AF: Atividade física; SED: Sedentários; DP: Dieta padrão; DHL: Dieta hiperlipídica.

* = $p < 0.05$ grupo 1x2; ** = $p < 0.05$ grupo 1 x 3; *** = $p < 0.05$ grupo 1x4 ;

= $p < 0.05$ grupo 2x3; ## = $p < 0.05$ grupo 2x4; ### = $p < 0.05$ grupo 3x4

Figura 7. Ganho de peso dos grupos de ratos submetidos ao estudo (gramas; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0.05$.

Este comportamento se repetiu de forma idêntica na avaliação do peso da gordura epididimária. No grupo 1 pesou 14,06 ($\pm 4,04$) g, e no grupo 3, 19,74 ($\pm 4,09$) g ($p = 0,01$). A média do grupo 2 foi de 15,26 ($\pm 4,53$) g e do grupo 4 20,38 ($\pm 3,44$) g ($p = 0,02$) (Tabela 2) (Figura 8).

Figura 8. Peso da gordura epididimária dos grupos de ratos submetidos ao estudo (gramas; média±desvio padrão); * $p < 0.05$.

Em relação ao peso da gordura retroperitoneal, a média do grupo 4 foi de 21,58 ($\pm 4,53$) g, sendo o maior valor entre os grupos, e foi significativamente maior que a média do grupo 1, 15,35 g ($\pm 5,31$) ($p=0,025$) (Tabela 2) (Figura 9).

Figura 9. Peso da gordura retroperitoneal dos grupos de ratos submetidos ao estudo (gramas; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0.05$.

O peso da bexiga foi significativamente maior nos ratos com dieta padrão (DP) quando comparados aos grupos de dieta hiperlipídica (DHL). No grupo 1 a média do peso vesical foi de 0,19 ($\pm 0,047$) g, e no grupo 2, de 0,14 ($\pm 0,015$) g ($p=0,04$). No grupo 3, a média foi de 0,18 ($\pm 0,03$) g, e no grupo 4, 0,13 ($\pm 0,026$) g ($p=0,01$) (Tabela 2) (Figura 10).

Figura 10. Peso da bexiga dos grupos de ratos submetidos ao estudo (gramas; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$.

4.2 Dados Metabólicos

Quando comparamos as médias da pressão arterial sistólica entre os grupos, não houve diferença significativa (Tabela 3).

Tabela 3. Valores da pressão arterial e parâmetros laboratoriais dos grupos de ratos submetidos ao estudo (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão).

	Grupo 1 AF + DP (n=07)	Grupo 2 AF + DHL (n=07)	Grupo 3 SED + DP (n=07)	Grupo 4 SED + DHL (n=07)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	115,44 ($\pm 12,98$)	113,40 ($\pm 13,08$)	110,38 ($\pm 13,14$)	117,57 ($\pm 13,93$)
Glicemia (mg/dl)	106,86 ($\pm 4,98$) * ***	123,33 ($\pm 19,88$) #	104,86 ($\pm 5,67$) ###	129,29 ($\pm 16,24$)
Insulina (ng/ml)	4,148 ($\pm 1,141$) ***	4,870 ($\pm 2,244$)	5,146 ($\pm 0,787$)	6,054 ($\pm 1,797$)
Índice HOMA	1,098 ($\pm 0,378$) ***	1,490 ($\pm 0,641$)	1,332 ($\pm 0,218$) ###	1,956 ($\pm 0,739$)
Colesterol (mg/dl)	63,5 ($\pm 3,93$) * **	54,95 ($\pm 7,08$) #	71,74 ($\pm 8,30$) ###	61,34 ($\pm 6,98$)
LDL (mg/dl)	2,69 ($\pm 1,42$)	2,75 ($\pm 1,76$)	4,39 ($\pm 2,57$)	2,73 ($\pm 1,13$)
HDL (mg/dl)	46,53 ($\pm 3,83$)	38,58 ($\pm 8,16$)	45,08 ($\pm 10,02$)	45,19 ($\pm 8,27$)
Triglicerídeos (mg/dl)	71,43 ($\pm 14,49$) **	68,08 ($\pm 18,49$) #	111,32 ($\pm 28,04$) ###	67,11 ($\pm 10,70$)

AF: Atividade física; SED: Sedentários; DP: Dieta padrão; DHL: Dieta hiperlipídica.

* = $p < 0.05$ grupo 1x2; ** = $p < 0.05$ grupo 1 x 3; *** = $p < 0.05$ grupo 1x4 ;

= $p < 0.05$ grupo 2x3; ## = $p < 0.05$ grupo 2x4; ### = $p < 0.05$ grupo 3x4.

A glicemia foi significativamente mais elevada nos grupos de dieta hiperlipídica (2 e 4). Comparando os grupos de atividade física, a glicemia média no grupo 1 foi de 106,86 ($\pm 4,98$) mg/dl, e no grupo 2, 123,33 ($\pm 19,88$) mg/dl ($p=0,03$). Comparando os grupos sedentários, a glicemia média no grupo 3 foi de 104,86 ($\pm 5,67$) mg/dl, e no grupo 4 129,29 ($\pm 16,24$) mg/dl ($p=0,02$) (Tabela 3) (Figura 11).

Figura 11. Glicemia sérica dos grupos de ratos submetidos ao estudo (mg/dl; média $\pm$ desvio padrão) * $p<0,05$.

Em relação a dosagem de insulina sérica, o grupo 4 apresentou o maior nível, 6,05 ($\pm 1,79$) ng/ml, sendo significativamente maior que o grupo 1, 4,14 ($\pm 1,14$) ng/ml. ($p=0,038$) (Figura 12).

Figura 12. Insulina sérica dos grupos de ratos submetidos ao estudo (ng/ml; média $\pm$ desvio padrão) * $p<0,05$.

De modo similar, o índice HOMA foi mais elevado no grupo 4, 1,95 ($\pm 0,73$), sendo significativamente maior que ambos os grupos com dieta padrão, grupo 1, 1,09 ($\pm 0,37$) ($p= 0,006$) e grupo 3, 1,33 ($\pm 0,21$) ($p= 0,038$) (Tabela 3) (Figura 13).

Figura 13. Índice HOMA dos grupos de ratos submetidos ao estudo (média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$.

Em relação ao perfil lipídico, tanto o colesterol total quanto o triglicerídeo tiveram o maior valor no grupo 3, sendo significativamente maiores em comparação a todos os outros grupos. Entretanto, as frações do colesterol, LDL e HDL, não tiveram diferença significativa entre os grupos (Tabela 3) (Figuras 14 e 15).

Figura 14. Colesterol sérico dos grupos de ratos submetidos ao estudo (mg/dl; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$.

Figura 15. Triglicerídeo sérico dos grupos de ratos submetidos ao estudo (mg/dl; média $\pm$ desvio padrão) * $p < 0,05$.

4.3 Consumo De Oxigênio

Quanto ao consumo de oxigênio, o grupo 2 apresentou a maior taxa de VO₂ basal, 26,95 ($\pm 4,78$) ml/kg/min, sendo significativamente maior que ambos os grupos sedentários (Grupo 3, 21,80 ($\pm 2,71$) ml/kg/min, $p = 0,043$; grupo 4, 20,75 ($\pm 4,98$) ml/kg/min, $p = 0,020$) (Tabela 4).

