ANTONIO CELSO S. RAMOS FILHO

Avaliação morfofuncional e molecular do detrusor isolado de ratos hipertensos renovasculares

> CAMPINAS 2010

> > i

ANTONIO CELSO S. RAMOS FILHO

Avaliação morfofuncional e molecular do detrusor isolado de ratos hipertensos renovasculares

Dissertação de mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

CAMPINAS 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO Sistemas de Bibliotecas da UNICAMP / Diretoria de Tratamento da Informação

Bibliotecário: Helena Joana Flipsen – CRB-8ª / 5283



Título e subtítulo em inglês: Morphofunction and molecular evaluation of isolated detrusor on renovascular hypertensive rat model.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Bladder; Renovascular hypertension; Urinary organs - Diseases; Adrenergic beta blocker; Adrenolytic agents.

Titulação: Mestre em Farmacologia.

Banca examinadora: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglio, Heitor Moreno Júnior,

Data da Defesa: 18-11-2010 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Antonio Celso Saragossa Ramos Filho

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Edson Antunes

Membros:	100
Professor (a) Doutor (a) Edson Antunes	AF.
K	to Care AST Panashia
Professor (a) Doutor (a) Rita de Cassia Aleixo	Tostes Passaglio
	. / /
Professor (a) Doutor (a) Heitor Moreno Junior	Mmongs.
	1-1

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/11/2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio Celso e Catarina, meus exemplos de dedicação, dignidade e os grandes incentivadores por minha carreira acadêmica. Minha vida será pequena para agradecer tudo que sempre fizeram e fazem por mim. Obrigado!

À minha irmã Isis Maria, pelas discussões, amor, carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Antunes Agradeço pela oportunidade e por sua orientação

À

Prof^ª Dr^ª Suzete Maria Cerutti Agradeço pelos primeiros ensinamentos e por fazer despertar em mim a paixão pela ciência

Agradecimentos

Aos meus amigos da "Cascata", Fernanda Priviero, Fernanda Dell, Mário Claudino, Maria Andréia, Rodrigo Capel, Samuel Barillas, Fábio, Luiz Osório e Lorenzo agradeço pela ajuda e pelos momentos descontraídos que me proporcionaram durante todo o período que permaneci no laboratório.

Agradeço especialmente a Fabíola e ao Fernando Báu que me acompanharam desde o início, me ensinando, contribuindo com idéias e ajudando em tudo que eu precisei.

Agradeço também, em especial, ao amigo e companheiro de experimentos Julio Rojas, que sempre me ajudou no desenvolvimento do modelo experimental de hipertensão.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Elen, Lineu, Marina, Nádia, Priscila, Rafael Prada, Sisi Marcondes, Letícia Lintomen, Dalize, Glaucia e Eliza.

Aos funcionários do departamento de farmacologia da UNICAMP, Francileuda, Elaine, Karina, Wanderlei, Marcos, Agnaldo, pelos serviços prestados. Especialmente, agradeço ao Sr. Miguel Borges da Silva e Denize por dispensar tanto cuidado na criação dos animais.

SUMÁRIO

	LISTA DE DROGAS	xxiii
	LISTA DE ABREVIAÇÕES	xxvii
	LISTA DE TABELAS	xxxi
	LISTA DE FIGURAS	xxxv
	RESUMO	xxxix
	ABSTRACT	xliii
1.	INTRODUÇÃO	47
1.1	Hipertensão Arterial	48
	1.1.1 Epidemiologia	48
	1.1.2 Doença aterosclerótica da artéria renal	48
	Clipagem Renal pelo método de GoldBlatt II (2K-1C)	
	1.1.3 Sistema Renina Angiotensina	51
	Participação da angiotensina nos transtornos do baixo trato urinário	
	1.1.4 Uma nova visão do sistema Renina-angiotensina	53
1.2	Anatomo-fisiologia da bexiga	55
	1.2.1 Mecanismos contráteis	59
	Receptores muscarínicos	
	1.2.2 Mecanismos relaxantes	61
	Receptores β-adrenérgicos	
	1.2.3 Hiperatividade de bexiga e hiperatividade do detrusor	63
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	68
2.1	Animais de experimentação	69

2.2	Clipagem renal pelo método de Goldblatt II (2K-1C)	69
2.3	Tratamento crônico com losartan e captopril	70
2.4	Medida da pressão arterial	70
2.5	Estudo morfológico quantitativo da bexiga urinária	71
	2.5.1 Histologia	71
	2.5.2 Imunohistoquímica	71
	2.5.3 Histomorfometria	72
2.6	Análise funcional do detrusor isolado ("in vitro")	73
	2.6.1 Isolamento e montagem dos tecidos	73
	2.6.2 Protocolos experimentais	74
	Avaliação do efeito contrátil ao agonista muscarínico em detrusor	
	isolado	
	Avaliação dos efeitos relaxantes aos agonistas β-adrenérgicos em	
	detrusor isolado de ratos	
	Avaliação da resposta contrátil ao CaCl2 em detrusor isolado	
	Resposta contrátil ao KCI em músculo liso detrusor de ratos	
	Curva frequência-resposta em músculo liso detrusor de ratos	
	Avaliação da resposta contrátil a agonista purinérgico em detrusor	
	isolado de ratos	
2.7	Parâmetros farmacológicos	76
2.8	Análise cistométrica	77
2.9	Técnica de PCR em Tempo Real (Real Time PCR)	78

	2.9.1 Extração de RNA	78
	2.9.2 Síntese de DNA complementar (DNAc)	79
	2.9.3 Desenho dos primers	79
	2.9.4 Padronizações necessárias para o PCR quantitativo em tempo	
	real – concentração e eficiência dos <i>primers</i>	80
	2.9.5 PCR quantitativo em tempo real – "Real Time PCR"	81
	2.9.6 Quantificação e normalização das amostras pelo método	
	geNorm versão 3.4	82
2.10	Determinação dos níveis de AMPc	83
2.11	Análise estatística	84
3.	RESULTADOS	85
3.1	Avaliação da pressão arterial sistólica	86
3.2	Avaliação funcional "in vitro" – cistometria	86
3.3	Análise histomorfométrica	89
3.4	Avaliação funcional "in vitro"	90
	3.4.1 Curva frequência resposta em detrusor de ratos 2K1C e SHAM	90
	3.4.2 Curva concentração-resposta ao agonista muscarínico carbacol	
	em detrusor isolado de ratos 2K1C e SHAM	90
	3.4.3 Curva concentração-resposta ao cloreto de potássio (KCI) em	
	detrusor isolado de ratos 2K-1C e SHAM	93
	3.4.4 Curva concentração-resposta ao cloreto de cálcio (CaCl ₂) em	
	detrusor isolado de ratos 2K-1C e SHAM	93

	3.4.5 Curva concentração-resposta não cumulativa ao α,β -metileno-	
	ATP em detrusor isolado de ratos 2K-1C e SHAM	94
	3.4.6 Curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) e	
	BAY 41-2272 em detrusor isolado de ratos SHAM e 2K-1C	95
	3.4.7 Participação dos β-adrenoceptores no relaxamento do detrusor	
	de ratos 2K-1C	96
	3.4.8 Níveis intracelulares de AMPc	98
	3.4.9 Expressão de RNAm dos receptores muscarínicos M3 e M2	99
3.5	Avaliação funcional em ratos SHAM e 2K-1C após tratamento crônico	
	com losartan e captopril	99
	3.5.1 Avaliação cistométrica após tratamento crônico com losartan e	
	captopril	101
	3.5.2 Resposta contrátil do detrusor induzida pelo carbacol em animais	
	2K1-C e SHAM após tratamento crônico com losartan e captopril	103
	3.5.3 Resposta contrátil do detrusor induzido pela estimulação elétrica	
	em animais 2K-1C e SHAM tratados com losartan e captopril	105
	3.5.4 Relaxamento do detrusor com isoproterenol em animais 2K-1C e	
	SHAM tratados com losartan e captopril	106
4.	DISCUSSÃO	108
5.	CONCLUSÃO	116
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
7.	APÊNDICE	129

LISTA DE DROGAS

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
HCI	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
KCI	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
MgSO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
NaHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
Carbacol	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
EGTA	Sigma St. Louis, MO, EUA
Ácido ciclopiazônico	Sigma St. Louis, MO, EUA
BAY-412272	Bayer, Leverkusen, Alemanha
Nitroprussiato de sódio	Sigma St. Louis, MO, EUA
Isoproterenol	Sigma St. Louis, MO, EUA
Metaproterenol	Sigma St. Louis, MO, EUA
BRL37-344	Sigma St. Louis, MO, EUA
A,β-metileno-ATP	Sigma St. Louis, MO, EUA
Y-27632	Sigma St. Louis, MO, EUA

LISTA DE ABREVIAÇÕES

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ACh: acetilcolina

- ADH: hormônio antidiurético
- AMPc: monofosfato cíclico de adenosina
- ATP: trifosfato de adenosina
- BKca: canal de potássio ativado por cálcio
- BAY41-2272:5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridin-3-i]-pirimidin-

4-lamina.

- **CaM:** calmodulina
- CCh: carbacol
- CPA: ácido ciclopiazônico
- **DAG:** diacilglicerol
- E.P.M: erro padrão da média
- EGTA: ácido etilenoglicol bis (2-aminoetileter) tetra acético
- Emax: resposta máxima
- GCs: guanilil ciclase solúvel
- GMPc: monofofato cíclico de guanosina
- GTP: trifosfato de guanosina
- IP₃: inositol trifosfato
- KATP: canal de potássio ativado por ATP
- **L-NAME:** N^{ω} -nitro-L-arginina metil éster
- MLC: cadeia leve de miosina
- MLCK: quinase da cadeia leve de miosina

MLC-P: cadeia leve de miosina fosforilada

NANC: não adrenérgico não colinérgico

NO: óxido nítrico

NOS: sintase do óxido nítrico

PDE: fosfodiesterase

PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta

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

máximo

PKA: proteína quinase A

PKC: proteína quinase C

PKG: proteína quinase G

PLC: fosfolipase C

RNAm: ácido ribonucleico

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

SR: retículo sarcoplasmático

TGF-*β*: fator de crescimento beta

2K-1C: 2 rins, 1 clip

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência e tamanho dos fragmentos amplificados de cada par de <i>primer</i>	63
Tabela 2:	Concentração de <i>primers</i> utilizados na amplificação dos genes de estudo e eficiência de amplificação obtida	64
Tabela 3.	Peso corporal, peso da bexiga e análise morfométrica em ratos controles e 2K-1C	73
Tabela 4	Efeito do tratamento com losartan nas alterações urodinâmicas em resposta à hipertensão renovascular	86
Tabela 5	Efeito do tratamento com captopril nas alterações urodinâmicas em resposta à hipertensão renovascular	86
Tabela 6	Valores de potência (pEC ₅₀) e resposta máxima (E _{máx}) para o carbacol em detrusor isolado de ratos após tratamento crônico com losartan ou captopril	88
Tabela 7	Valores de potência (pEC ₅₀) e resposta máxima (E _{máx}) para o isoproterenol em detrusor isolado de ratos pré-contraídos com KCI, após tratamento crônico com losartan ou captopril	91

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vias proteolíticas para formação das angiotensinas	39
Figura 2.	Representação esquemática da inervação da bexiga	43
Figura 3.	Mecanismo de biossinalização do receptor muscarínico M3	45
Figura 4.	Esquema da formação e hidrólise do AMPc no detrusor	47
Figura 5.	Valores das pressões sistólicas de animais SHAM e 2K-1C	70
Figura 6.	Avaliação cistométrica	72
Figura 7.	Curva frequência-resposta (1-32 Hz)	74
Figura 8.	Curva concentração-resposta ao carbacol (CCh; 0.001 a 100 μ M) na presença e na ausência do inibidor da enzima Rho-Quiinase, Y-27632 (10 μ M)	76
Figura 9.	Curva concentração-resposta ao cloreto de potássio (KCI - 1 a 300 mM)	77
Figura 10.	Curva concentração-resposta ao cloreto de cálcio (CaCl ₂ - 0.01 a 100 mM)	78
Figura 11.	Curvas concentração-resposta ao α,β -metileno-ATP (α,β -metileno-ATP – 1 a 100 μ M)	78

Figura 12.	Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP; 0.001-300 μM) e ao BAY 41-2271 (0.001-100 μM)	80
Figura 13.	Curvas concentração-resposta ao isoproterenol (0.001-100 μ M), metaproterenol (0.001-100 μ M) e BRL 37-344 (0.001-100 μ M)	81
Figura 14.	Quantificação intracelular de AMPc	82
Figura 15.	Expressão de RNAm dos receptores muscarínicos M2 e M3	83
Figura 16.	Valores das pressões sistólicas de animais SHAM e 2K1C após tratamento com losartan (A) ou captopril (B)	84
Figura 17.	Avaliação cistométrica após tratamento com losartan ou captopril	85
Figura 18.	Efeito do tratamento crônico com losartan ou captopril na contração induzida pelo carbacol (1 nM – 10 mM)	88
Figura 19.	Efeito do tratamento crônico com losartan ou captopril na contração induzida pela estimulação elétrica	89
Figura 20.	Efeito do tratamento crônico com losartan ou captopril no relaxamento induzido pelo isoproterenol	90

RESUMO

A hipertensão renovascular é uma forma secundária da hipertensão arterial, que corresponde de 1-5% dos casos de hipertensão. A associação entre hipertensão arterial e disfunções miccionais foi observada no modelo experimental de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Até o momento nenhum estudo avaliou as disfunções miccionais em animais hipertensos renovasculares. Dessa forma, neste estudo, caracterizamos a disfunção miccional em ratos hipertensos renovasculares através do modelo de dois rins, um clip (2K-1C).

Em ratos Wistar (200-220 g) colocou-se um clip em torno da artéria renal. Depois de oito semanas, os ratos foram utilizados. Realizou-se estudo cistométrico em ratos anestesiados, assim como curvas concentração-resposta para agentes contráteis e relaxantes em detrusor isolado (DSM). Foram também realizados estudos histomorfométricos e da expressão de RNAm dos receptores muscarínicos M3 e M2 em DSM isolado.

Os resultados histomorfométricos mostraram aumentos significantes na espessura da parede da bexiga, no volume intravesical, na densidade de musculatura lisa e na densidade de fibras neurais no grupo 2K-1C em comparação ao SHAM. O agonista muscarínico, carbacol, produziu contrações concentração-dependentes do DSM, as quais foram significantemente maiores no grupo 2K-1C. O inibidor da Rho-quinase, Y27-632 (10 μ M), reduziu significantemente a contração induzida pelo carbacol nos ratos SHAM e 2K-1C; porém, no grupo 2K-1C, o DSM continuou hiperativo na presença do Y27-632. A estimulação elétrica (1 – 32 Hz) produziu contração freqüência-dependente do DSM as quais foram maiores no grupo 2K-1C. O agonista purinérgico P2X, α , β -metileno-ATP (1 – 100)

xli

 μ M), o KCI (1 – 300 μM) e o Ca²⁺ extracelular (0,01-100 μM) produziram contrações concentração-dependente; porém, não observamos diferenças entre o grupo SHAM e 2K-1C. O agonista não seletivo β-adrenérgico, isoproterenol, o agonista seletivo β_2 -adrenérgico, metaproterenol, e o agonista seletivo β_3 -adrenérgico, BRL37-344, produziram relaxamentos menores do DSM nos ratos 2K-1C, e também redução nos níveis intracelulares de AMPc nos detrusores. O efeito relaxante ao nitroprussiato de sódio e BAY41-2272 mantiveram-se iguais nos animais SHAM e 2K-1C. A expressão do RNAm do receptor muscarínico M₃ (mas não do M₂) no DSM foi significantemente maior nos ratos 2K-1C em comparação ao grupo controle.

