



RICARDO MIYAOKA

**EFEITO RELAXANTE DO ESTIMULADOR DA
GUANILATO CICLASE SOLÚVEL BAY 41-2272
EM SEGMENTOS ISOLADOS DE URETER
HUMANO EM MODELO PADRONIZADO *IN VITRO***

**Campinas
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

RICARDO MIYAOKA

**EFEITO RELAXANTE DO ESTIMULADOR DA GUANILATO CICLASE
SOLÚVEL BAY 41-2272 EM SEGMENTOS ISOLADOS DE URETER HUMANO
EM MODELO PADRONIZADO *IN VITRO***

Orientador: Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO ALUNO RICARDO
MIYAOKA E ORIENTADA PELO PROF. CARLOS ARTURO LEVI
D'ANCONA.

Assinatura do(a) Orientador(a)

Campinas
2014

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

M699e Miyaoka, Ricardo, 1979-
Efeito relaxante do estimulador da guanilato ciclase solúvel BAY 41-2272 em segmentos isolados de ureter humano em modelo padronizado *in vitro* / Ricardo Miyaoka. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Carlos Arturo Levi D'Ancona.
Coorientador: Edson Antunes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ureter. 2. Relaxamento. 3. Óxido nítrico - Uso terapêutico. 4. Cálculos urinários. I. D'Ancona, Carlos Arturo Levi, 1952-. II. Antunes, Edson, 1960-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Relaxing effect of BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase stimulator, in isolated human ureter segments in a standardized *in vitro* model

Palavras-chave em inglês:

Ureter

Relaxing

Nitric Oxide - Therapeutic use

Urinary calculi

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutor em Ciências da Cirurgia

Banca examinadora:

Carlos Arturo Levi D'Ancona [Orientador]

Cássio Luiz Zanettini Riccetto

Gabriel Forato Anhô

Eduardo Mazzucchi

Fábio Carvalho Vicentini

Data de defesa: 05-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RICARDO MIYAOKA

Orientador PROF. DR. CARLOS ARTURO LEVI D'ANCONA

MEMBROS:

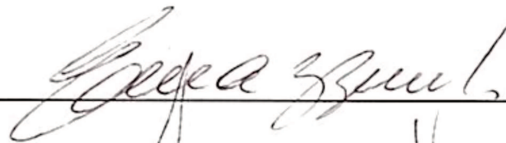
1. PROF. DR. CARLOS ARTURO LEVI D'ANCONA



2. PROF. DR. CÁSSIO LUIS ZANETTINI RICETTO



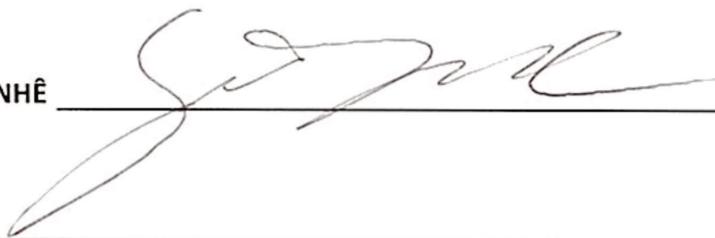
3. PROF. DR. EDUARDO MAZZUCCHI



4. PROF.DR. FABIO CARVALHO VICENTINI



5. PROF.DR. GABRIEL FORATO ANHÊ



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

Data: 05 de agosto de 2014

Para ser grande, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em toda coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa

Dedico este Trabalho...

Aos meus pais, Tetsushi Miyaoka e Cinira Tamico Sato Miyaoka, que sempre me deram amor e apoio incansável, presente e incondicional. A eles devo tudo.

À minha amada esposa Rafaella Dini Miyaoka, que com seu companheirismo, compreensão e amor, me motiva a querer ser mais e melhor. Obrigado por entender as horas abdicadas para que esta conquista se tornasse possível.

Ao meu filho Tiago, que este trabalho possa inspirá-lo a sempre perseverar e lutar por seus objetivos e sonhos.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos D'Ancona pela amizade e constante orientação acadêmica.

Aos Profs. Drs. Edson Antunes e Gilberto de Nucci pela possibilidade de parceria inestimável entre as Divisões de Urologia e Farmacologia da UNICAMP, e pelas instruções sempre construtivas.

Aos Profs. Drs. Nelson Rodrigues Netto Junior, Paulo Palma, Cássio L. Z. Ricetto e Miriam Dambros por despertarem meu interesse científico ainda jovem e me incentivarem a cultivá-lo sempre.

À Profa. Dra. Fabíola Zakia Mónica pela amizade, disponibilidade, competência e ajuda incansável no processamento do material que constitui esta tese.

Ao Dr. Manoj Monga pela amizade e constante orientação; por refinar meus conhecimentos e apreço pela Endourologia e por auxiliar na revisão do artigo resultante desta tese.

A todos os docentes e assistentes da Disciplina de Urologia que de diferentes formas contribuíram para me fazer um profissional em busca constante da excelência:

- Prof. Dr. Osamu Ikari
- Prof. Dr. Fernandes Denardi
- Prof. Dr. Ubirajara Ferreira
- Prof. Dr. Antônio Gugliotta
- Dr. Marcelo Lopes de Lima
- Dr. Adriano Fregonesi
- Dr. Ricardo Destro Saade
- Dr. Celso Frasson Scafi
- Dr. Wagner Eduardo Matheus

Aos residentes da Disciplina de Urologia: Thiago Gonçalves Pereira, Elaine Bronzatto, João Paulo de Pádua, Marcelo Cartapatti da Silva, Thomas Moretti, Tiago Aguiar, Cristiano Andrade, Juliano Moro e

Wilmar Azal Neto pela amizade sincera e pelo auxílio nas captações de órgãos esforçando-se para garantir a qualidade do material envolvido na pesquisa.

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia pelo convívio sempre agradável, por me receberem como um amigo e pelo constante apoio e troca de conhecimentos durante o desenvolvimento deste projeto.

Às agências de fomento FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) pelo apoio contínuo à pesquisa no Estado de São Paulo e no Brasil.

Aos doadores falecidos de múltiplos órgãos e suas famílias, minha estima pela nobreza e generosidade deste verdadeiro gesto de amor

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xvii
Summary.....	xix
1. Introdução.....	1
1.1 Anatomia e histologia do ureter	1
1.2 Fisiologia da contratilidade ureteral	2
1.2.1 Inervação Autonômica	2
1.2.2 Fibras não adrenérgicas não colinérgicas	5
1.3 Atividade miogênica do ureter	6
1.4 Relevância da doença calculosa do trato urinário	6
1.5 Papel da terapia medicamentosa expulsiva	9
1.6 Modelos experimentais de contratilidade ureteral com espécimes humanos	11
1.7 Via NO/ GMPc/ PDE5	14
1.8 Guanilato ciclase solúvel	14
1.9 Estimuladores da GCs heme-dependente	18
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1. Fonte dos espécimes.....	21
3.2. Montagem dos espécimes isolados.....	23
3.3. Análise qualitativa da expressão das enzimas NOS, GCs e PDE5 em ureter humano pela técnica de imunohistoquímica.....	27
3.4. Análise estatística.....	29
4. Resultados.....	31
4.1. O relaxamento do BAY 41-2272 em segmento isolado de ureter humano é parcialmente dependente da via NO/GCs/PDE5.....	31

4.2. Avaliação da expressão das enzimas da via NO-GMPc-PDE5 em ureter isolado de humano.....	38
5. Discussão.....	44
6. Conclusão.....	53
7. Referências Bibliográficas.....	54
8. Bibliografia e normatizações	70
9. Anexos.....	71

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
ALT	Alanina Transferase
AMPc	Monofosfato – 3', 5' – Adenosina Cíclico
CAT	Colina Acetil Transferase
COX-2	Cicloxygenase tipo 2
CO₂	Gás carbônico
CPK	Creatina fosfoquinase
CTL	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
E_{max}	Relaxamento máximo
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fenilefrina
GMPc	Monofosfato – 3', 5'- Guanosina Cíclico
GTP	Guanidina trifosfato
HBP	Hiperplasia benigna da próstata
HE	Hematoxilina-Eosina
IPDE-5	Inibidores de Fosfodiesterase tipo 5
IPSS	Escore Internacional de Sintomas Prostáticos
ITU	Infecção do Trato Urinário
KCl	Cloreto de potássio

LDH	Lactato desidrogenase
LECO	Litotripsia extracorpórea
L-NAME	L-NG-Nitroarginina Metil Ester
mN	Milnewton
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NANC	Não-adrenérgica não-colinérgica
NO	Óxido nítrico
NOR	Noradrenalina
NOS	Sintase do Óxido Nítrico
nNOS	Sintase do Óxido Nítrico neuronal
eNOS	Sintase do Óxido Nítrico endotelial
O₂	Oxigênio
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
PIC	Pressão intracraniana
pEC₅₀	Potência da concentração efetiva 50%
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SIN – 1	Linsidomina
SNP	Nitroprussiato de sódio
TEA	Tetraetilamônio
TH	Tirosina hidroxilase
TME	Terapia Medicamentosa Expulsiva
U+	Presença de urotélio
U-	Ausência de urotélio
5-HT	Histamina

Introdução: A terapia medicamentosa expulsiva no tratamento da calculose ureteral visa abreviar o tempo para eliminação espontânea do cálculo e evitar a necessidade de uma intervenção cirúrgica. As terapêuticas atuais baseiam-se essencialmente em bloqueadores de canais de cálcio e bloqueadores alfa-adrenérgicos, mas têm eficácia questionável, conforme demonstram estudos clínicos mais recentes e com alto nível de evidência. Assim, faz-se necessária a investigação persistente de novos agentes para este fim.

Objetivos: Descrever modelo padronizado de contratilidade ureteral *in vitro* com segmentos isolados de ureter humano a fim de avaliar o relaxamento provocado pelo estimulador da guanilato ciclase solúvel BAY 41-2272; avaliar o envolvimento da via do NO-GMPc-PDE5 e dos canais de potássio e urotélio neste processo; avaliar a expressão das enzimas guanilato ciclase solúvel (GCs), óxido nítrico sintase (NOS) e fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) no ureter por meio de imunohistoquímica.

Materiais e Métodos: Segmentos de ureter distal de 17 doadores falecidos de múltiplos órgãos de ambos sexos (24 – 65 anos de idade, média 40 ± 3.2 anos; homens 2:1 mulheres) foram utilizados. A contratilidade ureteral foi avaliada em banho de solução de Krebs e o tecido pré-contraído com KCl 80nM. Os valores de potência foram determinados como o log negativo da concentração molar para induzir 50% do relaxamento máximo nos espécimes pré-contraídos com KCl. O teste não-pareado T de Student foi usado para as comparações.

Resultados: O BAY 41-2272 produziu relaxamento em ureter isolado em tecidos pré-contraídos com KCl (80 mM) com valores de potência (pEC_{50}) e relaxamento máximo (E_{max}) de $5,82 \pm 0,12$ (n=8) e $84 \pm 5\%$, respectivamente. A adição do inibidor da sintase

de óxido nítrico (L-NAME, 100 μ M, n=6) ou da guanilato ciclase solúvel (ODQ, 10 μ M, n=6) reduziu em, 21 e 44% ($P < 0,05$) a E_{max} , respectivamente, sem alteração dos valores de pEC_{50} . A pré-incubação do inibidor da PDE5, sildenafil (100 nM) potencializou (pEC_{50} : $6,39 \pm 0,10$, n=8, $P < 0,05$) o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 em comparação à curva controle.

A adição dos bloqueadores inespecíficos de canais de potássio (tetraetilamônio – TEA) ou ATP-dependentes (glibenclamida) e a ausência de urotélio não interferiram nos parâmetros farmacológicos do BAY 41-2272. A imunorreatividade mostrou a presença da eNOS no endotélio de estruturas vasculares do ureter e nNOS no urotélio, estruturas nervosas e, fracamente, na musculatura lisa. A GCs é expressa tanto no urotélio como na musculatura lisa. A PDE5 é expressa, exclusivamente, na musculatura lisa.

Conclusão: O BAY 41-2272 provoca relaxamento em segmentos ureterais humanos pré-contraídos com KCl em modelo *in vitro* de forma concentração-dependente, essencialmente pela ativação da guanilato ciclase presente no músculo liso, e não no urotélio, apesar de um mecanismo GMPc-independente poder estar envolvido. Esta nova classe farmacológica pode ter papel no tratamento clínico de cálculos ureterais obstrutivos.

Summary

Introduction: Medical expulsive therapy in the treatment of ureteral calculi aims to reduce the timeframe for spontaneous stone expulsion avoiding an unwanted surgical intervention. Current clinical therapy is essentially based upon the use of calcium channel blockers and alpha-adrenergic antagonists which have been recently shown to offer questionable efficacy according to well-designed recent clinical trials with a high level of evidence. As such, it is necessary to continue the pursuit for new agents that could abbreviate the time for ureteral stone expulsion.

Objectives: To report on a standardized ureteral contractility *in vitro* model with isolated human ureter segments in order to characterize the relaxation induced by soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272; to assess the involvement of NO-cGMP-PDE5 pathway and potassium channels in ureteral relaxation; to assess the immunohistochemical expression of endothelial (eNOS) and neuronal NO synthase (nNOS), soluble guanylate cyclase (sGC) and type 5 phosphodiesterase (IPDE5) in human ureter.

Materials and Methods: Distal ureteral segments harvested from 17 multiple organs deceased donors (age 24-65; mean 40 ± 3.2 ; men/women ratio 2:1) were used. Ureteral contractility was assessed with segments immersed into Kreb's solution after being pre contracted with 80mM KCl. BAY 41-2272 induced ureteral relaxation in KCl pre contracted isolated segments with pEC_{50} and E_{max} of $5,82 \pm 0,12$ (n=8) and $84 \pm 5\%$, respectively. Addition of a NOS inhibitor (L-NAME, 100 μ M, n=6) or soluble guanylate cyclase (ODQ, 10 μ M, n=6) led to a reduction of 21% and 44% in E_{max} values ($P < 0,05$),

respectively. pEC_{50} values remained unaltered. PDE5 inhibitor sildenafil (100 n M) enhanced (pEC_{50} : $6,39 \pm 0,10$, $n=8$, $P<0,05$) the relaxing effect provoked by BAY 41-2272 compared with control curve.

Neither unspecific potassium channel blockers tetraethylammonium (TEA) nor ATP-dependent potassium channel blocker glibenclamide nor ureteral urothelium removal influenced the relaxation response by BAY 41-2272. Immunohistochemistry markers showed eNOS expression in ureteral vascular endothelium, nNOS in urothelium, nerve structures and with less intensity in smooth muscle. Soluble guanylate cyclase was present in urothelium and smooth muscle; and PDE5 was only expressed in ureteral smooth muscle.

Conclusions: BAY 41-2272 relaxes human isolated ureter segments in a concentration-dependent manner, mainly by activating the sGC enzyme in smooth muscle cells rather than in the urothelium, although a cyclic guanosine monophosphate-independent mechanism may exist. This pharmacological class may have a role in treating ureteral obstructive calculi.

1. Introdução

1.1 Anatomia e histologia do ureter

O ureter localiza-se na região retroperitoneal do abdômen e possui cerca de 25-30 cm de comprimento (em recém nascidos de 6.5 – 7.0 cm) com um diâmetro que varia de 1.5 – 6 mm. O ureter estende-se caudalmente a partir da pelve renal imediatamente lateral às extremidades dos processos transversos da coluna lombar. Os segmentos ureterais podem ser didaticamente divididos em 3 partes: proximal (que vai da junção ureteropielica até o promontório sacral), média (do promontório ao cruzamento com os vasos ilíacos) e distal (do cruzamento até sua entrada na bexiga) ¹.

A vascularização do ureter provém de ramos das artérias renais na sua porção proximal, de ramos das artérias gonadais e ilíacas comuns, na sua porção média, e de ramos das ilíacas internas na porção distal, em especial da artéria vesical superior¹.