A medida do VO₂ máximo seguiu padrão identico ao VO₂ basal, com o grupo 2 tendo a maior taxa, 65,53 ($\pm 5,73$) ml/kg/min, e significativamente maior que ambos os grupos sedentários (Grupo 3, 56,06 $\pm 4,62$ ml/kg/min, $p = 0,024$; grupo 4, 57,13 $\pm 6,15$ ml/kg/min, $p = 0,048$) (Tabela 4).

Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos das taxas de VO₂ de reserva (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros de consumo de oxigênio dos grupos de ratos submetidos ao estudo (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão).

	Grupo 1 AF + DP (n=06)	Grupo 2 AF + DHL (n=05)	Grupo 3 SED + DP (n=07)	Grupo 4 SED + DHL (n=06)
VO ₂ basal (ml/Kg/min)	22,12 ($\pm$ 3,76)	26,95 ($\pm$ 4,78) # ##	21,80 ($\pm$ 2,71)	20,75 ($\pm$ 4,98)
VO ₂ máx (ml/Kg/min)	60,23 ($\pm$ 9,19)	65,53 ($\pm$ 5,73) # ##	56,06 ($\pm$ 4,62)	57,13 ($\pm$ 6,15)
VO ₂ reserva (ml/Kg/min)	38,10 ($\pm$ 7,22)	38,59 ($\pm$ 6,46)	34,26 ($\pm$ 5,97)	36,38 ($\pm$ 8,16)

AF: Atividade física; SED: Sedentários; DP: Dieta padrão; DHL: Dieta hiperlipídica.

= p < 0.05 grupo 2x3; ## = p < 0.05 grupo 2x4;

4.4 Dados Urodinâmicos

O grupo 4 apresentou significativamente maior número de micções ($13,60 \pm 4,21$ x $6,00 \pm 1,82$; p=0,04), maior pressão pós miccional ($8,06 \pm 2,24$ mmHg x $5,08 \pm 1,23$ mmHg; p=0,04), menor capacidade ($0,29 \pm 0,18$ ml x $0,91 \pm 0,41$ ml; p=0,008) e menor complacência ($0,027 \pm 0,014$ x $0,091 \pm 0,034$ ml/mmHg; p=0,016) quando comparado ao grupo 1 (Tabela 5) (Figuras 16, 17, 18 e 19).

Tabela 5. Parâmetros urodinâmicos dos grupos de ratos submetidos ao estudo (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão).

	Grupo 1 AF + DP (n=04)	Grupo 2 AF + DHL (n=05)	Grupo 3 SED + DP (n=07)	Grupo 4 SED + DHL (n=05)
Número de micções (nmic)	6,00 ($\pm 1,82$) ***	10,80 ($\pm 4,81$)	8,43 ($\pm 3,55$)	13,60 ($\pm 4,21$)
Intervalo entre contrações (ICI) (s)	228,92 ($\pm 77,84$)	184,80 ($\pm 93,63$)	185,34 ($\pm 56,38$)	132,18 ($\pm 42,03$)
Limiar de pressão (Pthres) (mmHg)	9,00 ($\pm 1,24$)	8,93 ($\pm 1,12$)	8,00 ($\pm 1,03$) ###	10,96 ($\pm 2,08$)
Pico de pressão (Pmax) (mmHg)	25,94 ($\pm 3,85$)	31,06 ($\pm 3,78$)	28,53 ($\pm 1,77$)	29,40 ($\pm 6,12$)
Pressão pós micção (PVP) (mmHg)	5,08 ($\pm 1,23$) ***	6,53 ($\pm 1,52$)	4,79 ($\pm 0,87$) ###	8,06 ($\pm 2,24$)
Capacidade (Cap) (ml)	0,91 ($\pm 0,41$) * ***	0,37 ($\pm 0,14$)	0,59 ($\pm 0,22$)	0,29 ($\pm 0,18$)
Complacência (Bcompl) (ml/mmHg)	0,091 ($\pm 0,034$) ***	0,039 ($\pm 0,014$)	0,073 ($\pm 0,036$)	0,027 ($\pm 0,014$)

AF: Atividade física; SED: Sedentários; DP: Dieta padrão; DHL: Dieta hiperlipídica.

* = $p < 0.05$ grupo 1x2; ** = $p < 0.05$ grupo 1 x 3; *** = $p < 0.05$ grupo 1x4 ;

= $p < 0.05$ grupo 2x3; ## = $p < 0.05$ grupo 2x4; ### = $p < 0.05$ grupo 3x4.

Figura 16. Número de micções dos grupos de ratos submetidos ao estudo (média $\pm$ desvio padrão); * $p < 0,05$.

Figura 17. Pressão pós micção dos grupos de ratos submetidos ao estudo (média $\pm$ desvio padrão); * $p < 0,05$.

Figura 18. Capacidade vesical dos grupos de ratos submetidos ao estudo (ml) (média $\pm$ desvio padrão); * $p < 0,05$.

Figura 19. Complacência vesical dos grupos de ratos submetidos ao estudo (ml/mmHg) (média $\pm$ desvio padrão); * $p < 0,05$.

Na comparação dos grupos de ratos sedentários, o grupo 4 apresentou significativamente maior limiar de pressão ($10,96 \pm 2,08$ mmHg x $8,00 \pm 1,03$ mmHg; $p = 0,01$) e maior pressão pós micção ($8,06 \pm 2,24$ mmHg x $4,79 \pm 0,87$ mmHg; $p = 0,009$) em relação ao grupo 3 (Tabela 5) (Figura 20).

Figura 20. Traçado urodinâmico de rato do grupo atividade física e dieta padrão.

Na comparação dos grupos de ratos que realizaram atividade física, o grupo 1 apresentou significativamente maior capacidade vesical do que o grupo 2 ($0,91 \pm 0,41$ mL x $0,37 \pm 0,14$ mL; $p = 0,02$) (Tabela 5) (Figura 21).

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao intervalo entre contrações (ICI) e ao pico de pressão (Pmax) (Tabela 5).

Figura 21. Traçado urodinâmico de rato do grupo sedentário e dieta hiperlipídica.

4.5 Expressão Molecular

A análise do efeito da dieta hiperlipídica na expressão molecular vesical (IRS1, IRS2, PI3K, AKT2, NOS3) foi realizada comparando os ratos sedentários com dieta padrão (grupo 3), e os ratos sedentários com dieta hiperlipídica (grupo 4). Houve uma subexpressão de todos os genes do grupo com dieta hiperlipídica, sendo que o NOS3 ficou subexpresso em 100% dos casos, com uma mediana de expressão 0,25 vezes menor que o grupo controle (Figura 22) (Tabela 6).

Figura 22. Nível de expressão gênica dos ratos sedentários com dieta hiperlipídica (grupo 4) em comparação com o controle (grupo 3). A linha de base representa a média dos ratos do grupo controle.

Tabela 6. Expressão dos genes estudados comparando o grupo sedentário com dieta hiperlipídica com o grupo sedentário e dieta padrão (controle).

	IRS1	IRS2	pi3k	AKT2	NOS3
Média	0,68x	0,83x	0,56x	0,61x	0,41x
Mediana	0,16x	0,76x	0,54x	0,24x	0,25x
Superexpressão	14,3%	28,6%	14,3%	14,3%	0
Subexpressão	85,7%	71,4%	85,7%	85,7%	100%

Para avaliar o efeito da atividade física na expressão molecular vesical, foram comparados os ratos ativos com os sedentários, ambos com dieta padrão (grupo 1 x grupo 3). Houve superexpressão do IRS2 e do NOS3 nos ratos ativos. O IRS2 foi superexpresso em 71,4% dos ratos, com mediana de expressão 1,49 vezes maior que o controle. O NOS3 foi superexpresso em 85,7% dos ratos, e a mediana de expressão foi de 2,28 vezes maior que o controle (Figura 23) (Tabela 7).

