



ANTONIO CELSO SARAGOSSA RAMOS FILHO

Participação do receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 4 (TRPV4) e do melastatina do tipo 8 (TRPM8) nas disfunções miccionais do diabetes em camundongos

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ANTONIO CELSO SARAGOSSA RAMOS FILHO

Participação do receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 4 (TRPV4) e do melastatina do tipo 8 (TRPM8) nas disfunções miccionais do diabetes em camundongos

Orientador(a): Prof. Dr. Edson Antunes

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutor em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO ANTONIO CELSO S RAMOS FILHO E ORIENTADO PELO PROF. DR. EDSON ANTUNES.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R147p Ramos-Filho, Antonio Celso Saragossa, 1985-
Participação do receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 4 (TRPV4) e do melastatina do tipo 8 (TRPM8) nas disfunções miccionais do diabetes em camundongos / Antonio Celso Saragossa Ramos Filho. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Edson Antunes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bexiga urinária. 2. Estreptozotocina. 3. Mentol. 4. Canais de cálcio de tipo L. I. Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Participation of transient receptor potential vanilloid type 4 (TRPV4) and melastatin type 8 (TRPM8) in micturition dysfunction of diabetic mice

Palavras-chave em inglês:

Urinary bladder

Streptozocin

Menthol

Calcium channels, L type

Área de concentração: Farmacologia

Títuloção: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]

Maria Andréia Delbin

José Antonio Rocha Gontijo

Clélia Akiko Hiruma

André Sampaio Pupo

Data de defesa: 22-07-2014

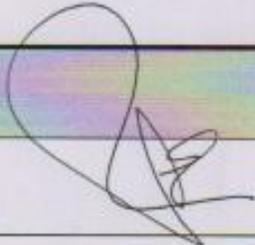
Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

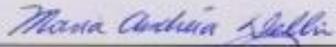
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

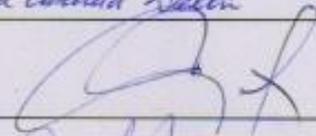
ANTONIO CELSO SARAGOSSA RAMOS FILHO

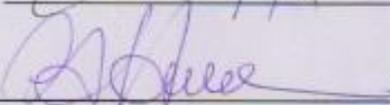
Orientador (a) PROF(A). DR(A). EDSON ANTUNES

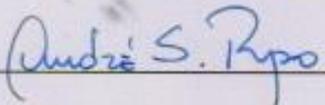
MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). EDSON ANTUNES 

2. PROF(A). DR(A). MARIA ANDRÉIA DELBIN 

3. PROF(A). DR(A). JOSÉ ANTONIO ROCHA GONTIJO 

4. PROF(A).DR(A). CLÉLIA AKIKO HIRUMA 

5. PROF(A).DR(A). ANDRÉ SAMPAIO PUPO 

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 22 de julho de 2014

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Antonio Celso e Catarina,
pelo amor incondicional, e ajuda em todas as
escolhas profissionais que tenho feito.*

*À minha irmã Isis Maria, pelo exemplo de
dedicação e luta pelos nossos sonhos.*

*À minha sobrinha Clara Luísa, por me fazer
olhar para frente e acreditar em um futuro
melhor.*

*Á minha namorada Aline, pela paciência e
apoio durante este trabalho. Uma pessoa
que eu amo e admiro muito.*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço à Fundação de Apoio a Pesquisa
do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo
apoio financeiro concedido, sem o qual este
trabalho não poderia ser realizado.*

*Ao meu orientador
Prof. Dr. Edson Antunes
Agradeço pela oportunidade, paciência e
orientação.*

*Ao meu co-orientador
Prof. Dr. Andrew Grant
Agradeço pela convivência, amizade e
importantes ensinamentos.*

Aos meus amigos da “Cascaata”, Camila, Eduardo, Fabiano, Fábio, Julio, Luiz Osório, Lorenzo, Mariana, Marcy, Rafael, Renam, Renata, e Tuany agradeço pela ajuda e pelos momentos descontraídos que me proporcionaram durante todo o período que permaneci no laboratório.

Ao Prof. Dr. Hernandes F. Carvalho, e aos amigos do laboratório de matriz extracelular do IB/UNICAMP, Guilherme Barbosa e Taíze Augusto, pelo auxílio e apoio durante a realização dos experimentos de influxo de cálcio extracelular.

Ao Prof. Dr. Gabriel F. Anhô e aos amigos do laboratório de fisiologia endócrina do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Juliana, Tiago, Ana, Danilo, e Carolina, pelo auxílio e apoio durante os experimentos de western blotting.

À Prof^a Dr^a Soraia K. Costa, ao Prof. Dr. Marcelo N. Muscará, à Dr^a. Simone Teixeira e a Dr^a Karen Tiago dos Santos do Departamento de Farmacologia do ICB/USP pelo auxílio e apoio durante os experimentos de RT-PCR e western blotting para os receptores TRPM8 e TLR4.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Elen, Camila, Lineu, Marina, Rafael Prada, Sisi Marcondes, Dalize, Glauca, Eliza, Lurdez, e Sandro pela convivência.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Maísa, Agnaldo, Toninho pelos serviços prestados.

Especialmente, agradeço ao Sr. Miguel Borges da Silva por dispensar tanto cuidado na criação dos animais.

Aos colegas Daniel, Enilton, Elizabeth, Juan, Hannes, John, Ana, Chin, Chang pelo apoio durante o estágio no King's College (Londres).

RESUMO

Os receptores TRPV4 e TRPM8 são expressos no urotélio e em fibras aferentes sensitivas da bexiga. Fisiologicamente, a ativação mecânica do receptor TRPV4 na parede da bexiga participa do controle miccional. Em doenças de origem inflamatória, esses receptores adquirem funcionalidade importante. As disfunções da bexiga no diabetes podem estar associadas a alterações ao nível de detrusor, da inervação e do urotélio. A disfunção urotelial parece ser a responsável por desencadear as alterações neurais e musculares da bexiga. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos fisiopatológicos da ativação dos receptores TRPV4 e TRPM8 no estado diabético em camundongos. Para tanto, dividimos o estudo em duas etapas, sendo que na primeira avaliamos a participação dos receptores TRPV4 e TRPM8 nos mecanismos contráteis e relaxantes do detrusor isolado de animais controles e *knockout* para esses canais. Em uma segunda etapa estudamos a ativação desses canais em camundongos diabéticos pela injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ; 180 mg/Kg) após 4 semanas. Em fragmentos do detrusor isolados de camundongos controles mostramos que o agonista do receptor TRPV4, GSK1016790A, causou resposta contrátil dependente da concentração. Por outro lado, quando os tecidos foram contraídos com solução despolarizante de KCl, o GSK1016790A causou relaxamento da preparação. No detrusor isolado de animais TRPV4^{-/-} verificamos hipercontratibilidade ao carbacol (agonista muscarínico) e à estimulação elétrica, assim como redução no relaxamento ao agonista β -adrenérgico não-seletivo, isoprenalina. Estes efeitos não foram obtidos com os antagonistas dos receptores TRPV4, RN1734 e HC067047. A STZ causou hiperglicemia, nocicepção mecânica

e aumento da proporção entre bexiga e peso corpóreo após 4 semanas da injeção de STZ. A avaliação miccional dos animais diabéticos mostrou aumento da capacidade, frequência urinária e das contrações involuntárias da bexiga. Observamos ainda hipercontratibilidade do detrusor ao carbacol, à estimulação elétrica e ao KCl. A indução do diabetes em animais TRPV4^{-/-} não modificou as disfunções “*in vivo*” e “*in vitro*” observadas nos animais *wyld type* diabéticos, mostrando que a ausência crônica dos receptores TRPV4 desencadeia alterações miccionais que são anteriores as causadas pelo diabetes. Também verificamos que os animais TRPM8^{-/-} não apresentam alteração na resposta contrátil ao carbacol e à estimulação elétrica. Por outro lado, o mentol, mas não a icilina, reduziu significativamente as respostas contráteis nestes animais. O mentol inibiu o influxo de cálcio extracelular em cultura de células da musculatura lisa da bexiga por mecanismo inibitório direto nos canais Cav_{1,2}. O tratamento agudo com mentol, intraperitoneal e intravesical, atenuou as disfunções miccionais observadas nos camundongos diabéticos. O pré-tratamento com mentol “*in vitro*” reduziu a hipercontratibilidade ao carbacol no grupo diabético, sem alterar a resposta no grupo controle. Concluímos que o mentol impede a resposta contrátil da bexiga por mecanismo independente do receptor TRPM8 bloqueando o influxo de cálcio extracelular nos canais Cav_{1,2}, podendo ser utilizado como tratamento na hiperatividade de bexiga de origem miogênica.

Palavras-chave: Bexiga urinária, diabetes experimental por estreptozotocina, TRPV4, TRPM8, mentol e canal de cálcio do tipo L.

ABSTRACT

The TRPV4 and TRPM8 receptors are expressed in bladder urothelium and sensitive afferent fibers. Physiologically, the mechanical activation of TRPV4 receptor in the bladder wall is involved in micturition control. In inflammatory diseases, these receptors may have important roles. The bladder dysfunction in diabetes may be associated with changes at the level of detrusor, innervation and urothelium. The urothelial dysfunction triggers neural changes, modifying consequently the smooth muscle contractility. Thus, the goal of the present study was to investigate the pathophysiological mechanisms of TRPV4 and TRPM8 receptor activation in physiological and diabetic conditions in mice. For this purpose we divided the study in two phases, the first of which we evaluated the participation of TRPV4 and TRPM8 receptors in detrusor contractile and relaxing mechanisms in control and *knockout* animals for these channels. In the second phase we studied the activation of these channels in diabetic mice induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ; 180 mg / kg, 4 weeks). The TRPV4 agonist GSK1016790A produced concentration-dependent detrusor contractions. On the other hand, in detrusor pré-contracted with KCl (80 mM), GSK1016790A caused relaxation responses. In TRPV4^{-/-} animals, we verified hypercontractility to carbachol (muscarinic agonist) and electrical-field stimulation, as well as a decreased relaxation to isoprenaline (non-selective β -adrenergic agonist). These effects were not obtained with the TRPV4 antagonists, RN1734 and HC067047. Induction of diabetes with STZ caused hyperglycemia, mechanical nociception, and increased ratio between bladder and body weight after 4 weeks. The miccturition evaluation in diabetic animals showed

increased capacity, urinary frequency, and non-voiding contractions. Hypercontractility to carbachol, electrical-field stimulation and KCl in isolated detrusor were also observed. The induction of diabetes in TRPV4^{-/-} animals did not change the urinary dysfunctions. Our data are consistent with the proposal that TRPV4 receptor has a physiological function in micturition control by decreasing muscarinic-induced contractions and increasing β -adrenergic-mediated relaxations. Moreover, the bladder contractions to carbachol and EFS in TRPM8^{-/-} did not significantly change compared to TRPM8^{+/+}. However, menthol (300 μ M), but not icilin (1 μ M), significantly inhibited these contractile responses. The menthol (300 μ M) inhibited extracellular calcium influx in bladder smooth muscle cell culture by direct mechanism through $C_{av1.2}$ channels. In addition the acute treatment with menthol, intraperitoneal and intravesical, attenuated the micturition dysfunctions observed in diabetic mice. Also, detrusor preparations pre-treated with menthol decreased carbachol hypercontractility, without changing the responses in normoglycemic group. Menthol reduces bladder contractions by mechanisms independent of TRPM8 receptor activation, inhibiting extracellular calcium influx through $Cav_{1.2}$ channel, thus been considered as treatment for bladder overactivity of myogenic origin.

Key words: Urinary bladder, experimental diabetes by streptozotocin, TRPV4, TRPM8, menthol, and L type calcium channels.

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
MgSO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
NaHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
Carbacol	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
EGTA	Sigma St. Louis, MO, EUA
CPA	Sigma St. Louis, MO, EUA
α,β-metileno-ATP	Sigma St. Louis, MO, EUA
RN-1734	Tocris Bioscience, Bristol, UK
HC067047	Tocris Bioscience, Bristol, UK
GSK1016790A	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Betanecol	Sigma St. Louis, MO, EUA
Vasopressina	Sigma St. Louis, MO, EUA
Mentol	Sigma St. Louis, MO, EUA
Icilina	Sigma St. Louis, MO, EUA
L-NAME	Sigma St. Louis, MO, EUA
Tetrodotoxina	Sigma St. Louis, MO, EUA

NMDG	Sigma St. Louis, MO, EUA
HEPES	Sigma St. Louis, MO, EUA
Nifedipina	Sigma St. Louis, MO, EUA
Isoprenalina	Sigma S
Caribdotoxina	Sigma St. Louis, MO, EUA
Apamina	Sigma St. Louis, MO, EUA
TEA	Sigma St. Louis, MO, EUA
Glibenclamida	Sigma St. Louis, MO, EUA
FluoForte [®]	Enzo Life Sciences, NY, USA

LISTA DE ABREVIACÕES

μM : micromolar

mg: miligrama

ACh: acetilcolina

ATP: trifosfato de adenosina

BK_{ca}: canal de potássio ativado por cálcio

Ca²⁺: cálcio

CCh: carbacol

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CPA: ácido ciclopiazônico

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EGTA: ácido etilenoglicol bis (2-aminoetileter) tetra acético

E_{max}: resposta máxima

E.P.M: erro padrão da média

GRD: gânglio da raiz dorsal

HEPES: Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico)

IP₃: inositol trifosfato

K_{ATP}: canal de potássio ativado por ATP

Kv: canal de potássio ativado por voltagem

MLC: cadeia leve de miosina

MLCK: quinase da cadeia leve de miosina

MLC-P: cadeia leve de miosina fosforilada

NMDG: N-metil-D-glucamina

PDGF α : fator de crescimento derivado de plaqueta

pEC₅₀: antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

SR: retículo sarcoplasmático

TEA: ácido tetraetilamônio

TTx: tetrodotoxina

TRP: receptor de potencial transiente

TRPV1: receptor de potencial transiente vanilóide do subtipo 1

TRPV4: receptor de potencial transiente vanilóide do subtipo 4

TRPM8: receptor de potencial melastatina do subtipo 8

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes histológicos da parede da bexiga-----	48
Figura 2. Mecanismos reflexos de enchimento e esvaziamento da bexiga----	51
Figura 3. Estrutura geral dos receptores de potencial transiente (TRPs)-----	56
Figura 4. Agonistas e antagonistas do receptor TRPV4-----	59
Figura 5. Diagrama esquemático da parede da bexiga-----	63
Figura 6. Agonistas do receptor TRPM8-----	67
Figura 7. Mecanismo de reflexo miccional frente à estimulação gelada em bexigas saudáveis e hiperativas de origem neurogênica-----	70
Figura 8. Imagem obtida por microscopia eletrônica da camada urotelial da bexiga de ratos controles e diabéticos por estreptozotocina-----	74
Figura 9. Resposta contrátil ao GSK1016790A em detrusor isolado de camundongos-----	92
Figura 10. Relaxamento produzido pelo GSK1016790A em preparação de detrusor isolado de camundongos controles pré-contraídos com solução de KCl-----	93
Figura 11. Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta contrátil ao carbacol em detrusor isolado de camundongos controles e TRPV4 ^{-/-} -----	94
Figura 12. Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta contrátil ao cloreto de potássio em detrusor isolado de camundongos controles e TRPV4 ^{-/-} -----	95
Figura 13. Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta contrátil ao cloreto de cálcio em detrusor isolado de camundongos controles e TRPV4 ^{-/-} -----	96
Figura 14. Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta contrátil ao estímulo elétrico em detrusor isolado de camundongos controles e TRPV4 ^{-/-} -----	98

Figura 15. <i>Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta contrátil ao α,β-metileno-ATP em detrusor isolado de camundongos controles e TRPV4^{-/-}-----</i>	99
Figura 16. <i>Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta relaxante à isoprenalina em detrusor isolado de camundongos controles e TRPV4^{-/-}-----</i>	100
Figura 17. <i>Níveis plasmáticos de glicose e peso corpóreo de camundongos controles e TRPV4^{-/-} após 4 e 28 dias da injeção de estreptozotocina-----</i>	101
Figura 18. <i>Avaliação nociceptiva frente à estimulação mecânica (Von Frey) e térmica (Hargreaves) em animais controle e TRPV4^{-/-} diabéticos---</i>	102
Figura 19. <i>Peso da bexiga (mg) e proporção entre a bexiga / corpo de animais controles e TRPV4^{-/-} diabéticos-----</i>	103
Figura 20. <i>Respostas contráteis do detrusor isolado de camundongos controle e TRPV4^{-/-} diabéticos-----</i>	106
Figura 21. <i>Avaliação funcional do receptor TRPM8 nas respostas contráteis do detrusor isolado de camundongos controles e TRPM8^{-/-}-----</i>	108
Figura 22. <i>Resposta contrátil à estimulação elétrica na ausência e na presença do mentol ou icilina em detrusor isolado de camundongos controles e TRPM8^{-/-}-----</i>	109
Figura 23. <i>Resposta contrátil ao carbacol em preparação de detrusor isolado de camundongos controles e TRPM8^{-/-} pré-tratadas com icilina e mentol-----</i>	111
Figura 24. <i>Efeito do pré-tratamento com mentol na resposta contrátil induzida pela estimulação elétrica e ao carbacol-----</i>	112
Figura 25. <i>Curva de contração ao carbacol em detrusor isolado de camundongos com e sem urotélio-----</i>	113
Figura 26. <i>Curva de contração ao carbacol em solução desprovida de sódio ou pré-tratada com tetrodotoxina em detrusor isolado de camundongos-----</i>	115

Figura 27. <i>Curva de contração ao betanecol, vasopressina e cloreto de potássio na presença do mentol em detrusor isolado de camundongos</i> -----	117
Figura 28. <i>Curva de relaxamento ao mentol em detrusor isolado de camundongos, pré-contraídos com cloreto de potássio na ausência e na presença dos bloqueadores dos canais de potássio</i> -----	119
Figura 29. <i>Curva de contração ao CaCl_2 na presença de mentol e/ou nifedipina em detrusor isolado de camundongos</i> -----	121
Figura 30. <i>Influxo de cálcio extracelular em cultura de célula primária da musculatura lisa da bexiga de camundongos</i> -----	122
Figura 31. <i>Avaliação cistométrica de animais controles e diabéticos na presença de mentol intravesical</i> -----	124
Figura 32. <i>Parâmetros citométricos após avaliação miccional na presença de mentol intravesical em animais controles e diabéticos</i> -----	125
Figura 33. <i>Curva de contração ao carbacol em detrusor isolado de camundongos controles e diabéticos na presença de mentol</i> -----	127
Figura 34. <i>Registro do padrão de micção em camundongos diabéticos tratados com mentol</i> -----	129

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	47
1.1 Vias eferentes e aferentes no controle miccional	48
1.2. Família de receptores de potencial transiente	54
1.3. O receptor TRPV4 e sua ativação/inibição	57
1.4. Participação do receptor TRPV4 na fisiopatologia do trato urinário inferior	59
<i>1.4.1 Envolvimento do receptor TRPV4 no controle urotelial da secreção de ATP</i>	61
1.5. O receptor TRPM8 e sua ativação	64
<i>1.5.1. Resposta inibitória do mentol independente do receptor TRPM8</i>	66
1.6. Participação do receptor TRPM8 na fisiopatologia do trato urinário inferior	68
1.7. Diabetes e distúrbios miccionais	70
1.7.1. Diabetes experimental e disfunção vesical.....	72
2. MATERIAIS E MÉTODOS	78
2.1. Animais	79
2.2. Indução do diabetes	80
2.3. Testes comportamentais	80

2.3.1. Teste de retirada da pata frente à estimulação mecânica (Von Frey)-----	80
2.3.2. Teste de retirada da pata frente à estimulação por calor (Hargreaves)-----	81
2.4. Avaliação da função miccional “in vivo”-----	81
2.4.1. Análise cistométrica-----	81
2.4.2. Ensaio da mancha de micção em papel filtro-----	82
2.5. Avaliação funcional da bexiga “in vitro”-----	83
2.5.1. Isolamento e montagem dos tecidos-----	83
2.5.2. Respostas contráteis-----	84
2.5.3. Resposta contrátil na ausência de sódio e uso do bloqueador tetrodotoxina (TTX)-----	85
2.5.4. Resposta contrátil mediada pelo influxo de cálcio extracelular-----	85
2.5.5. Respostas relaxantes-----	86
2.5.6. Parâmetros farmacológicos-----	86
2.6. Cultura primária de células detrusoras-----	87
2.7. Determinação do influxo de cálcio extracelular $[Ca^{2+}]_i$-----	88
2.8. Análise estatística-----	89
3. RESULTADOS -----	90

3.1. Avaliação funcional do detrusor isolado em camundongos controles e TRPV4^{-/-} -----	91
3.1.1. Curva de contração ao GSK1016790A-----	91
3.1.2. Curva de relaxamento ao GSK1016790A-----	93
3.1.3. Curva concentração-resposta ao carbacol-----	93
3.1.4. Curva concentração-resposta ao cloreto de potássio-----	95
3.1.5. Curva concentração-resposta ao CaCl ₂ -----	96
3.1.6. Curva frequência-resposta-----	97
3.1.7. Curva não-cumulativa ao α,β -metileno-ATP-----	98
3.1.8. Curva concentração-resposta de relaxamento à isoprenalina-----	99
3.2. Modelo de bexiga hiperativa causada pela STZ: papel do TRPV4 -----	100
3.2.1. Concentração plasmática de glicose e peso corporal-----	100
3.2.2. Avaliação nociceptiva aos estímulos mecânico e ao calor-----	101
3.2.3. Peso da bexiga e proporção entre a bexiga e o corpo após 4 semanas de diabetes-----	103
3.2.4. Curva concentração-resposta ao carbacol em detrusor de camundongos diabéticos wyld type e TRPV4 ^{-/-} -----	103
3.2.5. Curva concentração-resposta ao cloreto de cálcio (CaCl ₂)-----	104
3.2.6. Curva frequência-resposta-----	104
3.2.7. Resposta contrátil ao cloreto de potássio (KCl 80 mM)-----	105
3.3. Avaliação funcional do receptor TRPM8 na bexiga de camundongos -----	107

3.3.1. Curva frequência-resposta do detrusor isolado de camundongos controles e <i>TRPM8</i> ^{-/-} -----	107
3.3.2. Curva concentração-resposta ao carbacol-----	107
3.3.3. Curva concentração-resposta não-cumulativa ao α,β -metileno-ATP-----	107
3.3.4. Contração ao cloreto de potássio-----	108
3.3.5. Curva frequência-resposta do detrusor na presença dos agonistas do receptor <i>TRPM8</i> (mentol e icilina)-----	109
3.3.6. Curva concentração-resposta ao carbacol na presença do mentol e icilina-----	110
3.3.7. Caracterização farmacológica do efeito inibitório do mentol-----	111
3.3.8. Mecanismo inibitório do mentol independente do urotélio-----	113
3.3.9. Mecanismo inibitório do mentol independente de excitação neuronal-----	114
3.3.10. Mecanismo inibitório do mentol nas respostas contráteis ao betanecol, vasopressina e KCl-----	116
3.3.11. Mecanismo inibitório independente da ativação dos canais de potássio dependentes de voltagem (K_V), de cálcio (<i>SK</i> e <i>BK</i>) e de ATP- (K_{ATP})-----	118
3.3.12. Mecanismo inibitório dependente do bloqueio de cálcio extracelular através do canal de cálcio do tipo L de membrana ($Ca_{V1,2}$)-----	120
3.3.13. Inibição do influxo de cálcio extracelular em cultura de células musculares da bexiga-----	121
3.4. Avaliação terapêutica do mentol na hiperatividade de bexiga causada pelo diabetes-----	123
3.4.1. Instilação intravesical de mentol-----	123

3.4.2. Avaliação funcional do detrusor isolado de animais diabéticos tratados “in vitro” com mentol-----	126
3.4.3. Avaliação do perfil miccional de animais diabéticos tratados “in vivo” com mentol-----	128
4. DISCUSSÃO -----	130
5. CONCLUSÃO -----	145
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	147
7. APÊNDICE-----	165

1.Introdução

1.1 Vias eferentes e aferentes no controle miccional

O trato urinário inferior é constituído pela bexiga, uretra e esfíncteres. A bexiga, por sua vez, apresenta duas regiões distintas: uma ampla região localizada acima dos orifícios ureterais, denominada “corpo da bexiga”, que contém o músculo liso detrusor, e uma região menor, abaixo dos orifícios ureterais, denominada “base da bexiga”, que é constituída pelo músculo liso trígono e junção uretrovesical. Histologicamente, o corpo da bexiga é dividido em 4 partes: (1) a túnica adventícia que reveste externamente a bexiga, (2) a túnica muscular, denominada de detrusor, (3) a lâmina própria, onde se encontram as células intersticiais, e (4) o urotélio, que a reveste internamente (Figura 1).

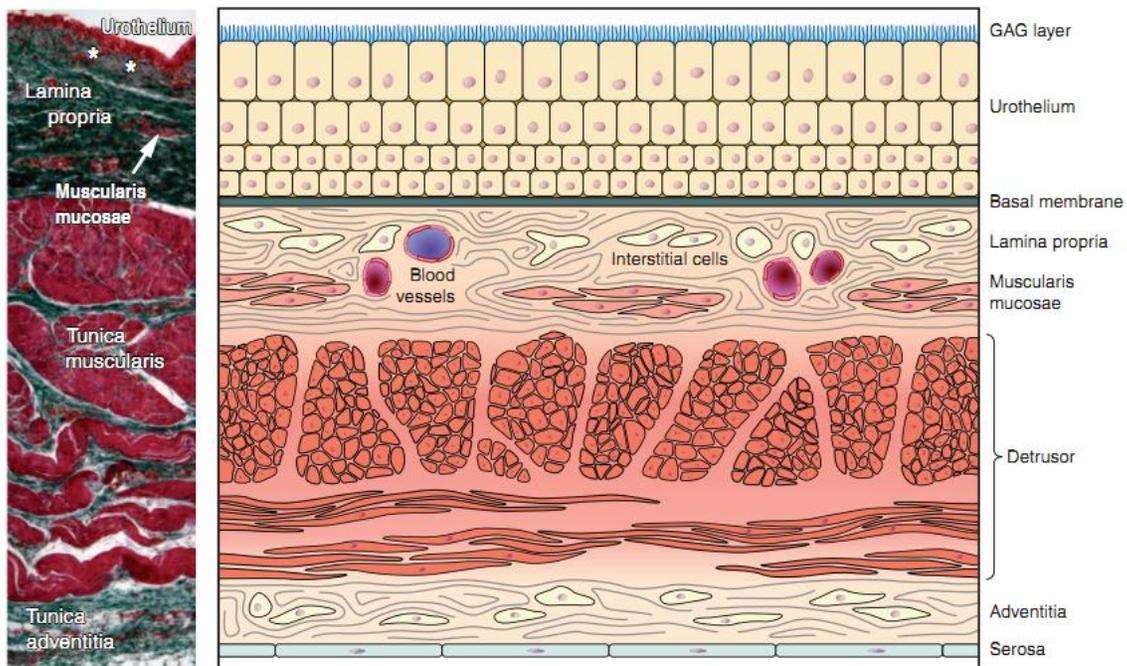


Figura 1- Componentes histológicos da parede da bexiga. À esquerda, secção transversão de bexiga humana normal corada por H&E. À direita, desenho representativo dos componentes histológicos da bexiga. GAG layer, camada de glicosaminoglicanos; Urothelium, camada urotelial; Basal membrane, membrana basal (Para revisão: Birder e Andesson, 2013).

A bexiga urinária é um órgão elástico que apresenta capacidade de estocar e ejetar urina, sendo o detrusor a principal musculatura lisa deste órgão. As fibras musculares do detrusor são capazes de se distender permitindo um aumento do volume da bexiga sem produzir aumento da pressão intravesical (fase de enchimento) e, concomitantemente, de se contrair de maneira suficiente para gerar a pressão necessária para ejetar a urina (fase de esvaziamento). A dinâmica entre o enchimento e o esvaziamento urinário depende não somente das atividades do detrusor, do trígono, da uretra e dos esfíncteres uretral interno e externo, como também da inervação autonômica e/ou somática nestas estruturas e de seus neurotransmissores, os quais determinarão o funcionamento da continência urinária. A fase de armazenamento apresenta duas subfases, sendo uma inicial que corresponde apenas a enchimento, e uma segunda que se processa após a primeira sensação para micção. A fase de esvaziamento é caracterizada pelo aumento da pressão intravesical com consequente eliminação da urina (Para revisão: Fowler *et al.*, 2008). Durante a fase de armazenamento de urina ocorre, simultaneamente, relaxamento do detrusor e contração da base da bexiga e da uretra, sendo esses eventos mediados, predominantemente, por catecolaminas liberadas de fibras autonômicas simpáticas. Na fase de esvaziamento, o detrusor se contrai, ao passo que a base da bexiga e uretra relaxam. Esses eventos são mediados, respectivamente, pela acetilcolina (ACh), oriunda de fibras autonômicas parassimpáticas ao nível de detrusor, e por fibras simpáticas e neurônios nitrérgicos na base da bexiga e da uretra (Para revisão: Fowler *et al.*, 2008).

Em relação à inervação autonômica e somática da bexiga, sabe-se que a mesma é inervada pelos nervos pélvico, hipogástrico e pudendo (Figura 2; Para revisão: de Groat e Yoshimura, 2006). O nervo pélvico conduz fibras parassimpáticas para o detrusor, sendo sua atividade relacionada, essencialmente, à fase de esvaziamento (de Groat e SAUM, 1976; Nishizawa *et al.*, 1987). A ativação dessas fibras leva à liberação de ACh, a qual interage com receptores muscarínicos, predominantemente do subtipo M3, causando contração muscular (Rivera *et al.*, 1992; Kondo *et al.*, 1995; Longhurst *et al.*, 1995). Além da ACh, o nervo pélvico libera neurotransmissores não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC), como o trifosfato de adenosina (ATP) e o óxido nítrico (NO).

O nervo hipogástrico conduz fibras simpáticas para parte do detrusor, e para a base da bexiga e uretra. A atividade deste nervo está relacionada à fase de armazenamento de urina, evento este mediado pela liberação de noradrenalina. Este neurotransmissor interage com receptores β_2 e β_3 no detrusor, cuja ativação resulta em relaxamento muscular, e com receptores do subtipo α_{1A} no trígono e na uretra, cuja ativação resulta em contração muscular (Honda *et al.*, 1985; Morgan *et al.*, 1986; Morita *et al.*, 1990; Oshita *et al.*, 1997).

O nervo pudendo é responsável pela liberação de ACh, que interage com receptores nicotínicos no esfíncter uretral externo, levando à contração dessa musculatura, contribuindo, assim, para o processo de retenção urinária (Thor *et al.*, 1989; Fowler *et al.*, 2008).