A inervação simpática origina-se do plexo aórtico que se continua pelo plexo hipogástrico superior que, por sua vez, ramifica-se nos nervos hipogástricos e, finalmente, no plexo hipogástrico inferior (nervo pélvico), que é uma combinação de fibras simpáticas e parassimpáticas, estas também provindas das raízes sacrais (S2-S4)¹.

O corte transversal de um segmento ureteral revela diversas camadas histológicas a partir do lúmen, assim arranjadas: urotélio ou epitélio de transição; lâmina própria; camada de músculo liso longitudinal (interna) e circular (externa); adventícia^{1,2}. Na porção intramural, há uma terceira camada muscular conhecida como camada muscular de Waldeyer, que consiste de fibras musculares longitudinalmente dispostas como prolongamentos do músculo do trígono da bexiga¹.

1.2 Fisiologia da contratilidade ureteral

1.2.1 Inervação Autonômica

Nervos colinérgicos estão presentes no trato pieloureteral de diversas espécies animais. Fibras positivas para acetilcolinesterase foram demonstradas nas camadas adventícia e muscular dos ureteres de gatos e cobaias³. Também em cobaias foram verificadas fibras positivas para colina acetil transferase (CAT) no cálice e em camadas musculares da pelve renal. Essas fibras nervosas correm em paralelo em direção à junção pieloureteral onde se pode ver uma rede de fibras nervosas marcadas com CAT na microscopia eletrônica. Ao longo do corpo ureteral também podem-se verificar algumas fibras simples dentro das camadas adventícia e muscular⁴. No ureter humano, duas redes neurais foram demonstradas, uma na lâmina própria e outra na muscular lisa, demonstradas por

microscopia confocal. A estimulação das fibras parassimpáticas gera a liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) dos terminais nervosos.

Em experimentos *in vitro* a administração de ACh leva à contração da musculatura lisa do ureter em diferentes espécies. Em cães, a administração intravenosa de acetilcolina causou o aumento da peristalse, porém não inibida pela administração de atropina⁵.

Em ureter humano, verificou-se marcação imunohistoquímica para os cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5), sugerindo que o efeito induzido pela ACh se dá através da ativação destes nas células musculares lisas⁶. Entretanto, o estímulo colinérgico pode provocar respostas contráteis de forma indireta, através da liberação secundária de catecolaminas, conforme demonstrado em ureter de cães⁵.

O suprimento de fibras nervosas simpáticas origina-se dos segmentos tóraco-lombares T11-L1 da medula espinhal. Em cobaias, verificou-se a presença de fibras nervosas positivas para tirosina hidroxilase (TH) ao longo de todo ureter, sendo que a marcação foi mais intensa na porção distal⁴. A ativação destas fibras leva à liberação do neurotransmissor noradrenalina (NOR).

Em experimentos *in vitro* utilizando ureteres isolados de cães verificou-se que a administração de NOR leva a um aumento tanto da pressão da pelve renal quanto da peristalse do ureter⁷. De maneira semelhante, tanto a NOR quanto a fenilefrina (FE), agonista seletivo α_1 -adrenérgico, mostraram efeito estimulante em ureter de coelhos, sendo este efeito reduzido após a adição do antagonista alfa-

adrenérgico regitine⁸. Experimentos *in vivo* mostram também uma atividade estimulatória de agonistas alfa-adrenérgicos. Em porcos e em cães, verificou-se que a administração de FE foi capaz de aumentar não somente a frequência e a amplitude das contrações^{7,9,10} mas também o volume do bolus urinário e o fluxo de fluido, demonstrando que o estímulo de adrenoceptores α relaciona-se ao aumento do tônus e resistência ureteral.

Por outro lado, a administração de agonistas beta-adrenérgicos gera o relaxamento da musculatura lisa ureteral tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A administração de isoproterenol em ureter isolado de coelhos leva à redução da contratilidade ureteral, enquanto que a administração de propranolol reduz significativamente esta resposta⁸. Em cães, o isoproterenol intravenoso reduz tanto a tensão da parede ureteral quanto a peristalse^{7,10,11}. Estes trabalhos mostram claramente uma atividade contrátil alfa-adrenérgica estimulatória presente na musculatura ureteral, e uma atividade beta-adrenérgica inibitória.

,Os componentes neurais dominantes são os nervos sensoriais, amplamente confinados a um plexo suburotelial¹². A atividade elétrica de unidades mecanosensitivas de fibras C aferentes foi registrada em pequenos ramos ureterais do nervo hipogástrico durante vários estímulos mecânicos, incluindo probes ureterais de vidro, inserção de esferas de vidro intraluminais mimetizando cálculos e distensão hídrica^{13,14}. As fibras nervosas aferentes originam-se na raiz do gânglio dorsal que foi identificada nos segmentos L2-L3 e S1-S2 em cobaias e T11-L3 e L3-S1 em ratos^{15,16}. A dor gerada na crise de cólica renoureteral aguda decorrente de processo obstrutivo do lúmen ureteral, é desencadeada pelo

espasmo da musculatura lisa que produz ácido láctico e que, por sua vez, estimula as fibras A de condutância lenta e as fibras C de condutância rápida¹⁷.

A densidade de fibras aferentes na porção proximal do ureter é intensa e vai reduzindo ao longo do ureter, distalmente. Fibras nervosas aferentes podem ser visualizadas em todas as camadas do ureter: adventícia, musculatura lisa, subepitélio e epitélio ¹⁸.

1.2.2 Fibras não adrenérgicas não colinérgicas (NANC) - nitrérgicas

Em ureter de cobaias foram demonstradas fibras nervosas positivas para nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPH), marcador de fibras nitrérgicas, formando uma rede na região da pelve renal e nas camadas de musculatura lisa ureteral. Essas fibras nervosas quando estimuladas liberam óxido nítrico (NO) ⁴. Estudando ureteres de patos através de histoquímica e imunohistoquímica, Mirabella et al. demonstraram a distribuição de neurônios nitrérgicos compondo até 60% e 70% das populações neurais intramural e adventícia, respectivamente. A densidade de neurônios nitrérgicos na adventícia mostrou-se significativamente maior na porção distal do que nas porções intermediária e proximal. Os autores sugerem que em aves, assim como em mamíferos, nervos nitrérgicos e catecolaminérgicos agem na modulação da motilidade ureteral promovendo sinais com ação excitatória e inibitória na musculatura lisa ureteral¹⁹.

Estudos avaliando a via do NO mostraram que a administração de doador de óxido nítrico linsidomina (SIN-1) causou um efeito inibitório tanto na frequência de contração quanto na amplitude, sendo este efeito seguido de uma significativa produção de Monofosfato – 3', 5'- Guanosina Cíclico (GMPc)²⁰. Além disso, a administração de inibidores de fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), enzima que degrada o GMPc, reduziu também o tônus em ureter de humanos, comprovando a importância do NO na regulação do tônus da musculatura lisa ureteral ²¹.

1.3 Atividade miogênica do ureter

O transporte de urina nos ureteres se dá através de contrações peristálticas espontâneas da musculatura lisa. A teoria mais comumente aceita para explicar a geração destas contrações consiste na despolarização das membranas das células musculares lisas do cálice e pelve renal que funcionam como um marca-passo e propagam-se ao longo de todo ureter promovendo contração sincicial célula-a-célula²². Experimento em ureteres de ratos verificou a presença de células fusiformes que disparam potenciais de ação com um pico inicial, seguido de um platô e uma abrupta hiperpolarização. Essas células estão presentes na pelve renal e estão diretamente relacionadas com a atividade miogênica do ureter, de forma que o bolus urinário desencadeia o início do estímulo contrátil ²³.

1.4 Relevância da doença calculosa do trato urinário

A calculose renal é um problema de saúde pública de alcance mundial e afeta todas as regiões geográficas do planeta, além de atingir grupos de culturas e raças diversas. A incidência anual de nefrolitíase é estimada ao redor de 0.5% na América do Norte e Europa e parece ter aumentado ainda mais nos últimos anos²⁴. apesar de algumas regiões específicas como o extremo norte dos Estados Unidos, apresentarem indícios de estabilização na incidência em mulheres e até mesmo queda, em homens²⁵. Este aumento é atribuído não somente a uma incidência maior da doença, mas também à maior detecção de cálculos assintomáticos que outrora eram subdiagnosticados, situação mudada pelo desenvolvimento de aparelhos e métodos de imagem mais sensíveis e, também, pelo seu uso mais frequente²⁶. O risco de desenvolver doença calculosa renal durante a vida é estimado em torno de 10-15% em países desenvolvidos²⁷ e o perfil demográfico mais suscetível a apresentar a doença é o de homens caucasianos idosos (aproximadamente 10%) em oposição a mulheres jovens de raça negra (aproximadamente 1%)²⁶. Apesar do conhecimento de diversos fatores de risco implicados no aumento da formação de cálculos renais que incluem história familiar positiva, doenças sistêmicas (hiperparatiroidismo, gota, síndrome plurimetabólica, diabetes), fatores ambientais (altas temperaturas, stress), dietéticos (alto consumo de proteína e sódio, baixa ingestão de líquidos) e urinários (hipocitratúria, hiperoxalúria, hipercalcúria, baixo volume urinário), os índices de recorrência ainda são altos e estima-se que a probabilidade da

formação de um novo cálculo renal a partir da primeira ocorrência situa-se ao redor de 30-50% em 5 a 10 anos, e 75% em 20 anos²⁸⁻³¹.

A história natural da maioria dos cálculos renais, notadamente os de oxalato de cálcio, é o desprendimento deste da papila renal, onde ele é inicialmente formado, e sua conseqüente eliminação através do ureter, seguindo o fluxo unidirecional da urina em direção à bexiga. A cólica renoureteral consiste em uma dor intensa associada à obstrução causada pela impactação do cálculo em seu trajeto e representa a condição patológica mais comum na prática urológica diária³². Esta ocorrência, que afeta de 2% a 5% da população geral, consiste em uma dor lateral associada à náusea, vômito, hematúria e sintomas irritativos vesicais quando o cálculo se localiza na porção distal do ureter³³. A cólica renal ocorre com a migração do cálculo ao longo do ureter, causando espasmo, obstrução do fluxo urinário e distensão do sistema coletor. O aumento da pressão intra-renal leva à produção de prostaglandinas e conseqüente vasodilatação que, por sua vez, produz um aumento ainda maior na pressão da pelve renal. Além disso, a contração prolongada da musculatura lisa leva ao aumento da produção de ácido láctico que estimula as fibras C aferentes, gerando a sensação de dor³⁴.

Apesar de cerca de 68% a 94% dos cálculos ureterais até 5 mm e 47% daqueles entre 5 e 10 mm serem passíveis de eliminação espontânea³⁵⁻³⁷, o intervalo necessário para que isso ocorra é variável e depende também de sua localização e condições ureterais, como peristalse e edema. Cálculos de 4 a 6 mm podem levar até 40 dias para serem expelidos e metade destes demanda intervenção cirúrgica para remoção³⁸. A despeito da perda definitiva de função

renal não ocorrer em até 2 semanas de obstrução ureteral, ainda que completa, esta pode ocorrer com até 6 semanas de obstrução³². Recomenda-se intervenção urológica para cálculos ureterais persistentes por mais de 2 meses, quando passíveis de conduta inicial expectante³³.

Pacientes com cálculos urinários respondem por cerca de 20% das internações urológicas e representam uma das causas mais comuns de procura espontânea ao postos de atendimento de emergência^{21,41}. No ano de 2000, o custo operacional relacionado à calculose renal nos Estados Unidos foi estimado em até US\$ 2.1 bilhões, incluindo US\$ 971 milhões despendidos somente em internações devidas a esta moléstia⁴².

1.5 Papel da Terapia Medicamentosa Expulsiva (TME)

Os cálculos urinários são frequentemente localizados no ureter e a maioria destes, por sua vez, são mais comumente detectados na porção distal⁴³. Apesar da eficácia comprovada das opções de intervenção minimamente invasivas disponíveis para tratamento dos cálculos nesta topografia (86% de sucesso para litotripsia extracorpórea - LECO e 97% para ureterolitotripsia transureteroscópica), o custo envolvido é maior do que o acompanhamento vigiado; procedimentos adicionais para eliminação completa do cálculo são frequentemente necessários na LECO; ambos incorrem no risco de anestesia (regional ou geral), além dos riscos de sepse, cólica renal recorrente, rrua de

cálculos (steinstrasse), estenose ureteral, lesão ureteral e infecção do trato urinário (ITU)^{35,44}.

Apesar de pacientes com litíase ureteral poderem ser assintomáticos, muitos apresentam dor e comumente procuram serviços de atendimento emergencial ou ambulatorial. Uma vez que estes não requeiram descompressão imediata do sistema coletor, ou seja, não apresentem obstrução em rim único ou bilateral ou pielonefrite obstrutiva, e que o controle da dor seja satisfatório, uma tentativa de tratamento não-cirúrgico é desejável, frente à possibilidade de eliminação espontânea.

Neste contexto, a descoberta de meios que contribuam com o aumento desta chance vem ganhando crescente interesse. A perspectiva de um tratamento ambulatorial eficaz deflagrou a investigação de diversos agentes farmacológicos, incluindo alfa-bloqueadores adrenérgicos, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da PDE5 e outros estimuladores da via do NO. O conceito que embasa o emprego da TME apóia-se em dados de modelos animais nos quais a eliminação do cálculo é facilitada pelo relaxamento da musculatura lisa do ureter e do aumento da pressão hidrostática proximal ao cálculo⁴⁵. A TME já faz parte do armamentário terapêutico para cálculos ureterais e é recomendada como terapia de primeira linha em pacientes com cálculos até 10 mm, cujos sintomas podem ser controlados e que não apresentem infecção conjunta³⁵. Meta-análise publicada por Hollingsworth e cols. incluindo nove estudos sem distinção entre antagonistas alfa-adrenérgicos e bloqueadores de canais de cálcio detectou benefício de 65% no aumento da taxa de eliminação⁴⁶. Revisão sistemática de Singh e cols. envolvendo 16 estudos avaliando antagonistas alfa e 9 avaliando bloqueadores de

canais de cálcio concluiu que a TME com estes agentes deve ser recomendada com o intuito de facilitar a expulsão de cálculos de tamanho moderado (4,3 a 12,8 mm, neste estudo) localizados no ureter distal. Mas entendem que devido a discrepâncias e limitações metodológicas dos estudos incluídos, uma série ampla, prospectiva, randomizada, bem controlada ainda é desejável antes de uma conclusão definitiva⁴⁷. Além disso, estudos mais recentes e com alto nível de evidência contrariam o aumento da taxa expulsiva e a real eficácia dos alfa-bloqueadores no cenário clínico^{48,49}.

1.6 Modelos experimentais de contratilidade ureteral com espécimes humanos

O estudo em modelos experimentais com ureteres de animais e humanos permitiram comprovar a capacidade miorelaxante desses agentes justificando seu emprego em ensaios clínicos, mas são escassos e não seguem uma padronização.

Nakada e cols. determinaram os efeitos relaxantes do antagonista do receptor alfa₁ doxazosina na contratilidade ureteral espontânea e induzida por agonistas adrenérgicos em modelo *in vitro* utilizando segmentos ureterais porcinos⁵⁰. Além disso, avaliando segmentos de ureteres humanos sadios (doadores renais vivos) e obstruídos (segmentos de ureteres estenóticos)

demonstraram a presença equivalente de receptores alfa dos subtipos 1A, 1B e 1D.

Iversen e cols.⁵¹ testaram segmentos isolados de ureter proximal humano adquiridos a partir de nefrectomias para tratamento de carcinoma renal e de pacientes submetidos a pieloplastia por hidronefrose obstrutiva a fim de demonstrar atividade nitrérgica no músculo liso. Os autores utilizaram segmentos espirais de 10-12 mm mantidos em banho contendo solução de Tyrode. A maior parte dos espécimes demonstrou contratilidade espontânea após estabilização. Naqueles inertes inicialmente, a atividade contrátil foi facilmente desencadeada com o uso de histamina (5-HT) na concentração de $10^{-7}M - 10^{-5}M$. Um quarto dos espécimes não desenvolveram contrações rítmicas após a administração de 5-HT, mas apresentaram contração tônica.

Utilizando segmentos ureterais circulares de nefrectomias para tumores renais malignos, Kühn e cols. demonstraram o envolvimento dos segundos mensageiros Monofosfato – 3', 5'- Adenosina Cíclico (AMPC) e Monofosfato – 3', 5' – Guanosina Cíclico (GMPC) no relaxamento da musculatura lisa ureteral. Neste modelo, nenhum espécime apresentou contratilidade espontânea. Utilizou-se solução tampão de Krebs e a contratilidade ureteral foi induzida com cloreto de potássio (KCl) na dose de 80mM⁵².

A fim de verificar a ação relaxante do inibidor seletivo de cicloxigenase tipo 2 (COX-2), Nakada e cols.⁵³ utilizaram segmentos longitudinais abertos de ureter humano provenientes de nefrectomia para doação renal e de reimplante ureteral. Espécimes foram mantidos em solução aerada de Krebs e sua contração provocada pelo uso de antígeno E. A frequência das contrações foi reduzida pelos

inibidores seletivo e não-seletivo de COX-2 de forma significativa em relação aos controles ($p < 0.05$). O mesmo modelo foi usado posteriormente, desta vez incluindo segmentos ureterais provenientes de correção de estenose ureteral além dos provenientes de nefrectomia para transplante renal de doador vivo, para demonstração da atividade do receptor de neurocinina-2 como um dos principais envolvidos no relaxamento ureteral. Detectou-se redução de 97% da contratilidade da musculatura lisa espontânea *in vitro* por esta via⁵⁴.

Rajpathy e cols. se utilizaram de segmentos de ureter médio de doadores renais vivos para determinar a atividade relaxante ureteral do alfa-bloqueador tansulosina. Em cortes anelares de ureter imersos em solução de Krebs, induziram contração nos espécimes que não apresentavam contratilidade espontânea com um inibidor de canais de potássio (100 μ M Cloreto de Césio). Observaram que a tansulosina foi capaz de reduzir a atividade peristáltica, mas não o tônus basal do ureter, sugerindo que ela não teria ação miorelaxante⁵⁵.

Utilizando segmentos ureterais captados de nefrectomias por tumor renal, Lee e cols. determinaram a atividade miorelaxante do NS-398, um inibidor seletivo da COX-2, através do bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependentes. Os segmentos foram cortados longitudinal e transversalmente e imersos em solução HEPES. As contrações foram induzidas com KCl (35 mM), FE (10^{-9} - 10^{-4} M) e BAY K8644 (agonista de canais de cálcio voltagem-dependente)⁵⁶.

Sasaki e cols. caracterizaram os subtipos de receptores alfa-1 adrenérgicos envolvidos no relaxamento de segmentos proximais e distais de ureter humano captados de nefrectomias para tumores renais (segmentos proximais) e cistectomias para tumores de bexiga (segmentos distais). Em banhos de solução

de Krebs, induziram contração usando FE em segmentos cortados em espiral. Demonstraram a maior participação do receptor alfa-1A em comparação ao receptor alfa-1D no relaxamento ureteral, quando bloqueados. Além disso, apesar de todos os segmentos apresentarem resposta contrátil à FE, os distais demonstraram contração máxima significativamente maior do que os proximais⁵⁷.

1.7 Via NO/GMPc/PDE5

O NO está envolvido em uma série de funções fisiológicas, incluindo relaxamento de músculo liso, inibição da agregação plaquetária e participação na neurotransmissão no sistema nervoso central e autônomo^{58,59}, sendo a maior parte de seus efeitos mediada pela estimulação direta da guanilato ciclase solúvel (GCs)⁶⁰. Muitos estudos mostram que a diminuição da biodisponibilidade e/ou resposta ao NO endógeno contribui para o desenvolvimento de alterações cardiovasculares, pulmonares, endoteliais, renais, hepáticas assim como na disfunção erétil. Algumas destas alterações podem ser tratadas com nitratos orgânicos, como o gliceriltrinitrato ou com outros doadores de NO. Entretanto, o uso limitado destas substâncias na terapêutica reside no fato de terem absorção errática e tolerância como consequência de seu uso prolongado⁶¹. Sendo assim, compostos que atuam na via NO-GCs-GMPc, seja ativando a enzima GCs ou inibindo a enzima PDE5, constituem alvos importantes no tratamento de disfunções causadas por anormalidades na via do NO.

1.8 Guanilato Ciclase solúvel

A GCs é expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e exerce várias funções, como inibição da agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso, vasodilatação, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação⁶². A GCs é um heterodímero composto de subunidades α e β , com massas moleculares de 77 e 70 kDa, respectivamente⁶³⁻⁶⁵. Cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme e região de dimerização) e um domínio catalítico C-terminal (Figura 1). A expressão das duas subunidades é necessária para a atividade catalítica^{66,67}.

A presença do grupo prostético heme é necessária para ativação da GCs pelo NO⁶⁸⁻⁷⁰ (Figura 2). O grupo heme corresponde a um anel de cinco membros, contendo quatro átomos de nitrogênio que circundam um átomo de ferro na posição central, o qual pode encontrar-se como Fe²⁺ (forma reduzida) ou Fe³⁺ (forma oxidada). O quinto membro do anel na GCs é um ligante axial imidazólico na posição His105⁷¹. A mutação deste aminoácido, localizado próximo ao N-terminal da subunidade β_1 , determina a incapacidade da GCs de ligar-se ao grupo heme, resultando em uma enzima insensível ao NO⁷².

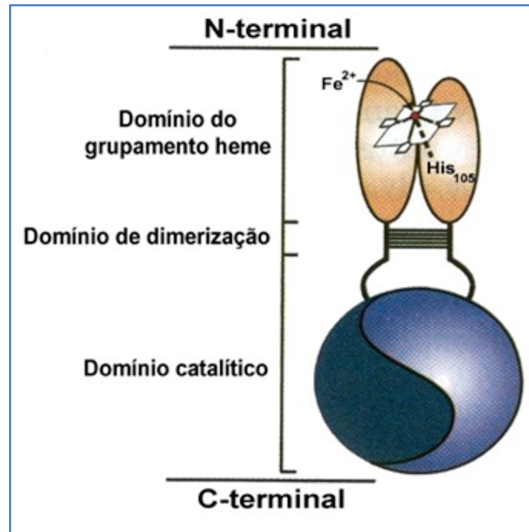


Figura 1. Guanilato ciclase solúvel é uma enzima heterodímera formada pelas subunidades alfa e beta e um grupo prostético heme (Lucas *et al.*, 2000).

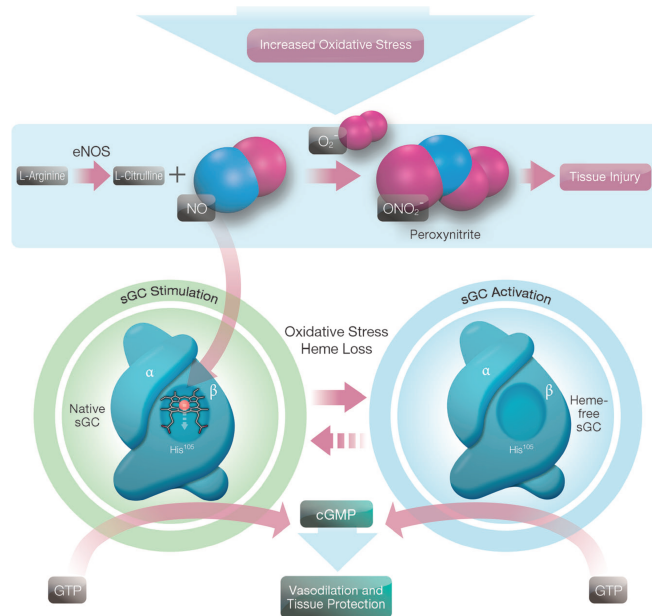


Figura 2. Via de ativação da Guanilato ciclase solúvel pelo Óxido Nítrico (Follmann *et al.* 2013)

O NO ativa a GCs por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferrosnitrosil. A ligação do NO promove a quebra da ligação entre a His105 axial e o ferro, resultando em um anel onde o NO está presente na quinta posição, criando assim uma mudança conformacional capaz de ativar a GCs^{60,73,74}. Esta ativação causa elevação nos níveis de GMPc, o qual é clivado a partir da guanidina trifosfato (GTP) pela GCs^{60,75} (Figura 3).

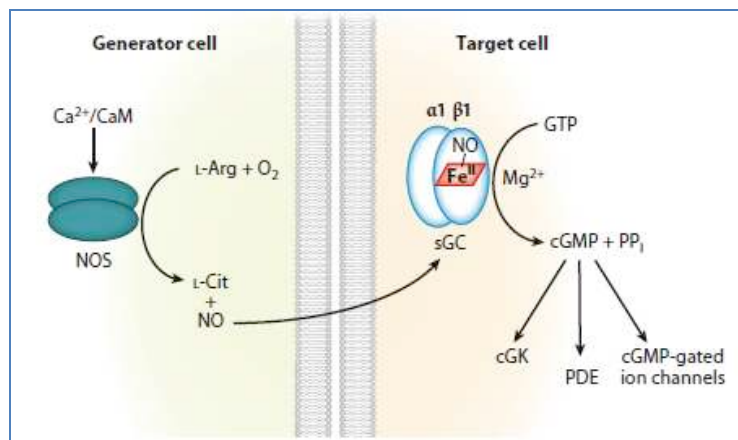


Figura 3. Esquema mostrando a formação do óxido nítrico (NO) a partir da ativação da sintase de óxido nítrico (NOS) e a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) a qual converte a guanidina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Derbyshire, E.R. & Marletta M.A. 2012)

Estados distintos de oxidação da GCs foram recentemente identificados^{76,77}. A remoção do grupamento heme ou sua oxidação leva à insensibilidade da enzima ao NO. Mudanças endógenas do estado redox da GCs podem ser induzidas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como os radicais superóxido (O_2^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$), que são geradas em condições de estresse oxidativo, comuns à patologia do diabetes e outras. Esta alteração do

estado redox compromete a sinalização NO-GCs-GMPc, fazendo com que a enzima não mais apresente resposta tanto ao NO endógeno, quanto ao exógeno, proveniente de fármacos doadores de NO⁶⁸. Embora a GCs não mais responda ao NO neste estado, ela ainda pode responder a estimuladores (BAY 41-2272, BAY 63-2521, BAY 41-8543) e ativadores (BAY 58-2667, BAY 60-2770 e HMR 1766) da enzima⁷⁶⁻⁷⁸.

1.9 Estimuladores da GCs heme-dependente

Os compostos BAY 41-2272, BAY 63-2521 (riociguat) e BAY 41-8543 são potentes estimuladores da GCs⁷⁷⁻⁸¹, produzidos pela BAYER® (patente US20130035340A1). Ao contrário dos nitratos orgânicos convencionais, cuja eficácia é limitada pelo desenvolvimento de tolerância após administração crônica⁸², a estimulação da GCs com o BAY 41-2272 não causa o desenvolvimento de tolerância, como demonstrado em um modelo de hipertensão genética⁸³. Além disso, a administração oral de BAY 41-2272 reduz a pressão arterial média em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), apresenta atividade antiplaquetária e aumenta a sobrevivência em animais hipertensos induzidos por inibição da NOS⁷⁹. Em diferentes preparações vasculares e não vasculares, incluindo aorta de coelho⁸³, artéria mesentérica⁸⁴, artéria basilar de ratos⁸⁵, corpo cavernoso de coelho e humano⁸⁶, bexiga de coelho⁸⁷, bexiga de rato⁸⁸ e canal deferente de rato⁸⁹ o BAY 41-2272 causa potentes repostas relaxantes, as quais são parcialmente reduzidas pela inibidor da GCs, denominado ODQ (quinoxalin-1-

one 1H[1,2,4] oxidiazolo [4,3-a]), que provoca oxidação do grupo heme, impedindo sua ativação pelo NO.

No trato urinário baixo, o NO constitui o principal neurotransmissor inibitório contrátil. A expressão da sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS) foi determinada em axônios e terminações nervosas presentes na musculatura lisa ureteral, sugerindo assim que o relaxamento do ureter envolve a via do NO⁹⁰.

Os doadores de óxido nítrico Linsidomina (SIN-1) e nitrito sódico acidificado provocam relaxamento em ureter isolado de suínos²⁰. Em ureter isolado de humano, os inibidores da PDE5 vardenafil, sildenafil e tadalafil induziram relaxamento concentração dependente em tecidos pré-contraídos com KCl, sendo este efeito devido, principalmente, ao acúmulo de GMPc²¹.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente projeto tem como objetivo geral caracterizar o relaxamento induzido pelo estimulador da guanilato ciclase solúvel, BAY 41-2272, em ureter isolado de doador falecido de múltiplos órgãos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Investigar se o relaxamento produzido pelo BAY 41-2272 envolve a via do NO-GMPc-PDE5
2. Investigar se o relaxamento produzido pelo BAY 41-2272 envolve a participação da ativação de canais de potássio
3. Investigar a participação do urotélio no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272
4. Avaliar a expressão das enzimas sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), guanilato ciclase solúvel (GCs) e fosfodiesterase tipo 5 (PDE5).

3. Materiais e Métodos

3.1 Fonte dos espécimes

Foram utilizados segmentos ureterais de 17 pacientes (idade 24 a 65 anos; média 40 ± 3.2 anos; homens 2:1 mulheres) submetidos a captação de múltiplos órgãos após diagnóstico de morte encefálica e consentimento informado, no período entre Setembro de 2009 e Setembro de 2013. A fim de padronizar os espécimes, os ureteres foram retirados “em bloco” com um pedaço da bexiga envolvendo sua porção intramural. Segmentos de 2 cm de comprimento medidos a partir da junção uretero-vesical foram cortados para o experimento (Figuras 4, 5a e 5b) de forma a certificar que somente segmentos distais estavam sendo utilizados. Todos os protocolos experimentais receberam aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Parecer CEP: N° 490/2009 – documento anexo) e foram realizados no Departamento de Farmacologia da UNICAMP. Para este estudo, não houve financiamento direto de nenhuma agência de fomento.