Figura 23. Nível de expressão gênica dos ratos ativos com dieta padrão (grupo 1) em comparação com o controle sedentário (grupo 3). A linha de base representa a média dos ratos do grupo controle.

Tabela 7 - Expressão dos genes estudados comparando o grupo dos ratos com dieta padrão, ativos x sedentários (controle).

	IRS1	IRS2	pi3k	AKT2	NOS3
Média	4,75x	1,82x	1,20x	1,61x	4,59x
Mediana	0,63x	1,49x	1,41x	1,47x	2,28x
Superexpressão	42,8%	71,4%	42,8%	42,8%	85,7%
Subexpressão	57,2%	28,6%	57,2%	57,2%	14,3%

A análise do efeito da atividade física na expressão molecular vesical em ratos alimentados com dieta hiperlipídica foi realizada comparando os ratos ativos com os sedentários, ambos os grupos com dieta hiperlipídica (grupo 2 x grupo 4). Houve superexpressão em todos os genes estudados, sendo que o IRS1, IRS2, AKT2 e NOS3 foram superexpressos em 100% dos ratos, e o PI3K em 85,7%. A mediana de expressão do NOS3 foi de 7,5 vezes maior que o controle (Figura 24) (Tabela 8).

Figura 24. Nível de expressão gênica dos ratos ativos (grupo 2) em comparação com o controle sedentário (grupo 4), ambos com dieta hiperlipídica. A linha de base representa a média dos ratos do grupo controle.

Tabela 8 - Expressão dos genes estudados comparando o grupo dos ratos com dieta hiperlipídica, ativos x sedentários (controle).

	IRS1	IRS2	pi3k	AKT2	NOS3
Média	17,97x	3,17x	2,47x	7,38x	7,75x
Mediana	9,28x	3,27x	1,61x	6,22x	7,50x
Superexpressão	100%	100%	85,7%	100%	100%
Subexpressão	0	0	14,3%	0	0

A análise dos grupos “extremos” foi realizada comparando os ratos ativos e dieta padrão (grupo 1) com os sedentários e dieta hiperlipídica (grupo 4, controle). Houve a superexpressão de todos os genes estudados nos ratos do grupo 1, tendo sido o NOS3 superexpresso em 100% dos ratos, com mediana de expressão 6,8 vezes maior que o grupo controle (Figura 25) (Tabela 9).

Figura 25. Nível de expressão gênica dos ratos ativos e dieta padrão (grupo 1) em comparação com o controle sedentário e dieta hiperlipídica (grupo 4). A linha de base representa a média dos ratos do grupo controle.

Tabela 9 - Expressão dos genes estudados comparando os ratos ativos e dieta padrão x sedentários e dieta hiperlipídica (controle).

	IRS1	IRS2	PI3K	AKT2	NOS3
Média	25,83x	2,37x	2,26x	10,32x	13,65x
Mediana	3,43x	1,94x	2,65x	9,41x	6,80x
Superexpressão	71,4%	71,4%	71,4%	57,2%	100%
Subexpressão	18,6%	18,6%	18,6%	42,8%	0

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos os efeitos funcionais e moleculares em bexigas de ratos expostos a dieta hiperlipídica e a atividade física. Após 12 semanas, os ratos sedentários ficaram mais obesos, independentemente da dieta utilizada. Metabolicamente, quando o efeito das duas intervenções se somaram (sedentarismo e dieta hiperlipídica), os ratos do grupo 4 (SED+DHL) demonstraram maior nível médio de insulina e índice HOMA-IR entre os grupos, com significância estatística quando comparados ao grupo 1 (AF + DP). Este padrão metabólico sugere resistência à insulina. Utilizando a mesma comparação (grupo 1 x 4), urodinamicamente demonstramos características sugestivas de hiperatividade vesical no grupo 4 - maior número de micções e maior pressão pós-miccional, menor capacidade e complacência vesical. Quanto ao estudo molecular da via de sinalização da insulina no tecido vesical, o efeito da dieta hiperlipídica resultou em subexpressão de toda a via (IRS1, IRS2, PI3K, AKT e NOS3). Em contrapartida, o efeito da atividade física resultou em uma superexpressão da via, em especial quando comparamos os ratos com ingesta de gordura (grupo 2 x 4), assim como na comparação dos grupos extremos (grupo 1 x 4).

A obesidade tem como consequência a resistência periférica tecidual a insulina, eixo central do desenvolvimento da síndrome metabólica (SM) ⁽⁹⁾. Evidências sugerem que o estado inflamatório crônico assim como o estresse oxidativo possuem papel importante na fisiopatologia da SM. No presente modelo, a atividade física teve impacto na redução do ganho de peso corporal e da gordura epididimal (correspondente da gordura visceral em humanos) dos ratos, independentemente da dieta utilizada. Yang e cols (2016) também demonstraram o efeito protetor da atividade física (natação) em ratos Sprage-Dawley submetidos a dieta hiperlipídica. Os ratos alimentados com DHL e que realizaram natação (cinco vezes/semana)

tiveram ganho de peso significativamente menor que os ratos que apenas consumiram DHL, após 16 semanas de treinamento ⁽³⁰⁾. Entretanto ao compararmos os dois grupos sedentários, a dieta hiperlipídica não resultou em diferença naqueles parâmetros morfométricos. Modelos animais com dieta hiperlipídica tem sido utilizados em diversos estudos com intenção de induzir obesidade e síndrome metabólica ^(21, 31, 32). Em nosso estudo, utilizamos dieta hiperlipídica contendo 30% de gordura saturada (banha de porco) por um período de 3 meses. Possivelmente um maior tempo de exposição a dieta gordurosa e/ou uma maior concentração lipídica da dieta poderiam estabelecer critérios morfométricos sugestivos de obesidade na comparação entre ratos sedentários.

O peso das bexigas mostrou-se significativamente maior nos grupos com dieta padrão (grupo 1 e grupo 3) em comparação aos seus controles com dieta hiperlipídica. Uma hipótese a esse achado seria o maior acúmulo de gordura nas bexigas dos ratos com DHL, substituindo o tecido muscular, o que por consequência traria menor peso ao órgão.

O consumo basal e o consumo máximo de oxigênio são marcadores da capacidade de metabolização do oxigênio pelos tecidos, e por isso quanto maiores são seus valores, maior o condicionamento físico dos animais. Em nosso estudo, os ratos ativos com ingesta de dieta hiperlipídica apresentaram um maior consumo basal e maior consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), e estes dados validam o protocolo de atividade física implementado, aliado ao fato dos ratos ativos terem ganhado menos peso corporal ao final do experimento. Apesar do consumo máximo de oxigênio ter sido numericamente maior no subgrupo de ratos ativos com dieta normal em comparação aos ratos sedentários (grupo 1 vs grupo 3), essa diferença não foi estatisticamente significativa. Esse resultado não é incomum em protocolos curtos de

natação de intensidade leve ou moderada, como no estudo em questão, pois comumente o acréscimo de consumo não se eleva mais do que 10% com relação aos sedentários, ao contrário de protocolos mais intensos, que podem alterar em quase 30% o consumo máximo de oxigênio ⁽³⁰⁾. O fato do teste de consumo ser realizado em uma esteira de treino pode influenciar no resultado quando analisamos ratos submetidos a protocolo aquático, já que alguns ratos que são bons nadadores podem não ser bons corredores.

Os benefícios da atividade física em relação ao metabolismo glicêmico são: melhor controle da glicemia sérica e maior sensibilidade dos tecidos periféricos a insulina. Estes benefícios tem sido reportados em pacientes obesos com *diabetes mellitus* tipo 2, sugerindo correlação positiva entre perda de peso corporal e melhor controle glicêmico ⁽³³⁾. Entretanto, a atividade física isolada, sem redução de peso corporal pode não trazer benefícios ao metabolismo glicêmico, sugerindo importante papel do aporte calórico (dieta) no processo de redução de peso. Poirier e col, em 2002, avaliaram o efeito de um programa de exercício físico aeróbico, por 12 semanas, na sensibilidade a insulina em pacientes diabéticos tipo 2, obesos e não obesos. Ao final do estudo, os pacientes não-obesos melhoraram a sensibilidade a insulina, fato que não ocorreu nos pacientes obesos que não emagreceram ⁽³⁴⁾.

Em nosso modelo, detectamos significativas diferenças nos valores de glicemia, insulina e por consequência, no índice HOMA-IR. A glicemia foi mais elevada nos ratos com DHL (grupo 2 e 4), independente do exercício físico, sugerindo efeito prevalente da dieta nesta questão. A insulina sérica teve uma tendência a ser mais elevada nos grupos sedentários, porém sem significância estatística. A significância surgiu quando somamos o efeito de ambas as intervenções e comparamos os grupos extremos (grupo 1 x 4). O grupo 4 teve o maior nível de

insulina sérica entre os grupos, sendo significativamente maior que o grupo 1 ($p=0,038$). Ao analisarmos os valores do índice HOMA-IR, o grupo 4 teve significativamente maior valor em comparação a ambos os grupos de dieta padrão (grupos 1 e 3), sugerindo que os ratos do grupo 4 possuíam maior resistência à insulina em comparação com os ratos do grupo 1 ($p=0,006$) e do grupo 3 ($p=0,038$). Todavia, ao compararmos o grupo 4 com o outro grupo alimentado com DHL e submetido a AF (grupo 2) não encontramos diferença significativa, muito embora aquele possuiu maior valor do índice. Podemos novamente supor o efeito prevalente da dieta sobre a atividade física.

A resistência à insulina em ratos pode ser verificada por diversos métodos, sendo o teste hiperinsulinêmico euglicêmico (“clamp test”) o padrão ouro de análise ⁽³⁵⁾. Contudo, este possui diversas limitações para sua realização, como custo elevado, necessidade de bomba infusora, tempo prolongado e necessidade de experiência ao método. Optamos pela utilização do índice HOMA-IR. Utilizado com grande frequência em estudos clínicos em humanos para avaliação do metabolismo glicêmico, tem sido experimentado com adequada confiabilidade em estudos com roedores ⁽³⁶⁾.

Não encontramos diferença estatística na medida da pressão arterial caudal entre os grupos. Outros estudos na literatura também não conseguiram desenvolver hipertensão arterial com dieta hiperlipídica, mesmo após 6 meses de intervenção ⁽¹³⁾.

Ao analisarmos o perfil lipídico dos ratos, o grupo 3 (SED+DN) obteve a maior taxa de colesterol total e de triglicerídeo, com significância estatística em comparação a todos os outros grupos. As frações do colesterol (LDL e HDL) não tiveram diferença estatística entre os grupos. Resultado este inesperado para nós, pois prevíamos um maior nível do perfil lipídico nos ratos com DHL. Possivelmente teríamos o resultado

esperado utilizando mais tempo de dieta (6 meses) e/ou maior percentual de gordura saturada (utilizamos 30%). Oberbach et al, em 2013, ao estudarem ratos Sprage-Dawley com exposição a dieta hiperlipídica por 11 semanas, utilizaram concentração de 45% de gordura saturada, e encontraram diferença estatística na dosagem sérica de colesterol total e triglicerídeo ⁽³⁷⁾.

As repercussões vesicais funcionais decorrentes do efeito da dieta hiperlipídica tem sido demonstrada utilizando estudo urodinâmico em modelos animais. Inúmeras técnicas surgiram para esta finalidade, não existindo um padrão ouro na literatura atual. Andersson et al, em 2011, revisaram os aspectos práticos de diversas técnicas para realização do exame, assim como sugeriram nomenclatura e definições adequadas aos parâmetros a serem avaliados em roedores ⁽³⁸⁾. Em nosso estudo, utilizamos modelo com ratos anestesiados com uretano, anestésico cujo efeito mantém a sinalização neural miccional, permitindo adequada avaliação pressórica vesical.

Rahman e cols, em 2007, utilizando dieta com 10% de gordura saturada (banha) por 6 meses em ratos Sprage-Dawley, desenvolveram ratos obesos com disfunção erétil e hiperatividade vesical. Como critério para conceituação de hiperatividade vesical, os autores utilizaram o número de contrações vesicais durante a fase de cistometria, tendo ou não desencadeado micção ⁽²¹⁾. Leiria et al, em 2013, demonstraram hiperatividade vesical em modelo com camundongos C57Bl6/J alimentados com dieta hiperlipídica (55% de gordura) ao longo de 10 semanas. Os animais obesos apresentaram maior número de contrações vesicais, miccionais ou não ⁽³⁹⁾.

Em nosso modelo, comparando os ratos sedentários (grupo 3x4), o grupo com DHL (grupo 4) apresentou significativamente maior limiar de pressão (Pthres) ($p=0,01$)

e maior pressão pós-miccional (PVP) ($p=0,009$), sugerindo um pior esvaziamento vesical. Analisando os grupos extremos (1 x 4), evidenciamos no grupo 4 (SED+DHL) maior número de micções (nmic) ($p=0,04$), maior pressão pós miccional (PVP) ($p=0,04$), menor capacidade ($p=0,008$) e menor complacência ($p=0,016$), critérios sugestivos de hiperatividade vesical. Não encontramos diferença no intervalo entre micções (ICI) e no pico de pressão ($P_{m\acute{a}x}$). Na literatura, apenas um estudo experimental correlaciona atividade física e comportamento funcional vesical. Vadhavkar e cols, em 2011, estudaram camundongos fêmeas e diabéticas (db/db) expostos a um programa de corrida (uma hora por dia, 5 dias por semana, por 8 semanas). Ao final do protocolo, realizaram estudo cistométrico nos animais e evidenciaram redução do número de micções e redução do volume pós miccional nos ratos diabéticos que fizeram atividade física, sugerindo melhor padrão de esvaziamento vesical ⁽³¹⁾.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, um regime de atividade física moderada a intensa, cinco vezes por semana, com duração mínima de 30 minutos, tem ação importante na prevenção de obesidade e *diabetes mellitus* tipo 2 ⁽⁴⁴⁾. Estudos comprovam o benefício metabólico até mesmo com discreto aumento da frequência de exercícios físicos, mostrando que o abandono da rotina sedentária traz benefícios a sensibilidade a insulina ⁽³²⁾.

As mudanças no estilo de vida, incluindo atividade física, são intervenções universalmente reconhecidas com primeira linha de tratamento para pacientes com STUI/ABP, inclusive recomendadas pelo *guideline* da Associação Europeia de Urologia ⁽⁴⁰⁾. Wolin e cols, em 2015, avaliaram a associação entre nictúria e atividade física em uma coorte com mais de 20.000 homens (*Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trail - PLCO*). Homens que realizavam atividade física ao

menos 1 hora por semana, a prevalência de nictúria severa (3 ou mais episódios) foi 35% menor ⁽⁴¹⁾. Subak e cols (2009) em estudo randomizado e prospectivo demonstraram o efeito da redução de peso corporal por medidas comportamentais (dieta hipocalórica e atividade física) na redução da frequência de episódios de incontinência urinária, tanto aos esforços quanto por urge-incontinência. Após 6 meses, o grupo de intervenções reduziu em 8% o peso corporal contra 1,6% do grupo controle, com redução dos episódios de incontinência urinária em 47% contra 28% do grupo controle ($p=0.01$) ⁽⁴²⁾. Apesar de evidências epidemiológicas consistentes na literatura atual associando estilo de vida (dieta e exercícios) com STUI, Lin e cols, em revisão de literatura recente sobre o tema (2015) enfatizaram a ausência de um estudo prospectivo, randomizado e controlado validando a efetividade das intervenções em estilo de vida para melhorar ou prevenir os STUI ⁽⁴³⁾.

Diversos mecanismos fisiopatológicos têm sido propostos para as alterações vesicais decorrentes da obesidade, e por consequente alteração na sinalização da insulina. Destacam-se o padrão de inflamação crônica, os distúrbios no metabolismo lipídico e as alterações da homeostase glicêmica ⁽⁴⁴⁾. Oberbach e cols, em 2013, descreveram os possíveis mecanismos moleculares que desencadeiam o remodelamento vesical em modelo animal com dieta hiperlipídica. Ao analisarem a expressão de 383 proteínas na bexiga dos ratos, identificaram um aumento da expressão tecidual nas vias de reação de fase aguda, hipóxia, glicólise, beta-oxidação e proteínas relacionadas a disfunção mitocondrial nos animais com dieta hiperlipídica. Em contrapartida, proteínas de sinalização do cálcio, do citoesqueleto e da sinalização do eNOS estavam subexpressas ⁽³⁷⁾.

A insulina, além de seus efeitos metabólicos clássicos como hormônio regulador glicêmico, possui ação vasodilatadora por ação direta e por induzir liberação

de óxido nítrico (NO) do endotélio para o músculo liso vascular, resultante da ativação da via de sinalização da PI3K/AKT/eNOS ⁽⁴⁵⁾. Assim como nos tecidos vasculares, a insulina possui ação direta no tecido vesical, causando semelhante ação de relaxamento muscular local ⁽²⁹⁾. Em 1992, Persson e cols., demonstraram por cistometrias em ratos que a inibição da via L-arginina/óxido nítrico resultava em hiperatividade vesical e redução de capacidade vesical ⁽⁴⁶⁾. Monica e cols., em 2008, reportaram modelo animal com deficiência de NO secundária ao uso de L-NAME, e evidenciaram aumento da contratilidade muscular detrusora em resposta a agonistas muscarínicos ⁽⁴⁷⁾.

As alterações na sinalização tecidual de NO/cGMP são comprovadamente correlacionados com STUI, e em 2002, Sairman e cols., sugeriram pela primeira vez que o uso das medicações inibidoras da fosfodiesterase-5 (iPED5) poderiam melhorar os STUI em homens ⁽⁴⁶⁾. Em 2007, McVary e cols., em estudo randomizado duplo-cego controlado por placebo em homens com ABP estabeleceu a efetividade e tolerabilidade do uso de iPED5 para tratamento dos STUI ⁽⁴⁶⁾.

Avaliamos a expressão de cinco genes da via de sinalização da insulina no tecido vesical. Houve subexpressão de todos os genes (IRS1, IRS2, PI3K, AKT e NOS3) quando a intervenção foi a dieta hiperlipídica em ratos sedentários (3x4), sendo o NOS3 subexpresso em 100% dos casos com mediana de expressão de 0,25 vezes. Estes resultados sugerem o efeito deletério da dieta hiperlipídica na sensibilidade tecidual a insulina, reduzindo a expressão do óxido nítrico endotelial sintase, com provável diminuição da produção de NO.

O efeito da dieta hiperlipídica nesta via de sinalização foi demonstrado em 2007, por Zecchin e cols. Ao estudarem tecido de aorta de ratos alimentados com dieta hiperlipídica, demonstraram um prejuízo na via de sinalização

IRS1/PI3K/AKT/eNOS em resposta a insulina, com consequente comprometimento na vasodilatação local ⁽⁴⁸⁾.

As implicações da atividade física na expressão molecular foram estudadas tanto nos ratos com dieta padrão (1x3) quanto nos ratos com dieta hiperlipídica. Na primeira comparação (1x3), os ratos do grupo 1 (AF+DP) tiveram superexpressão do IRS2, em 71,4% dos casos e nível de expressão 1,49 vezes maior, e do NOS3 em 85,7% dos casos e nível de expressão 2,28 vezes maior. Na segunda comparação, ratos com DHL (2x4), o grupo que realizou atividade física (grupo 2) apresentou superexpressão de toda a via de sinalização, sendo em 100% dos casos dos genes IRS1, IRS2, AKT, NOS3. O nível de expressão do NOS3 foi 7,5 vezes maior. Este último padrão foi similar quando comparamos os grupos extremos (1x4). Novamente houve superexpressão de todos os genes da via, sendo o NOS3 superexpresso em 100% dos casos, com nível de expressão 6,8 vezes maior. Os resultados sugerem efeito protetor da atividade física na via de sinalização da insulina no tecido vesical, sendo este efeito mais pronunciado quando os ratos foram expostos a dieta hiperlipídica.

Wang e cols, 2015, em modelo de ratos Sprague-Dawley submetidos a infarto do miocárdio, estudaram o efeito de 8 semanas de atividade física na via de sinalização PI3K/AKT/eNOS no músculo cardíaco. Considerando uma relação direta entre o infarto do miocárdio e resistência à insulina, independente do metabolismo glicêmico, a atividade física reestabeleceu a sinalização local, normalizando a expressão tecidual de eNOS ⁽⁴⁹⁾.

Silva e cols., 2016, estudaram modelo de obesidade em camundongos, induzido por dieta hiperglicêmica, e o efeito da atividade física (corrida em esteira) na expressão de eNOS em tecido vascular. Após 8 semanas de intervenção, o exercício

físico induziu um aumento significativo na expressão de eNOS em aorta, melhorando o comprometimento funcional vascular resultante da obesidade ⁽⁵⁰⁾.

Nosso estudo é o primeiro na literatura a descrever o efeito protetor da atividade física na via de sinalização da insulina em tecido vesical, reforçando as recomendações já estabelecidas quanto a mudança de hábitos de vida como adjuvante no tratamento das disfunções vesicais/STUI secundárias a alterações metabólicas.

O presente estudo apresenta algumas limitações que devem ser reportadas. Nosso modelo de obesidade/resistência à insulina foi realizado com dieta hiperlipídica utilizando 30% de gordura saturada por 3 meses. Possivelmente um período mais longo de exposição a dieta e/ou uma maior concentração de gordura poderão consolidar os resultados metabólicos.

Em relação ao estudo funcional vesical, a urodinâmica em ratos anestesiados é um estudo amostral, sendo possivelmente inferior ao exame realizado com animais conscientes e em gaiolas metabólicas para mensuração de volume urinado ao longo da análise. Por fim, estudamos apenas uma via de sinalização tecidual, e entendemos que a complexa rede de eventos moleculares decorrentes da resistência à insulina resulte em causas multifatoriais das disfunções vesicais.

Como perspectivas futuras, necessitamos da comprovação em seres humanos dos resultados aqui alcançados. Estudo prospectivo e controlado com regime de atividade física em homens obesos poderá confirmar os benefícios desta intervenção quanto ao padrão miccional e qualidade de vida dos pacientes.

6. CONCLUSÕES

A exposição dos ratos a dieta hiperlipídica resultou em subexpressão molecular de toda a via IRS2/PI3K/AKT/eNOS. A atividade física por sua vez gerou superexpressão desta via molecular, em especial nos ratos expostos a dieta hiperlipídica.

A exposição dos ratos a dieta hiperlipídica em associação a hábitos sedentários resultou em obesidade, resistência à insulina, padrão urodinâmico sugestivo de hiperatividade vesical em comparação aos ratos expostos a atividade física e a dieta padrão.

7. REFERÊNCIAS

1. Coyne KS, Sexton CC, Thompson CL, Milsom I, Irwin D, Kopp ZS, et al. The prevalence of lower urinary tract symptoms (LUTS) in the USA, the UK and Sweden: results from the Epidemiology of LUTS (EpiLUTS) study. *BJU Int.* 2009;104(3):352-60.
2. Antunes AA, Srougi M, Dall'oglio MF, Vicentini F, Paranhos M, Freire GC. The role of BPH, lower urinary tract symptoms, and PSA levels on erectile function of Brazilian men who undergo prostate cancer screening. *J Sex Med.* 2008;5(7):1702-7.
3. Fourcade RO, Théret N, Taïeb C, Group BUS. Profile and management of patients treated for the first time for lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia in four European countries. *BJU Int.* 2008;101(9):1111-8.
4. Brading AF. A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology.* 1997;50(6A Suppl):57-67; discussion 8-73.
5. Thomas AW, Abrams P. Lower urinary tract symptoms, benign prostatic obstruction and the overactive bladder. *BJU Int.* 2000;85 Suppl 3:57-68; discussion 70-1.
6. Fitzgerald MP, Link CL, Litman HJ, Trivison TG, McKinlay JB. Beyond the lower urinary tract: the association of urologic and sexual symptoms with common illnesses. *Eur Urol.* 2007;52(2):407-15.
7. Jaime PC, da Silva AC, Gentil PC, Claro RM, Monteiro CA. Brazilian obesity prevention and control initiatives. *Obes Rev.* 2013;14 Suppl 2:88-95.
8. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med.* 2011;9:48.
9. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106(4):473-81.
10. Parsons JK, Carter HB, Partin AW, Windham BG, Metter EJ, Ferrucci L, et al. Metabolic factors associated with benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(7):2562-8.
11. Rohrmann S, Crespo CJ, Weber JR, Smit E, Giovannucci E, Platz EA. Association of cigarette smoking, alcohol consumption and physical activity with lower urinary tract symptoms in older American men: findings from the third National Health And Nutrition Examination Survey. *BJU Int.* 2005;96(1):77-82.
12. Sarma AV, Parsons JK, McVary K, Wei JT. Diabetes and benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms--what do we know? *J Urol.* 2009;182(6 Suppl):S32-7.

13. Rahman NU, Phonsombat S, Bochinski D, Carrion RE, Nunes L, Lue TF. An animal model to study lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction: the hyperlipidaemic rat. *BJU Int.* 2007;100(3):658-63.
14. Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, Vollenweider L, Nicod P. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest.* 1994;94(6):2511-5.
15. Uzun H, Zorba O. Metabolic syndrome in female patients with overactive bladder. *Urology.* 2012;79(1):72-5.
16. Ohgaki K, Horiuchi K, Kondo Y. Association between metabolic syndrome and male overactive bladder in a Japanese population based on three different sets of criteria for metabolic syndrome and the Overactive Bladder Symptom Score. *Urology.* 2012;79(6):1372-8.
17. Galgani J, Ravussin E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int J Obes (Lond).* 2008;32 Suppl 7:S109-19.
18. Lee JH, Ragolia L. AKT phosphorylation is essential for insulin-induced relaxation of rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291(6):C1355-65.
19. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399(6736):601-5.
20. Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, et al. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation.* 2000;101(13):1539-45.
21. Vicent D, Ilany J, Kondo T, Naruse K, Fisher SJ, Kisanuki YY, et al. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;111(9):1373-80.
22. Contreras C, Sánchez A, Martínez P, Raposo R, Climent B, García-Sacristán A, et al. Insulin resistance in penile arteries from a rat model of metabolic syndrome. *Br J Pharmacol.* 2010;161(2):350-64.
23. Birder LA. Urinary bladder urothelium: molecular sensors of chemical/thermal/mechanical stimuli. *Vascul Pharmacol.* 2006;45(4):221-6.
24. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart

Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112(17):2735-52.

25. Meigs JB, Mohr B, Barry MJ, Collins MM, McKinlay JB. Risk factors for clinical benign prostatic hyperplasia in a community-based population of healthy aging men. *J Clin Epidemiol*. 2001;54(9):935-44.

26. Parsons JK, Kashefi C. Physical activity, benign prostatic hyperplasia, and lower urinary tract symptoms. *Eur Urol*. 2008;53(6):1228-35.

27. Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrão CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(12):1909-17.

28. Barretti DL, Magalhães FeC, Fernandes T, do Carmo EC, Rosa KT, Irigoyen MC, et al. Effects of aerobic exercise training on cardiac renin-angiotensin system in an obese Zucker rat strain. *PLoS One*. 2012;7(10):e46114.

29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

30. Yang XQ, Yuan H, Li J, Fan JJ, Jia SH, Kou XJ, et al. Swimming intervention mitigates HFD-induced obesity of rats through PGC-1 α -irisin pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(10):2123-30.

31. Vadhavkar M, Golbidi S, Sea J, Longpre M, Stothers L, Laher I. Exercise improves bladder function in diabetic mice. *Neurourol Urodyn*. 2011;30(1):174-82.

32. Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. Combatting type 2 diabetes by turning up the heat. *Diabetologia*. 2016.

33. Cuff DJ, Meneilly GS, Martin A, Ignaszewski A, Tildesley HD, Frohlich JJ. Effective exercise modality to reduce insulin resistance in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(11):2977-82.

34. Poirier P, Tremblay A, Broderick T, Catellier C, Tancrède G, Nadeau A. Impact of moderate aerobic exercise training on insulin sensitivity in type 2 diabetic men treated with oral hypoglycemic agents: is insulin sensitivity enhanced only in nonobese subjects? *Med Sci Monit*. 2002;8(2):CR59-65.

35. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979;237(3):E214-23.

36. Bowe JE, Franklin ZJ, Hauge-Evans AC, King AJ, Persaud SJ, Jones PM. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *J Endocrinol.* 2014;222(3):G13-25.
37. Oberbach A, Jehmlich N, Schlichting N, Heinrich M, Lehmann S, Wirth H, et al. Molecular fingerprint of high fat diet induced urinary bladder metabolic dysfunction in a rat model. *PLoS One.* 2013;8(6):e66636.
38. Andersson KE, Soler R, Füllhase C. Rodent models for urodynamic investigation. *Neurourol Urodyn.* 2011;30(5):636-46.
39. Leiria LO, Sollon C, Báu FR, Mónica FZ, D'Ancona CL, De Nucci G, et al. Insulin relaxes bladder via PI3K/AKT/eNOS pathway activation in mucosa: unfolded protein response-dependent insulin resistance as a cause of obesity-associated overactive bladder. *J Physiol.* 2013;591(9):2259-73.
40. Gacci M, Corona G, Vignozzi L, Salvi M, Serni S, De Nunzio C, et al. Metabolic syndrome and benign prostatic enlargement: a systematic review and meta-analysis. *BJU Int.* 2015;115(1):24-31.
41. Wolin KY, Grubb RL, Pakpahan R, Ragard L, Mabie J, Andriole GL, et al. Physical activity and benign prostatic hyperplasia-related outcomes and nocturia. *Med Sci Sports Exerc.* 2015;47(3):581-92.
42. Subak LL, Wing R, West DS, Franklin F, Vittinghoff E, Creasman JM, et al. Weight loss to treat urinary incontinence in overweight and obese women. *N Engl J Med.* 2009;360(5):481-90.
43. Lin PH, Freedland SJ. Lifestyle and lower urinary tract symptoms: what is the correlation in men? *Curr Opin Urol.* 2015;25(1):1-5.
44. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* 2007;21(12):1443-55.
45. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation.* 2006;113(15):1888-904.
46. Persson K, Igawa Y, Mattiasson A, Andersson KE. Inhibition of the arginine/nitric oxide pathway causes bladder hyperactivity in the rat. *Acta Physiol Scand.* 1992;144(1):107-8.
47. Mónica FZ, Bricola AA, Báu FR, Freitas LL, Teixeira SA, Muscará MN, et al. Long-term nitric oxide deficiency causes muscarinic supersensitivity and reduces

beta(3)-adrenoceptor-mediated relaxation, causing rat detrusor overactivity. *Br J Pharmacol.* 2008;153(8):1659-68.

48. Zecchin HG, Priviero FB, Souza CT, Zecchin KG, Prada PO, Carnevali JB, et al. Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats. *Diabetes.* 2007;56(4):1014-24.

49. Wang Y, Tian Z, Zang W, Jiang H, Li Y, Wang S, et al. Exercise training reduces insulin resistance in postmyocardial infarction rats. *Physiol Rep.* 2015;3(4).

50. Silva JF, Correa IC, Diniz TF, Lima PM, Santos RL, Cortes SF, et al. Obesity, Inflammation, and Exercise Training: Relative Contribution of iNOS and eNOS in the Modulation of Vascular Function in the Mouse Aorta. *Front Physiol.* 2016;7:386.

APÊNDICES

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da USP

APROVAÇÃO

A CEUA d Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27 de Novembro de 2013, **APROVOU o(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº 374/12, intitulado: **"PAPEL DA ATIVIDADE FÍSICA E REPOSIÇÃO HORMONAL NA PREVENÇÃO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA EM RATOS COM SÍNDROME METABÓLICA"** apresentado pelo **CIRURGIA**.

• Adendo datado de 16.10.2013

Pesquisador (a) Responsável: **Alberto Azoubel Antunes**

CEP-FMUSP, 27 de Novembro de 2013

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
CEUA - FMUSP

São Paulo, 16 de outubro de 2013

Adendo referente ao projeto: Papel da atividade física e reposição hormonal na prevenção da hiperplasia prostática em ratos com síndrome metabólica - 374/12.

Ao Comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP

Venho por meio desta solicitar a inclusão no projeto de pesquisa supra citado, o estudo da bexiga urinária dos animais. Dados na literatura sugerem correlação entre síndrome metabólica e disfunção vesical (1-3), porém não está estabelecido o papel da atividade física neste modelo. Resumidamente, realizaremos estudo cistométrico nos ratos Wistar que já serão utilizados e, posteriormente, avaliaremos a expressão proteica por meio de Western Blot dos receptores de insulina, da AKT, da Nos, NO, GMPc, IGF e PKC no tecido das bexigas removidas. Esta parte do trabalho será a tese de doutorado do aluno André Matos de Oliveira.

Referências bibliográficas:

- 1- Pathophysiological studies of overactive bladder and bladder motor dysfunction in a rat model of metabolic syndrome.
Wu CC et al, J Urol. 2011 Jul;186(1):318-25
- 2- Molecular fingerprint of high fat diet induced urinary bladder metabolic dysfunction in a rat model. Oberbach A, Jehmlich N, Schlichting N, Heinrich M, Lehmann S, Wirth H, Till H, Stolzenburg JU, Völker U, Adams V, Neuhaus J. PLoS One. 2013 Jun 24;8(6):e66636.
- 3- Sensory dysfunction of bladder mucosa and bladder oversensitivity in a rat model of metabolic syndrome. Lee WC, Chiang PH, Tain YL, Wu CC, Chuang YC. PLoS One. 2012;7(9):e45578.

Atenciosamente,

Alberto A. Antunes
Urologia
CRM 110877
Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes

Participação em congresso

American Urological Association (AUA) – New Orleans, USA 2015

15-6665

Physical activity may prevent bladder dysfunction in obese rats through over-expression of insulin signaling related genes

Andre Matos Oliveira, Fernando F Fonseca, Sabrina T Reis, Vanessa Guimaraes, Katia R Leite, William C Nahas, Miguel Srougi, Alberto A Antunes, Sao Paulo, Brazil*

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Sedentarism and obesity have been reported as relevant risk factors for the development of bladder dysfunction through alterations in the insulin-signaling pathway. In the present study, we investigated the role of physical activity in bladder insulin-signaling pathway in normal fed and high fat fed rats.

METHODS: Twenty eight male Wistar rats with eight weeks old were used in this experiment and were randomly divided into four groups: 1. physical activity (PA) and normal diet; 2. PA and high fat diet; 3. sedentary (S) and normal diet; 4. S and high fat diet. Food and water were provided ad libitum. Groups 1 and 2 were submitted to a swimming training protocol for 10 weeks, executed five times a week with duration of 60 minutes per day. At the end of the protocol, bladders were dissected and stored. We measured bladder gene expression levels of protein kinase A and B (PKCa and PKCb), insulin receptor substrate 1 (IRS1), insulin receptor substrate 2 (IRS2), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), protein kinase B (AKT) and tribbles homolog 3 (Trib3) – AKT suppressor - through the quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) method.

RESULTS: After 10 weeks, groups 1 and 2 had less visceral fat when compared to the groups 3 (29.4 vs 37.9 grams; $p<0.05$) and 4 (31.8 vs 41.9 grams; $p<0.05$), respectively. When comparing normal fed rats (group 1 vs group 3; Graph 1), IRS2, eNOS, AKT, PKCa, PKCb genes were more over-expressed in bladder of rats submitted to PA (median 1.49, 2.28, 1.47, 1.95 and 1.1 times respectively) and IRS1 and Trib3 were more under-expressed (median 0.63 and 0.37 times respectively). Comparing high fat fed rats (group 2 vs group 4; Graph 2) we found overexpression in IRS1, IRS2, eNOS, AKT, PKCa and PKCb (median 9.27, 3.27, 7.50, 6.22, 2.63, 5.23 times respectively) and Trib3 did not change the pattern of expression (median 1.08).

CONCLUSIONS: PA improved intracellular bladder insulin-signaling pathway, with more pronounced results in obese rats.

These findings suggest a protective effect of PA on obesity-related bladder dysfunctions.

Source of Funding: FAPESP - protocol 2014/08368-0

15-6915

High fat diet is related to bladder dysfunction: an urodynamic-controlled experimental study um rats

Andre Matos Oliveira, Fernando F Fonseca, Sabrina T Reis, Luiz O Leiria, Katia R Leite, William C Nahas, Miguel Srougi, Alberto A Antunes, Sao Paulo, Brazil*

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Sedentarism and obesity are proposed risk factors for the development of lower urinary tract symptoms (LUTS) and bladder dysfunction. In the present study, we investigated the effect of a high fat diet on cystometric parameters in rats submitted to urodynamic analysis.

METHODS: Twenty eight male Wistar rats with eight weeks old were used in this experiment and were randomly divided into four groups: 1. physical activity (PA) and normal diet; 2. PA and high fat diet; 3. sedentary (S) and normal diet; 4. S and high fat diet (HFD). Food and water were provided ad libitum. Groups 1 and 2 were submitted to a swimming training protocol for 10 weeks, executed five times a week with duration of 60 minutes per day. Under urethane anesthesia, cystometry were performed during 30 minutes period. The parameters analysed were: number of micturition (nmic), intercontraction intervals (ICI), threshold pressure (Pthres), peak intravesical pressure (Pmax), post voiding pressure (PVP), capacity (cap) and compliance (Bcompl).

RESULTS: When compared HFD rats (group 2+4 - graph1) versus normal diet (group 1+3 - graph 2), HFD rats had more micturitions (means 12.2 and 7.55 times respectively; $p=0.01$), higher PVP (means 7.30 and 4.89 mmHg respectively; $p=0.00$), lower bladder capacity (means 0.33 and 0.71 ml respectively; $p=0.00$) and lower compliance (means 0.03 and 0.08 ml/mmHg respectively; $p=0.00$). The ICI, Pthres and Pmax did not show difference between groups. However, when PA groups were compared with sedentary groups, there was no statistical difference in cystometric parameters in normal fed rats (group 1 x 3) and, also, in high fat fed rats (group 2 x 4).

CONCLUSIONS: Our data suggest that obesity is the main factor of bladder dysfunction, PA did not ameliorated bladder dysfunction in obese rats.

Source of Funding: none

Physical activity may prevent bladder dysfunction in obese rats through overexpression of insulin signaling related genes

André Matos de Oliveira*, Fernando F Fonseca, Sabrina T Reis, Vanessa Guimaraes, Katia R Leite, William C Nahas, Miguel Srougi, Alberto A Antunes
Division of Urology - University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

INTRODUCTION

Sedentism and obesity have been reported as relevant risk factors for the development of bladder dysfunction through alterations in the insulin-signaling pathway. In the present study, we investigated the role of physical activity in bladder insulin-signaling pathway in normal fed and high fat fed rats.

METHODS

Twenty eight male Wistar rats with eight weeks old were randomly divided into four groups: 1. physical activity (PA) and normal diet; 2. PA and high fat diet (HFD); 3. sedentary (S) and normal diet; 4. S and HFD. Groups 1 and 2 (PA) were submitted to a swimming training protocol for 10 weeks, executed five times a week with duration of 60 minutes per day. We measured bladder gene expression levels of protein kinase C subtype α and β (PKC α and PKC β), insulin receptor substrate 1 (IRS1), insulin receptor substrate 2 (IRS2), protein kinase B (AKT), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and tribbles homolog 3 (Trib3) - AKT suppressor - through the quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) method.

Figure 1. Bladder insulin signaling pathway. (adapted from Lábile et al)

RESULTS

After 10 weeks, groups 1 and 2 had less visceral fat when compared to the groups 3 (29.4 vs 37.9 grams; $p < 0.05$) and 4 (31.8 vs 41.9 grams; $p < 0.05$), respectively. When comparing normal fed rats (group 1 vs group 3; Graph 1), IRS2, eNOS, AKT, PKC α , PKC β genes were more over-expressed in bladder of rats submitted to PA (median 1.49, 2.28, 1.47, 1.95 and 1.1 times respectively) and IRS1 and Trib3 were more under-expressed (median 0.63 and 0.37 times respectively). Comparing high fat fed rats (group 2 vs group 4) we found overexpression in IRS1, IRS2, eNOS, AKT, PKC α and PKC β (median 9.27, 3.37, 7.58, 6.22, 1.63, 5.23 times respectively) and Trib3 did not change the pattern of expression (median 1.08).

Figure 2. Comparison of visceral fat weight (g)

Figure 3. Relative expression of genes IRS1, IRS2, eNOS, AKT, PKC, PKC, Trib3. Graph 1 shows normal fed rats and Graph 2 shows high fat fed rats. The baseline is the mean expression of sedentary rats while each column represents the relative expression of the respective gene in one individual rat in relation to baseline.

CONCLUSION

PA improved intracellular bladder insulin-signaling pathway, with more pronounced results in obese rats. These findings suggest a protective effect of PA on obesity-related bladder dysfunctions.

e-mail: andromatosa@usp.br

High fat diet is related to bladder dysfunction: an urodynamic-controlled experimental study in rats

André Matos de Oliveira*, Fernando F Fonseca, Sabrina T Reis, Luiz O Leiria, Katia R Leite, William C Nahas, Miguel Srougi, Alberto A Antunes
Division of Urology - University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

INTRODUCTION

Sedentism and obesity are proposed risk factors for the development of lower urinary tract symptoms (LUTS) and bladder dysfunction. In the present study, we investigated the effect of a high fat diet on cystometric parameters in rats submitted to urodynamic analysis.

METHODS

Twenty eight male Wistar rats with eight weeks old were randomly divided into four groups: 1. physical activity (PA) and normal diet; 2. PA and high fat diet (HFD); 3. sedentary (S) and normal diet; 4. S and HFD. Food and water were provided ad libitum. Groups 1 and 2 were submitted to a swimming training protocol for 10 weeks, executed five times a week with duration of 60 minutes per day. Under urethane anesthesia, cystometry were performed during 30 minutes period. The parameters analysed were: number of micturition (mic), intercontraction intervals (ICI), threshold pressure (Pthres), peak intravesical pressure (Pmax), post voiding pressure (Pvp), capacity (Cap) and compliance (Bcomp).

Figure 1. Rat bladder filled during cystometry

RESULTS

When compared HFD rats (group 2+4 - graph1) versus normal diet (group 1+3 - graph 2), HFD rats had more micturitions (means 12.2 and 7.55 times respectively; $p = 0.01$), higher PVP (means 7.30 and 4.89 mmHg respectively; $p = 0.00$), lower bladder capacity (means 0.33 and 0.71 ml respectively; $p = 0.00$) and lower compliance (means 0.03 and 0.08 ml/mmHg respectively; $p = 0.00$). The ICI, Pthres and Pmax did not show difference between groups. However, when PA groups were compared with sedentary groups, there was no statistical difference in cystometric parameters in normal fed rats (group 1 x 3) and, also, in high fat fed rats (group 2 x 4).

Table 1: Cystometric parameters

	High fat diet rats	Normal diet rats	p
Micturition (mic)	12.20	7.55	.01
Post voiding pressure (PVP) (mmHg)	7.30	4.89	.00
Bladder capacity (Cap) (ml)	0.33	0.71	.00
Bladder compliance (Bcomp) (ml/mmHg)	0.03	0.08	.00

Figure 2: Cystometric tracing of HFD rat (Graph 1) and normal diet rat (Graph 2).

CONCLUSION

Our data suggest that obesity is the main factor of bladder dysfunction. PA did not ameliorated bladder dysfunction in obese rats.

e-mail: andromatosa@usp.br