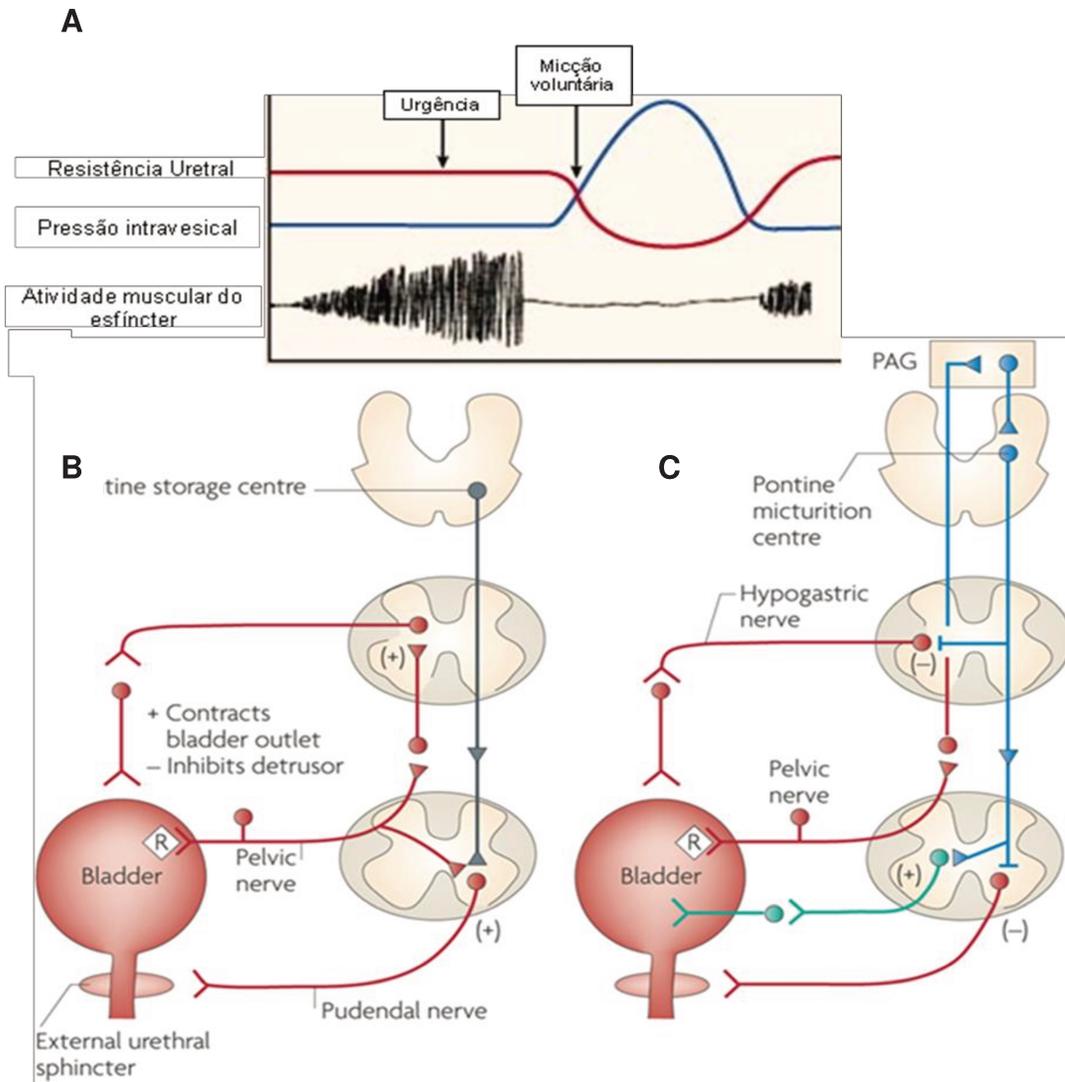


Figura 2- Mecanismos reflexos de enchimento e esvaziamento da bexiga. (A) Traçado representativo da avaliação cistométrica acoplada à eletromiografia do esfíncter uretral. O enchimento da bexiga, em indivíduos saudáveis, aumenta a atividade muscular do esfíncter sem modificar a pressão intravesical. No esvaziamento, a atividade do esfíncter é interrompida e a pressão intravesical aumenta. (B) Reflexo neural na fase de enchimento: durante a fase de enchimento há a ativação de fibras nervosas simpáticas (hipogástrico) e somáticas (pudendo), que, quando ativadas, promoverão o fechamento da saída da bexiga (base e uretra) assim como do esfíncter uretral externo, respectivamente. (C) Reflexo neural na fase de esvaziamento: o início da micção ocorre devido ao aumento da atividade aferente, a qual ativará o centro da micção (centro pontino da micção), promovendo assim inibição das vias simpáticas e somáticas. O centro pontino estimulará as fibras nervosas eferentes parassimpáticas que inervam tanto a bexiga como a saída da bexiga. PAG: zona periaquedutal (de Groat e Yoshimura, 2006).

As fibras aferentes (sensitivas) da bexiga e da uretra estão presentes nas ramificações do plexo pélvico e atingem a medula espinal via nervos pélvico, hipogástrico e pudendo (Steers *et al.*, 1991; Streng *et al.*, 2004; de Groat e Yoshimura, 2010). Os impulsos aferentes vesicais ativam os motoneurônios pudendos do núcleo de Onuf (inervam o esfíncter uretral estriado), aumentando a atividade tônica do esfíncter uretral e, por conseguinte, a resistência da uretra. Na micção voluntária há redução da atividade dos músculos do assoalho pélvico e da pressão uretral, que precedem a contração do detrusor. Ao mesmo tempo, ocorre a ativação do centro pontino, que envia impulsos para a medula sacral, ativando neurônios parassimpáticos, desencadeando, assim, a contração do detrusor (Para revisão: Yoshimura *et al.*, 2008). Simultaneamente, impulsos da ponte inibem os motoneurônios pudendos (núcleos de Onuf) que inervam o esfíncter uretral estriado, causando relaxamento destes tecidos. Iniciada a contração do detrusor, a descarga aferente gerada pela tensão na parede vesical reforça o reflexo miccional. O fluxo de urina pela uretra facilita o esvaziamento, pois também estimula a contração do detrusor. Quando a micção está chegando ao fim, o assoalho pélvico se contrai e eleva o colo vesical, que se fecha, quando então a pressão do detrusor se reduz (Para revisão: Yoshimura, 2008).

Os nervos aferentes são compostos por fibras nervosas mielinizadas A δ , responsáveis pelas respostas proprioceptivas, e por fibras não mielinizadas do tipo C, relacionadas às respostas nociceptivas. As fibras A δ são conhecidas como fibras nervosas finas de alta velocidade de condutância e de baixo limiar de estimulação. Estão localizadas, principalmente, na camada muscular ao nível do

detrusor, e respondem ao estiramento mecânico da musculatura lisa durante a fase de armazenamento, transportando informações de monitoramento do volume vesical (Para revisão: Andersson, 2002; Ouslander, 2004; Yoshimura, 2007).

As fibras sensoriais do tipo C (pobres em neurofilamentos) são amplamente dispersas pelo detrusor, mucosa e urotélio. Quando ativadas apresentam um maior limiar excitatório mecânico do que as fibras A δ (Habler *et al.*, 1990; Dmitrieva e McMahon 1996). A participação dessas fibras na fisiologia da bexiga é pouco compreendida, mas sabe-se que estão envolvidas no reflexo miccional em condições de lesão da coluna vertebral (Para revisão: de Groat *et al.*, 2010). Estas fibras não respondem à distensão da parede vesical; porém, se tornam ativas durante irritação química, em situações de alta osmolaridade, em presença de concentrações elevadas de potássio, e de inflamação local (Wiseman *et al.*, 2002). Por isso, são referidas como “fibras aferentes silenciosas”, visto que se tornam ativas em situações especificamente patológicas. Essas fibras são sensíveis ao ATP, à capsaicina e à resiniferatoxina, que a despolarizam pela ativação de receptores do tipo P2X₃ e P2X_{2/3} (Para revisão: Fowler *et al.*, 2008).

Os neurônios aferentes da bexiga, principalmente as fibras do tipo C, podem conter vários tipos de receptores ionotrópicos e metabotrópicos, como os receptores de potencial transiente TRPV1, TRPA1, TRPM8, tropomiosina quinase A (TrkA; receptor que responde ao NGF), receptores de estrógeno α e β , tropomiosina quinase B (TrkB; que responde para o fator neurotrófico cerebral), receptor do fator neurotrófico derivado de célula glial (GDNF; que respondem para GFR α 1 e GFR α 3), receptor neurotrófico p75, sítios de ligação à isolectina B4, e

receptores purinérgicos P2X₂, P2X₃ e P2Y (que são ativados pelo ATP) (Vizzard, 2006). A grande variedade de receptores expressos nas fibras aferentes da bexiga indica que os mecanismos sensoriais são complexos e envolvem várias vias de sinalização. Dessa forma, uma mesma substância pode interagir com um receptor e produzir estado de excitação; ao mesmo tempo, pode interagir com outro receptor e produzir efeito inibitório, suprimindo a ativação aferente. Essa complexa atividade das fibras aferentes não se processa apenas pela expressão de múltiplos receptores, mas também por interagir com células não-neurais (células uroteliais, células intersticiais e miofibroblastos), as quais podem modular a atividade dos nervos aferentes por secretarem mensageiros químicos (Zhong *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2006; Streng *et al.*, 2008; Everaerts *et al.*, 2010).

1.2 Família de receptores de potencial transiente

A identificação dos canais de potencial transiente (TRPs) em mamíferos veio do estudo dos fotoreceptores em *Drosophila* (Minke, 1977). Neste estudo, analisando a luz emitida pelo gradiente eletroquímico em insetos, foi observado em um mutante da *Drosophila* a chamada corrente transiente, diferente da até então conhecida corrente sustentada. Outras análises mostraram que esses mutantes não apresentavam o canal de influxo de cálcio (Ca²⁺), e, assim, o canal de cálcio relacionado à fotoluminescência em *Drosophila* foi mais tarde chamado de TRP (receptor de potencial transiente).

Vários outros trabalhos confirmaram a função dos canais TRPs em controlar os mecanismos fisiológicos de sensibilidade térmica e mecânica, resposta a estímulos dolorosos, sabor e ferormônios (Para revisão: Calixto *et al.*, 2005; Flockerzi e Nilius, 2014). No início dos anos 2000 vários homólogos dos canais TRPs foram clonados em invertebrados e vertebrados. Como ocorre com outros receptores reconhecidos como canais iônicos com segmentos transmembranares, os canais TRPs são catiônicos, não seletivos, e apresentam intracelularmente terminais amino (N-) e carboxílico (COO-) com 6 segmentos transmembranares (TM1-6) com poro para permeabilidade catiônica entre os segmentos 5 e 6 (Figura 3; Para revisão: Moran *et al.*, 2011). Essas novas famílias identificadas de canais iônicos foram divididas em 6 classes de receptores: TRPC (família dos TRP catiônicos, curto, 1-7), TRPM (família dos TRP melastatina, longo, 1-8), TRPV (família TRP de receptor vanilóide, 1-6), TRPA (família TRP com repetição de anquirina), TRPP (família TRP policistina, 2, 3 e 5) e TRPML (família TRP mucolipina, 1-3; Para revisão: Calixto *et al.*, 2005; Flockerzi e Nilius, 2014).

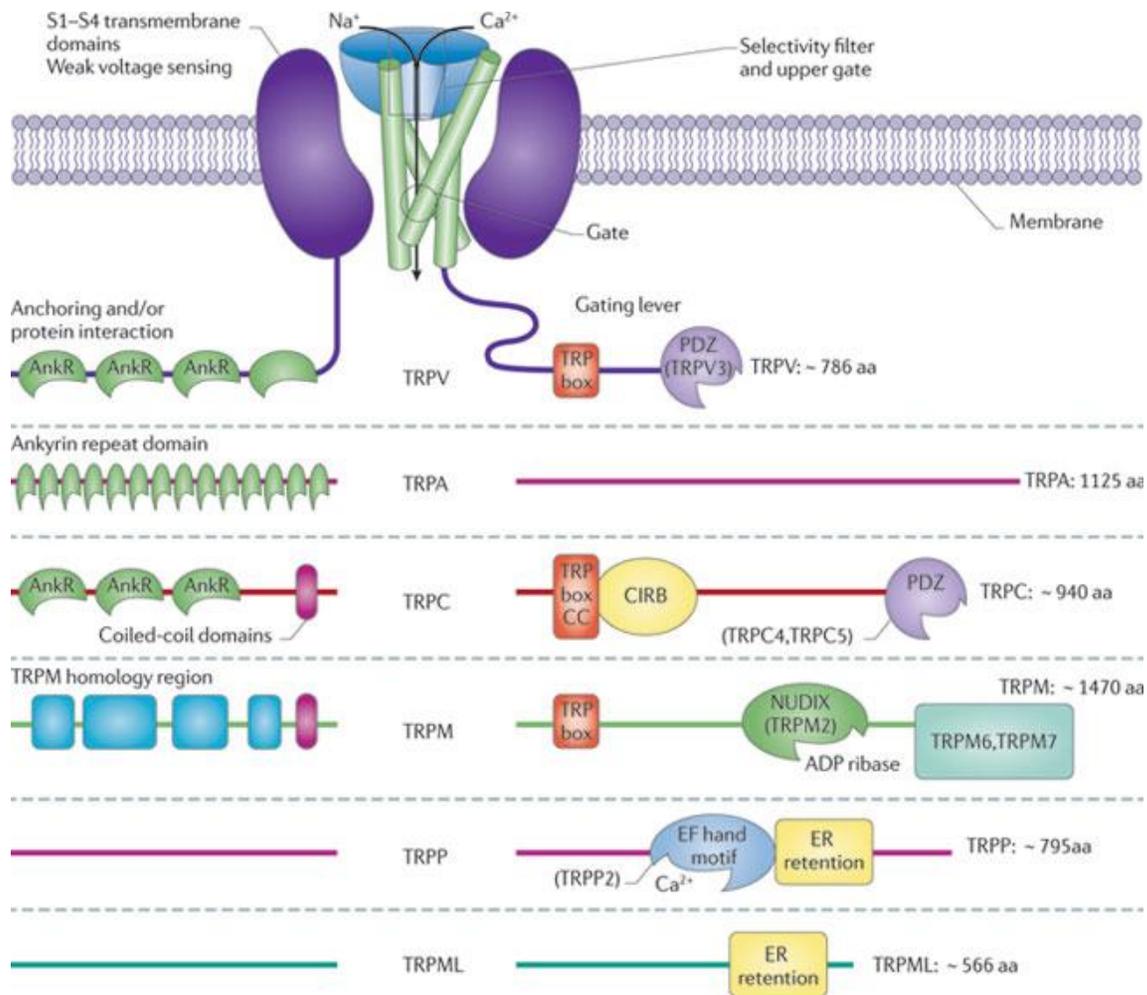


Figura 3- Estrutura geral dos receptores de potencial transiente (TRPs). Representação esquemática das 6 classes de TRPs (TRPV, TRPA, TRPC, TRPM, TRPP e TRPML). Intracelularmente, são encontrados dois domínios, amino terminal (N-; esquerda) e carboxílico terminal (COO-; direita). Transmembranalmente, são encontrados 6 segmentos (S1-6), sendo que entre os segmentos 5 e 6 encontra-se o poro de influxo catiônico. A repetição dos domínios de anquirina na porção N-terminal não é encontrada no subtipo melastatina (M) dos TRPs. O sítio de ligação denominado TRP Box não é encontrado no subtipo anquirina (A) dos TRPs. CIRB, região de ligação à calmodulina/inositol-1,4,5-trifosfato; NUDIX, nucleosídeo de ligação difosfato X; PDZ, acrônimo para proteína pós-sináptica 95 (PSD95; Moran *et al.*, 2011).

1.3 O receptor TRPV4 e sua ativação/inibição

O termo vanilóide desta família foi empregado após identificação do primeiro ativador de TRP vanilóide do subtipo 1 (TRPV1), a capsaicina, a qual apresenta em sua estrutura química o grupo vanilil. Outro constituinte da família dos TRPs é o membro do subtipo 4 (TRPV4). Este canal encontra-se amplamente presente em mamíferos, particularmente em neurônios sensitivos, bexiga, pele (queratinócitos), pulmão, rim, artérias, cérebro e intestino (Strotmann *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2004; Cohen, 2005; Watanabe *et al.*, 2008).

As funções do receptor TRPV4 são igualmente diversas, com participação na osmoregulação (Liedtke e Friedman, 2003), controle da pressão arterial (Earley *et al.*, 2009; Sonkusare *et al.*, 2012; Sukumaran *et al.*, 2013) e controle miccional (Gevaerts *et al.*, 2007). Este canal pode ser ativado por vários estímulos físicos, como alteração da tonicidade (*cell swelling*), estiramento mecânico e calor moderado (>24-27°C) (Nilius *et al.*, 2004). Pode também ser ativado por estímulos químicos endógenos, como o endocanabinóide anandamida, os metabólitos do ácido araquidônico (AA) via citocromo P450 (ácidos 5,6 e 8,9 epoxieicosatrienóicos) e o metabólito da degradação do mevalonato (dimetil-alil pirofosfato) (Watanabe *et al.*, 2003; Bang *et al.*, 2012; Para revisão: Kaneko e Szallasi, 2014).

O GSK1016790A foi descrito como um novo ativador do canal TRPV4, causando potente influxo de Ca^{2+} em cultura de células HEK (células embrionárias de rim humana) expressando o receptor TRPV4 ($\text{EC}_{50} \sim 18 \text{ nM}$). O GSK1016790A é mais potente em canais TRPV4 humanos ($\text{EC}_{50} \sim 2,1 \text{ nM}$ - Thorneloe *et al.*,

2008). Essa substância também se mostrou 10 vezes mais potente para o TRPV4 do que para o TRPV1, que é considerado o membro da família TRP mais próximo do TRPV4 (Willette *et al.*, 2008). Em outros experimentos, também utilizando células HEK, o GSK1016790A foi testado para se avaliar a ativação dos canais TRPM8 e TRPA1 humanos, em concentrações até 20 μ M. Nestes experimentos não foi verificado influxo de cálcio. Em cultura de células HEK expressando o canal TRPV4, o GSK1016790A, na concentração de 10 nM, foi capaz de ativar o TRPV4 (Thorneloe *et al.*, 2008).

Dentre os antagonistas do receptor TRPV4, o HC-067047 e o RN-1734 foram os primeiros descritos (Vincent *et al.*, 2009; Everaerts *et al.*, 2010; Figura 2). Em cultura de células (HEK) expressando o receptor TRPV4 de camundongos, observou-se que tanto o HC-067047 quanto o RN-1734, nas concentrações de 1 e 10 μ M, respectivamente, foram eficazes em inibir o influxo de cálcio induzido tanto pela hipotonicidade como pelo agonista GSK1016790A. Estes compostos não interferiram na resposta de outros TRPs (Everaerts *et al.*, 2010).

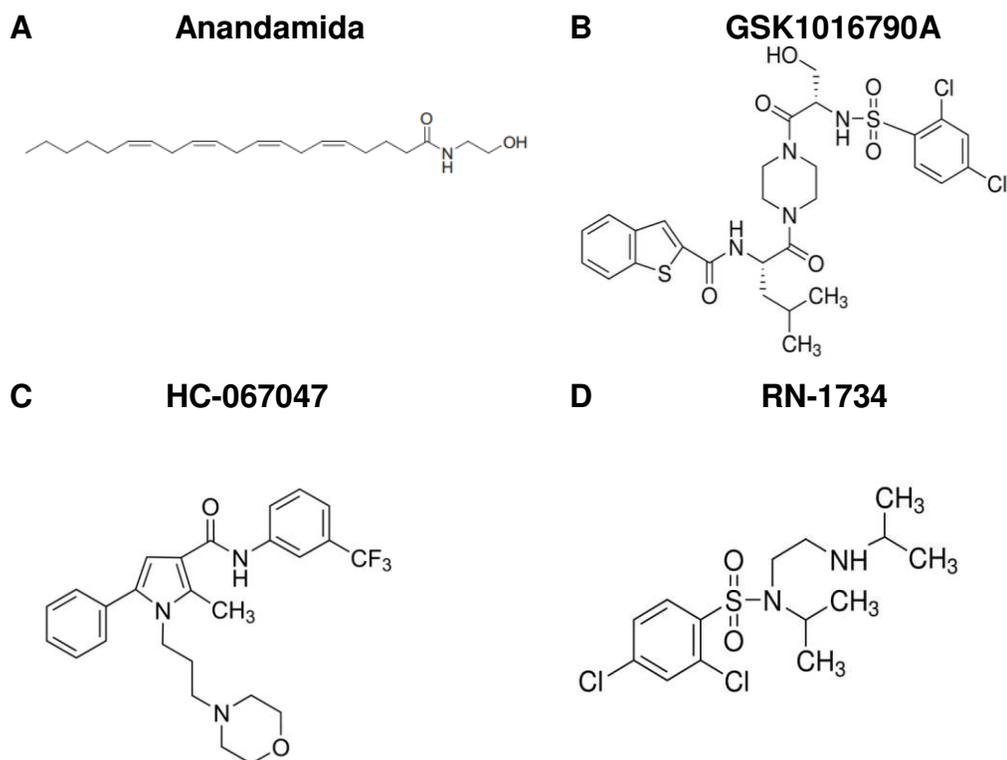


Figura 4- Agonistas e antagonistas do receptor TRPV4. (A) O agonista endógeno, anandamida; (B) O agonista sintético, GSK1016790A; (C) O antagonista, HC-067047; (D) O antagonista, RN-1734.

1.4 Participação do receptor TRPV4 na fisiopatologia do trato urinário inferior

O canal TRPV4 é expresso na bexiga de camundongos (Gevaert *et al.*, 2007), sendo sua expressão na mucosa amplamente maior comparada à musculatura lisa (Thorneloe *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2009). Evidências indicam que camundongos *knockout* para o receptor TRPV4 apresentam alterações na função miccional em relação aos animais selvagens (Gevaert *et al.*, 2007). Por meio da técnica de cistometria, os animais TRPV4^{-/-} apresentaram aumento na capacidade da bexiga, no intervalo entre os ciclos miccionais, no número de

contrações involuntárias e na pressão de micção (Gevaert *et al.*, 2007; Thorneloe *et al.*, 2008; Everaerts *et al.*, 2010), que corresponde à redução na sensibilidade de distensão da parede vesical. Estes resultados corroboram com os obtidos por Suzuki *et al.*, (2003) que demonstraram em camundongos TRPV4^{-/-} redução na sensibilidade do nervo femoral frente à resposta pressórica nociceptiva na pele.

O TRPV4 é relacionado à hipersensibilidade mecânica, inflamação e neuropatia de diferentes etiologias (Alessandri-Haber *et al.*, 2006), como a induzida por quimioterápicos (vincristina) (Aley *et al.*, 1996), no consumo excessivo de álcool (Dina *et al.*, 2006) e no diabetes induzido por estreptozotocina (STZ; Aley e Levine, 2002). O mecanismo relacionado à hipersensibilidade mecânica na resposta inflamatória envolve a estimulação do receptor ativado por protease-2 (PAR2) em neurônios aferentes da pele e do intestino, com consequente ativação das proteínas quinases do tipo C (PKC), do tipo A (PKA) e do tipo D (PKD), as quais sensibilizam o canal TRPV4, resultando no aumento do influxo de íons Na⁺ e Ca²⁺ para o meio citosólico. Isto favorece o aumento da sensibilidade nociceptiva por induzir a liberação de substâncias pró-inflamatórias como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P (Grant *et al.*, 2007). No trato urinário, a hiperatividade de bexiga de origem inflamatória causada pela injeção intraperitoneal de ciclofosfamida causa redução no volume de micção e aumento da frequência urinária, os quais são eficientemente inibidos em animais TRPV4^{-/-} ou pela injeção do antagonista HC067047 (Everaerts *et al.*, 2010).

Por outro lado, a funcionalidade do receptor TRPV4 na bexiga ainda é muito pouco entendida. Em estudo com bexiga isolada de camundongos foi observado que o GSK1016790A, através da ativação do receptor TRPV4, contraiu a preparação por ativar a entrada de cálcio extracelular pelos canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L de membrana (Cav_{1.2}), efeito este independente da mucosa e abolida em animais TRPV4^{-/-} (Thorneloe *et al.*, 2008). Contudo, como a expressão do receptor TRPV4 é amplamente maior na mucosa em relação à musculatura lisa, este parece não ser o principal mecanismo que explica as alterações no padrão de micção encontradas em animais TRPV4^{-/-}.

1.4.1 Envolvimento do receptor TRPV4 no controle urotelial da secreção de ATP

O urotélio tem como função garantir impermeabilidade à água, solutos e patógenos frente a variações na superfície vesical durante a estocagem de urina e micção. No entanto, é cada vez mais claro que o urotélio também desempenha um papel sensorial, contribuindo para a sensação mecânica e química da bexiga. As células uroteliais expressam uma grande variedade de receptores iônicos e metabotrópicos, incluindo os receptores TRPVs, receptores purinérgicos (P2X e P2Y), receptores muscarínicos e receptores nicotínicos. Além disso, as células uroteliais podem secretar várias moléculas sinalizadoras como o ATP, NO, prostanóides, substância P, ACh, adenosina e vários fatores de regulação trófica (Para revisão: Birder e Andersson, 2013). Evidências mostram que a ativação do receptor TRPV4 na mucosa vesical induz liberação de ATP frente ao estiramento mecânico (Gevaert *et al.*, 2007; Figura 5). Além disso, células uroteliais isoladas,

quando submetidas ao estiramento mecânico, aumentam a $[Ca^{2+}]_i$ e induzem liberação de ATP devido à ativação do receptor TRPV4 (Mochizuki *et al.*, 2009).

O ATP secretado das células uroteliais apresenta funções autócrina e parácrina local, podendo ativar receptores purinérgicos P2X dos subtipos 2 e 3 (P2X_{2/3}) nos neurônios aferentes. O ATP pode ainda ativar receptores purinérgicos da família P2Y nas células intersticiais, assim como receptores P2X₁ no detrusor (Figura 5). O receptor P2X_{2/3} é expresso em fibras nervosas aferentes da bexiga projetadas das camadas urotelial, lâmina própria e detrusora, sugerindo um papel importante do mesmo na regulação sensitiva funcional da bexiga (Kaan *et al.*, 2010; Para revisão: Birder e Andersson 2013). A infusão intravesical de ATP aumenta a atividade reflexa das fibras aferentes; por outro lado, a dessensibilização dos receptores purinérgicos pela infusão intravesical do agonista α,β -metileno-ATP diminui a atividade aferente reflexa. Além disso, em camundongos *knockout* para o receptor P2X₃, a atividade aferente é praticamente abolida (Nishiguchi *et al.*, 2005). No detrusor isolado de camundongos e ratos, o ATP e seu análogo sintético, α,β -metileno-ATP, causam contração através da ativação dos receptores P2X₁ o qual conseqüentemente promove influxo de cálcio extracelular, ativando a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC; Aronsson *et al.*, 2010; Leiria *et al.*, 2011).

O ATP também causa relaxamento da musculatura lisa da bexiga em ratos (Aronsson *et al.*, 2010), supostamente pela ativação direta do receptor P2Y₁ (Hernández *et al.*, 2009). Em estudo recente, demonstrou-se que o ATP causa abertura de canais SK3, promovendo a geração de gradiente eletroquímico

intracelular, que será conduzido para a musculatura lisa, causando relaxamento (Lee *et al.*, 2014). Apesar deste mecanismo não ser completamente entendido, existe na bexiga junções comunicantes (*gap junctions*) que poderiam apresentar função similar às junções comunicantes dos leitos vasculares (Ikeda *et al.*, 2007).

Outro mecanismo indireto do relaxamento ao ATP seria pela sua hidrólise a ADP por ectonucleotidases (NTPD). Encontram-se expressas na bexiga de camundongos cinco isoformas de ectonucleotidases, chamadas NTPD1, NTPD2, NTPD3, NTPD8 e NT5E (Yu *et al.*, 2011). O ADP pode também ativar os receptores P₂Y₁ ou ser convertido em adenosina, a qual ativa os receptores A₂A e A₂B, causando relaxamento da bexiga (Hernandez *et al.*, 2009; Aronsson *et al.*, 2010).

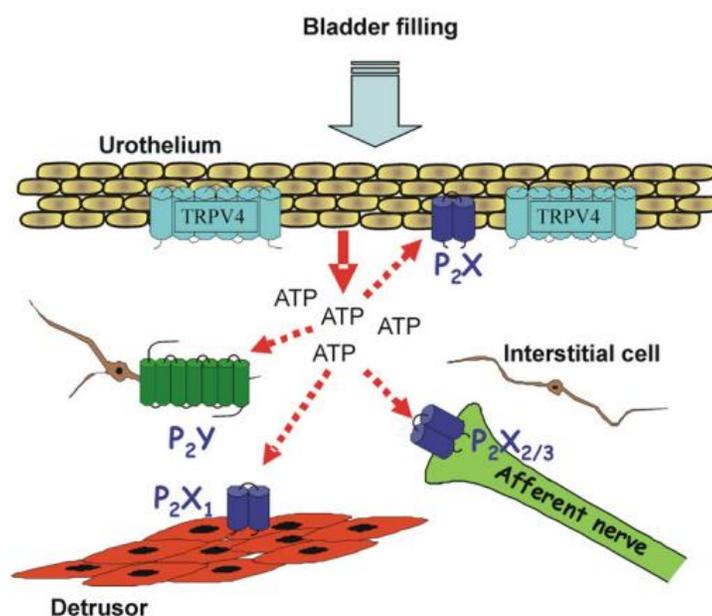


Figura 5- Diagrama esquemático da parede da bexiga. A distensão da bexiga durante a fase de enchimento ativa o canal TRPV4 presente no urotélcio, levando à liberação de ATP, que pode ativar receptores purinérgicos em diferentes tipos celulares (Montell *et al.*, 2008).

1.5 O receptor TRPM8 e sua ativação

A família de receptores TRPM (melastatina, longo) não apresenta a repetição de anquirina na região citosólica amino terminal (Figura 3). O termo melastatina originou-se do primeiro subtipo TRPM1, o qual foi relacionado à metástase de melanomas (Duncan *et al.*, 1998). Entretanto, a existência do TRPM8 foi descrita pela primeira vez por Tsavaler *et al.* em 2001, mostrando-se que a expressão do gene *trp-p8*, um gene específico da próstata, era maior no câncer de próstata e em células malignas. Neste mesmo trabalho também foi mostrado que o gene *trp-p8* tinha grande homologia com o gene dos receptores TRPs. Posteriormente, mostrou-se que o gene *trp-p8* codificava um canal permeável ao Ca^{2+} que seria ativado pelo frio e por substâncias refrescantes, como o mentol, o eucaliptol e a icilina (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). Seguindo a unificação das nomenclaturas para os TRPs, o *trp-p8* passou a ser classificado como parte da subfamília melastatina (“M”) e renomeado como do subtipo 8 (TRPM8; Montell *et al.*, 2002).

Além do tecido prostático, o TRPM8 foi identificado em neurônios sensoriais periféricos (fibras afentes do tipo A δ e C), gânglio da raiz dorsal (DRG) gânglio trigeminal (TG), testículos, ducto seminal, bexiga, pulmão, cólon e vasos sanguíneos (Stein *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2009; Ramachandran *et al.*, 2013). A detecção da temperatura permite aos organismos evitar condições de queimaduras e congelamentos, as quais podem ameaçar a sobrevivência, além de permitir a detecção de condições ideais para a alimentação, acasalamento e conforto. Os neurônios sensitivos da pele detectam tanto a temperatura em limiar

nocivo (conjunto de neurônios nociceptivos), quanto em limiar inócuo (para integração sensitiva térmica no SNC). Estudos em animais *knockout* para o receptor TRPM8^{-/-} mostraram que esse canal apresenta função importante na detecção de temperaturas frias ambientais (Dhaka *et al.*, 2007; Bautista *et al.*, 2007). Quando ativados por estímulos ao frio (25-10°C) em fibras aferentes e gânglios DRG e TG, o receptor TRPM8 causa influxo de Ca²⁺ intracelular, alterando o potencial de membrana, despolarizando conseqüentemente a célula nervosa, desencadeando assim as respostas sensitivas. Estes efeitos se contrapõem aos do receptor TRPV1, expresso também nas mesmas estruturas neurais, o qual promove sensação de calor, hiperalgesia e inflamação (Szallasi e Blumberg, 1999). Pelos mecanismos antagônicos existentes entre as respostas quentes-inflamatórias e as frias nos tecidos periféricos, parece existir uma aplicação terapêutica para os agonistas dos receptores TRPM8 como analgésicos e antiinflamatórios locais (Liu *et al.*, 2013).