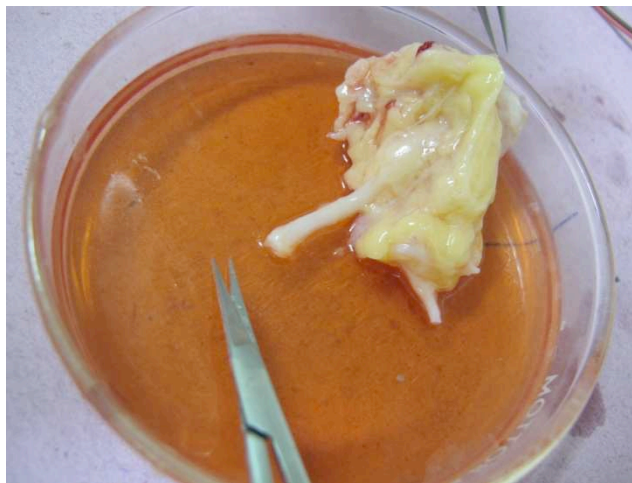


Figura 4. Segmento de ureter distal com *cuff* vesical e porção intramural

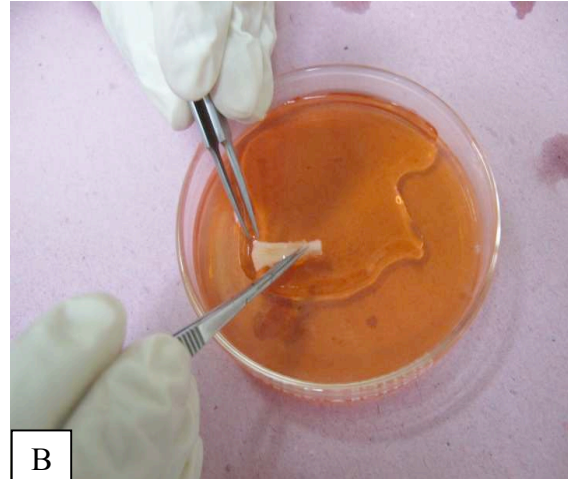
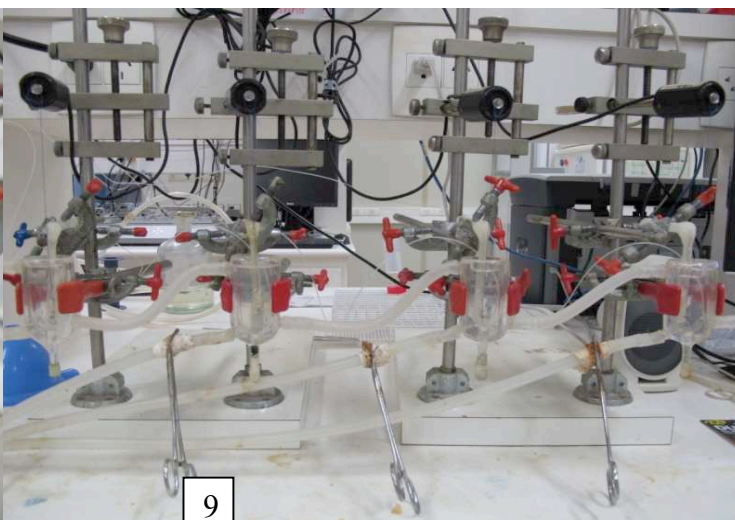
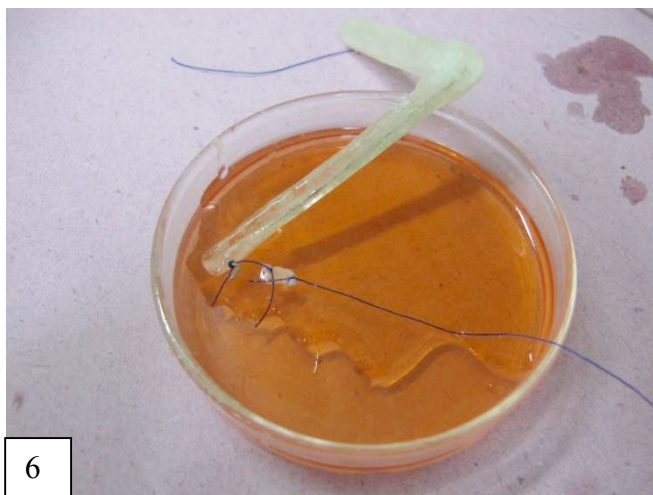


Figura 5a e 5b: Segmento ureteral distal isolado e abertura longitudinal da luz.

3.2 Montagem dos ureteres isolados

Após a retirada dos ureteres direito e esquerdo, os tecidos foram, imediatamente, colocados em solução de Krebs refrigerada para posterior remoção do tecido conjuntivo. Cada ureter forneceu duas tiras de cerca de 1 cm cada. Posteriormente, as tiras foram montadas em banhos isolados de 10 ml contendo solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (mM): NaCl, 118; NaHCO₃, 25; glicose, 5.6; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄.7H₂O, 1.17 e CaCl₂.2H₂O, 2.5, aquecida a 37°C e continuamente aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os tecidos foram amarrados a um transdutor de força isométrico, os quais estavam conectados a um sistema de aquisição de dados (Power Lab 4/30, LabChart, 7.2) (Figuras 6 a 9). A tensão foi, periodicamente, ajustada durante o período de estabilização (5 mN ± 10%).



Figuras 6 a 9: Amarradura das extremidades do segmento ureteral com fio de algodão e ancoramento em base fixa de resina (fig. 6); ancoramento no tensiômetro (figs. 7 e 8) e areamento contínuo da solução (fig. 9).

Os experimentos funcionais foram realizados em três etapas. Na primeira etapa procuramos caracterizar o relaxamento do BAY 41-2272 neste tecido. Para tanto, os tecidos foram pré-contraídos com KCl (80 mM) e curvas concentração resposta ao estimulador da GCs, BAY 41-2272 (0,001-100 μ M) foram realizadas na ausência (curva controle - CTL) e na presença dos inibidores da NOS (L-NAME, 100 μ M), da GCs (ODQ, 10 μ M) e da PDE5 (sildenafil, 100 nM). Além disso, curva concentração resposta ao doador de NO nitroprussiato de sódio (SNP, 0,001-100 μ M) foi realizada na presença de dose fixa de BAY 41-2272 (1 μ M). Espécimes que não apresentaram contração ao estímulo com KCl foram descartados por serem considerados não funcionantes. Somente uma curva de concentração resposta foi realizada em cada segmento. Em todos os experimentos, um segmento foi utilizado como controle (CTL) (curva concentração resposta ao BAY 41-2272 na ausência de antagonistas ou inibidores), de forma a garantir que o mesmo indivíduo servisse como seu próprio controle. Estudos preliminares certificaram que a dose utilizada do veículo dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,3% era incapaz de induzir relaxamento, agindo somente como veículo (Figura 10).

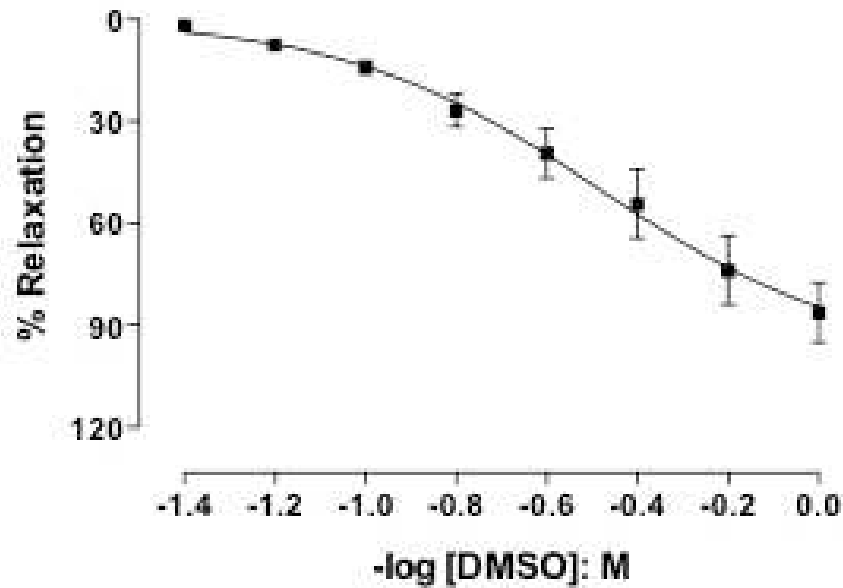


Figura 10. Curva concentração-resposta de segmento ureteral humano ao DMSO.

Em outro set de experimentos realizamos curva concentração resposta ao BAY 41-2272 na presença do bloqueador inespecífico dos canais de potássio tetraetilamônio (TEA, 1 mM) e do bloqueador dos canais de potássio ativados por ATP glibenclamida (10 μ M).

Em uma terceira etapa avaliamos se o urotélio poderia contribuir no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272. Assim, curvas concentração resposta ao BAY 41-2272 foram realizadas na ausência e na presença do urotélio. A remoção da camada urotelial dos segmentos estudados foi conseguida através de fricção suave com cotonete, e confirmada por análise histológica após coloração com Hematoxilina-Eosina (HE).

Estudos preliminares com incubação de segmentos ureterais com glibenclamida, TEA, sildenafil, ODQ e L-NAME não apresentaram alteração do tônus basal ou da resposta contrátil ao KCl 80mM (Figura 11).

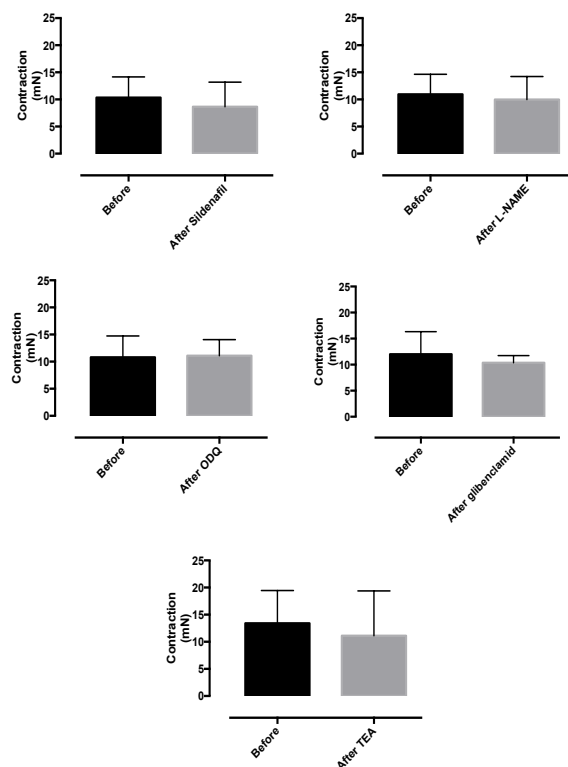


Figura 11. Gráficos de contração ao KCl (80nM) antes e após pré-incubação com os diversos agentes da via do NO.

3.3 Análise qualitativa da expressão das enzimas eNOS, nNOS, GCs e PDE5 em ureter humano pela técnica de imunohistoquímica

Os ureteres (n=5) foram seccionados em fatias com espessura máxima de 2mm, as quais foram fixadas em formalina a 10% tamponada (pH 7.4-7.6), por

período de 24 horas. Após a fixação, o material foi processado automaticamente em aparelho histotécnico (*i.e.*, submetido a desidratação, diafanização e impregnação por parafina, por meio de banhos consecutivos de álcoois em concentrações crescentes, xilol e parafina), sendo finalmente incluído em blocos de parafina. Secções de 4 µm, realizadas a partir destes blocos, foram colocadas em lâminas previamente lavadas, desengorduradas e tratadas com solução de organossilano a 25% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América; cod. A3648). As lâminas com os cortes foram deixadas à temperatura ambiente até o momento da reação imunohistoquímica. A detecção das enzimas foi feita utilizando os anticorpos: anti-.NOSe (policlonal, diluição 1:500, Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-NOSn (policlonal, diluição 1:5000, Abcam), anti-GCs (policlonal, diluição: 1:500, Abcam) e anti-PDE5 (policlonal, diluição 1:1000, Abcam). As secções foram desparafinizadas em banho de xilol previamente aquecido em estufa a 110° C e, a seguir, em banhos subseqüentes de xilol à temperatura ambiente. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80% e 50% e lavadas em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por meio de três banhos de H₂O₂ a 10 volumes cada um, com duração de cinco minutos, seguidos de lavagens em PBS. Para recuperação antigênica, foi utilizada uma panela a vapor T-fall, com o objetivo de desmascarar os antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio, em pH 6,0 durante 30 minutos a 95° C e, a seguir, lavadas em água corrente. A seguir, o anticorpo primário foi gotejado sobre o corte histológico na diluição adequada e incubado durante o dia (*overday*), por 2 horas a

temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, sob agitação, secadas e incubadas com o sistema de revelação baseado em polímero *Advance* (DAKOCYTOMATION, Carpenteria, Califórnia, Estados Unidos da América) por uma hora a 37° C. Terminada a incubação, foram realizadas três lavagens em PBS, sob agitação. Para a revelação da reação foi utilizado um substrato cromogênico - a solução DAB (tetraidrocloro de 3-3'-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América) na proporção de 0,06g para 100mL de PBS-, 500µl de H₂O₂ a 20 volumes e 1mL de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América), por cinco minutos a 37° C. O material foi, então, lavado em água corrente e contracorado com hematoxilina de Mayer durante 30 a 60 segundos. As lâminas foram desidratadas em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e encaminhadas a três banhos de xilol, para em seguida serem montadas em lamínulas e resina Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Secções histológicas correspondentes (*i.e.*, extraídas do mesmo bloco de parafina) sem o anticorpo primário foram utilizadas como controles negativos. Para os controles positivos utilizaram-se amostras de tecido da aorta de camundongos. Análise microscópica e documentações fotomicrográficas das secções de imunohistoquímica foram realizadas com o uso de microscópio de campo luminoso (Leica DM5000 B, Leica, Germany) conectado a uma câmera digital (Leica DFC360 FX, Leica).

3.4 Análise Estatística

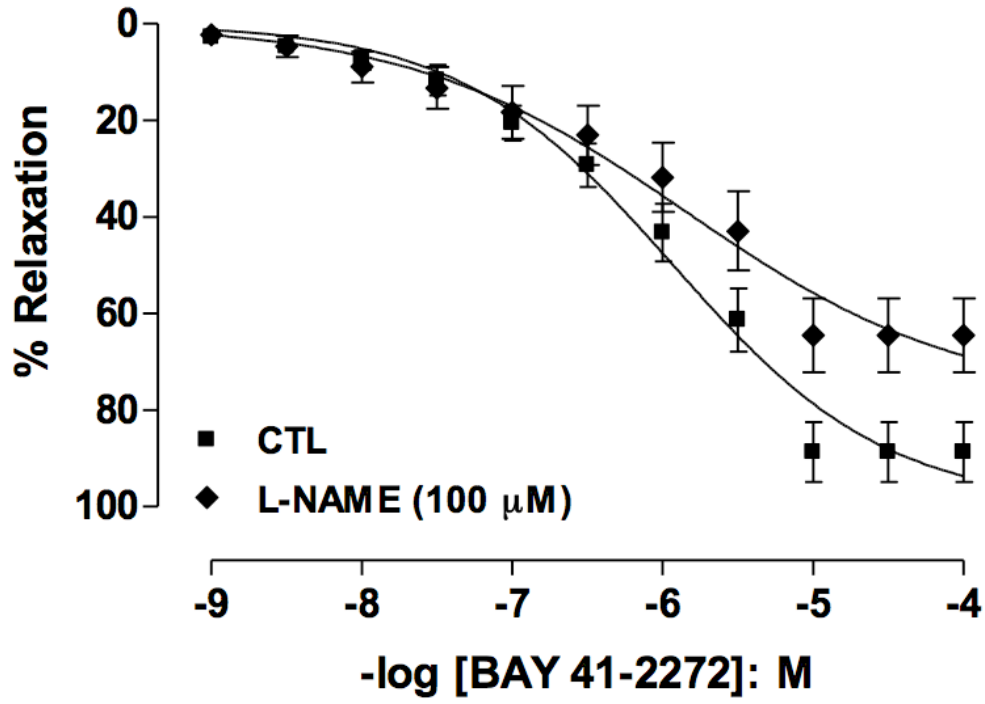
Valores experimentais de relaxamento máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e contração foram calculados em relação à contração máxima produzida pelo KCl (80 mM) tomados como 100%. O relaxamento foi expresso em porcentagem, enquanto que a contração em “mN” logarítmo negativo da EC_{50} (pEC_{50}) foi calculado utilizando-se um programa de cálculo (GraphPAD Instat, 1997, versão 5.0, GraphPad Prism Software, San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias. O teste não pareado “t” de Student foi utilizado para as análises comparativas. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

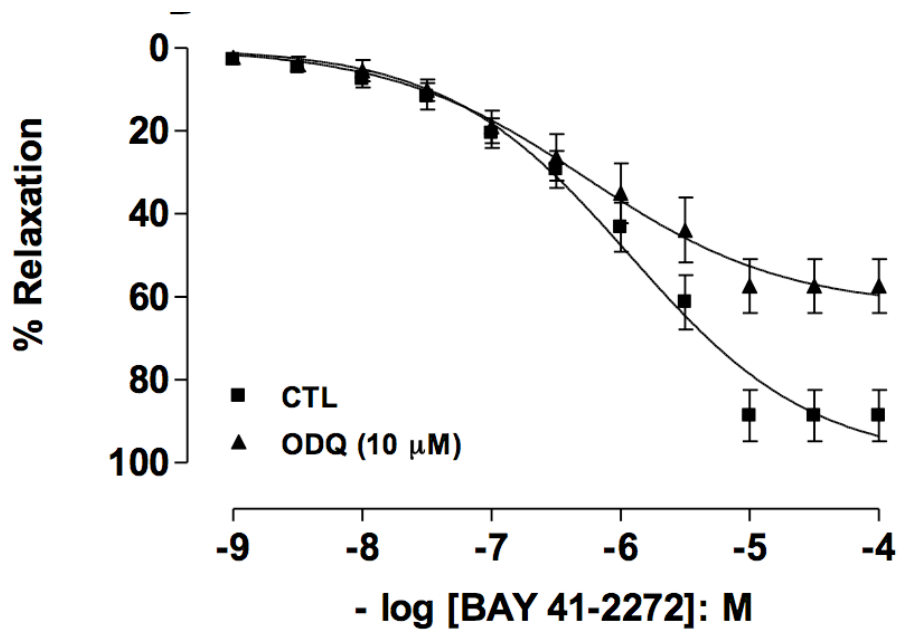
4.1 O relaxamento do BAY 41-2272 em segmento isolado de ureter humano é parcialmente dependente da via NO/GCs/PDE5

O KCl (80mM) foi capaz de induzir contração sustentada gerando uma força contrátil de $10,3 \pm 1,2$ mN. A adição do inibidor da NOS (L-NAME, 100 μ M, Figura 10A) e do ODQ (10 μ M, Figura 10B) reduziu o relaxamento máximo induzido pelo BAY 41-2272 ($E_{\text{máx}}$) em 21% (Curva CTL 87 ± 7 versus L-NAME $68 \pm 6\%$, $n=8$, $P=0,03$) e 44% (Curva CTL $97 \pm 6\%$ versus ODQ $53 \pm 6\%$, $n=5$, $P=0,006$), respectivamente, sem alteração dos valores de potência (pEC_{50}). Por outro lado, a pré-incubação do inibidor da PDE5, sildenafil (100 nM, Figura 10C) potencializou (curva CTL $5,82 \pm 0,12$ versus sildenafil $6,39 \pm 0,10$, $n=6$, $P= 0,002$) o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272, sem alterar os valores de $E_{\text{máx}}$.

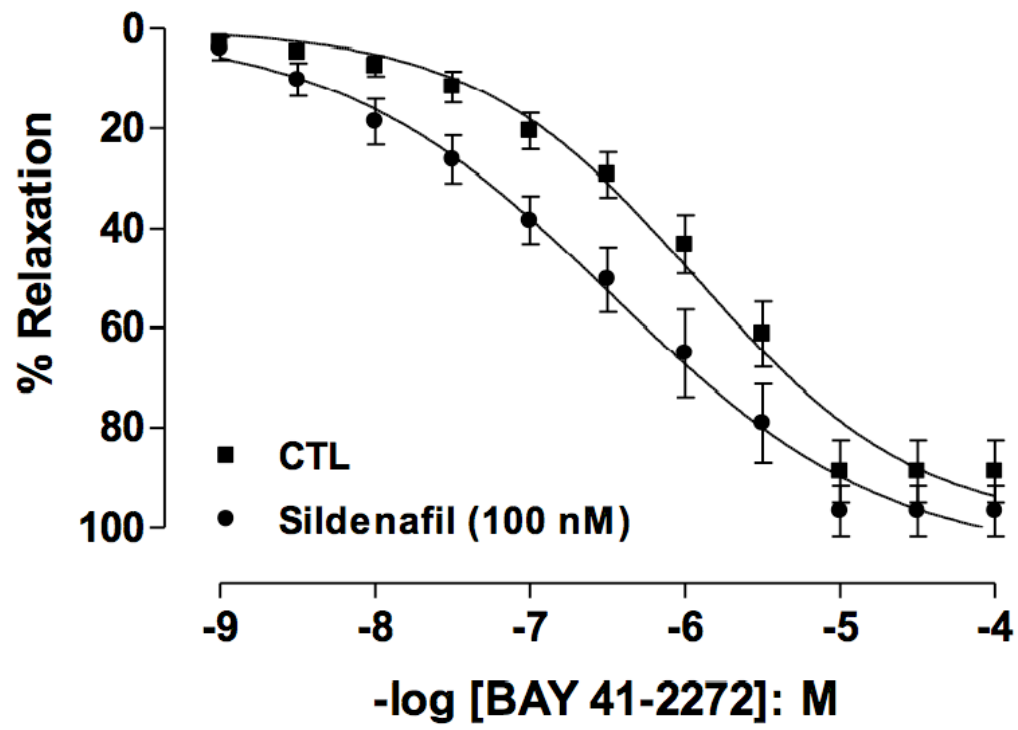
O doador de NO nitroprussiato de sódio (SNP) produziu relaxamento concentração dependente (pEC_{50} : $5,96 \pm 0,08$ e E_{max} : $82 \pm 6\%$, $n=5$) que foi significativamente potencializado (pEC_{50} : $6,45 \pm 0,10$, $P=0,007$ e E_{max} : $70 \pm 6\%$, $n=5$, $p>0.24$) na presença de BAY 41-2272 (1 μ M, Figura 10D).



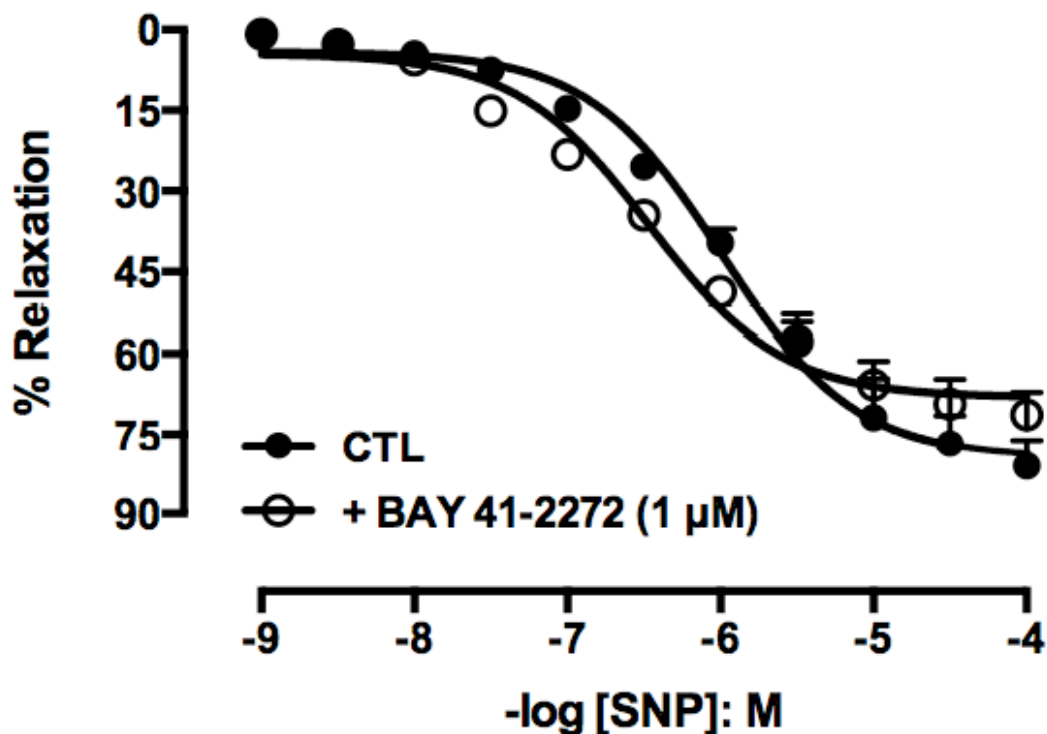
A



B

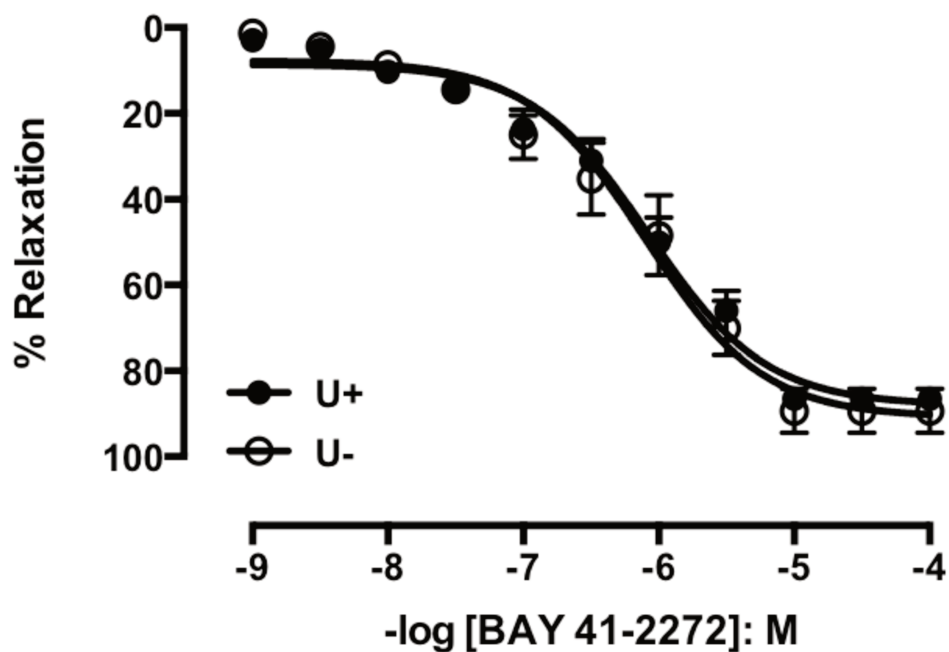


C

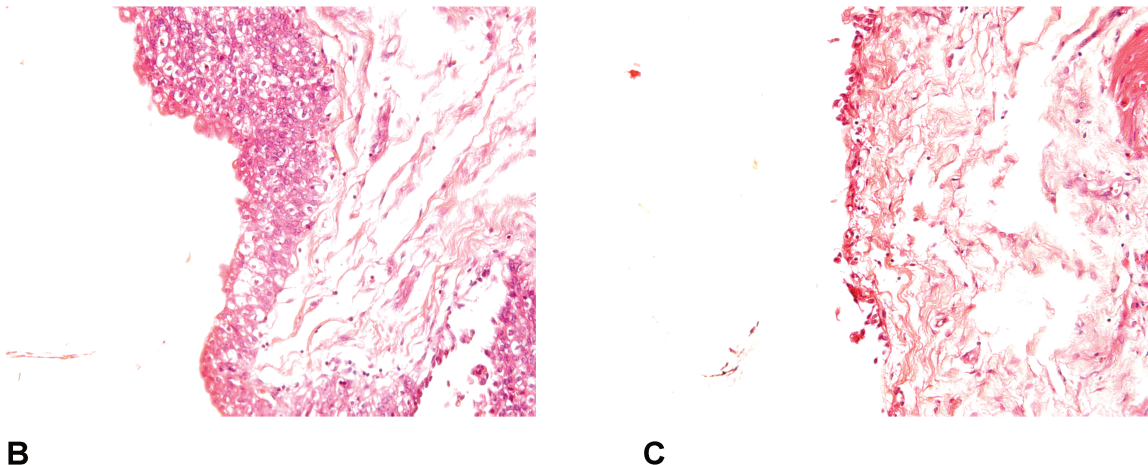


D Figura 12. Relaxamento induzido pelo estimulador da Guanilato Ciclase (GCs), BAY 41-2272 (0,001-100 μ M) em tecidos pré contraídos com KCl (80nM) na ausência (controle [CTL]) e presença de inibidores de (A) sintase do óxido nítrico (N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester [L-NAME], 100 μ M, n=8), (B) guanilato ciclase solúvel (ODQ, 10 μ M, n=5) e (C) fosfodiesterase tipo 5 (sildenafil, 100nM, n=6). (D) Efeito do BAY 41-2272 (1 μ M) no relaxamento induzido pelo doador de óxido nítrico Nitroprussiato de sódio (SNP, 0,001-100 μ M, n=5). Dados apresentados como média \pm desvio padrão da média.

A ausência de urotélio (pEC_{50} : $6,09 \pm 0,10$, E_{max} : $89 \pm 5\%$, $n=5$) não interferiu nos parâmetros farmacológicos do BAY 41-2272 em comparação aos tecidos com urotélio (pEC_{50} : $6,07 \pm 0,06$, E_{max} : $86 \pm 2\%$, $n=5$, $P>0,05$) (Figura 11 A-C). A amplitude de contração ao KCl (80 mM) foi semelhante nos tecidos com (U+) e sem urotélio (U-) sugerindo a integridade da musculatura lisa.



A



B **C**

Figura 13. (A) Curva concentração resposta ao BAY 41-2272 (0,001-100 μ M) na presença (U+) e na ausência (U-) da camada urotelial. Os dados representam a média \pm EPM, n=5. As figuras (B) e (C) mostram cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina mostrando a presença (U⁺) e ausência (U⁻) do urotélio, respectivamente.

Por outro lado, o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 não parece envolver a ativação dos canais de potássio, uma vez que a adição prévia do inibidor não seletivo de canais de potássio ativados por voltagem tetraetilamônio (TEA, 1 mM) ou do bloqueador seletivo dos canais de potássio ativados por ATP (glibenclamida 10 μ M) não alteraram os parâmetros das curvas controle (CTL 5,92 \pm 0,09 e 83 \pm 6% versus TEA 6,18 \pm 0,11 e 73 \pm 6%, n=6, P>0,05; CTL 5,92 \pm 0,06 e 90 \pm 2% versus glibenclamida 6,21 \pm 0,08 e 81 \pm 5%, n=5, P>0,05; figura 14).

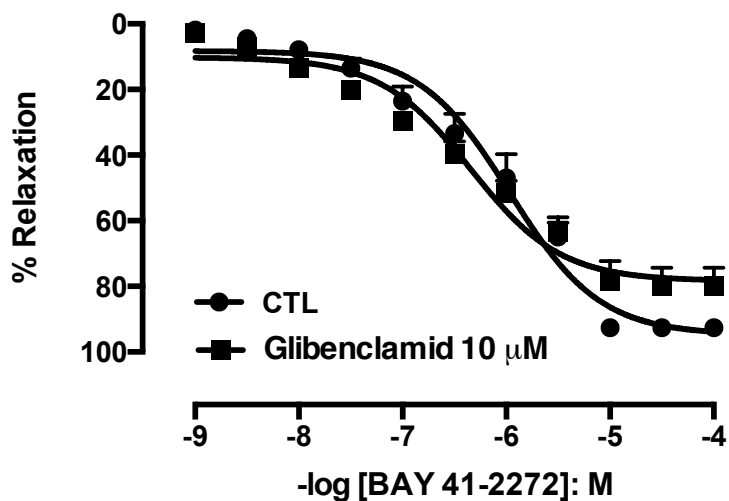
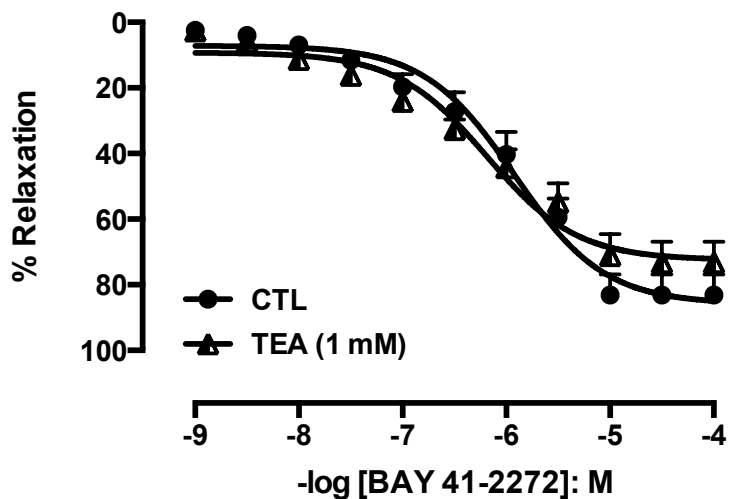
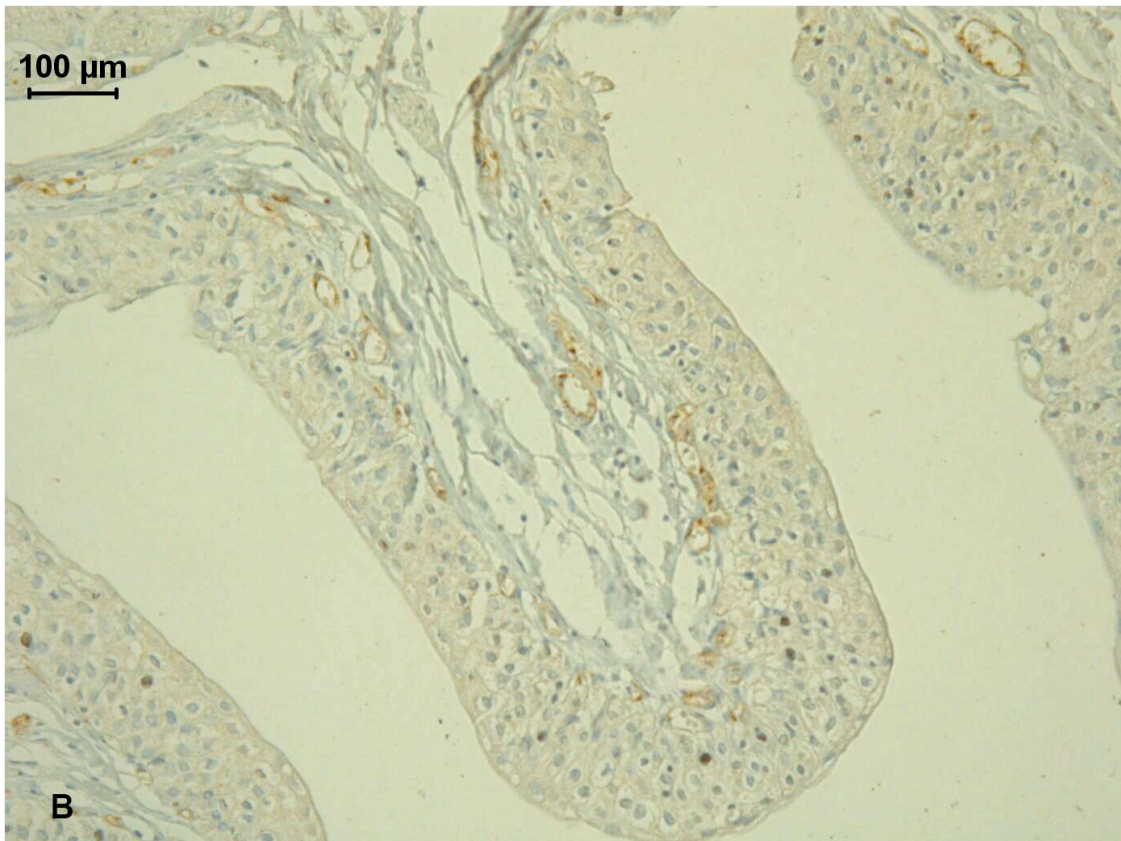
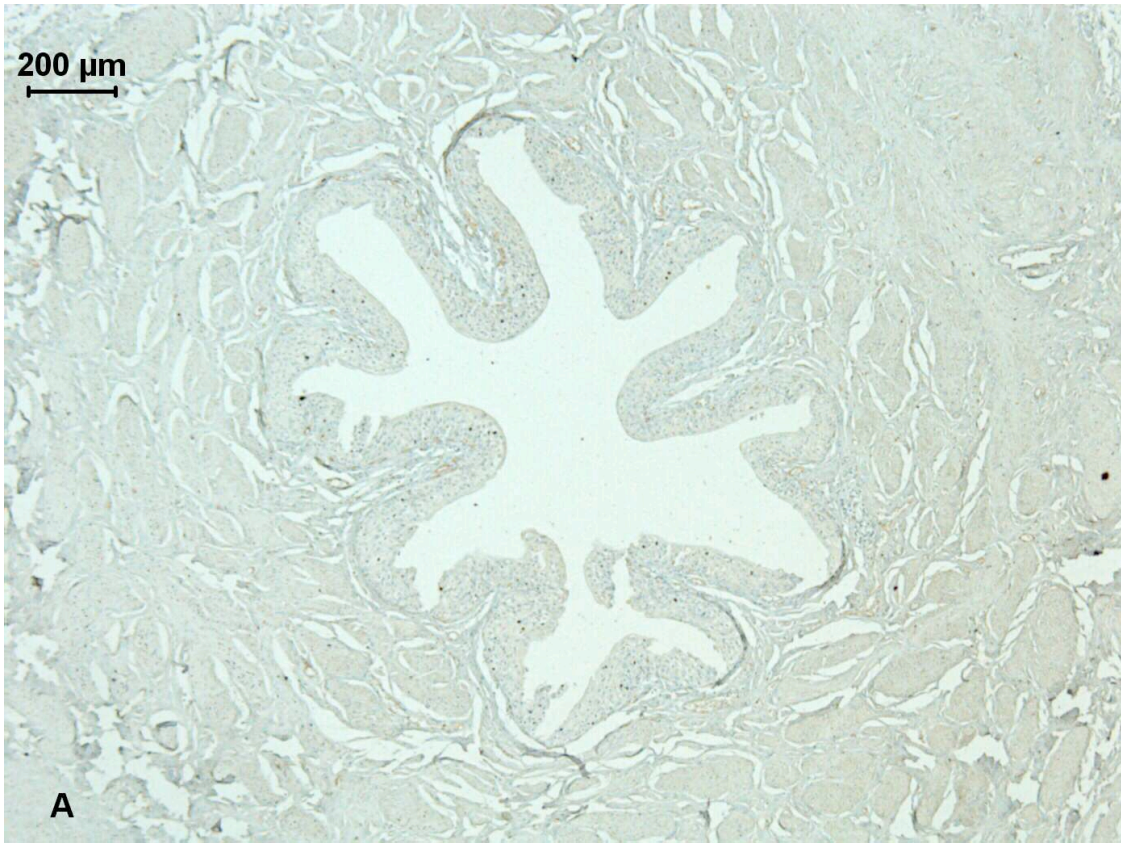


Figura 14. Curva concentração resposta ao BAY 41-2272 (0,001 – 100 μ M) na ausência (controle [CTL]) e na presença do tetraetilamônio (TEA, 1 mM, n=6) e do bloqueador seletivo dos canais de potássio ativados por ATP (K_{ATP} , glibenclamida, 10 μ M, n=6). Os dados representam a média \pm EPM.

4.2 Avaliação da expressão das enzimas da via NO-GMPc-PDE5 em ureter isolado de humano

A imunorreatividade (IR) indicou a presença de eNOS no endotélio de estruturas vasculares do ureter (Figuras 13A e B) enquanto a IR nNOS foi observada fortemente no urotélio e estruturas neurais, e de forma menos intensa na camada de músculo liso (Figuras 13C e D). A IR GCs foi demonstrada tanto na musculatura lisa quanto no urotélio (Figura 13E). Finalmente, a IR PDE5 foi expressa exclusivamente na musculatura lisa (13F). Nenhuma reatividade foi observada quando o anticorpo primário foi omitido (controle negativo, Figura 13G).





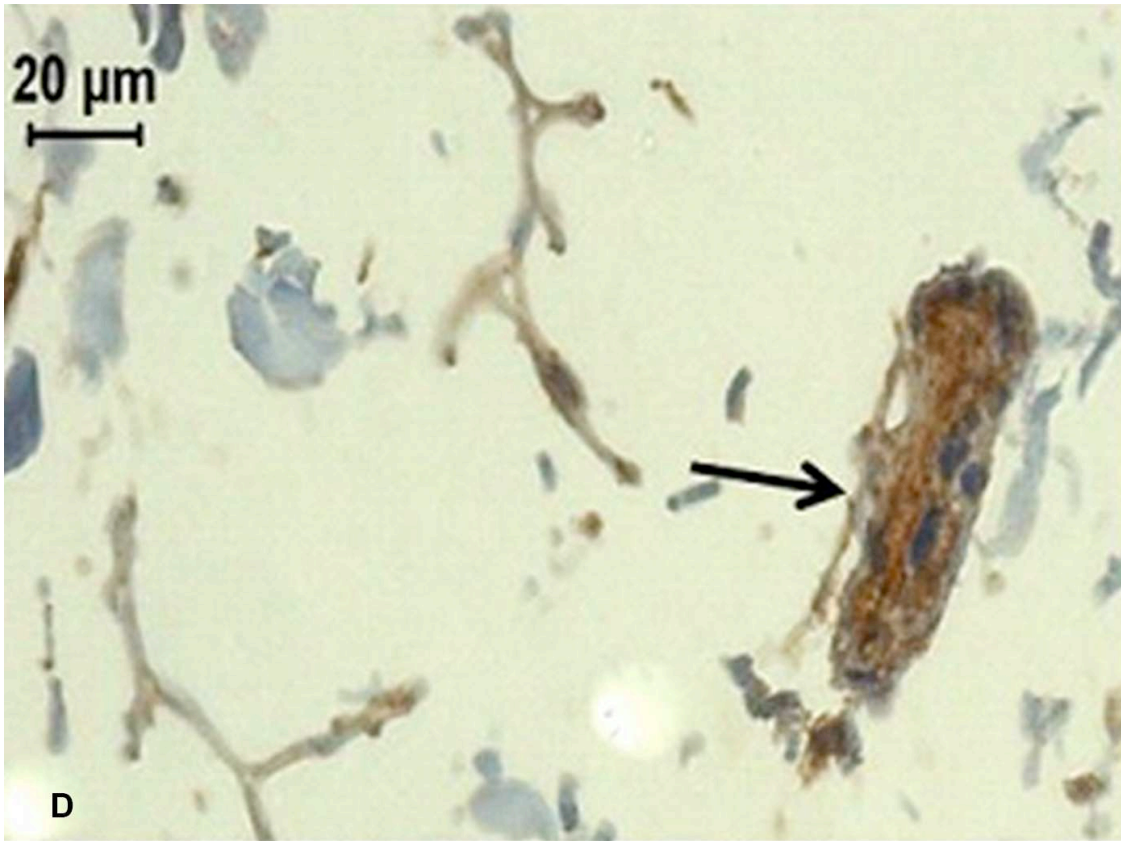






Figura 13. Imunorreatividade (IR) em ureter isolado de humano demonstra a presença de eNOS (**A**, aumento 50x) no endotélio vascular (**B**, aumento 200x), a presença de nNOS no urotélio e com menor intensidade na musculatura lisa (**C**, aumento 50x), e em estruturas nervosas (**D**, aumento 400x). A IR GCs é demonstrada no urotélio e músculo liso (**E**, aumento 50x). IR PDE5 é expressa somente na musculatura lisa (**F**, aumento 50x). Finalmente, nenhuma IR foi observada quando omitiu-se o anticorpo primário (**G**, aumento 50x).

5. Discussão

A doença calculosa do trato urinário possui importância não somente pela sua epidemiologia com alta prevalência e incidência²⁷, mas também pelo crescente peso global que determina no aspecto financeiro dos sistemas de saúde, especialmente quando requerem intervenção cirúrgica⁴². Estudos recentes com alto nível de evidência têm questionado a real eficácia da terapia medicamentosa expulsiva atual, que baseia-se principalmente no uso de agentes alfa-bloqueadores, no que tange à capacidade de aumentar a chance de expulsão do cálculo ureteral^{48,49}. Agentes anti-inflamatórios, por sua vez, não facilitam a eliminação do cálculo, e trazem riscos de doença péptica e insuficiência renal⁹¹.

Desta forma, faz-se necessária a padronização de um modelo experimental que possibilite a avaliação de novas linhas de terapia voltadas para este fim, e a perseverança na busca por novos agentes eficazes na abreviação do tempo de eliminação de cálculos no ureter.

A mensuração da atividade contrátil ureteral *in vivo* em resposta à aplicação destes agentes farmacológicos seria o modelo ideal. No entanto, a necessidade de cateterização do ureter *in vivo* acarreta problemas como inconstância nas medições; alto índice de desconforto dos pacientes, requerendo remoção precoce do cateter; influência de agentes anestésicos e da própria presença do cateter ureteral no desencadeamento das contrações espontâneas; e, finalmente, a

inexistência de um cateter transdutor de pressão ideal tornam a monitorização da atividade ureteral contrátil *in vivo* impraticável⁹².

Os modelos descritos *in vitro* de contratilidade ureteral que utilizam segmentos ureterais de humanos são escassos, tendo em vista a dificuldade em conseguir-se este tipo de tecido para pesquisa. Todos, no entanto, pecam especialmente pela ausência de padronização do modelo, uma vez que mesclam espécimes provindos de nefrectomias em doador renal vivo ou para tratamento de câncer renal ^{21,54,55,57} (tornando inacurada a seleção de segmento proximal x médio), segmento distal em casos de reimplante ureteral e cistectomia (onde não se descreve com exatidão qual margem ureteral é deixada no espécime patológico, além do risco possível de doença neoplásica urotelial)^{53,57} e casos de correção de estenose ureteral e anomalias da junção ureteropielica (que sabidamente podem apresentar alterações estruturais patológicas do ureter)^{51,54}. Descrevemos o primeiro modelo utilizando segmentos ureterais distais de doadores falecidos de múltiplos órgãos, padronizados em 2 cm acima da inserção do ureter na bexiga (junção ureterovesical), similar ao utilizado por Troxel e cols.⁹³ em modelo suíno.

Optamos pelo uso de segmentos ureterais distais, pois sua retirada não compromete o ureter do órgão a ser implantado, que necessita ser longo a fim de facilitar o reimplante na bexiga do paciente receptor. Além disso, esta porção do ureter é de interesse clínico, uma vez que a maioria dos estudos que avaliam a facilitação de eliminação de cálculos ureterais focam este segmento⁹⁴⁻⁹⁷.

No trabalho de Jerde e cols.⁹⁸ compararam-se diferentes formatos de corte de segmentos ureterais suínos a fim de determinar possíveis diferenças na

resposta contrátil. A musculatura ureteral sempre foi considerada como uma camada única, estruturada em formato de uma hélice justa, tornando-se mais longitudinal conforme o ureter insere-se na bexiga⁹⁹. Mais recentemente, tem-se sugerido a disposição da musculatura como uma estrutura em malha com fibras musculares orientadas em diversas direções^{100,101} ou ainda, em duas camadas, uma externa circular e outra interna disposta longitudinalmente. Baseado nestes achados, Morita e cols. usaram segmentos cortados em espiral em seus experimentos com segmentos ureterais suspensos em banhos sugerindo que este formato preservaria fibras musculares mais contínuas e portanto poderiam gerar contrações espontâneas maiores¹⁰². Jerde e cols. compararam cortes de ureter suíno em espiral, longitudinal com anel fechado, longitudinal com anel aberto e transversal com anel fechado, através de curva concentração-resposta ao carbacol e estimulação elétrica. Todas as suspensões mostraram-se adequadas para análise da resposta ureteral aos variados estímulos. Além disso, não houve diferença na sensibilidade, resposta contrátil máxima ou níveis de contratilidade espontânea entre os diferentes cortes⁹⁸. Em nosso modelo, optamos pelo uso do segmento longitudinal aberto, obtendo curvas adequadas de contração e relaxamento.

O tempo decorrido da captação de órgãos até o uso dos segmentos ureterais não parece ter influenciado na ausência de contratilidade espontânea dos segmentos ureterais, visto que em nenhum deles (6 a 24 horas) detectamos esta atividade, fato já observado por outros pesquisadores^{21,103}. Porém, a pré-contracção com KCl 80 mM assegurou a viabilidade de todos os espécimes antes de seu uso experimental.

O uso do DMSO como veículo de outros agentes farmacológicos insolúveis em água já foi previamente descrito e mostrou-se adequado para este fim^{50,53,104}. A concentração de 0,3% (0,04M) mostrou-se inerte para o tecido ureteral, conforme estudos preliminares (dados não demonstrados).

Nosso modelo apresenta algumas limitações que merecem destaque: dificuldade da obtenção de tecido humano, restrita a centros de transplante de órgãos, o que dificulta sua universalização. Como todos os modelos *in vitro*, o nosso também não é capaz de estimar o impacto dos fármacos na peristalse fisiológica, não somente pela ausência de contratilidade espontânea, mas também pelo fato de não utilizarmos ureteres íntegros, mas segmentos destes. Além disso, o estabelecimento de doses ideais de fármacos *in vitro* pode não retratar de forma fiel a dosagem adequada sérica e urinária dos mesmos *in vivo*, além de não poder avaliar a possível influência do fluxo urinário intraluminal.

Trabalhos recentes têm despertado o interesse crescente na via nitrérgica e no uso de antiespasmódicos como possíveis facilitadores da expulsão de cálculos ureterais pelo relaxamento da musculatura lisa^{51,105,106}.

O NO é uma molécula sinalizadora chave e está envolvida numa série de processos biológicos e fisiológicos nos mamíferos. Há vasta evidência experimental e clínica que a redução na biodisponibilidade ou na responsividade ao NO endógeno relaciona-se ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, pulmonares, endoteliais, renais e hepáticas, assim como a disfunção erétil. Algumas destas condições já são tratadas na atualidade com nitratos orgânicos (como o gliceril trinitrato), doadores de NO e outras drogas nitrovasodilatadoras que liberam NO por decomposição espontânea ou bioconversão para ativar a

GCs. No entanto, a ação destes agentes é limitada pela imprevisibilidade da resposta devido ao biometabolismo insuficiente, desenvolvimento de tolerância após administração prolongada e interações inespecíficas do NO com outras moléculas biológicas⁶¹. Compostos que ativam a GCs de uma forma independente do NO podem, assim, oferecer vantagens terapêuticas expressivas⁷⁶. De fato, os estimuladores e ativadores da GCs independentes do NO representam uma das maiores inovações dentre as descobertas farmacológicas nos últimos tempos.

Este é o primeiro estudo a explorar de forma funcional e imunohistoquímica o papel do BAY 41-2272, estimulador seletivo de GCs, em ureter isolado de humano.

O BAY 41-2272 induziu relaxamento de uma maneira concentração-dependente e sua resposta foi reduzida por inibidores da GCs e da NOS, sugerindo que o BAY 41-2272 estimula a GCs de forma direta, mas também sinérgica com o NO. Apesar de ambas GCs e PDE5 estarem expressas na camada urotelial, podemos especular que a fonte principal de GMPc venha da GCs do músculo liso, uma vez que a remoção do urotélio não interferiu no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272. Sabe-se que a função do urotélio não se restringe ao papel de barreira funcional protetora da parede vesical ao conteúdo luminal. Quando o urotélio vesical é tensionado, NO, trifosfato de Adenosina (ATP) e até acetilcolina (Ach) são liberados do espaço suburotelial^{107,108}. Na junção uretero-vesical, fibras nervosas contendo NOS foram observadas em troncos nervosos extramurais e ao longo da musculatura lisa, apesar de nenhum marcador imunohistoquímico de NOS ter sido documentado¹⁰⁹. Axônios com positividade para NOS também foram detectados na camadas musculares do ureter humano⁹⁰.

Neste estudo, a presença de eNOS foi demonstrada somente na camada endotelial de estruturas vasculares do ureter, enquanto que a nNOS apresentou presença intensa na camada urotelial e células nervosas, e foi fracamente identificada no músculo liso. A remoção do urotélio não alterou o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272, sugerindo que no ureter ele pode não ser uma fonte tão determinante de substâncias contráteis e/ou relaxantes, como o é na bexiga.

A presença de nNOS na musculatura lisa já foi anteriormente demonstrada na artéria mesentérica de ratos por Lekontseva et al.¹¹⁰ No entanto, o significado desta expressão como fonte importante de NO no ureter ainda não é claro.

Não obstante o NO seja um neurotransmissor inibitório primordial na via não-adrenérgica não-colinérgica (NANC) causando relaxamento nos trato urinários superior e inferior, não há estudos clínicos de substâncias que agem na via NO-GMPc-PDE5 objetivando facilitar a eliminação de cálculos ureterais. No trato urinário superior, Gratzke e cols. demonstraram a capacidade relaxante dos inibidores de PDE5 e do doador de NO nitroprussiato de sódio (SNP) de maneira concentração-dependente, em modelo utilizando segmentos de ureter humano²¹.

As vantagens de agentes que agem na via do NO já foram constatadas tanto em estado de saúde quanto em situações patológicas. A administração sublingual de dinitrato de isossorbida em voluntários sadios, melhorou parâmetros urodinâmicos, reduzindo a pressão detrusora média de micção e a pressão detrusora média no fluxo máximo¹¹¹. A administração diária de tadalafila na dose de 5 mg por 12 semanas em homens com hiperplasia benigna da próstata (HBP) também melhorou objetivamente o escore internacional de sintomas prostáticos (IPSS) quando comparada ao uso de placebo¹¹². Os compostos que agem

diretamente na GCs podem ser divididos em duas categorias: estimuladores ou ativadores da GCs. Os primeiros são dependentes da presença de um grupo protético reduzido; já os últimos ativam a GCs de forma preferencial e efetiva, inclusive no seu estado oxidado ou ainda que desprovida do grupamento Heme^{76,113,114}. O BAY 41-2272 é um estimulador da GCs que age através do mecanismo heme-dependente e NO-independente, tendo em vista que a remoção da unidade sintética ou sua oxidação por ODQ reduziram drasticamente o relaxamento ureteral induzido por BAY 41-2272 em musculatura lisa tanto vascular quanto não vascular⁸³⁻⁸⁷. Além disso, o tratamento a longo prazo com BAY 41-2272 em modelo de ratos deficientes em NO mostrou significância clínica, melhorando a pressão detrusora basal e máxima⁸⁸ e prevenindo os relaxamentos indesejáveis do corpo cavernoso¹¹⁵. Isto sugere um papel promissor para este composto no tratamento da Síndrome da Bexiga Hiperativa e da disfunção erétil. No presente estudo, o relaxamento provocado pelo doador de óxido nítrico SNP foi potencializado na presença de BAY 41-2272. Apesar do BAY 41-2272 ser considerado uma classe de drogas NO-independente, estudos preliminares em músculo liso de estruturas vasculares^{84,85} e não-vasculares^{85,86} mostraram que o inibidor de NOS L-NAME e o agente quelante de NO (carboxi-PTIO, 100µM) provocaram um deslocamento da curva de relaxamento do BAY 41-2272 para a direita, sugerindo que o NO endógeno contribui para este processo. Em plaquetas, o BAY 41-2272 reduziu a resposta agregante provocada pelo difosfato de adenosina e esta resposta foi potencializada após incubação com doadores de NO¹¹⁶. A partir destes estudos, entretanto, não se pode afirmar de forma clara se o

BAY 41-2272 promove o aumento da liberação do NO ou se ele interage com o NO derivado do endotélio para provocar o relaxamento.

Nossos achados demonstram que a GCs não apenas é expressa no músculo liso do ureter, mas também é funcionalmente ativa, levando a um relaxamento concentração-dependente do ureter isolado. A incubação prévia com o ODQ (antagonista da GCs) reduziu este relaxamento de forma significativa; enquanto que a incubação com o inibidor de PDE5 (sildenafil 100nM) potencializou a resposta, comprovando o papel fundamental do GMPc neste circuito.

Muitos processos fisiológicos dependentes do Ca^{+2} são antagonizados pelo GMPc, uma vez que este regula a atividade de quinases GMPc-dependentes, fosfodiesterases reguladas por GMPc e portais de íons. Estudo preliminar demonstrou que o dibutilil GMPc bloqueou o aumento do cálcio intracelular induzido pela cafeína em células de músculo liso isoladas de traquéia bovina, reduzindo assim a $[Ca^{+2}]$ no retículo sarcoplasmático¹¹⁷. A adição cumulativa de cloreto de cálcio (0,01 – 30mM) na presença de níveis despolarizantes de potássio é comumente usada para avaliar as respostas contráteis dependentes do influxo de cálcio. Na artéria mesentérica de ratos⁸⁴ e bexiga de coelhos¹¹⁸, a adição do BAY 41-2272 reduziu a contração provocada pelo cloreto de cálcio e esta resposta não foi alterada por incubação prévia com ODQ. Assim, no presente estudo, especula-se que o relaxamento residual do BAY 41-2272 na presença do ODQ possa envolver a inibição do influxo de Ca^{+2} .

A presença da GCs no urotélio já havia sido documentada previamente em tecido vesical de humanos¹¹⁹ e suínos¹²⁰. Porém, até o momento, nenhum estudo

havia documentado a existência da PDE5 no ureter humano. Apesar de estudos anteriores terem demonstrado a presença da PDE4 e da PDE9¹¹⁹ no urotélio de bexiga humana, conseguimos demonstrar a expressão da PDE5 exclusivamente na musculatura lisa do ureter de humanos por meio de imunohistoquímica.

A despeito da cromacalina (abridor de canais de potássio) ter sido descrita como indutora do relaxamento ureteral humano, sugerindo um papel importante destes canais na fisiologia ureteral¹²⁰, no presente estudo o relaxamento provocado pelo BAY 41-2272 não sofreu influência dos bloqueadores de canais de potássio, o que torna questionável o papel do íon K⁺ neste processo.

6. Conclusão

1. O relaxamento produzido pelo BAY 41-2272 envolve a via do NO-GMPc-PDE5.
2. O relaxamento produzido pelo BAY 41-2272 não parece envolver a participação da ativação de canais de potássio.
3. O urotélio não participa no relaxamento ureteral induzido pelo BAY 41-2272.
4. A enzima sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) é expressa somente no endotélio vascular do ureter; a neuronal (nNOS) é expressa no urotélio, músculo liso e estruturas nervosas; a guanilato ciclase solúvel (GCs) é expressa no urotélio e músculo liso; e, finalmente, a fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) é expressa exclusivamente na musculatura lisa.

7. Referências Bibliográficas

1. Frober R. Surgical Atlas: surgical anatomy of the ureter. *BJU Int* 2007; 100: 949-65.
2. Anderson JK, Kabalin JN, Cadeddu JA. Surgical anatomy of the retroperitoneum, adrenals, kidneys, and ureters. In: *Campbell's Urology – 9th ed.* / editors: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. Ed. Elsevier, Philadelphia 2007.
3. Wharton J, Polak JM, Probert L, De Mey J, Mcgregor GP, Bryant MG, Bloom SR. Peptide containing nerves in the ureter of the guinea-pig and cat. *Neuroscience* 1981; 6(5):969-82.
4. Rolle U, Brylla E, Tillig B, Chertin B, Cascio S, Puri P. Demonstration of intrinsic innervation of the guinea pig upper urinary tract using whole-mount preparation. *Neurourol Urodyn* 2008; 27(4):341-7.
5. Tomiyama Y, Wanaio I, Yamazaki Y, Kojima M, Shibata N. Effects of cholinergic drugs on ureteral function in anesthetized dogs. *J Urol* 2004; 172: 1520-3.
6. Sakamoto K, Suri D, Rajasekaran M. Characterization of Muscarinic Receptor Subtypes in human Ureter. *J Endourol* 2006; 20(11): 939-42.
7. Morita T, Suzuki T, Kondo S, Tsuchida S. Effects of noradrenaline and acetylcholine on ureteral peristalsis. *Tohoku J Exp Med* 1983; 141(4):489-90.

8. Deane RF. Functional studies of the ureter: its behaviour in the domestic pig (*Sus scrofa domestica*) as recorded by the technique of Trendelenburg. *Br J Urol* 1967; 39(1):31-7.
9. Danuser H, Weiss R, Abel D, Walter B, Scholtysik G, Mettler D, Studer UE. Systemic and topical drug administration in the pig ureter: effect of phosphodiesterase inhibitors alpha1, beta and beta2-adrenergic receptor agonists and antagonists on the frequency and amplitude of ureteral contractions. *J Urol* 2001; 166(2):714-20.
10. Mcleod DG, Reynolds DG, Swan KG. Adrenergic mechanisms in the canine ureter. *Am J Physiol* 1973; 224(5):1054-8.
11. Kondo S, Morita T, Saeki H, Tsuchida S. Effects of autonomic drugs on in vivo recording of electromyograms of canine renal pelvis and ureter. *Urol Int* 1985; 40(5):260-6.
12. Hoyes AD. Fine structure and response to capsaicin of primary afferent nociceptive axons in the rat and guinea-pig ureter. In: Hamman W, Iggo A (eds). *Sensory receptor mechanisms*. World Scientific Publ, Singapore, pp. 25-34.
13. Cervero F, Sann H. Mechanically evoked responses of afferent fibres innervating the guinea-pig's ureter: an in vitro study. *J Physiol* 1989; 412: 245-66.
14. Sann H, Cervero F. Afferent innervation of the guinea-pig's ureter. *Agents Actions* 1988; 25: 243-45.
15. Su HC, Wharton J, Polak JM, Mulderry PK, Ghatei MA, Gibson SJ, Terenghi G, Morrison JF, Ballesta J, Bloom SR. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in afferent neurons supplying

- the urinary tract: combined retrograde tracing and immunohistochemistry. *Neuroscience* 1986; 18(3):727- 47.
16. Semenenko FM, Cervero F. Afferent fibres from the guinea-pig ureter: size and peptide content of the dorsal root ganglion cells of origin. *Neuroscience* 1992; 47(1):197- 201.
 17. Shokeir AA. *Curr Opin Urol* 2002; 12: 263-9.
 18. Marfurt CF, Echtenkamp SF. Sensory innervation of the rat kidney and ureter as revealed by the anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP) from dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 1991; 311(3):389- 404.
 19. Mirabella N, Germano G, Langella M, Lamanna C, Paino G. The distribution and colocalisation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced-diaphorase (NADPH-d)/nitric oxide synthase (NOS)-containing neurons in the innervation of the duck ureter. *Anat Embryol* 2000; 202: 291-301.
 20. Iselin CE, Alm P, Schaad NC, Larsson B, Graber P, Andersson KE. Nitric oxide inhibits contraction of isolated pig ureteral smooth muscle. *J Urol* 1996; 155(2):763-7.
 21. Gratzke C, Ückert S, Kedia G, Reich O, Schlenker B, Seitz M, Becker AJ, Stief CG. In vitro effects of PDE5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil on isolated human ureteral smooth muscle: a basic research approach. *Urol Res* 2007; 35: 49-54.
 22. Mensah-Dwumah M, Djurhuus JC, Constantinou CE. Hydronephrotic alterations in calyceal and renal pelvic pacemaker function of the in vitro pyeloureteral system. *Urol Int* 1980; 35(3):161-6.

23. Lang RJ, Takano H, Davidson ME, Suzuki H, Klemm MF. Characterization of the spontaneous electrical and contractile activity of smooth muscle cells in the rat upper urinary tract. *J Urol* 2001; 166(1):329-34.
24. Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA et al. Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976-1994. *Kidney Int* 2003; 63(5): 1817- 23.
25. Lieske JC, Pena de la Vega LS, Slezak JM, et al. Renal stone epidemiology in Rochester, Minnesota: an update. *Kidney Int* 2006; 69(4): 760-4.
26. Curhan GC. Epidemiology of Stone Disease. *Urol Clin N Am* 2007; 34: 287- 93.
27. Moe OW. Kidney Stones: pathophysiology and medical management. *Lancet* 2006; 367: 333-44.
28. Johnson CM, Wilson DM, O'Fallon WM, et al. Renal stone epidemiology: a 25- year study in Rochester, Minnesota. *Kidney Int* 1979; 16(5): 524- 31.
29. Trinchieri A, Ostini F, Nespola R, Rovera F, Zanetti G. A prospective study of recurrence rate and risk factors for recurrence after a first renal stone. *J Urol* 1999; 162: 27-30.
30. Sutherland JW, Parks JH, Coe FL. Recurrence after a single renal stone in community practice. *Miner Electrolyte Metab* 1985; 11: 267-9.
31. Miyaoka R, Ortiz-Alvarado O, Kriedberg C, Alanee S, Chotikawanich E, Monga M. Correlation between stress and kidney stone disease. *J Endourol* 2012; 26: 551-5.

32. Parmar MS. Kidney stones. BMJ 2004; 328: 1420-4.
33. Drach GW. Evolution of shock wave lithotripsy during its first decade. J Urol 1992; 148(3 Pt 2):1063, 1992.
34. Carpentier X, Traxer O, Lechevallier E, Saussine C. Physiopathology of acute renal colic. Prog Urol 2008; 18(12):844-8.
35. Preminger GM, Tiselius HG, Assimos DG, Alken P, Buck C, Gallucci M, et al. 2007 Guideline for the Management of Ureteral Calculi. J Urol 2007; 178: 2418- 34.
36. Ueno A, Kawamura T, Ogawa A, et al. Relation of spontaneous passage of ureteral calculi to size. Urology 1977; 10: 544-6.
37. Kinder RB, Osborn DE, Flynn JT, et al. Ureteroscopy and ureteric calculi: How useful? Br J Urol 1987; 60: 506-8.
38. Miller OF, Kane CJ. Time to stone passage for observed ureteral calculi: a guide for patient education. J Urol 1999; 162: 688-90.
39. Vaughan ED Jr., Gillenwater JY. Recovery following complete chronic unilateral ureteral occlusion: functional, radiographic and pathologic alterations. J Urol 1971; 106: 27-35.
40. Teichman JMH. Acute renal colic from ureteral calculus. N Engl J Med 2004; 350:684-93.
41. Jo MK, Kwak C, Park SK, Yoo KY, Kang DH, Kim HH, et al. Prevalence and epidemiological characteristics of urolithiasis for adults aged 40-79 in Seoul, Korea. Korean J Urol 2000; 41: 367-74.
42. Lotan Y and Pearle M. Cost-Effectiveness of Primary Prevention Strategies for Nephrolithiasis. J Urol 2011; 186: 550-55.

43. Bozler E. The activity of the pacemaker previous to the discharge of a muscular impulse. *Am J Physiol* 1942a; 136: 543-52.
44. Lotan Y, Gettman MT, Roehrborn CG, et al. Management of ureteral calculi: a cost comparison decision making analysis. *J Urol* 2002; 167: 1621-29.
45. Sivula A, Lehtonen T. Spontaneous passage of artificial concretions applied in the rabbit ureter. *Scand J urol Nephrol* 1967; 1: 259-63.
46. Hollinsworth JM, Rogers MA, Kaufman SR, et al. Medical therapy to facilitate urinary stone passage: a meta-analysis. *Lancet* 2006; 368: 1171-9.
47. Singh A, Alter HJ, Littlepage A. A systematic review of medical therapy to facilitate passage of ureteral calculi. *Ann Emerg Med* 2007; 50: 552-63.
48. Hermanns T, Sauermann P, Rufibach K, Frauenfelder T, Sulser T, Strebel RT. Is there a role for tamsulosin in the treatment of distal ureteral stones of 7 mm or less? Results of a randomized, double-blind, placebo controlled-trial. *Eur Urol* 2009; 56: 407-12.
49. Pedro RN, Hinck B, Hendlin K, Feia K, Canales BK, Monga M. Alfuzosin stone expulsion therapy for distal ureteral calculi: a double blind, placebo-controlled study. *J Urol* 2008; 179: 2244-47.
50. Nakada SY, Coyle TLC, Ankem MK, Moon TD, Jerde TJ. Doxazosin relaxes ureteral smooth muscle and inhibits epinephrine-induced ureteral contractility in vitro. *Urology* 2007; 70: 817-21.

51. Iversen HH, Ehrén I, Gustafsson LE, Adolfsson J, Wiklund NP. Modulation of smooth muscle activity by nitric oxide in the human upper urinary tract. *Urol Res* 1995; 23: 391-4.
52. Kühn R, Ückert S, Stief CG, Truss MC, Lietz B, Bischoff, Schramm M, Jonas U. Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide-dependent pathways. *Urol Res* 2000; 28: 110-115.
53. Nakada SY, Jerde TJ, Bjorling DE, Saban R. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors reduce ureteral contraction in vitro: a better alternative for renal colic? *J Urol* 2000; 163: 607-12.
54. Nakada SY, Jerde TJ, Bjorling DE, Saban R. In vitro contractile effects of neurokinin receptor blockade in the human ureter. *J Urol* 2001; 156: 1534-38.
55. Rajpathy J, Aswathaman K, Sinha M, Subramani S, Gopalakrishnan G, Kekre NS. An *in vitro* study on human ureteric smooth muscle with the α_1 -adrenoceptor subtype blocker, tamsulosin. *BJU Int* 2008; 102(11): 1743-45.
56. Lee SY, Lee MY, Park SH, Kim TH, Moon YT, Han JH, Myung SC. NS-398 (a selective cyclooxygenase-2 inhibitor) decreases agonist-induced contraction of the human ureter via calcium channel inhibition. *J Endourol* 2010; 24:1863-8.
57. Sasaki S, Tomiyama Y, Kobayashi S, Kojima Y, Kubota Y, Kohri K. Characterization of α_1 -adrenoceptors subtypes mediating contraction in human isolated ureters. *Urology* 2011; 77: 762.e13- 762.e17.
58. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21(4): 361-74.

59. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 683-706.
60. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000; 52(3): 375-414.
61. Münzel T, Daiber A, Mülsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res* 2005; 97(7): 618-28.
62. Collier J, Vallance P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10(11):427- 31.
63. Koesling D, Schultz G, Böhme E. Sequence homologies between guanylyl cyclases and structural analogies to other signal-transducing proteins. *FEBS Lett* 1991; 280(2): 301-6.
64. Schulz S, Yuen PS, Garbers DL. The expanding family of guanylyl cyclases. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12(3): 116-20.
65. Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18(12): 484-91.
66. Harteneck C, Koesling D, Söling A, Schultz G, Böhme E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* 1990; 266(1-2): 128-32.
67. Buechler JA, Taylor SS. Differential labeling of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase with a water-soluble carbodiimide: identification of carboxyl groups protected by MgATP and inhibitor peptides. *Biochemistry* 1990; 29(7): 1937-43.

68. Gerzer R, Radany EW, Garbers DL. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 108(2): 678-86.
69. Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, KadowitzPJ, Wolin MS. Activation of purified soluble guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing form of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta* 1982; 718(1): 49-59.
70. Ohlstein EH, Wood KS, Ignarro LJ. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch Biochem Biophys* 1982; 218(1): 187-98.
71. Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994; 33(18): 5636-40.
72. Wedel B, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G, Koesling D. Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91(7): 2592-6.
73. Traylor TG, Sharma VS. Why NO? *Biochemistry* 1992; 31(11):2847- 9.
74. Stone JR, Marletta MA. The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane. *Biochemistry* 1995; 34(50):16397-403.

75. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983; 52(3):352-7.
76. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(9):755-68.
77. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H S AK, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Müller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Müller-Esterl W, Schmidt HH. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest* 2006; 116(9):2552-61.
78. Stasch JP, Dembowsky K, Perzborn E, Stahl E, Schramm M. Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. *Br J Pharmacol* 2002a; 135(2):344-55.
79. Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schröder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 2001; 410(6825):212-5.
80. Stasch JP, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Minuth T, Perzborn E, Schramm M, Straub A. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br J Pharmacol* 2002b; 135(2):333-43.

81. Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiss U, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A, Stasch JP. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol* 2001;1:13.
82. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 9(12):8306-11.
83. Priviero FB, Baracat JS, Teixeira CE, Claudino MA, De Nucci G, Antunes E. Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005;32(9):728-34.
84. Teixeira CE, Priviero FB, Webb RC. Molecular mechanisms underlying rat mesenteric artery vasorelaxation induced by the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulators BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-4-ylamine] and YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole]. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 ; 317(1):258-66.
85. Teixeira CE, Priviero FB, Todd J Jr, Webb RC. Vasorelaxing effect of BAY 41-2272 in rat basilar artery: involvement of cGMP-dependent and independent mechanisms. *Hypertension* 2006; 47(3):596-602.
86. Baracat JS, Teixeira CE, Okuyama CE, Priviero FB, Faro R, Antunes E, De Nucci G. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol*. 2003 Sep 12;477(2):163-9.
87. Báu FR, Mónica FZ, Priviero FB, Baldissera L Jr, de Nucci G, Antunes E. Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble

- guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle. Eur J Pharmacol 2010; 637(1-3):171-7.
88. Mónica FZ, Reges R, Cohen D, Silva FH, De Nucci G, D'Ancona CA, Antunes E. Long-term administration of BAY 41-2272 prevents bladder dysfunction in nitric oxide-deficient rats. Neurourol Urodyn 2011; 30(3):456-60.
89. da Silva FH, Claudino MA, Báu FR, Rojas-Moscoso JA, Mónica FZ, De Nucci G, Antunes E. Vas deferens smooth muscle responses to the nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272. Eur J Pharmacol 2012; 688(1-3):49-55.
90. Stief CG, Uckert S, Truss MC, Becker AJ, Machtens S, Jonas U. A possible role for nitric oxide in the regulation of human ureteral smooth muscle tone in vitro. Urol Res 1996;24(6):333-7.
91. Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med 1998; 104: 413-21.
92. Davenport K, Timoney AG, Keeley Jr, FX. Effect of smooth muscle relaxant drugs on proximal human ureteric activity in vivo: a pilot study. Urol Res 2007; 35: 207-13.
93. Troxel SA, Jones AW, Magliola L, Benson JS. Physiologic effect of nifedipine and tamsulosin on contractility of distal ureter. J Endourol 2006; 20(8): 565-68.
94. Delabella M, Milanese G, Muzzonigro G. Efficacy of tamsulosin in the medical management of juxtavesical ureteral stones.

95. Porpiglia F, Destefanis P, Fiori C, et al. Effectiveness of nifedipine and deflazacort in the management of distal ureteral stones. *Urology* 2000; 56: 579- 82.
96. Vincendeau S, Belissant E, Houlgatte A, Doré B, Bruyère F, Renault A, Mouchel C, Bensalah K, Guillé F. Tamsulosin hydrochloride vs placebo for management of distal ureteral stones. *Arch Intern Med* 2010; 170(22): 2021-27.
97. Cha WH, Choi JD, Kim KH, Seo YJ, Lee K. Comparison and efficacy of low-dose and standard-dose tamsulosin and alfuzosin in medical expulsive therapy for lower ureteral calculi: prospective, randomized, comparative study. *Korean J Urol* 2012; 53: 349- 54.
98. Jerde TJ, Saban R, Nakada SY. Evaluation of ureteric contraction: a comparison among ring, spiral-cut and longitudinal segments. *BJU Int* 1999; 83: 95-100.
99. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology*. Norwalk CT, San Mateo CA: Appleton and Lange, 1989: 388-9.
100. Hanna MK, Jeffs RD, Sturgess JM, Barkin M. Ureteral structure and ultrastructure. 1. The normal human ureter. *J Urol* 1976; 116: 718- 24.
101. Woodburne RT. The ureter, ureterovesical junction and vesical trigone. *Anat Rec* 1965; 151: 243-9.
102. Morita T, Anode M, Char K, Oshima H. Relationship of the structure of ureteral muscularis to in vitro spontaneous contraction. *Urol Int* 1995; 55: 123-7.

103. Kühn R, Ückert S, Stief CG, Truss MC, Lietz B, Bischoff E, Schramm M, Jonas U. Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide-dependent pathways. *Urol Res* 2000; 28: 110-15.
104. Wen CC, Coyle TLC, Jerde TJ, Nakada SY. Ketorolac effectively inhibits ureteral contractility in vitro. *J Endourol* 2008; 22(4): 739-42.
105. Gurbuz MC, Polat H, Canat L, Kilic M, Caskurlu T. Efficacy of three different alpha1-adrenergic blockers and hyoscine N-Butylbromide for distal ureteral stones. *Int Braz J Urol* 2011; 37(2): 195- 202.
106. Madani AH, Kazemzadeh M, Pourreza F, Shakiba M, Farzan A, Asadollahzade A, Esmaeili S. Randomized controlled trial of the efficacy of isossorbide-SR addition to current treatment of medical expulsive therapy for ureteral calculi. *Urol Res* 2011; 39: 361-5.
107. Burnstock G. Purinergic cotransmission. *Exp Physiol* 2009; 94(1): 20-4.
108. Gillespie JI, Markerink-van Ittersum M, De Vente J. Interstitial cells and cholinergic signalling in the outer muscle layers of the guinea-pig bladder. *BJU Int* 2006; 97(2):379-85.
109. Goessl C, Grozdanovic Z, Knispel HH, Wegner HE, Miller K. Nitroergic innervation of the human ureterovesical junction. *Urol Res* 1995; 23(3):189-92.
110. Lekontseva O, Chakrabarti S, Jiang Y, et al. Role of neuronal nitric-oxide synthase in estrogen-induced relaxation in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 339: 367-75.

111. Müntener M, Schurch B, Wefer B, Reitz A. Systemic nitric oxide augmentation leads to a rapid decrease of the bladder outlet resistance in healthy men. *Eur Urol* 2006; 50(1):112-7.
112. Porst H, Kim ED, Casabé AR, Mirone V, Secret RJ, Xu L, Sundin DP, Viktrup L; LVHJ study team. Efficacy and safety of tadalafil once daily in the treatment of men with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia: results of an international randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Urol* 2011; 60(5): 1105-13.
113. Schmidt HH, Schmidt PM, Stasch JP. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol* 2009; (191): 309-39.
114. Martin F, Baskaran P, Ma X, Dunten PW, Schaefer M, Stasch JP, Beuve A, van den Akker F. Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to Nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 2010; 285(29):22651-7.
115. Claudino MA, da Silva FH, Mónica FZ, Rojas-Moscoso JA, De Nucci G, Antunes E. Long-term oral treatment with BAY 41-2272 ameliorates impaired corpus cavernosum relaxations in a nitric oxide-deficient rat model. *BJU Int* 2011;108(1):116-22.
116. Roger S, Badier-Commander C, Paysant J, et al. The anti-aggregating effect of BAY 41-2272, a stimulator of soluble guanylyl cyclase, requires the presence of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 2010; 161: 1044-58.
117. Bazán-Perkins B. cGMP reduces the sarcoplasmic reticulum Ca⁺² loading in airway smooth muscle cells: a putative mechanism in the regulation of Ca⁺² by cGMP. *J Muscle Cell Res Motil* 2012; 32: 375-82.

118. Bau FR, Monica FZ, Priviero FB, et al. Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2010; 637: 171-7.
119. Nagasaki S, Nakano Y, Masuda M, et al. Phosphodiesterase type 9 (PDE9) in the human lower urinary tract: an immunohistochemical study. *BJU Int* 2012; 109: 934-40.
120. De Moura RS, de Lemos Netto M. Effects of potassium channel modulators cromakalin, tetraethylammonium and glibenclamide on the contractility of the isolated human ureter. *J Urol* 1996; 156: 276-80.

8 .Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.

- **Manual para normatização de publicações técnico-científicas.** 4ªed.,

Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdades de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2006).

9. Anexo 1

PROJETO :

« INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO) EM URETER ISOLADO DE HUMANO : PAPEL DA VIA DO NO-sGC-cGMP E DOS ADRENOCEPTORES »

PARECER CEP : No. 490/2009



CEP, 14/07/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 490/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0388.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO) EM URETER ISOLADO DE HUMANO: PAPEL DA VIA DO NO-sGC-cGMP E DOS ADRENOCEPTORES".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gilberto de Nucci.

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 04/06/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 14/07/10 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Avançar na compreensão dos mecanismos farmacológicos envolvidos no relaxamento de ureter isolado de doadores humanos produzido pela adição cumulativa de dimetil sulfóxido (DMSO).

III - SUMÁRIO

Serão utilizados ureteres de pacientes submetidos à nefrectomia, transplante renal e doador cadáver. Estima-se que serão necessários 20 doadores. O material será cultivado e utilizado para os testes farmacológicos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI I - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de junho de 2009.

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP