



LUIZ OSÓRIO SILVEIRA LEIRIA

ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS EM BEXIGA URINÁRIA DE
CAMUNDONGOS OBESOS RESISTENTES À INSULINA

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LUIZ OSÓRIO SILVEIRA LEIRIA

ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS EM BEXIGA URINÁRIA DE
CAMUNDONGOS OBESOS RESISTENTES À INSULINA

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. EDSON ANTUNES

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
LUIZ OSÓRIO SILVEIRA LEIRIA, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. EDSON ANTUNES.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

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

L534a Leiria, Luiz Osório, 1983-
Alterações fisiopatológicas em bexiga urinária de camundongos obesos resistentes à insulina / Luiz Osório Silveira Leiria. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Trato urinário. 2. Urotélio. 3. Obesidade. I. Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Physiopathological alterations in urinary bladder from insulin resistant obese mice

Palavras-chave em inglês:

Urinary tract

Urothelium

Obesity

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]

Marcio Alberto Torsoni

Ana Paula Couto Davel

Fábio Bessa Lima

Paulina Sannomiya

Data de defesa: 19-06-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LUIZ OSÓRIO SILVEIRA LEIRIA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTUNES

MEMBROS:

1. PROF. DR. EDSON ANTUNES

2. PROF. DR. MARCIO ALBERTO TORSONI

3. PROF. DR. ANA PAULA COUTO DAVEL

4. PROF. DR. FÁBIO BESSA LIMA

5. PROF. DR. PAULINA SANNOMIYA

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

Data: 19 de junho de 2013

DEDICATÓRIA

*Aos meus filhos João Vitor, Lucas e Helena,
minhas fontes de vida e de energia,
são a força motriz do meu labor e da minha existência.
A minha esposa Lívia, pelo companheirismo,
paciência, cumplicidade e amor,
sem os quais esta etapa de nossas vidas jamais seria cumprida.*

*Aos meus pais, Edeovaldo e Carma Maria,
principais fomentadores da minha carreira,
e a quem devo minha formação moral e intelectual.
A vocês dedico e dedicarei todas minhas conquistas, e agradeço
e retribuo eternamente o amor que me devotam.*

AGRADECIMENTOS

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

*Ao meu orientador,
Prof. Dr. Edson Antunes,
Agradeço imensamente por sua orientação,
paciência e pela sólida formação
científica que me proporcionastes.*

*Ao meu sogro, Álvaro e minha sogra, Dionete,
por todo carinho, apoio e incentivo ao longo destes anos.*

Agradecimentos

Ao Prof. Gabriel Forato Anhô e à Carolina Solon, que foram imprescindíveis colaboradores neste trabalho, muito obrigado pela contribuição científica e pela amizade ao longo destes anos.

Aos amigos da cascata, Fábio Henrique da Silva, Julio Rojas, Fabíola Mónica, Samuel Barillas, Celso Saragossa, Mário Claudino, Fernando Bau, Lorenzo Picinatti, Maria Andréia, Paulo Gonzales, Fabiano Calmasini, Fernanda Priviero, Marcy, Carmem, Eduardo Alexandre, Rafael (Ceará), Rodrigo Capel, Fernanda Carvalho, Renata Lopes, Camila e Tuany, agradeço por toda a amizade, alegria e pela ajuda compartilhada no dia a dia de trabalho.

Aos amigos de laboratório Marina Calixto, Letícia Lintomen, Diana André, Dalize Squebola, Priscila Monteiro, Lineu Baldissera, Gláucia Mello, Raíssa, Carolina, Maria Elisa e Camila.

Aos e amigos do laboratório do Prof. Gabriel, Andrezza, Ana Paula, André, Tiago, Danilo, Caroline, Juliana, Giuliana e Marcos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Elaine, Agnaldo, Adilson e especialmente, agradeço ao Sr. Miguel Borges da Silva e a Denise pelo competente trabalho que realizam no cuidado diário dos animais de experimentação.

Agradeço especialmente aos meus familiares e saudosos amigos de Alegrete, por estarem sempre presentes, de alguma forma, na minha vida e pela verdadeira e sólida amizade que me fazem um ser humano mais pleno

Aos meus familiares do núcleo paulista, bisa Lurdinha, Aline, Diogo, Fernanda e ao meu sobrinho Arthur.

SUMÁRIO

LISTA DE DROGAS	<i>xxi</i>
LISTA DE ABREVIÇÕES	<i>xxv</i>
LISTA DE TABELAS	<i>xxix</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>xxxiii</i>
RESUMO	<i>xxxvii</i>
ABSTRACT	<i>xli</i>
1- INTRODUÇÃO	<i>45</i>
1.1- Fisiologia da bexiga urinária	<i>48</i>
1.2- Síndrome metabólica/obesidade e hiperatividade de bexiga	<i>51</i>
1.3- Resistência à insulina e estresse de retículo endoplasmático	<i>54</i>
1.4- JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	<i>56</i>
1.5- OBJETIVO	<i>56</i>
1.6- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	<i>57</i>
2- MATERIAIS E MÉTODOS	<i>59</i>
2.1- Modelo animal e características gerais	<i>61</i>
2.2- Tratamentos Farmacológicos	<i>61</i>
2.3- Sensibilidade à Insulina <i>in vivo</i>	<i>62</i>
2.4- Estudo funcional in vitro em banho para órgão isolado	<i>62</i>
2.4.1- Preparação de strips de bexiga humana para estudo funcional in vitro	<i>63</i>
2.4.2- Protocolos funcionais	<i>64</i>
2.4.2.1- Curvas concentração-resposta de contração	<i>64</i>

2.4.2.2-	Curvas concentração-resposta de relaxamento	65
2.4.2.3-	Estimulação elétrica	66
2.5-	Cistometria	66
2.6-	Western blotting	67
2.7-	Medidas de GMPc	68
2.8-	Análise estatística	69
3-	RESULTADOS – PARTE 1	71
3.1-	Características gerais	73
3.2-	Teste de sensibilidade à insulina	75
3.3-	Experimentos funcionais em banho para órgão isolado	76
3.4-	Efeito do bloqueio de canais de Ca ²⁺ do tipo L	79
3.5-	Papel da resistência à insulina na hiperatividade de bexiga em camundongos obesos	80
3.6-	Cistometria	83
3.7-	Papel da PKC no aumento das respostas contráteis	87
3.8-	Efeito da metformina sobre os níveis de AKT fosforilada em camundongos obesos	89
4-	DISCUSSÃO – PARTE 1	91
5-	RESULTADOS – PARTE 2	99
5.1-	Curvas concentração-resposta à insulina em bexigas humanas	101
5.2-	Resposta relaxante à insulina em camundongos obesos	102
5.3-	Níveis de GMPc, pAKT e p-eNOS em bexiga em resposta à insulina	104
5.4-	Influência do urotélio na resposta relaxante à insulina	106

5.5- Ativação da AKT e eNOS no urotélio pela insulina	<i>108</i>
5.6- Aumento da expressão de TRIB3, ATF4 e CHOP no urotélio de camundongos obesos	<i>110</i>
5.7- Inibição da UPR ativada por estresse de retículo (ER)	<i>112</i>
6- DISCUSSÃO – PARTE 2	<i>115</i>
7- CONCLUSÕES	<i>123</i>
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	<i>127</i>

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIAS	FABRICANTE	ORIGEM
CaCl ₂	Merck	Darmstadt, Alemanha
HCl	Merck	Darmstadt, Alemanha
KCl	Merck	Darmstadt, Alemanha
KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt, Alemanha
MgSO ₄	Merck	Darmstadt, Alemanha
NaCl	Merck	Darmstadt, Alemanha
NaHCO ₃	Merck	Darmstadt, Alemanha
Uretana	Sigma	St Louis, LO, EUA
α,β-metileno ATP	Sigma	St Louis, LO, EUA
Atropina	Sigma	St Louis, LO, EUA
Ácido piridoxalfosfato-6 azofenil-2',4'-disulfônico (PPADS)	Sigma	St Louis, LO, EUA
Ácido 4-fenil butírico (PBA)	Sigma	St Louis, LO, EUA
N ^o -L-nitro-L-arginina (L-NAME)	Sigma	St Louis, LO, EUA
Wortmannin	Sigma	St Louis, LO, EUA
LY294002	Sigma	St Louis, LO, EUA
Ácido ciclopiazônico (CPA)	Sigma	St Louis, LO, EUA
Forbol 12,13 dibutirato (PDBu)	Sigma	St Louis, LO, EUA
Tetrodotoxina (TTX)	Sigma	St Louis, LO, EUA
Anlodipino	Sigma	St Louis, LO, EUA
Metformina	Sigma	St Louis, LO, EUA
Carbacol	Sigma	St Louis, LO, EUA

Insulina regular (Novolin R)

Novo Nordisk

Bagsvaerd, Dinamarca

“AKT inhibitor” (Cat. 124005)

Merck Millipore

Darmstadt, Alemanha

LISTA DE ABREVIACOES

ACh	Acetilcolina
AKT	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
ATF4	Fator ativador de transcrição 4
ATP	Adenosina trifosfato
CHOP	Proteína homóloga C/EBP
DAG	Diacilglicerol
E_{max}	Resposta máxima
GCs	Guanilil ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
IMC	Índice de massa corpórea
IP3	Inositol 1,4,5 tri-fosfato
Kitt	Constante de desaparecimento da glicose
LUTS	Distúrbios do trato urinário inferior
MLC20	Miosina de cadeia leve
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve
NO	Óxido nítrico
eNOS	Sintase endotelial do óxido nítrico
pEC50	Potência
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
TRIB3	<i>Tribbles homolog 3</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de peso corporal, gordura epididimal, peso da bexiga, glicemia de jejum e pressão caudal 74

Tabela 2: Parâmetros cistométricos avaliados em camundongos obesos e controles 86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mecanismo contrátil da bexiga	50
Figura 2:	Mecanismo de relaxamento desencadeado pelo óxido nítrico (NO)	51
Figura 3:	Teste de sensibilidade à insulina em camundongos obesos e controle	75
Figura 4:	Curvas de contração em detrusor	78
Figura 5:	Curvas cumulativas concentração-resposta na presença de metformina ou anlodipino <i>in vitro</i>	81
Figura 6:	Curvas cumulativas concentração-resposta em detrusor isolado de camundongos controle e obesos tratados cronicamente com metformina ou amlodipino	82
Figura 7:	Traçados cistométricos representativos de camundongos controle, obesos, obesos tratados com anlodipino e obesos tratados com metformina	84
Figura 8:	Parâmetros cistométricos em camundongos controle e obesos, tratados ou não com anlodipino ou metformina	85
Figura 9:	Papel da PKC no aumento das respostas contráteis e expressão protéica por western blotting	88
Figura 10:	Western blot para determinação de expressão de AKT fosforilada após estímulo com insulina em bexigas isoladas de camundongos controle e obesos, tratados ou não com metformina	89
Figura 11:	Curvas concentração-resposta à insulina em bexigas de origem humana	101
Figura 12:	Curvas concentração-resposta à insulina em bexigas de camundongos obesos e controle	103
Figura 13:	Western blot da fosforilação da AKT e da eNOSs em animais controle e obesos	105
Figura 14:	Curvas concentração-resposta à insulina em bexigas intactas e desprovidas de urotélio	107
Figura 15:	Expressão protéica de p-AKT e p-eNOS em urotélio e detrusor isolados de camundongos obesos e controle nas condições basal e estimulada com insulina	109
Figura 16:	Expressão protéica de TRB3, ATF4 e CHOP em urotélio isolado de camundongos obesos e controle	111

- Figura 17:** Efeito do tratamento com PBA sobre a sensibilidade à insulina e expressão protéica de p-AKT, p-eNOS, TRB3, CHOP e ATF 4 em urotélio de camundongos obesos e controle 113
- Figura 18:** Efeito do tratamento com PBA sobre o relaxamento à insulina, níveis de GMPc e parâmetros cistométricos em camundongos obesos e controle 114

RESUMO

Obesidade/síndrome metabólica são fatores de risco para o desenvolvimento dos sintomas do trato urinário inferior (LUTS), incluindo hiperatividade de bexiga. Em nosso estudo visamos investigar a relação entre resistência à insulina e hiperatividade de bexiga em modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (10 semanas) em camundongos C57BL6/J. Curvas concentração-resposta a diferentes agentes contráteis e à insulina foram realizadas em bexigas isoladas de camundongos e humanos. Estudo cistométrico foi conduzido em camundongos anestesiados. Expressão protéica de PKC, canais de Ca^{2+} do tipo L, eNOS (Ser1177) e AKT (Ser473) fosforiladas, bem como de marcadores da resposta a proteínas mal dobradas (UPR), TRIB3, CHOP e ATF4, foi determinada por western blot. Camundongos obesos exibiram aumento do peso corpóreo, gordura epididimal, glicemia de jejum e resistência à insulina. As respostas contráteis aos diferentes agentes foram maiores nos animais obesos, o que foi normalizado pela pré-incubação com o bloqueador dos canais de Ca^{2+} do tipo L, amlodipino. Animais do grupo obeso apresentaram hiperatividade de bexiga, como demonstrado por estudo cistométrico. As curvas concentração-resposta ao agonista muscarínico, carbacol, foram dependentes da ativação da PKC. A resposta contrátil ao ativador da PKC, PDBu, foi abolida pela incubação com amlodipino. O tratamento com metformina melhorou a sensibilidade à insulina assim como normalizou a hipercontratibilidade *in vitro*, a hiperatividade de bexiga e os níveis de PKC e pAKT em camundongos obesos. A insulina (1-100 nM) produziu relaxamento concentração-dependente em bexigas de camundongos e humanos, o que foi reduzido pela remoção da camada urotelial ou inibição da via de sinalização da PI3K/AKT/eNOS. Em condições fisiológicas, o estímulo com insulina resultou em um aumento de aproximadamente 3 vezes nos níveis de GMPc; porém, o relaxamento e os níveis de GMPc foram menores em bexigas de animais obesos. . A produção de cGMP foi reduzida na presença de inibidores da via da PI3K/AKT/eNOS. A inibição da PI3K aboliu a fosforilação de ambas eNOS e AKT no urotélio de camundongos. A expressão de pAKT e peNOS em resposta à insulina foi reduzida no urotélio de animais obesos em comparação com a do grupo controle, enquanto os níveis de TRIB3, CHOP e ATF4 foram maiores no urotélio dos animais obesos. O tratamento via oral com o inibidor de estresse de retículo endoplasmático, PBA, normalizou todos os parâmetros funcionais e moleculares dos camundongos obesos. Nossos dados mostram que a obesidade/síndrome metabólica em camundongos resulta em

hiperatividade de bexiga associada à resistência local à insulina. A modulação positiva da PKC em camundongos obesos medeia simultaneamente a resistência à insulina em detrusor e a hiperatividade de bexiga. Além disso, camundongos obesos e resistentes à insulina exibem deficiência da ação da insulina na mucosa da bexiga como consequência de estresse de retículo, que parece estar também diretamente relacionado ao quadro de hiperatividade vesical nestes animais.

ABSTRACT

Obesity/metabolic syndrome are common risk factors for lower urinary tract symptoms, including overactive bladder. This study aimed to investigate whether insulin resistance affects bladder function in a model of obesity induced by high-fat diet (10 weeks) in C57BL/6/J mice. Concentration-response curves to contractile agents and insulin were performed in human and mouse bladders. Cystometric study was performed in terminally anaesthetized mice. Western blot was performed in bladders to detect PKC, Ca_v1.2, phosphorylated eNOS (Ser1177) and AKT (Ser473), as well as the unfolded protein response (UPR) markers TRIB3, CHOP and ATF4. Obese mice exhibited higher body weight, epididymal fat mass, fasting glucose and insulin resistance. All the contractile agents produced greater bladder contractions in obese mice, which were fully reversed by the Ca_v1.2 blocker amlodipine. Cystometry evidenced overactive bladder in obese group that were also prevented by amlodipine. Carbachol induced contractions was dependent on the PKC activation, and PKC expression was increased in obese mice. Metformin treatment improved the insulin sensitivity, normalized the in vitro bladder hypercontractility, cystometric dysfunction and restored PKC and pAKT expression in the obese bladders. Insulin (1-100 nM) produced concentration-dependent mouse and human bladder relaxations that were markedly reduced by mucosal removal or inhibition of the PI3K/AKT/eNOS pathway. In mouse bladders, insulin produced a 3.0-fold increase in cGMP levels ($P < 0.05$), that was prevented by PI3K/AKT/eNOS pathway inhibition. PI3K inhibition abolished insulin-induced phosphorylation of AKT and eNOS in bladder mucosa. Obese mice showed greater voiding frequency and non-voiding contractions, indicating overactive bladder. Insulin failed to relax bladder or to increase cGMP in obese group. Insulin-stimulated AKT and eNOS phosphorylation in mucosa was also impaired in obese mice. The UPR markers TRIB3, CHOP and ATF4 were increased in the mucosa of obese mice. The UPR inhibitor PBA normalized all the functional and molecular parameters in obese mice. Our data show that obesity/metabolic syndrome in mice resulted in overactive bladder associated to a local insulin resistance. Up-regulation of PKC in obese mice appears to mediate simultaneously the bladder overactivity and the insulin resistance in the bladders from obese mice bladder. Moreover, obese mice exhibited impaired insulin action in the urothelium layer as a consequence of the endoplasmic reticulum stress, which was demonstrated to be directly involved in the bladder overactivity of obese animals.

1- INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica é definida pela coexistência de obesidade central, resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertrigliceridemia, dislipidemia e hipertensão arterial (Grundy et al., 2004). Segundo o *NCEP Adult Treatment Panel III (ATP III)*, o diagnóstico de síndrome metabólica é dado quando ao menos 3 dos fatores de risco estão presentes, entre eles: (1) Glicemia de jejum acima ≥ 100 mg/dL; (2) HDL colesterol <40 mg/dL para homens ou <50 mg/dL para mulheres, (3) Triglicérides ≥ 150 mg/dL, (4) Circunferência abdominal ≥ 102 cm para homens ou ≥ 88 cm para mulheres e (5) Pressão arterial: ≥ 130 mmHg para sistólica ou ≥ 85 mmHg para diastólica. A instalação deste quadro aumenta o risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Opie, 2007). A resistência à insulina é considerada o eixo central da síndrome metabólica, e consiste na incapacidade dos tecidos alvo, principalmente fígado e músculo esquelético, em responder eficientemente às concentrações normais de insulina. A obesidade é o principal fator etiológico que predispõe à resistência à insulina e doenças vasculares (Kahn e Flier, 2000; Carr et al., 2004; Barton et al., 2011).

O aumento da ocorrência do diabetes mellitus, obesidade e síndrome metabólica na população mundial coincide com a crescente incidência de complicações urológicas, que tem permitido um aumento crescente do interesse pelo estudo da relação entre estas patologias (Moul e McVary, 2010). Estudos recentes apontam uma forte correlação entre a obesidade/síndrome metabólica e os assim-denominados “Distúrbios do Trato Urinário Inferior” (LUTS; *Lower Urinary Tract Symptoms*), no qual a bexiga hiperativa ocupa um papel central, e que pode resultar em incontinência urinária (McVary, 2006; Laven et al., 2008; Richter et al., 2010).

A bexiga hiperativa é uma condição que, apesar de sua benignidade, apresenta elevada incidência e afeta milhões de pessoas em todo o mundo, causando profundo impacto psicossocial e consideráveis custos para o sistema público de saúde. O terceiro *National Health e Nutritional Examination Survey* (NHANES III) mostrou que o aumento do índice de massa corpórea (IMC) em indivíduos com mais de 25 anos de idade é positivamente correlacionado com LUTS. Além disso, este estudo também demonstrou que homens com circunferência abdominal maior que 102 cm foram mais propensos a apresentar LUTS (Subak et al., 2009).

1.1 Fisiologia da bexiga urinária

A função da bexiga urinária é regulada por complexas interações entre fibras aferentes, eferentes e inervações somáticas, cujas funções são integradas pelo sistema nervoso central e autônomo (Michel e Barendrecht, 2008). Em condições fisiológicas, a medida da pressão intravesical durante o preenchimento da bexiga revela pressões baixas e relativamente constantes quando o volume está abaixo do limiar de pressão que desencadeia a micção. Durante o preenchimento da bexiga, a atividade contrátil do esfíncter uretral e da musculatura lisa desta estrutura aumenta significativamente, permitindo um aumento da resistência uretral e conseqüente manutenção da continência urinária (Eersson e Arner, 2004).

As contrações neurogênicas da bexiga refletem principalmente a liberação do neurotransmissor excitatório, acetilcolina (ACh), a partir de fibras parassimpáticas. A bexiga urinária contém todos os subtipos de receptores muscarínicos conhecidos (M1, M2, M3, M4 e M5), mas o subtipo M3 é o principal mediador das contrações do músculo liso detrusor. O mecanismo clássico de sinalização intracelular decorrente de estimulação de

receptores M3 envolve o acoplamento à proteína G_{q11} , a qual, por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC) com subsequente geração de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), resultando na liberação do Ca^{2+} dos estoques do retículo sarcoplasmático e na ativação da proteína cinase C (PKC) (Eersson et al., 2004). O Ca^{2+} liberado se liga à calmodulina, a qual ativa a miosina-cinase de cadeia leve (MLCK), induzindo a contração através da fosforilação da miosina de cadeia leve (Somlyo et al., 2003). Durante este processo, a MLC_{20} fosforilada interage com a β -actina resultando na contração do músculo liso. A PKC, uma vez ativada, fosforila a CPI-17, a qual inibe a miosina-fosfatase de cadeia leve, aumentando então a contração do músculo liso de modo independente de Ca^{2+} (Somlyo et al., 2003). O aumento dos níveis de Ca^{2+} citosólico resulta de sua mobilização a partir do retículo sarcoplasmático e/ou de seu influxo através de canais de cálcio presentes na membrana celular. O influxo extracelular de Ca^{2+} se reveste de grande importância nas respostas contráteis, visto que tais respostas deixam de ser observadas com o uso de bloqueadores de canais de cálcio voltagem-dependente. Entretanto, no músculo liso detrusor, a contração resultante da estimulação de receptores M3 é mediada principalmente pelo influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais de Ca^{2+} do tipo L. Demonstrou-se, recentemente, que a ativação dos canais de Ca^{2+} do tipo L decorrentes da estimulação muscarínica (M3) é regulada pela PKC em detrusor de camundongos (Huster et al., 2010) (Figura 1).

O neurotransmissor excitatório ATP, através dos receptores ionotrópicos P2X1, também medeia parte das contrações resistentes à atropina na bexiga urinária, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Em condições patológicas, a participação do componente purinérgico pode variar significativamente, ganhando maior ou menor

importância dependendo da patologia (Rapp et al., 2005). Variações significativas da participação desta via na contração do detrusor podem ser verificadas entre as diferentes espécies animais (Ford e Cockayne, 2011). A sinalização intracelular resultante da estimulação dos receptores ionotrópicos P2X1 via ATP também envolve ativação de canais de Ca^{2+} do tipo L acoplados a receptores (Rapp et al., 2005).

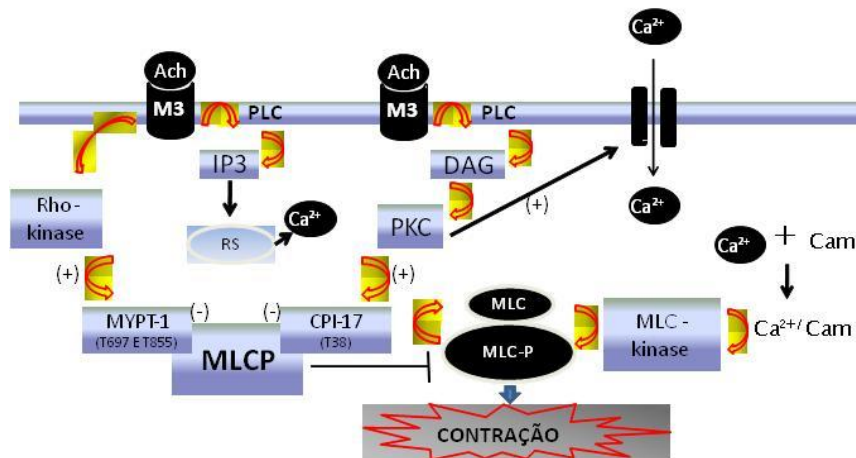


Figura 1: Mecanismo contrátil da bexiga resultante da ativação de receptores muscarínicos M3.

Em mamíferos, o relaxamento do detrusor se dá, principalmente, pela via do AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA) em resposta à ligação da noradrenalina (NOR) aos receptores beta (β)-adrenérgicos. Os subtipos β -adrenérgicos 1,2,3 estão presentes em bexiga urinária; entretanto, o RNAm do subtipo β 3 corresponde a mais de 95% do total de RNAm de β -adrenoceptores (Nakahira et al., 2001). Estudo prévio mostrou que os níveis de AMPc estão diminuídos em coelhos com obstrução parcial da uretra, e que substâncias capazes de aumentar os níveis deste segundo mensageiro produzem melhora dos sintomas desta desordem. Apesar da presença de adrenoceptores na bexiga, seu papel na função urinária ainda é controverso. A simpsectomia e o bloqueio dos receptores adrenérgicos, assim como a deficiência da dopamina hidroxilase (enzima que converte dopamina em noradrenalina) não produzem alterações no processo de micção (Gillespie, 2004). A via de

sinalização do NO/GMPc também está envolvida na modulação do tônus muscular da bexiga (Figura 2). Trabalhos anteriores mostraram que fármacos atuantes nesta via, como inibidores de fosfodiesterase 5 (PDE5) e estimuladores da guanilil ciclase solúvel (GCs) causam relaxamento dose-dependente da bexiga (Báu et al., 2010). Além disso, estudos recentes sugerem que inibidores da fosfodiesterase 5 constituem alternativa válida para o tratamento da hiperatividade de bexiga (Dmochowski et al., 2010).

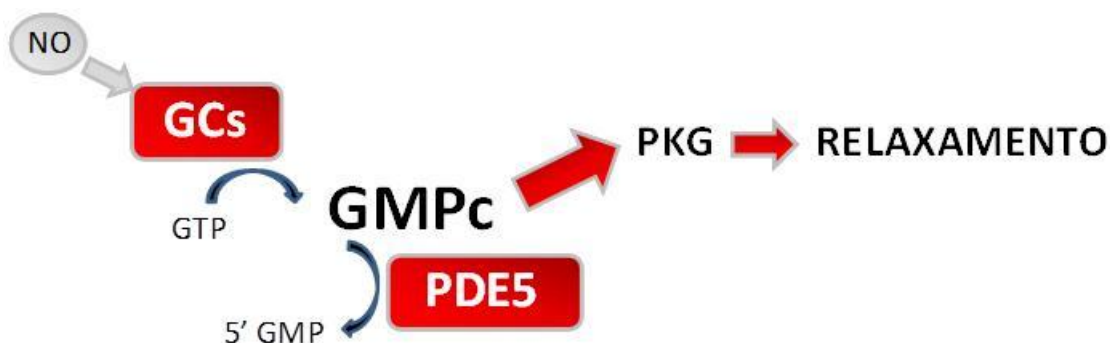


Figura 2: Mecanismo de relaxamento desencadeado pelo óxido nítrico (NO), o qual estimula a guanilil ciclase solúvel (GCs), formando guanosina monofosfato cíclico (GMPc). GMPc estimula proteína quinase G (PKG), que por sua vez promove o relaxamento muscular.

1.2 Síndrome metabólica/obesidade e hiperatividade de bexiga

Vários estudos epidemiológicos mostram uma clara relação entre obesidade/síndrome metabólica e incontinência urinária (Joseph et al., 2003; Rohrmann et al., 2005; Ozden et al., 2007). Correlação positiva foi encontrada entre a presença de síndrome metabólica e bexiga hiperativa em mulheres (Uzun e Zorba, 2012). Estudos com pacientes homens mostram que esta correlação é também forte, sendo que a magnitude da disfunção vesical aumenta proporcionalmente com a magnitude da síndrome metabólica (Rohrmann et al., 2005). Muitos dos estudos clínicos disponíveis na literatura associam a síndrome metabólica à hiperplasia prostática benigna, a qual pode desencadear bexiga

hiperativa secundariamente (Hammarsten e Högstedt, 2001; Kupelian et al. 2009; Parsons et al. 2011; Lee et al. 2012). A hiperplasia prostática é atribuída à hiperinsulinemia no estado obeso, que leva à ativação da cascata das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e conseqüentemente à proliferação celular na próstata (Vikram, 2010).

Entretanto, poucos estudos têm explorado a fisiopatologia da disfunção vesical em modelos experimentais de obesidade/síndrome metabólica. A maioria dos estudos publicados neste âmbito reporta o uso de modelos de síndrome metabólica induzida por dieta rica em frutose. Ratos Wistar alimentados com dieta rica em frutose (60%) por 6 semanas apresentaram obesidade, hiperinsulinemia e hiperglicemia, além de exibirem aumento de contrações involuntárias, o que sugere a instalação de quadro de detrusor hiperativo (Tong e Cheng, 2007). Por outro lado, ratas Wistar também alimentadas com dieta rica em frutose por períodos prolongados (24 semanas) não exibiram aumento do peso corpóreo, mas tornaram-se hiperinsulinêmicas (Lee et al., 2008). Estes animais apresentaram redução da resposta contrátil *in vitro* do detrusor ao carbacol, estimulação elétrica e KCl, e aumento da contração ao ATP. Estudo cistométrico em ratas Zucker obesas revelou uma redução da frequência de micção e de contrações involuntárias, tanto em ratas obesas diabéticas como em obesas não-diabéticas, sugerindo que a obesidade crônica *per se* reduz a atividade contrátil da bexiga independentemente da presença do diabetes (Gasbarro et al., 2010). Embora a obesidade humana seja principalmente decorrente do consumo de dieta rica em gorduras combinada com baixo gasto energético (Galgani e Ravussin, 2008), há poucos estudos experimentais investigando a atividade de bexiga em modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta hiperlipídica durante 24 semanas tiveram grande ganho ponderal e exibiram aumento da frequência de micção e de contrações involuntárias em comparação

com o grupo controle, sugerindo o desenvolvimento de detrusor hiperativo nestes animais (Rahman et al., 2007). Trabalho recente mostrou que camundongos duplo-*knockout* (DKO) para os genes *Irs1* e *Irs2* hepáticos apresentam hiperatividade de bexiga associada a aumento dos níveis de TNF- α , o qual regula diretamente a contração da bexiga via ativação da Rho-quinase (Wang et al., 2012). Entretanto, ainda não foi estudada a ação direta da insulina sobre o tônus muscular da bexiga e o seu potencial envolvimento na fisiopatologia da cistopatia diabética. A disfunção de bexiga urinária durante a obesidade tem sido pouco estudada e ainda assim os resultados na literatura científica são conflitantes, o que pode ser atribuído a diferenças entre os modelos experimentais, idade e gênero dos animais e paradigmas experimentais.

A resistência à insulina está associada a várias complicações periféricas como doenças cardiovasculares e LUTS (Rask Madsen e King, 2007; Hammarsten e Peeker, 2011). Além de sua bem estabelecida relevância para a manutenção da homeostase da glicose, a insulina é um importante mediador do relaxamento vascular através de mecanismos envolvendo a produção endotelial de NO (Sherrer et al., 1994). A geração de NO pelas células endoteliais resulta da ativação da proteína quinase B (AKT), a qual ativa diretamente a sintase endotelial de NO (eNOS) através da fosforilação no resíduo de serina 1177 (Dimmeler et al., 1999). O NO medeia a vasodilatação através da sua difusão para o músculo liso onde ativa a GCs, formando GMPC (Zeng et al., 2000). A resistência à insulina endotelial e o subsequente dano vascular são a principal causa de disfunção endotelial associada ao diabetes (Vicent et al., 2003; Contreras et al., 2010) com sérias implicações para a saúde cardiovascular dos pacientes. Estudo prévio mostrou que estes componentes da via de sinalização da PI3K/AKT/eNOS estão expressos na bexiga urinária

(Wei et al., 2008). Porém, até o momento não há evidências de que a insulina ative esta via de sinalização na bexiga, tal qual ocorre na vasculatura.

1.3 Resistência à insulina e estresse de retículo endoplasmático

A insulina medeia a captação da glicose principalmente para o músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, promovendo assim a redução dos níveis glicêmicos. Além disso, a insulina regula a glicemia por inibir a produção hepática e renal de glicose. A resistência à insulina ocorre quando o tecido perde a capacidade de responder à insulina (Murino et al., 2006), resultando em aumento da glicemia simultaneamente a hiperinsulinemia (Ye, 2013). A resistência à insulina é o fator principal que leva ao diabetes tipo 2. Diferentes mecanismos moleculares estão envolvidos na fisiopatologia da resistência à insulina, como mecanismos inflamatórios, estresse de retículo endoplasmático, aumento de ácidos graxos livres circulantes com conseqüente aumento dos níveis citosólicos de PKC, disfunção mitocondrial, fatores genéticos, estresse oxidativo, entre outros (Murino et al., 2006; Ye, 2013). Muitos destes mecanismos são deflagrados pela obesidade e vêm ganhando crescente interesse da comunidade científica nos últimos anos.

Ao longo da década passada, vários trabalhos mostraram que a obesidade desencadeia a ativação de vias de sinalização relacionadas ao estresse celular e inflamação (Uysal et al., 1997; Yuan et al., 2001; Hirosumi et al., 2002). Entretanto, a origem deste estresse não é bem conhecida. O retículo endoplasmático (RE), organela responsável pela síntese e processamento de proteínas de membranas e secretórias, possui papel chave na resposta do estresse celular (Ozcan et al., 2004, 2006). Certas condições patológicas interferem na homeostase do RE, levando, conseqüentemente, ao acúmulo de proteínas maldobradas no lúmen desta organela. Como reação ao estresse, a célula ativa um sistema

de transdução de sinal ligando o lúmen do RE com citoplasma e núcleo celulares, sistema este chamado de resposta a proteínas maldobradas (Unfolded Protein Response, UPR) (Hummasti et al., 2010). Diferentes estímulos, como aumento da concentração de lipídeos e glicose, levam ao estresse de RE. A obesidade está associada ao aumento do estresse mecânico, da glicemia e da biodisponibilidade de nutrientes, acúmulo de lipídeos, além de anormalidades do fluxo de energia intracelular (Hummasti et al., 2010). A co-existência destas alterações faz da obesidade um fator determinante para o estresse de RE, que por sua vez desencadeia a resistência à insulina nestas condições (Ozcan et al., 2006). Um dos principais mecanismos envolvidos na resistência à insulina associada ao estresse de RE é a modulação positiva do TRIB3 (Gong et al., 2009; Oberkofler et al., 2010;), uma pseudoquinase inibidora da AKT, sendo esta última diretamente envolvida na sinalização da insulina, tanto na função metabólica, como na função reguladora do tônus vascular, onde atua ativando a eNOS, aumentando conseqüentemente os níveis de NO. Trabalhos recentes mostram que a deleção gênica do TRIB3 previne complicações periféricas derivadas do diabetes tipo 2 ao mesmo tempo que promove a sensibilização à insulina (Ti et al., 2011; Wang et al., 2012b).

No presente trabalho, estabelecemos a hipótese segundo a qual a insulina pode exercer papel regulatório sobre o tônus muscular da bexiga de maneira similar ao que ocorre na vasculatura, e que a resistência à sua ação pode influenciar a função motora da bexiga e o padrão miccional, resultando em hiperatividade vesical. Para demonstrar nossa hipótese optamos por dividir o trabalho em duas etapas. Na primeira procuramos caracterizar a fisiopatologia da disfunção vesical no modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Na segunda etapa buscamos investigar a ação direta da insulina na

regulação da função motora da bexiga em condições fisiológicas e patológicas (resistência local à ação da insulina).

1.4 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Estudos epidemiológicos e experimentais mostram que a obesidade/síndrome metabólica está associada ao desenvolvimento de LUTS, acometendo milhares de pessoas no mundo todo. A hiperatividade de bexiga compreende a co-incidência de desordens como detrusor hiperativo, incontinência urinária e urgência, acompanhada ou não de noctúria (Bayliss et al., 1999; Coyne et al., 2008, Irwin et al., 2008). Apesar da associação LUTS com obesidade/síndrome metabólica, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesta condição permanecem pouco compreendidos, o que é evidenciado pela ausência de estudos experimentais abordando a influência da resistência à insulina sobre a função do baixo trato urinário. Com base nestas evidências, levantamos a hipótese de que a hiperatividade de bexiga associada à síndrome metabólica em modelo murino de obesidade está diretamente associada à ação prejudicada da insulina neste órgão.

1.5 OBJETIVO

No presente trabalho estudamos as alterações fisiopatológicas da hiperatividade de bexiga associada à obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos, com ênfase para a compreensão do papel da resistência à insulina nesta condição.

1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS – PARTE 1

- 1.6.1 Investigar as alterações funcionais *in vitro* em bexiga isolada de camundongos controle e obesos alimentados com dieta hiperlipídica, através da realização de curvas concentração-resposta a agentes contráteis (carbacol, CaCl₂, KCl, α,β -metileno ATP, PDBu) e estimulação elétrica;
- 1.6.2 Investigar a função miccional de animais obesos e controle através de estudo cistométrico;
- 1.6.3 Estudar o efeito do bloqueador dos canais de Ca²⁺ do tipo L, anlodipino, sobre as alterações funcionais e moleculares em bexigas de camundongos controle e obesos.
- 1.6.4 Investigar o papel da resistência à insulina na hiperatividade de bexiga, através do tratamento crônico com metformina sobre as alterações funcionais e moleculares em camundongos controle e obesos.
- 1.6.5 Avaliar o papel da PKC na hiperatividade de bexiga de animais obesos.

1.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS – PARTE 2

- 1.7.1 Investigar a ação relaxante direta da insulina em bexiga de humanos e camundongos, na ausência e na presença de inibidores da via PI3K/AKT/eNOS em tecidos intactos e desprovidos de urotélio;
- 1.7.2 Investigar a ação da insulina sobre os níveis de GMPc e expressão protéica de AKT e eNOS fosforilados em bexigas de camundongos controle e obesos.
- 1.7.3 Realizar ensaios de Western blotting para determinar a expressão protéica de marcadores do stress de retículo como TRB3, CHOP e ATF4.
- 1.7.4 Estudar os efeitos da inibição do estresse de retículo, através do tratamento com PBA, sobre a sensibilidade à insulina no urotélio e função miccional;

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Modelo animal e características gerais

Foram usados camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 4 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos à 24°C em ciclos de claro/escuro (12/12 h), com ração e água *ad libitum* no Departamento da Farmacologia da FCM/UNICAMP. Os protocolos experimentais encontram-se aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP sob o número de protocolo 2067-1. Os animais foram inicialmente divididos em 2 grupos, assim divididos: Grupo Controle (animais que receberam ração padrão e água *ad libitum*) e Grupo Obeso (receberam a dieta hiperlipídica durante 10 semanas e água *ad libitum*). Posteriormente, tratamentos farmacológicos foram aplicados com objetivos específicos, conforme descrito adiante.

A obesidade foi induzida através da substituição da ração padrão dos camundongos por dieta hiperlipídica, que consiste de 55% de lipídeo, 29% de carboidrato e 16% de proteína durante 10 semanas (Tsukumo et al., 2007; Calixto et al., 2010). A eficácia das alterações metabólicas foi comprovada por medidas de peso corporal, da gordura epididimal e do perfil glicêmico (glicose). A glicose sanguínea de jejum (8 h) foi mensurada utilizando uma gota de sangue caudal e os valores constatados através de glicosímetro (ACCUCHEK Performa; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

2.2 Tratamentos Farmacológicos

Camundongos controle e obesos foram tratados cronicamente com o anti-hiperglicemiante, metformina (300 mg/kg/dia, durante 2 semanas, administrado por gavagem a partir da 8ª semana de dieta hiperlipídica). Estes grupos também foram tratados

cronicamente com o bloqueador de canal de Ca^{2+} do tipo L, anlodipino, 25 mg/kg/dia, fornecido na água de beber durante 21 dias (a partir da 7ª semana de dieta hiperlipídica).

Na segunda etapa do trabalho procuramos estudar o papel do estresse de retículo endoplasmático na resistência à insulina dos animais obesos. Para tanto, realizamos tratamento oral, por gavagem, com ácido 4-fenilbutírico (PBA, 500 mg/kg duas vezes ao dia) ou seu veículo (0.9% de NaCl e 0.15 mM de NaHCO_3) durante 4 dias (Ozcan et al., 2009).

2.3 Sensibilidade à insulina in vivo

O teste de sensibilidade a insulina foi realizado após jejum de 6 h. Amostras de sangue foram coletadas através da cauda nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min após a injeção intraperitonal de insulina regular (Novolin R, NovoNordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) na concentração de 1.00 U/Kg. As concentrações sanguíneas de glicose foram mensuradas utilizando-se glicosímetro (ACCUCHEK Performa; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA) e os valores foram usados para calcular a constante de desaparecimento de glicose sanguínea (Kitt), a qual é baseada na regressão linear do logaritmo neperiano das concentrações de glicose obtidas entre os tempos 0 – 30 min. O Kitt foi calculado através da fórmula $0.693/(t_{1/2})$.

2.4 Estudo funcional in vitro em banho para órgão isolado

Para o isolamento do detrusor, os animais foram anestesiados com isoflurano e exsangüinados por secção dos vasos cervicais. Em seguida, realizou-se uma incisão na parede abdominal, e a bexiga foi exposta e removida através de uma secção horizontal no nível dos ureteres. O isolamento do tecido foi obtido retirando-se a base da bexiga. As

bexigas foram montadas em câmaras de incubação com capacidade de 10 ml, e preenchidas com a solução de Krebs-Henseleit, continuamente gaseificadas com O₂:CO₂ (95:5 %), mantidas à temperatura de 37°C e pH entre 7,3 a 7,5. Os tecidos foram lavados com solução nutritiva Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl (118), KCl (4,8), CaCl₂ (1,9), MgSO₄ (1,2), NaHCO₃ (25), KH₂PO₄ (1,2) e Glicose (10,1).

Os *strips* foram suspensos através de fio de algodão, sendo que uma das pontas foi conectada a um transdutor de força. A tensão basal aplicada aos tecidos de origem murina foi de 5 mN, enquanto para aqueles de origem humana foi de 20 mN. A tensão foi periodicamente ajustada durante tempo de estabilização de 1 hora, sendo que a solução nutritiva foi trocada a cada 15 min durante este período. 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 7.0, AD Instruments, Austrália). A viabilidade dos tecidos foi verificada através da contração produzida pela adição ao banho de solução de Krebs modificada, em que 80 mM NaCl foi substituído de forma equimolar por KCl.

2.4.1 Preparação de strips de bexiga humana para estudo funcional in vitro

As bexigas de origem humana foram obtidas junto ao Hospital de Clínicas da UNICAMP. A porção do ápice da bexiga foi removida de doadores universais cadáveres, com idade entre 18 a 60 anos, através de procedimento cirúrgico. Os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP sob o número de protocolo 761/2005.

2.4.2 Protocolos funcionais

2.4.2.1 Curvas concentração-resposta de contração

Foram realizadas curvas concentração-efeito ao carbacol (agonista muscarínico), KCl e CaCl₂ no detrusor de camundongos controle e obesos. Após a realização de cada curva, foi incubado o bloqueador de canal de cálcio voltagem dependente do tipo L, anlodipino (3 µM), durante 30 min, e realizada nova curva concentração-resposta. O mesmo procedimento foi também realizado com a incubação do fármaco anti-hiperglicemiante metformina (1 µM).

Para a realização da curva ao CaCl₂ foi necessária a depleção dos estoques de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático através da incubação dos tecidos com ácido ciclopiazônico (CPA; 1 µM) durante 15 min. Em seguida, trocou-se o Krebs-Henseleit por igual solução, porém desprovida de Ca²⁺ e contendo ácido etilenoglicol tetra-acético (EGTA; 1 mM). Após período de equilíbrio de 60 min, o meio foi trocado por solução de KCl (80 mM) desprovido de Ca²⁺ a fim de fazer a despolarização do tecido. Após período de equilíbrio de 30 min realizou-se a curva concentração-resposta ao CaCl₂. Durante este período de 30 minutos foram incubados os fármacos anlodipino ou metformina (Lagaud et al., 1999).

Foram realizadas curvas de contração não cumulativas ao agonista purinérgico (α,β -metileno-ATP; 1, 3 e 10 µM), lavando-se o tecido com solução de Krebs-Henseleit nos intervalos de 20 min entre uma dose e outra. Também realizou-se curvas cumulativas concentração-resposta ao ativador da PKC, PDBu (1 nM – 3 µM) na ausência e na presença de anlodipino (3 µM).

As respostas contráteis dos agonistas foram medidas em mN/mg de peso úmido do *strip* de músculo liso detrusor. O logaritmo das concentrações molares dos agonistas foi colocado em abscissas e a resposta contrátil em mN/mg nas ordenadas. Os gráficos foram traçados e analisados através do programa computacional “GraphPad PRISM” (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores de potência e respostas máximas foram calculados pela seguinte equação (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA):

$$E = E_{\max} / [1 + (10^c / 10^x)^N + \Phi],$$

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

2.4.2.2 Curvas concentração-resposta de relaxamento

Foram realizadas curvas concentração-efeito à insulina (1 – 100 nM) em strips de bexiga pré-contraídos com KCl (80 mM). As curvas à insulina foram também realizadas na presença dos seguintes inibidores da via da PI3Quinase/AKT/eNOS: wortmannin (inibidor da PI3 quinase; 100 nM) e LY294002 (inibidor da PI3 quinase; 10 μ M), L-NAME (inibidor não seletivo da NOS; 100 μ M) ou AKT Inhibitor (inibidor da AKT; 5 μ M). Estes inibidores foram incubados por 30 min previamente à pré-contracção dos tecidos com KCl.

Curvas à insulina também foram realizadas em músculo liso detrusor desprovido de urotélio, o qual foi removido com o auxílio de tesoura oftálmica sob lupa esteroscópica. As curvas de relaxamento foram expressas como porcentagem em relação à amplitude da pré-contracção obtida com KCl (80 mM).

2.4.2.3 Estimulação elétrica em bexiga isolada

As bexigas de camundongos controle e diabéticos foram montadas em um sistema de ganchos para estimulação elétrica. Os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 80 V, com duração dos pulsos de 1 milissegundo, com intervalo entre os pulsos de 0,2 ms e duração da estimulação de 10 segundos, nas frequências de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 Hz com intervalo de 3 min entre os estímulos. A estimulação elétrica foi realizada através de estimulador elétrico Grass Telefactor S88 (Grass Telefactor, West Warwick, RI, EUA). As respostas contráteis foram expressas em mN/mg de peso úmido do *strip*.

2.5 Cistometria

Os camundongos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de uretana (1,8 g/Kg). O animal foi posto em posição de supino e uma cisão longitudinal de 1 cm foi realizada na região abdominal. A bexiga foi exposta e um “butterfly” (25G) conectado a um cateter (PE50) foi introduzido no ápice da bexiga. O catéter foi conectado simultaneamente a um transdutor de pressão e a uma bomba de infusão. Antes do início da cistometria, a bexiga foi completamente esvaziada. O cistometograma foi conduzido através da infusão contínua de solução salina na bexiga a um fluxo de 0,6 mL/h. Os seguintes parâmetros urodinâmicos foram avaliados:

- (1) Capacidade (CP) da bexiga, calculada pelo tempo necessário para desencadear a primeira micção $\times 0,6 \text{ (mL) / 60 min}$;
- (2) Pressão limiar (PL), que é a pressão imediatamente anterior ao início da contração de micção, e representa a variação de pressão intravesical durante a fase de enchimento;
- (3) Complacência (CM), que é a razão entre CP / PL;
- (4) Pressão pós-miccional (PPM), que é a pressão imediatamente posterior à contração de micção, e representa a eficiência do esvaziamento da bexiga;
- (5) Pressão de pico (CM), que é a amplitude do pico da contração que resulta em micção;
- (6) Freqüência de micção (FM) que é o número de contrações de micção por min;
- (7) Freqüência de contrações involuntárias (CIs), calculada como número de CIs por minuto, sendo considerada como CI aquela contração com amplitude superior a 4 mmHg que não resulta em micção;

2.6 Western blotting

As bexigas, urotélio ou detrusores foram homogeneizados em tampão SDS utilizando-se homogeneizador Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, EUA), operado em velocidade máxima por 30 s. Os extratos foram centrifugados à $12000\times g$, 4°C , durante 20 min para remover materiais insolúveis. Para a determinação de proteínas fosforiladas, as bexigas intactas, detrusor ou urotélio isolados foram previamente estimulados *in vitro* com insulina (100 nM). As concentrações de proteína no sobrenadante foram determinadas através do método de Bradford. Quantidades iguais de proteína de cada amostra (50 μg) foram tratadas com

tampão Laemmli contendo ditioeritrol (100 mM). As amostras foram aquecidas em banho com água fervente por 15 min e em seguida aplicadas em gel SDS-PAGE. A eletrotransferência das proteínas para membrana de nitrocelulose foi realizada durante 60 min a 15 V (constante) em sistema semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As ligações inespecíficas das proteínas à nitrocelulose foram reduzidas através da pré-incubação “overnight” da membrana à 4°C com o tampão de bloqueio (0,5% de leite em pó, Tris 10 mM, NaCl 100 mM e 0,02% de Tween 20). A detecção foi realizada utilizando-se anticorpos primários específicos, anticorpos secundários HRP-conjugados e solução de luminol, como descrito previamente (Anhê et al., 2007). Foram utilizados anticorpos anti-PKC, anti-DHPR α 1, anti-eNOS, anti-eNOS phospho Ser 1177, anti-AKT 1,2,3, AKT fosfo Ser473, anti-ATF4, anti-CHOP e anti-TRB3. A densitometria foi realizada usando o Software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, EUA).

Para detecção de níveis de p-AKT e p-eNOS foram comparadas bexigas de animais obesos e controle nos níveis basais e após estimulação *in vitro* (Krebs-Henseleit, 37°C, pH 7,4 e aerado com gás carbogênio) com insulina (100 nM, 20 min).

2.7 Determinação dos níveis de GMPc

Para determinação dos níveis de GMPc em homogenatos de bexiga de camundongos, os tecidos foram equilibrados durante 20 min em solução de Krebs continuamente oxigenada à 37°C. Os tecidos foram então estimulados por 30 min com insulina (100 nM). Alguns tecidos foram incubados com L-NAME (100 μ M), wortmannin (100 nM), LY294002 (10 μ M) ou com AKT *Inhibitor* (5 μ M) por 15 min antes da adição de insulina. Em seguida, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, pulverizados,

homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA, 5%) e centrifugados à 1500 g 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 o anticorpo foi feita conforme descrito no kit disponível comercialmente (Cayman Chemical Cyclic GMP EIA kit, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.8 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão das médias (E.P.M) de um número experimental (n). Para comparações múltiplas entre 3 grupos ou mais, foi usado o teste de análise de variância (ANOVA de uma via), seguido pelo teste de Tukey. O programa Instat (GraphPad Software) foi usado para estas análises. Para a comparação entre dois grupos, usou-se o teste “t” de STUDENT não pareado. $P < 0,05$ foi aceito como significativo.

3- RESULTADOS: PARTE 1

3.1 Características gerais

Camundongos obesos exibiram um aumento significativo do peso corpóreo e da gordura epididimal quando comparados ao grupo controle ($P < 0,001$; **Tabela 1**). A pressão caudal não foi modificada nos camundongos obesos. O peso da bexiga não foi significativamente modificado entre os grupos obesos e controle. Os níveis de glicose de jejum foram maiores em aproximadamente 70% no grupo obeso ($P < 0,001$; **Tabela 1**). O tratamento com metformina (300 mg/Kg/dia, 2 semanas) normalizou os níveis elevados de glicose do grupo obeso sem modificar de modo significativo os demais parâmetros (**Tabela 1**).

Tabela 1: Valores de peso corporal, gordura epididimal, peso da bexiga, glicemia de jejum e pressão caudal em camundongos obesos e controles, não tratados e tratados com metformina (300 mg/Kg/dia, 2 semanas).

	Controle	Controle + Metformina	Obeso	Obeso + Metformina
<i>Peso corporal (g)</i>	28,5 ± 0,3	28,4 ± 0,3	45,7 ± 1,1 ^{***}	43,7 ± 0,9 ^{***}
<i>Gordura epididimal (g)</i>	0,25 ± 0,01	0,39 ± 0,3	1,71 ± 0,08 ^{***}	1,86 ± 0,1 ^{***}
<i>Peso da bexiga (mg)</i>	24,9 ± 4,1	25,7 ± 0,8	27,9 ± 6,9	27,1 ± 0,9
<i>Glicemia (mg/dl)</i>	139,5 ± 6,6	166 ± 10	237,7 ± 11,9 ^{***}	162 ± 5,2 [#]
<i>Pressão caudal (mmHg)</i>	84,4 ± 3,4	81 ± 2,8	85,9 ± 3,3	83 ± 3,7

*** $P < 0,001$ comparado com o grupo controle; # $P < 0,001$ comparado com o grupo obeso não tratado.

3.2 Teste de sensibilidade à insulina

Como demonstrado na Figura 3A,B, os camundongos obesos apresentaram resistência à insulina, o que é indicado pela curva obtida no teste de tolerância à insulina (Figura 3A) e pela redução significativa no valor de Kitt (Figura 3B).

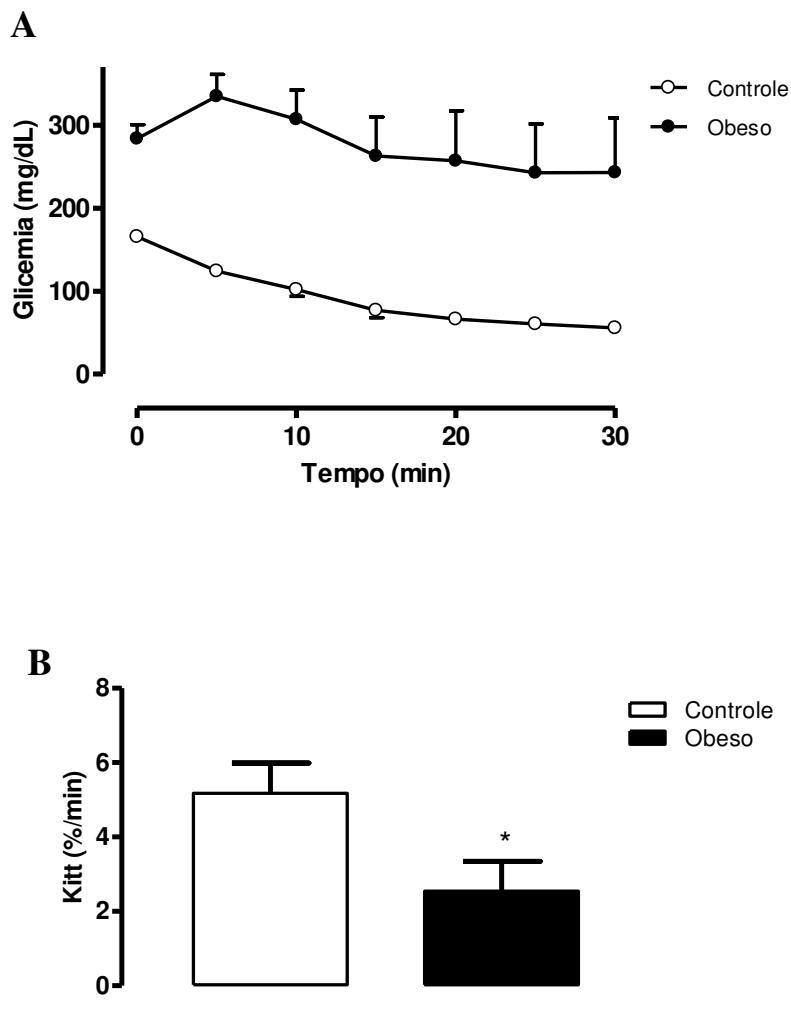


Figura 3: Teste de sensibilidade à insulina em camundongos obesos e controle: **(A)** curva de sensibilidade à insulina e **(B)** Valores da constante de desaparecimento da glicose sanguínea (Kitt). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média de 7 - 8 animais. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle.

3.3 Experimentos funcionais em banho para órgão isolado

A Figura 4A mostra que o agonista muscarínico, carbacol (1 nM – 100 µM), produziu contrações concentração-dependente em *strips* de detrusor isolado com resposta máxima (E_{max}) maior no grupo obeso em comparação ao grupo controle ($5,02 \pm 0,89$ e $1,83 \pm 0,36$ mN/mg, respectivamente; $n = 6-7$, $P < 0,01$). A potência (pEC_{50}) ao carbacol não foi modificada nos camundongos obesos em relação aos controles ($6,23 \pm 0,09$ e $6,11 \pm 0,06$, respectivamente).

As respostas contráteis ao agonista de receptor P2X1, α,β -metileno ATP (1 – 10 µM), não foram diferentes entre animais controles e obesos ($n = 6-7$; Fig. 4E).

A estimulação elétrica (EFS; 1-32 Hz) produziu contrações frequência-dependentes no músculo liso detrusor de ambos os grupos; porém, foram significativamente maiores nos camundongos obesos, em todas as frequências aplicadas (Fig. 4C; $n = 6$). O pré-tratamento das preparações de músculo liso detrusor com o antagonista muscarínico, atropina (1 µM), juntamente com o antagonista de receptor purinérgico, PPADS (30 µM), reduziu drasticamente ($P < 0,001$) as contrações induzidas por estimulação elétrica tanto no grupo controle (E_{max} : $1,57 \pm 0,25$ e $0,37 \pm 0,09$ mN/mg para as preparações não tratadas e tratadas, respectivamente; $n = 6$) como para o grupo obeso (E_{max} : $2,82 \pm 0,38$ e $0,93 \pm 0,19$ mN/mg; para as preparações não tratadas e tratadas, respectivamente $n = 6$). A incubação com o bloqueador do canal de sódio tetrodotoxina (1 µM) praticamente aboliu as contrações em todas as frequências testadas ($n = 4$).

Curvas cumulativas de contração receptor-independente aos agentes contráteis KCl e CaCl₂ foram também obtidas em *strips* de detrusor isolado de ambos os grupos (Fig. 4B,D). O KCl (1 – 300 mM; $n = 6-7$) e o CaCl₂ (0,01 – 100 mM; $n = 5-6$) produziram

contrações concentração-dependente em ambos os grupos, porém com significativo aumento da E_{max} nos camundongos obesos ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo controle (Fig. 4B,D). Não encontramos diferenças significativas em relação aos valores de pEC_{50} para KCl e $CaCl_2$ entre camundongos controle ($1,25 \pm 0,07$ e $2,19 \pm 0,08$, respectivamente) e obesos ($1,36 \pm 0,07$ e $2,14 \pm 0,06$, respectivamente).

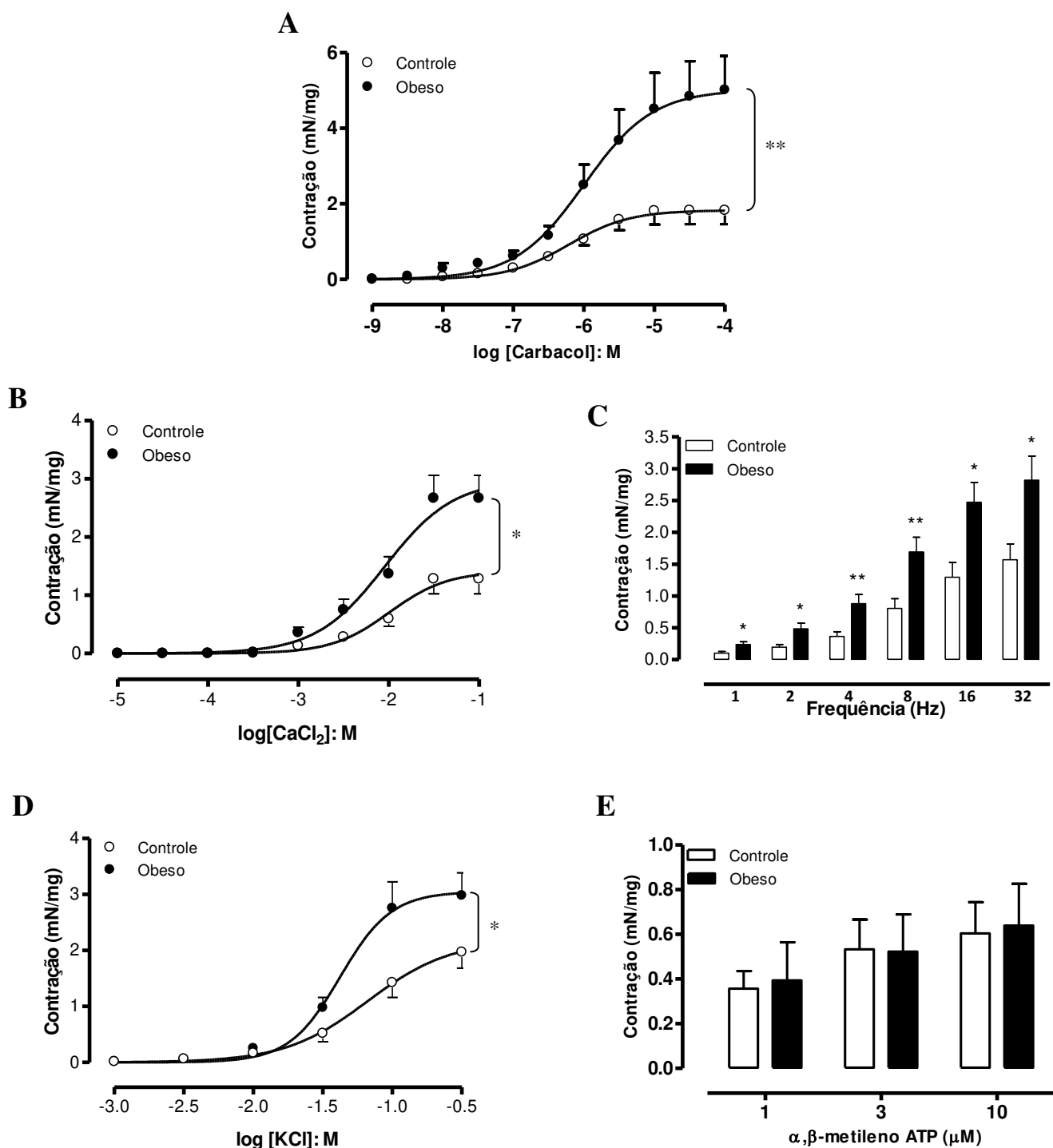


Figura 4. Contrações de detrusor em resposta ao carbacol (A), CaCl₂ (B), estimulação elétrica (C), KCl (D) e α,β-metileno-ATP (E) em *strips* isolados de camundongos controle e obesos. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média de 6 - 7 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado com o grupo controle.

3.4 Efeito do bloqueio de canais de Ca^{2+} do tipo L

Uma vez que a resposta contrátil ao KCl e ao $CaCl_2$ foi maior em *strips* de detrusor dos camundongos obesos, levantamos a hipótese que o aumento do influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} do tipo L estaria exercendo papel fundamental na hiperatividade de bexiga e hipercontratibilidade induzidas por obesidade.

A incubação *in vitro* do bloqueador de canais de Ca^{2+} do tipo L, anlodipino (3 μ M; $n = 4-5$) normalizou as respostas contráteis ao carbacol (E_{max}) em detrusor de camundongos obesos, apresentando pequeno, porém significativo, efeito sobre os tecidos dos camundongos controle (Fig. 5 A,B). O aumento das contrações ao KCl (Fig. 5 C,D; $n = 5-7$) e ao $CaCl_2$ (Fig. 5 E,F; $n = 4-5$) em camundongos obesos também foi prevenido pelo anlodipino.

Os animais também foram tratados cronicamente, por via oral, com anlodipino (25 mg/kg/dia, 21 dias), após o qual avaliamos as respostas contráteis ao carbacol ($n = 6-7$), KCl ($n = 5-10$) e $CaCl_2$ ($n = 5-11$). O tratamento crônico com o anlodipino preveniu o aumento das contrações ao carbacol (Fig. 6 A,B), KCl (Fig. 6 C,D) e $CaCl_2$ (Fig. 6 E,F) nos camundongos obesos. O anlodipino não alterou significativamente as contrações induzidas por carbacol e KCl nos animais controle; porém, reduziu as respostas contráteis ao $CaCl_2$ tanto em camundongos obesos como em animais controle.

3.5 Papel da resistência à insulina na hiperatividade de bexiga em camundongos obesos

O tratamento crônico com o agente anti-hiperglicêmico, metformina (300 mg/kg/dia, 14 dias), não modificou significativamente o peso corporal e gordura epididimal em obesos ($43,7 \pm 0,9$ e $1,86 \pm 0,1$ g, respectivamente, $n=11$) e camundongos controle ($28,4 \pm 0,3$ e $0,39 \pm 0,3$ g, respectivamente, $n=10$). O tratamento com a metformina restaurou a sensibilidade à insulina nos animais obesos, normalizando o valor de Kitt a níveis normais ($5,17 \pm 0,81$, $4,68 \pm 1,23$, $2,54 \pm 0,80$ e $5,76 \pm 0,38$ %/min para controle não-tratado, controle tratado, obesos não tratados e obesos tratados, respectivamente; $n=4-6$), bem como os valores de glicemia de jejum (166 ± 10 e $162 \pm 5,2$ mg/dL para controle e obeso tratados, respectivamente; $n=5$).

O aumento das contrações de detrusor de camundongos obesos em resposta ao carbacol (Fig. 6 A,B), KCl (Fig. 6 C,D) e CaCl_2 (Fig. 6 E,F) foi prevenido pelo tratamento crônico com metformina ($n = 6-11$). O tratamento com metformina não produziu alterações das respostas contráteis no grupo controle. A incubação *in vitro* dos *strips* de detrusor com metformina (1 μM , 30 min) não modificou significativamente as contrações de detrusor em ambos os grupos, controle e obeso (Fig. 5).

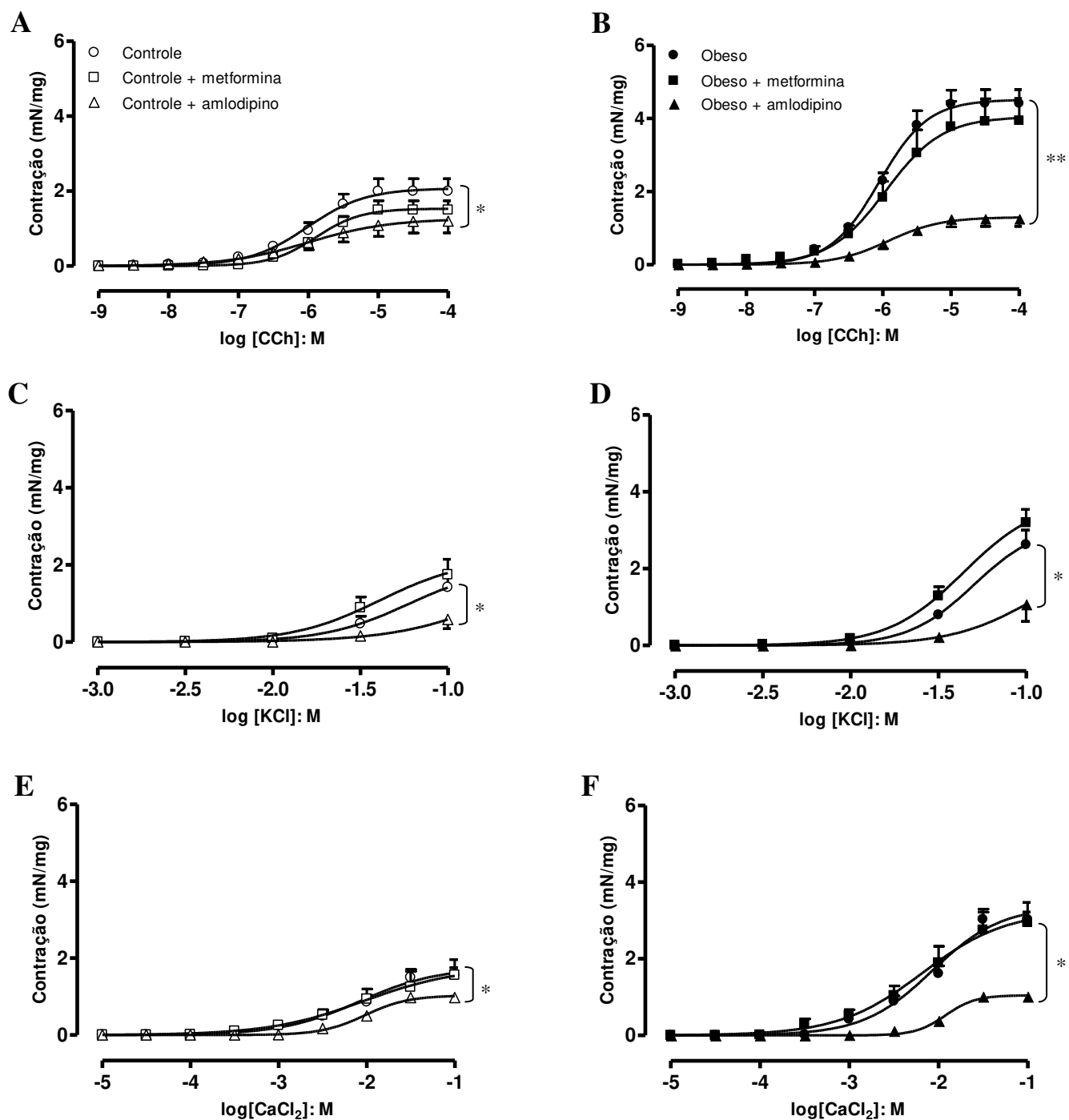


Figura 5. Curvas cumulativas concentração-resposta ao carbacol (CCh; **A,B**), KCl (**C,D**) e CaCl₂ (**E,F**) na presença de metformina (1 μM) ou anlodipino (3 μM) pré-incubados *in vitro* em detrusor isolado de camundongos controle e obesos. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média de 4 - 7 camundongos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparados com o grupo controle.

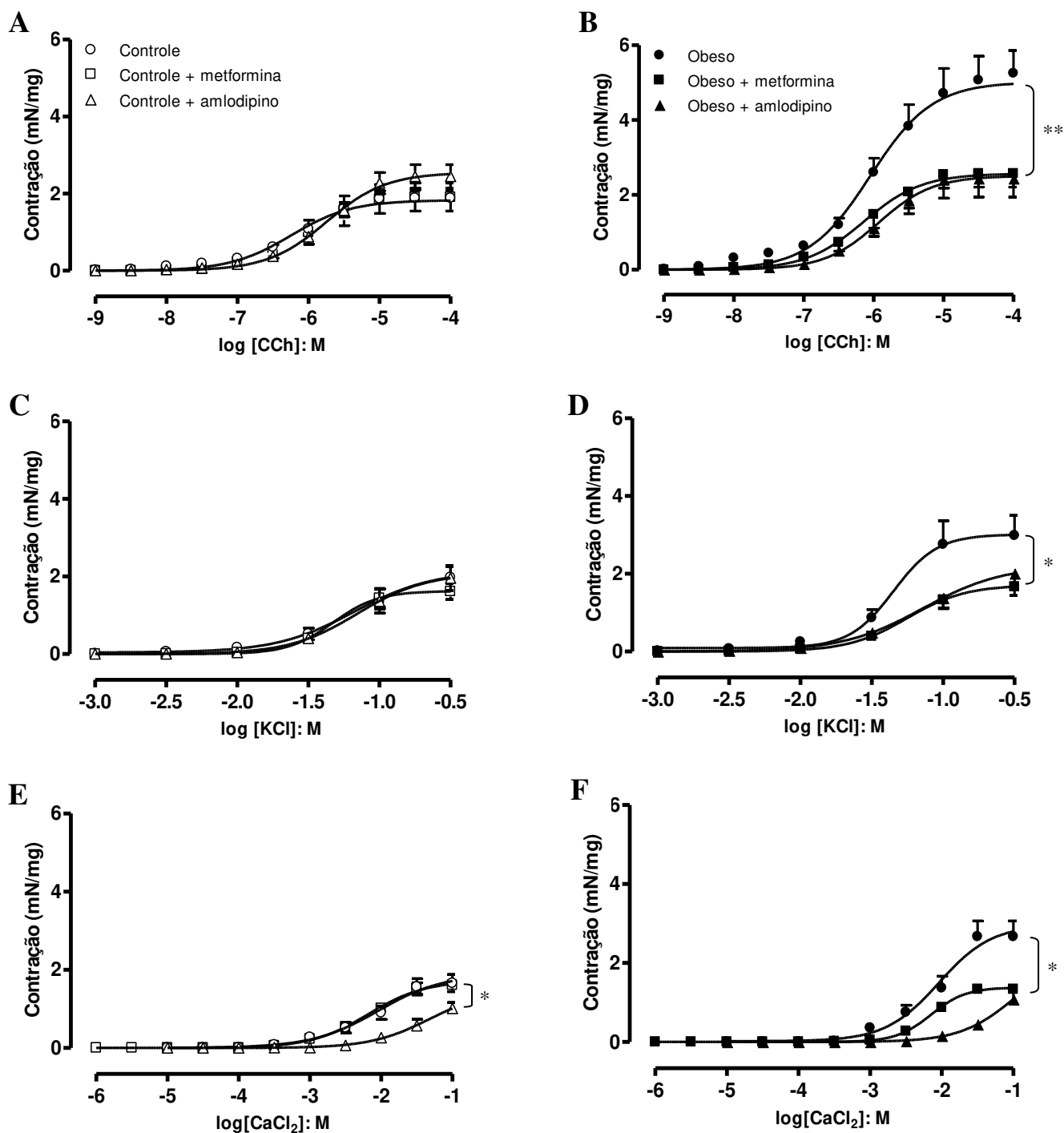


Figura 6. Curvas cumulativas concentração-resposta ao carbachol (CCh; **A,B**), KCl (**C,D**) e CaCl₂ (**E,F**) em detrusor isolado de camundongos controle e obesos tratados cronicamente com metformina (300 mg/Kg/dia, 2 semanas) e anlodipino (25 mg/Kg/dia, 3 semanas). Os valores são expressos como média ± erro padrão da média de 4 - 7 camundongos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparados com o grupo controle.

3.6 Cistometria

Durante a cistometria, os camundongos controle exibiram ciclos de micção regulares com esparsas contrações involuntárias (Fig. 7A). Em contraste, os camundongos obesos exibiram ciclos de micção irregulares (Fig. 7B) acompanhados por um aumento significativo ($P<0,01$) na frequência de micção e de contrações involuntárias (Fig. 8 A,B; $n=5-7$). A pressão pós-miccional, a qual reflete a eficiência do esvaziamento da bexiga, foi marcadamente maior ($P<0,01$) nos camundongos obesos, em comparação com os animais controle (Fig. 8C). A capacidade da bexiga, pressão limiar, complacência e pressão de pico não foram modificadas nos animais obesos (Tabela 2).

Uma vez que o anlodipino normalizou as contrações *in vitro* nos animais obesos, procuramos investigar os efeitos do tratamento crônico com este fármaco sob os parâmetros cistométricos. O tratamento crônico com o anlodipino não resultou em alterações urodinâmicas significativas no grupo controle ($n=5-7$); porém, preveniu o aumento da frequência de micção, das contrações involuntárias, bem como da pressão pós-miccional no grupo obeso (Fig. 7C; Fig. 8). Os demais parâmetros cistométricos (capacidade, pressão limiar, complacência e pressão de pico) não foram modificados pelo tratamento com anlodipino (Tabela 2).

Como a melhora da sensibilidade a insulina pelo tratamento crônico com a metformina também normalizou a hiperatividade de detrusor em camundongos obesos, em um passo seguinte investigamos o efeito deste agente anti-hiperglicêmico nas alterações cistométricas. O tratamento com metformina restaurou a níveis normais os valores de frequência de micção, contrações involuntárias e pressão pós-miccional em camundongos obesos (Fig. 7D; Fig. 8). Os demais parâmetros permaneceram inalterados após o

tratamento (Tabela 2). O tratamento com metformina não modificou significativamente os parâmetros cistométricos em camundongos controle (Fig. 8).

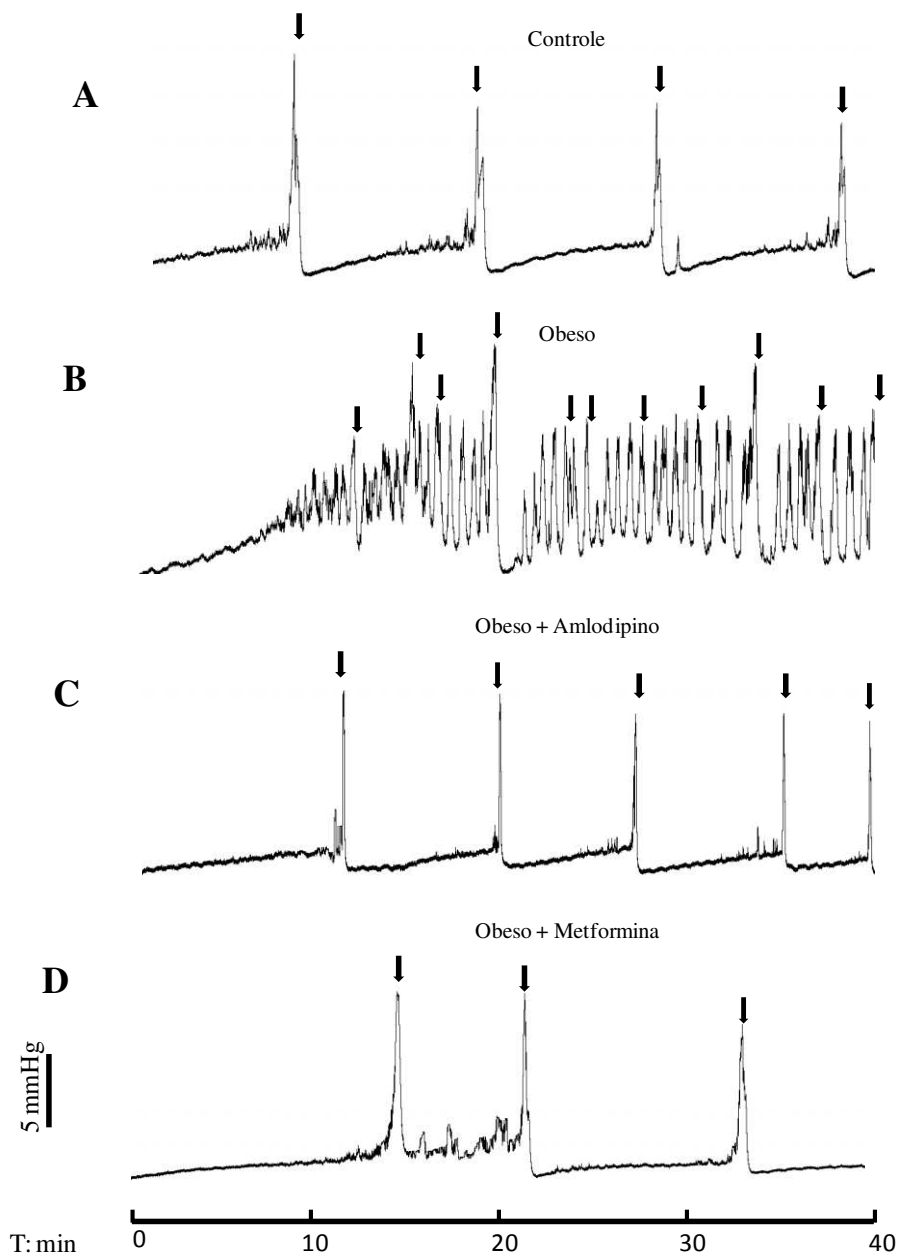


Figura 7. Traçados cistométricos representativos de camundongos controle (A), obesos (B), obesos tratados com anlodipino (C) e obesos tratados com metformina (D). As flechas em preto indicam as contrações de micção.

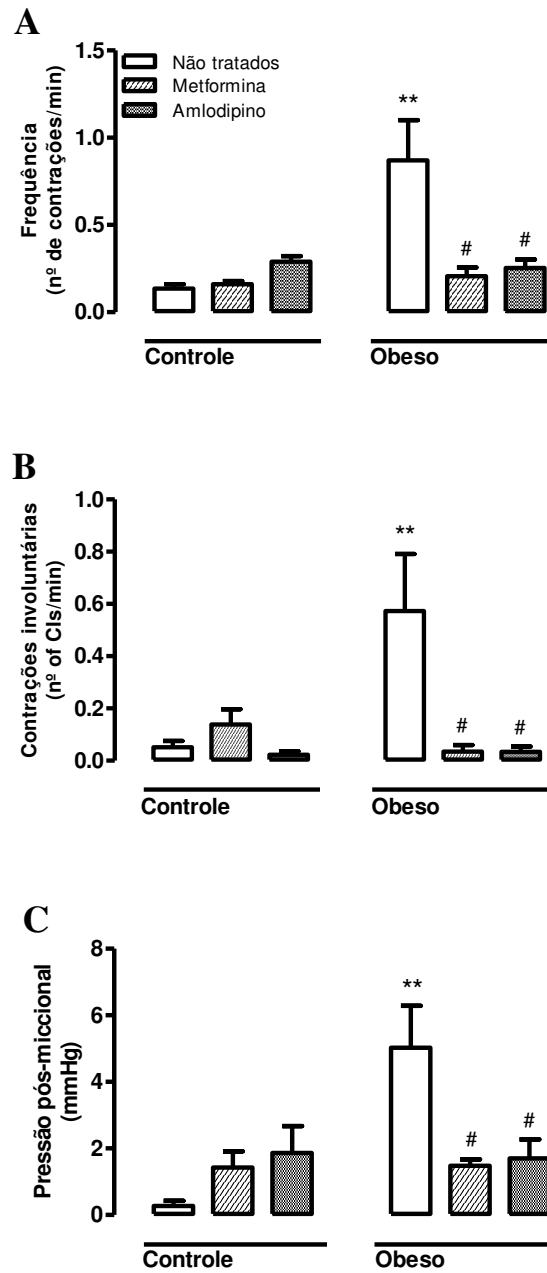


Figura 8. Parâmetros cistométricos em camundongos controle e obesos, tratados ou não com anlodipino (25 mg/Kg/dia, 3 semanas) ou metformina (300 mg/Kg/dia, 2 semanas). (A) Frequência de contrações de micção; (B) Frequência de contrações involuntárias e (C) pressão pós-miccional. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão de 5 – 7 animais. ** $P < 0,01$ comparado com o grupo controle, # $P < 0,01$ comparado com o grupo obeso não tratado.

Tabela 2: Parâmetros cistométricos avaliados em camundongos obesos e controles tratados cronicamente ou não com metformina (300 mg/kg/dia, 2 semanas) ou anlodipino (25 mg/kg/dia, 3 semanas).

	Grupo controle			Grupo obeso		
	Não tratado	Anlodipino	Metformina	Não tratado	Anlodipino	Metformina
Capacidade (ml)	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,19 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,16 ± 0,02
Pressão limiar (mmHg)	3,6 ± 0,7	5,3 ± 0,7	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,9	4,0 ± 0,6	5,4 ± 0,9
Complacência (mmHg/mL)	0,03 ± 0,004	0,03 ± 0,007	0,04 ± 0,009	0,03 ± 0,009	0,03 ± 0,007	0,036 ± 0,011
Pressão de pico (mmHg)	12,2 ± 0,82	9,3 ± 1,02	13,9 ± 1,44	12,2 ± 2,3	9,9 ± 0,88	16,2 ± 1,9

Resultados são expressos como média ± erro padrão de 4-7 animais de cada grupo.

3.7 Papel da PKC no aumento das respostas contráteis

A PKC regula a atividade de canais de Ca^{2+} em vários tipos de células musculares lisas, incluindo em detrusor (Huster et al., 2010). Portanto, investigamos o envolvimento da PKC no aumento das contrações observadas em camundongos obesos. Os camundongos obesos exibiram aumento significativo ($P < 0,01$) da resposta contrátil ao ativador da PKC, PDBu (E_{max} : $0,71 \pm 0,01$ mN/mg; $n = 4$) em comparação com o grupo controle (E_{max} : $0,26 \pm 0,07$ mN/mg; $n = 7$). A pré-incubação com anlodipino ($3 \mu\text{M}$) praticamente aboliu as contrações induzidas por PDBu em ambos os grupos, controle e obeso (Fig. 9A), confirmando o envolvimento da PKC na modulação positiva da atividade dos canais de Ca^{2+} do tipo L em camundongos obesos. Como mostrado na figura 9B, a expressão protéica da PKC foi significativamente maior em bexiga de animais obesos ($P < 0,05$), que é consistente com os resultados observados nos experimentos funcionais *in vitro*. O aumento da expressão protéica da PKC foi prevenida pelo tratamento crônico com anlodipino ou metformina (Fig. 9C). Os tratamentos não afetaram a expressão de PKC no grupo controle. Também investigamos a expressão dos canais de Ca^{2+} do tipo L por western blot, mas não encontramos diferenças significativas entre os grupos (Fig. 9D).

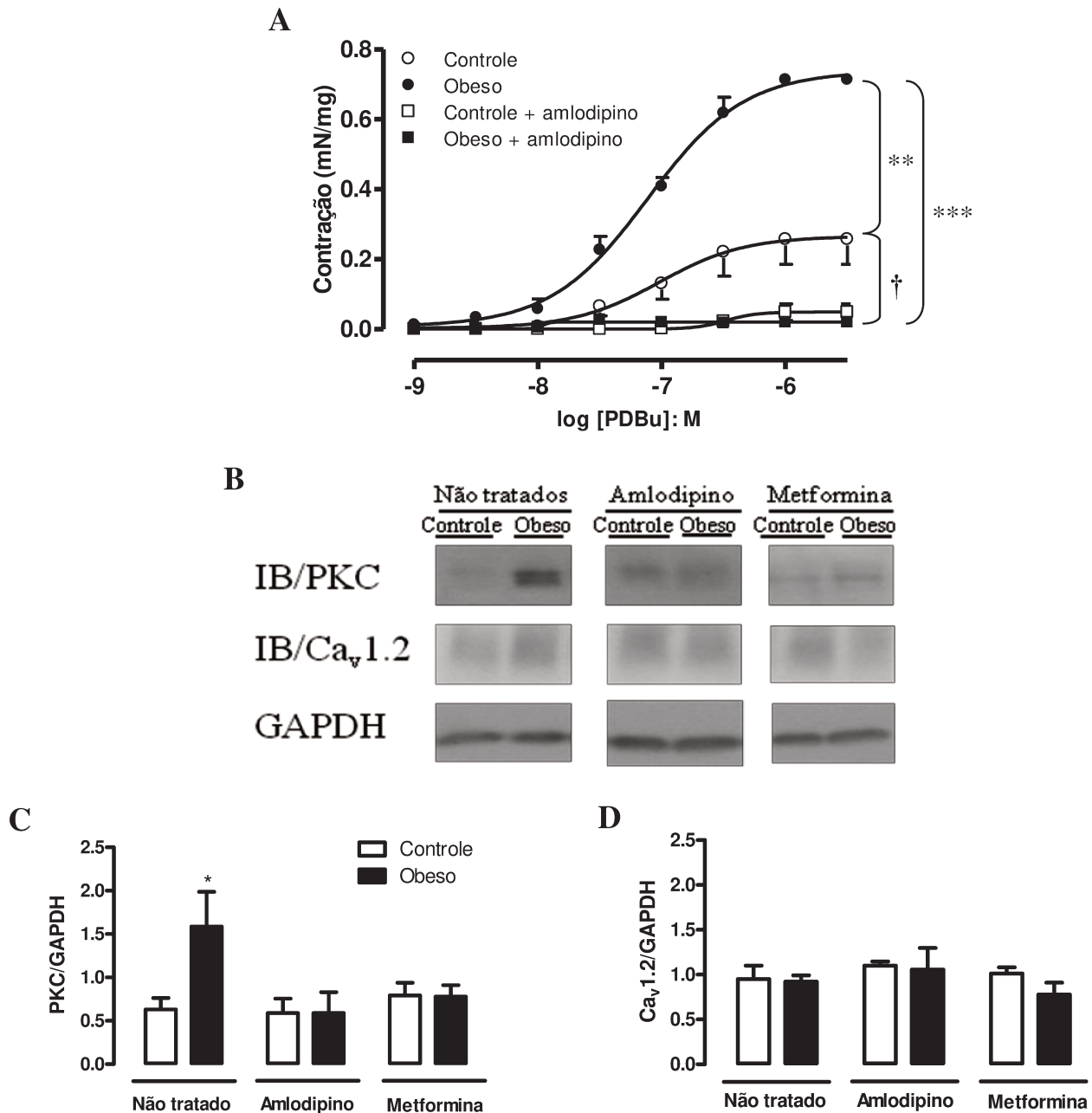


Figura 9. (A) Curva concentração-resposta ao PDBu, na presença de anlodipino (3 μ M) em detrusor de camundongos controle e obesos; (B) Bandas representativas de expressão de PKC e subunidade α 1 dos canais de cálcio Ca_v1.2; (C) Expressão protéica de PKC e (D) Subunidade α 1 dos canais de cálcio Ca_v1.2. Os ensaios de western blot foram realizados em bexigas de animais obesos e controle, tratados ou não com metformina (300 mg/Kg/dia, 2 semanas) ou anlodipino (25 mg/Kg/dia, 3 semanas). Dados expressos como a média \pm erro padrão para 4-7 camundongos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparados com o grupo controle, *** $P < 0,001$ comparado com o grupo obeso tratado *in vitro*; † $P < 0,05$ comparado com o grupo controle tratado *in vitro*.

3.8 Efeito da metformina sobre os níveis de AKT fosforilada em camundongos obesos

Para verificar se o tratamento com metformina (300 mg/Kg/dia, 2 semanas) altera a sensibilidade à insulina na bexiga, estas foram estimuladas com insulina (100 nM) e os níveis de AKT fosforilada foram mensurados por western blot. A insulina aumentou a fosforilação da AKT em bexigas de animais controle (tratados e não tratados com metformina), enquanto as bexigas de camundongos obesos não responderam à insulina (Figura 10). O tratamento com metformina normalizou os níveis de AKT fosforilada na Ser 473 nos animais obesos, evidenciando que a metformina normaliza a função miccional paralelamente à restauração dos níveis de PKC e da sensibilização à insulina na bexiga.

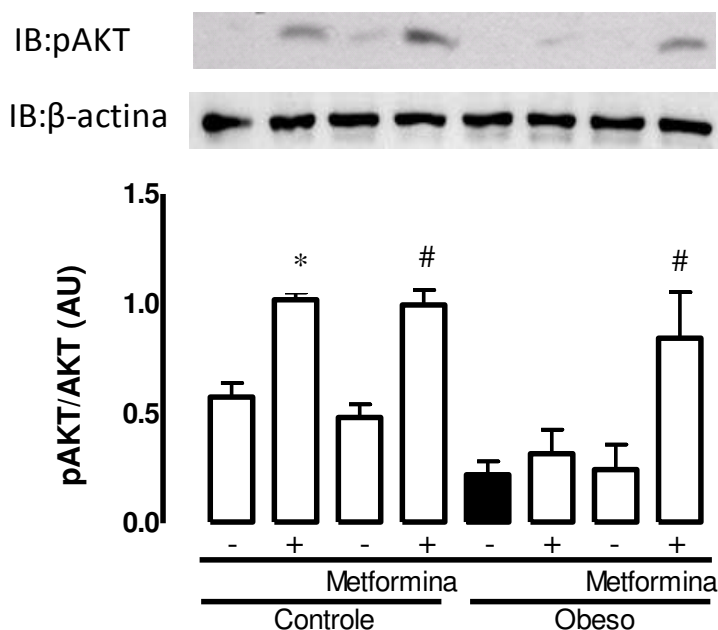


Figura 10: Western blot para determinação de expressão de AKT fosforilada após estímulo com insulina (100 nM) em bexigas isoladas de camundongos controle e obesos, tratados ou não com metformina (300 mg/Kg/dia, 2 semanas) por via oral. Dados expressos como a média \pm erro padrão para 5 camundongos. * $P < 0,01$, comparado ao grupo controle, # $P < 0,01$ comparado ao respectivo grupo não tratado.

4- DISCUSSÃO: PARTE 1

O presente estudo mostra que camundongos obesos, alimentados com dieta hiperlipídica, apresentam detrusor hiperativo como resultado do aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais de Ca^{2+} do tipo L, que parece estar relacionado ao aumento da expressão de PKC neste tecido. O tratamento com o agente anti-hiperglicêmico, metformina, restaura a sensibilidade à insulina nos camundongos obesos, além de concomitantemente normalizar os níveis protéicos de PKC e a disfunção vesical nestes animais. Isto indica que a resistência à insulina é crítica para a progressão da hiperatividade vesical resultante de obesidade associada à dieta rica em gorduras.

O termo síndrome metabólica refere-se à combinação de anormalidades metabólicas ou fatores de riscos para o diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, como obesidade central, dislipidemia, hipertensão e resistência à insulina (Hanley et al., 2003; Carr et al., 2004; Opie, 2007). Entre os fatores de risco, a obesidade central é considerada fator determinante para o desenvolvimento de síndrome metabólica (Carr *et al.*, 2004). No presente modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, os camundongos exibiram aumento do peso corporal e da gordura epididimal (correspondente a gordura abdominal em humanos), assim como resistência à insulina. Utilizando este mesmo modelo, trabalhos prévios relataram a ocorrência de dislipidemia e intolerância à glicose nos animais (Tsukumo et al., 2007; Calixto et al., 2010). Estas modificações sugerem que o presente modelo de síndrome metabólica reproduz as alterações observadas em humanos com síndrome metabólica. Os camundongos obesos não exibiram aumento da pressão caudal, excluindo a pressão caudal como possível causa das presentes alterações funcionais.

Vários estudos epidemiológicos apontam para uma forte correlação entre o desenvolvimento de disfunções do trato urinário inferior e obesidade (Richter et al., 2005). Resultados de nosso estudo urodinâmico revelam hiperatividade de detrusor em

camundongos obesos, como evidenciado pelo aumento da frequência de micção, frequência de contrações involuntárias e pressão pós-miccional. Por outro lado, os demais parâmetros cistométricos, como capacidade, complacência, pressão limiar e pressão de pico não foram alterados. Estes dados diferem de estudo prévio do grupo, onde camundongos com diabetes tipo 1 induzida por estreptozotocina apresentaram, além das alterações mostradas no presente trabalho, aumento da capacidade, complacência e pressão de pico (Leiria et al., 2011). Acredita-se que estas alterações urodinâmicas no diabético tipo 1 sejam consequência do aumento da diurese e do remodelamento da bexiga. A obesidade/síndrome metabólica aumenta o risco de desenvolvimento de hiperplasia prostática benigna, que por sua vez é fator determinante para o desenvolvimento de detrusor hiperativo resultante da obstrução parcial da bexiga (Parsons et al., 2009). Dessa forma, em nosso estudo, o aumento da pressão pós miccional, que reflete redução da eficiência de micção, pode ser consequência de aumento da resistência uretral, devido ao aumento de volume prostático (Vikram et al., 2010). Entretanto, estudos adicionais seriam necessários para comprovar esta hipótese.

As contrações neurogênicas de bexiga refletem principalmente a liberação do neurotransmissor ACh, a partir de fibras parassimpáticas. Adicionalmente, o ATP também pode produzir contrações na bexiga, de maneira concentração-dependente, via receptores P2X1 (Brading e Williams, 1990; Tammela et al., 1994). Além disso, existem componentes resistentes à ação muscarínica e purinérgica que ainda não foram completamente caracterizados (Pinna et al., 2006; Kennedy et al., 2007). No presente estudo, tanto as contrações de detrusor induzidas por estimulação elétrica como aquelas induzidas por carbacol foram maiores no grupo obeso em comparação ao grupo controle, enquanto as respostas contráteis ao agonista P2X1, α,β -metileno ATP, não foram diferentes entre os

grupos. Os receptores muscarínicos M_3 interagem com as proteínas Gq as quais, uma vez ativadas, desencadeiam a hidrólise de fosfoinositídeos de membrana e consequente geração do segundo mensageiro, inositol trifosfato (IP_3), o qual promove a liberação de Ca^{2+} dos estoques do retículo sarcoplasmático, aumentando sua concentração citosólica (Abrams et al., 2006). Entretanto, em músculo liso detrusor, as contrações mediadas por receptores muscarínicos M_3 envolvem principalmente influxo de Ca^{2+} extracelular via canais de Ca^{2+} do tipo L, como demonstrado em bexigas de diferentes espécies animais e de humanos (Uchida et al., 1994; Masters et al., 1999; Wegener et al., 2004; Schneider et al., 2004; Wuest et al., 2007; Frazier et al., 2008). Níveis elevados de K^+ extracelular despolarizam a membrana celular, ativando os canais de Ca^{2+} do tipo L, que resulta no aumento da entrada de Ca^{2+} com subsequente ativação das proteínas contráteis. Em células musculares lisas, o bloqueio dos canais de Ca^{2+} do tipo L reduz amplamente a concentração intracelular de íons Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) resultante do estímulo por K^+ ou $CaCl_2$ extracelular. Nossos resultados mostram um aumento das respostas contráteis dependentes (carbacol) e independentes (KCl e $CaCl_2$) de receptores, sugerindo que aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular via canais de Ca^{2+} do tipo L pode ser determinante para a hiperatividade de bexiga nos camundongos obesos. Esta hipótese foi confirmada com o tratamento crônico dos animais obesos com anlodipino, cujas respostas contráteis ao carbacol, KCl e $CaCl_2$ foram normalizadas no grupo obeso. As alterações urodinâmicas observadas no grupo obeso também foram restauradas pelo tratamento com anlodipino, o que está em consonância com os resultados obtidos com a pré-incubação *in vitro* deste fármaco, onde se verificou a normalização das respostas contráteis aos agentes dependentes e independentes de receptores. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que a hiperatividade de detrusor em camundongos obesos

reflete um aumento da ativação de canais de Ca^{2+} do tipo L via receptores muscarínicos M3.

A cascata de sinalização dos receptores muscarínicos M3 em músculo liso também envolve a geração de diacilglicerol (DAG) levando à ativação da PKC e inibição da fosfatase de miosina de cadeia leve, resultando, conseqüentemente, na contração da musculatura (Abrams et al., 2006). A PKC regula a atividade de canais de Ca^{2+} do tipo L em diferentes tipos de músculo liso. Em miócitos ventriculares, o acoplamento de α_{1A} -adrenoceptores com a via Gq/11-PLC-PKC-CaMKII potencializa o influxo de Ca^{2+} extracelular através da fosforilação das subunidades α_{1c} e β dos canais de Ca^{2+} do tipo L (O-Uchi et al., 2008). Trabalho recente em detrusor de camundongos mostra que, em condições fisiológicas, os canais de Ca^{2+} do tipo L servem como um sítio alvo para o ancoramento da PKC, a qual é translocada para a membrana celular via estimulação muscarínica (Huster et al., 2010). Este trabalho sugere que a estimulação de receptores muscarínicos M₃ na bexiga regula a atividade dos canais de Ca^{2+} do tipo L através da formação de um complexo macromolecular formado por PKC/PLD/canais de Ca^{2+} do tipo L (Huster et al., 2010). No presente estudo, realizamos curvas cumulativas concentração-resposta ao PDBu (ativador da PKC), e encontramos um aumento significativo da resposta contrátil em detrusor de camundongos obesos. O tratamento *in vitro* com o anlodipino (30 min, 3 μM) praticamente aboliu as contrações induzidas por PDBu em ambos os grupos. Estes resultados estão de acordo com o aumento dos níveis de expressão protéica de PKC na bexiga de camundongos obesos, os quais foram prevenidos pelo tratamento crônico com anlodipino. A modulação negativa da PKC pelo tratamento crônico com anlodipino pode ter ocorrido como um *feedback* positivo em conseqüência da inativação/bloqueio dos canais de Ca^{2+} do tipo L. Tomados em conjunto, nossos dados indicam que a PKC está

diretamente envolvida com a hipercontratibilidade e hiperatividade de detrusor observada nestes animais, o que se dá provavelmente em razão da exacerbação da ativação dos canais de Ca^{2+} do tipo L pela PKC ativada via receptores M_3 . Reforçando esta hipótese, vimos que a expressão da subunidade α_1 dos canais de Ca^{2+} do tipo L foi inalterada entre os grupos; desta forma, excluiu-se a hipótese segundo a qual o aumento do influxo possa ter ocorrido em função do aumento da expressão destes canais e não de sua atividade.

A metformina é medicamento de escolha para a terapia farmacológica de pacientes com diabetes tipo 2, pois possui efeitos favoráveis, como redução dos níveis glicêmicos e menor risco de hipoglicemia. No presente estudo, o tratamento crônico de camundongos obesos com metformina restaurou a sensibilidade à insulina, bem como os parâmetros funcionais *in vivo* (cistometria) e *in vitro* nestes animais. Além disso, a metformina reverteu o aumento dos níveis de PKC e os níveis de AKT fosforilada na bexiga dos animais obesos, sugerindo que o tratamento normaliza simultaneamente os níveis de PKC e a sensibilidade à insulina. Estudo prévio mostrou que camundongos *knockout* para a PKC- θ são protegidos da resistência à insulina induzida por dieta rica em gorduras (Kim et al., 2004). Nosso trabalho mostra que a incubação *in vitro* do músculo liso detrusor com metformina (30 min, 1 μM) não modifica as respostas aos diferentes agentes contráteis (carbacol, KCl e CaCl_2), confirmando que a normalização da função da bexiga, resultante do tratamento crônico com este agente anti-hiperglicemiante, de fato foi consequência de sua ação como agente sensibilizador à insulina e não a um eventual efeito direto na musculatura lisa. Camundongos obesos tratados com metformina não apresentaram modificação do peso corpóreo em relação aos obesos não tratados, sugerindo que a resistência à insulina e a subsequente hiperglicemia, e não a obesidade *per se*, sejam as principais causas da hiperatividade de bexiga. Embora a metformina reduza o peso corporal e circunferência

abdominal em humanos (Lee e Aronne, 2007), tal efeito não se confirma em modelo de animal obeso tratado com este agente (Sena et al., 2011). Curiosamente, a disfunção de bexiga em ratas fêmeas Zucker obesas foi atribuída à obesidade crônica e não ao diabetes (Gasbarro et al., 2010).

Em suma, nesta etapa do trabalho mostramos que as alterações contráteis e urodinâmicas observados em camundongos obesos, alimentados com dieta hiperlipídica, estão relacionadas ao aumento dos níveis de PKC em bexiga, resultando em um estado de super-ativação dos canais de Ca^{2+} do tipo L e, subsequentemente, aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular. É provável que a modulação positiva da PKC em bexiga de camundongos obesos esteja mediando, simultaneamente, a resistência à insulina e a hiperatividade deste tecido. Desta forma, em condições patológicas caracterizadas pela deficiência da ação da insulina, a hiperativação dos canais de Ca^{2+} do tipo L, através da estimulação da via $\text{M}_3/\text{PLC}/\text{DAG}/\text{PKC}$, leva ao aumento do influxo do extracelular deste íon.

5- RESULTADOS: PARTE 2

5.1 Curvas concentração-resposta à insulina em bexigas humanas

A fim de se avaliar o efeito relaxante direto da insulina (1–100 nM) sobre a bexiga, realizamos curvas concentração-resposta à insulina em *strips* de detrusor de pacientes doadores de órgão. A insulina gerou resposta relaxante de maneira concentração-dependente, alcançando resposta de $32,6 \pm 2,9\%$ para 100 nM (Fig. 11A e B). A inibição da via de sinalização da PI3-K/AKT/eNOS, através da incubação prévia (30 min) com os inibidores da PI3-K (wortmannin; 100 nM e LY294002; 10 μ M), da NOS (L-NAME; 100 μ M) e da AKT (AKT *inhibitor*; 5 μ M), resultou na inibição do relaxamento induzido pela insulina ($n=4-5$, $P<0,05$; Fig. 11C-F).

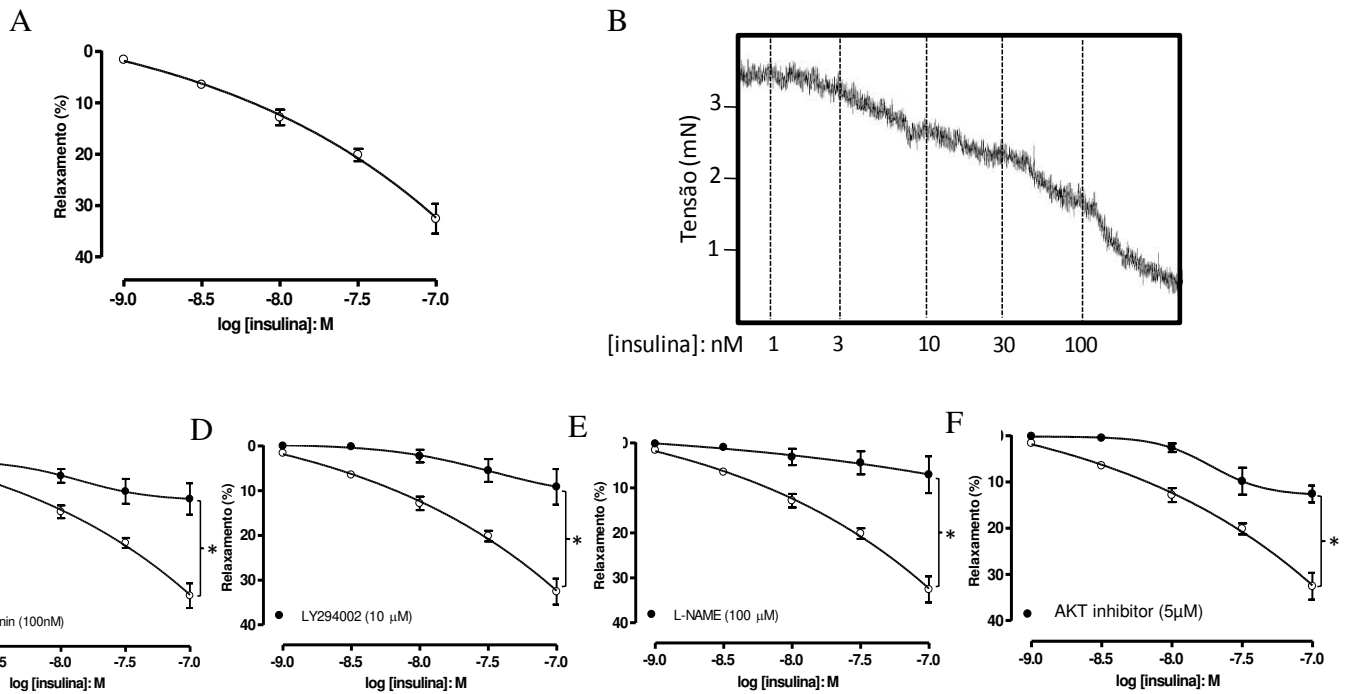


Figura 11: (A, B) Curvas concentração-resposta à insulina em bexigas de pacientes do sexo masculino, com idade entre 18 e 60 anos; (C-F) Curvas concentração-resposta a insulina na presença dos inibidores da PI3-quinase, wortaminnin e LY294002; da NOS, L-NAME (E), e da AKT, AKT *inhibitor* (F). Dados expressos como a média \pm erro padrão para 4-6 pacientes. * $P < 0,05$, comparados à curva controle (círculos vazios).

5.2 Resposta relaxante à insulina em camundongos obesos

Assim como observado em bexigas humanas, as curvas à insulina em bexigas de camundongo resultaram em efeito relaxante concentração-dependente, o qual foi significativamente reduzido nos animais obesos em comparação aos do grupo controle ($17,1 \pm 3,9\%$ e $35,5 \pm 3,3\%$ para 100 nM, respectively, $n = 11-13$, $P < 0,01$; Fig. 12A). A pré-incubação *in vitro* (30 min) com L-NAME resultou em redução significativa do relaxamento à insulina no grupo controle ($n=5$, $P < 0,05$; Fig. 12D). Os inibidores da PI3-K, wortmannin e LY294002, também reduziram significativamente a resposta relaxante em camundongos controle ($n=4-6$, $P < 0,05$; Fig. 12B e C). A insulina não produziu efeito relaxante na presença do inibidor da AKT ($n=5$, $P < 0,05$; Fig. 12E). A pré-incubação dos inibidores supracitados em bexigas de camundongos obesos não produziu alterações significativas na resposta relaxante à insulina ($n=4-7$; Fig. 12B-E).

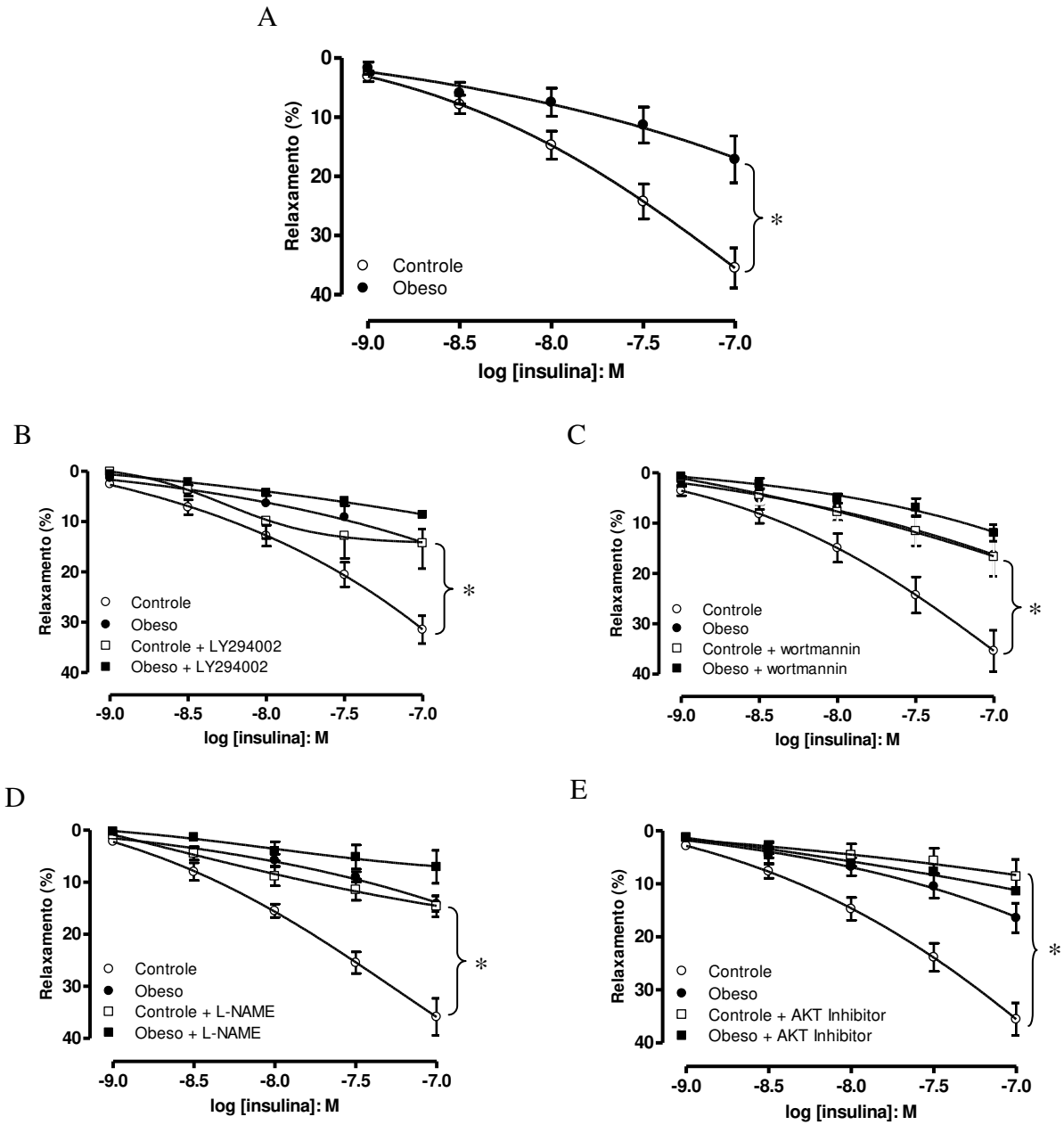


Figura 12: Curvas concentração-resposta à insulina em bexigas de camundongos obesos e controle (**A**); curvas concentração-resposta à insulina na presença dos inibidores da PI3-quinase, LY294002 (10 μ M, **B**) e wortmannin (100 nM, **C**), do inibidor da NOS, L-NAME (100 μ M, **D**) e do inibidor da AKT, AKT inhibitor (5 μ M, **E**). * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle não tratado.

5.3 Níveis de GMPc, pAKT e p-eNOS em bexiga em resposta à insulina

Para se avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na redução da resposta relaxante à insulina em bexiga de camundongos obesos, quantificamos a fosforilação da AKT em serina 473 (pAKT) e da eNOS em serina 1177 (p-eNOS). O estímulo com insulina produziu um aumento de aproximadamente 3 vezes nos níveis de pAKT e de 2 vezes nos níveis de p-eNOS em bexigas de camundongos controle, enquanto nenhum aumento na fosforilação de ambas as enzimas foi verificado em bexigas de camundongos do grupo obeso (Fig. 13A,B).

Como demonstrado na figura 13C, a estimulação da bexiga de animais controle com insulina aumentou em aproximadamente 3 vezes ($P<0,01$) os níveis de GMPc, não se verificando alterações nos níveis deste nucleotídeo cíclico em bexigas de obesos. Além disso, a elevação dos níveis de GMPc no grupo controle foi prevenida pela pré-incubação com os inibidores da via PI3K/AKT/eNOS (L-NAME, wortmannin, LY294002 e AKT *Inhibitor*) (Fig. 13C).

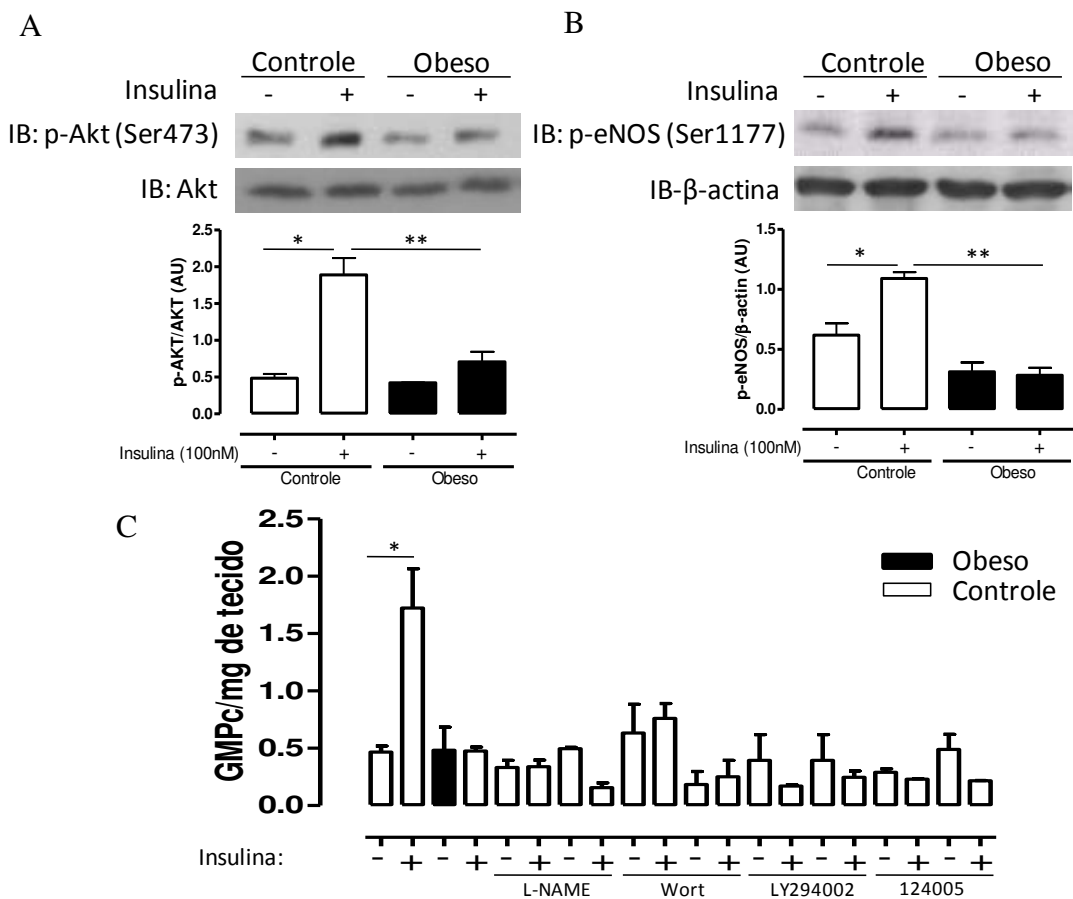


Figura 13: Western blot da fosforilação da AKT Ser473 (A) e da eNOSs Ser1177 (B) em animais controle e obesos nas condições basal e estimulada com insulina. Níveis de GMPc em animais controle e obesos, nas condições basal e estimulada com insulina na ausência e na presença dos inibidores: L-NAME (100 μM), wortmannin (100 nM), LY294002 (10 μM) e AKT *Inhibitor* (5 μM). * $P < 0,05$ comparado com o basal (ausência de insulina); ** $P < 0,05$ comparado com o grupo controle estimulado com insulina.

5.4 Influência do urotélio na resposta relaxante à insulina

Com objetivo de se avaliar o papel do urotélio no relaxamento à insulina, removemos a camada urotelial com auxílio de estereomicroscópio, após o qual preparamos o músculo liso detrusor em banho para órgão isolado para a realização de curvas concentração-efeito à insulina. Verificamos redução significativa da resposta relaxante à insulina em detrusor de camundongos controle desprovidos de urotélio ($n = 5$, $P < 0,001$; Fig. 14 A,B). Por outro lado, a remoção do urotélio não modificou a resposta no grupo obeso (Fig. 14 A,B).

O mesmo protocolo foi realizado em bexigas de origem humana onde se observou uma redução significativa do relaxamento à insulina ($n = 4$, $P < 0,05$; Fig. 14C, D), confirmando, assim, o papel crucial do urotélio no relaxamento à insulina.

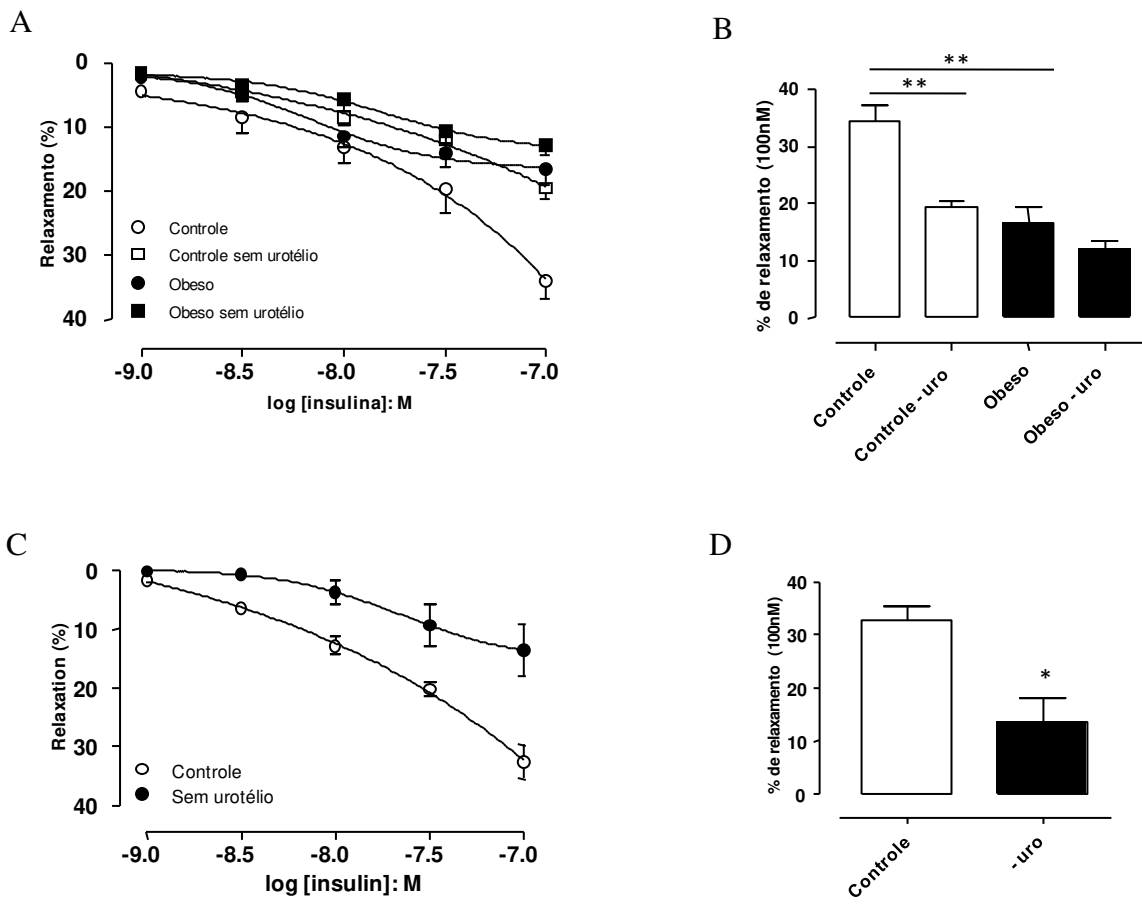


Figura 14: Curvas concentração-resposta à insulina em bexigas intactas e desprovidas de urotélio de camundongos obesos e controle (A); níveis de relaxamento de bexigas intactas e desprovidas de urotélio em camundongos obesos e controle em resposta à insulina (100 nM) (B) Curvas concentração-resposta à insulina em bexigas humanas intactas e sem urotélio (C); níveis de relaxamento de bexigas humanas intactas e sem urotélio em resposta à insulina (100 nM) (D). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, comparado ao grupo controle com bexiga intacta.

5.5 Ativação da AKT e eNOS no urotélio pela insulina

Considerou-se que o relaxamento induzido pela insulina é dependente do urotélio, separamos esta camada do detrusor para quantificar a fosforilação da eNOS e da AKT pela insulina. Verificou-se que a insulina promoveu um aumento dos níveis de pAKT e p-eNOS em urotélio de animais controle, mas não em obesos ($n = 4-9$; Fig. 15A e B). Em detrusor isolado (sem urotélio) a insulina induziu fosforilação significativa da AKT ($n = 4-6$; Fig. 15C) em camundongos do grupo controle, sem alterar a expressão da pAKT no grupo obeso, enquanto a expressão da p-eNOS não foi modificada em nenhum grupo ($n = 4$, Fig. 15D). O aumento da fosforilação da AKT e eNOS no urotélio do grupo controle foi também prevenido pela incubação com wortmannin (100 nM, $n = 4$, 20 min; Fig. 15E e F).

Em conjunto, os dados acima indicam que a insulina promove relaxamento da bexiga através da ativação da via PI3K/AKT/eNOS no urotélio, liberando NO, o qual difunde-se do urotélio para o músculo liso detrusor, onde forma GMPc, promovendo relaxamento da musculatura. Além disso, demonstramos que este mecanismo está prejudicado em animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

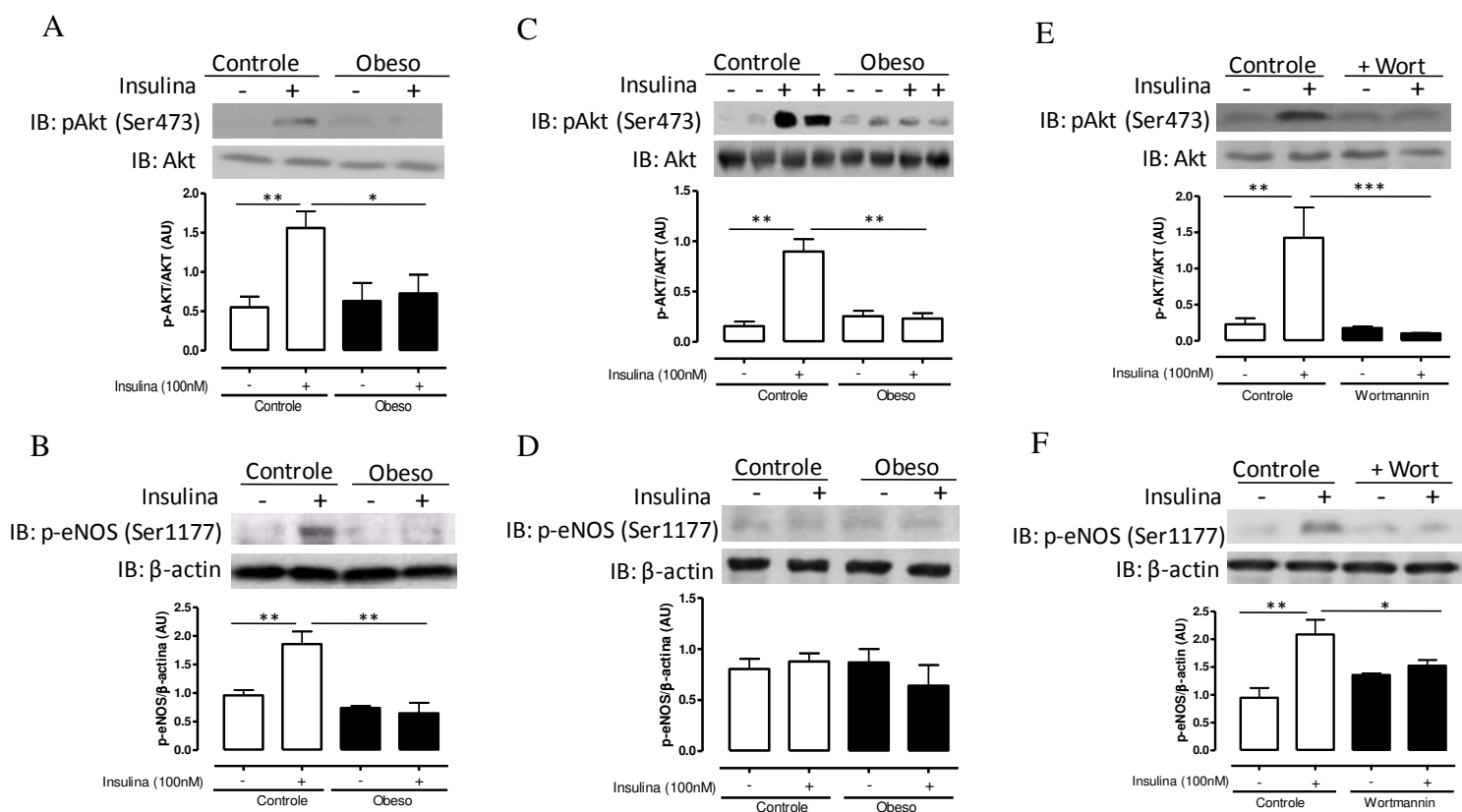


Figura 15: Expressão protéica de p-AKT (A) e p-eNOS (B) em urotélio isolado de camundongos obesos e controle nas condições basal e estimulada com insulina; Expressão de p-AKT (C) e p-eNOS (D) em detrusor (sem urotélio) isolado de camundongos obesos e controle nas condições basal e estimulada com insulina; Expressão protéica de p-AKT (E) e p-eNOS (F) em urotélio isolado de camundongos controle nas condições basal e estimulada com insulina, na ausência e na presença do inibidor da PI3-quinase wortmannin (100 nM). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $< 0,001$ comparados ao grupo controle.

5.6 Aumento da expressão de *TRIB3*, *ATF4* e *CHOP* no urotélio de camundongos obesos

TRIB3 é uma pseudo-quinase inibidora da AKT diretamente envolvida na patogênese da resistência à insulina e associada à obesidade em vários tecidos com relevância metabólica (Ti et al., 2011; Wang et al., 2012b). Por este motivo, procuramos investigar a associação entre o estresse de retículo endoplasmático (ER) com a resistência à insulina no urotélio, através da determinação da expressão protéica de marcadores do ER, como o TRIB3, ATF4 e CHOP. Os níveis de TRIB3 foram maiores no urotélio dos camundongos do grupo obeso em comparação com os do grupo controle ($n = 4-5$, $P < 0,05$; Fig. 16A e B). A expressão de TRIB3 é induzida pela resposta a proteínas mal dobradas (*Unfolded Protein Response-UPR*) através de mecanismo dependente de CHOP e ATF4. As expressões protéicas tanto da CHOP quanto da ATF4 foram maiores no grupo obeso em comparação ao grupo controle ($n = 4-5$, $P < 0,05$; Fig. 16A, C e D).

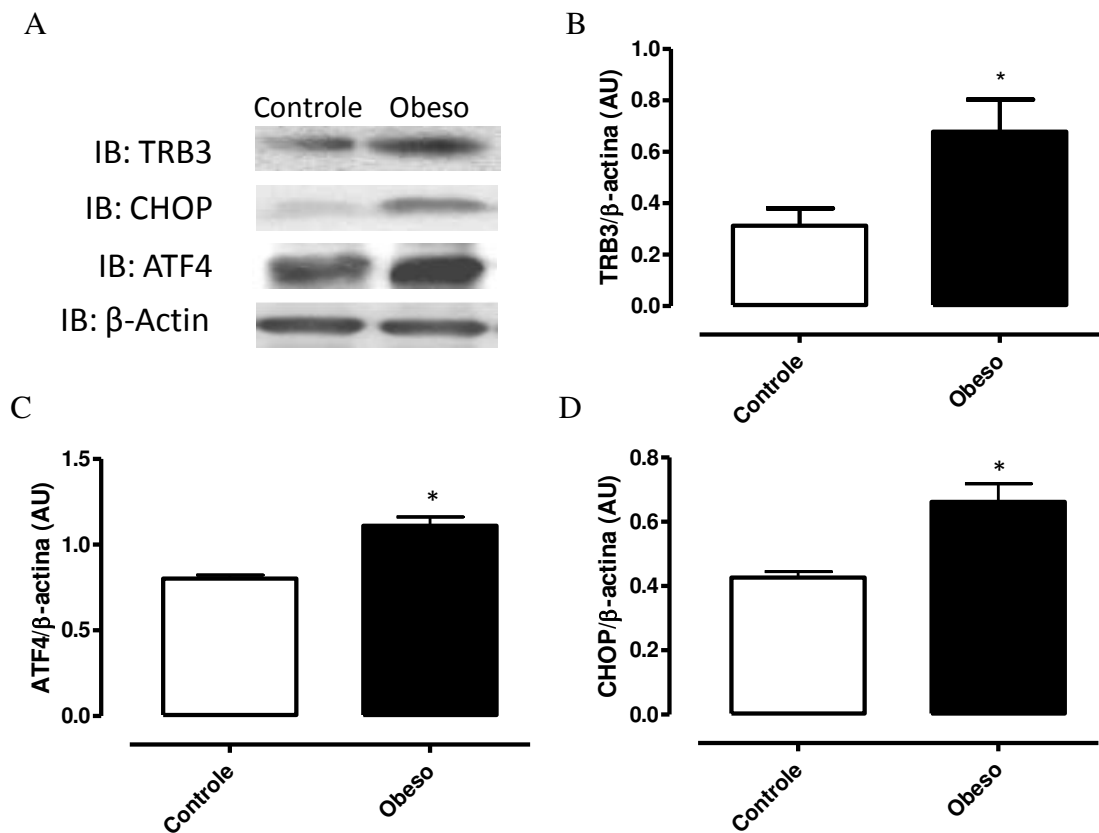


Figura 16: Imagens representativas das bandas de Western blotting de TRB3, CHOP e ATF4 em camundongos obesos e controle (A); Expressão protéica de TRB3 (B), ATF4 (C) e CHOP (D) em urotélio isolado de camundongos obesos e controle. * $P < 0,05$, comparado ao grupo controle.

5.7 Inibição da UPR ativada por estresse de retículo (ER) normaliza a sensibilidade à insulina no urotélio e a função urodinâmica de camundongos obesos

A fim de se avaliar se o ER está envolvido diretamente com a resistência à insulina no urotélio dos animais obesos, realizou-se tratamento oral com o inibidor de ER, ácido fenilbutírico (PBA, 500 mg/Kg, 2 vezes ao dia) por quatro dias. O PBA é uma chaperona química inibidora da UPR ativada por ER, que restaura a homeostase da glicose em camundongos obesos (Ozcan et al., 2004). Camundongos obesos tratados com PBA apresentaram melhora da sensibilidade à insulina, como demonstrado pelos valores obtidos de Kitt ($n = 5$, $P < 0,05$; Fig. 17A). O tratamento com PBA restaurou completamente a fosforilação da AKT induzida pela insulina ($n = 4$, $P < 0,05$; Fig. 17B) e aumentou significativamente os níveis de p-eNOS no urotélio de camundongos obesos ($n = 4-6$, $P < 0,05$; Fig. 17C). A expressão de TRIB3, CHOP e ATF4 em urotélio de camundongos obesos tratados com PBA foi reduzida a valores similares aos encontrados para os camundongos controle ($P < 0,05$; Fig. 17D-G).

A resposta relaxante à insulina em bexiga de camundongos obesos foi também normalizada pelo tratamento oral com PBA ($39,1 \pm 3,3\%$, $n = 5$; Fig. 18A), enquanto o relaxamento em animais controle não foi afetado pelo tratamento com PBA.

A Figura 8B mostra que a insulina induziu um aumento significativo ($P < 0,05$) nos níveis de GMPc em camundongos obesos tratados com PBA, enquanto nenhuma alteração da produção do GMPc foi observada em camundongos obesos tratados com veículo. O tratamento com PBA melhorou os parâmetros cistométricos avaliados, como frequência miccional, frequência de contrações involuntárias e pressão pós-miccional, indicando uma melhora da função miccional em camundongos obesos resultante da inibição da resistência

à insulina decorrente de *UPR* (Fig. 17C-F). Outros parâmetros cistométricos como complacência, capacidade, pressão limiar e pressão de pico não foram modificados.

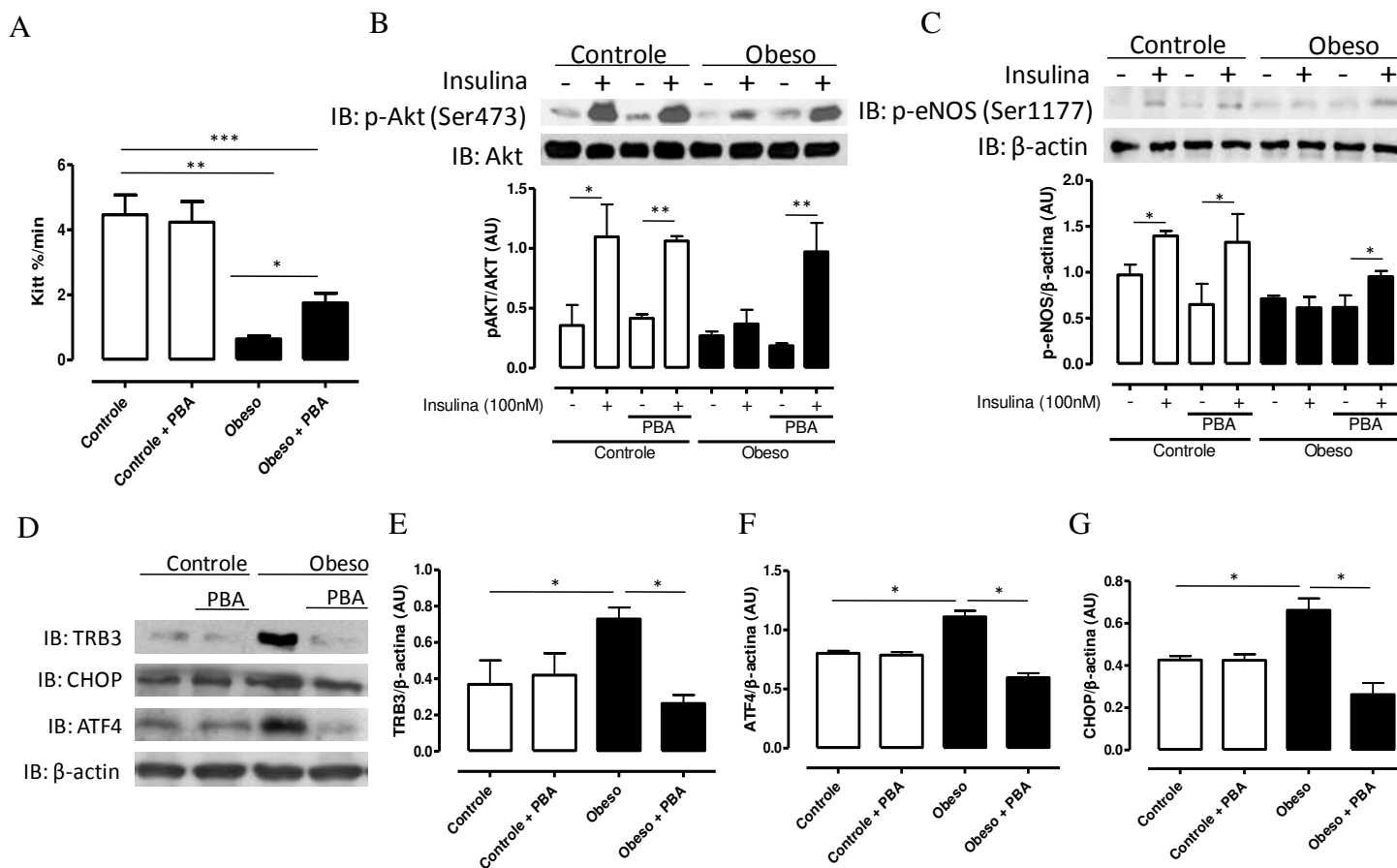


Figura 17: Níveis de KITT para os grupos Controle + veículo, controle + PBA, obeso + veículo e obeso + PBA (A); Expressão protéica de p-AKT (B) e p-eNOS (C) em urotélio isolado de camundongos obesos (veículo ou PBA) e controle (veículo ou PBA) nas condições basal e estimulada com insulina; Imagens representativas de Western blotting para TRB3, CHOP e ATF4 (D); Níveis protéicos de TRB3 (E), ATF4 (F) e CHOP (G) em urotélio isolado de camundongos obesos e controle. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

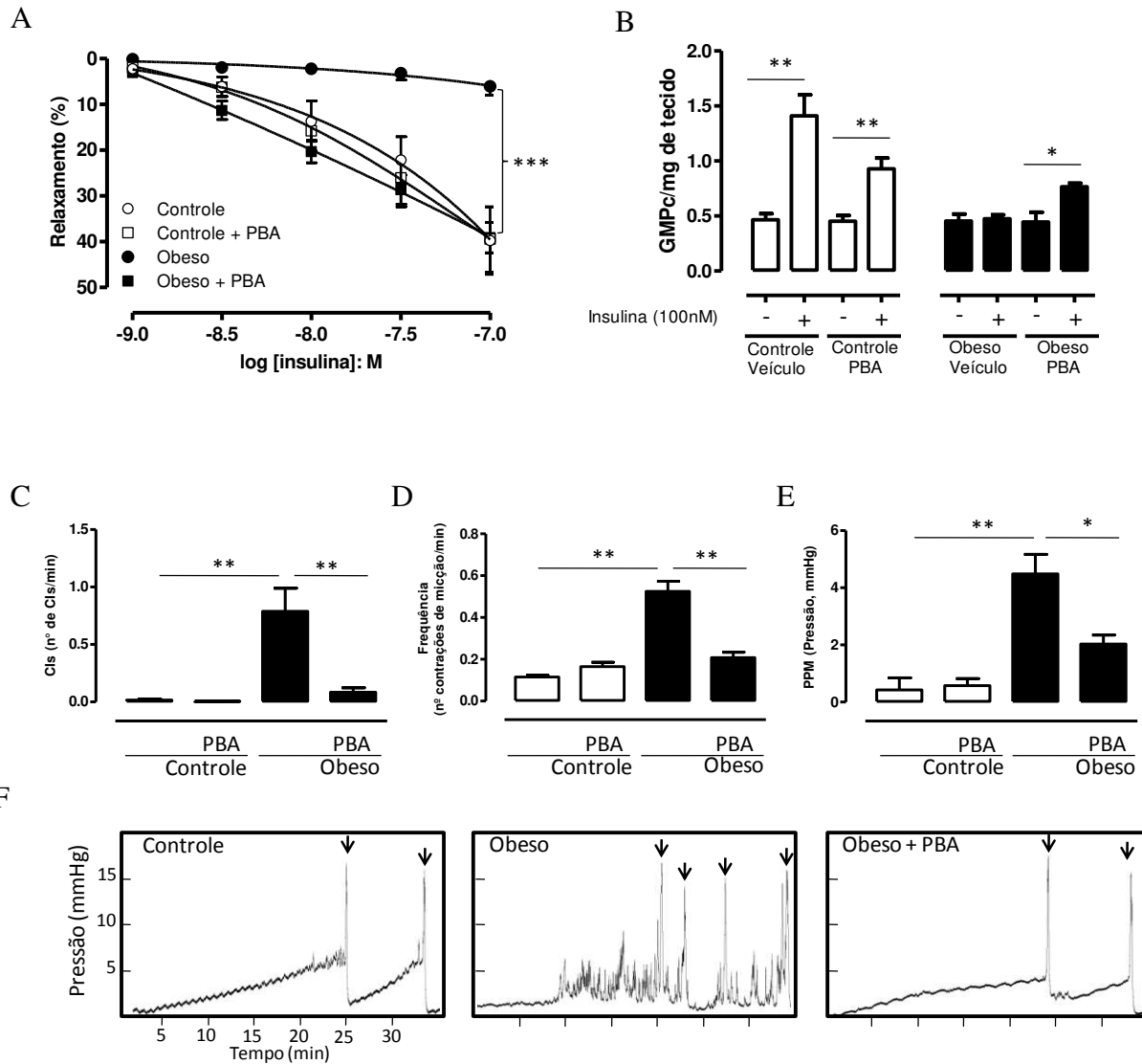


Figura 18: Curvas concentração-resposta à insulina (**A**) em camundongos obesos (veículo ou PBA) e controle (veículo ou PBA); Níveis de GMPc (**B**) nas condições basal e estimulada com insulina em camundongos obesos (veículo ou PBA) e controle (veículo ou PBA); Frequência de contrações involuntárias (**C**); Frequência de micção (**D**) e Pressão pós-miccional (**E**); Imagens representativas do perfil urodinâmico de camundongos controle, obesos e obesos tratados com PBA (**F**). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

6-DISSCUSSÃO: PARTE 2

Nesta etapa do trabalho demonstramos que a insulina relaxa bexiga humana e murina através da ativação da via de sinalização da PI3K/AKT/eNOS no urotélio, promovendo liberação de NO e formação de GMPc, resultando no relaxamento desta musculatura por mecanismo semelhante ao que ocorre no endotélio vascular. Além disso, a resposta relaxante à insulina é reduzida em camundongos obesos com bexiga hiperativa devido à resistência à insulina associada à *UPR* urotelial.

Adicionalmente aos seus efeitos metabólicos clássicos, a insulina constitui-se em importante modulador do tônus vascular devido à sua ação vasorelaxante. O mecanismo envolvido na vasodilatação induzida pela insulina se baseia na liberação de NO do endotélio para o músculo liso vascular, como resultado da ativação da via de sinalização da PI3K/AKT/eNOS (Kim et al., 2006). A resistência à ação da insulina no endotélio está associada a alterações cardiovasculares e hemodinâmicas, conforme demonstrado em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (Zecchin et al., 2003, 2007).

A camada urotelial e o endotélio compartilham algumas semelhanças no que diz respeito às características anatômicas e funcionais. Ambas encontram-se delineando uma musculatura lisa, e atuam tanto como barreira protetora quanto como estruturas ativas no reconhecimento de estímulos térmicos, mecânicos e químicos. Exercem, assim, papel sensorial importante em seus sistemas, o que é possível devido à rica inervação aferente presente nestas camadas (Birder, 2005; Gevaert et al., 2007; Mochizuki et al., 2009, Zagorodnyuk et al., 2009). Em nosso estudo mostramos que a insulina causa relaxamento concentração-dependente de bexiga humana e murina. Em ambas as espécies estudadas, os relaxamentos foram reduzidos pela pré-incubação *in vitro* com diferentes inibidores da cascata de sinalização da PI3K/AKT/eNOS, tais como L-NAME, wortmannin, LY294002 e *AKT Inhibitor*. Desta forma, nossos dados indicam um papel até então desconhecido da

insulina como reguladora do tônus muscular da bexiga, que ocorre de maneira similar ao que vem sendo descrito para a vasculatura (Lee et al., 2006).

Em consonância com o progressivo aumento da incidência de diabetes e resistência à insulina na população mundial, estudos epidemiológicos têm apontado para um concomitante crescimento da ocorrência de complicações deletérias destas doenças, como LUTS.

Dada esta ação fisiológica da insulina na bexiga, posteriormente levantamos a hipótese que a resistência à insulina local poderia ter relevância para a disfunção vesical em camundongos obesos. Embora alguns estudos experimentais e clínicos tenham mostrado correlação positiva entre a síndrome metabólica/diabetes tipo 2 e disfunção de bexiga (Rohrmann et al., 2005; Laven et al., 2008; Richter et al., 2010; Tai et al., 2010), até os dias atuais não há explicação para o impacto da resistência à insulina na função mecânica e urodinâmica da bexiga urinária. Com o objetivo de estudar a fisiopatologia da resistência à insulina na bexiga, primeiramente avaliamos a capacidade da insulina de induzir relaxamento do detrusor em animais obesos. Após dez semanas com alimentação exclusiva por dieta hiperlipídica, os camundongos exibiram aumento de peso corpóreo e de gordura epididimal, além de aumento da glicemia de jejum e da resistência à insulina, o que foi demonstrado pela redução do valor de Kitt. Em trabalhos prévios foi demonstrado que estes animais apresentam intolerância à glicose e aumento dos níveis de LDL (Toque et al., 2011). Também foi previamente demonstrado em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica um prejuízo da via de sinalização da PI3K/AKT/eNOS em resposta à insulina ou acetilcolina, levando à redução da vasodilatação (Zecchin et al., 2007). No presente estudo mostramos que bexigas de camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica exibem resposta relaxante reduzida à insulina *in vitro* em comparação a camundongos

controle. Com o objetivo de confirmar a via de sinalização ativada pela insulina na bexiga medimos a fosforilação da AKT e da eNOS e os níveis de GMPc em resposta à insulina. Observamos que a expressão de pAKT (Ser473) e de p-eNOS (Ser1177), assim como os níveis de GMPc, foi reduzida nos animais obesos, enquanto no grupo controle verificou-se um aumento significativo tanto das proteínas fosforiladas quanto da produção de GMPc.

Para investigar se o urotélio exerce na bexiga um papel semelhante ao do endotélio na musculatura vascular, determinamos os níveis de fosforilação de AKT e eNOS em resposta à insulina diretamente no urotélio isolado. Encontramos um aumento da fosforilação da AKT em urotélio e em detrusor isolado, enquanto apenas no urotélio observou-se fosforilação da eNOS em resposta à insulina. Adicionalmente, ainda observamos que a ativação de AKT e eNOS é dependente da ativação pela PI3K, uma vez que a incubação prévia com inibidor da PI3K, wortmannin, preveniu o aumento da fosforilação de ambas, AKT e eNOS, em urotélio de camundongos controle. Além disso, o relaxamento produzido pela insulina foi prevenido pela remoção do urotélio tanto em bexigas de animais controle como de humanos. Tomados em conjunto, os resultados descritos acima sugerem que a insulina medeia o relaxamento da bexiga através da ativação da via da PI3K/AKT/eNOS no urotélio, a partir do qual NO é liberado, difundindo-se para o músculo liso detrusor, resultando no relaxamento da bexiga.

Focamos a última parte deste trabalho na exploração dos mecanismos causadores da resistência à insulina no urotélio dos camundongos obesos. O estresse de retículo endoplasmático (ER) tem sido recentemente considerado como evento crucial para o desencadeamento de resistência à insulina associada à obesidade em tecidos periféricos (Ozcan et al., 2004; Raciti et al., 2010). O ER ocorre como resultado de um rompimento da homeostase do retículo endoplasmático e conseqüente desencadeamento de uma resposta a

proteínas mal dobradas (UPR) (Ron e Walter, 2007). Entre as várias vias de sinalização ativadas pelo ER, o aumento da expressão da pseudo-quinase TRIB3, desempenha papel importante para a patogênese da resistência à insulina (Oskolkova et al., 2008; Bromati et al., 2011), uma vez que este se complexa a AKT inibindo-a e levando à descontinuidade da transdução de sinal ativada pela insulina (Du et al., 2005). A UPR estimula o aumento da expressão de TRIB3 através da estimulação dos fatores de transcrição ATF4 e CHOP (Ohoka et al., 2005).

Indivíduos portadores de mutações gênicas que resultam em ganho de função do TRIB3 apresentam resistência à insulina e aumento da incidência de complicações associadas (Oberkofler et al., 2010; Gong et al., 2009). Nossos resultados mostram um aumento da expressão protéica de TRIB3, CHOP e ATF4 em camundongos obesos. Corroborando nossos achados, trabalhos recentes mostram um aumento da expressão de TRIB3 concomitantemente com redução da fosforilação da AKT em modelos animais de roedores com diabetes tipo 2. Nestes estudos foi demonstrado que o silenciamento genético do TRIB3 melhorou algumas complicações decorrentes do diabetes, como cardiomiopatia e aterosclerose, ao mesmo tempo que restaurou a sensibilidade à insulina e os níveis de pAKT (Ti et al., 2011; Wang et al., 2012b).

O tratamento com o inibidor de ER, PBA, foi efetivo na redução da expressão de TRIB3, ATF4 e CHOP no urotélio dos animais obesos, resultado este que comprova a eficácia do tratamento realizado. Corroborando dados prévios descritos na literatura, o tratamento com o PBA resultou na melhora da sensibilidade à insulina e restaurou os níveis de fosforilação da AKT no urotélio. Embora não tenha restaurado completamente, o tratamento com PBA aumentou significativamente a fosforilação da eNOS, assim como a produção de GMPc em resposta à insulina em comparação aos camundongos obesos que

receberam somente o veículo. A inibição do ER pelo PBA também levou à normalização do relaxamento induzido pela insulina em animais obesos.

De acordo com a Sociedade Internacional de Continência (*International Continence Society – ICS*), a bexiga hiperativa é clinicamente caracterizada pela presença de urgência, acompanhada de freqüência, com ou sem incontinência (Abrams et al., 2012). Cistometrogramas obtidos de pacientes com bexiga hiperativa caracterizam-se por aumento da frequência de contrações involuntárias, da frequência de micção e do volume residual, evidenciando quadro de detrusor hiperativo concomitante com redução da eficácia no esvaziamento da bexiga. Camundongos com diabetes tipo 2 exibem detrusor hiperativo caracterizado pelo aumento de contrações involuntárias e de micções, além de redução do volume urinado dentro de um período de 3 h (Wang et al., 2012a). Também verificamos alterações importantes de alguns parâmetros cistométricos como frequência de contrações involuntárias e de micção e aumento da pressão pós-miccional, que por sua vez expressa um aumento do volume residual. O tratamento com PBA normalizou estes parâmetros nos animais obesos, sugerindo que a resistência à insulina dependente de UPR está diretamente envolvida na hiperatividade de bexiga em camundongos obesos. Nossos dados mostram que a insulina produz relaxamento da bexiga através da ativação da via de sinalização PI3K/AKT/eNOS no urotélio, liberando NO para o músculo liso detrusor. Além disso, mostramos que camundongos obesos e resistentes à insulina exibem deficiência da ação da insulina na bexiga como consequência de estresse de retículo, que parece estar diretamente relacionado ao quadro de hiperatividade vesical apresentado por estes animais. Os resultados aqui apresentados apontam para um mecanismo de regulação do tônus muscular da bexiga e da função miccional, além de propor um importante mecanismo envolvido na fisiopatologia da cistopatia diabética.

7- CONCLUSÕES

As alterações contráteis e urodinâmicas observadas em camundongos obesos, alimentados com dieta hiperlipídica, estão relacionadas ao aumento dos níveis de PKC em bexiga, resultando em aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular. A modulação positiva da PKC em camundongos obesos medeia simultaneamente, a resistência à insulina em detrusor e a hiperatividade de bexiga nestes animais.

A insulina produz relaxamento da bexiga através da ativação da via de sinalização PI3K/AKT/eNOS no urotélio, liberando NO para o músculo liso detrusor. Camundongos obesos e resistentes à insulina exibem deficiência da ação da insulina na mucosa da bexiga como consequência de estresse de retículo, que parece estar diretamente relacionado ao quadro de hiperatividade de bexiga apresentado por estes animais.

Os resultados aqui apresentados apontam para um mecanismo de regulação do tônus muscular da bexiga onde a resistência à insulina influencia diretamente a função miccional, além de propor um importante mecanismo envolvido na fisiopatologia da cistopatia diabética.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrams P, Eersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, Kay G, Laties A, Nathanson NM, Pasricha PJ, Wein AJ (2006) Muscarinic receptors: their distribution e function in body systems, e the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol* 148: 565-578.

Eersson KE, Arner A (2004) Urinary bladder contraction e relaxation: physiology e pathophysiology. *Physiol Rev* 84: 935-986.

Barton M, Baretella O, Meyer MR (2012) Obesity e Risk of Vascular Disease: Importance of Endothelium-Derived Vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 165: 591-602.

Bayliss M, Wu C, Newgranden D, Mundy AR, Fry CH (1999) A quantitative study of atropine-resistant contractile responses in human detrusor smooth muscle, from stable, unstable e obstructed bladders. *J Urol* 162: 1833–839.

Birder LA (2005) More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F489-495.

Brading AF, Williams JH (1990) Contractile responses of smooth muscle strips from rat e guinea-pig urinary bladder to transmural stimulation: effects of atropine e alpha,beta-methylene ATP. *Br J Pharmacol* 99: 493-498.

Bromati CR, Lellis-Santos C, Yamanaka TS, Nogueira TC, Leonelli M, Caperuto LC, Gorjão R, Leite AR, Anhê GF, Bordin S (2011) UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R92-100.

Calixto MC, Lintomen L, Schenka A, Saad MJ, Zanesco A, Antunes E (2010) Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol* 159: 617-625.

Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, Shofer JB, Fish BE, Knopp RH, Kahn SE (2004) Intra-abdominal fat is a major determinant of the

national Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Criteria for the Metabolic Syndrome. *Diabetes* 53: 2087–2094.

Contreras C, Sánchez A, Martínez P, Raposo R, Climent B, García-Sacristán A, Benedito S, Prieto D (2010) Insulin resistance in penile arteries from a rat model of metabolic syndrome. *Br J Pharmacol* 161: 350-364.

Coyne KS, Sexton CC, Irwin DE, Kopp ZS, Kelleher CJ, Milsom I (2008) The impact of overactive bladder, incontinence e other lower urinary tract symptoms on quality of life, work productivity, sexuality e emotional well-being in men e women: results from the EPIC study. *BJU Int* 101: 1388–95.

Coyne KS, Sexton CC, Thompson CL, Clemens JQ, Chen CI, Bavendam T e Dmochowski R (2012) Impact of overactive bladder on work productivity. *Urology* 80: 97-103.

Daneshgari F, Huang X, Liu G, Bena J, Saffore L, Powell CT (2006) Temporal differences in bladder dysfunction caused by diabetes, diurese, e treated diabetes in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1728–R1735.

De Oliveira CF, Nathan LP, Metze K, Moreno H Jr, De Luca IM, Sucupira M, Zatz R, Zappellini A, Antunes E, De Nucci G (1999) Effect of Ca²⁺ channel blockers on arterial hypertension e heart ischaemic lesions induced by chronic blockade of nitric oxide in the rat. *Eur J Pharmacol* 373: 195-200.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605.

Dmochowski R, Roehrborn C, Klise S, Xu L, Kaminetsky J, Kraus S (2010) Urodynamic effects of once daily tadalafil in men with lower urinary tract symptoms secondary to clinical benign prostatic hyperplasia: a reomized, placebo controlled 12-week clinical trial. *J Urol* 183: 1092-7.

Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M (2005) TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300: 1574-1577.

Ford AP, Cockayne DA (2011) ATP e P2X purinoceptors in urinary tract disorders. *Heb Exp Pharmacol* 202: 485-526.

Frazier EP, Peters SLM, Braverman AS, Ruggieri MR, Michel MC (2008) Signal transduction underlying the control of urinary bladder smooth muscle tone by muscarinic receptors e β -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 377: 449–462.

Galgani J, Ravussin E (2008) Energy metabolism, fuel selection e body weight regulation. *Int. J. Obes. (Lond)* 32: S109-119.

Gasbarro G, Lin DL, Vurbic D, Quisno A, Kinley B, Daneshgari F, Damaser MS (2010) Voiding function in obese e type 2 diabetic female rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 298: F72-77.

Gevaert T, Vriens J, Segal A, Everaerts W, Roskams T, Talavera K, Owsianik G, Liedtke W, Daelemans D, Dewachter I, Van Leuven F, Voets T, De Ridder D, Nilius B (2007) Deletion of the transient receptor potential cation channel TRPV4 impairs murine bladder voiding. *J Clin Invest* 117: 3453-3462.

Gong HP, Wang ZH, Jiang H, Fang NN, Li JS, Shang YY, Zhang Y, Zhong M e Zhang W (2009) TRIB3 functional Q84R polymorphism is a risk factor for metabolic syndrome e carotid atherosclerosis. *Diabetes Care* 32: 1311-1313.

Grundey SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C (2004) American Heart Association; National Heart, Lung, e Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, e Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 109: 433-438.

Hammarsten J, Peeker R (2011) Urological aspects of the metabolic syndrome. *Nat Rev Urol* 8: 483-494.

Hanley AJG, Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Zinman B, Haffner SM (2003) Identification of Subjects with Insulin Resistance e β -Cell Dysfunction Using Alternative Definitions of the Metabolic Syndrome. *Diabetes* 52: 2740–2747.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-6.

Hummasti S, Hotamisligil GS (2010) Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res* 107: 579-91.

Huster M, Frei E, Hofmann F, Wegener JW (2010) A complex of Ca(V)1.2/PKC is involved in muscarinic signaling in smooth muscle. *FASEB J* 24: 2651-2659.

Irwin DE, Milsom I, Reilly K, Hunskar S, Kopp Z, Herschorn S, Coyne KS, Kelleher CJ, Artibani W, Abrams P (2008) Overactive bladder is associated with erectile dysfunction e reduced sexual quality of life in men. *J Sex Med* 5: 2904-2910.

Joseph MA, Harlow SD, Wei JT, Sarma AV, Dunn RL, Taylor JM, James SA, Cooney KA, Doerr KM, Montie JE, Schottenfeld D (2003) Risk factors for lower urinary tract symptoms in a population-based sample of African-American men. *Am J Epidemiol* 157: 906-914.

Kahn BB, Flier JS (2000) Obesity e insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 473-481.

Kennedy C, Tasker PN, Gallacher G, Westfall TD (2007) Identification of atropine-e P2X1 receptor antagonist-resistant, neurogenic contractions of the urinary bladder. *J Neurosci* 27: 845-851.

Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ (2006) Reciprocal relationships between insulin resistance e endothelial dysfunction: molecular e pathophysiological mechanisms. *Circulation* 113: 1888-1904.

Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL (2000) Regulation of endothelial constitutive nitric oxide

synthase gene expression in endothelial cells e in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation* 101: 676-681.

Lagaud GJ, Reriamboavonjv V, Roul G, Stoclet JC, Eriantsitohaina, R. (1999) Mechanism of Ca^{2+} release e entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. *Am J Physiol* 276: H300-308.

Laven BA, Orsini N, Eersson SO, Johansson JE, Gerber GS, Wolk A (2008) Birth weight, abdominal obesity e the risk of lower urinary tract symptoms in a population based study of Swedish men. *J Urol* 179: 1891-1895.

Lee JH, Ragolia L (2006) AKT phosphorylation is essential for insulin-induced relaxation of rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C1355-1365.

Lee WC, Chien CT, Yu HJ, Lee SW (2008) Bladder dysfunction in rats with metabolic syndrome induced by long-term fructose feeding. *J Urol* 179: 2470-2476.

Lee WC, Chuang YC, Chiang PH, Chien CT, Yu HJ, Wu CC (2011) Pathophysiological studies of overactive bladder e bladder motor dysfunction in a rat model of metabolic syndrome. *J Urol* 186: 318-325.

Lee M, Aronne LJ (2007) Weight management for type 2 diabetes mellitus: global cardiovascular risk reduction. *Am J Cardiol* 99: 68B-79B.

Leiria LO, Mónica FZ, Carvalho FG, Claudino MA, Franco-Penteado C, Schenka A, Grant AD, De Nucci G, Antunes E (2011) Functional, morphological e molecular characterization of bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: Evidence of a role for L-type voltage-operated Ca^{2+} channels. *Br J Pharmacol* 163: 1276-1288.

Masters JG, Neal DE, Gillespie JI (1999) The contribution of intracellular Ca^{2+} release to contraction in human bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* 127: 996-1002.

McVary K (2006) Lower urinary tract symptoms e sexual dysfunction: epidemiology e pathophysiology. *BJU Int* 97: 23-28.

Michel MC, Barendrecht MM (2008) Physiological e pathological regulation of the autonomic control of urinary bladder contractility. *Pharmacol Ther* 117: 297-312.

Mochizuki T, Sokabe T, Araki I, Fujishita K, Shibasaki K, Uchida K, Naruse K, Koizumi S, Takeda M e Tominaga M (2009) The TRPV4 cation channel mediates stretch evoked Ca^{2+} influx e ATP release in primary urothelial cell cultures. *J Biol Chem* 284: 21257-21264.

Moul S, McVary KT (2010) Lower urinary tract symptoms, obesity e the metabolic syndrome. *Curr Opin Urol* 20: 7-12.

Morino K, Petersen KF, Shulman GI (2006) Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 Suppl 2: S9-S15.

Oberkofler H, Pfeifenberger A, Soyak S, Felder T, Hahne P, Miller K, Krempler F, Patsch W (2010) Aberrant hepatic TRIB3 gene expression in insulin-resistant obese humans. *Diabetologia* 53: 1971-1975.

Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H (2005) TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway e is involved in cell death. *EMBO J* 24: 1243–1255.

Opie LH (2007) Metabolic syndrome. *Circulation* 115: 32-35.

Oskolkova OV, Afonyushkin T, Leitner A, von Schlieffen E, Gargalovic PS, Lusic AJ, Binder BR, Bochkov VN (2008) ATF4-dependent transcription is a key mechanism in VEGF up-regulation by oxidized phospholipids: critical role of oxidized sn-2 residues in activation of unfolded protein response. *Blood* 112: 330-339.

Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG Jr, Ozcan U (2009) Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 9: 35-51.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, e type 2 diabetes. *Science* 306: 457-461.

Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Görgün CZ, Hotamisligil GS (2006) Chemical chaperones reduce ER stress e restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313: 1137-1140.

Ozden C, Ozdal OL, Urgancioglu G, Koyuncu H, Gokkaya S, Memis A (2007) The correlation between metabolic syndrome e prostatic growth in patients with benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 51: 199-203.

Parsons JK, Sarma AV, McVary K, Wei JT (2009) Obesity e benign prostatic hyperplasia: clinical connections, emerging etiological paradigms e future directions. *J Urol* 182: S27-S31.

Pinna C, Sanvito P, Puglisi L (2006) Altered neurogenic e mechanical responses to acetylcholine, ATP e substance P in detrusor from rat with outlet obstruction. *Life Sci* 79: 1301-1306.

Raciti GA, Iadicicco C, Ulianich L, Vind BF, Gaster M, Ereozzi F, Longo M, Teperino R, Ungaro P, Di Jeso B, Formisano P, Beguinot F, Miele C (2010) Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress affects GLUT4 expression via activating transcription factor 6 in rat e human skeletal muscle cells. *Diabetologia* 53: 955-965.

Rahman NU, Phonsombat S, Bochinski D, Carrion RE, Nunes L, Lue TF (2007) An animal model to study lower urinary tract e erectile dysfunction: the hyperlipidaemic rat. *BJU Int* 100: 658-663.

Rapp DE, Lyon MB, Bales GT, Cook SP (2005) A role for the P2X receptor in urinary tract physiology e in the pathophysiology of urinary dysfunction. *Eur Urol* 48: 303-308.

Rask-Madsen C, King GL (2007) Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance e diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 46-56.

Richter HE, Kenton K, Huang L, Nygaard I, Kraus S, Whitcomb E, Chai TC, Lemack G, Sirls L, Dereo KJ, Stoddard A (2010) The impact of obesity on urinary incontinence symptoms, severity, urodynamic characteristics e quality of life. *J Urol* 183: 622-628.

Richter HE, Burgio KL, Brubaker L, Moalli PA, Markle, AD, Mallet V, Menefee SA, Johnson HW, Boreham MK, Dereo KJ, Stoddard AM (2005) Urinary Incontinence Treatment Network. Factors associated with incontinence frequency in a surgical cohort of stress incontinent women. *Am J Obstet Gynecol* 193: 2088-2093.

Rohrmann S, Smit E, Giovannucci E, Platz EA (2005) Association between markers of the metabolic syndrome e lower urinary tract symptoms in the Third National Health e Nutritional Examination Survey (NHANES III). *Int J Obes (Lond)* 29: 310-316.

Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519–529.

Scherrer U, Rein D, Vollenweider P, Vollenweider L, Nicod P (1994) Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 94: 2511-2515.

Schneider T, Fetscher C, Krege S, Michel MC (2004) Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of human urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 1148-1153.

Sena CM, Matafome P, Louro T, Nunes E, Fernees R., Seiça RM (2011) Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br J Pharmacol* 163: 424-437.

Shore SA, Williams ES, Zhu M (2008) No effect of metformin on the innate airway hyperresponsiveness e increased responses to ozone observed in obese mice. *J Appl Physiol*. 105:1127-33.

Stella Jr SL, Bryson EJ, Thoreson WB (2001) Insulin inhibits voltage dependent calcium influx into rod photoreceptors. *Neuroreport* 12: 947-951.

Subak LL, Richter HE, Hunskaar S (2009) Obesity e urinary incontinence: epidemiology e clinical research update. *J Urol* 182: S2-S7.

Subak LL, Richter HE, Hunskaar S (2009) Obesity e urinary incontinence: epidemiology e clinical research update. *J Urol* 182: S2-S7.

Tai HC, Chung SD, Ho CH, Tai TY, Yang WS, Tseng CH, Wu HP, Yu HJ (2010) Metabolic syndrome components worsen lower urinary tract symptoms in women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 1143-1150.

Tammela TL, Briscoe JA, Levin RM, Longhurst PA (1994) Factors underlying the increased sensitivity to field stimulation of urinary bladder strips from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 113: 195-203.

Ti Y, Xie GL, Wang ZH, Bi XL, Ding WY, Wang J, Jiang GH, Bu PL, Zhang Y, Zhong M e Zhang W (2011) TRB3 gene silencing alleviates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetic rat model. *Diabetes* 60: 2963-2974.

Tong YC, Cheng JT (2007) Alterations of M_{2,3}-muscarinic receptor protein e mRNA expression in the bladder of the fructose fed obese rat. *J Urol* 178: 1537-1542.

Toque HA, da Silva FH, Calixto MC, Lintomen L, Schenka AA, Saad MJ, Zanesco A, Antunes E (2011) High-fat diet associated with obesity induces impairment of mouse corpus cavernosum responses. *BJU Int* 107: 1628-1634.

Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araújo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ (2007) Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity e insulin resistance. *Diabetes* 56: 1986–1998.

Turban S, Hajduch E (2011) Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Lett.* 585: 269-274.

Uchida W, Masuda N, Shirai Y, Shibasaki K, Satoh N, Takenada T (1994) The role of extracellular Ca²⁺ in carbachol-induced tonic contraction of the pig detrusor smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350: 398-402.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389: 610-4.

Uzun H, Zorba OÜ (2012) Metabolic syndrome in female patients with overactive bladder. *Urology* 79: 72-75.

Veesompele 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* 3: RESEARCH 0034.

Vicent D, Ilany J, Kondo T (2003) The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone e insulin resistance. *J Clin Invest* 111: 1373-1380.

Vikram A, Jena G, Ramarao P (2010) Pioglitazone attenuates prostatic enlargement in diet-induced insulin-resistant rats by altering lipid distribution e hyperinsulinaemia. *Br J Pharmacol* 161: 1708-1721.

Wang Z, Cheng Z, Cristofaro V, Li J, Xiao X, Gomez P, Ge R, Gong E, Strle K, Sullivan MP, Adam RM, White MF, Olumi AF (2012) Inhibition of TNF- α Improves the Bladder Dysfunction That Is Associated With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 61: 2134-2145.

Wang ZH, Shang YY, Zhang S, Zhong M, Wang XP, Deng JT, Pan J, Zhang Y, Zhang W (2012) Silence of TRIB3 suppresses atherosclerosis e stabilizes plaques in diabetic ApoE^{-/-}/LDL receptor^{-/-} mice. *Diabetes* 61: 463-473.

Wegener JW, Schulla V, Lee TS, Koller A, Feil S, Feil R, Kleppisch T, Klugbauer N, Moosmang S, Welling A, Hofmann F (2004) An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *FASEB J* 18: 1159-1161.

Wei B, Chen Z, Zhang X, Feldman M, Dong XZ, Doran R, Zhao BL, Yin WX, Kotlikoff MI, Ji G (2009) Nitric oxide mediates stretch-induced Ca²⁺ release via activation of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in smooth muscle. *PLoS One* 3: e2526.

Wuest M, Hiller N, Braeter M, Hakenberg OW, Wirth MP, Ravens U (2007) Contribution of Ca²⁺ influx to carbachol-induced detrusor contraction is different in human urinary bladder compared to pig e mouse. *Eur J Pharmacol* 565: 180-189.

Ye J (2013) Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med* 7: 14-24.

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk-beta. *Science* 293: 1673-7.

Zagorodnyuk VP, Brookes SJ, Spencer NJ, Gregory S (2009) Mechanotransduction e chemosensitivity of two major classes of bladder afferents with endings in the vicinity to the urothelium. *J Physiol* 587: 3523-38.

Zecchin HG, Bezerra RM, Carvalheira JB, Carvalho-Filho MA, Metze K, Franchini KG, Saad MJ (2003) Insulin signalling pathways in aorta e muscle from two animal models of insulin resistance-the obese middle-aged e the spontaneously hypertensive rats. *Diabetologia* 46: 479-491.

Zecchin HG, Priviero FB, Souza CT, Zecchin KG, Prada PO, Carvalheira JB, Velloso LA, Antunes E, Saad MJ (2007) Defective insulin e acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats. *Diabetes* 56: 1014-1024.

Zeng G, Nystrom FH, Ravicheran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ (2000) Roles for insulin receptor, PI3-kinase, e Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 101: 1539-1545.