O mentol é um monoterpene cíclico com função orgânica álcool, o qual apresenta em sua estrutura carbônica três átomos de carbono assimétricos (Figura 6A). Entre os isômeros ópticos, o (-)-mentol é o que ocorre em maior abundância na natureza, além de ser a substância que confere as propriedades peculiares de fragrância e sabor ao mentol. Por esta razão, o mentol é utilizado amplamente como flavorizante em creme dental, gomas de mascar e cigarros (Eccles, 1994). O mentol é descrito como agonista não-seletivo do receptor TRPM8 (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002), apresentando efeito refrescante por ativar esse receptor em células sensitivas (Reid e Flonta, 2002). O mentol é

capaz de ativar a corrente iônica no TRPM8, demonstrado através da técnica de patch-clamp (McKemy *et al.*, 2002). Por meio de registro de influxo de cálcio por imagem, demonstrou-se que o mentol, na concentração de 30 μM , inibe o influxo de Ca^{2+} através deste canal iônico (Macpherson *et al.*, 2006).

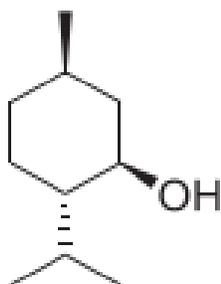
Entre os ligantes do receptor TRPM8 não derivados do mentol, encontra-se a icilina, previamente chamada de AG-35 (Figura 6B). A icilina foi primeiramente sintetizada como um agente depressor do SNC (Podesva e Do Nascimento, 1972). Entretanto, foi em células nervosas sensitivas periféricas que se demonstrou que a icilina é um potente refrescante, através da ativação do receptor TRPM8 (EC_{50} 0.36 μM), sendo sua potência e eficácia aproximadamente 200 e 2,5 vezes maior, respectivamente, que a do mentol (McKemy *et al.*, 2002). As diferenças moleculares entre o mentol e a icilina parecem se explicar por mecanismos diferentes de ligação com o receptor. Um dos estudos que dão suporte a essa visão mostra que a ativação do receptor TRPM8 pela icilina e frio (17°C) é modulada pelo pH intracelular, efeito este não observado com o mentol (Andersson *et al.*, 2004).

1.5.1 Resposta inibitória do mentol independente do receptor TRPM8

O mentol e a icilina são substâncias utilizadas para se investigar a função do receptor TRPM8 em diferentes tecidos. Contudo, trabalhos recentes sugerem que o mentol apresenta outros mecanismos independentes do canal TRPM8. O mentol pode, por exemplo, inibir alostericamente o receptor nicotínico em neurônios sensoriais do nervo trigêmeo (Hans *et al.*, 2012). Em cultura de gânglio

da raiz dorsal, demonstrou-se que o mentol inibe a condutância iônica em canais de sódio dependentes de voltagem ($Na_v 1.2$) resistentes à TTX (Gaudioso *et al.*, 2012). Por meio da técnica de *whole-cell patch clamp* em cardiomiócitos demonstrou-se que o mentol inibe o canal de cálcio do tipo L (Baylie *et al.*, 2010). Em artéria isolada de ratos pré-contraída com fenilefrina ou KCl mostrou-se a atividade relaxante do mentol independente do endotélio, do receptor muscarínico e de óxido nítrico (NO) (Johnson *et al.*, 2009). No baixo trato urinário há poucos estudos quanto à atividade do mentol, à exceção do estudo de Nomoto *et al.*, (2008) que mostrou a atividade inibitória do mentol frente à estimulação muscarínica pelo carbacol. Contudo, em nenhum momento especulou-se a possibilidade de o mentol ativar outros mecanismos farmacológicos independentes do receptor TRPM8.

A (-) Mentol



B Icilina

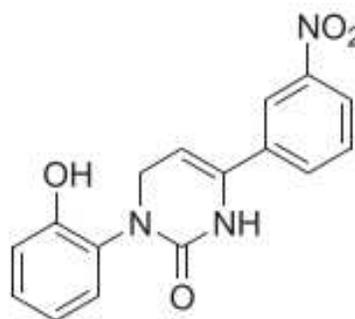


Figura 6- Agonistas do receptor TRPM8. (A) (-)-mentol, (1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol; (B) icilina, 1-(2-hidroxifenil)-4-(3-nitrofenil)-3,6-dihidropirimidina.

1.6 Participação do receptor TRPM8 na fisiopatologia do trato urinário inferior

A avaliação do reflexo vesical frente ao frio (*bladder cooling reflex*, BCR), ou simplesmente a contração da bexiga urinária causada pela infusão intravesical de água gelada é uma estratégia diagnóstica importante na investigação de hiperatividade neurogênica do detrusor (Geirsson *et al.*, 1999; Mukerji *et al.*, 2006; Steanu *et al.*, 2012; Figura 7). O termorreceptor sensível ao frio, TRPM8, é expresso no trato genitourinário (testículo, próstata, pênis, gânglio da raiz dorsal e bexiga) de humanos e ratos (Stein *et al.*, 2004). Na bexiga, a expressão do TRPM8 ocorre no urotélio e nas fibras aferentes do tipo C (Stein *et al.*, 2004). Em indivíduos saudáveis a instilação intravesical de água gelada ativa os receptores TRPM8; entretanto, o reflexo de contração vesical é inibido por sinais descendentes de centros superiores no córtex encefálico. Em condições de bexiga neurogênica ocorre aumento da condutância neural em fibras aferentes e prejuízo do mecanismo inibitório central do reflexo miccional, gerando dissinergismo contrátil entre bexiga e uretra, resultando em aumento da frequência urinária e incontinência (Figura 7; Mukerji *et al.*, 2006). Em gatos e ratos anestesiados, a instilação intravesical de água gelada (6-8°C) facilitou a condução iônica em fibras aferentes do tipo C presentes no nervo pélvico, causando dissinergismo entre o reflexo contrátil da musculatura detrusora e do esfícter uretral externo (Cheng *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2002).

Estudos recentes mostraram que a exposição de ratos conscientes a temperaturas ambientais geladas ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) causa hiperatividade detrusora por

mecanismo dependente da ativação do receptor TRPM8 na pele da região dorsal (Lei *et al.*, 2013; Noguchi *et al.*, 2013). Este mecanismo pode estar sensibilizado em processos patológicos de hiperatividade detrusora como o que ocorre em ratas ovariectomizadas, onde mostrou-se que a expressão do receptor TRPM8 na pele da região dorsal e a resposta ao frio ambiental estão significativamente aumentados (Noguchi *et al.*, 2013).

Os agonistas do receptor TRPM8, mentol e icilina, quando injetados na pata de ratos aumentam a sensibilidade ao estímulo gelado (10°C). Entretanto, essa resposta de hipersensibilidade à icilina foi abolida em animais TRPM8^{-/-} enquanto o mesmo não se observou para o mentol (Gentry *et al.*, 2010). A avaliação cistométrica de cobaias saudáveis com infusão intravesical de salina mentolada (0,6 mM) à 38 °C mostrou redução no volume de micção e aumento da pressão de micção (Tsukimi *et al.*, 2005). O mecanismo de hiperatividade de bexiga pelo mentol intravesical parece estar relacionado à ativação de fibras aferentes insensíveis à capsaicina (Nomoto *et al.*, 2008). O mesmo efeito foi obtido com a aplicação de solução mentolada (50%) na pele de ratos 30 minutos antes da avaliação cistométrica (Chen *et al.*, 2010), sendo que o volume e a pressão de micção foram restabelecidos com a aplicação endovenosa do antagonista não seletivo dos receptor TRPM8, BCTC (Lei *et al.*, 2013). Apesar de estudos mostrarem o potencial farmacológico dos antagonistas do receptor TRPM8 na modulação da função miccional, o entendimento da fisiopatologia desse receptor modulando a resposta contrátil da bexiga continua pouco explorado.

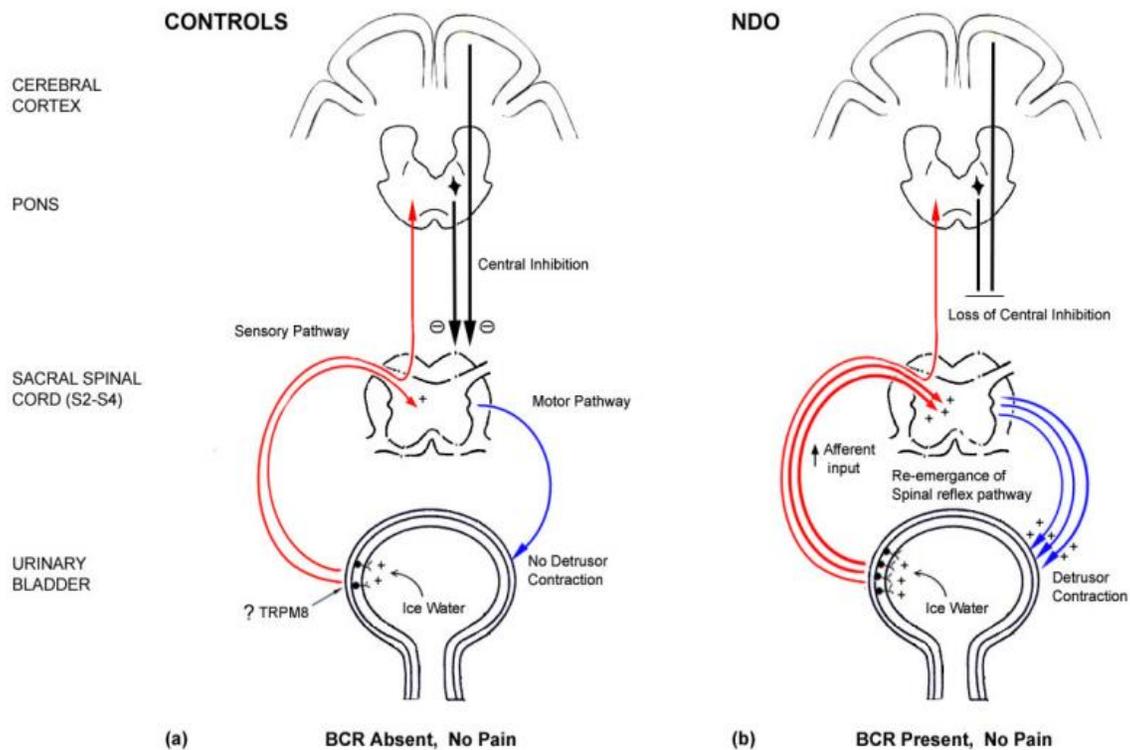


Figura 7- Mecanismo de reflexo miccional frente à estimulação gelada em bexigas saudáveis e hiperativas de origem neurogênica. (A) Neurologicamente em adultos saudáveis o reflexo espinal frente ao estímulo gelado é inibido por sinais descendentes de centros superiores no córtex encefálico. (B) Em bexigas neurogênicas existe um maior número de fibras aferentes responsivas ao estímulo gelado, além de perda na inibição central do reflexo miccional (Mukerji *et al.*, 2006).

1.7 Diabetes e distúrbios miccionais

O diabetes tipo 1 é uma doença idiopática, até o presente momento sem cura, que acomete de 5-10% do total de casos de diabetes no mundo. A prevalência de diabetes esta estimada para 2030 em 4,4% da população mundial ou aproximadamente 366 milhões de indivíduos (Wild *et al.*, 2004; American Diabetes Association, 2009). O diabetes tipo 1 é causado pela destruição seletiva das células β -pancreáticas, por auto-antígenos específicos dos linfócitos T.

Quando a maioria das células β apresentam-se destruídas, o pâncreas perde a capacidade de produzir insulina em resposta ao aumento plasmático de glicose (Denis *et al.*, 2004).

A bexiga urinária é um dos órgãos afetados diretamente pela hiperglicemia persistente do diabetes. As primeiras consequências no sistema urinário são o aumento da filtração glomerular, com incapacidade de reabsorção tubular devido ao excesso de glicose, causando diurese. Inicialmente, a bexiga se adapta a esse aumento de urina produzida, chamado de período compensatório, em que se observa aumento da atividade neuronal e contrátil da bexiga (Daneshgari *et al.*, 2006a). A glicemia plasmática cronicamente elevada causa neuropatia periférica com redução na excitabilidade neuronal aferente e eferente da bexiga, reduzindo a eficiência miccional (Changolkar *et al.*, 2005; Daneshgari *et al.*, 2006b).

Aproximadamente 50% dos homens e mulheres diabéticos apresentam disfunções miccionais como urgência, aumento na frequência, noctúria e incontinência urinária (Brown *et al.*, 2005; Melman *et al.*, 2009). A cistopatia vesical ocorre nos estágios avançados da disfunção miccional, e pode ser acompanhada de diminuição da frequência urinária, dificuldade em iniciar a micção e sensação de bexiga sempre cheia (Brown *et al.*, 2005). Apesar de a fisiopatologia miccional do diabetes indicar que existam duas fases, compensatória e descompensatória, na maioria dos pacientes a fase compensatória é pouco notada, e os pacientes somente procuram tratamento quando apresentam retenção urinária, a qual é consequente da hiperdistensão da parede vesical (Ioanid *et al.*, 1981).

1.7.1 Diabetes experimental e disfunção vesical

As disfunções vesicais no diabetes podem estar associadas a alterações ao nível de músculo detrusor, inervação e urotélio. Um dos modelos experimentais mais utilizados para se investigar as complicações miccionais da diabetes é o da injeção de estreptozotocina (STZ). A estrutura química da STZ (2 - Deoxy - 2- ([(methylnitrosoamino) carbonyl] amino) – D – glucopyranose) compreende uma molécula de glicose com uma cadeia lateral altamente reativa, metil-nitrosourea, que inicia a ação citotóxica. A molécula de glicose direciona a STZ para as células β pancreáticas, onde o mesmo liga-se ao transportador de membrana GLUT-2. Inicia-se então o processo de metilação, levando à quebra do DNA das células β pancreáticas, geração de radicais livres e produção de NO. Dessa forma, a STZ inibe a secreção de insulina causando um estado de diabetes tipo 1 (Ledoux *et al.*, 1986; Wilson *et al.*, 1988).

Em estudo recente foi mostrado, em ratos diabéticos por STZ, que a hiperglicemia causa alterações significativas no urotélio (Mitchell *et al.*, 2013). Inicialmente (3 semanas após indução do diabetes), ocorre espessamento da camada urotelial. Em período intermediário (9 semanas após a indução com STZ), as células guarda-chuva (células superficiais do urotélio com formato de guarda-chuva) vão morrendo e se descolando da parede vesical (Figura 8; Mitchell *et al.*, 2013). Assim, as células intersticiais e as fibras aferentes ficam expostas ao líquido intravesical, favorecendo a hiperexcitação destas fibras e a instalação de resposta inflamatória local (Para revisão: de Groat e Yoshimura, 2009). Em camundongos diabéticos pela STZ, após 4 semanas da injeção, observou-se

aumento na densidade neural da bexiga isolada comparado com animais normoglicêmicos (Leiria *et al.*, 2011). Outros trabalhos utilizando o mesmo modelo experimental de diabetes mostraram hiperalgesia frente a estímulos periféricos físicos e térmicos, os quais antecedem a neuropatia (Sugimoto *et al.*, 2000; Bishnoi *et al.*, 2011). Em fibras aferentes e terminais nervosos sensoriais da medula espinhal isolados de ratos diabéticos pela STZ verificou-se aumento da expressão e ativação de receptores TRPV1 (Bishnoi *et al.*, 2011), resultado também alcançado com o urotélio isolado (Mitchell *et al.*, 2013). A hiperativação crônica dos receptores TRPV1 aumenta a liberação de CGRP e de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α , IL-1 α e IL-6, efeito este inibido pelo antagonista não seletivo dos receptores TRPs, resiniferatoxina (Bishnoi *et al.*, 2011).

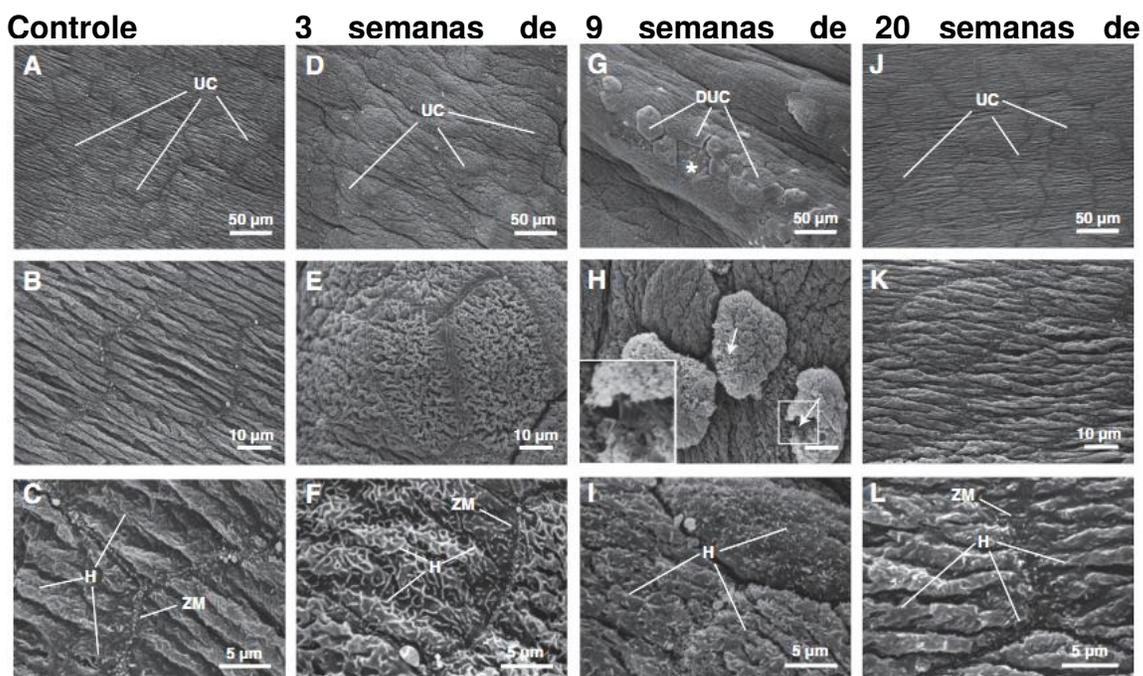


Figura 8- Imagem obtida por microscopia eletrônica (ME) de varredura da camada urotelial da bexiga de ratos controles e diabéticos por estreptozotocina. As imagens tridimensional da camada superficial do urotélio mostram a morfologia celular de forma tempo-dependente nos animais diabéticos por estreptozotocina. Controle (A-C), 3 semanas (D-F), 9 semanas (G-I) e 20 semanas (J-L). Entre a 6^o e 9^o semana de diabetes observam-se alterações significativas da integridade celular nas células guarda-chuva. O arterisco (G) indica as células que estão se desprendendo do urotélio, deixando as células intersticiais mais profundas expostas. As setas (H) indicam as regiões onde a membrana plasmática está lesada. Após a 20^o semana de diabetes (J-L), a camada urotelial é recomposta de forma similar à encontrada nos animais controles não tratados (A-C). As imagens encontram-se em três níveis de aumento 50 μm (A-J), 10 μm (B-K) e 5 μm (C-L). UC, camada celular superficial do urotélio (células guarda-chuva); DUC, células desprendidas do urotélio; H, camada celular em estrias; ZM, membrana apical (Mitchell *et al.*, 2013).

A disfunção da musculatura lisa em camundongos diabéticos pela STZ foi também caracterizada. Estudos farmacológicos mostraram aumento da resposta contrátil do detrusor isolado frente à estimulação muscarínica e β -adrenérgica (Menéndez *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2005). O aumento da resposta

contrátil neste tecido foi associado a aumento da sensibilidade ao cálcio extracelular, hiperativando os canais Cav_{1,2} (Leiria *et al.*, 2011). Em ratos diabéticos pela STZ, observa-se também um aumento na resposta contrátil do detrusor frente à estimulação elétrica, que se explica pelo aumento da liberação de neurotransmissores de fibras eferentes parassimpáticas, aliado ao aumento na sensibilidade e atividade dos Cav_{1,2} (Waring e Wendt, 2000; Brown *et al.*, 2005).

Justificativa

Os receptores TRPV4 e TRPM8 apresentam funções relacionadas à osmorregulação, termorregulação e regulação da resposta inflamatória. No trato urinário inferior estes receptores são expressos no urotélio e em fibras aferentes sensitivas. O TRPV4 é ativado pela distensão da parede vesical, e quimicamente pela degradação do ácido araquidônico (AA) via citocromo P450. A ativação do TRPV4 nas células uroteliais causa secreção de ATP, o qual regula as respostas contráteis e relaxantes da musculatura lisa da bexiga. Nas fibras aferentes sensitivas, a ativação do TRPV4 regula a função dos receptores purinérgicos P2X_{2/3}, os quais aumentam o reflexo miccional. A deleção do receptor TRPV4 ou a ativação do TRPM8 pelo mentol e icilina, reduziram as respostas inflamatórias mediadas pela liberação de substância P e CGRP em fibras aferentes sensitivas. No modelo experimental de hiperatividade de bexiga causado pela injeção intraperitoneal de ciclofosfamida, a deleção ou inibição química do TRPV4 pelo HC067047 reduziu a resposta inflamatória local, melhorando a função miccional nestes animais. Poucos estudos até o presente momento avaliaram a função dos receptores TRPV4 e TRPM8 no estado diabético, sendo que nenhum deles utilizou essas proteínas como alvos terapêuticos para os transtornos miccionais observados nesses pacientes.

OBJETIVO GERAL

Estudar o papel dos receptores TRPV4 e TRPM8 no controle miccional de camundongos em condição fisiológica e patológica (diabetes).

Objetivos específicos

Grupo TRPV4

- Estudar o efeito do agonista de TRPV4, GSK1016790A, em preparação de bexiga isolada de camundongos C57BL/J6;
- Estudar a participação do TRPV4 nas respostas contráteis e relaxantes do detrusor isolado, usando camundongos C57BL/J6 controles e *knockout* para o receptor *TRPV4 (TRPV4^{-/-})*;
- Estudar a ativação do receptor TRPV4 na bexiga de camundongos diabéticos pela injeção intraperitoneal de STZ por 4 semanas.

Grupo TRPM8

- Estudar a participação do TRPM8 nas respostas contráteis do detrusor isolado, usando para tanto camundongos C57BL/J6 controles e *knockout* para o receptor *TRPM8 (TRPM8^{-/-})*.
- Caracterizar farmacologicamente o efeito inibitório do mentol no detrusor isolado de animais controles e *TRPM8^{-/-}*.
- Avaliar o efeito do tratamento com mentol nas disfunções miccionais “*in vivo*” e “*in vitro*” do diabetes induzido por STZ.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/J6 *wild type* (+/+; controles), machos (3-4 meses), pesando entre 25 e 29 g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP). Também foram utilizados camundongos machos *knockout* (-/-) para o receptor TRPV4 e TRPM8, provenientes do King's College (Londres, Reino Unido), resultantes do cruzamento de pares heterozigotos para os receptores TRPV4 e TRPM8. Os camundongos foram mantidos em ciclos de 12/12 h (claro/escuro), em temperatura de 25°C, com comida e água *ad libitum*. Todos os experimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP; protocolo nº3313-1) e pelo *United Kingdom Home Office Regulations* (Animals Scientific Procedures Act, 1986). Os experimentos com animais *wild type* (+/+) e *knockout* (-/-) para os receptores TRPV4 e TRPM8 foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Stephen B. McMahon (King's College London, Neurorestoration Group, Wolfson Centre for Age-Related Diseases) e no laboratório da Prof^a Dr^a Helen Cox (King's College London, Wolfson Centre for Age-Related Diseases, Guy's Campus), sob supervisão do Prof. Dr. Andrew D. Grant.

2.2 Indução do diabetes

O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal (i.p.) de STZ (180 mg/kg), dissolvida em tampão citrato (20 mM, pH 4.5). Após 48 h da injeção, os animais foram mantidos em jejum por 8h e o diabetes foi confirmado pela existência de hiperglicemia (concentração plasmática de glicose ≥ 15 mmol/l), sendo que os camundongos que não alcançaram estes valores glicêmicos foram descartados. O peso e a concentração plasmática de glicose foram semanalmente medidos nos animais controles e diabéticos. Aqueles que apresentavam redução de peso $>20\%$ em relação ao início do tratamento foram descartados, não sendo utilizados para as análises posteriores. Após 4 semanas de diabetes, os camundongos foram utilizados para a realização dos protocolos experimentais “in vivo” e “in vitro”, conforme descrito a seguir.

2.3 Testes comportamentais

2.3.1 Teste de retirada da pata frente à estimulação mecânica (Von Frey)

Os grupos controle-diabético e TRPV4^{-/-} diabético foram aclimatizados por 1 h em caixa transparente com assoalho de malha metálica (Alessandri-Haber *et al.*, 2006). Para o teste de sensibilidade periférica, foram utilizados monofilamentos von Frey calibrados (0.173 mN) (Stoelting Company, Wood Dale, IL, EUA), os quais foram aplicados através da malha metálica de forma a estimular a planta da pata dos camundongos. A retirada da pata foi avaliada como o número de vezes que a pata posterior foi retirada em resposta a cinco aplicações do monofilamento,

expresso em porcentagem (por exemplo, três levantamentos em cinco estímulos foi registrado como 60%). A medida basal foi o resultado de três conjuntos de estimulações em dias alternados que antecederam a indução do diabetes. As avaliações pós-diabetes foram feitas nos dias 1, 3, 7, 10, 14, 21, contados a partir do dia em que foi administrada a injeção i.p. de STZ.

2.3.2 Teste de retirada da pata frente à estimulação por calor (Hargreaves)

Os grupos controle-diabético e TRPV4^{-/-} diabético foram aclimatizados por 1 h em caixa (plexiglass) com assoalho transparente. Um laser de estimulação térmica (IITC modelo 336 TG combinação entre Tail Flick & Paw algesia) foi ativado após a colocação do estimulador diretamente abaixo da superfície plantar da pata traseira dos animais. Mediu-se a latência de retirada da pata em resposta ao calor radiante (15% de intensidade que produziu uma taxa de aquecimento de aproximadamente 1,3 °C por s, em um tempo máximo de 30 s). Medidas individuais foram repetidas três vezes em cada pata traseira, com um intervalo de pelo menos 10 min entre as estimulações, e o valor médio foi calculado (Obrosova *et al.*, 2007).

2.4 Avaliação da função miccional “in vivo”

2.4.1 Análise cistométrica

Os camundongos foram anestesiados com uretano (1.2 g/kg; i.p). A bexiga urinária foi exposta e catetizada utilizando-se escalpe n°25. O escalpe foi

conectado a uma bomba de infusão de salina (Harvard Apparatus, Holliston, MA) e a um transdutor de pressão (AD Instruments, Austrália). Os registros das pressões intravesicais foram obtidos em sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (Software versão 7.0, AD Instruments, Austrália). A infusão intravesical de salina (0,9% NaCl) foi realizada com velocidade constante de 0,6 mL/hora à 25-28°C. Após 40-45 min, o registro cistométrico foi interrompido, e a bexiga completamente esvaziada. Em seguida, a solução de salina foi substituída por solução de mentol (100 µM) ou por veículo (solução com DMSO a 0,046%). Um novo registro cistométrico foi gerado nas mesmas condições anteriores.

Os dados foram analisados *off-line* utilizando os programas Excell, Instat e Graph Prism 5 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). Os parâmetros cistométricos utilizados foram: pressão de micção (pressão em mmHg no momento da micção); pressão limiar (pressão em mmHg imediatamente antes do início da micção); contrações não-miccionais (contrações involuntárias da bexiga que não sucederam em micção, contrações > 3 mmHg em relação a pressão basal); intervalo de micção (tempo entre dois ciclos miccionais); pressão basal (pressão após a colocação do escalpe intravesical); capacidade (volume em mL intravesical até ocorrer a primeira micção).

2.4.2 Ensaio da mancha de micção em papel filtro

Os camundongos foram alojados individualmente em caixas contendo no assoalho papel filtro (26 x 16 cm; 80 g/m²) durante 2 horas, com comida e água *ad libitum*, de acordo com trabalhos prévios (Everaerts *et al.*, 2010; Wang *et al.*,

2012). Após a marcação, os papéis foram secos naturalmente por 24 horas. As imagens foram obtidas em foto-documentador (ChemiDoc; Bio Rad[®]) através da exposição do papel filtro à luz UV. A área de micção (cm²) foi quantificada pelo programa *ImageJ Launcher* (Image J software, Maryland, USA). Para medida do volume de micção foi realizado curva de calibração onde volumes conhecidos de urina (10 a 80 µl) foram aplicados em papel filtro e relativizados com a área (cm²) marcada obtida. Os valores de área marcada no papel filtro dos grupos experimentais foram extrapolados para volume de micção (ml) em 2 horas de exposição. Os dados foram analisados utilizando os programas Excell, Instat e Graph Prism 5 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA).

2.5 Avaliação funcional da bexiga “in vitro”

2.5.1 Isolamento e montagem dos tecidos

Os animais foram mortos por overdose por pentobarbital. A bexiga foi rapidamente isolada e colocada em solução nutritiva de Krebs-Henseleit (mM): NaCl(117), KCl(4,7), CaCl₂(2,5), MgSO₄(1,2), NaHPO₄(1,2), NaHCO₃(25) e C₆H₁₂O₆(11), pH 7,4 à 37°C. O ápice da bexiga (região da musculatura detrusora) foi separado e cortado em duas tiras longitudinais (2 X 2 X 10 mm). As extremidades das tiras foram amarradas por um fio de algodão. Um dos lados foi amarrado a uma haste de fixação e a outra extremidade foi conectada a um transdutor de força (AD Instruments, Austrália), o qual é acoplado ao sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (Software versão 7.0, AD Instruments,

Austrália). A preparação foi mantida em câmara para órgão isolado (volume de 10 mL), preenchida com solução de Krebs-Henseleit, continuamente gaseificada com O₂:CO₂ (95:5%) à 37°C. O tempo de estabilização da preparação foi de 45 minutos. Nesse período, a solução nutritiva foi trocada a cada 15 minutos e a tensão reajustada para 5 mN.

2.5.2 Respostas contráteis

Nas preparações de detrusor (com e sem urotélio) foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas ao agonista do receptor TRPV4, GSK1016790A (10 nM a 100 nM), aos agonistas muscarínicos carbacol (1 nM a 30 µM) e betanecol (1 nM a 30 µM), ao cloreto de potássio (KCl; 1 mM a 100 mM) e à vasopressina (1 nM a 10 µM). Foram também realizadas curvas frequência-resposta (8 Hz a 32 Hz) ao estímulo elétrico e curvas não cumulativas ao agonista purinérgico não seletivo, α,β -metilenoATP (10 µM a 100 µM).