Os tratamentos crônicos com losartan e captopril normalizaram a pressão arterial sistólica dos animais 2K-1C, normalizaram a função miccional, e reduziram a hipercontratilidade do detrusor induzida pela estimulação elétrica e pelo carbacol, assim como restabeleceram o relaxamento induzido pelo isoproterenol ao nível do grupo SHAM.

Concluimos que os ratos hipertensos renovasculares apresentam hiperatividade do detrusor, a qual envolve remodelamento tecidual e aumento da contração via receptor muscarínico M₃ associado à redução no relaxamento β-adrenérgico com redução da sinalização intracelular e produção de AMPc. Os tratamentos com losartan e captopril restauram a função miccional dos animais 2K-1C.

xlii

ABSTRACT

Renovascular hypertension is a secondary form of arterial hypertension, accounting for 1-5% of cases in unselected population. Association between arterial hypertension and urinary bladder dysfunction has been reported in spontaneously hypertensive rats, but no study evaluated the bladder dysfunction in renovascular hypertensive animals. Therefore, in this study, we explored the bladder dysfunction in renovascular hypertensive rats, using the two-kidney one-clip (2K-1C) model.

A silver clip was placed around the renal artery of male Wistar Kyoto rats (200-220 g). After eight weeks, rats were used. Cystometric study in anesthetized rats, along with concentration-response curves to both contractile and relaxant agents in isolated detrusor smooth muscle (DSM) were performed. Histomorphometry and mRNA expression of muscarinic M3 and M2 receptors in DSM were also determined.

The histomorphometric data showed significant increases in bladder wall thickness, intravesical volume and density of smooth muscle, as well as density of neural fibers in the 2K-1C group compared with SHAM. The muscarinic agonist carbachol produced concentration-dependent DSM contractions, which were markedly greater in 2K-1C rats. The Rho-kinase inhibitor Y27-632 (10 μ M) significantly reduced the carbachol-induced contractions in sham and 2K-1C rats, but DSM in 2K-1C rats remained overactive in the presence of Y27632. Electrical-field stimulation (EFS; 1-32 Hz) produced frequency-dependent DSM contractions that were also greater in 2K-1C group. The P2X receptor agonist α , β -methylene ATP (1–100 μ M), KCI (1-300 mM) and extracellular Ca²⁺ (0.01-100 M) produced

concentration-dependent DSM contractions, but no changes among sham and 2K-1C rats were seen. In 2K-1C rats, the non-selective β -adrenoceptor agonist isoproterenol, the β_2 -adrenoceptor agonist metaproterenol and the β_3 -adrenoceptor agonist BRL 37-344 produced lower DSM relaxations, as well as decreased cAMP levels. The relaxant responses to sodium nitroprusside and BAY 41-2272 remained unchanged in 2K-1C rats. Expression of mRNA of muscarinic M₃ (but not of M₂) receptors in DSM was significantly increased in 2K-1C rats.

The chronic treatment with losartan and captopril normalized the blood systolic pressure of 2K-1C animals, improved their urinary function by reducing DSM hypercontractility to EFS and carbacol stimulation, and restored the relaxation induced by the β -adrenergic agonist isoproterenol to the level of SHAM group.

In conclusion, renovascular hypertensive rats exhibit overactive DSM that involves tissue remodeling and enhanced muscarinic M_3 -mediated contractions associated with reduced β -adrenoceptor-mediated signal transduction. The treatments with losartan and captopril improved urinary function of 2K-1C animals.

xlvi

1. Introdução

1.1 Hipertensão Arterial

1.1.1 Epidemiologia

A hipertensão é uma doença de escalas globais. Os números são grandes: a doença atinge cerca de 60 milhões de pessoas nos Estados Unidos e mais de um bilhão de pessoas no mundo. No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, cerca de 30 milhões de brasileiros têm hipertensão e há outros 12 milhões que ainda não sabem que possuem a doença. A hipertensão arterial pode ser diferenciada em primária (essencial) e secundária. A hipertensão arterial primária, que corresponde ao maior número de hipertensos (~95%), é o tipo de hipertensão em que a causa etiológica não é bem definida. A hipertensão arterial secundária, que corresponde ao menor número de hipertensos (~5%), é o tipo de hipertensão em que a causa é bem definida; por exemplo, disfunções endócrinas, uso de drogas, gravidez, estenose aórtica, estenose da artéria renal, nefropatia diabética, glomerulonefrite e doença policística.

1.1.2 Doença aterosclerótica da artéria renal

A coarctação da artéria renal (CAR) resulta em hipertensão arterial e isquemia nefropática. A isquemia renal causada pela CAR em ambos os rins, na maioria dos casos, se cronifica, e os pacientes acabam evoluindo para uso de hemodiálise em seu estágio final ^(1,2).

Os fatores de risco relacionados à doença aterosclerótica da artéria renal incluem o envelhecimento, diabetes, dislipidemias e doenças vasculares periféricas ^(3,4,5). Estudos indicam que a CAR segue as consequências sistêmicas da aterosclerose em relação à qualidade e comprometimentos. A CAR pode resultar na isquemia nefropática, evoluindo para redução da filtração glomerular ou perda do parênquima renal devido à redução do fluxo sanguíneo renal.

Episódios repetidos de diminuição do fluxo sanguíneo renal levam à destruição irreversível do parênquima renal levando consequentemente a estenose. A hipoperfusão renal leva ao aumento da secreção de renina pelas células justa-glomerulares e, consequentemente, à geração de angiotensina II (ang II). A ang II induz aumento da expressão do RNAm do fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e do RNAm do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), resultando no acúmulo da matriz extracelular e colágeno do tipo IV no interstício renal ⁽⁶⁾.

Clipagem renal pelo método de GoldBlatt II (2K-1C)

O modelo experimental de hipertensão renovascular (2K-1C) foi inicialmente descrito por Goldblatt em 1934, e consiste na estenose unilateral da artéria renal, através da colocação de um "clip" metálico entorno da artéria renal ⁽⁷⁾. O "clip" não é suficientemente capaz de causar isquemia; porém, a redução da perfusão renal estimula o aumento da síntese e liberação de renina no rim clipado.

O rim não clipado, subjetivamente ao progressivo aumento na pressão arterial (em resposta ao aumento de renina no rim clipado), aumenta a secreção de renina, promovendo aumento da excreção de sódio (natriurese).

Apenas um rim saudável é suficiente para manter a depuração renal e o equilíbrio dinâmico de sódio, mantendo a pressão arterial normal; porém, o paradigma da hipertensão do modelo Goldblatt reside na inabilidade do rim saudável em prevenir o desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica.

No rim clipado, a ang II eleva-se até o 7° dia pós-clipagem após o qual a perfusão do rim clipado é reestabilizada. A ang II, a renina e a reabsorção renal de Na⁺ voltam aos níveis basais. Da mesma forma, após 3 semanas da clipagem renal, os níveis plasmáticos de renina e ang II também retornam aos níveis basais, porém a pressão arterial continua elevada. Depois desse período de estabilização da pressão renal no rim clipado e da normalização dos níveis plasmáticos de ang II e de renina, a função renal do rim não estenótico continua sendo modulada pela ang II. Vários trabalhos da década de oitenta e noventa mostram que o rim não-clipado é o principal responsável pela ativação do SRA (sistema-renina-angiotensina), repercutindo na manutenção do quadro de hipertensão arterial ^(8, 9, 10, 11, 12)

Como os níveis de ang II não voltam ao basal no rim não clipado, sugere-se que a atividade do SRA mantém-se também aumentada na hipertensão causada pela estenose da artéria renal arterosclerótica. Dessa forma, trabalhos mostram que a administração de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e

50

de antagonistas do receptor AT₁ da angiotensina II contribuem significantemente para redução dos níveis pressóricos nesses casos⁽¹³⁾.

1.1.3 Sistema renina angiotensina (SRA)

O SRA é ativado, fisiologicamente, para reverter a hipotensão arterial. Em situações patológicas de hipertensão arterial ocorre a estimulação persistente deste sistema. A hipertensão arterial, quando não tratada, pode ser assintomática durante anos; porém, os danos teciduais e funcionais ocorridos são muitas vezes irreparáveis.

A atividade do SRA inicia-se quando o polipeptídeo angiotensinogênio, sintetizado pelo fígado, é clivado pela renina, sintetizada pelas células justaglomerulares. Quando liberada na corrente sanguínea forma o decapeptídio ang I a partir do angiotensinogênio. A ang I, na superfície pulmonar e no endotélio renal, sofre uma segunda ação enzimática na qual a ECA o transforma em ang II.

A ang II possui diversas ações como estimulação das fibras simpáticas, estimulação tubular dos canais de sódio e cloro e ação vasoconstritora. No córtex da supra-renal, a aldosterona é liberada para corrente sanguínea, aumentando a retenção de água ao nível de ducto coletor do néfron. Ao interagir com receptores vasculares do tipo AT₁, a Ang II, contrai a musculatura lisa vascular. A ang II também pode ativar o lóbulo posterior da hipófise ocasionando a liberação do

hormônio anti-diurético (ADH), o qual atua sinergicamente na retenção de água no ducto coletor do néfron.

Participação da angiotensina II nos transtornos do baixo trato urinário

Estudos recentes sugerem que a ang II é um fator trófico local da parede da bexiga, sendo responsável por regular a hipertrofia da musculatura lisa e a produção de colágeno ⁽¹⁴⁾. No modelo experimental de hiperatividade de bexiga por obstrução parcial observou-se que a ang II é responsável pela hipertrofia da musculatura lisa e aumento da produção de colágeno. Palmer *et al.*⁽¹⁵⁾ demonstraram que o inibidor da ECA, captopril, e o antagonista do receptor de ang II, losartan, atenuam significativamente as alterações histológicas encontradas em ratos com obstrução parcial de bexiga.

Utilizando-se o modelo experimental de obstrução parcial de bexiga e técnica de radio-ligante foi verificado que a densidade de receptor AT₁ na bexiga não esta alterada; porém, a sensibilidade destes receptores encontra-se aumentada nesta condição patológica. Neste mesmo trabalho, mostrou-se que o antagonista de ang II, telmisartan, reduz significantemente a hipertrofia da parede da bexiga. Dessa forma, foi comprovado um papel importante da ang II na fisiopatologia do baixo trato urinário⁽¹⁴⁾.

52
1.1.4 Uma nova visão do SRA

Classicamente, o angiotensinogênio sofre a ação da renina e produz ang I que, sob a ação da ECA, produz ang II, que por sua vez exerce suas ações em receptores AT₁ e AT₂. Nesse contexto, a ang II é o peptídeo biologicamente ativo e a ECA é o modulador central do sistema. Atualmente, sabe-se que a ang I pode ser hidrolisada para angiotensina-(1-9) (ang1-9) por meio da ação catalítica de uma monopeptidase denominada ECA2. A ang1-9, por sua vez, pode sofrer a ação da ECA, gerando a angiotensina-(1-7) (ang1-7), o peptídeo biologicamente ativo dessa via e potente vasodilatador. A ang1-7 pode também ser gerada diretamente da ang I por outras endopeptidases que não as ECA2 e ECA ^(16, 17).

A eficiência catalítica da ECA2 é 400 vezes maior com a ang II como substrato do que com a ang I ⁽¹⁸⁾. A descoberta da ang1-7 e ECA2 ampliam o conhecimento e a percepção de como esse sistema trabalha ^(16, 17). Acredita-se que esse segundo eixo do SRA atua como um contra-regulador do primeiro. A geração do vasodilatador ang 1-7, através da ECA2, supostamente contrabalança o efeito vasopressor da ang II gerada pela ação da ECA. Provavelmente, sob condições fisiológicas, existe um fino equilíbrio entre os dois eixos do SRA, mantendo o tônus normal dos vasos sanguíneos. Qualquer desequilíbrio entre os dois eixos do sistema, como resultado de um eventual processo patogênico, pode resultar em hipertensão arterial. Ainda não é claro a contribuição relativa da segunda via metabólica de ang I em condições hemodinâmicas fisiopatológicas, e a proporção de ang I direcionada para cada eixo do SRA. A potência da ang 1-7

como vasodilatadora em relação à da ang II como vasoconstritora em seres humanos também não está definitivamente elucidada. De qualquer modo, parece certo que se está frente a um sistema com dupla função contra-regulador que permite inibição e estimulação de um mesmo órgão efetor, possibilitando equilíbrio entre duas forças opostas, favorecendo a homeostase. Sabe-se que quanto maior a razão ang 1-7/ang II ou ang 1-7/ang I, mais fortemente a ang 1-7 "antagoniza" a ang II ou maior é sua produção a partir de ang I. A medida de ang 1-7 pode ser considerada uma medida indireta dos níveis e da atividade da ECA2, uma vez que esta enzima é seu produto efetor ⁽¹⁹⁾.

Baseado em achados de que componentes do SRA são encontrados em órgãos como cérebro, introduziu-se o conceito de SRA tecidual ou local ^(18, 20). Os genes para todos os componentes do SRA têm sido clonados, sendo encontrados em muitos tecidos, confirmando a possibilidade de síntese local de ang II. É sabido também que esses sistemas locais não são entidades isoladas, mas podem interagir com o SRA endócrino, bem como com outros sistemas peptídicos em múltiplos níveis. Isto parece explicar a fisiopatologia do SRA em vários órgãos que não apenas coração, vasos sanguíneos e rins ⁽²¹⁾. Ou seja, atualmente, quando se estuda o SRA, deve-se considerar não apenas o eixo tradicional mediado pela ECA/ang II mas também o segundo eixo mediado pela ECA2/ang 1-7, e a relação entre os dois (Figura 1).



Figura 1. Vias proteolíticas para formação das angiotensinas. ECA: enzima conversora de angiotensina; Amp A: aminopeptidase A; Cbp: carboxipeptidases; D-Amp: dipeptidil-aminopeptidase I-III; NEP: endopeptidase neural; PCP: prolilcarboxipeptidase; PEP: prolil-endopeptidase; ECA 2: enzima conversora de angiotensina 2⁽¹⁶⁾.

1.2 Anatomo-fisiologia da bexiga urinária

O baixo trato urinário é constituído pela bexiga, uretra e esfíncteres. A bexiga é um órgão dividido em duas regiões distintas: uma ampla região localizada acima dos orifícios ureterais, denominada "corpo da bexiga", que contêm o músculo liso detrusor, e uma região menor, abaixo dos orifícios ureterais, denominada "base da bexiga", que é constituída pelo músculo trígono e

junção uretravesical ⁽²²⁾. A principal musculatura da bexiga é o músculo liso detrusor. As fibras musculares do detrusor são capazes de se distender permitindo um aumento do volume da bexiga, sem aumento da pressão intravesical, e de se contrair de maneira suficiente para gerar a pressão necessária para liberar a urina. A bexiga urinária é um órgão elástico que apresenta capacidade de estocar e liberar urina. Esta capacidade depende da atividade dos músculos lisos e estriados, uretra e esfíncter uretral externo.

O corpo da bexiga é dividido em três partes: a camada serosa que reveste a bexiga externamente, a túnica muscular, denominada de músculo detrusor e o urotélio que reveste internamente a bexiga com três camadas celulares, tornandoa não somente impermeável como também uma região que secreta substâncias. A bexiga, a uretra e os esfíncteres, os músculos envolventes, a inervação autonômica e somática e os neurotransmissores são elementos fundamentais, cuja interação resulta no estabelecimento da continência urinária ⁽²²⁾.

A fisiologia da bexiga apresenta duas fases, uma de armazenamento de urina, e a outra de esvaziamento. A fase de armazenamento consiste de duas sub-fases, sendo uma inicial que corresponde apenas a enchimento, e uma segunda, que se dá após a primeira sensação para micção. A fase de esvaziamento é caracterizada pelo aumento da pressão intravesical com conseqüente saída da urina ⁽²³⁾. Durante a fase de armazenamento de urina, ocorre, simultaneamente, o relaxamento do detrusor, e a contração da base da bexiga e da uretra, sendo esses eventos mediados, predominantemente, por

catecolaminas liberadas de fibras autonômicas simpáticas. Na fase de esvaziamento, o detrusor se contrai, ao passo que a base da bexiga (e a uretra) se relaxam. Esses eventos são mediados, respectivamente, pela acetilcolina (ACh), oriunda de fibras autonômicas parassimpáticas ao nível do detrusor, e por fibras simpáticas e neurônios nitrérgicos na base da bexiga e da uretra ⁽²³⁾.

Em relação à inervação autonômica e somática da bexiga, sabe-se que a mesma é inervada pelos nervos pélvico, hipogástrico e pudendo. O nervo pélvico conduz fibras parassimpáticas para o detrusor, sendo sua atividade relacionada, essencialmente, à fase de esvaziamento (24, 25). A ativação dessas fibras leva à liberação ACh. а qual interage receptores de com muscarínicos. predominantemente do subtipo M3, causando contração muscular (26, 27; 28). O nervo pélvico também libera neurotransmissores não-adrenérgicos nãocolinérgicos (NANC), como o ATP (adenosina trifosfato) e o óxido nítrico (NO).

O ATP leva à contração do detrusor por interagir com receptores purinérgicos do tipo P2X. Aparentemente, esta via é menos importante para a fisiologia vesical do que a muscarínica, ao menos em condições fisiológicas. No entanto, alguns trabalhos mostram que em situações patológicas de hiperatividade da bexiga essa via pode assumir grande importância ⁽²⁹⁾. Por outro lado, o NO promove relaxamento da musculatura lisa uretral por estimulação da guanilil ciclase solúvel (GCs) levando à formação de GMP cíclico (GMPc) ^(30, 31, 32). O NO é um neurotransmissor formado a partir da L-arginina, através de uma reação catalisada por uma família de enzimas denominadas sintase de óxido nítrico

(NOS) ⁽³³⁾. Existem três isoformas da NOS, denominadas de endotelial (eNOS), neural (nNOS) e induzível (iNOS), cada qual codificada por diferentes genes ⁽³⁴⁾. O mecanismo de ação do NO, de modo geral, envolve a sua ligação na porção heme da sGC, induzindo uma mudança conformacional que leva a enzima a sintetizar 3'5'monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) à partir do trifosfato de guanosina (GTP) ⁽³⁵⁾. Drogas que aumentam as concentrações intracelulares do nucleotídeo GMPc relaxam o baixo trato urinário ⁽³⁶⁾.

O nervo hipogástrico conduz fibras simpáticas para parte do detrusor, e para a base da bexiga e uretra. A atividade deste nervo está relacionada à fase de armazenamento de urina, evento este mediado pela liberação de noradrenalina. Este neurotransmissor interage com receptores β_2 e β_3 no detrusor, cuja ativação resulta em relaxamento muscular, e com receptores do subtipo α_{1A} presentes no trígono e na uretra, cuja ativação resulta em contração muscular ^(37, 38, 39, 40).

O nervo pudendo é responsável pela liberação de ACh, que interage com receptores nicotínicos no esfíncter uretral externo, levando à contração dessa musculatura, contribuindo, assim, para o processo de retenção urinária (^{41, 23} – Figura 2)



Figura 2. Representação esquemática da inervação da bexiga. Nervo hipogástrico (nervo simpático), nervo pélvico (nervo parassimpático), nervo pudendo (nervo somático). ACh: acetilcolina, NE: noradrenalina, NO: óxido nítrico, $Th_{11}-L_2$: região toraco-lombar, S_2 - S_4 : região sacral da coluna vertebral (²³, adaptado).

1.2.1 Mecanismos contráteis

Receptores muscarínicos

Os antagonistas dos receptores muscarínicos são as drogas mais prescritas para o tratamento da hiperatividade de bexiga (Oxibutinina, Atropina). Essas drogas agem, bloqueando os receptores muscarínicos pós-juncionais no músculo detrusor. Dois subtipos dos receptores muscarínicos M₂ e M₃ foram identificados em diversas espécies animais como sendo os responsáveis pelo processo de contração do detrusor. Embora seja evidenciado que o subtipo M₂ seja expresso em maior quantidade na bexiga (80%), a contração do detrusor é mediada principalmente pelo subtipo M_3 ^(42, 43, 44).

A estimulação dos receptores M₃ pela ACh leva à hidrolise do fosfoinositol e posteriormente à liberação intracelular de Ca⁺⁺ e a contração do músculo liso ⁽⁴⁵⁾. juntamente com a ativação da via Rho-Quinase (46). Essas evidências foram confirmadas em estudo utilizando camundongos knockout para o receptor M3, no qual a resposta contrátil exercida pelo carbacol na bexiga é marcantemente reduzida ⁽⁴⁷⁾. A contração residual (5%) que persiste com camundongos "knockout" para receptor M3 é abolida com duplo knockout para M₂/M₃ em camundongos, validando a idéia de que os receptores M2 tem um papel discreto no processo de contração miccional ⁽⁴⁷⁾. Estudos ainda mostram que o receptor M₂ é importante para auxiliar os efeitos contráteis causados pelo receptor M₃ ⁽⁴⁸⁾. Porém, essa participação parece ser mais importante em estados patológicos (49, 44). Ainda assim, tanto em detrusor normal guanto em detrusor hiperativo de humanos, a resposta contrátil ao carbacol é mediada predominantemente pelo receptor M3⁽⁵⁰⁾. Em contrapartida, o receptor M₂ age inibindo a adenilil ciclase e estimulando a síntese de proteína kinase C (PKC), a qual atua fosforilando diversas proteínas citoplasmáticas, além de inibir canais de potássio ativados por cálcio de membrana e liberar cálcio dos retículos sarcoplasmáticos (Figura 3).



Figura 3. Mecanismo de biossinalização do receptor muscarínico M₃. A ativação dos receptores M₃ pela ACh ativa a PLC, produzindo IP₃ e DAG. O aumento de IP₃ leva ao aumento de [Ca²⁺]i o qual ativará a MLC quinase, promovendo a fosforilação da MLC e consequentemente a contração. O DAG ativa a PKC que inibirá a MLC fosfatase. ACh: acetilcolina, PLC: fosfolipase C, IP₃: trifosfato de inositol, SR: retículo sarcoplasmático, Ca²⁺: íons cálcio, MLC kinase: quinase da cadeia leve de miosina, MLC: cadeia leve de miosina, MLC-P: miosina de cadeia leve fosforilada, CIC: cálcio induzindo liberação de cálcio, PKC: proteína quinase C, MLC-fosfatase: fosfatase da cadeia leve de miosina (adaptado de Anderson e Hedlung, 2002)

1.2.2 Mecanismos relaxantes

Receptores β-adrenérgicos

Três subtipos de receptores β -adrenérgicos (β_1 , β_2 , β_3) foram identificados

no detrusor, porém a participação dos diferentes subtipos na resposta relaxante

varia de acordo com a espécie animal. Em detrusor de humanos, os receptores β-

adrenérgicos são expressos na proporção de 1,5%, 1,4% e 97% para β_1 , β_2 e β_3 , respectivamente, sendo o relaxamento mediado principalmente pelos receptores β_3 ⁽⁵¹⁾. O subtipo β_1 parece não ter importância funcional no relaxamento do detrusor de ratos, ao passo que em cães e coelhos, a ativação destes receptores parece contribuir para o relaxamento da bexiga. Os receptores β_2 e β_3 parecem ser igualmente responsáveis pelo relaxamento do detrusor em ratos; porém, em coelhos, os receptores β_2 têm maior participação nas respostas relaxantes quando comparados aos β_3 ⁽⁵²⁾.

A estimulação de receptores β-adrenérgicos dispara uma cascata de eventos celulares iniciando-se com a ativação da enzima adenilil ciclase induzindo acúmulos de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O aumento dos níveis de AMPc leva à ativação da proteína quinase A (PKA) que tem como função a fosforilação de proteínas específicas, promovendo o relaxamento da musculatura lisa (Figura 4). Dentre as ações atribuídas à PKA está a inativação da MLCK e o aumento da recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático através da fosforilação da fosfolambana, diminuindo o cálcio citosólico ⁽⁵³⁾. A ativação de receptores β pode promover o relaxamento do detrusor também por mecanismos independentes de AMPc, incluindo a ativação de canais de potássio. Dentre estes canais, destacam-se os canais de potássio ativados por cálcio (BKc_a), que levam à hiperpolarização das células musculares, causando o fechamento dos canais de cálcio para o meio intracelular.



Figura 4. *Esquema da formação e hidrólise do AMPc no detrusor*. A estimulação do receptor do subtipo β_3 pela NA ativa a AC com conseqüente aumento do AMPc, o qual é degradado pela PDE a 5-AMP. *NA: noradrenalina, AC: adenilil ciclase, PKA: proteína quinase A, PDEs: fosfodiesterases, K*_{ATP}: canal potássio ativado por ATP, β_3 : receptor beta-3 adrenérgico, PKC: proteína quinase C, ATP: trifosfato de adenosina, cAMP: monofosfato cíclico de adenosina, BK_{ca}: canal de potássio ativado por cálcio.

1.2.3 Bexiga hiperativa

A síndrome da bexiga hiperativa, síndrome de urgência ou síndrome de urgência-frequência é um diagnóstico clínico caracterizado por urgência miccional, com ou sem urge-incontinência, usualmente acompanhada de noctúria e de aumento da freqüência urinária, na ausência de fatores infecciosos, metabólicos ou locais ^(54, 55). A hiperatividade do detrusor, por sua vez, refere-se a um diagóstico urodinâmico que se caracteriza por contrações involuntárias do detrusor

durante a cistometria; pode ser neurogênica ou idiopática ^(54, 55). Admite-se que, em mais de 90% das vezes a hiperatividade do detrusor é idiopática.

A bexiga hiperativa compromete sobremaneira a qualidade de vida, causando isolamento social, queda de produtividade no trabalho, vergonha, frustração, ansiedade e baixa auto-estima ⁽⁵⁶⁾. Os sintomas da bexiga hiperativa são variados e, no geral, associam-se à hiperatividade do detrusor ⁽⁵⁷⁾. O sintoma mais comum é o aumento da freqüência miccional, referido por cerca de 85% dos pacientes, seguido da urgência, presente em 54% das vezes ⁽⁵⁸⁾. A urge-incontinência está presente em apenas um terço dos pacientes. São ainda relatados outros sintomas, como enurese noturna e perda de urina durante os esforços da relação sexual ⁽⁵⁹⁾.

Justificativa

A hiperatividade da bexiga resulta em urgência, noctúria, polaciúria, com ou sem urge-incontinência, piorando grandemente a gualidade de vida da população ^(60, 61). Estudo epidemiológico mostra que cerca de 12% da população estudada apresenta a síndrome da bexiga hiperativa ⁽⁶²⁾. A hipertrofia e a hiperplasia da bexiga urinária acarretam na obstrução do efluxo à urina, mas os fatores primários que induzem o crescimento celular ainda não estão completamente caracterizados. Vários receptores, vias de sinalização e fatores de crescimento têm sido implicados nesta disfunção. Estudos epidemiológicos relatam que disfunções miccionais são mais pronunciadas em pacientes hipertensos do que em pacientes normotensos (63, 64, 62). Porém poucos estudos examinaram as disfunções miccionais em condições de hipertensão arterial experimental. Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos tratados crônicamente com L-NAME (inibidor da síntese de NO), ocorrem disfunções miccionais. Nos animais SHR, especula-se que as disfunções do baixo trato urinário sejam devido a alterações na inervação aferente da bexiga, e a diminuição na capacidade e complacência reguladas pela inervação β-adrenérgica ^(65, 66). A hiperatividade do detrusor observada em ratos tratados com L-NAME é caracterizada como uma supersensibilidade aos receptores muscarínicos com redução no relaxamento causado pelo receptor β 3-adrenérgico ⁽⁶⁷⁾. Em condições patológicas de hipertensão arterial, o SRA parece desempenhar atividades fisiopatológicas importantes fora do sistema cardiovascular, incluindo o trato urinário inferior ^(68, 15). Trabalhos recentes mostram que o tratamento com antihipertensivo melhora as

disfunções do baixo trato urinário em animais com obstrução parcial da uretra e incontinentes por estresse ^(69, 70, 14). No modelo de hipertensão renovascular de Goldblatt (2K-1C), o rim isquêmico secreta renina, a qual leva ao aumento da formação de ang II e, consequentemente, elevação da pressão arterial ⁽⁷¹⁾. No entanto, nenhum trabalho até o presente momento avaliou a função miccional em ratos hipertensos renovasculares.

OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações miccionais *in vivo* e *in vitro* em ratos hipertensos renovasculares (2K-1C), tratados ou não com losartan ou captopril.

Objetivos específicos

- Avaliar o perfil cistométrico dos animais hipertensos renovasculares em relação ao grupo controle.
- Avaliar a resposta contrátil do detrusor frente à estimulação por carbacol e α,β-metileno-ATP, KCl e CaCl₂.
- Avaliar a expressão do RNAm dos receptores M₂ e M₃ no detrusor.
- Avaliar os níveis intracelulares de AMPc no detrusor frente à estimulação βadrenérgica.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com o antagonista de receptores de ang II, losartan, nas disfunções miccionais dos ratos 2K-1C.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com o inibidor da ECA, captopril, nas disfunções miccionais dos ratos 2K-1C.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais de experimentação

Foram utilizados ratos Wistar machos (8-10 semanas), pesando entre 200-210 g, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP, Campinas, SP). Os ratos ficaram alojados no biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia – UNICAMP, mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), à temperatura de 25°C, em gaiolas coletivas (4 ratos por gaiola). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pela *Comissão de Ética na Experimentação Animal* (CEEA/UNICAMP- protocolo n°1683-1).

2.2 Clipagem renal pelo método de GoldBlatt II (2K-1C)

A cirurgia foi conduzida de acordo com trabalhos prévios ^(7, 72). Ratos mantidos em jejum por 8 h foram submetidos ao procedimento cirúrgico de clipagem renal. Para tanto, foram anestesiados com tiopental sódico (Tiopentax[®]-20mg/kg) por via intra-peritoneal (i.p.). Procedeu-se a tricotomia abdominal, com posterior incisão do abdômen com exposição do rim esquerdo. Realizou-se a separação da artéria renal da veia renal. Colocou-se um grampo metálico (0.2 mm) em torno da artéria renal. Para finalizar a cirurgia, fez-se a sutura da incisão lombar, mantendo-se os animais em cama térmica à 37°C até acordarem.

Os mesmos procedimentos cirúrgicos foram feitos para o grupo controle (SHAM); porém, o grampo metálico foi colocado e imediatamente retirado do entorno da artéria renal, de modo a não comprometer a função renal.

Os ratos foram mantidos em ciclos de 12 h claro/escuro, com comida e água *ad libitum* por 8 semanas. A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida semanalmente pelo método de *tail-cuff*, e os animais foram considerados hipertensos quando atingiram níveis de PAS acima de 145 mmHg ao final de 8 semanas.

2.3 Tratamento crônico com losartan e captopril

O tratamento crônico com losartan foi conduzido de acordo com trabalhos prévios ^(73, 74). O losartan foi dissolvido em água e administrado através de ingestão hídrica, em dose aproximada de 30 mg/kg/dia durante 8 semanas de tratamento, iniciado imediatamente após a clipagem renal nos grupos hipertenso (2K1C) e SHAM.

O tratamento crônico com captopril foi conduzido de acordo com estudos prévios ^(75, 76). O captopril foi dissolvido em água e administrado através de ingestão hídrica, em dose aproximada de 60 mg/kg/dia, durante 8 semanas de tratamento, iniciado imediatamente após a clipagem renal nos grupos hipertenso (2K1C) e SHAM.

Foram controlados, semanalmente, o peso corporal e a pressão arterial sistólica em todos os grupos estudados.

2.4 Medida da pressão arterial caudal

Para a medida da pressão arterial sistólica, os animais foram colocados em gaiolas aquecidas à 37°C por 20 min, para provocar dilatação dos vasos caudais.

Após este período, os animais foram colocados em contensor, modelo 1262 (Narco Bio Systems, Texas, EUA). Na cauda do animal adaptou-se um manguito acoplado a sistema de microfones capaz de captar sinais de 0.5 mv de amplitude. As oscilações foram registradas através do osciloscópio modelo CS 4025 (Kenwood Corporation, Japão). O manguito foi inflado até 200 mmHg de modo a não se visualizarem as pulsações. Logo após o manguito era desinsuflado até reiniciarem as pulsações, e o valor da pressão arterial era lido no manômetro. As medidas foram consideradas válidas quando não houve variações significantes, isto é, acima de 2 mmHg ⁽⁷⁷⁾.

2.5 Estudo morfológico quantitativo da bexiga urinária

2.5.1 Histologia

As bexigas de animais 2K-1C e SHAM foram isoladas e fixadas em formalina tamponada com fosfato (10%) por 24 h. Após exame macroscópico, as bexigas foram cortadas pela metade, e ambas as metades foram desidratadas, diafanizadas em xilol e embebidos em parafina. As secções transversais (4 μ m) foram cortadas e coradas com hematoxilina e eosina (H & E) e tricrômico de Masson (MT).

2.5.2 Imunohistoquímica

Secções de tecido (4 µm) foram marcadas para actina de músculo liso (SMA) e da proteína S100 por um método de imunoperoxidase. Resumidamente, dois cortes de 4 µm de espessura foram obtidos, colocados em lâminas silanizadas,

desparafinizados em xilol e reidratados. A atividade da peroxidase endógena foi interrompida através da incubação das lâminas com H₂O₂ 3% por 10 min. A recuperação de antígenos foi realizada pelo aquecimento das lâminas em tampão citrato (10 mM, pH 6,0) à 95 °C por 30 min. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-SMA (Clone1A4, Dako, diluído a 1:100) e anti-S100 (policlonal de coelho, Dako, diluído a 1:400). O antígeno-anticorpo foi detectado através do sistema Advance (Dako). A coloração foi realizada com 3,3-tetracloreto de diamonobenzidina (Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.) e contra-corado usando-se hematoxilina. Todas as reações foram realizadas utilizando-se controles positivos e negativos.

2.5.3 Histomorfometria

As imagens digitais a partir de H & E, MT e imunohistoquímica foram obtidas utilizando-se uma câmera digital (Leica DFC360 FX, Leica, Alemanha) conectada a um microscópio de campo claro (Leica DM5000 B). As imagens (H & E) de baixa ampliação foram usadas para determinar a área média da secção transversal ("Área") e espessura da parede da bexiga ("BWT"). O conteúdo de colágeno ("C") na parede da bexiga foi determinado utilizando-se imagens coradas por tricrômico de Masson, enquanto que de músculo liso (SM) e de tecido neural (NT) foram obtidos, utilizando-se imagens de imunoistoquímica (oito imagens aleatórias dos campos de média potência - 200X), e expressa como porcentagem de densidade de SM, C e NT (conteúdo por mm² de tecido analisado). Os parâmetros citados acima, foram avaliados por meio de software de análise de imagem NIH - ImageJ

1,42 – o qual pode ser usado manualmente para as diferentes medições de "Área" e "BWT". Além disso, esse software pode ser configurado para detectar a intensidade da escala de cinza em imagens, permitindo assim a segmentação automática de áreas de interesse em MT ou imagens histoquímica (como em C, SM e medições de densidade NT).

2.6 Análise funcional do detrusor isolado

2.6.1 Isolamento e montagem dos tecidos

Os ratos foram sacrificados por inalação de CO₂ com posterior decapitação e exsanguinação. A bexiga foi rapidamente isolada e colocada em solução nutritiva de Krebs-Henseleit (mM): NaCl (117), KCl (4.7), CaCl₂ (2.5), MgSO₄ (1.2), NaHPO₄ (1.2), NaHCO₃ (25) e C₆H₁₂O₆ (11), pH 7.4 a 37°C. A bexiga foi dividida em duas partes: base (trígono e parte da uretra) e ápice (detrusor). Depois de isolado o detrusor, cortou-se o tecido em *strips* de aproximadamente 2 X 2 X 10 mm. Estes foram montados em câmaras para órgão isolado (10 mL, volume) preenchidas com solução de Krebs-Henseleit, continuamente gaseificada com O₂:CO₂ (95:5%), mantidas à temperatura de 36,5°C e pH entre 7,3 a 7,5.

Os *strips* foram suspensos através de fio de algodão, sendo que uma das pontas foi conectada a um transdutor de força. A tensão aplicada aos tecidos (20 mM) foi periodicamente ajustada até a estabilização, e a solução nutritiva de Krebs-Henseleit trocada a cada 15 min durante o período de 1 h. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (AD Instruments,

Austrália) e registradas em sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (software versão 6.0, AD Instruments, Austrália).

2.6.2 Protocolos experimentais

Avaliação do efeito contrátil ao agonista muscarínico carbacol

Foram realizadas curvas concentração-efeito ao agonista pleno carbacol (1 nM – 1 mM) em detrusor de ratos SHAM e 2K-1C, tratados ou não com losartan ou captopril. Ao final de cada experimento, os *strips* foram pesados para se corrigir o efeito máximo por peso úmido de tecido, sendo a resposta contrátil expressa em mN/mg tecido úmido. Foram determinadas a potência (pEC₅₀) e a resposta máxima (E_{max}).

Avaliação dos efeitos relaxantes aos agonistas β-adrenérgicos

O relaxamento aos agonistas β-adrenérgicos foi avaliado no detrusor précontraído com KCl (80 mM) na presença da fentolamina (antagonista αadrenérgico) e do 17-β-estradiol (5 μ M; bloqueador extraneuronal). Após atingir a resposta contrátil máxima, foram construídas curvas concentração-resposta ao agonista β-adrenérgico não-seletivo, isoproterenol (1 nM – 100 μ M), β₂-seletivo, metaproterenol (1 nM – 100 μ M) ou β₃-seletivo, BRL37-344 (1 nM – 100 μ M) em ratos controles, 2K-1C. Foram também construídas curvas concentração-resposta ao doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP) e ao estimulador direto da guanilil ciclase solúvel independente de NO, BAY 41-2272. Os relaxamentos induzidos pelos agonistas β-adrenoceptores, SNP e BAY 41-2272 foram calculados como porcentagem da contração induzida pelo KCI (80 mM).

Avaliação da resposta contrátil ao CaCl₂

Para avaliação dos efeitos diretos do CaCl₂, utilizou-se o protocolo experimental descrito por Lagaud et al. ⁽⁹⁷⁾. Inicialmente, os tecidos foram contraídos com KCl (80 mM) para determinação da contração máxima dos mesmos. Em seguida, a solução nutritiva de Krebs foi substituída por Krebs desprovido de cálcio na presença de EGTA (1 mM), para a total remoção do cálcio do meio. Em seguida, foi adicionado ao banho 1 μ M de carbacol para a remoção do cálcio do cálcio do retículo sarcoplasmático. Os tecidos foram novamente lavados com Krebs desprovido de cálcio contendo EGTA, e em seguida foram incubados por 20 min com o inibidor da Ca²⁺-ATPase, o ácido ciclopiazônico (CPA; 10 μ M). Após este período, o Krebs foi substituído por uma solução de KCl (80 mM) desprovida de cálcio. O CPA foi adicionado novamente ao banho, e após 15 min, curvas concentração-efeito ao CaCl₂ (0,01 – 100 mM) foram construídas.

Resposta contrátil ao KCI

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas (1 – 300 mM) em detrusor de ratos SHAM e 2K-1C. Para a realização destas curvas foi preparada uma solução estoque de KCI 3 M.

Curva freqüência-resposta

O detrusor de ratos SHAM e 2K-1C, tratados ou não com captopril ou losartan, foram isolados e montados em um sistema de ganchos para estimulação elétrica. Os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 80 V, duração de 0,2 ms por 10 s nas frequências de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 Hz com intervalo de 2 min entre os pulsos.

Avaliação da resposta contrátil do agonista purinérgico α,β-metileno-ATP

Foram realizadas curvas concentração-respota não cumulativas (1 -100 μ M) ao agonista purinérgico P2X, $\alpha\beta$ -metileno-ATP. Entre as concentrações da substância adicionada à cuba, os tecidos foram lavados várias vezes para evitar a dessensibilização do receptor purinérgico.

2.7 Parâmetros Farmacológicos

As respostas contráteis dos agonistas foram medidas em mN e comparadas em relação ao peso do *strip* (mg). O logaritmo das concentrações molares dos agonistas foi colocado em abcissas e a porcentagem do efeito em ordenadas. Os gráficos foram traçados e analisados através do programa computacional GraphPad PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores de potência (pEC₅₀) e respostas máximas (E_{máx}) foram calculados pela seguinte equação:

 $E = Emax/[(1+(10^{c}/10^{x})^{N} + \Phi])$, onde E é elevação do tônus basal, E_{max} é a máxima resposta que o agonista pode produzir, "c" é o logaritimo da EC_{50} , que é a

contração do agonista que produz 50% da resposta máxima; "x" é o logaritmo da concentração do agonista, o expoente, "N", significa a inclinação da curva concentração-resposta e Φ é a resposta observada na ausência do agonista. As análises de regressões não lineares para determinar os parâmetros E_{max}, logEC₅₀ e o "n" foram feitas utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism, considerando o parâmetro Φ como zero.

2.8 Análise cistométrica

Os ratos foram anestesiados com uretano (1.8 g/kg; i.p). A artéria carótida foi catetizada com cateter PE-10. Posteriormente, a bexiga urinária foi catetizada utilizando-se cateter PE-50. O cateter foi conectado a uma bomba de infusão de salina e a um transdutor de pressão para registro das mudanças pressóricas dentro da bexiga. As respostas miccionais foram obtidas pela infusão contínua de salina (0,9% NaCl) com uma velocidade de 4 mL/hora à 22-28°C. Os registros foram realizados em um tempo de 30-35 min após o início da infusão de salina.

Os dados foram analisados *off-line* utilizando os programas: Excell, Origin (versão 7), Instat e Graph Prism 5 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). Os parâmetros cistométricos utilizados foram: pressão de micção (PM, definido como a pressão em mmHg no momento da micção); pressão limiar (PL, definido como a pressão em mmHg imediatamente antes do início da micção); contrações não-miccionais (CNMs, definido como as contrações involuntárias da bexiga que não sucederam-se em uma micção, contrações < 4mmHg da pressão basal); IC (tempo entre dois ciclos miccionais); PB (Pressão basal logo após a colocação do

cateter intravesical); Capacidade (capacidade da bexiga em mL até o momento da micção).

2.9 Técnica de PCR em Tempo Real (Real Time PCR)

2.9.1 Extração de RNA

Para obtenção do RNA da bexiga dos ratos (SHAM e 2K1C) utilizamos o método de extração com o reagente TRIzol (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) de acordo com as instruções do fabricante. A bexiga foi incubada em TRIzol por 5 min à temperatura ambiente, para completa dissociação dos complexos núcleoprotéicos; 200 µl de clorofórmio (CHCl₃) foi adicionado e agitado vigorosamente e incubado por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado e o RNA precipitado pela adição de 500 µl de isopropanol. Após 10 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (19.000 g, 10 min à 4°C). Os sobrenadantes foram descartados e o pellet de RNA foi lavado com 800 µl de etanol 75%. Após centrifugação (14000 g, 5 min à 4°C), os sobrenadantes foram desprezados, e os tubos foram invertidos e apoiados sobre gazes para eliminar restos de etanol. Posteriormente, o RNA foi dissolvido em água estéril contendo dietilpirocarbonato (DEPC), incubado a 55 °C por 10 min e colocado em gelo para solubilização total do RNA. A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel desnaturante 1,2 %. As amostras com gualidade adeguada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18S e 28S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80 °C.

2.9.2 Síntese de DNA Complementar (cDNA).

As amostras de RNA foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Superscript III RT^{TM} (Invitrogen, Life Technologies). A verificação da síntese de cDNA foi feita através de PCR para amplificação do gene da β -actina.

2.9.3 Desenho dos Primers

Os *primers* utilizados nas reações foram desenhados com o uso do site <u>www.invitrogen.com</u> e com o software "Primer Express" (Applied Biosystems), analisados no programa *Blast* (<u>www.ncbi.nlm.nih.gov/blast</u>) para verificação das condições de formação de estruturas como *hairpins* e *dimers*. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados na tabela 1.

Tabela	1 -	- Seqüência	е	tamanho	dos	fragmentos	amplificados	de	cada	par	de
primer											

Gene	Seqüência Primer	Tm	
M2 -F	5' TAGTTGGGTCGTCGGGTCAG 3'	80	
M2- R	5' CTTCACGATTTTGCGGGC 3'		
M3 - F	5' CCCACAGGCAGTTCTCGAA 3'	82	
M3- R	5` GAACCAGAAGTGACAGCGACC 3′		
β – actina – F	5'-GCAATGAGCGGTTCCGAT -3'	84	
β – actina - R	5'-TAGTTTCATGGATGCCACAGGAT -3'	04	

2.9.4 Padronizações necessárias para o PCR Quantitativo em tempo real:

concentração e eficiência do Primer

Utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers* (sense e anti-sense) na concentração final de 70 nM, 150 nM, 300 nM e 600 nM. A eficiência foi determinada utilizando-se a concentração ótima de *primer* com 7 concentrações conhecidas de amostra, em escala logarítimica: 2 ng (2x10⁰), 6,32 ng (2x10^{0,5}), 20 ng (2x10¹), 63,2 ng (2x10^{1,5}), 120 ng, 200 ng (2x10²) e 632 ng (2x10^{2,5}). Os resultados são utilizados para construção da curva padrão Ct *versus* quantidade de amostra. Para que a qRT-PCR seja confiável e reprodutiva são necessárias que as amplificações apresentem 95-100% de eficiência de amplificação (coeficiente de correlação de Pearson ou R2, onde r deve ser >0,95, o qual é a reflexão da eficiência da amplificação da qRT-PCR), a cada ciclo em duplicata e inclinação da reta ou Slope entre -3,1 e 3,6 (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração de primers utilizadas na amplificação dos genes de estudo e eficiência de amplificação obtida.

Primer	Concentração Utilizada	Eficiência do primer
M2	50 nM	100%
M3	150 nM	99,1%
β – actina	70 nM	100%

2.9.5 PCR Quantitativo em tempo real – "Real Time PCR"

As reações, feitas sempre em duplicata, foram realizadas utilizando o reagente SYBERGreen PCR Master Mix® (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCl2, tampão, Taq Ampli-Gold), contém o corante SYBERGreen, componente intercalante de dupla fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo. Além disso, utiliza-se amostras de cDNA e *primers* específicos para o gene analisado. A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System® (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência *versus* número de ciclos. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) é denominado ciclo de *threshold* ou Ct. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre amplificação e, consequentemente, menor é o Ct.

As reações realizadas continham 6 µl do reagente SYBERGreen PCR Master Mix®, 5 ng de amostra de cDNA e a concentração ótima de *primer* determinada, perfazendo um volume final de 12 µl. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 95 °C/ 10 min, seguido de 45 ciclos: 95 °C/ 15 segundos – 60 °C/ 1 min. Ao final de uma amplificação normal adiciona-se um passo de degradação durante o qual a temperatura aumenta gradualmente de 60 °C para 95 °C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, cai o sinal

fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de TM (*melting temperature*) entre os produtos de PCR amplificados, essa diferença é causada pelo número e composição de bases de cada produto.

2.9.6 Quantificação e normalização das amostras pelo método geNorm version 3.4

A expressão dos genes de interesse foi quantificada e normalizada com relação a dois genes controles ou calibradores (β -*ACTINA* e *GAPDH*). Estes são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. Para tanto, após a exportação dos valores dos CTs obtidos, para uma planilha *Excel* (Microsoft Corporation, USA), foi calculada a média aritmética do CT das duplicatas. A seguir foi obtida a quantidade de expressão (Q), por meio da fórmula Q = E^{Δ CT}, onde E = eficiência de reação e Δ CT= menor CT observado – CT de cada amostra. Desta forma, a expressão gênica foi relacionada à amostra que apresentou maior expressão (menor CT observado).

Os valores Q dos genes calibradores de cada amostra foram submetidos ao método *geNorm* (*Program geNorm version 3.4*) ^(78, 79), que calcula a média geométrica entre eles, valor este denominado fator de normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra foi dada pela razão entre o valor Q do gene de interesse da amostra e o fator de normalização da mesma.

2.10 Determinação dos níveis de AMPc

Para determinação dos níveis de AMPc em detrusor isolado de ratos, os fragmentos foram equilibrados durante 30 min em solução de Krebs continuamente oxigenada à 37°C. Os tecidos foram então estimulados por 15 minutos com isoproterenol (10 μ M), metaproterenol (10 μ M), BRL37-344 (10 μ M) ou nitroprussiato de sódio (SNP, 100 μ M; controle negativo). Em seguida, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, pulverizados, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA, 5%) e centrifugados a 1500g por 10 min à 4°C. O TCA foi extraído das amostras através de três lavagens com solução de éter saturado com água. A preparação do *tracer*, amostras, padrões e incubação com anticorpo foram realizados conforme descrito no kit disponível comercialmente (Cayman Chemical Cyclic AMP EIA kit, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.11 Análise estatística

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

3. Resultados

3.1 Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS)

Na primeira semana pós-clipagem renal os animais já apresentaram aumento significante da PAS em relação ao grupo controle, mantendo-se significantemente elevada até a 8ª. semana (Figura 5). Os animais do grupo SHAM permaneceram normotensos durante todo o estudo (Figura 5).



Figura 5. Valores da pressão arterial sistólica (PAS) de animais SHAM e 2K-1C. Os dados representam media ± erro padrão da média de 20 animais. ***P<0,001; **P<0,01 comparado com os respectivos tempos do grupo SHAM.

3.2 Avaliação cistométrica (in vivo)

Analisamos a função miccional de animais 2K-1C e SHAM anestesiados 8 semanas após a cirurgia (Figura 6A). Os animais hipertensos apresentaram alterações urodinâmicas bastante evidentes (Figura 6A) tais como redução do intervalo entre as contrações (IC; Figura 6E); aumento da capacidade da bexiga

urinária (Figura 6G) e aumento do número de contrações que não geram micção (CNM; Figura 6C). Não se observou diferenças na amplitude da pressão de micção, da pressão limiar e da pressão basal entre os dois grupos experimentais (Figuras 6B, D e F).



Figura 6 – Avaliação cistométrica em ratos SHAM e hipertenso 2K-1C. (A) registros cistométricos; (B) Pressão basal; (C) Contrações não miccionais (CNMs); (D) Pressão limiar; (E) Intervalo entre as contrações miccionais (IC); (F) Pressão de micção; (G) Capacidade da bexiga. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média de 6 animais. *P<0,05; **P<0,01 comparados com os respectivos grupos SHAM.
3.3 Análise histomorfométrica

No estudo histomorfométrico verificamos que as bexigas urinárias dos animais hipertensos renovasculares apresentaram diferenças significantes em relação ao grupo controle. Essas diferenças se referem à maior espessura da parede da bexiga, da densidade de tecido neural, do volume intravesical e da densidade de musculatura lisa (Tabela 3). Observamos uma tendência de maior deposição de colágeno nos animais 2K1C em relação ao grupo controle SHAM. Analisando a proporcionalidade peso corporal / peso da bexiga, não encontramos diferenças significantes entre o grupo 2K1C e o SHAM (Tabela 3).

Tabela 3. Peso corporal, peso da bexiga e análise morfométrica em ratos controles e 2K-1C.

Parametros	Controle	2K-1C
Peso bexiga (PB; mg)	163,2 ± 22,6	171,1 ± 20,4
Peso corporal (PC; g)	448,2 ± 38,4	463,4 ± 29,8
PB / PC	$2,74 \pm 0,19$	$2,70 \pm 0,18$
Espessura da parede da bexiga (mm)	$1,12 \pm 0,04$	$1,39 \pm 0,04^{**}$
Densidade de musculo liso (%)	$0,59 \pm 0,02$	$0,82 \pm 0,02^{**}$
Densidade de colágeno (%)	$0,12 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$
Colágeno/Músculo liso	0,2 ± 0,01	$0,2 \pm 0,02$
Densidade tecido neural (%)	$0,02 \pm 0,002$	$0,07 \pm 0,01^{**}$

Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 6 ratos por grupo . P<0,05; $*^{*}P<0,01$ comparado ao grupo controle (t- test bicaudal).

3.4 Avaliação funcional in vitro

3.4.1 Curva freqüência-resposta em detrusor isolado de ratos

A estimulação elétrica produziu resposta contrátil dependente da freqüência em detrusor de ambos os grupos, sendo a resposta máxima alcançada na freqüência de 16 Hz. Entretanto, a contração do detrusor no grupo 2K-1C foi significantemente maior quando comparada ao grupo SHAM nas frequências acima de 4 Hz (Figura 7).



Figura 7 – Curva frequência-resposta (1-32 Hz) em detrusor isolado de ratos SHAM e 2K-1C. Os dados estão expressos como amplitude de contração (mN) produzida pelas diferentes freqüências de estimulação / peso do *strip* (mg). Os resultados são a média ± erro padrão da média de 7 animais. *P<0,05 comparado com o grupo controle.

3.4.2 Curva concentração-resposta ao agonista muscarínico, carbacol

A contração máxima induzida pelo carbacol no detrusor do grupo 2K-1C foi maior comparada ao grupo SHAM (P<0,05; Figura 8, A e C), sem alterações na potência entre os dois grupos (5,38 ± 0,03 e 5,58 ± 0,08; respectivamente). A incubação do tecido por 30 min com o inibidor da enzima Rho-kinase (Y27632, 10 μ M) diminuiu a E_{max} e a pEC₅₀ em ambos os grupos (Figura 8B). No entanto, o detrusor dos ratos 2K-1C continuaram hiperativos em relação ao grupo SHAM + Y27632 (P<0,05; Figura 12, B e C), mas sem alterações significantes da pEC₅₀ $(5,01 \pm 0,06 \text{ e} 5,06 \pm 0,12 \text{ para SHAM e 2K-1C, respectivamente}).$



Figura 8 – Curva concentração-resposta ao carbacol (CCh) em detrusor isolado de rato SHAM e 2K-1C. (A) Curva concentração-resposta ao carbacol; (B) Curva concentração-resposta ao carbacol na presença do Y27632 (10 μ M, 30 min); (C) Valores de resposta máxima (E_{max}) ao carbacol na presença e na ausência do Y-27632. Os dados foram expressos como amplitude de contração (mN) / peso do strip (mg). Os resultados são a média ± erro padrão da média de 7 animais. *P<0,05 comparado com o respectivo grupo SHAM ou 2K-1C. [#]P<0,05 comparado com os respectivos grupos SHAM.

3.4.3 Curva concentração-resposta ao cloreto de potássio

Neste protocolo experimental avaliamos a resposta contrátil do detrusor independentemente da ativação de receptores. A adição de KCI (1-300 mM) produziu contrações concentração-dependentes. Entretanto, não notamos diferenças significantes na resposta contrátil do detrusor de ratos hipertensos renovasculares em comparação com o grupo controle SHAM (Figura 9).



Figura 9 - Curva concentração-resposta ao cloreto de potássio (KCI) em detrusor isolado de ratos SHAM e 2K-1C. Os dados foram expressos como amplitude de contração (mN) / (mg). Os resultados são a média ± erro padrão da média de 5 animais.

3.4.4 Curva concentração-resposta ao cloreto de cálcio (CaCl₂)

Neste protocolo buscamos avaliar se a sensibilidade ao íon cálcio proveniente do meio extracelular estava modificada no detrusor dos ratos hipertensos renovasculares. Nossos resultados mostram que o CaCl₂ produziu resposta contrátil concentração-dependente em ambos os grupos. Entretanto, não encontramos diferenças significantes nos parâmetros de pEC₅₀ e E_{max} entre os grupos SHAM e 2K-1C (Figura 10).



Figure 10 - Curva concentração-resposta ao cloreto de cálcio (CaCl₂) em detrusor isolado de ratos SHAM e 2K-1C. Os valores de pEC_{50} estão mostrados no interior do gráfico. Os dados foram expressos como amplitude de contração (mN) produzida pelas diferentes concentrações de CaCl₂ / peso do strip (mg). Os resultados são a média ± erro padrão da média de 6 animais.

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

Neste protocolo experimental, avaliamos a contração do detrusor induzida pela ativação dos receptores purinérgicos P2X_{1/2}. Nossos resultados mostraram que não há diferenças significantes entre os grupos 2K1C e SHAM (Figura 11).



Figura 11 - Curvas concentração-resposta ao α,β -metileno-ATP (α,β -metileno-ATP) em detrusor isolado de ratos SHAM e 2K-1C. Os dados foram expressos como amplitude de contração (mN) produzida pelas diferentes concentrações de α,β -metileno-ATP / peso do strip (mg). Os resultados são a média ± erro padrão da média de 5 animais.

3.4.6 Curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) e BAY 41-2272

Utilizamos o SNP (doador de NO) e o BAY 41-2272 (ativador da guanililciclase solúvel independente de NO) em tecidos pré-contraídos com KCI (80 mM) para se estudar eventuais disfunções na via NO/GMPc no detrusor. Ambos, SNP e BAY 41-2272, causaram relaxamentos dependentes da concentração em detrusor de animais SHAM e 2K-1C. No entanto, não encontramos diferenças, ao nível de pEC₅₀ e E_{max} no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 ou SNP nos grupos 2K-1C e SHAM (Figura 12, A e B).



Figure 12 - Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP, painel A) e ao BAY 41-2271 (painel B) em detrusor isolado de ratos SHAM e 2K-1C. Os valores de pEC₅₀ estão mostrados no interior do gráfico. Os resultados são a média ± erro padrão da média de 7 animais.

3.4.7 Relaxamento de detrusor isolado mediado por β-adrenoceptores

O isoproterenol (agonista β não seletivo), o metaproterenol (agonista seletivo β_2) e o BRL 37-244 (agonista seletivo β_3) produziram relaxamentos dependentes da concentração em detrusor de ratos controles e 2K-1C. Entretanto, a resposta relaxante foi significantemente menor no grupo 2K-1C para os três agonistas usados (Figura 13). Quanto à pEC₅₀, a potência foi maior para o BRL 37-344 seguido pelo isoproterenol e metaproterenol; entretanto, não notamos diferenças significantes entre os grupos SHAM e 2K-1C(Figura 13).



Figure 13 - Curvas concentração-resposta ao isoproterenol (painel A), metaproterenol (painel C) e BRL 37-344 (painel B) em detrusor isolado de ratos SHAM e 2K-1C. Os valores de pEC_{50} estão mostrados no interior dos gráficos. Os resultados são a média ± erro padrão da média de 7 animais.

3.4.8 Níveis intracelulares de AMPc em detrusor isolado

No grupo SHAM, a incubação do detrusor com isoproterenol (10 μ M), metaproterenol (10 μ M) e BRL 37-344 (10 μ M) aumentou significantemente a concentração intracelular de AMPc em relação ao basal (aumento de 180%, 209% e 127%, respectivamente; P<0,05; n=4). No grupo 2K-1C, a concentração de AMPc no detrusor isolado, quando estimulado pelos três agonistas βadrenérgicos, foi significantemente menor comparado ao grupo SHAM. Como esperado, o SNP (100 μ M) não modificou a concentração basal de AMPc (Figura 14).



Figura 14 – Determinação intracelular de AMPc em detrusor isolado de ratos controles e 2K-1C. Os detrusores foram estimulados com isoproterenol (10 μ M), metaproterenol (10 μ M), BRL 37-344 (10 μ M) ou SNP (100 μ M). Os dados representam média ± erro padrão da média de 4 animais. [#]P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle; *P<0,05 comparado com o nível basal.

3.4.9 Expressão de RNAm dos receptores muscarínicos M3 e M2

A expressão gênica do receptor muscarínico M2 no detrusor mostrou-se maior do que a de M3 (P<0,05) em ambos os grupos experimentais. Os animais 2K-1C apresentaram aumento significante na expressão do RNAm do receptor M3 em relação ao grupo controle SHAM (Figura 15). Em relação à expressão do receptor muscarinico M2, não notamos diferenças significantes entre os grupos analisados (Figura 15).



Figura 15 – Expressão de RNAm dos receptores muscarínicos M2 e M3. Os resultados representam média ± erro padrão da média de 6 animais. **P<0,01 comparado com o respectivo grupo controle.

3.5 Pressão arterial em ratos SHAM e 2K1C após tratamento crônico com

losartan ou captopril

O tratamento com losartan (30 mg/kg/dia) ou captopril (50 mg/kg/dia) nos grupos 2K-1C e SHAM foi iniciado imediatamente após a cirurgia de clipagem renal. A pressão arterial dos grupos analisados foi monitorada semanalmente por 8 semanas. Observamos que logo após a primeira semana pós-clipagem renal, tanto o tratamento com losartan (Figura 16B) quanto com captopril (Figura 16A), preveniu as elevações de PAS no animais 2K1C. Até a 8° semana após a cirurgia ambos os tratamentos preveniram a hipertensão arterial encontrada no grupo 2K1C (Figura 16 A e B). Porém após a 5° semana de tratamento, observou-se redução significativa da PAS dos animais tratados, tanto com captopril quanto com losartan, comparado ao grupo controle não tratado SHAM (Figura 16 A e B). Porém os tratamentos com antihipertensivos reduziram significativamente a pressão arterial tanto no grupo SHAM como no 2K-1C comparados com os animais não tratados.



Figura 16 - Valores da pressão arterial sistólica de animais SHAM e 2K1C em animais tratados com losartan (30 mg/kg/dia; painel B) ou captopril (60 mg/kg/dia; painel A). Os dados representam media ± erro padrão da média de 20 animais. ***P<0,001; **P<0.01 comparados com os animais 2K-1C; *P<0,05 comparado com o grupo controle SHAM.

3.5.1 Avaliação cistométrica após tratamento crônico com losartan ou captopril

Verificamos que o tratamento com losartan ou captopril tende a normalizar o perfil cistométrico dos animais 2K1C (Figura 17). Esta normalização se deve à redução da frequência de CNMs e da capacidade da bexiga. O intervalo entre as contrações miccionais (ICs) foi também normalizado. Para os demais parâmetros cistométricos (pressão basal, pressão limiar e pressão de micção) não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos analisados (Tabelas 4 e 5; Figura 17)



Figura 17 – Avaliação cistométrica após tratamento com losartan (30 mg/kg/dia) ou captopril (60 mg/kg/dia). Registros cistométricos representativos de animal SHAM, 2K-1C, 2K-1C tratado com losartan e 2K-1C tratado com captopril durante 8 semanas após a cirurgia, mostrando atenuação das alterações miccionais encontradas nos animais hipertensos.

Tabela 4 - Efeito protetor do tratamento com losartan (30 mg/kg/dia, 8 semanas) nas alterações urodinâmicas causadas pela hipertensão renovascular

Parâmetros Cistométricos	SHAM	2K-1C	SHAM + LOS.	2K-1C + LOS.
Capacidade (mL)	$1,0 \pm 0,09$	1,8 ± 0,2 *	$1,10 \pm 0,05$	$1,2 \pm 0,1$ #
Pressão de micção (mmHg)	$28,0 \pm 0,5$	$20,4 \pm 2,5$	$20,1 \pm 2,1$	$25,4 \pm 2,7$
Pressão limiar (mmHg)	$20,3 \pm 0,9$	$16,0 \pm 0,9$	$16,4 \pm 1,2$	$16,9 \pm 1,6$
Frequência de CNMs	$2,0 \pm 1,9$	14,5 ± 1,2 **	$2,0 \pm 0,8$	2,0 ± 1,5 ##
IC (min)	6.5 ± 1.5	1.68 ± 0.2 **	$5,4 \pm 1,2$	5.9 ± 0.9 ##
Pressão basal (mmHg)	$5,5 \pm 0,05$	$6,3 \pm 0,09$	$5,82 \pm 0,03$	$6,02 \pm 0,03$

Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média de 6 animais; (CNMs) contrações não miccionais; (IC) intervalo entre contrações. *P<0,05; **P<0,01, comparado com SHAM. #P<0,05, **P<0,01 comparado com respectivo grupo 2K-1C (não tratado).

Tabela 5 - Efeito protetor do tratamento com captopril (60 mg/kg/dia, 8 semanas) nas alterações urodinâmicas causadas pela hipertensão renovascular.

Parâmetros Cistométricos	SHAM	2K-1C	SHAM + CAP	2K-1C + CAP.
Capacidade (mL)	$1,22 \pm 0,09$	1,8 ± 0,2 *	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$ #
Pressão de micção (mmHg)	$28,0 \pm 0,5$	$25,4 \pm 2,5$	$24,1 \pm 2,1$	$22,4 \pm 3,6$
Pressão limiar (mmHg)	$18,3 \pm 0,8$	$16,0 \pm 0,9$	$16,4 \pm 1,2$	21,1 ± 1,6
Frequência de CNMs	$2,0 \pm 1,9$	14,5 ± 1,2 **	$2,0 \pm 0,7$	2,0 ± 1,2 ##
IC (min)	$5,5 \pm 1,5$	1,7 ± 0,2 **	$6,4 \pm 0,9$	6,6 ± 0,9 ##
Pressão basal (mmHg)	$5,51 \pm 0,05$	$6,32 \pm 0,09$	$5,83 \pm 0,03$	$6,05 \pm 0,03$

Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média de 6 animais; (CNMs) contrações não miccionais; (IC) intervalo entre contrações *P<0,05; **P<0,01, comparado com SHAM. #P<0,05, ##P<0,01 comparado com respectivo grupo 2K-1C (não tratado).

3.5.2 Resposta contrátil do detrusor induzida pelo carbacol após tratamento crônico com losartan ou captopril

A hipercontratilidade do detrusor nos animais 2K-1C obtida com o carbacol foi normalizada após o tratamento com losartan ou captopril (Figura 18). Os valores de pEC₅₀ e de E_{max} estão mostrados na tabela 6.



Figura 18 – Efeito do tratamento crônico com losartan (painel A) ou captopril (50 mg/kg/dia; painel B) na contração induzida pelo carbacol em detrusor isolado de ratos SHAM e 2K-1C, tratados ou não com losartan (30 mg/kg/dia, 8 semanas) ou captopril (60 mg/kg/dia, 8 semanas). Os resultados são a média ± erro padrão da média de 7 animais.

Tabela 6. Valores de potência (pEC₅₀) e resposta máxima (E_{máx}) de curvas concentração-resposta ao carbacol em detrusor isolado de ratos após tratamento crônico com losartan ou captopril.

	pEC ₅₀	<i>E_{máx}</i> (mN ∕ mg)
SHAM	4,85 ± 0,04	7,76 ± 0,33
2K-1C	$4,93 \pm 0,04$	9,71 ± 0,42 **
SHAM – Iosartan	4,98 ± 0,04	$7,90 \pm 0,20$
2K-1C - Iosartan	$4,99 \pm 0,08$	7,59 \pm 0,60 $^{\#}$
SHAM – captopril	$4.96 \pm 0,06$	$7,65 \pm 0,64$
2K-1C - captopril	4,91 ± 0,06	$7,66 \pm 0,60^{*\#*}$

Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média de 6 animais. **P<0,01, comparado com grupo SHAM; # P<0,01 comparado com 2K1C não tratado.

3.5.3 Resposta contrátil do detrusor induzida pela estimulação elétrica em detrusor de animais tratados com losartan e captopril

A hipercontratilidade do detrusor frente à estimulação elétrica nos animais 2K-1C foi também normalizada após tratamento com losartan ou captopril (Figura 19).



Figura 19 – Efeito do tratamento crônico com Iosartan (painel A) ou captopril (painel B) na contração induzida pela estimulação elétrica em detrusor isolado de ratos SHAM e 2K-1C, tratados ou não com Iosartan (30 mg/kg/dia, 8 semanas) ou captopril (60 mg/kg/dia, 8 semanas). Curva frequência-resposta (2 a 32 Hz). Os resultados são a média ± erro padrão da média de 7 animais. *P<0,05 comparado com SHAM; #P<0,05 comparação com o grupo 2K1C (não tratado).

3.5.4 Relaxamento do detrusor induzido pelo isoproterenol em animais 2K1C

e SHAM tratados com losartan e captopril

Tanto o tratamento com losartan quanto com captopril preveniram a redução da resposta relaxante nas curvas concentração-resposta ao isoproterenol nos detrusores de ratos 2K-1C (Figura 20).



Figura 20 – Efeito do tratamento crônico com losartan (painel A) ou captopril (painel B) no relaxamento induzido pelo isoproterenol em detrusor isolado de ratos SHAM e 2K-1C, tratados ou não com losartan (30 mg/kg/dia, 8 semanas) ou captopril (60 mg/kg/dia, 8 semanas). Os resultados são a média \pm erro padrão da média de n=7 animais.

Tabela 7. Valores de potência (pEC ₅₀) e resposta máxima (E _{máx}) de curva	as
concentração-resposta ao isoproterenol em detrusor isolado de ratos pr	۰é-
contraídos com KCI (80 mM), após tratamento crônico com losartan o	วน
captopril.	

	pEC ₅₀	$E_{m\acute{a}x}$ (% relax.)
SHAM	6,22 ± 0,04	47,7 ± 1,0
2K-1C	$6,40 \pm 0,05$	36,4 ± 0,9 **
SHAM – Iosartan	$6,20 \pm 0,06$	50,1 ± 2,0
2K-1C - Iosartan	$6,10 \pm 0,08$	52,0 ± 2,0 ^{#**}
SHAM – captopril	$6,33 \pm 0,08$	$48,6 \pm 2,8$
2K-1C - captopril	6,41 ± 0,06	50,4 ± 2,7 ^{#**}

Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média de 6 animais. **P<0,01, comparado com grupo SHAM; # P<0,01 comparado com 2K1C não tratado.

4. Discussão

Este estudo mostrou pela primeira vez que ratos hipertensos renovasculares (2K-1C) apresentam disfunções miccionais caracterizadas por aumento do número e da freqüência das contrações não miccionais (CNMs), assim como da capacidade da bexiga. A avaliação histomorfométrica revelou aumento do volume, da espessura da parede e da densidade de músculo liso nos detrusores de ratos 2K-1C. Nossos estudos funcionais em detrusor isolado de ratos 2K-1C mostraram aumento das contrações induzidas pelo carbacol acompanhadas de elevação da expressão do RNAm do receptor muscarínico M3. Observamos também redução do relaxamento do detrusor ao isoproterenol, metaproterenol e BRL 37-344, com redução de AMPc nos ratos 2K-1C. Nossos resultados, no conjunto, indicam que a hipercontratilidade ao carbacol e a redução do relaxamento β-adrenérgico sejam responsáveis, ao menos em parte, pela disfunção miccional nos animais 2K-1C.

A contração neurogênica da bexiga reflete, parcialmente, a liberação dos neurotransmissores excitatórios. ACh ATP. provenientes е de fibras parassimpáticas, os quais são fundamentais para o esvaziamento da bexiga (80). A bexiga contém todos os tipos de receptores muscarínicos, mas os subtipos M2 e M3 são os mais abundantes ^(81, 82). O receptor muscarínico M2 está presente em maior quantidade na bexiga urinária; porém, funcionalmente, o receptor muscarínico M3 é reconhecido como o principal subtipo responsável pela ^(83, 84, 48). Dessa forma, a farmacoterapia com antagonistas contração muscarínicos, particularmente aqueles seletivos para os receptores M3 ⁽⁸⁵⁾, constitue a melhor estratégia terapêutica para as sintomatologias da bexiga

109

hiperativa e incontinência urinária. Há também evidência de que o ATP (atuando em receptores P2X₁) seja o responsável pelo componente contrátil resistente à atropina ⁽⁸⁶⁾. Este componente contrátil, purinérgico, resistente à atropina, pode contribuir para alguns tipos de disfunções miccionais, como a hiperatividade da bexiga secundária à obstrução parcial da uretra ⁽⁸⁷⁾. Em nossos estudos, a estimulação elétrica e o carbacol induziram uma resposta contrátil maior no detrusor dos animais 2K-1C comparado ao grupo SHAM. Contudo, não encontramos diferenças significantes para o agonista purinérgico α,β-metileno-ATP. Além disso, a expressão de RNAm do receptor muscarínico M3 em detrusor isolado dos animais 2K-1C mostrou-se significantemente maior do que no grupo SHAM. Por outro lado, a expressão do RNAm do receptor M2 não apresentou mudanças entre os grupos. Esses resultados sugerem que a hiperatividade do detrusor encontrada nos animais 2K-1C seja devido ao aumento da expressão do RNAm dos receptores muscarínicos M3 no detrusor, sem contribuição dos receptores purinérgicos P2X.

A ACh estimula os receptores muscarínicos M3 causando contração direta do detrusor via interação com proteína Gq, à qual promove hidrólise do fosfoinositol e conseqüente geração do secundo mensageiro inositol trifosfato IP₃ (inositol trifosfato), que ativa os receptores de IP₃ do retículo sarcoplasmático, liberando Ca²⁺ para o meio citosólico ⁽⁸⁸⁾. A contratilidade do músculo liso vascular não é regulada somente pelo Ca²⁺ intracelular, mas também por mecanismos independentes de Ca²⁺. Além da ativação da quinase da cadeia leve de miosina (quinase-CLM) pelo aumento citosólico de Ca²⁺, o estado fosforilado da CLM é

controlado pela fosfatase da miosina. A proteína G, RhoA e sua subunidade catalítica Rho-quinase desenpenham um importante papel na regulação da atividade da quinase-CLM no músculo liso ⁽⁸⁹⁾, incluindo o trato urinário baixo ⁽⁹⁰⁾. A inibição da Rho-quinase relaxa músculo liso contraído e reduz a pressão arterial ⁽⁹¹⁾. Em nosso trabalho, o inibidor da enzima Rho-quinase Y27632 reduziu significantemente a contração do detrusor induzida pelo carbacol no grupo controle, o que é consistente com estudos prévios em bexiga urinária ^(92, 46, 93). Porém, nos animais 2K-1C, o detrusor continuou hiperativo na presença do Y27-632, sugerindo que a via de sinalização RhoA/Rho-quinase não exerce um papel importante no aumento da resposta ao carbacol em detrusor isolado de ratos hipertensos renovasculares.

Está bem estabelecido que o Ca^{2+} regula vários complexos processos celulares, incluindo a ativação celular, a proliferação e a apoptose. O nível de Ca^{2+} intracelular $[Ca^{2+}]_i$ é controlado pelo balanço entre o Ca^{2+} que entra na célula e o Ca^{2+} que sai da célula ⁽⁹⁴⁾. O canal de Ca^{2+} voltagem dependente do tipo L é encontrado na membrana plasmática de células excitáveis e não excitáveis. Após ativação desse canal, ocorre influxo de Ca^{2+} , que é necessário para manter a elevação da $[Ca^{2+}]_i$ e para ativar os processos dependentes de Ca^{2+} (^{95, 26)}. Por isso, decidimos explorar a contribuição do Ca^{2+} extracelular via canal de Ca^{2+} voltagem dependente do tipo L na hiperatividade do detrusor de ratos 2K-1C. Concentrações elevadas de K⁺ extracelular despolarizam a membrana da célula e ativam os canais de Ca^{2+} do tipo L, levando à elevação da concentração de $[Ca^{2+}]_i$, que, por sua vez, ativa as proteínas contráteis ⁽⁹⁶⁾. A adição gradual de Ca^{2+}

solução de Krebs desprovida de Ca²⁺ promove contrações dependentes da concentração, em consequência do influxo de Ca²⁺ via canais de Ca²⁺ do tipo L ^(97, 98). Em nosso estudo, tanto o KCI quanto o Ca²⁺ extracelular produziram contrações do detrusor dependentes da concentração. Porém, não encontramos diferenças significantes na resposta contrátil a esses estímulos entre os grupos 2K-1C e SHAM, indicando que o influxo de Ca²⁺ extracelular, via canais de Ca²⁺ do tipo L, não exerce papel importante na hiperatividade do detrusor de ratos 2K-1C.

O relaxamento do detrusor via estimulação dos receptores β-adrenérgicos contribui para a fase de estocagem de líquido intavesical ^(66, 51). Na bexiga de ratos, a resposta relaxante é mediada pelos receptores β_2 e β_3 adrenérgicos ⁽⁵²⁾. Em nosso estudo, o isoproterenol, o metaproterenol e o BRL37-344 (agonista nãoseletivo, e β_2 e β_3 seletivos, respectivamente) produziram relaxamentos concentração-dependente do detrusor na seguinte ordem de potência: BRL37-344 > isoproterenol > metaproterenol. Assim, nossos dados indicam uma importância funcional maior para o receptor β_3 -adrenérgico em bexiga urinária de ratos. A relaxante isoproterenol, BRL37-344 e resposta ao metaproterenol foi significantemente menor no detrusor de ratos 2K-1C em comparação ao grupo SHAM. A via de sinalização intracelular da ativação dos receptores βadrenérgicos, incluindo o receptor β_3 , inclui a ativação da adenilil ciclase com conseqüente formação de AMPc (53, 51). No grupo 2K-1C, após estimulação do detrusor isolado com isoproterenol, metaproterenol e BRL37-344, obtivemos níveis de AMPc significantemente menores do que o grupo SHAM, confirmando que distúrbios da via adenilil ciclase-AMPc contribuem para as disfunções miccionais

112

em detrusores de ratos 2K-1C. A ativação do receptor M₂ pela acetilcolina age inibindo a adenilil ciclase e estimulando a síntese de PKC. A PKC inibe a fosfatase da MLC quinase, prejudicando o relaxamento tecidual dependente de AMPc, e favorecendo assim a permanência do tecido contraído. No entanto, não encontramos diferenças significativas na expressão do RNAm do receptor M2 na bexiga dos animias 2K1C e SHAM.

Evidências sugerem que disfunções na via NO/GMPc podem resultar em hiperatividade de bexiga ^(99, 67). Em camundongos com deficiência gênica da proteina quinase G (PKG) observou-se aumento das contrações não miccionais e diminuição do volume miccional ⁽¹⁰⁰⁾. Em nosso estudo, porém, o relaxamento do detrusor ao nitruprussiato de sódio (doador de NO) e ao BAY 41-2272 (ativador direto da guanilil ciclase solúvel independente de NO; ^{101, 36}) não foi diferente entre os grupos 2K-1C e SHAM, excluindo a possibilidade de a via NO/GMPc contribuir para a disfunção miccional encontrada nos animais 2K-1C.

Está comprovado que a ang II participa dos mecanismos fisipatológicos da hipertensão renovacular. Na bexiga, tem sido relatado que a ang II exerce importante papel na regulação celular, seja através da hipertrofia da musculatura lisa, seja na produção de tecido conjuntivo ⁽¹⁰²⁾. As análises histomorfométricas no presente estudo revelaram mudanças significantes na estrutura da bexiga dos animais 2K-1C, caracterizadas por aumento do volume, da espessura da parede e da densidade de musculatura lisa, resultados que são condizentes com o aumento da capacidade da bexiga nos animais hipertensos renovasculares. Esses resultados, somados aos dados cistométricos, sugerem que os animais 2K-1C

apresentam prejuízos no esvaziamento da bexiga, que podem ser decorrentes, por exemplo, de aumento da resistência uretral. Estudo prévio em ratos com disfunção esfincteriana secundária a danos neurológicos mostrou que o bloqueio dos receptores de angiotensina II, AT-1 e AT-2, diminuem a resistência uretral através do relaxamento do músculo liso uretral ⁽⁶⁹⁾.

Procuramos também avaliar se o tratamento com losartan (antagonista seletivo dos receptores AT-1) e catopril atenuam as disfunções miccionais encontradas nos animais 2K-1C. Nossos resultados mostraram que os tratamentos normalizaram a pressão arterial sistólica dos animais hipertensos renovasculares. Normalizaram também a hipercontratilidade do detrusor destes animais, tanto de origem neuronal (estimulação elétrica) quanto a muscarínica (curva concentração-reposta ao carbacol). O relaxamento β-adrenérgico que encontrava-se prejudicado nos animais 2K1C após o tratamento com os antihipertensivos, losartan e captopril, retornou ao nível do grupo controle SHAM.

Hoje se sabe que há vários peptídeos e enzimas que controlam a conversão de ang I em ang II, como as angiotensinas 1-9, 1-7, 1-5, III, IV, 3-7, a ECA2, a aminopeptidase (Amp), a dipeptidil-aminopeptidase (D-Amp), a prolil-peptidase (PEP), as carboxipeptidases (Cbp), as endopeptidases (NEP), a prolilcarboxipeptidase (PCP) e a quimase ^(103, 104, 105). Trabalhos prévios já mostraram que a ang II é prejudicial na bexiga ^(15, 69), e que o tratamento com captopril atenua a disfunção vesical em cães neonatos com obstrução parcial de uretra ⁽⁷⁰⁾. No entanto, nenhum estudo avaliou o efeito da inibição da ECA na disfunção miccional causada pela hipertensão renovascular. Nossos resultados

114

mostraram que o captopril melhora a disfunção miccional do modelo 2K-1C, normalizando a hipercontratilidade do detrusor frente à estimulação elétrica e ao carbacol, e a redução do relaxamento β -adrenérgico do grupo 2K-1C. No conjunto, os resultados do tratamento crônico com captopril e losartan indicam que as disfunções miccionais encontradas no modelo 2K-1C são devidas ao aumento persistente de ang II, que corrobora com outros modelos experimentais de hiperatividade de bexiga ^(15, 69, 70).

5. Sumário e conclusão

✓ A resposta contrátil do detrusor induzida por estimulação elétrica e pelo carbacol é maior em ratos hipertensos renovasculares. Por outro lado, a resposta contrátil induzida pelo α,β-metileno ATP, KCl e Ca²⁺ mostrou-se inalterada nestes animais;

 \checkmark A resposta relaxante do detrusor e os níveis intracelulares de AMPc induzidos pelos agonistas β-adrenérgicos é menor nos ratos hipertensos renovasculares;

 O detrusor de ratos hipertensos renovasculares apresentam aumento da expressão do RNAm dos receptores muscarínicos do subtipo M3, sem alteração do subtipo M2;

 \checkmark O tratamento com losartan ou captopril normalizou a hipertensão arterial dos ratos 2K-1C, assim como as disfunções miccionais destes animais (alterações urodinâmicas, hipercontratilidade do detrusor isolado ao carbacol e estimulação elétrica, bem como redução do relaxamento β -adrenérgico);

Concluímos que a hipertensão renovascular leva à hiperatividade do detrusor por aumentar a atividade contrátil e diminuir a atividade relaxante deste tecido, sendo tal resposta provavelmente devido à ativação do SRA.

117

6. Referências Bibliográficas

- 1. Preston R A, Epstein M (1997). Ischemic renal disease: An emerging cause of chronic renal failure and end-stage renal disease. *J Hypertens* 15:1365-1377.
- 2. Jacobson H R (1988). Ischemic renal disease: An overlooked clinical entity? *Kidney Int* 34:729-743.
- 3. Rimmer J M, Gennari F J (1993). Atherosclerotic renovascular disease and progressive renal failure. *Ann Intern Med* 118:712-719.
- 4. Greco B A, Breyer J A (1997). Atherosclerotic ischemic renal disease. *Am J Kidney Dis* 29:167-187.
- 5. Kendrick J, Chonchol M (2008). Renal Artery Stenosis and Chronic Ischemic Nephropathy: Epidemiology and Diagnosis. *Adv Chronic Kidney Dis*.15: 355-362.
- 6. Meyrier A, Hill G.S, Simon P. Ischemic renal diseases: New insights into old entities. Kidney International 1998; 54: 2-13.
- 7. Goldblatt H (1934). Renovascular hypertension due to renal ischemia. Circulation. 32:1-4.
- Huang w c, Ploth D W, Navar L G (1982). Angiotensin mediated alterations in nephron function in Goldblatt hypertension rats. Am J. Physiol. 243: 553-560.
- 9. Ploth D W (1983). Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney one-clip renal vascular hypertension. Am J Physiol. 245: 131-141.
- 10.Guyton A C (1991). Blood pressure control special role of the kidneys and body fluids. Science. 252: 1813-1816.
- 11.Cowley A W J (1992). Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol. Rev.* 72: 231-300.
- 12.Braam B, Navar L G, Mitchell K D (1995). Modulation of tubuloglomerular feedback by angiotensin II type receptors during the development of Goldblatt hypertension. *Hypertension* 25: 1232-1237.
- 13.Navar L G, Zou L, Thum A V, Wang C T, Imig J D, Mitchell K D (1998). Unraveling the mystery of goldblatt hypertension. *News Physiol Sci.* 13:170-176

- 14. Yamada S, Takeuchi C, Oyunzul L, Ito Y. Bladder Angiotennsin-II Receptors: Characterization and Alteration in Bladder Outlet Obstruction., 2009; 55: 482-490
- 15.Palmer L S, Lee C, Decker R S, Lang S, Kaplan W E, Firlit C F, Cheng E Y (1997). The effect of angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor antagonism on obstructed rat bladder. *J Urol.* 158: 1100-1104.
- 16.Boehm M, Nabel E G (2002). Angiotensin converting enzyme 2 a new cardiac regulator. *N Engl J Med.* 83: 235-239.
- 17.Santos R A, Ferreira A J (2007). Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. Curr Opin Nephrol Hypertens. 16: 122-128.
- Carey R M, Siragy H M (2003). Newly recognized components of the reninangiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* 24: 261-271
- 19. Rocks A J, van Geel P P, Pinto Y m, Buikema H, Henning R H, de Zeeuw D, van Glist W H (1999). Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renninangiotensin system. *Hypertension* 34: 296-301.
- 20.Dzau V J, Re R (1994). Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? *Circulation* 89: 493-498.
- 21.Paul M, Mehr P A, Kreutz R (2006). Physiology of local renin-angiotensin system. *Physiol Rev.* 86: 747-803.
- 22.Morrison J, Birder L, Craggs M, de Groat W C, Downie J, Drake M, Fowler C, Thor K. Neural control. In: Incontinence, eds. Abrams, O, Cardozo, L, Khoury, S, Wein, A, Jersey: Health Publications, Ltd, 363-422.
- 23. Fowler C J, Griffiths D, De Groat W C (2008). The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci*. 09:453-466.
- 24.De Groat W C, Saum W R (1976). Synaptic transmission in parasympathetic ganglia in the urinary bladder of the cat. *J Physiol.* **256**:137-158.
- 25.Nishizawa O, Matsuzaki A, Kohama T, Noto H, Nakamura H, Harada T, Tsuchida S (1987). Role of the pelvic nerve in the dynamics of micturition in the decerebrate dog as determined by suprapubic endoscopical and urodynamic evaluation. *J Urol.* 138:442-445.

- 26. Rivera L, Brading A F (2006). The role of Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release in the muscarinic-mediated contraction of mammalian urinary bladder smooth muscle. BJU Int. 98: 868-875.
- 27.Kondo s, Morita T, Tashima Y (1995). Muscarinic cholinergic receptor subtypes in human detrusor muscle studied by labeled and nonlabeled pirenzepine, AFDX-116 and 4DAMP. *Urol Int.* 54:150-153.
- 28.Longhurst P A, Leggett R e, Briscoe J A (1995). Characterization of the functional muscarinic receptors in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 116:2279-2285
- 29.Nishiguchi J, Hayashi y, Chancellor M B, De Miguel F, De Groat W C, Kumon H, Yoshimura N (2005) Detrusor overactivity induced by intravesical application of adenosine 5'-triphosphate under different delivery conditions in rats. *Urology.* 66:1332-1337.
- 30.Burnstock G, Satchell D G, Smythe A (1972). A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. *Br J Pharmacol.* 46:234-242.
- 31. Persson K, Andersson K E (1992). Nitric oxide and relaxation of pig lower urinary tract. *Br J Pharmacol*. 106:416-422.
- 32.Sergeant G P, Johnston L, Mchale N G, Thornbury K D, Hollywood M A (2006). Activation of the cGMP/PKG pathway inhibits electrical activity in rabbit urethral interstitial cells of Cajal by reducing the spatial spread of Ca2+ waves. J Physiol. 574:167-181.
- 33.Moncada S, Reesd D, Schulz R, Palmer R M J (1991). Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilator after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 2166-2170.
- 34.Stuehr D J (2004). Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr* 134: 2748-2751.
- 35.Proskuryakov S Y, Konoplyannikov A G, Skvortsov V G, Mandrugin A A, Fedoseev V M (2005). Structure and activity of NO synthase inhibitors specific to the L-arginine binding site. *Biochemistry* 70: 8-23.
- 36.Báu F R, Mónica F Z, Priviero F B, Baldissera L Jr, de Nucci G, Antunes A (2010). Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent

soluble guanylil cyclase stimulator BAY 41-2271 in isolated detrusor smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 637: 171-177.

- 37.Honda K, Miyata-Osawa A, Takenaka T (1985). alpha 1-Adrenoceptor subtype mediating contraction of the smooth muscle in the lower urinary tract and prostate of rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 330:16-21.
- 38.Morgan C, De Groat W C, Nadelhaft I (1986).The spinal distribution of sympathetic preganglionic and visceral primary afferent neurons that send axons into the hypogastric nerves of the cat. J Comp Neurol 243:23–40.
- 39. Morita T, Dohkita S, Kondo S, Nishimoto T, Hirano S, Tsuchida S (1990). Cyclic adenosine monophosphate production and contractile response induced by beta-adrenoceptor subtypes in rabbit urinary bladder smooth muscle. *Urol Int.* 45:10-15.
- 40.Oshita M, Hiraoka Y, Watanabe Y (1997). Characterization of betaadrenoceptors in urinary bladder: comparison between rat and rabbit. *Br J Pharmacol.* 122:1720-1724.
- 41. Thor K B, Morgan C, Nadelhaft I, Houston M, De Groat W C (1989). Organization of afferent and efferent pathways in the pudendal nerve of the female cat. *J Comp Neurol* 288:263–279.
- 42.Chess-Williams R, Chapple C R, Yamanishi T, Yasuda K, Sellers D J (2001). The minor population of M3-receptors mediate contraction of human detrusor muscle in vitro. *J Auton Pharmacol.* 21:243-248.
- 43.Fetscher C, Fleichman M, Schmidt M, Krege S, Michel M C (2002). M(3) muscarinic receptor mediate contraction of human urinary bladder. *Br J Pharmacol* 136:641-643.
- 44. Stevens L A, Chapple C R, Chess-Williams R (2007). Human idiopathic and neurogenic overactive bladder and the role of M2 muscarinic receptor in contraction. *Eur Urol* 52:531-538.
- 45. Harriss D R, Marsh K A, Birmingham A T, Hill S J (1995). Expression of muscarinic M3-receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis in human detrusor culture smoth muscle cells. *J Urol* 154:1241-1245.
- 46.Schneider T, Hein P, Bai J, Michel M C (2005). A role for muscarinic receptor or rho-kinase in hypertension associated rat bladder dysfunction? *J Urol* 173:2178-2181.

- 47. Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T, Taketo M M (2002). Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci* 22:10627-10632.
- 48.Ehlert F J, Ahn S, Pak K J, Park G J, Sangnil M S, Tran J A, Matsui M (2005). Neuronally released acetylcholine acts on the M2 muscarinic receptor to oppose the relaxant effect of isoproterenol on cholinergic contractions in mouse urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 322:631-637.
- 49. Pontari M A, Braverman A S, Ruggieri M R (2004). The M2 muscarinic receptor mediates in vitro bladder contractions from patients with neurogenic bladder dysfunction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:874-880.
- 50.Salcedo C, Davalillo S, Cabellos J, Lagunas C, Balsa D, Pérez-Del-Pulgar S, Ballarín M, Fernández A (2009). In vivo and in vitro pharmacological characterization of SVT-40776, a novel M3 muscarinic receptor antagonist, for the treatment of overactive bladder. *Br J Pharmacol* 156:807-817
- 51.Yamaguchi O, Chapple C R (2007). β3-Adrenoceptors in urinary bladder. Neurourol Urodyn 26:752-756.
- 52.Yamazaki Y, Takeda H, Akahane M, Igawa Y, Nishizawa O, Ajisawa Y (1998). Species different in the distribution of b-adrenoceptor subtypes in bladder smooth muscle. Br J Pharmacol 124: 593–599.
- 53.Uchida H, Shishido K, Nomiya M, Yamaguchi O (2005). Involvement of cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms in the relaxation of rat detrusor muscle via β-adrenoceptors. Eur J Pharmacol 518:195–202.
- 54. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffihs D, Rosier P, Ulmsien U (2002). The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Su-committee of International Continence Society. *Neurourol Urodyn* 21:167-178.
- 55. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffihs D, Rosier P, Ulmsien U (2003). The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Su-committee of International Continence Society. *Urology* 61:37-49.
- 56.Sand P K, Appell R A (2006). Disruptive effects of overactive bladder and urge urinary incontinence in younger women. *Am J Med* 119:16-23.

- 57.Ousland J G (2004). Management of overactive bladder. *N Engl J Med* 350: 786-799.
- 58. Milsom L, Abrams P, Cardozo L, Roberts R G, Thuroff J, Wein A J (2001). How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU Int.* 87:760-766.
- 59.Wein A J, Rackley R R (2006). Overactive bladder: a better understanding of pathophysiology, diagnosis and management. *J Urol* 175:5-10.
- 60.Kumar V, Cros R L, Chess W C R (2005). Recent advances in basic science for overactive bladder. *Curr Opin Urol* 15: 222-226.
- 61.Hashim H e Abrams P (2005). Overactive bladder: an update. *Curr Opin Urol* 17:231-236.
- 62.Irwin D E, Milsom I, Hunskaar S, Reilly K, Kopp Z, Herschom S, Coyne K S, Kelleher C J, Hampel C, Artibani W, Abrams P (2006). Population-based survey of urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries: results of the EPIC Study. *Eur Urol.* 50: 1306-1315.
- 63. Michel M C, Heemann U, Schumacher H, Mehlburger L, Goepel M (2004). Association of hypertension with symptoms of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 172: 1390–1393.
- 64. Pons M E, Clota M P, González A P, Álvarez P R (2005). Nicturia em mujeres com sintomas de incontinência urinaria: analisis de lãs variables clínicas y urodinámicas asociadas. *Actas Urol Esp.* 29: 378-286.
- 65.Persson K, Pandita R K, Spitsbergen J M, Steers W D, Tuttle J B, Andersson K E (1998). Spinal and peripheral mechanisms contributing to hyperactive voiding in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 275: 1366–1373.
- 66.Michel M C, Vrydag W (2006). α1-, α2- and β-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* 147: 88–119.
- 67.Monica F Z, Bricola A A, Baú F R, Freitas L L, Teixeira S A, Muscará M N, Abdalla F M, Porto C S, De Nucci G, Zanesco A, Antunes E (2008). Longterm nitric oxide deficiency causes muscarinic supersensivity and reduces beta(3)-adrenoceptor-mediated relaxation, causing rat detrusor overactivity. *Br J Pharmacol.* 153: 1659-1668.
- 68.Osterholtz D W, Reams G, Wu Z, Knaus J, Campbell F, Bauer J H (1996). The urinary bladder angiotensin system: response to infusions of angiotensin I and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Kidney Dis.* 28: 603-609
- 69. Phull H, Salkini M, Escobar C, Purves T, Comiter C V (2007). The role of angiotensin II in stress urinary incontinenc: a rat model. *Neurourol Urodyn.* 26: 81-88.
- 70.Shirazi M, NNoorafshan A, Bahri M A, Hassnpoor A (2008). Captopril reduces deposition of collagen in lamina propria and muscular layers of the bladder and ureter in neonatal dogs with partial urethral obstruction. Scand *J Urol Nephrol.* 42: 324-329.
- 71.Morgan C, De Groat W C, Nadelhaft I (1986).The spinal distribution of sympathetic preganglionic and visceral primary afferent neurons that send axons into the hypogastric nerves of the cat. *J Comp Neurol* 243:23–40.
- 72. Moreno H Jr, Metze K, Bento AC, Antunes E, Zatz R, de Nucci G (1996). Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. *Basic Res Cardiol.* 91:248-55.
- 73.Dai Q, Xu M, Yao M, Sun B (2007). Angiotensin AT1 receptor antagonist exert anti-inflammatory effects in spontaneously hypertensive rats. *Br J Phamacol.* 152: 1042-1048.
- 74. Toblli J E, Cao G, Lombraña A, Rivero M (2007). Functional and morphological improvement in erectile tissue of hypertensive rats by long-term combined therapy with phosphodiesterase type 5 inhibitor and losartan. *J Sex Med.* 4: 1291-1303.
- 75.D' Uscio L, Quaschning T, Burnett Jr. J C, Luscher T F (2001). Vasopeptidase inhibition prevents endothelial dysfunction of resistance arteries in salt-sensitive hypertension in comparison with single ACE inhibition. *Hypertension*. 37: 28-33.
- 76.Bravo R, Somoza B, Ruiz-Gayo M, González C, Ruilope L M, Afonso M S F (2001). Differential effect of chronic antihypertensive treatment on vascular smooth muscle cell phenotype in spontaneously hypertensive rats. Hypertension 37: 4-10.
- 77.Zatz R (1990). A low cost tail-cuff method for the stimulation of mean arterial pressure in conscious rats. *Laboratory animal Science*.

- 78. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 18:3.
- 79. Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F (2002). Elimination of primerdimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. Anal Biochem. 303:95-98.
- Tammela T L, Briscoe J A, Levin R M, Longhurst P A (1994). Factors underlying the increased sensitivity to field stimulation of urinary bladder strips from streptozotocin-induced diabetic rats. Br J Pharmacol 113: 195– 203.
- 81.Wang P, Luthin G R, Ruggieri M R (1995). Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 273:959-966.
- 82.Hegde S S (2006). Muscarinic receptors in the bladder: From basic research to therapeutics. *Br J Pharmacol* 147:80–87.
- 83.Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, Takahashi S, Taketo M M (2000). Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:9579-9584.
- 84.Igawa Y, Zhang X, Nishizawa O, Umeda M, Iwata A, Taketo M M, Manabe T, Matsui M, Andersson K E (2004). Cystometric findings in mice lacking muscarinic M2 or M3 receptors. *J Urol* 172: 2460-2464.
- 85.Sinha S, Gupta S, Malhotra S, Krishna NS, Meru AV, Babu V, Bansal V, Garg M, Kumar N, Chugh A, Ray A (2010). AE9C90CB: a novel, bladderselective muscarinic receptor antagonist for the treatment of overactive bladder. Br J Pharmacol 160:1119-1127
- 86. Yoshimura N, Kaiho Y, Miyazato M, Yunoki T, Tai C, Chancellor M B, Tyagi P (2008). Therapeutic receptor targets for lower urinary tract dysfunction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 377: 437-448.
- 87.Bayliss M, Wu C, Newgreen D, Mundy A R, Fry C H (1999). A quantitative study of atropine-resistant contractile responses in human detrusor smooth muscle, from stable, unstable and obstructed bladders. *J Urol.*162: 1833-9.

- 88. Abrams P, Andersson K E, Buccafusco J J, Chapple C, de Groat W C, Fryer A D, Kay G, Laties A, Nathanson N M, Pasricha P J, Wein A J (2006). Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol.* 148: 565-78.
- 89.Lee D L, Webb R C, Jin L (2004). Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature. *Hypertension*. 44:796-9.
- 90.Christ G J, Andersson K E (2007). Rho-kinase and effects of rho-kinase inhibition on the lower urinary tract. *Neurourol Urodynam*. 26: 948-54.
- 91.Chitaley K, Webb R C (2002). Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of Rho-kinase signaling. Hypertension 39:438–442.
- 92. Rajasekaran M, Wilkes N, Kuntz S, E Albo M (2005). Rho-kinase inhibition suppresses bladder hyperactivity in spontaneously hypertensive rats. Neurourol Urodyn. 24:295-300.
- 93.Morelli A, Filippi S, Sandner P, Fibbi B, Chavalmane A K, Silvestrini E, Sarchielli E, Vignozzi L, Gacci M, Carini M, Vannelli G B, Maggi M (2009). Vardenafil modulates bladder contractility through cGMP-mediated inhibition of RhoA/Rho kinase signaling pathway in spontaneously hypertensive rats. J Sex Med. 6:1594-608.
- 94.Suzuki Y, Inoue T, Ra C (2010). L-type Ca²⁺ channels: a new player in the regulation of Ca²⁺ signaling, cell activation and cell survival in immune cells. Mol Immunol. 47: 640-8.
- 95.Rapp D E, Lyon M B, Bales G T, Cook S P (2005). A role for the P2X receptor in urinary tract physiology and in the pathophysiology of urinary dysfunction. Eur Urol. 48: 303-8.
- 96.Andersson K E, Arner A (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 84: 935-86.
- 97.Lagaud G J, Randriamboavonjy V, Roul G, Stoclet J C, Andriantsitohaina R (1999). Mechanism of Ca²⁺ release and entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. Am. J. Physiol. 276:300-308.
- 98.Toque H A, Teixeira C E, Priviero, F B M, Morganti R P, Antunes E, De Nucci G (2008). Vardenafil, but not sildenafil or tadalafil, has calciumchannel blocking activity in rabbit isolated pulmonary artery and human washed platelets. Br. J. Pharmacol. 154:787–796.

- 99. Theobald Jr R J (2003). Differing effects of N(G)-monomethyl L-arginine and 7-nitroindazole on detrusor activity. Neurourol. Urodyn. 22:62–69.
- 100. Persson K, Pandita R K, Aszòdi A, Ahmad M, Pfeifer A, Fässler R, Andersson, K E (2000). Functional characteristics of urinary tract smooth muscles in mice lacking cGMP protein kinase type I. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 279:1112–1120.
- 101. Stasch J P, Becker E M, 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 (2001). NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. Nature 410:212–215.
- 102. Cheng E Y, Decker R S, Lee C (1999). Role of angiotensina II in bladder smooth muscle growth and function. Adv Exp Med Biol. 462:183-191.
- 103. Ianzer D, Santos R A, Etelvino G M, Xavier C H, de Almeida Santos J, Mendes E P, Machado L T, Prezoto B C, Dive V, de Camargo A C (2007). Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involved ACE-independent mechanisms? New insights from proline-rich peptides of Bothrops jararaca. J Pharmacol Exp Ther. 322:795-805.
- 104. Da Costa A C G, Leite R, Fraga-Silva R A, Pinheiro S V, Reis A B, Reis F M, Touyz R M, Webb R C, Alenina N, Bader M, Santos R A (2007). Evidence that the vasodilator angiotensin (1-7)-Mas axis plays na important role in erectile function. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293:2588-2596.
- 105. Chappel M C (2010). Angiotensin-converting enzyme 2 autoantibodies; further evidence for a role of the rein-angiotensin system in inflammation. Arthritis Res Ther. 12:128.

7.APÊNDICE





Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº <u>1683-1</u>, sobre "<u>Estudo morfofuncional do</u> <u>músculo detrursor isolado de rato em modelo de hipertensão renovascular:</u> <u>envolvimento da Angiotensina-II</u>", sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Edson</u> <u>Antunes / Antonio Celso Saragossa Ramos Filho</u>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em <u>06 de novembro de 2008</u>.

CERTIFICATE

We certify that the protocol n° <u>1683-1</u>, entitled "<u>Morfofunctional study of rat</u> <u>isolated detrusor smooth in renovascular hypertension model: involvement</u> <u>of angiotensin-II</u>", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on <u>November 6, 2008</u>.

Prof. Dr. Stephen Hyslop Vice-Presidente

Campinas, 06 de novembro de 2008.

Fátima Álonso Secretária Executiva

CEEA – Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/