Os experimentos acima foram também realizados na presença dos antagonistas do receptor TRPV4, RN1734 (10 µM) e HC067047 (1 µM), e dos agonistas do receptor TRPM8, mentol (30 e 300 µM) e icilina (1µM). Após a finalização dos experimentos, os tecidos foram retirados da cuba e pesados. Os resultados de contração tecidual (mN) foram normalizados pelo peso úmido do tecido (mg), sendo expressos como (mN/mg).

2.5.3 Resposta contrátil na ausência de sódio e uso do bloqueador tetrodotoxina (TTX)

Para avaliarmos a participação dos íons sódio (Na^+) na resposta contrátil muscarínica, substituímos a solução convencional de Krebs (citada anteriormente) por solução de Krebs modificada, na qual utilizamos NMDG (N-metil-D-glucamina) em concentração equimolar de cloreto de sódio (NaCl), e trocamos o tampão bicarbonato de sódio (NaHCO_3) por HEPES. Neste meio nutritivo desprovido de sódio realizamos curvas concentração-resposta cumulativas ao carbacol (1 nM a 30 μM), na ausência e na presença do mentol (300 μM), incubado por 20 min. Em outro grupo de experimentos pré-incubamos o bloqueador do canal de sódio, tetrodotoxina (TTX- 1 μM), e/ou mentol (300 μM) antes da realização da curva concentração-resposta ao carbacol (1 nM a 30 μM).

2.5.4 Resposta contrátil mediada pelo influxo de cálcio extracelular

Após o período de estabilização da preparação detrusora em solução nutritiva de Krebs- Henseleit, avaliou-se a viabilidade da preparação através da contração com carbacol (10 μM). A solução nutritiva foi substituída por Krebs desprovido de cálcio na presença de EGTA (1 mM) por 15 min. Em seguida, os tecidos foram contraídos com carbacol (10 μM), e a solução desprovida de Ca^{2+} contendo EGTA foi readicionada, até visualização da abolição da resposta contrátil, caracterizando a completa remoção dos íons cálcio do meio intracelular. Posteriormente, as preparações foram préincubadas com o inibidor da Ca^{2+} -ATPase, ácido ciclopiazônico (CPA; 10 μM) por 20 min, e despolarizadas com

solução de KCl (80 mM). Curvas concentração-efeito ao CaCl_2 (10 μM a 100 mM) foram construídas na presença de nifedipina (1 μM) e/ou mentol (300 μM).

2.5.5 Respostas relaxantes

Para analisar a resposta relaxante do detrusor, foi realizada a pré-contração tecidual com solução de KCl (40 mM ou 80 mM). Após a estabilização da resposta contrátil (sem variações na tensão), se procederam curvas concentração-resposta ao agonista β -adrenérgico não-seletivo, isoprenalina (1 nM a 30 μM), ao agonista do receptor TRPV4, GSK1016790A (1 nM a 10 μM), e ao mentol (100 nM a 1 mM). As curvas de relaxamento foram calculadas através da porcentagem de relaxamento. Os experimentos de relaxamento ao mentol também foram conduzidos na presença dos inibidores dos canais de potássio, caribdotoxina (100 nM), apamina (1 μM), TEA (1 mM) e glibenclamida (10 μM).

2.5.6 Parâmetros farmacológicos

As respostas contráteis dos agonistas foram medidas em mN e comparadas em relação ao peso da tira de tecido (mg). O logaritmo das concentrações molares dos agonistas foi colocado em abcissas e a porcentagem do efeito em ordenadas. Os gráficos foram traçados e analisados através do programa computacional GraphPad PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores de potência (pEC_{50}) e respostas máximas ($E_{\text{máx}}$) foram calculados pela seguinte equação:

$E = E_{max}/[(1+(10^c/10^x)^N) + \Phi]$, onde E é elevação do tônus basal, E_{max} é a máxima resposta que o agonista pode produzir, “c” é o logaritmo da EC_{50} , que é a contração do agonista que produz 50% da resposta máxima; “x” é o logaritmo da concentração do agonista, o expoente, “N”, significa a inclinação da curva concentração-resposta e Φ é a resposta observada na ausência do agonista. As análises de regressões não lineares para determinar os parâmetros E_{max} , $\log EC_{50}$ e o “n” foram feitas utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism, considerando o parâmetro Φ como zero.

2.6 Cultura primária de células detrusora

Cinco bexigas de camundongos C57BL/6J apresentando 6 semanas de vida foram fragmentadas em HBSS (Hank’s Balanced Salt solution) contendo penicilina 2% (10000 unidades/mL) e estreptomicina (10 mg/mL). Em seguida, o tecido foi incubado em RPMI1640 contendo colagenase tipo I (1mg/mL; de *Clostridium histolyticum* - Gibco), penicilina 2% (10000 unidades / mL) e estreptomicina (10 mg/mL), e mantida sob agitação por 4 horas à 37°C. A solução resultante foi centrifugada a 2000 rpm; o “pellet” obtido foi ressuspenso em 1 mL de solução trisina/EDTA (Sigma Aldrich) por 5 min à 37°C. A tripsina foi inativada pela adição de RPMI1640 com 10% de soro fetal bovino. As células musculares dissociadas foram contadas, e um total de 2×10^5 células foi plaqueado em discos de Petri (CellView®, com quatro compartimento e vidro de 35mm no fundo, Greiner Bio-one) contendo meio completo (RPMI1640, 10% de soro fetal bovino, 2% penicilina / estreptomicina e 0,14% de insulina) e mantidas à 37°C. O meio de

cultura foi trocado a cada 48 horas. Todos os experimentos foram realizados na primeira passagem celular. O fenótipo das células musculares obtidas foi confirmado pela técnica de imunohistoquímica, expressando a cadeia leve de miosina.

2.7 Determinação do influxo de cálcio extracelular $[Ca^{2+}]_i$

A concentração intracelular de cálcio foi medida como previamente descrita (Mendes-Silveiro *et al.*, 2012). Quando as células musculares alcançaram 60-70% de confluência, foram lavadas 3 vezes em meio HBSS (Sigma Aldrich). Posteriormente, foram incubadas em meio HBSS contendo EGTA (1 mM) e carbacol (100 μ M) por 15 min a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas em meio HBSS, e incubadas com o marcador intracelular de cálcio Fluo Forte-AM[®] (10 μ M; Enzo Life Sciences, Inc., USA) na presença de CPA (10 μ M) ao abrigo de luz por 30 min a 37°C. Utilizando microscópio confocal (Zeiss LSM780-NLO, Carl Zeiss AG, Germany), a fluorescência, emissão a 490 nm e excitação a 520 nm foram registradas em células individuais por 6-7 min, período este em que foram adicionados ao meio, sequencialmente, KCl (80 mM), CaCl₂ (1 mM) e mentol (300 μ M) ou veículo (DMSO). A $[Ca^{2+}]_i$ foi expressa como variação do influxo de cálcio, que representa a intensidade de fluorescência emitida por cada célula normalizada pela fluorescência máxima individual.

2.8 Análise estatística

Os dados foram apresentados como médias \pm erro padrão das médias (E.P.M) de um número experimental (n). Para comparações múltiplas de variáveis independentes foi usado o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. O programa InStat (GraphPad Software) foi usado para estas análises. O teste t de Student foi utilizado para análises de um mesmo parâmetro entre dois grupos experimentais. $P < 0,05$ foi aceito como significativo.

3.Resultados

3.1 Avaliação funcional do detrusor isolado em camundongos controles e TRPV4^{-/-}

3.1.1. Curva de contração ao GSK1016790A

O GSK1016790A produziu respostas contráteis no detrusor isolado de animal controle, sendo esta resposta ausente no grupo *knockout* (TRPV4^{-/-}; Figura 9 A e B). As respostas contráteis ao GSK1016790A foram concentração-dependentes e foram visualizadas de 10 a 15 min após a adição da substância à cuba (Figura 9C). Ao final do experimento todos os tecidos utilizados responderam igualmente à estimulação com cloreto de potássio.

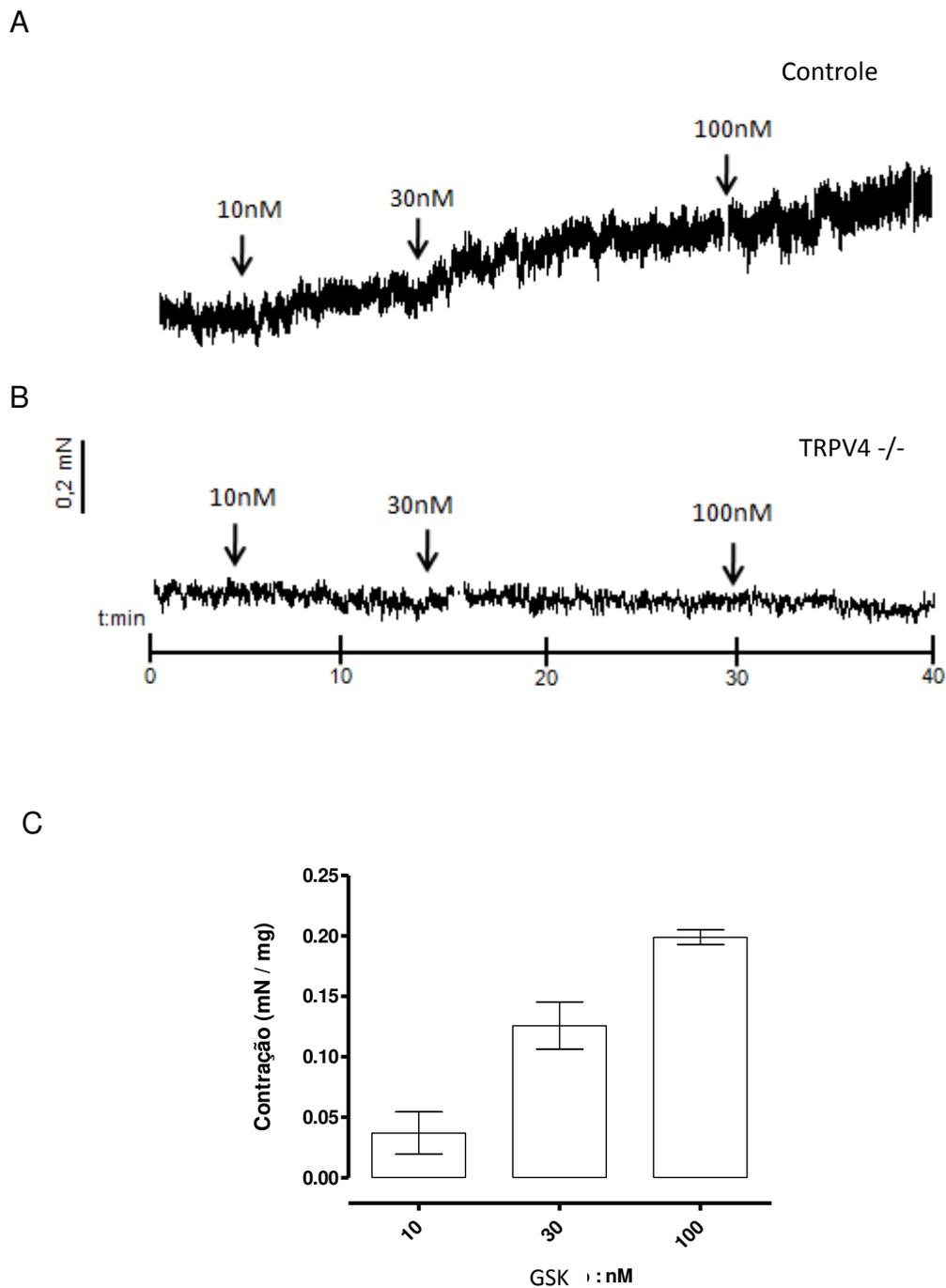


Figura 9- Resposta contrátil ao GSK1016790A em detrusor isolado de camundongos. (A) Traçados representativos da curva de concentração-resposta ao agonista TRPV4, GSK1016790A (10, 30 e 100 nM) em animais controles e (B) *knockout* (TRPV4^{-/-}). (C) Conjunto de resultados normalizados pelo peso do tecido (mN / mg) do grupo controle. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 4 experimentos independentes.

3.1.2 Curva de relaxamento ao GSK1016790A

Em preparações do detrusor pré-contraídos com solução de KCl (80 mM), o GSK1016790A relaxou o tecido de forma concentração-dependente. Curvas controles com o mesmo volume de veículo, DMSO (0,01%), resultaram em relaxamento significativamente menor (Figura 10A, B).

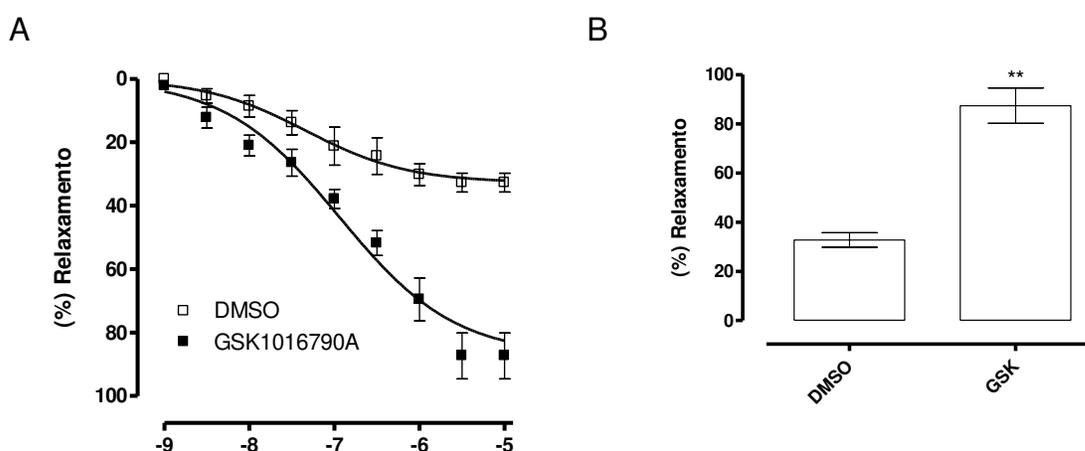


Figura 10- Relaxamento produzido pelo GSK1016790A em preparação de detrusor isolado de camundongos controles pré-contraídos com solução de KCl (80 mM). (A) Curva concentração-resposta ao GSK1016790A (1 nM a 10 μ M). (B) Comparação entre as respostas relaxantes máximas (E_{max}) obtidas ao GSK1016790A. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo controle (DMSO). Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 4-5 animais por grupo.

3.1.3 Curva concentração-resposta ao carbacol

O agonista muscarínico, carbacol, causou resposta contrátil dependente da concentração em ambos os grupos, controle e TRPV4^{-/-} (Figura 11A). A potência ao agonista (pEC_{50}) não foi diferente entre os grupos; entretanto, a E_{max} ao

carbacol foi significativamente maior no grupo TRPV4^{-/-} comparada ao controle (P<0,05; Figura 11B). A hipercontratibilidade ao carbacol não foi observada após o pré-tratamento, por 30 minutos, com os antagonistas do receptor TRPV4, RN0279893 (10 μM) e HC067047 (1 μM; Figura 11C e D).

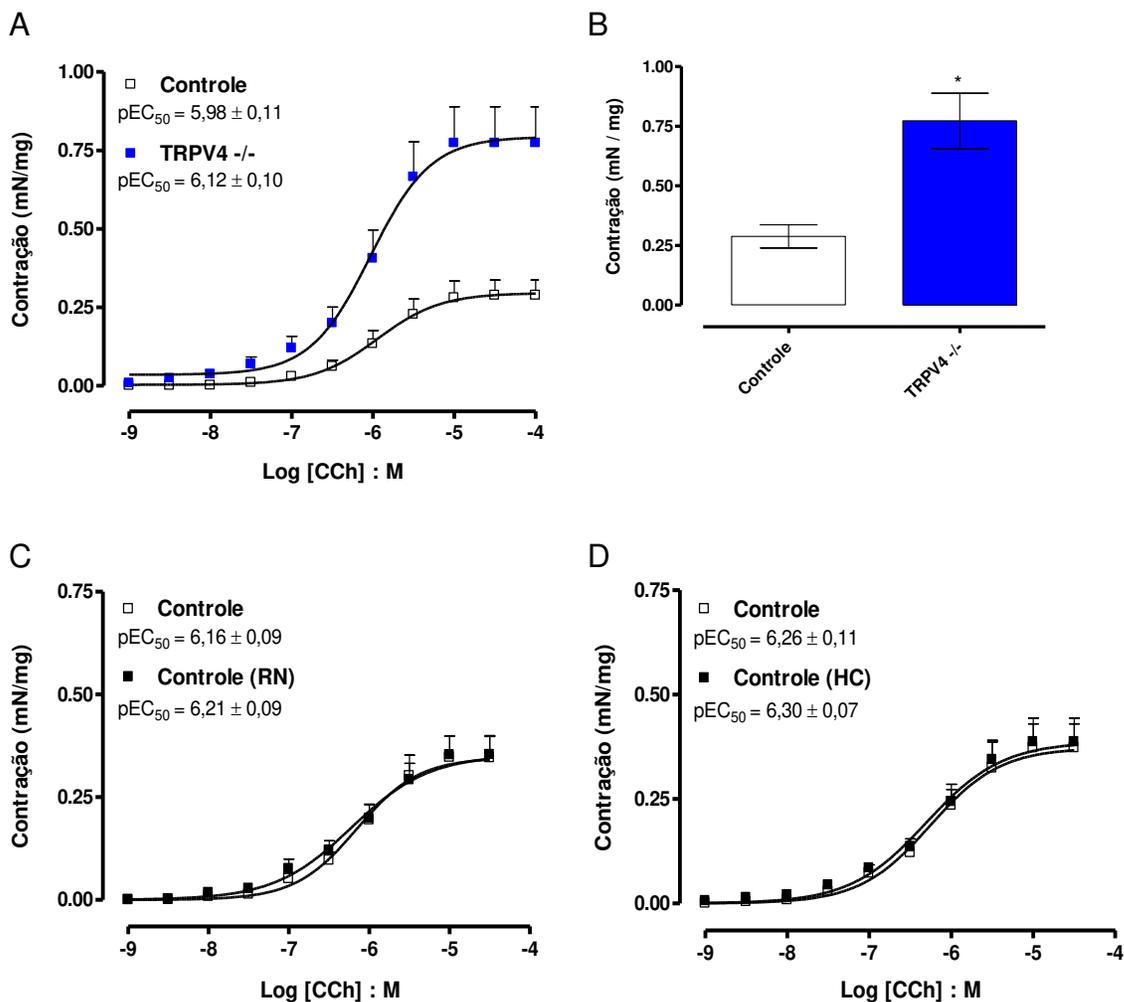


Figura 11- Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta contrátil ao carbacol em detrusor isolado de camundongos controles e TRPV4^{-/-}. (A) Curva concentração-reposta ao carbacol na ausência e presença dos antagonistas do receptor TRPV4, RN0279893 (10 μM; C) e HC067047 (1 μM; D). (B) Comparação entre as respostas contráteis máximas (E_{max}) ao carbacol. Os valores de pEC₅₀ estão inseridos no corpo dos gráficos. * P<0,05 comparado ao grupo control. Os resultados são a média ± erro padrão da média de 4-5 experimentos independentes por grupo.

3.1.4 Curva concentração-resposta ao cloreto de potássio

Neste protocolo experimental avaliamos a resposta contrátil do detrusor independentemente da ativação de receptores. A adição do agente despolarizante, KCl (1 mM a 1 M), produziu contrações dependentes da concentração nos grupos controle e TRPV4^{-/-} (Figura 12A), mas não se observou diferenças entre ambos os grupos, nem ao nível de pEC₅₀ nem de E_{max} (Figura 12B).

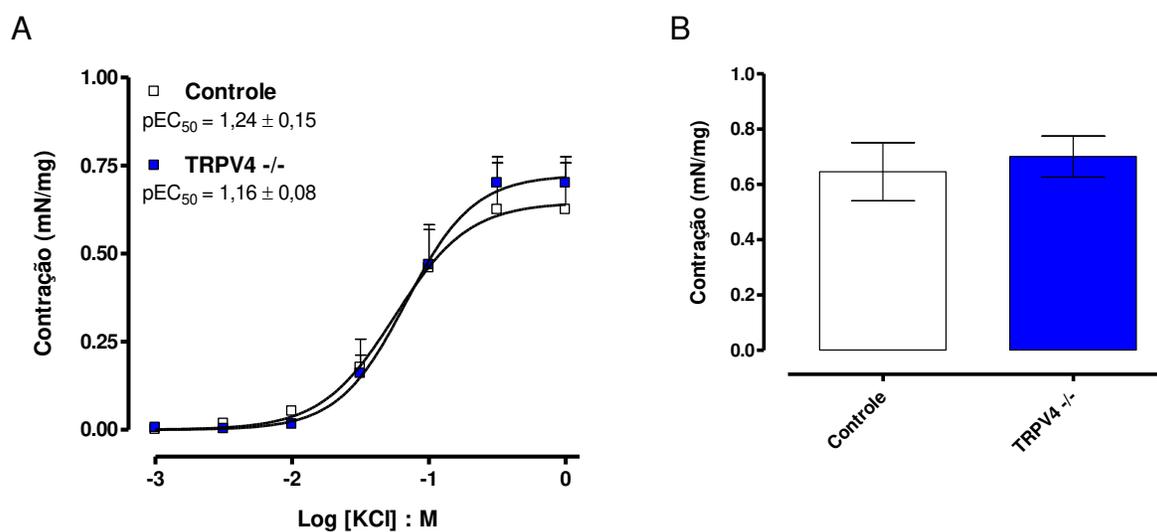


Figura 12- Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta contrátil ao cloreto de potássio em detrusor isolado de camundongos controles e TRPV4^{-/-}. (A) Curva concentração-resposta ao KCl (1 mM a 1 M). (B) Comparação entre as E_{max} ao KCl. Os valores de pEC₅₀ estão inseridos no corpo dos gráficos. Os resultados são a média ± erro padrão da média de 4-5 experimentos independentes por grupo.

3.1.5 Curva concentração-resposta ao CaCl_2

Neste protocolo buscamos avaliar se a sensibilidade ao íon cálcio proveniente do meio extracelular estava modificada no detrusor dos camundongos $\text{TRPV4}^{-/-}$. Nossos resultados mostram que o CaCl_2 produziu resposta contrátil concentração-dependente em ambos os grupos. Entretanto, não encontramos diferenças significantes para os parâmetros de pEC_{50} e E_{max} entre os grupos controle e $\text{TRPV4}^{-/-}$ (Figura 13A e B).

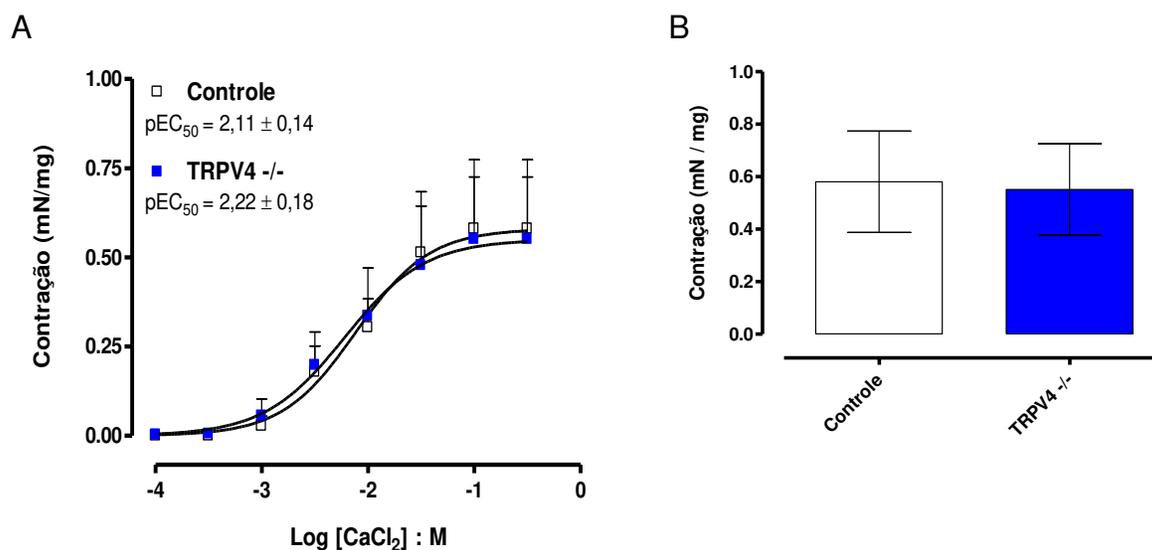


Figura 13- Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta contrátil ao cloreto de cálcio em detrusor isolado de camundongos controles e $\text{TRPV4}^{-/-}$. (A) Curva concentração-resposta ao CaCl_2 (100 μM a 300 mM). (B) Comparação entre as E_{max} ao CaCl_2 . Os valores de pEC_{50} estão inseridos no corpo dos gráficos. Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 3-4 experimentos independentes por grupo.

3.1.6 Curva frequência-resposta

A estimulação elétrica produziu resposta contrátil dependente da frequência no detrusor isolado dos grupos controle e TRPV4^{-/-}, sendo a resposta máxima alcançada na frequência de 32 Hz (Figura 14A-C). A resposta contrátil no grupo TRPV4^{-/-} foi significativamente maior quando comparada ao grupo controle em todas as frequências de estimulação analisadas ($P < 0,05$; Figura 14A). A incubação da preparação dos animais controles por 30 min com os antagonistas do receptor TRPV4, RN0279893 (10 μM) ou HC067047 (1 μM) não alterou a resposta contrátil do detrusor em nenhum das frequências analisadas (Figura 14B e C).

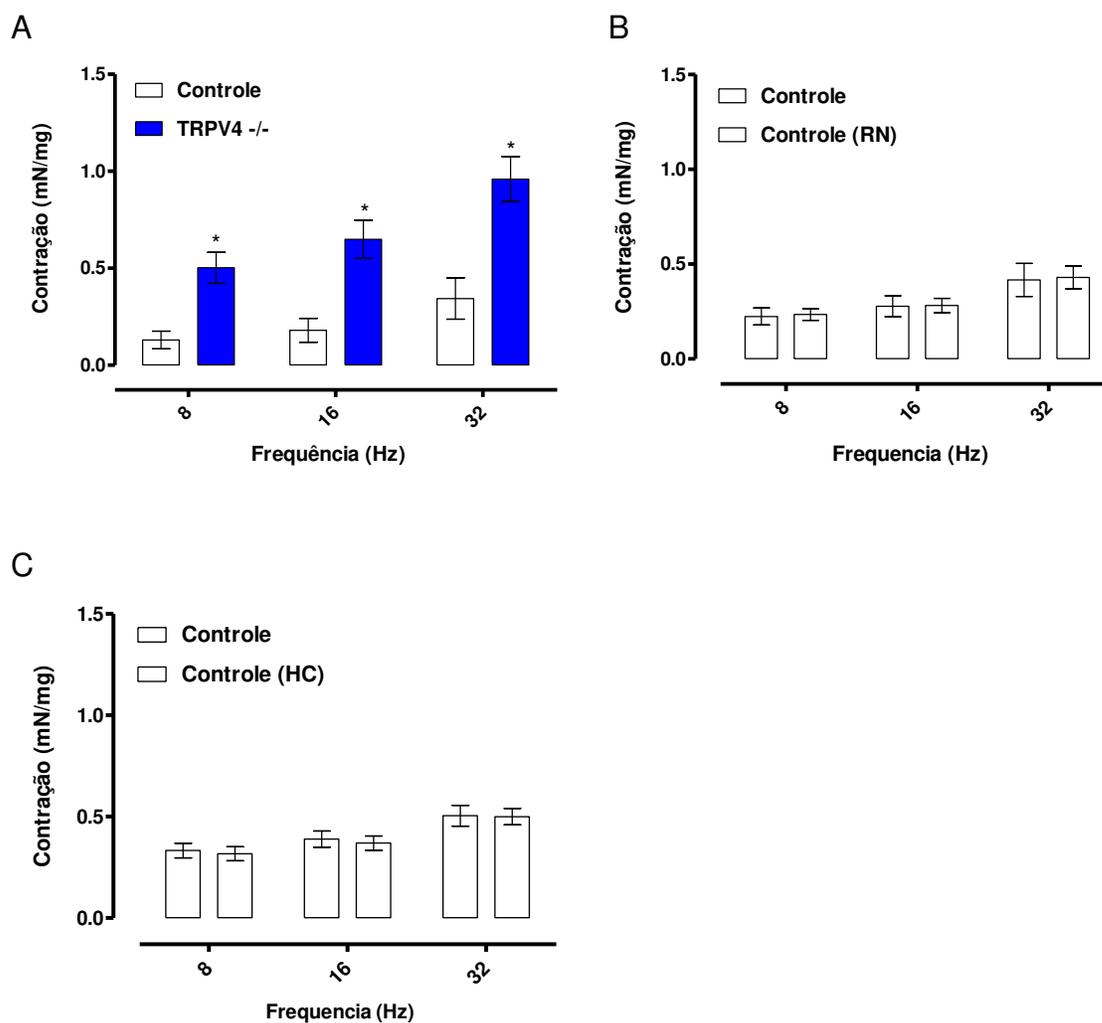


Figura 14- Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta contrátil ao estímulo elétrico em detrusor isolado de camundongos controles e TRPV4^{-/-}. (A) Curva frequência-resposta (8 Hz a 32 Hz) na ausência e presença dos antagonistas do receptor TRPV4, RN0279893 (10 μ M; B) e HC067047 (1 μ M; C). *P<0,05 comparado ao grupo controle. Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 4-6 experimentos independentes por grupo.

3.1.7 Curva não-cumulativa ao α,β -metileno-ATP

Neste protocolo experimental, avaliamos a contração do detrusor induzida pela ativação dos receptores purinérgicos P2X_{1/2}. O α,β -metileno-ATP produziu

contração da preparação de forma concentração-dependente em ambos os grupos analisados (Figura 15). Nossos resultados mostraram uma tendência de redução da resposta contrátil no grupo TRPV4^{-/-}, porém não atingiu diferença estatisticamente significativa (Figura 15).

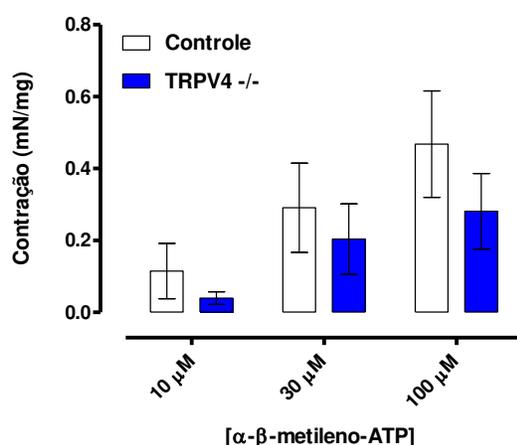


Figura 15- Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta contrátil ao α,β-metileno-ATP em detrusor isolado de camundongos controles e TRPV4^{-/-} Curva não cumulativa ao agonista purinérgico não seletivo, α,β-metileno-ATP (10 μM a 100 μM). Os resultados são a média ± erro padrão da média de 4-5 experimentos independentes por grupo.

3.1.8 Curva concentração-resposta de relaxamento à isoprenalina

O isoproterenol (agonista β não seletivo) produziu relaxamento dependente da concentração em detrusor de camundongos controle e TRPV4^{-/-} (Figura 16A). Entretanto, a E_{max} foi significativamente menor no grupo TRPV4^{-/-} (P<0,05; Figura 16B), sem alteração na pEC₅₀.

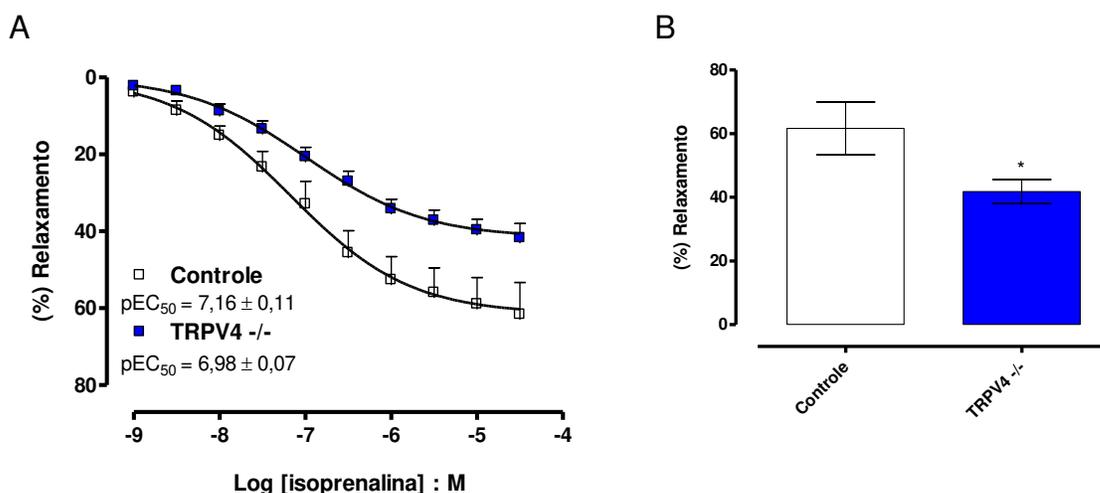


Figura 16- Efeito da ausência do receptor TRPV4 na resposta relaxante à isoprenalina em detrusor isolado de camundongos controles e TRPV4^{-/-}. (A) Curva concentração-resposta à isoprenalina (1 nM a 30 μM). (B) Comparação entre as E_{max} à isoprenalina. * P<0,05 comparado ao grupo controle. Os valores de pEC₅₀ estão inseridos no corpo dos gráficos. Os resultados são a média ± erro padrão da média de 5 experimentos independentes por grupo.

3.2 Modelo de bexiga hiperativa causada pela STZ: papel do TRPV4

3.2.1 Concentração plasmática de glicose e peso corporal

A concentração plasmática de glicose e o peso corporal foram verificados antes da injeção de STZ (basal), e aos 4 e 28 dias após a indução do diabetes. Notamos um aumento significativo na glicose plasmática em ambos os grupos (controle e TRPV4^{-/-}) aos 4 dias, mantendo-se elevada até o 28° dia, quando então os animais foram sacrificados para os experimentos funcionais (Figura 17A). O peso corporal reduziu no 4° dia após a indução do diabetes em ambos os grupos; porém, essa redução só foi significativa no 28° dia (Figura 17B).

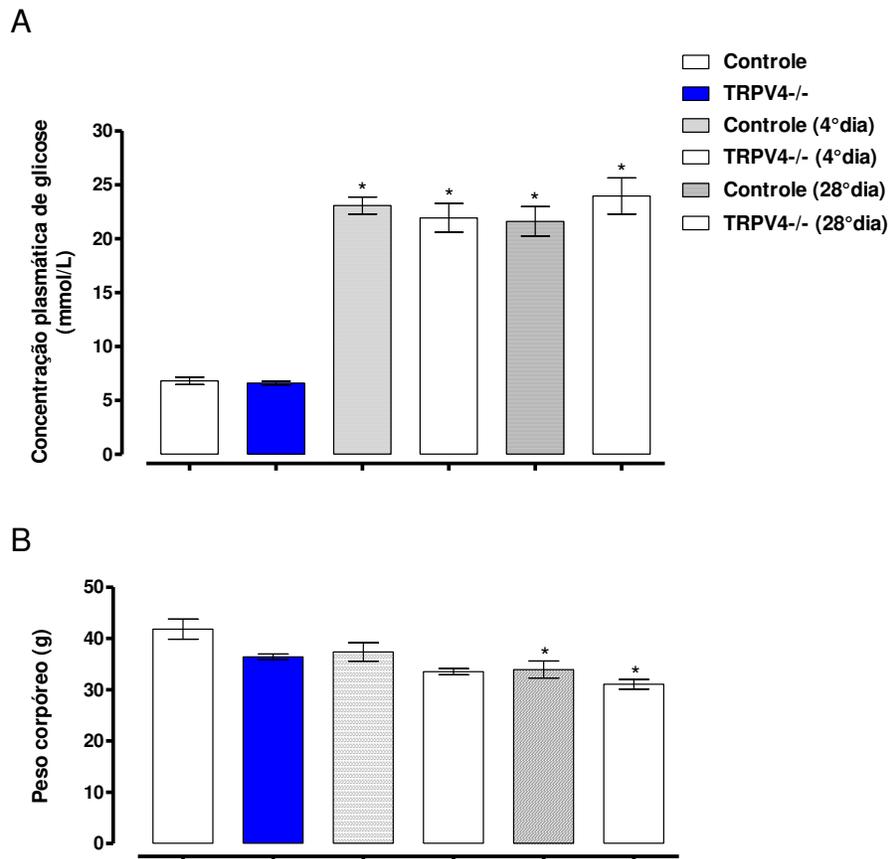


Figura 17- Níveis plasmáticos de glicose e peso corpóreo de camundongos controles e TRPV4^{-/-} após 4 e 28 dias da injeção de estreptozotocina. (A) concentração plasmática de glicose (mmol/L), e (B) peso corpóreo em animais controles e TRPV4^{-/-} dois dias antes da injeção de estreptozotocina (basal), 4 dias e 28 dias após a indução do diabetes.* P<0,05 comparado ao grupo controle no início do tratamento (Basal). Os resultados são a média ± erro padrão da média de 7 animais por grupo.

3.2.2 Avaliação nociceptiva aos estímulos mecânico e ao calor

Foi verificado, através do estímulo mecânico (von Frey), que no primeiro dia após a indução do diabetes pela STZ ocorre aumento na sensibilidade periférica, tanto nos animais controles como nos TRPV4^{-/-}. Essa hipersensibilidade é mantida no grupo TRPV4^{-/-} até o 7º dia de diabetes e no grupo controle até o 10º dia

(Figura 18A). A resposta nociceptiva mecânica retornou ao basal na semana em que os animais foram sacrificados para os experimentos funcionais (21° dia) (Figura 18A).

A resposta ao estímulo de calor (Hargreaves) manteve-se inalterada em relação à resposta basal. No grupo TRPV4^{-/-} houve redução da sensibilidade ao calor no 22° dia (Figura 18B).

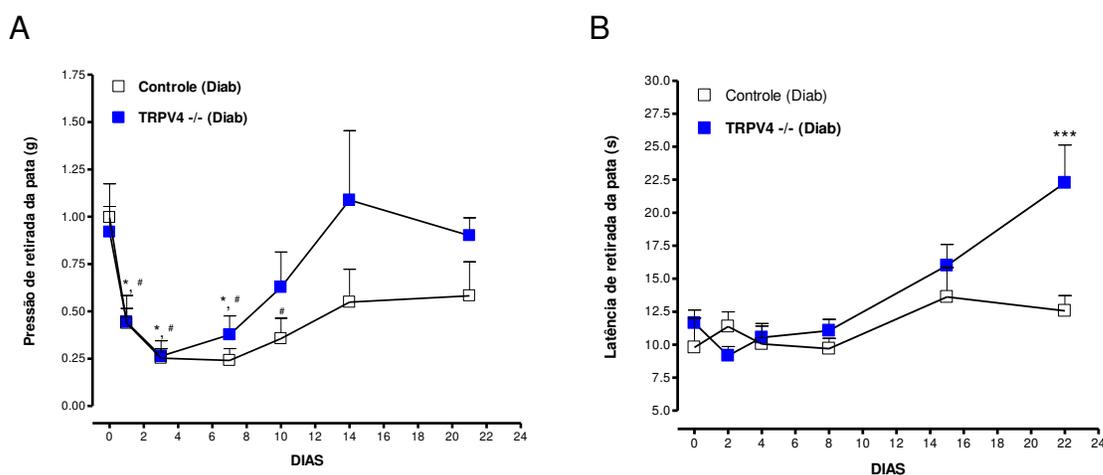


Figura 18- Avaliação nociceptiva frente à estimulação mecânica (Von Frey) e térmica (Hargreaves) em animais controle e TRPV4^{-/-} diabéticos. (A) Pressão de retirada da pata (g) pela técnica de von Frey; (B) Latência de retirada da cauda ao estímulo térmico pela técnica de Hargreaves. * P<0,05 e ***P<0,001 comparados ao grupo TRPV4^{-/-} no início do tratamento (Basal); #P<0,05 comparado ao grupo controle no início do tratamento (Basal). Os resultados são a média ± erro padrão da média de 7 animais por grupo.

3.2.3 Peso da bexiga e proporção entre a bexiga e o corpo após 4 semanas de diabetes

O peso úmido da bexiga (mg) aumentou significativamente após 4 semanas de diabetes nos grupos controle e TRPV4^{-/-} em relação aos animais normoglicêmicos (P<0,05; Figura 19A). Quando analisamos a proporção entre o peso da bexiga e o peso corpóreo (mg/g) notamos que as diferenças se mantiveram no grupo TRPV4^{-/-} (Figura 19B).

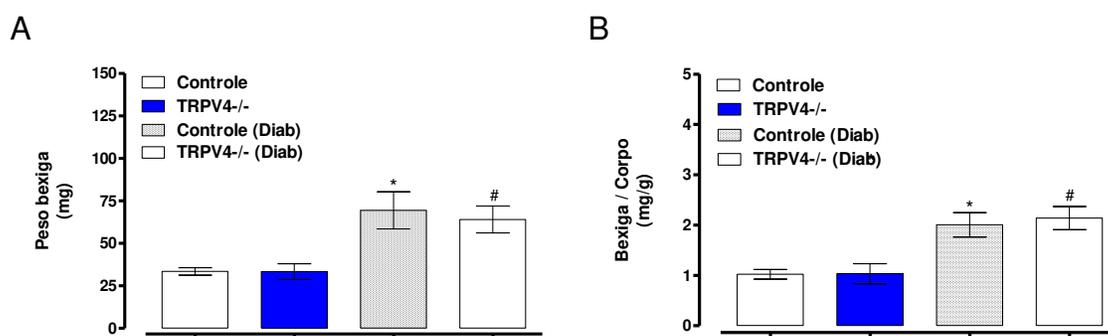


Figura 19- Peso da bexiga (mg) e proporção entre a bexiga / corpo de animais controles e TRPV4^{-/-} diabéticos. (A) Peso úmido da bexiga após 4 semanas de diabetes; (B) Proporção entre o peso da bexiga (mg) e o peso corpóreo (g) após 4 semanas de diabetes. * P<0,05 comparado ao grupo controle sem diabetes; # P<0,05 comparado ao grupo TRPV4^{-/-} sem diabetes. Os resultados são a média ± erro padrão da média de 5-6 animais por grupo.

3.2.4 Curva concentração-resposta ao carbacol em detrusor de camundongos controles e TRPV4^{-/-} diabéticos

O diabetes aumentou significativamente a E_{max} ao carbacol no grupo controle (P<0,05; Figura 20B), sem alterar a potência (pEC₅₀; 20A, B). Entretanto,

no grupo TRPV4^{-/-} diabético não visualizamos diferenças significativas para a E_{max} e pEC₅₀ quando comparamos com os animais TRPV4^{-/-} normoglicêmicos (Figura 20A, B). Além disso, confirmamos novamente o aumento significativo da E_{max} no grupo TRPV4^{-/-} comparado ao grupo controle (P<0,05; Figura 20B).

3.2.5 Curva concentração-resposta ao CaCl₂

A adição de CaCl₂ causou resposta contrátil dependente da concentração no detrusor isolado de animais controles e TRPV4^{-/-} (Figura 20 C). O diabetes aumentou significativamente a E_{max} ao cálcio extracelular em ambos os grupos, sem modificar a pEC₅₀ (Figura 20C, D).

3.2.6 Curva frequência-resposta

A resposta contrátil do detrusor isolado de camundongos TRPV4^{-/-} foi significativamente maior do que o grupo controle, quando estimulados nas frequências de 8 a 32 Hz (Figura 20E). O diabetes aumentou significativamente a resposta contrátil nos animais controles (P<0,05). Por outro lado, os animais TRPV4^{-/-} diabéticos não apresentaram alteração na resposta contrátil em relação ao grupo normoglicêmico. Também não observamos diferenças significativas entre os grupos diabéticos controle e TRPV4^{-/-} (Figura 20E).

3.2.7 Resposta contrátil ao KCl 80 mM

A adição de KCl ao meio causou contração do detrusor isolado dos animais controles e TRPV4^{-/-}. O diabetes aumentou significativamente a resposta contrátil no grupo controle ($P < 0,05$; Figura 20F). Entretanto, nos animais TRPV4^{-/-} não houve diferenças significativas em comparação com os animais TRPV4^{-/-} normoglicêmico (Figura 20F).

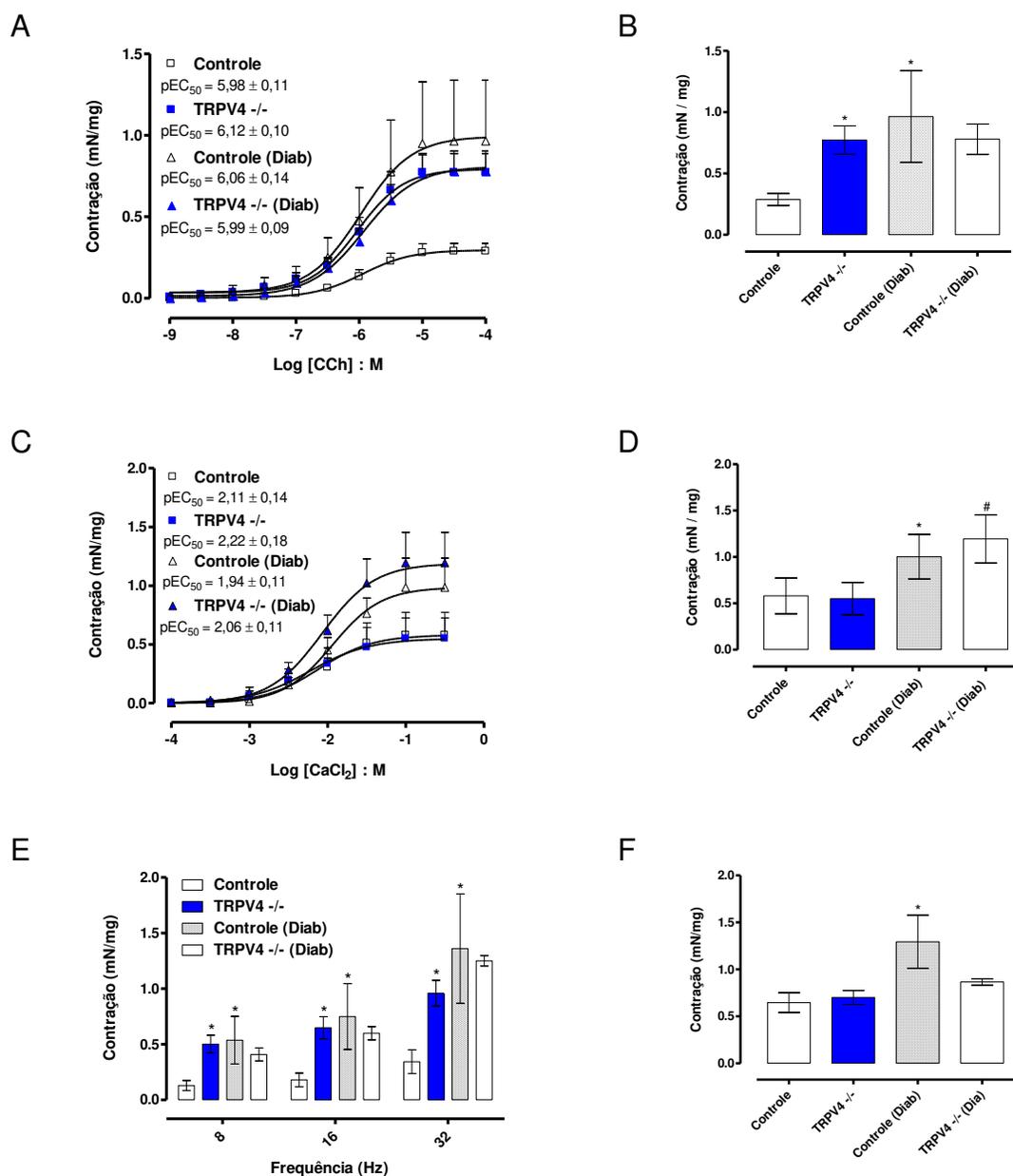


Figura 20– Respostas contráteis do detrusor isolado de camundongos controle e TRPV4^{-/-} diabéticos. (A) Curva concentração-efeito ao carbacol (CCh; 1 nM a 30 μ M); (B) Respostas contráteis máximas (E_{max}) obtidas ao CCh. (C) Curva concentração-resposta ao cloreto de cálcio (CaCl₂: 100 μ M a 300 mM); (D) E_{max} ao CaCl₂. (E) Curva frequência-resposta (8 a 32 Hz) ao estímulo elétrico; (F) E_{max} ao cloreto de potássio (80 mM); Diab (diabético). Os valores de pEC_{50} estão inseridos no corpo dos painéis A, C e E. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle sem diabetes; # $P < 0,05$ comparado ao grupo TRPV4^{-/-} sem diabetes. Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 4-7 animais por grupo.

3.3 Avaliação funcional do receptor TRPM8 na bexiga de camundongos

3.3.1 Curva frequência-resposta do detrusor isolado de camundongos controles e TRPM8^{-/-}

A estimulação elétrica produziu resposta contrátil dependente da frequência na preparação de ambos os grupos, sendo a resposta máxima obtida na frequência de 32 Hz. Não encontramos diferenças significativas entre os grupos controle e TRPM8^{-/-} (Figura 21A).

3.3.2 Curva concentração-resposta ao carbacol

A adição de carbacol à preparação causou contração dependente da concentração em ambos os grupos. A resposta máxima e a potência ao agonista muscarínico não foram diferentes entre os grupos controle e TRPM8^{-/-} (Figura 21B).

3.3.3 Curva concentração-resposta não-cumulativa ao α,β -metileno-ATP

A adição do agonista purinérgico não seletivo, α,β -metileno-ATP à preparação produziu resposta contrátil dependente da concentração em ambos os grupos analisados. As respostas contráteis observadas foram de mesma magnitude para os grupos controle e TRPM8^{-/-} (Figura 21C).

3.3.4 Contração ao cloreto de potássio

O agente despolarizante KCl, na concentração de 80 mM, contraiu a preparação de detrusor isolado de ambos os grupos. Entretanto, as respostas contráteis obtidas não diferiram entre os grupos controle e TRPM8^{-/-} (Figura 21D).

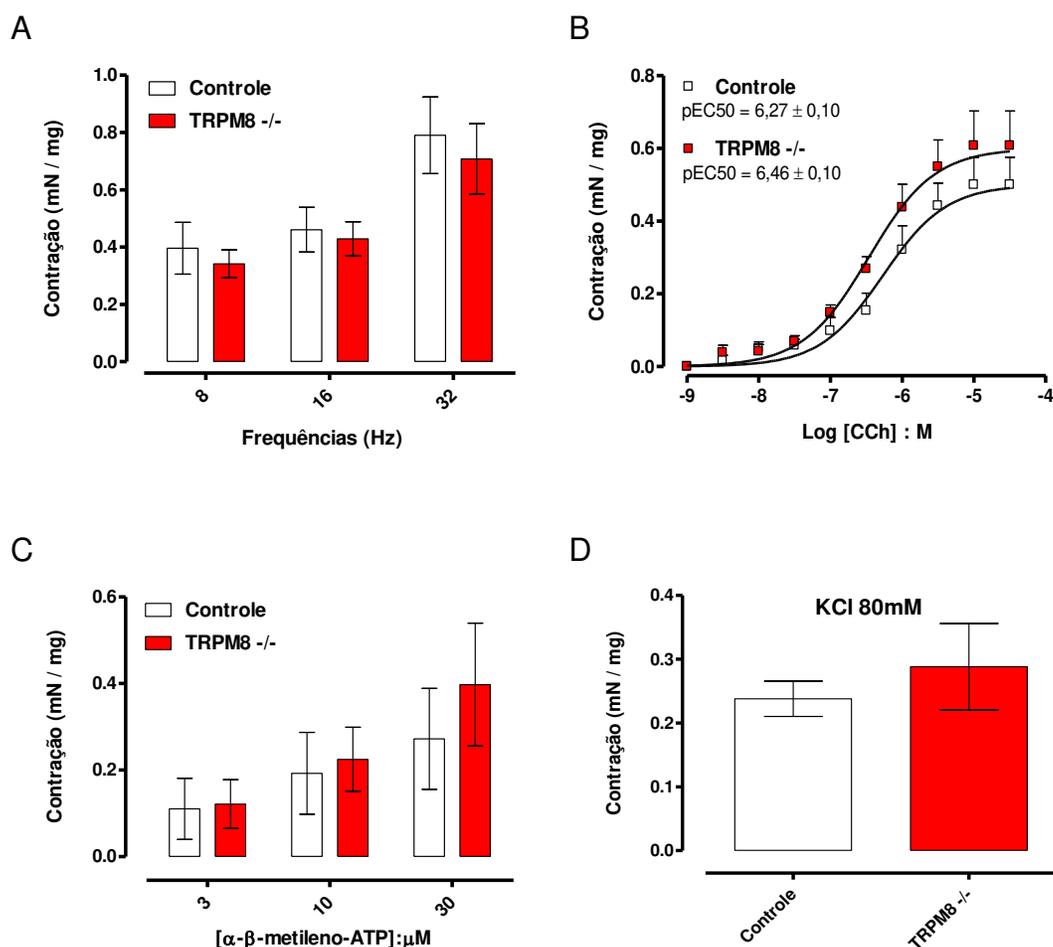


Figura 21- Avaliação funcional do receptor TRPM8 nas respostas contráteis do detrusor isolado de camundongos controles e TRPM8^{-/-}. (A) Curva frequência-resposta à estimulação elétrica (8 a 32 Hz); (B) Curva concentração-resposta ao carbacol (CCh; 1 nM a 30 μ M); (C) Curva não-cumulativa ao agonista purinérgico, α - β -metileno-ATP (3 a 30 μ M); (D) Resposta ao KCl (80 mM). Os valores de pEC₅₀ para o carbacol encontram-se no corpo do painel B. Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 5-7 animais por grupo.

3.3.5 Curva frequência-resposta do detrusor na presença dos agonistas do receptor TRPM8 (mentol e icilina)

O pré-tratamento de mentol (300 μ M) por 15 minutos na preparação de detrusor isolado de animais controles e TRPM8^{-/-} reduziu significativamente a resposta contrátil ao estímulo elétrico em todas as frequências analisadas (8 a 32 Hz; $P < 0,05$; Figura 22A). Por outro lado, o pré-tratamento com icilina (1 μ M, 15 min) não alterou a resposta contrátil à estimulação elétrica (Figura 22B).

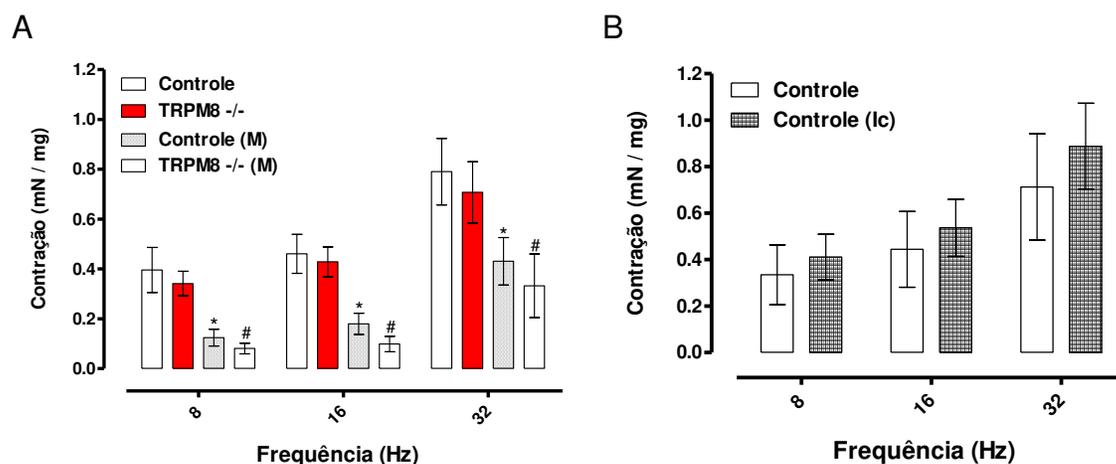


Figura 22- Resposta contrátil à estimulação elétrica na ausência e na presença do mentol ou icilina em detrusor isolado de camundongos controles e TRPM8^{-/-}. (A) Efeito do pré-tratamento com mentol (M; 15 min - 300 μ M); (B) Efeito do pré-tratamento com icilina (Ic; 15 min - 1 μ M) na curva frequência-resposta à estimulação elétrica (8 a 32 Hz; 80 V; 1 msec). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle não tratado; # $P < 0,05$ comparado ao grupo TRPM8^{-/-} não tratado. Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 4-7 animais por grupo.

3.3.6 Curva concentração-resposta ao carbacol na presença do mentol e icilina

A incubação com concentração menor de mentol (30 μ M; 15min) não produziu efeito inibitório na resposta contrátil à estimulação elétrica ou carbacol (Figura 24A, B). Entretanto, o mentol (300 μ M; 15min) reduziu significativamente a resposta contrátil do detrusor ao carbacol ($P < 0,05$), sendo esta redução de mesma magnitude em tecidos de animais controles e TRPM8^{-/-} (Figura 23A, C). Esta resposta inibitória com 300 μ M de mentol foi totalmente revertida pela lavagem da preparação (Figura 24C, D). O pré-tratamento com icilina (1 μ M; 15 min) não alterou nem a E_{max} nem a pEC_{50} ao carbacol em detrusor de animais TRPM8^{-/-} (Figura 23B).

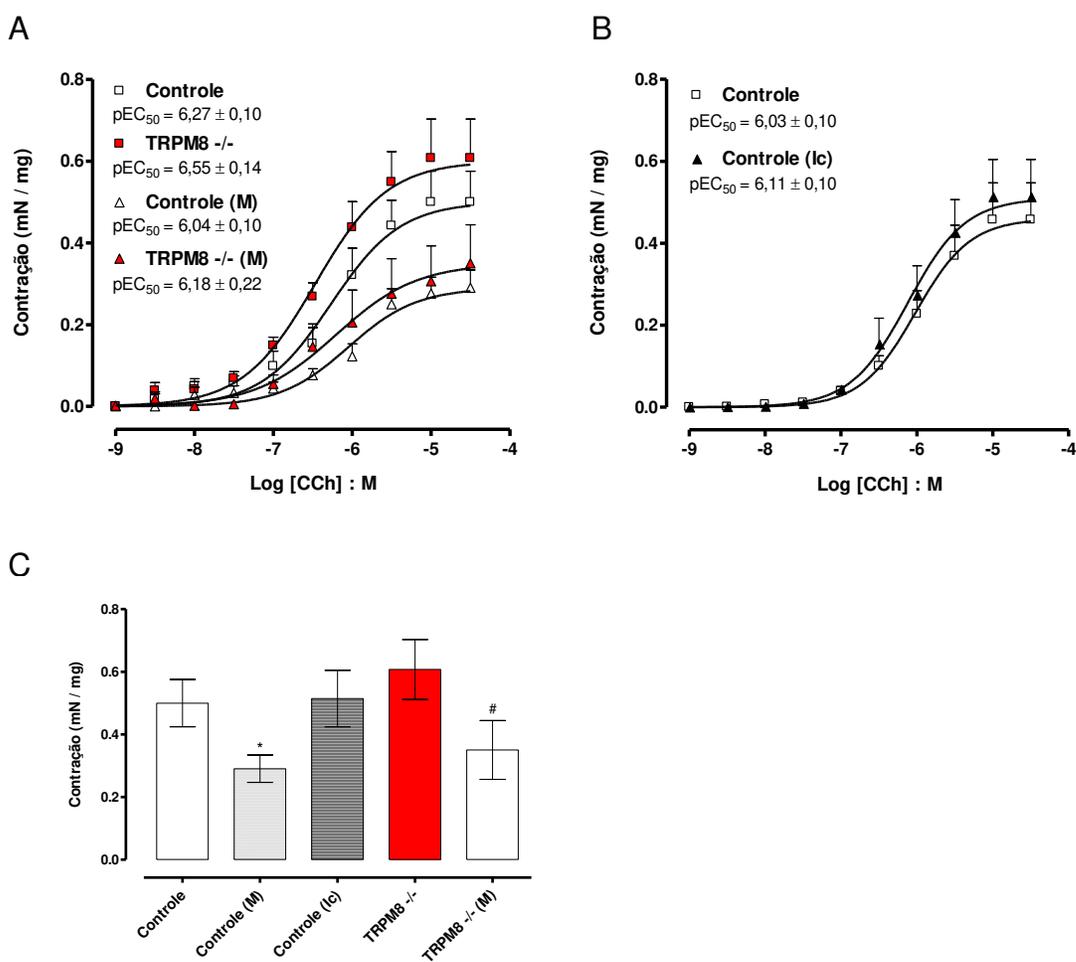


Figura 23- Resposta contrátil ao carbacol (CCh) em preparação de detrusor isolado de camundongos controles e TRPM8^{-/-} pré-tratadas com icilina e mentol. (A) Efeito do pré-tratamento com mentol (M; 15 min - 300 μ M); (B) Efeito do pré-tratamento com icilina (Ic; 15 min - 1 μ M) na curva de concentração-resposta ao carbacol em animais controles. (C) Comparação entre as E_{max} ao carbacol. Os valores de pEC₅₀ para o carbacol encontram-se no corpo dos painéis A e B. * P<0,05 comparado ao grupo controle não tratado; #P<0,05 comparado ao grupo TRPM8^{-/-} não tratado. Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 5-7 animais por grupo.

3.3.7 Caracterização farmacológica do efeito inibitório do mentol

A incubação com 30 μ M de mentol por 15 minutos não alterou a resposta contrátil induzida pela estimulação elétrica e carbacol (Figura 24A e B). Esta

resposta inibitória do mentol (300 μM) foi totalmente revertida após a lavagem da preparação (Figura 24C e D).

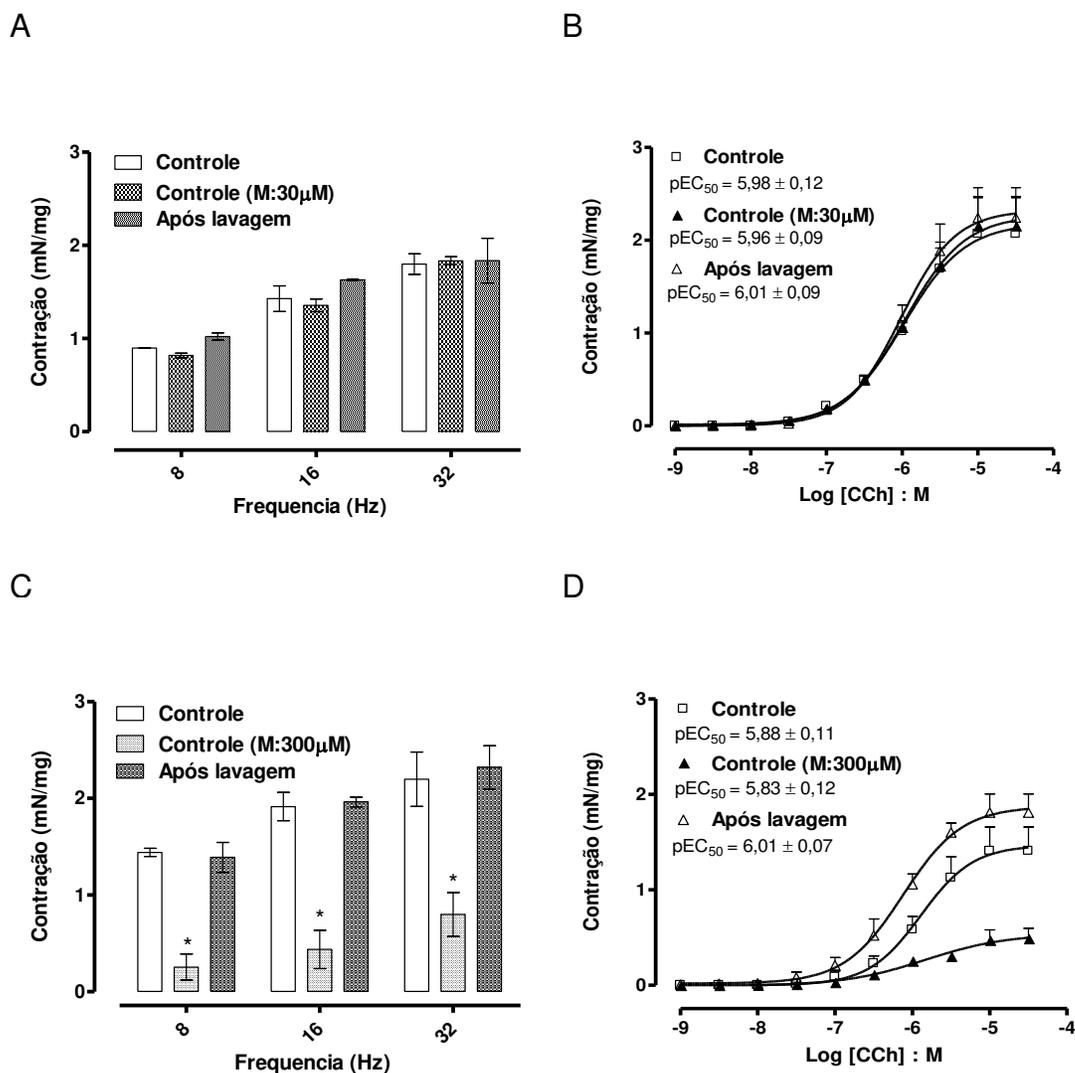


Figura 24- Efeito do pré-tratamento com mentol (M) nas concentrações de 30 μM (A e B) e 300 μM (C e D) na resposta contrátil induzida pela estimulação elétrica (A e C; 8 a 32 Hz; 80 V; 1 msec) e ao carbacol (B e D; CCh; 1 nM a 30 μM); Os valores de pEC_{50} para o carbacol encontram-se no corpo dos painéis B e D.* $P < 0,05$ comparado ao grupo controle não tratado. Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 4 animais por grupo.

3.3.8 Mecanismo inibitório do mentol independente do urotélio

O pré-tratamento com mentol (300 μ M) reduziu significativamente a E_{max} ($P < 0,05$; Figura 25B) nas preparações com e sem urotélio, sem modificar a potência do agonista muscarínico (pEC_{50} ; Figura 25A).

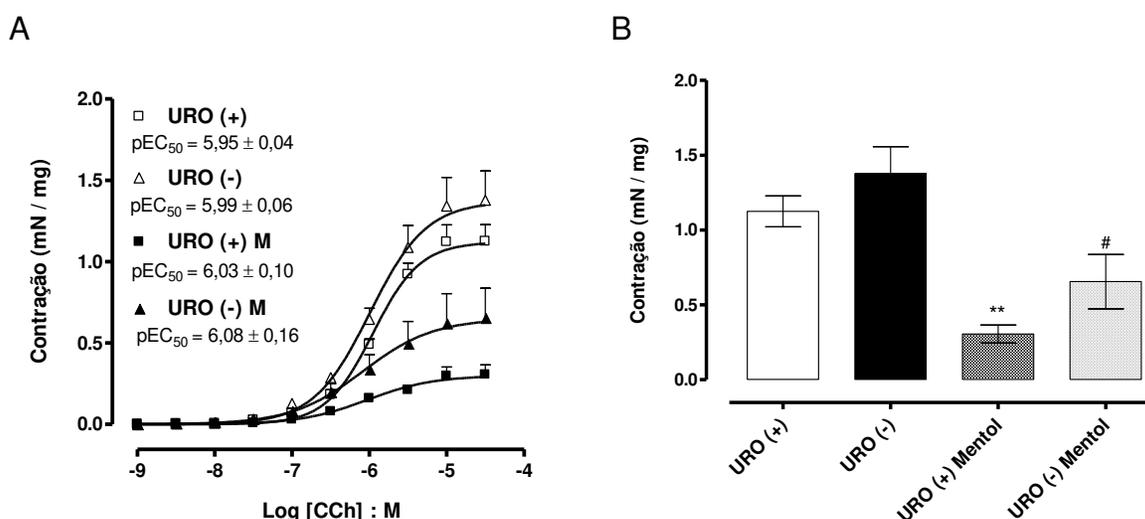


Figura 25- Curva de contração ao carbacol em detrusor isolado de camundongos com e sem urotélio. (A) Efeito do pré-tratamento com mentol (M; 15 min - 300 μ M) na resposta contrátil ao carbacol (CCh), em preparação com urotélio URO (+) ou sem urotélio URO (-); (B) Comparação entre as respostas contráteis máximas (E_{max}) ao carbacol. Os valores de pEC_{50} para o carbacol encontram-se no corpo do painel A. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo não-tratado com URO (+); # $P < 0,05$ comparado ao grupo não-tratado com URO (-). Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 5-7 animais por grupo.

3.3.9 Mecanismo inibitório do mentol independente de excitação neuronal

Para se avaliar a participação dos canais de sódio dependentes de voltagem na resposta inibitória do mentol, modificamos o tampão Krebs, no qual substituímos o NaCl e NaHCO₃ por concentração equimolar de N-metil-D-glucamina (NMDG) e HEPES. A ausência de sódio (NMDG) no meio não modificou a curva concentração-resposta ao carbacol, nem alterou a resposta inibitória do mentol (Figura 26A e C). Observamos também que o bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes (Nav_{1.2}) com a tetrodotoxina (TTX; 1 μM) não modificou a resposta contrátil ao carbacol, nem alterou o efeito inibitório do mentol (Figura 26B e D).

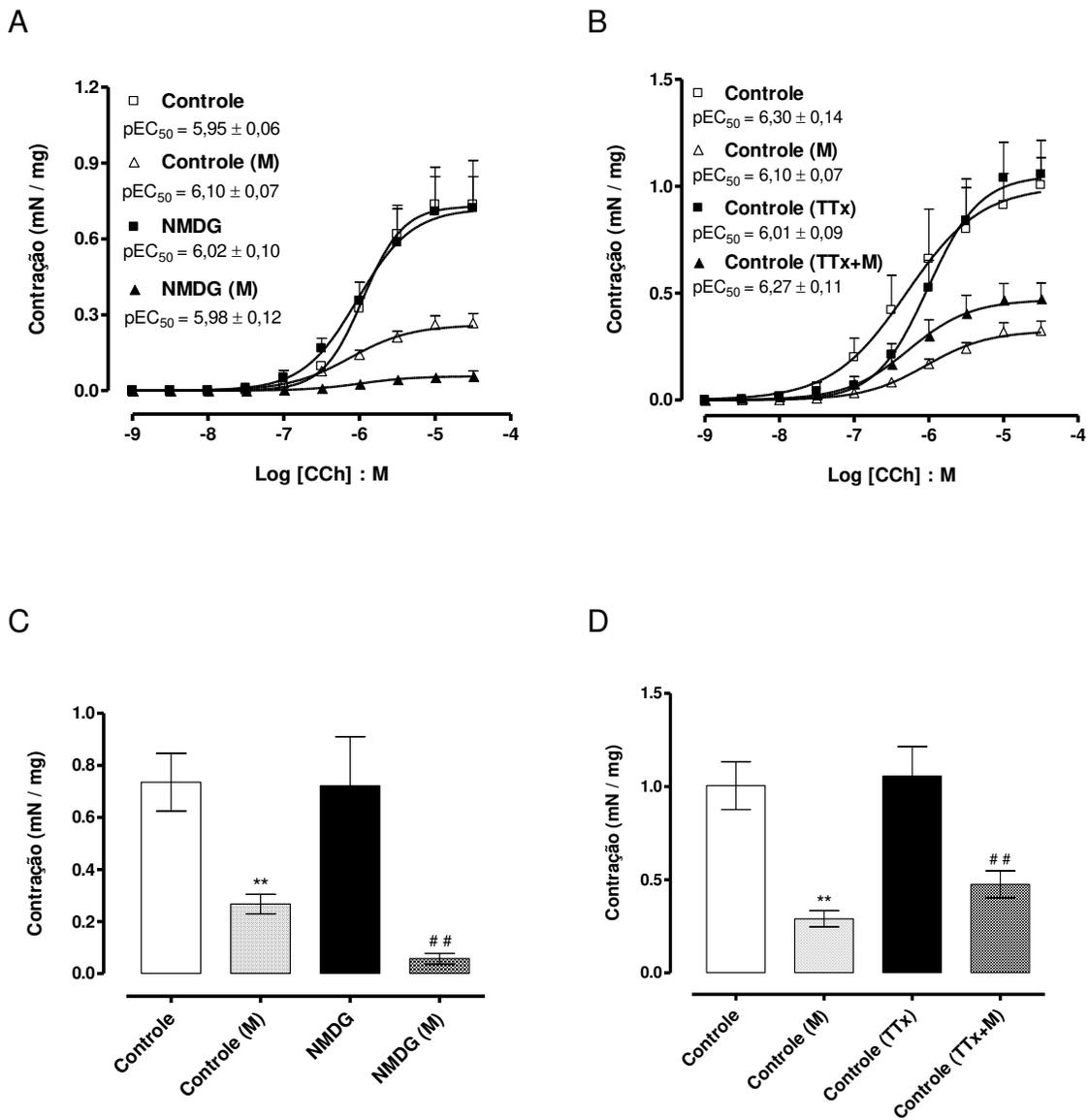


Figura 26- Curva de contração ao carbacol em solução desprovida de sódio ou pré-tratada com tetrodotoxina (TTX) em detrusor isolado de camundongos. Efeito inibitório do mentol (M; 300 μ M) na curva concentração-resposta ao carbacol (CCh) utilizando solução desprovida de sódio (NMDG; A) ou pré-tratada com o bloqueador neuronal, tetrodotoxina (TTX; 20min – 1 μ M; B); Comparação entre as E_{max} ao carbacol (C e D). Os valores de pEC₅₀ para o carbacol encontram-se no corpo dos painéis A e B. ** P<0,01 comparado ao grupo controle não tratado; ## P<0,01 comparado ao grupo (NMDG) ou TTX. Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 4-7 animais por grupo.

3.3.10 Mecanismo inibitório do mentol nas respostas contráteis ao betanecol, vasopressina e KCl

O agonista muscarínico seletivo para o receptor M3, betanecol, causou resposta contrátil concentração-dependente da preparação detrusora de animal controle (Figura 27A). O pré-tratamento com mentol (300 μ M) por 15 minutos reduziu significativamente a E_{max} ao betanecol ($P < 0,05$; Figura 27B), sem alterar a pEC_{50} a este agonista. A vasopressina, agonista dos receptores metabotrópicos V1a, V1b e V2, contraiu a preparação de forma concentração-dependente (Figura 27C). O mentol reduziu a E_{max} da vasopressina em mais de 50%, sem alterar a potência (pEC_{50} ; Figura 27C e D).

Analisamos o mecanismo inibitório do mentol independente de receptor por meio da utilização do agente despolarizante KCl, o qual causou contração da preparação de bexiga de forma concentração-dependente (Figura 27E). A prévia incubação do mentol (300 μ M) reduziu significativamente a E_{max} ao KCl ($P < 0,05$; Figura 27F).

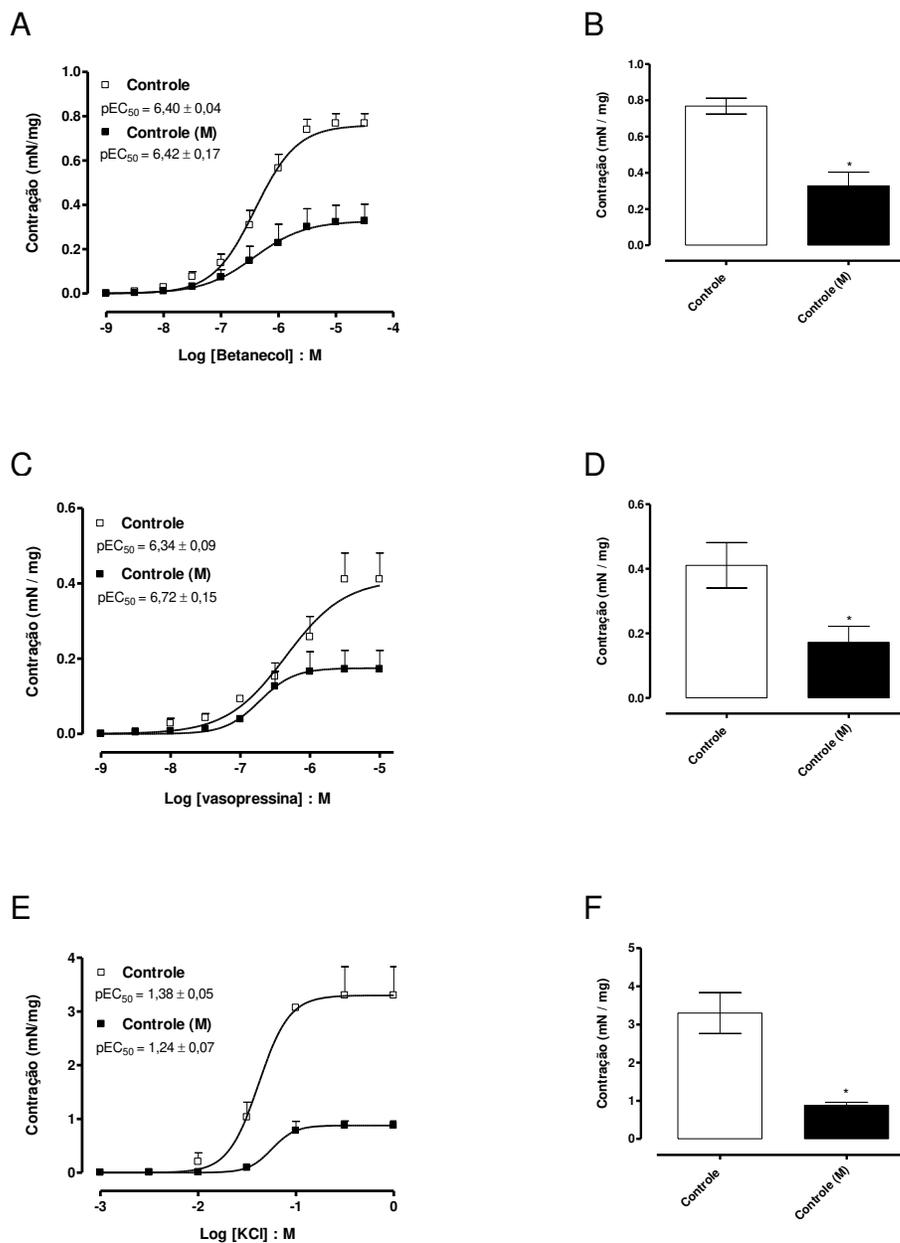


Figura 27- Curva de contração ao betanecol, vasopressina e cloreto de potássio na presença do mentol (M; 300 μ M) em detrusor isolado de camundongos. (A) Curva concentração-resposta ao agonista muscarínico betanecol (1 nM a 30 μ M), (B) à vasopressina (1 nM a 10 μ M), (C) e ao agente despolarizante KCl (1 mM a 1 M). Comparação entre as E_{max} ao betanecol (B), à vasopressina (D) e ao KCl (F). Os valores de pEC_{50} para o betanecol, a vasopressina e o KCl encontram-se, respectivamente, no corpo dos painéis A, C e E. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle não tratado. Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 3 animais por grupo.

3.3.11 Mecanismo inibitório independente da ativação dos canais de potássio dependentes de voltagem (K_v), de cálcio (SK e BK) e de ATP (K_{ATP})

Em preparação de bexiga isolada de animais controles, com urotélio intacto, e contraídas com solução de KCl (40 mM) verificamos que o mentol produziu relaxamento concentração-dependente entre 100 nM e 1 mM (Figura 28A, C). A incubação da preparação com os bloqueadores de canal de potássio, caribdotoxina (BK_{Ca} de alta condutância, 100 nM), apamina (SK_{Ca} de baixa condutância, 1 μ M), glibenclamida (K_{ATP} , 10 μ M) e TEA (K_v , 1 μ M) por 15 min não interferiu com a E_{max} relaxante do mentol, nem com a sua potência (Figura 28B, C).

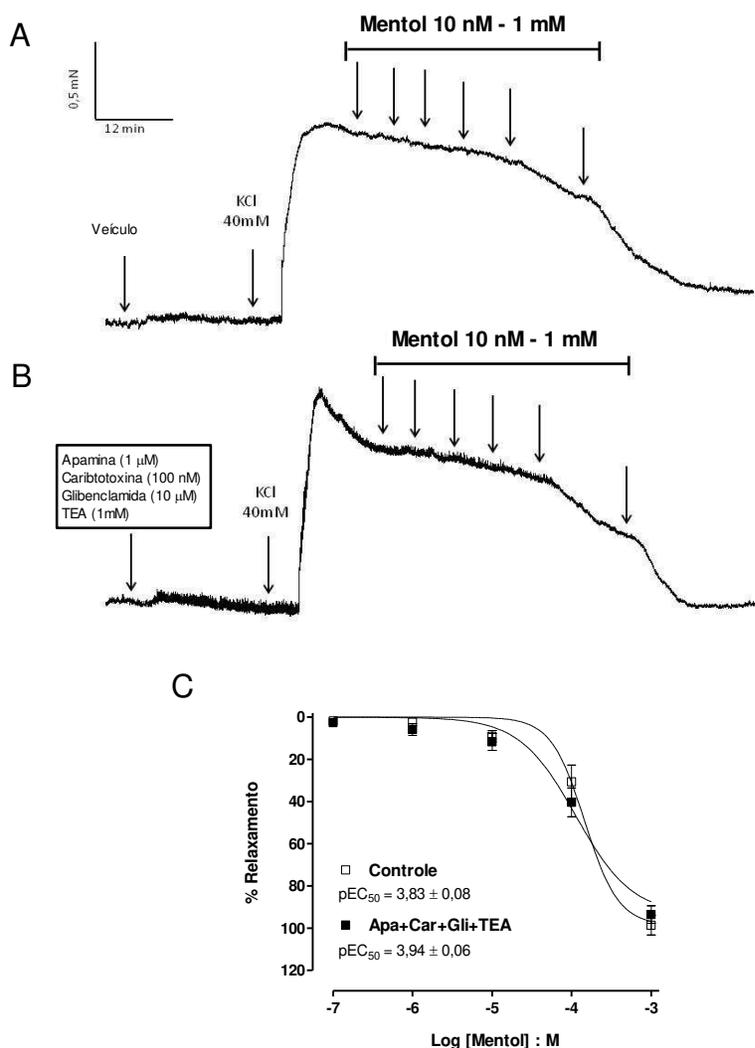


Figura 28- Curva de relaxamento ao mentol em detrusor isolado de camundongos, pré-contraídos com cloreto de potássio (KCl 40 mM), na ausência e na presença dos bloqueadores dos canais de potássio. (A) Traçado representativo da curva ao mentol (M; 100 nM a 1 mM); (B) na ausência e na presença de caribtotoxina (bloqueador dos canais de potássio, dependentes de cálcio; $BK_{Ca^{2+}}$ de alta condutância), apamina (bloqueador de K_{Ca} de baixa condutância; $SK_{Ca^{2+}}$), glibenclamida (bloqueador de K_{ATP}) e ácido tetraetilamônio (TEA; bloqueador não seletivo). (C) Curva relaxamento-resposta ao mentol na ausência e na presença dos bloqueadores de canais de K^+ . Os bloqueadores de canais de K^+ foram adicionados à preparação 15 min antes da adição de mentol 300 μ M. Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 4 animais por grupo.

3.3.12 Mecanismo inibitório dependente do bloqueio de cálcio extracelular através do canal de cálcio do tipo L de membrana ($Ca_{v1.2}$)

Neste protocolo buscamos avaliar se o mentol altera a sensibilidade ao Ca^{2+} proveniente do meio extracelular. Nossos resultados mostraram que a adição de $CaCl_2$ produz resposta contrátil concentração-dependente (Figura 29A). A pré-incubação com nifedipina (bloqueador dos canais $Ca_{v1.2}$; 1 μM) e mentol (300 μM), reduziram em mais de duas vezes a sensibilidade aos íons Ca^{2+} ($P < 0,05$), além de diminuírem significativamente a E_{max} do $CaCl_2$ ($P < 0,05$; Figura 29B). Quando incubados conjuntamente, a nifedipina e o mentol continuaram deslocando a potência para a direita e reduzindo a E_{max} na mesma proporção quando incubados independentemente, sem efeito sinérgico (Figura 29A e B).

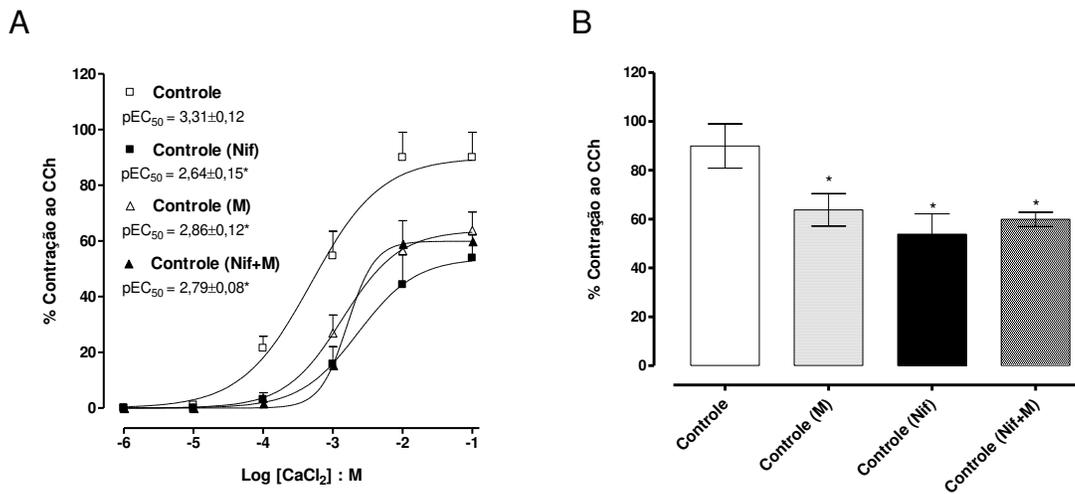


Figura 29- Curva de contração ao CaCl₂ (100 μM a 100 mM) na presença de mentol e/ou nifedipina em detrusor isolado de camundongos. (A) Efeito do prétratamento com nifedipina (Nif; 1 μM) e/ou mentol (M; 300 μM) na resposta contrátil ao Ca²⁺ extracelular. (B) Comparação entre as E_{max} ao CaCl₂. Os valores de pEC₅₀ para o CaCl₂ encontram-se no corpo do painel A. *P<0,05 comparado ao grupo controle não tratado. Os resultados são a média ± erro padrão da média de 4-5 animais por grupo.

3.3.13 Inibição do influxo de cálcio extracelular em cultura de células musculares da bexiga

Em cultura primária de células da musculatura lisa da bexiga de camundongos incubadas em solução sem Ca²⁺ (HBSS), com ácido ciclopiazônico (ACP; 10 μM), e depolarizadas com KCl (80 mM), observamos que a adição de CaCl₂ (1 mM) ao meio causou aumento da entrada de cálcio para o citosol celular (P<0,01; Figura 30A-C). Este aumento de Ca²⁺ intracelular foi rapidamente reduzido para níveis basais quando o mentol (300 μM) foi adicionado ao meio (Figura 30A, B). Em experimentos separados, mostramos que a adição de solução

0,1% DMSO (veículo) não reduziu a entrada de cálcio para o citosol celular $[Ca^{2+}]_i$ quando o $CaCl_2$ foi adicionado ao meio despolarizado com KCl (Figura 30C, D).

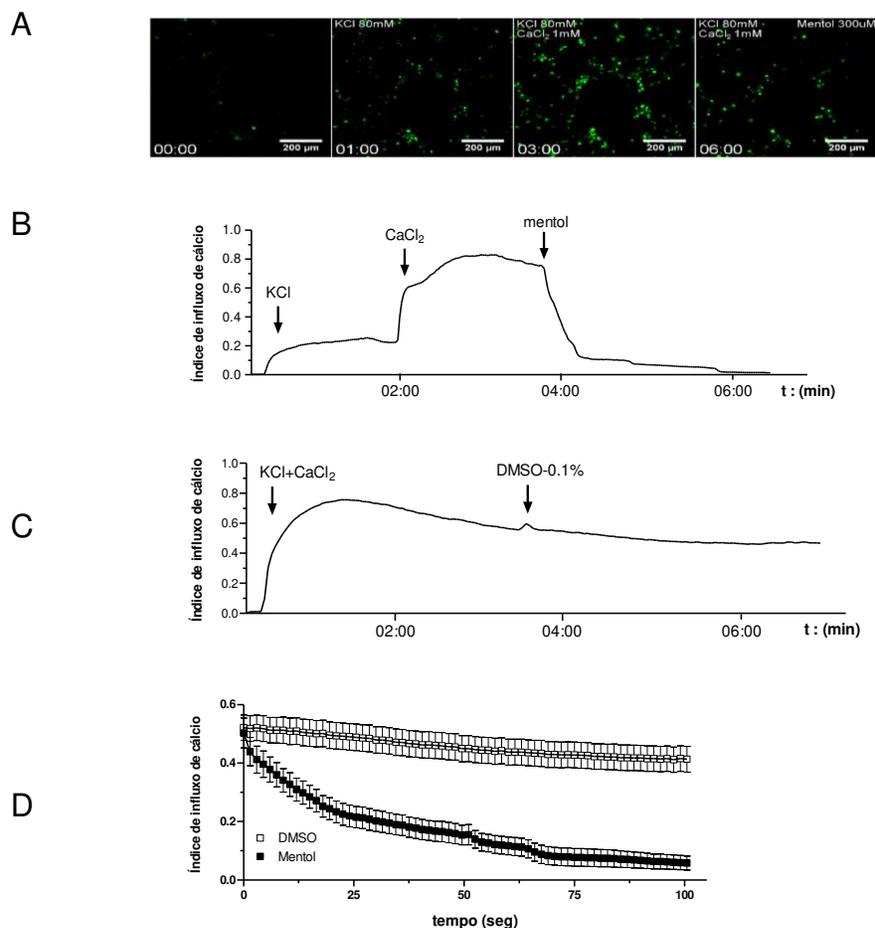


Figura 30- Influxo de cálcio extracelular em cultura de célula primária da musculatura lisa da bexiga de camundongos. (A) Figuras representativas da fluorescência emitida à 520 nm em condição basal, e depois da estimulação sequencial com KCl (80 mM), $CaCl_2$ (1 mM) e mentol (300 μM). (B) Traçado representativo de um experimento mostrando a média da variação do influxo de cálcio em 30 células musculares expostas sequencialmente ao KCl, $CaCl_2$ e ao mentol. (C) Traçado representativo de um experimento mostrando a média da variação do influxo de cálcio em 30 células expostas ao veículo (DMSO 0,1%). (D) Média da variação do influxo de cálcio extracelular registradas por 100 seg após a adição de mentol (300 μM) ou DMSO (0,1%). Os dados representam a média ± erro padrão da média para 90 células em um total de 3 experimentos independentes.

3.4 Avaliação terapêutica do mentol na hiperatividade de bexiga causada pelo diabetes

3.4.1 Instilação intravesical de mentol

Conforme mostrado anteriormente, verificamos que o perfil cistométrico de animais diabéticos após quatro semanas de diabetes por STZ foi irregular quando comparado ao grupo controle (Figuras 31). Observamos aumento na capacidade, pressão limiar, intervalo de micção, e na frequência de contrações não-miccionais no grupo diabético (Figura 32). A instilação intravesical de mentol (100 μ M) reduziu a capacidade da bexiga e a pressão de micção nos grupos controle e diabético (Figuras 32). Contudo, o tratamento com mentol normalizou os parâmetros de pressão limiar e frequência de contrações não-miccionais no grupo diabético, sem alterar de modo significativo no grupo controle. Por outro lado, a instilação intravesical de mentol não reverteu as alterações de frequência de micção e de pressão de micção no grupo diabético. O veículo (DMSO 0,1%) não modificou o padrão cistométrico nem no grupo controle nem no grupo diabético.

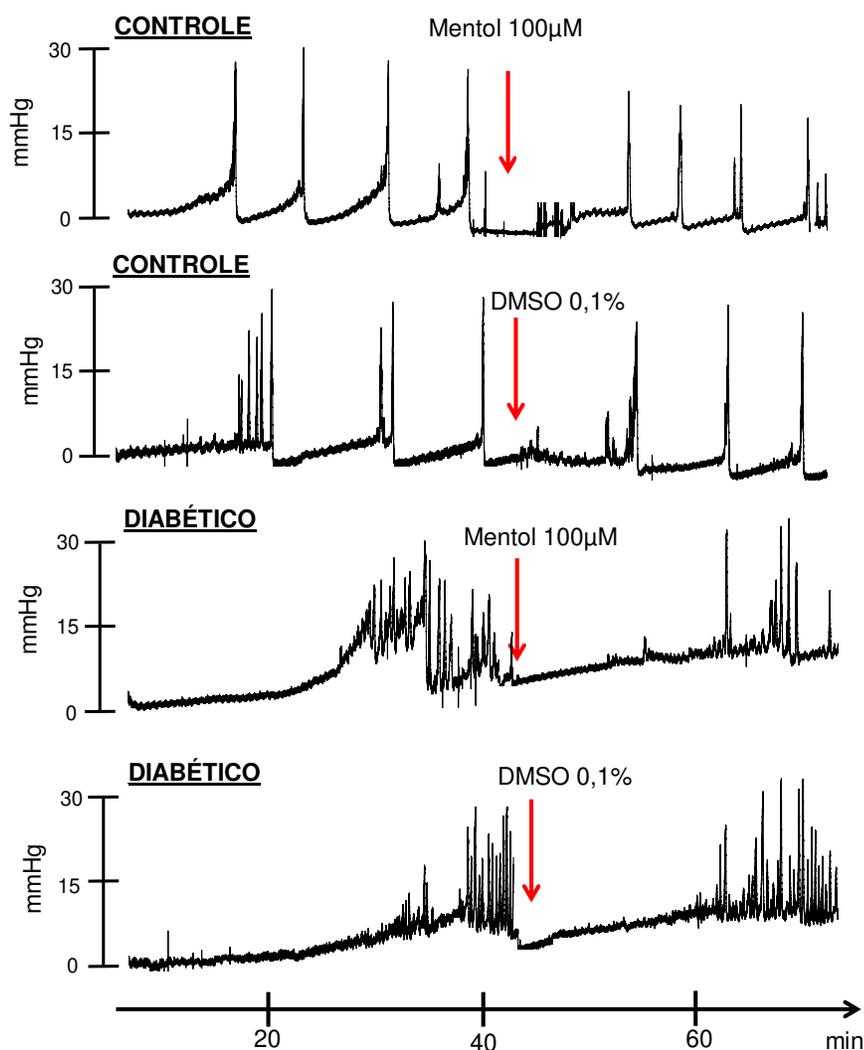


Figura 31- Avaliação cistométrica de animais controles e diabéticos na presença de mentol intravesical. Traçados representativos do perfil cistométrico de camundongos controles e diabéticos por STZ (180 mg/Kg, após 4 semanas da injeção) anestesiados com uretana 1,2 g/Kg. As setas indicam o momento da substituição da solução salina 0,9% pela solução de mentol 100 μM ou veículo (DMSO 0,1%).

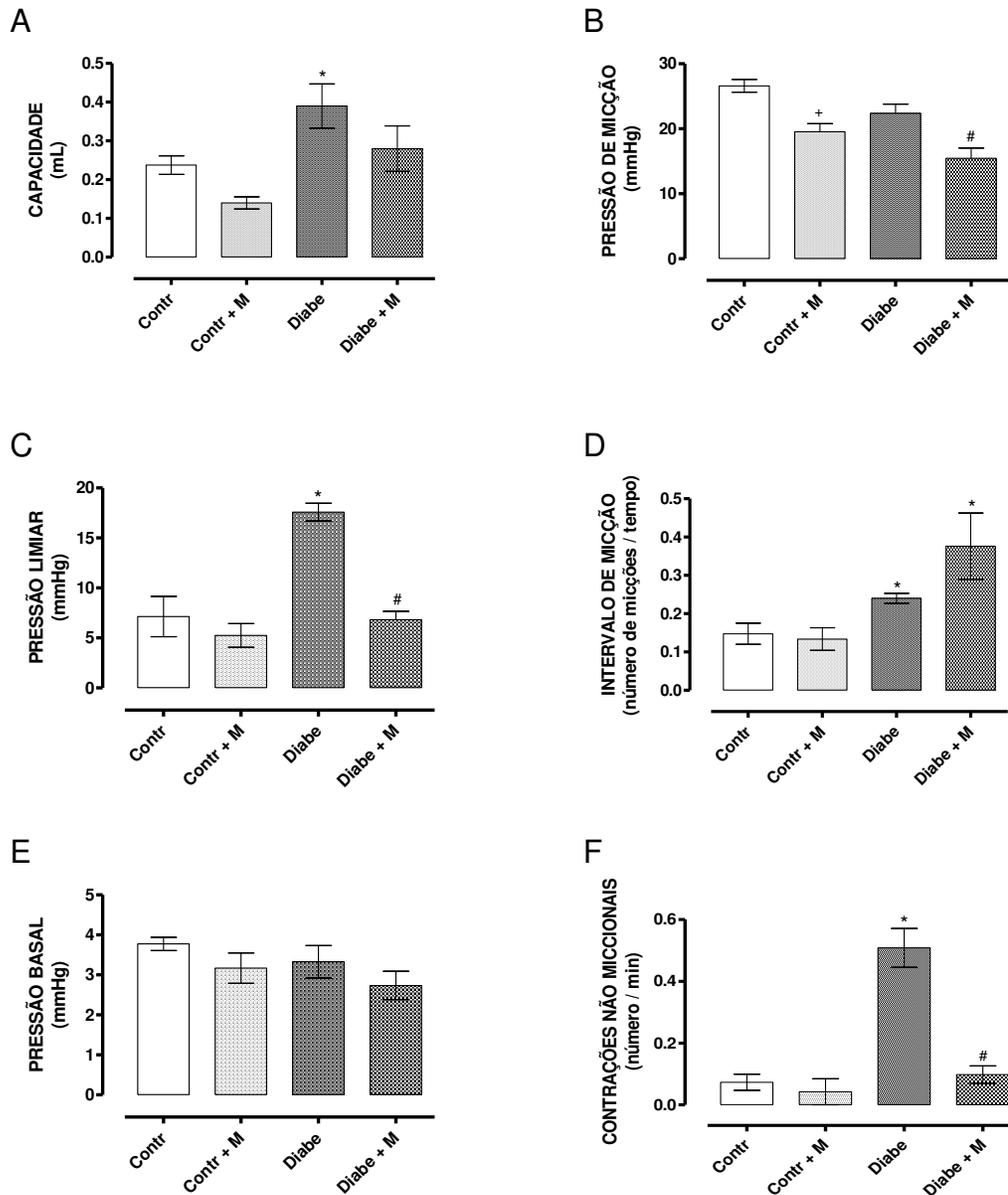


Figura 32- Parâmetros citométricos após avaliação miccional na presença de mentol intravesical em animais controles e diabéticos. Parâmetros avaliados: capacidade (A), pressão de micção (B), pressão limiar (C), intervalo entre os ciclos miccionais (D), pressão basal (E) e contrações não-miccionais (F). * $P < 0,05$, comparado ao grupo controle; # $P < 0,05$ comparado ao grupo diabético. M (mentol; 100 μ M); Diabe (diabético). Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 4animais por grupo.

3.4.2 Avaliação funcional do detrusor isolado de animais diabéticos tratados “in vitro” com mentol

Em comparação aos animais normoglicêmicos, a resposta contrátil ao carbacol foi maior no detrusor isolado de animais diabéticos (Figuras 33A-D). A incubação da preparação com mentol na concentração de 30 μM não alterou a resposta contrátil no grupo diabético nem no controle (Figuras 33A, C), ao passo que na concentração de 100 μM o mentol reduziu em 35% a resposta contrátil ao carbacol no grupo diabético, sem alterar significativamente a resposta no grupo controle (Figuras 33B e D).

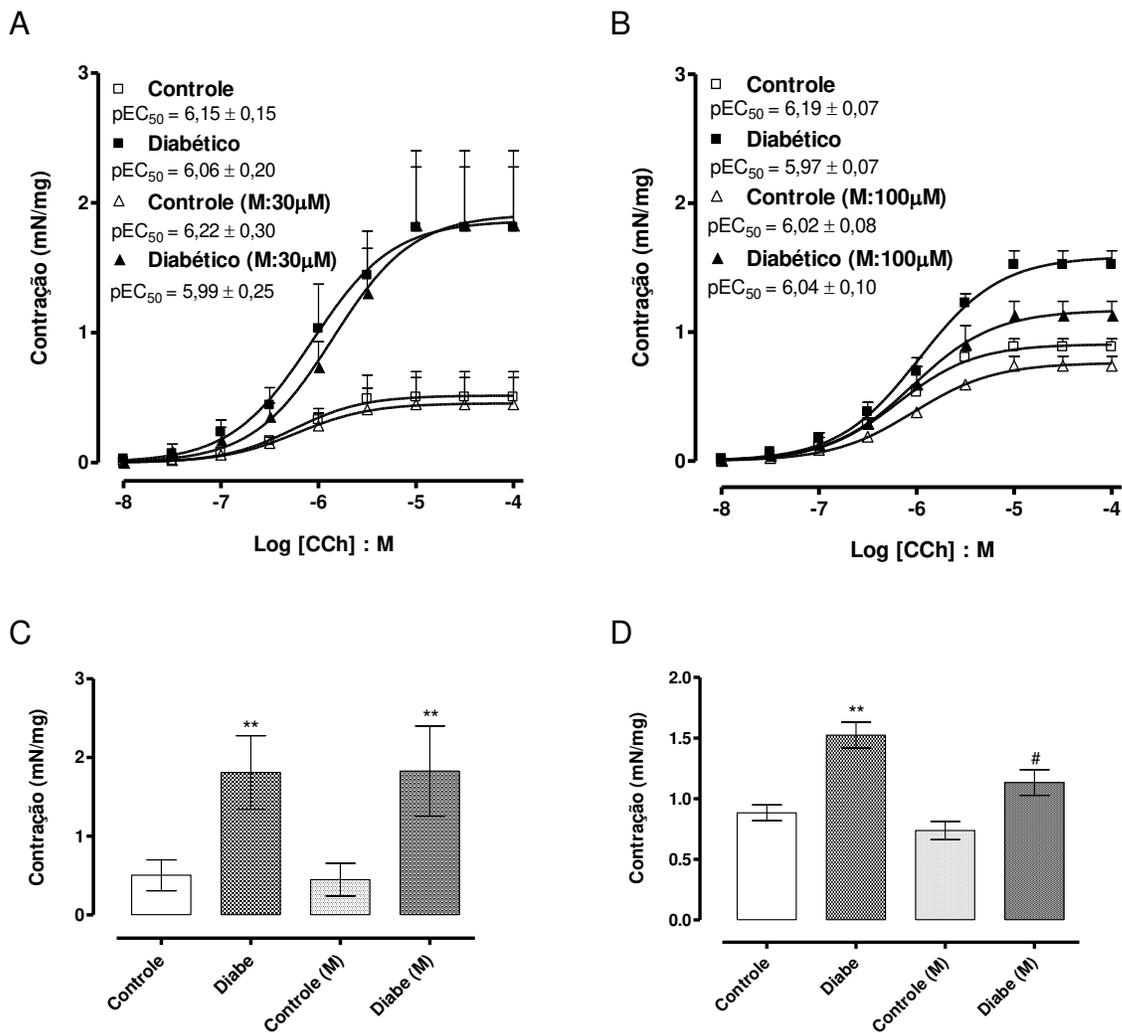


Figura 33- Curva de contração ao carbacol em detrusor isolado de camundongos controles e diabéticos na presença de mentol. Incubação de mentol na concentração de 30 μ M (A) ou 100 μ M (B) por 15 minutos antes da curva de concentração-resposta ao carbacol (CCh); (C e D) E_{max} ao CCh na presença de 30 μ M ou 100 μ M de mentol, respectivamente. Os valores de pEC_{50} para o carbacol encontram-se no corpo dos painéis A e B. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo controle; # $P < 0,05$ comparado ao grupo diabético. Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 4 animais por grupo.

3.4.3 Avaliação do perfil miccional de animais diabéticos tratados “in vivo” com mentol

Através da técnica de mancha de micção em papel filtro avaliamos “in vivo”, sem necessidade de anestesia avaliamos a função miccional de animais controles e diabéticos. Para calcularmos o volume de micção dos animais expostos durante duas horas ao papel filtro, relativizamos as manchas (cm^2) com volumes conhecidos de urina (10-80 μL ; Figura 34B). Observamos que o volume de micção dos animais diabéticos foi 5 vezes maior comparado ao grupo normoglicêmico ($P < 0,01$; Figura 34C). Também verificamos aumento significativo do número de micções no grupo diabético ($P < 0,01$), parâmetro este que deixou de diferir do grupo controle quando os animais foram tratados com mentol por via intraperitoneal na dose de 40 mg/Kg (Figura 34D).

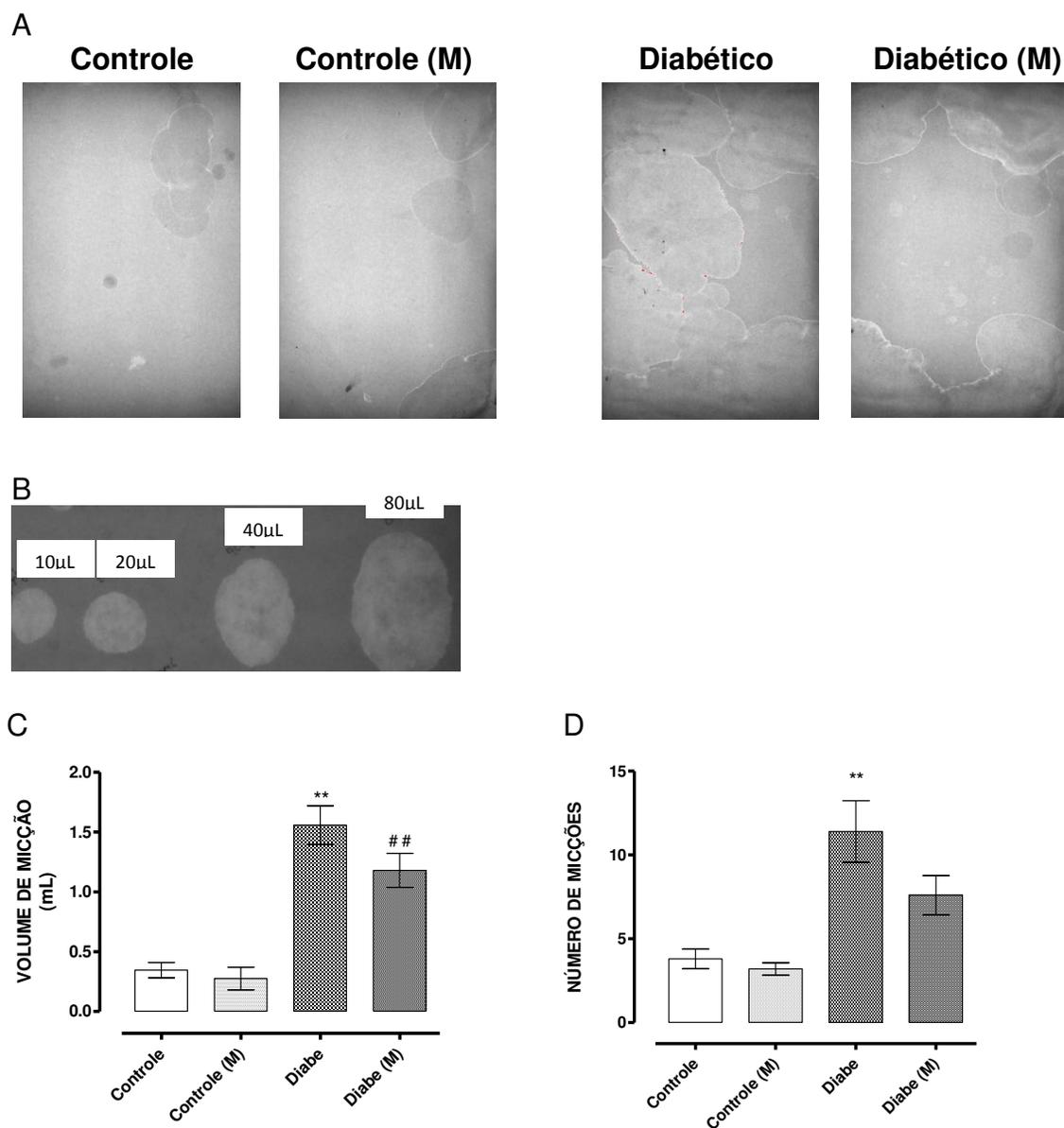


Figura 34- Registro do padrão de micção em camundongos diabéticos tratados com mentol (40 mg/Kg; i.p). (A) Papel filtro representativo do padrão de micção de um único animal com água e comida “*ad libitum*”. (B) Curva de calibração (cm^2) obtida em papel filtro após aplicação de volumes conhecidos de urina (10 a 80 μl). (C) Volume de micção e (D) Número de micções obtidos durante 2 horas de marcação do papel filtro.** $P < 0,01$ comparado ao grupo controle sem tratamento; ## $P < 0,01$ comparado ao grupo controle tratado. M (mentol); Diabe (diabético). Os resultados são a média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo.

4. Discussão

No presente trabalho estudamos o papel dos receptores TRPV4 e TRPM8 no controle miccional de camundongos em condição fisiológica e patológica (diabetes).

Em relação ao TRPV4, usando animais *wild type* e TRPV4^{-/-}, assim como agonista (GSK1016790A) e antagonistas seletivos deste receptor (RN0279893 e HC067047), mostramos que o mesmo desempenha papel importante no controle miccional fisiológico por modular a contração muscarínica e o relaxamento β -adrenérgico. A indução do diabetes pela STZ causou hiperglicemia, nocicepção mecânica e aumento da proporção entre o peso da bexiga e o peso corpóreo após 4 semanas de diabetes em igual magnitude nos grupos *wild type* e TRPV4^{-/-}. Funcionalmente, o detrusor isolado dos animais diabéticos apresentou hipercontratibilidade ao carbacol, à estimulação elétrica e ao cloreto de potássio. Entretanto, a resposta visualizada nos animais controles e TRPV4^{-/-} não foram diferentes. É possível que a ausência crônica dos receptores TRPV4^{-/-} desencadeie alterações miccionais anteriores ao diabetes.

O receptor TRPV4 é co-expresso na musculatura lisa da bexiga e no urotélio (Thorneloe *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2009; Everaerts *et al.*, 2010). Nossos resultados mostraram que este receptor quando ativado pelo GSK1016790A, contrai bexiga isolada de camundongos, resposta esta ausente nos camundongos TRPV4^{-/-}. Assim, partimos para a investigação do mecanismo relacionado à ativação deste receptor. Em preparação contraída com o agente despolarizante, KCl, mostramos que o GSK1016790A causou relaxamento da preparação de forma dependente da concentração. Assim, o receptor TRPV4

apresenta aparentemente duas funções distintas, uma mediando à resposta contrátil e outra mediando a resposta relaxante do detrusor. Nossos ensaios cistométricos mostraram que animais TRPV4^{-/-} apresentam maior frequência de micções e alteração no padrão cistométrico comparado aos *wild type*.

Nossos resultados funcionais “*in vitro*”, nos quais avaliamos as respostas contráteis e relaxantes do detrusor frente aos estímulos muscarínico e β -adrenérgico em animais TRPV4^{-/-}, corroboram com os observados “*in vivo*”, pois mostramos hipercontratibilidade do detrusor frente à estimulação com carbacol e estimulação elétrica (8-32 Hz), com redução no relaxamento à isoprenalina, indicando alterações nos dois principais mecanismos fisiológicos autonômicos do processo de micção. Por outro lado, verificamos que o RN0279893 e HC067047 (antagonistas do receptor TRPV4) não mimetizaram a hipercontratibilidade observada nos animais TRPV4^{-/-}. Por isso, acreditamos que a modulação das respostas contráteis e relaxantes da bexiga pelo TRPV4 só ocorram “*in vivo*” na ausência crônica deste receptor durante o crescimento do animal. Nossos resultados mostraram ainda que o mecanismo inibitório da resposta contrátil mediada pelo receptor TRPV4 não envolve ativação direta da musculatura lisa, visto que as respostas contráteis independentes de receptor, ou seja aquelas induzidas pelo KCl e CaCl₂, não foram alteradas nos animais TRPV4^{-/-}.

A indução de diabetes pela STZ causou elevação nos níveis plasmáticos de glicose e redução de peso corpóreo em ambos os grupos, controle e TRPV4^{-/-}. Observamos ainda que o diabetes STZ aumenta significativamente o peso das bexigas, sendo este aumento mantido nos animais TRPV4^{-/-} diabéticos. Em estudo

prévio, relatou-se que o diabetes por STZ acarreta hipersensibilidade periférica (medida pelo teste de Von Frey) em camundongos TRPV4^{+/+} e TRPV4^{-/-}. Entretanto, a hipersensibilidade no grupo *wild type* foi maior do que no grupo *knockout* (Alessandri-Haber *et al.*, 2006), abrindo a possibilidade de que a inibição do receptor TRPV4 possa ser uma via importante no tratamento da dor neuropática em pacientes diabéticos. Corroborando com a literatura, confirmamos que o diabetes por STZ causa hipersensibilidade periférica mecânica nos camundongos. Contudo, o receptor TRPV4 não influenciou a resposta nociceptiva, pois a resposta foi de mesma magnitude para os grupos TRPV4^{+/+} e TRPV4^{-/-} diabéticos. No teste de retirada da pata frente à estimulação por calor (Hargreaves), verificamos que o diabetes não alterou de maneira significativa as respostas, apesar de termos observado no grupo TRPV4^{-/-} uma redução na sensibilidade ao calor na 4ª semana de diabetes; entretanto, essa resposta ainda necessita ser melhor compreendida.

Nossos resultados funcionais mostrando hipercontratilidade ao carbacol e à estimulação elétrica, com aumento da resposta ao CaCl₂ extracelular no *wild type* diabético são consistentes com estudo prévio do grupo (Leiria *et al.*, 2011). Interessantemente, a indução do diabetes nos animais TRPV4^{-/-} não produziu alterações diferentes daquelas já observadas no *wild type*. Novamente, é possível que a ausência crônica dos receptores TRPV4^{-/-} desencadeie alterações miccionais anteriores ao diabetes. Dito de outro modo, as alterações produzidas pelo diabetes STZ são semelhantes às aquelas produzidas pela ausência do TRPV4, e disso decorreria a semelhança do diabetes e TRPV4^{-/-} quanto às alterações

miccionais. Estudo recente mostrou alterações significativas no urotélio em ratos diabéticos por STZ (Mitchell *et al.*, 2013). Ou seja, após 3 semanas da indução do diabetes, ocorre espessamento da camada urotelial, e após 9 semanas as células guarda-chuva entram em apoptose e se descolam da parede vesical; conseqüentemente, as células intersticiais e as fibras aferentes ficam expostas ao líquido intravesical, favorecendo a hiperexcitação das fibras aferentes e à resposta inflamatória local.

Quando estimuladas, as células uroteliais secretam várias moléculas sinalizadoras, dentre elas o ATP (Para revisão: Birder e Andersson, 2013). O ATP pode ativar o receptor purinérgico P2X₁ na musculatura lisa vesical, que promove influxo de cálcio extracelular, causando, conseqüentemente, contração muscular (Kennedy *et al.*, 2007; Aronsson *et al.*, 2010). Nossos resultados mostraram que o agonista purinérgico, α,β -metileno-ATP, contraiu o detrusor isolado de camundongos igualmente em camundongos *wild type* e TRPV4^{-/-}. Por outro lado, o ATP também causa relaxamento da musculatura lisa vesical (Aronsson *et al.*, 2010). Um dos mecanismos atribuídos à resposta relaxante do ATP é a ativação direta do receptor P2Y₁ (Hernández *et al.*, 2009). Recentemente, mostrou-se em humanos e animais, a existência de uma sub-população de células intersticiais, caracterizadas como PDGF α -positivas por serem marcadas com o anticorpo contra o receptor do subtipo alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGR α ; Monaghan *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2012). Neste tipo celular foi observada a expressão do receptor P2Y₁ e do canal de potássio ativado por cálcio de baixa condutância (SK3). Quando as células PDGR α foram estimuladas com ATP houve

abertura dos canais SK3, promovendo a geração de gradiente eletroquímico intracelular (Lee *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014). À semelhança das junções comunicantes (*gap junctions*) dos leitos vasculares, a bexiga apresenta junções comunicantes que talvez tenham a função de condução do gradiente eletroquímico das células ICs para a musculatura lisa, promovendo relaxamento deste tecido (Ikeda *et al.*, 2007). Dessa forma, é possível que a ausência crônica do TRPV4 na mucosa da bexiga leve à redução de mecanismos hiperpolarizantes importantes para o relaxamento da musculatura lisa. No diabetes, a morte urotelial com consequente exposição das células ICs ao líquido intravesical reduziria o mecanismo hiperpolarizante de modo similar ao animal TRPV4^{-/-}. Isto explicaria o fato de não termos observado diferenças significativas na resposta contrátil do detrusor de animais TRPV4^{-/-} não-diabéticos e diabéticos.

Em outra etapa deste projeto, caracterizamos o efeito do mentol, independentemente de ativação do receptor TRPM8, causando bloqueio do influxo de cálcio extracelular nos canais Cav_{1,2} e inibição da contração vesical. O receptor TRPM8 é expresso na parede da bexiga e em maior proporção no gânglio da raiz dorsal (Stein *et al.*, 2004). Sua função no processo miccional ainda é pouco conhecida, embora existam trabalhos mostrando sua funcionalidade no urotélio controlando o estresse oxidativo e em fibras aferentes modulando o reflexo miccional induzido pelo frio (Noguchi *et al.*, 2013; Nocchi *et al.*, 2014). Estudos utilizando camundongos TRPM8^{-/-} mostraram redução na sensibilidade ao frio (Para revisão: Daniels e McKemy, 2007). Na avaliação funcional do detrusor de camundongos TRPM8^{-/-}, verificamos que este canal não interferiu na resposta

contrátil ao carbacol, $\alpha\beta$ -metileno-ATP e estimulação elétrica, mostrando que os principais mecanismos contráteis da bexiga não são modulados pela ausência crônica deste canal.

O mentol e a icilina são substâncias largamente utilizadas para se investigar a função do receptor TRPM8 em diferentes tecidos (Para revisão: Journigan e Zaveri, 2013). Em nosso estudo, usando animais *wild type* e TRPM8^{-/-}, o pré-tratamento da preparação de detrusor isolado com mentol (300 μ M) reduziu as respostas contráteis induzidas pela estimulação elétrica e carbacol, efeito este não visualizado com a icilina. Isto sugere que o mentol é pouco seletivo para o receptor TRPM8, ativando provavelmente outros sítios de ligação.

Estudo anterior mostrou atividade inibitória, concentração-dependente, do mentol na resposta contrátil induzida pelo carbacol em bexiga de cobaios (Nomoto *et al.*, 2008). No entanto, em nenhum momento, especulou-se a possibilidade de o mentol ativar outros mecanismos independentes do TRPM8. Determinamos no presente estudo que a concentração inibitória do mentol em detrusor isolado de camundongos ocorre entre as concentrações de 30 e 300 μ M. Essa resposta inibitória foi completamente revertida após a lavagem da preparação, sugerindo que a tal atividade não seja devida a fosforilação de receptores. Avaliando a resposta contrátil ao carbacol em preparações de bexiga desprovidas de mucosa, observamos que a resposta ao agonista muscarínico não é alterada, apesar de estudos mostrarem que a ausência do urotélio aumenta a resposta contrátil ao carbacol (Hawthorn *et al.*, 2000). Quando as preparações com e sem mucosa foram pré-tratadas com mentol (300 μ M) por 15 min, observamos redução na

resposta contrátil ao carbacol em ambos os grupos, sugerindo que o mecanismo inibitório do mentol independe da presença de mucosa.

Em cultura de células de gânglio da raiz dorsal, mostrou-se que o mentol inibe a condutância iônica em canais de sódio dependentes de voltagem ($Na_v 1.2$) e resistentes à TTX (Gaudioso *et al.*, 2012). Em nossos protocolos, procuramos avaliar funcionalmente os canais $Nav_{1,2}$ na resposta induzida pelo carbacol. Para tanto, modificamos a solução de Krebs, substituindo equimolarmente o cloreto de sódio por NMDG (N-metil-glucamina) e o bicarbonato de sódio por HEPES (mantendo-se a mesma faixa de pH = 7,4). Este protocolo é bastante utilizado em estudos de eletrofisiologia para se avaliar a contribuição do sódio nas respostas funcionais (Gaudioso *et al.*, 2012). Assim, mostramos que a resposta contrátil da bexiga à estimulação muscarínica não necessita de sódio e também não é alterada na presença da TTX. Quando o mentol foi pré-incubado na solução de Krebs desprovida de sódio (ou conjuntamente com a TTX), observamos igual redução na E_{max} , sugerindo mecanismo independente de ativação de canais de sódio voltagem-dependentes.

Avaliamos a possibilidade de as moléculas entre mentol e carbacol interagirem quimicamente, apesar de não existirem evidências na literatura sobre essa possibilidade. Este poderia ser um dos mecanismos pelos quais o mentol reduz a eficácia contrátil ao carbacol. Entretanto, observamos que o mesmo efeito inibitório do mentol era alcançado nas respostas contráteis ao betanecol (agonista muscarínico seletivo), vasopressina (agonista endógeno dos receptores metabotrópicos V1a, V1b e V2) e ao KCl (agente contrátil independente de

receptor). Estes dados nos indicaram que o carbacol não interage diretamente com o mentol, e que o receptor muscarínico não é alvo direto da inibição ao mentol.

A musculatura lisa vesical expressa uma grande variedade de canais de potássio, os quais, quando ativados, causam efluxo celular de K^+ , hiperpolarizando conseqüentemente a célula, levando à relaxamento muscular (Para revisão: Petkov, 2011). Dentre estes canais, estão os de alta condutância de voltagem e ativados por Ca^{2+} (BK_{Ca} ou $K_{Ca1,1}$; Hristov *et al.*, 2011), os de baixa condutância de voltagem e ativados por Ca^{2+} (SK_{Ca} ou $K_{Ca2,1}$ - $K_{Ca2,3}$; Soder *et al.*, 2013) e os ativados por ATP (K_{ATP} ; Gopalakrishnan *et al.*, 2002). Nossos resultados mostraram que a adição de mentol em tiras da bexiga de camundongos pré-contraídas com KCl (40 mM) causou relaxamento dependente da concentração entre 10 nM e 1 mM. Entretanto, o pré-tratamento da preparação com um coquetel de inibidores dos canais de potássio (caribdotoxina, apamina, glibenclamida e TEA) não modificou a resposta relaxante ao mentol, excluindo a participação dos canais de potássio na resposta relaxante.

A concentração intracelular de Ca^{2+} é controlada pelo balanço entre a entrada e a saída de Ca^{2+} da célula. Os canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L ($Cav_{1,2}$) são expressos na membrana plasmática de células excitáveis e não excitáveis. A abertura desses canais nas células musculares lisas permite o movimento de Ca^{2+} do meio extracelular para o meio citosólico, evento necessário para o início da contração (Wegener *et al.*, 2004). Concentrações elevadas de K^+ extracelular despolarizam a membrana das células musculares e ativam os canais

$Cav_{1,2}$, resultando no aumento da corrente iônica de Ca^{2+} para o meio citosólico (Fry *et al.*, 2010). Subsequentemente, o cálcio se liga à calmodulina, a qual ativa a enzima miosina quinase (MLCK), levando à fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC20). Durante este processo, a MLC20 fosforilada interage com a α -actina, resultando na contração do músculo liso (Murthy *et al.*, 2003). A estimulação elétrica e o carbacol também causam abertura dos canais $Cav_{1,2}$ na bexiga (Huster *et al.*, 2010). Em nosso estudo, visando avaliar a entrada de Ca^{2+} do meio extracelular, depletamos os estoques intracelulares de Ca^{2+} , através da utilização de Krebs desprovido de Ca^{2+} em presença de EGTA (agente quelante de cálcio). Pré-incubamos a preparação com o inibidor da enzima Ca-ATPase, CPA, despolarizamos a musculatura com solução de KCl, e, finalmente, estimulamos o tecido com concentrações crescentes de $CaCl_2$ em solução de Krebs isenta de Ca^{2+} . A adição de $CaCl_2$ ao meio causou contrações dependentes da concentração, a qual foi significativamente inibida pelo mentol e nifedipina. Também observamos que a combinação das duas substâncias não aumentou a resposta inibitória à entrada de Ca^{2+} extracelular, sugerindo que o mecanismo de ação para ambos, mentol e nifedipina, seja semelhante. Em cultura de células detrusora realizamos o mesmo protocolo experimental para avaliação do influxo de Ca^{2+} extracelular. Observamos que o mentol impediu a entrada de cálcio extracelular causada pela despolarização com KCl. Acreditamos que esse efeito seja devido ao bloqueio dos canais $Cav_{1,2}$, impedindo o influxo extracelular de Ca^{2+} , favorecendo, assim, o retorno da concentração intracelular de Ca^{2+} ao nível

basal. Entretanto, não descartamos ainda a possibilidade de o mentol também ativar mecanismos intracelulares de efluxo de Ca^{2+} .

A avaliação do reflexo miccional induzido pela instilação intravesical de água gelada é uma técnica rotineira em ambulatórios de urologia para avaliação do reflexo miccional em pacientes com bexiga neurogênica (Mukerji *et al.*, 2006; Steanu *et al.*, 2012). Em indivíduos saudáveis, a instilação intravesical de água gelada ativa os receptores TRPM8 em fibras aferentes sensitivas, determinando conseqüentemente inibição do reflexo miccional, através de sinais descendentes de centros superiores do córtex encefálico. Em bexigas neurogênicas ocorre aumento da sensibilidade de fibras aferentes e comprometimento do mecanismo inibitório central do reflexo miccional, gerando dissinergismo contrátil entre bexiga e uretra, que resulta em aumento da frequência urinária e incontinência urinária (Figura 7; Mukerji *et al.*, 2006).

A avaliação cistométrica com salina mentolada (0,6 mM) à 38°C em cobaios saudáveis alterou o padrão cistométrico comparado ao veículo (salina 0,9%), onde se observou aumento na pressão de micção e redução no volume de micção (Tsukimi *et al.*, 2005). Resultados semelhantes foram obtidos com a aplicação de solução mentolada (99%) na pele da coxa de ratos 30 min antes da avaliação cistométrica em animais saudáveis (Chen *et al.*, 2010; Lei *et al.*, 2013). Nossos resultados cistométricos, através da instilação intravesical de mentol (0,1 mM) em animais controles, corroboram com estes estudos, onde mostramos redução na pressão de micção comparada ao veículo. Por outro lado, acreditamos que a utilização metodológica de cistometria em animais anestesiados pode muitas

vezes mascarar os mecanismos centrais inibitórios do reflexo miccional em animais saudáveis, visto que humanos saudáveis não apresentam exame positivo na avaliação do reflexo miccional induzido pela instilação intravesical de água gelada. Outra possibilidade é de o mentol ativar sítios receptores neurais diferentes dos sensíveis pela instilação de água gelada. No entanto, esse mecanismo ainda necessita de maior compreensão. O tratamento intraperitoneal com mentol (40 mg/Kg) não alterou a função miccional de camundongos saudáveis não anestesiados, mostrando que essa via de administração pode resultar em diferenças funcionais comparado à intravesical e cutânea. Trabalho recente utilizando bexiga de porco com vascularização intacta mostrou que o mentol, administrado por via intravascular, reduz a resposta contrátil do detrusor, enquanto a administração intravesical aumenta a resposta contrátil (Vahabi *et al.*, 2013).

Como mencionado anteriormente, camundongos diabéticos por STZ apresentam aumento da capacidade, pressão limiar, frequência de micção e contrações não-miccionais em relação aos animais normoglicêmicos. A instilação intravesical de mentol (100 μ M) atenuou significativamente as alterações miccionais dos camundongos diabéticos, normalizando os parâmetros de capacidade, pressão de micção limiar e contrações involuntárias da bexiga. Estes efeitos também foram obtidos com o tratamento agudo (i.p), na dose de 40 mg/Kg em animais acordados, onde verificamos que o mentol reduziu o número de micções e o volume de urina no grupo diabético. Nos estágios iniciais do diabetes observa-se aumento da expressão do receptor TRPV1 na parede da bexiga

(Mitchell *et al.*, 2013). A estimulação aferente do receptor TRPV1 pela capsaicina causa liberação dos neuropeptídeos substância P e CGRP, os quais aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL1 β e IL-6 (Bishnoi *et al.*, 2011; Ramachandran *et al.*, 2013). Foi verificado um aumento significativo dos níveis das citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IP-10, KC, MCP-1, TNF- α , IFN- β e IL-6 no soro e em macrófagos isolados de camundongos diabéticos por STZ em comparação com animais normoglicêmicos (Devaraj *et al.*, 2011). Em detrusor isolado foi observado que essas substâncias inflamatórias produzem contração da bexiga, podendo estar associadas à hiperatividade detrusora (Han *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Em modelo experimental de colite ulcerativa, estudo recente mostrou que o mentol reduz a resposta inflamatória no cólon por inibir a ativação neuronal do receptor TRPV1 (Ramachandran *et al.*, 2013). No entanto, acreditamos que essa proposição precisa ainda ser confirmada através de avaliação histológica e de ensaios da resposta inflamatória local na bexiga.

As disfunções miccionais do diabetes pela STZ envolvem destruição urotelial associada a estimulação de fibras aferentes sensíveis à capsaicina a qual modula o reflexo miccional, a resposta inflamatória e a contração vesical (Bishmoi *et al.*, 2011; Leiria *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2013). Em detrusor de camundongos diabéticos pela STZ, estudo prévio mostrou aumento da resposta contrátil ao carbacol, estimulação elétrica, KCl e CaCl₂. Estas alterações foram relacionadas ao aumento da expressão do RNAm dos canais de cálcio do tipo L (Cav_{1,2}; Leiria *et al.*, 2011). Nossos resultados também mostraram aumento da resposta contrátil em bexiga de camundongos diabéticos. Quando a bexiga do diabético foi

incubada com mentol (100 μM), a hipercontratilidade ao carbacol foi significativamente reduzida, enquanto no animal controle (não diabético) o mentol não modificou a resposta contrátil. No detrusor e cultura de células detrusora, o mentol inibiu eficientemente o influxo extracelular de Ca^{2+} nos canais $\text{Cav}_{1,2}$. Assim, acreditamos que o aumento da expressão e funcionalidade dos canais $\text{Cav}_{1,2}$ na bexiga dos animais diabéticos possa aumentar a sensibilidade tecidual ao mentol.

Os receptores TRPs (V4 e M8) encontram-se expressos na parede da bexiga. Sua função fisiológica, apesar de ainda pouco clara, envolve a regulação da sensibilidade de disteno da parede vesical e o controle do reflexo miccional. O presente projeto de doutorado mostrou que a ausência do receptor TRPV4 induziu a hiperatividade do detrusor. No diabetes, a disfunção miccional foi independente da ativação do receptor TRPV4. Por outro lado, mostramos que a ausência do receptor TRPM8 não modificou a fisiologia vesical, entretanto, o mentol inibiu a resposta contrátil do detrusor por mecanismo extrínseco ao TRPM8. O tratamento de camundongos diabéticos com mentol melhorou a função miccional. Acreditamos que o mentol seja uma ferramenta farmacológica interessante para o tratamento da hiperatividade detrusora de origem miogênica.

5. Sumário e conclusão

- O GSK1016790A causou contração e relaxamento do detrusor isolado de camundongos. O efeito depende do estado contrátil da preparação.
- Os animais TRPV4^{-/-} apresentaram hipercontratibilidade do detrusor em resposta à estimulação muscarínica e à estimulação elétrica, com redução no relaxamento à isoprenalina.
- Os animais TRPM8^{-/-} não apresentaram alterações nos mecanismos contráteis do detrusor, ao passo que o mentol inibiu a resposta contrátil da bexiga por mecanismo independente da ativação do receptor TRPM8, bloqueando a entrada de cálcio extracelular pelos canais Cav_{1,2}.
- A injeção de STZ causou hiperglicemia, nocicepção e funcionalmente no detrusor isolado, hipercontratibilidade ao carbacol e à estimulação elétrica. Os animais TRPV4^{-/-} diabéticos não apresentaram respostas funcionais diferentes dos animais diabéticos selvagens para o TRPV4.
- O tratamento agudo com mentol “*in vivo*”, através de instilação intravesical (100 μM) ou injeção intraperitoneal (40 mg/Kg), atenuou as disfunções miccionais causadas pelo diabetes, reduzindo a capacidade, as contrações involuntárias da bexiga, o volume, e a frequência de micções. O pré-tratamento “*in vitro*” com mentol (100 μM) normalizou a hipercontratibilidade do detrusor isolado nos animais diabéticos sem modificar a contração no grupo controle.
- Concluimos que o receptor TRPV4, diferente do TRPM8, apresenta função fisiológica importante no controle miccional por reduzir a resposta contrátil muscarínica e aumentar o relaxamento β-adrenérgico.

6. Referências Bibliográficas

ALESSANDRI-HABER N, DINA OA, JOSEPH EK, *et al.*, (2006). A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. *J Neurosci* 26:3864-74.

ALEY KO, REICHLING DB, LEVINE JD (1996). Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience* 73: 259–265.

ALEY KO e LEVINE JD (2002). Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience* 111:389–397.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2009). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32:62-67.

ANDERSSON KE (2002). Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology* 59: 43–50.

ANDERSSON DA, CHASE HW, BEVAN S (2004). TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. *J Neurosci* 24(23):5364–9.

ANDRADE EL, FERREIRA J, ANDRE E (2006). Contractile mechanisms coupled to TRPA1 receptor activation in rat urinary bladder. *Biochem Pharmacol* 72: 104–14.

ARONSSON P, ANDERSSON M, ERICSSON T, *et al.*, (2010) Assessment and characterization of purinergic contractions and relaxations in the rat urinary bladder. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 107(1):603-13.

BANG S, YOO S, YANG TJ, *et al.*, (2012). Nociceptive and pro-inflammatory effects of dimethylallyl pyrophosphate via TRPV4 activation. *Br J Pharmacol* 166(4):1433-43.

BAUTISTA DM, SIEMENS J, GLAZER JM, *et al.*, (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448:204–8.

BAYLIE RL, CHENG H, LANGTON PD, *et al.*, (2010). Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by the TRPM8 agonist, (-)-menthol. *J Physiol Pharmacol* 61: 543-50.

BIRDER L e ANDERSSON KE (2013). Urothelial signaling. *Physiol Rev* 93(2):653-80. Review

BISHNOI M, BOSGRAAF CA, ABOOJ M, *et al.*, (2011). Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators. *Mol Pain* 27:52.

BROWN JS, WESSELLS H, CHANCELLOR MB, *et al.* (2005). Urologic Complications of Diabetes. *Diabetes Care* 28:177-84.

BROWN SM, BENTCHEVA-PETKOVA LM, LIU L, *et al.* (2008). Beta-adrenergic relaxation of mouse urinary bladder smooth muscle in the absence of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(4):1149-57.

CALIXTO JB, KASSUYA CA, ANDRÉ E, *et al.*, (2005). Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther* 106(2):179-208.Review

CHANGOLKAR AK, HYPOLITE JA, DISANTO M, *et al.* (2005). Diabetes induced decrease in detrusor smooth muscle force is associated with oxidative stress and overactivity of aldose reductase. *J Urol* 173:309–313.

CHEN Z, ISHIZUKA O, IMAMURA T, *et al.* (2010). Stimulation of skin menthol receptors stimulates detrusor activity in conscious rats. *Neurourol Urodyn* 29(3):506-11.

CHENG CL, CHAI CY, DE GROAT WC (1997). Detrusor-sphincter dyssynergia induced by cold stimulation of the urinary bladder of rats. *Am J Physiol* 272:1271-82.

COHEN DM. (2005). TRPV4 and the mammalian kidney. *Pflugers Arch* 451, 168-175.

DANESHGARI F, HUANG X, LIU G, *et al.* (2006a). Temporal differences in bladder dysfunction caused by diabetes, diuresis, and treated diabetes in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 290:1728–1735.

DANESHGARI F, LIU G, IMREY PB (2006b). Time dependent changes in diabetic cystopathy in rats include compensated and decompensated bladder function. *J Urol* 176: 380–386.

DANIELS RL e MCKEMY DD (2007). Mice left out in the cold: commentary on the phenotype of TRPM8-nulls. *Mol Pain* 17;3:23. Review.

DE GROAT WC e SAUM WR (1976). Synaptic transmission in parasympathetic ganglia in the urinary bladder of the cat. *J Physiol*. 256:137-158.

DE GROAT WC e YOSHIMURA N (2006). Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. *Prog Brain Res* .152:59-84.

DE GROAT WC e YOSHIMURA N (2009). Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease. *Handb Exp Pharmacol*. 194:91-138.
Review

DE GROAT WC e YOSHIMURA N (2010). Changes in Afferent Activity After Spinal Cord Injury. *Neurourol Urodyn*. 29: 63-76.

DENIS MC, MAHMOOD U, BENOIST C, *et al.*, (2004). Imaging inflammation of the pancreatic islets in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34):12634-9.

DEVARAJ S, TOBIAS P, JIALAL I (2011). Knockout of toll-like receptor-4 attenuates the pro-inflammatory state of diabetes. *Cytokine* 55(3):441-5.

DHAKA A, MURRAY AN, MATHUR J, *et al.*, (2007). TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54(3):371–378.

DINA OA, MESSING RO, LEVINE JD (2006). Ethanol withdrawal induces hyperalgesia mediated by PKCepsilon. *Eur J Neurosci* 24:197–204.

DMITRIEVA N e MCMAHON SB (1996). Sensitization of visceral afferents by nerve growth factor in the adult rat. *Pain* 66:87–97.

DUNCAN LM, DEEDS J, HUNTER J, *et al.* (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* 58:1515–1520.

EARLEY S, PAUYO T, DRAPP R, *et al.*, (2009). TRPV4-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(3):1096-102.

ECCLES, R (1994). Menthol and related cooling compounds. *J Pharm Pharmacol* 46: 618– 630.

EVERAERTS W, GEVAERT T, NILIUS B, *et al.*, (2008). On the origin of bladder sensing: Tr(i)ps in urology. *Neurourol Urodyn* 27: 264-73

EVERAERTS W, ZHEN X, GHOSH D, *et al.*, (2010). Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(44):19084-9.

FLOCKERZI V e NILIUS B (2014). TRPs: Truly Remarkable Proteins. *Handb Exp Pharmacol* 222:1-12. Review.

FOWLER CJ, GRIFFITHS D, DE GROAT WC (2008). The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci* 09:453-466. Review.

FRY CH, MENG E, YOUNG JS (2010) The physiological function of lower urinary tract smooth muscle. *Auton Neurosci* 19::3-13. Review.

GAUDIOSO C, HAO J, MARTIN-EAUCLAIRE MF, *et al.*, (2012). Menthol pain relief through cumulative inactivation of voltage-gated sodium channels. *Pain*. 153: 473-84.

GEIRSSON G, LINDSTROM S, FALL M (1999). The bladder cooling reflex and the use of cooling as stimulus to the lower urinary tract. *J. Urol* 162: 1890–96.

GENTRY C, STOAKLEY N, ANDERSSON DA, *et al.*, (2010). The roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in chemically induced cold hypersensitivity. *Mol Pain* 21;6:4.

GEVAERT T, VRIENS J, SEGAL A, *et al.*, (2007). Deletion of the transient receptor potential cation channel TRPV4 impairs murine bladder voiding. *J Clin Invest* 117(11):3453-62.

GOPALAKRISHNAN SM, BUCKNER SA, MILICIC I, *et al.*, (2002). Functional characterization of adenosine receptors and coupling to ATP-sensitive K⁺ channels in Guinea pig urinary bladder smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 300(3):910-7.

GRANT AD, COTTRELL GS, AMADESI S, *et al.* (2007). Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J Physiol.* 578:715-733

HABLER HJ, JANIG W, KOLTZENBURG M (1990). Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J Physiol* 425: 545–62.

HAN JH, LEE MY, MYUNG SC (2009). The effect of endothelin-1 on the production of interleukin-6 in cultured human detrusor smooth muscle cells, and the effect of interleukin-6 on the contractile response of bladder smooth muscle strips from rats. *BJU Int* 104(5):707-12.

HANS M, WIHELM M, SWANDULLA D (2012). Menthol suppresses nicotinic acetylcholine receptor functioning in sensory neurons via allosteric modulation. *Chem Senses* 37:463-69.

HAWTHORN MH, CHAPPLE CR, COCK M, *et al.*, (2000). Urothelium-derived inhibitory factor(s) influences on detrusor muscle contractility in vitro. *Br J Pharmacol* 129(3):416-9.

HERNÁNDEZ M, KNIGHT GE, WILDMAN SS, *et al.*, (2009). Role of ATP and related purines in inhibitory neurotransmission to the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 157(8):1463-73.

HONDA K, MIYATA-OSAWA A, TAKENAKA T (1985). alpha 1-Adrenoceptor subtype mediating contraction of the smooth muscle in the lower urinary tract and prostate of rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 330: 16-21.

HRISTOV KL, CHEN M, KELLETT WF, *et al.*, (2011) Large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels regulate human detrusor smooth muscle function. *Am J Physiol Cell Physiol* 301(4):903-12.

HUSTER M, FREI E, HOFMANN F, *et al.*, (2010). A complex of Ca(V)1.2/PKC is involved in muscarinic signaling in smooth muscle. *FASEB J* 24(8):2651-9.

IKEDA Y, FRY C, HAYASHI F, *et al.* (2007). Role of gap junctions in spontaneous activity of the rat bladder. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:1018–1025,

IOANID CP, NOICA N, POP T (1981). Incidence and diagnostic aspects of the bladder disorders in diabetics. *Eur Urol* 7: 211–214.

JIA Y, WANG X, VARTY L, *et al.*, (2004). Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L272-278.

JIANG CH, MAZIÉRES L, LINDSTROM S (2002). Cold- and menthol-sensitive C afferents of cat urinary bladder. *J Physiol* 15:211-20.

JOHNSON CD, MELANAPHY D, PURSE A, *et al.* (2009). Transient receptor potential melastin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1868-77.

JOURNIGAN VB e ZAVERI N (2013). TRPM8 ion channel ligands for new therapeutic applications and as probes to study menthol pharmacology. *Life Sciences* 92:425-437.Review

KAAN TK, YIP PK, GRIST J, *et al.* (2010). Endogenous purinergic control of bladder activity via presynaptic P2X3 and P2X2/3 receptors in the spinal cord.. *J Neurosci* 24:4503-7.

KANEKO Y, SZALLASI A (2014). Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br J Pharmacol* 171(10):2474-2507.

KAPLAN SA, TE AE, BLAIVAS JG (2005). Urodynamic findings in patients with diabetic cystopathy. *J Urol* 153:342-44.

KENNEDY C, TASKER PN, GALLACHER G, *et al.*, (2007). Identification of atropine- and P2X1 receptor antagonist-resistant, neurogenic contractions of the urinary bladder. *J Neurosci* 27(4):845-51.

KONDO S, MORITA T, TASHIMA Y (1995). Muscarinic cholinergic receptor subtypes in human detrusor muscle studied by labeled and nonlabeled pirenzepine, AFDX-116 and 4DAMP. *Urol Int* 54:150-3.

KOH BH, ROY R, HOLLYWOOD MA, *et al.*, (2012). Platelet-derived growth factor receptor- α cells in mouse urinary bladder: a new class of interstitial cells. *J Cell Mol Med* 16(4):691-700.

LEDOUX SP, WOODLEY SE, PATTON NJ, *et al.*, (1986). Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage and alterations in DNA. *Diabetes* 35: 866–72.

LEE H, KOH BH, PERI LE, *et al.*, (2013). Functional expression of SK channels in murine detrusor PDGFR⁺ cells. *J Physiol* 15:503-13.

LEE H, KOH BH, PERI LE, *et al.*, (2014). Purinergic inhibitory regulation of murine detrusor muscles mediated by PDGFR α ⁺ interstitial cells. *J Physiol* 15:1283-93.

LEI Z, ISHIZUKA O, IMAMURA T, *et al.* (2013). Functional roles of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels in the cold stress-induced detrusor overactivity pathways in conscious rats. *Neurourol Urodyn* 32(5):500-4

LEIRIA LO, MÓNICA FZ, CARVALHO FD, *et al.* (2011). Functional, morphological and molecular characterization of bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: evidence of a role for L-type voltage-operated Ca²⁺ channels. *Br J Pharmacol*.163(6):1276-88.

LIEDTKE W e FRIEDMAN JM (2003). Abnormal osmotic regulation in trpv4^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13698-13703.

LIU B, FAN L, BALAKRISHNA S, *et al.*, (2013). TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain. *Pain*. 29: 304-314.

LONGHURST PA, LEGGETT RE, BRISCOE JA (1995). Characterization of the functional muscarinic receptors in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* 116: 2279-85.

MACPHERSON LJ, HWANG SW, MIYAMOTO T, *et al.* (2006). More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci* 32(4):335–43.

MCKEMY DD, NEUHAUSSER WM, JULIUS D (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416(6876):52–58.

MENDES-SILVERIO CB, LEIRIA LO, MORGANTI RP, *et al.* (2012). Activation of haem-oxidized soluble guanylyl cyclase with BAY 60-2770 in human platelets lead to overstimulation of the cyclic GMP signaling pathway. *PLoS One* 7(11):47223.

MENENDEZ V, COFÁN F, TALBOT-WRIGHT R, *et al.* (1996). Urodynamic evaluation in simultaneous insulin- dependent diabetes mellitus and end stage renal disease (see comments). *J Urol* 155: 2001–04.

MELMAN A, ZOTOVA E, KIM M, *et al.* (2009). Longitudinal studies of time-dependent changes in both bladder and erectile function after streptozotocin-induced diabetes in Fisher 244 male rats. *BJU*. 104:1292-300.

MINKE B. (1977). Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech* 3:59– 64.

MITCHELL H, RUIZ GW, DANESHGARI F, *et al.* (2013). Impact of diabetes mellitus on bladder uroepithelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 15:84-93.

MOCHIZUKI T, SOKABE T, ARAKI I, *et al.*, (2009). The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. *J Biol Chem* 284:21257-64.

MONAGHAN KP, JOHNSTON L, MCCLOSKEY KD (2012). Identification of PDGFR α positive populations of interstitial cells in human and guinea pig bladders. *J Urol* 188(2):639-47.

MONTELL C, BIRNBAUMER L, FLOCKERZI V, *et al.*, (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 9(2):229-31.

MORAN MM, MCALEXANDER MA, BÍRÓ T, *et al.*, (2011) Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 10(8):601-20. Review.

MORGAN C, DE GROAT WC, NADELHAFT I (1986). The spinal distribution of sympathetic preganglionic and visceral primary afferent neurons that send axons into the hypogastric nerves of the cat. *J Comp Neurol.* 243: 23–40.

MORITA T, DOHKITA S, KONDO S, *et al.* (1990). Cyclic adenosine monophosphate production and contractile response induced by beta-adrenoceptor subtypes in rabbit urinary bladder smooth muscle. *Urol Int* 45:10-15.

MUKERJI G, WATERS J, CHESSELL IP, *et al.* (2006). Pain during ice water test distinguishes clinical bladder hypersensitivity from overactivity disorders. *BMC Urol* 27;6:31.

MURTHY KS, ZHOU H, GRIDER JR, *et al.* (2003). Differential signalling by muscarinic receptors in smooth muscle: m2-mediated inactivation of myosin light

chain kinase via Gi3, Cdc42/Rac1 and p21-activated kinase 1 pathway, and m3-mediated MLC20 (20 kDa regulatory light chain of myosin II) phosphorylation via Rho-associated kinase/myosin phosphatase targeting subunit 1 and protein kinase C/CPI-17 pathway. *Biochem J* 15:145-55.

NILIUS B, VRIENS J, PRENEN J, *et al.*, (2004) TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 286: 195-205.

NISHIGUCHI J, HAYASHI Y, CHANCELLOR MB, *et al.*, (2005). Detrusor overactivity induced by intravesical application of adenosine 5'-triphosphate under different delivery conditions in rats. *Urology* 66: 1332-37.

NISHIZAWA O, MATSUZAKI A, KOHAMA T, *et al.*, (1987). Role of the pelvic nerve in the dynamics of micturition in the decerebrate dog as determined by suprapubic endoscopic and urodynamic evaluation. *J Urol.* 138: 442-45.

NOCCHI L, DONNA M, CHAPPLE C, *et al.*, (2014). Induction of oxidative stress causes functional alterations in mouse urothelium via a TRPM8-mediated mechanism: implication for aging. *Aging Cell* 13(3):540-50.

NOGUCHI W, ISHIZUKA O, IMAMURA T, *et al.* (2013). The relationship between α 1-adrenergic receptors and TRPM8 channels in detrusor overactivity induced by cold stress in ovariectomized rats. *J Urol* 189(5):1975-81.

NOMOTO Y, YOSHIDA A, IKEDA S, *et al.*, (2008). Effect of Menthol on detrusor smooth-muscle contraction and the micturition reflex in rats. *Urology* 72: 707-05.

OBROSOVA IG, ILNYTSKA O, LYZOGUBOV VV, *et al.* (2007). High fat diet induced neuropathy of pre-diabetes and obesity. *Diabetes* 56:2598-608.

OSHITA M, HIRAOKA Y, WATANABE Y (1997). Characterization of beta-adrenoceptors in urinary bladder: comparison between rat and rabbit. *Br J Pharmacol* 122: 1720-24.

OUSLANDER JG (2004). Management of overactive bladder. *N Engl J Med* 350: 786–99.

PEIER AM, MOQRICH A, HERGARDEN AC, *et al.*, (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 08:705–15.

PETKOV GV (2011). Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction. *Nat Rev Urol* 13;9(1):30-40.Review

PODESVA C e DO NASCIMENTO J (1972). 1,2,3,6-Tetrahydro-2-pyrimidinones. DE2142385 *ChemAbstr.* 77:5510.

RAMACHANDRAN R, HYUN E, ZHAO L, LAPOINTE TK, *et al.*, (2013). TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*30:7476-81.

REID G e FLONTA ML (2002). Ion channels activated by cold and menthol in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett.* 324:164–168.

RIVERA L, HERNÁNDEZ M, BENEDITO S, *et al.* (1992). Mediation of contraction by cholinergic muscarinic receptors in the ureterovesical junction. *J Auton Pharmacol* 12:175-181

SONKUSARE SK, BONEV AD, LEDOUX J, *et al.*, (2012). Elementary Ca²⁺ signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function. *Science* 4:597-601.

SODER RP, PARAJULI SP, HRISTOV KL, *et al.*, (2013) SK channel-selective opening by SKA-31 induces hyperpolarization and decreases contractility in human urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304(2):155-63.

STEANU ID, ALBU SE, PERSU C (2012). The place of the ice water test (IWT) in the evaluation of the patients with traumatic spinal cord injury. *Maedica (Buchar)* 7(2):125-30.

STEERS WD, CIAMBOTTI J, ETZEL B (1991). Alterations in afferent pathways from the urinary bladder of the rat in response to partial urethral obstruction. *J.Comp Neurol* 310: 401–10.

STEIN RJ, SANTOS S, NAGATOMI J, *et al.*, (2004). Cool TRPM8 and hot TRPV1 receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol* 172: 1175-78

STRENG T, TALO A, ANDERSSON KE (2004). Transmitters Contributing to the voiding contraction in female rats, *BJU* 94: 910-14.

STRENG T, AXELSSON HE, HEDLUND P (2008). Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *Eur Urol* 53: 391–99.

STROTMANN R, HARTENECK C, NUNNENMACHER K, *et al.*, (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* 2: 695-702.

SUGIMOTO K, MURAKAWA Y, SIMA AA (2000). Diabetic neuropathy a continuing enigma. *Diabetes Metab Res Ver* 16:408-433

SUKUMARAN SV, SINGH TU, PARIDA S, *et al.* (2013). TRPV4 channel activation leads to endothelium-dependent relaxation mediated by nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat pulmonary artery. *Pharmacol Res* 78:18-27.

SUZUKI M, MIZUNO A, KODAIRA K, *et al.*, (2003). Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* 278(25):22664-8.

SZALLASI A e BLUMBERG PM (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51: 159–212.

THOR KB, MORGAN C, NADELHAFT I, *et al.*, (1989). Organization of afferent and efferent pathways in the pudendal nerve of the female cat. *J Comp Neurol* 288: 263-79.

THORNELOE KS, SULPIZIO AC, LIN Z, *et al.*, (2008). GSK1016790A, a novel and potent TRPV4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326: 432-42.

TSAVALER L, SHAPERO MH, MORKOWSKI S, *et al.*, (2001). Trp-p8, a novel prostatespecific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 61:3760–3769.

TSUKIMI Y, MIZUYACHI K, YAMASAKI T, *et al.*, (2005). Cold response of the bladder in guinea pig: involvement of transient receptor potential channel, TRPM8. *Urology* 65:406–10.

VAHABI B, PARSONS BA, DORAN O, *et al.* (2013). TRPM8 agonists modulate contraction of the pig urinary bladder. *Can J Physiol Pharmacol* 91(7):503-9.

VINCENT F, ACEVEDO A, NGUYEN MT, *et al.* (2009). Identification and characterization of novel TRPV4 modulators. *Biochem Biophys Res Commun* 389(3):490-4.

VIZZARD MA (2006). Neurochemical plasticity and the role of neurotrophic factors in bladder reflex pathways after spinal cord injury. *Prog Brain Res* 152: 97–115.

WANG Z, CHENG Z, CRISTOFARO V, *et al.* (2012). Inhibition of TNF- α improves the bladder dysfunction that is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 61(8):2134-45.

WARING JV e WENDT IR (2000). Effects of streptozotocin- induced diabetes mellitus on intracellular calcium and contraction of longitudinal smooth muscle from rat urinary bladder. *J Urol* 163: 323–30.

WATANABE H, VRIENS J, PRENEN J, *et al.* (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424: 434-38.

WATANABE H, MURAKAMI M, OHBA T, *et al.*, (2008). TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 118:337-351.

WEGENER JW, SCHULLA V, LEE TS, *et al.* (2004) An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *FASEB J* 18(10):1159-6

WILD S, ROGLIC G, GREEN A, *et al.*, (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27(5):1047-53.

WILLETTE R, BAO W, NERURKAR S, *et al.*, (2008) Systemic activation of the transient receptor potential V4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse: part 2. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 326: 443-52.

WILSON GL, HARTIG PC, PATTON NJ, *et al.*, (1988). Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage and activation of poly(ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes*. 37: 213–16.

WISEMAN OJ, BRADY CM, HUSSAIN IF (2002). The ultrastructure of bladder lamina propria nerves in healthy subjects and patients with detrusor hyperreflexia. *J Urol* 168: 2040–45.

YAMADA T, UGAWA S, UEDA T, *et al.* (2009). Differential localizations of the transient receptor potential channels TRPV4 and TRPV1 in the mouse urinary bladder. *J Histochem Cytochem* 57: 277-87

YOSHIMURA, N (2007). Lower urinary tract symptoms (LUTS) and bladder afferent activity. *Neurourol Urodyn* 26: 908-13.

YOSHIMURA N (2008). Therapeutic receptor target for lower urinary tract dysfunction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377: 437-48.

YU W, ROBSON SC, HILL WG (2011). Expression and distribution of ectonucleotidases in mouse urinary bladder. *Plos One* 6(4):1-12.

ZHONG Y, BANNING AS, COCKAYNE DA (2003). Bladder and cutaneous sensory neurons of the rat express different functional P2X receptors. *Neuroscience* 120:667–75.

7.APÊNDICE



UNICAMP



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Participação dos receptores de potencial transiente vanilóide do tipo 4 (TRPV4) e do melastina do tipo 8 (TRPM8) nas disfunções miccionais do diabetes em camundongos" (protocolo nº 3313-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Antunes / Antonio Celso Saragossa Ramos Filho, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de abril de 2014.

Campinas, 07 de abril de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva