

FABÍOLA ZAKIA TAUFIC MÓNICA

***EFEITOS DA INIBIÇÃO CRÔNICA DA SINTASE DE
ÓXIDO NÍTRICO EM MÚSCULO LISO DETRUSOR
ISOLADO DE RATO***

CAMPINAS

2009

FABÍOLA ZAKIA TAUFIC MÓNICA

***EFEITOS DA INIBIÇÃO CRÔNICA DA SINTASE DE
ÓXIDO NÍTRICO EM MÚSCULO LISO DETRUSOR
ISOLADO DE RATO***

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

***CAMPINAS
2009***

*FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP*

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M748e Mónica, Fabíola Zakia Taufic
 Efeitos da inibição crônica da sintase de óxido nítrico em músculo
 liso detrusor isolado de rato / Fabíola Zakia Taufic Mónica. Campinas,
 SP : [s.n.], 2009.

 Orientador : Edson Antunes
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.

 1. Detrusor hiperativo. 2. Óxido nítrico. I. Antunes, Edson.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
 Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition of isolated rat
detrusor smooth muscle**

Keywords: • Hyperactive detrusor
 • Nitric oxide

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora: Prof. Dr. Edson Antunes

 Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack
 Profa. Dra. Rosely Oliveira Godinho
 Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior
 Prof. Dr. Cássio Luís Zanetinni Riccetto

Data da defesa: 03-02-2009

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Fabiola Zakia Taufic Monica

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

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Rosely Oliveira Godinho

Professor (a) Doutor (a) Lusiane Maria Bendhack

Professor (a) Doutor (a) Heitor Moreno

Professor (a) Doutor (a) Cássio Luis Zanettini Ricetto

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

Data: 03/02/2009

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Magda e José Augusto, meus exemplos,
incentivadores e os maiores responsáveis pela minha
formação. Obrigada por tudo. Serei eternamente grata.*

*Ao meu marido Luiz Eduardo, pela presença
constante, por sua dedicação e respeito.*

A meus queridos irmãos Juliana e Thiago.

*À minha avó, Belinha, sempre presente e grande
incentivadora por esta jornada.*

*À minha madrinha, Aldina, sempre interessada e
disposta a ajudar.*

AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador e amigo,
Prof. Dr. Edson Antunes,
Agradeço imensamente por sua orientação e por
todo o crescimento profissional.*

A

***Profa. Dra. Alice Aparecida Olím Bricola**
Agradeço pela sua amizade, dedicação e confiança
ao longo desses anos de convivência. Serei
eternamente grata.*

A

***Profa. Dra. Angelina Zanesco,**
Meus agradecimentos especiais por todo o
incentivo e por sempre estar disposta a ajudar a
qualquer momento. Muito obrigada*

Agradecimentos

Aos meus grandes amigos da “Casata”, Fernanda Priviero, Mário Claudino, Juliana Baracat, Haroldo, Fernando Bau, Camila Moraes, Maria Andréia, agradeço por toda a amizade, alegria e pela ajuda compartilhada no dia a dia de trabalho. E em especial a uma pessoa muito importante, Cleber Evandro Teixeira, que, apesar de não estar mais presente fisicamente, nos deixou grandes e importantes ensinamentos.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Carla Penteado, Clésio Pena, Elen Landucci, Enilton Camargo, Fernanda Dell, Ivani Souza, Julio Rojas, Leticia Lintomen, Lineu, Márcia Cardoso, Priscila, Rafael Annovazzi, Rafael Prada, Rodrigo Capel, Sisi Marcondes, Tatiane Ferreira, Celso Saragossa, Luiz Osório.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Francileuda, Elaine, Wanderlei, Marcos, Agnaldo, Adilson, pelos serviços prestados. E especialmente, agradeço ao Sr. Miguel Borges da Silva e Marcos por dispensar tanto cuidado na criação dos animais.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado direito – 05/50266-0 (2005-2009)

SUMÁRIO

LISTA DE DROGAS	xxiii
LISTA DE ABREVIACÕES	xxvii
LISTA DE TABELAS	xxxii
LISTA DE FIGURAS	xxxv
RESUMO.....	xxxix
ABSTRACT.....	xliv

1. INTRODUÇÃO.....	49
1.1. Fisiologia Ciclo Micção	52
1.1.1 Anatomia Baixo Trato Urinário.....	52
1.1.2 Controle Neural e Mecanismo de Sinalização.....	53
1.1.3 Inervação não adrenérgica não colinérgica no baixo trato urínario: NO e ATP	
1.1.3.1 Inervação NANC inibitória: NO.....	60
1.1.3.2 Inervação NANC excitatória: ATP	65
1.2. Sintomas Baixo Trato Urinário	
1.2.1 Síndrome Bexiga Hiperativa.....	67
1.2.2 Fisiopatologia	68
1.3.Tratamento Farmacológico.....	72
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1. Animais Experimentação.....	77
2.2. Tratamento Crônico com L-NAME	79
2.3 Medida Pressão Arterial	79
2.4. Ensaio Atividade NOS	80
2.5 Determinação Formação fosfatos de inositol (mono-bi e trifosfato de inositol) em bexiga.....	82
2.6. Ensaio de Saturação determinação parâmetros de B_{max} e K_D em bexiga	83
2.7 Ensaio Morfológico Quantitativo do músculo liso detrusor e trigono	85
2.8. Dosagem de nitrito e nitrato (NOx) plasmático	86
2.9. Ensaio funcionais	
2.9.1 Isolamento e montagem tecidos.....	87

2.10 Protocolos Experimentais	
2.10.1 Avaliação do efeito crônico e agudo do L-NAME sobre o efeito contrátil ao agonista muscarínico em detrusor isolado	88
2.10.2 Avaliação dos efeitos relaxantes dos agonistas beta-adrenérgicos em detrusor isolado de ratos tratados com L-NAME por 30 dias.....	89
2.10.3 Avaliação da resposta contrátil ao CaCl_2 em detrusor isolado de ratos tratados com L-NAME por 30 dias.....	89
2.10.4 Resposta contrátil ao KCl em músculo detrusor isolado de rato tratado com L-NAME por 30 dias	90
2.10.5 Curva frequência-resposta em músculo detrusor isolado de rato tratado com L-NAME por 30 dias	90
2.11. Parâmetros Farmacológicos	91
2.12 Análise Estatística	92

3. RESULTADOS

3.1. Valores do peso corporal e da pressão sistólica	95
3.2. Ensaio Temporal da atividade da NOS em bexiga urinária	97
3.3. Avaliação do efeito agudo e crônico do L-NAME sobre a ação contrátil ao agonista muscarínico	98
3.4. Dosagem dos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato (NO_x).....	101
3.5. Curva concentração-efeito aos agonistas β -adrenérgicos em ratos tratados com L-NAME por 30 dias.....	102
3.6. Curva concentração efeito ao CaCl_2 em músculo detrusor após tratamento crônico com L-NAME por 30 dias.....	105
3.7. Curva concentração efeito não cumulativa ao KCl em músculo detrusor isoaldo de rato tratado com L-NAME por 30 dias	108
3.8. Curva frequência resposta e músculo detrusor isolado de rato tratado com L-NAME por 30 dias na ausência e presença do antagonista purinérgico não seletivo.....	109
3.9. Dosagem do acúmulo dos fosfatos de inositol total em bexiga urinária de rato após estímulo com concentrações crescentes do agonista uscarínico carbacol.....	111

3.10. Determinação dos parâmetros de Bmax e Kd em bexiga urinária de rato em ensaios de saturação	113
3.11. Análise histológica quantitativa de músculo liso detrusor e trigono de ratos tratados com L-NAME por 30 dias	116
4. DISCUSSÃO	117
5. SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....	129
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
7. APÊNDICE	155

LISTA DE DROGAS

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
CaCl ₂	Merck
HCl	Merck
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
L-NAME	Sigma
MgSO ₄	Merck
NaCl	Merck
NaHCO ₃	Merck
Nifedipina	Sigma
Carbacol	Sigma
L-citrulina	Sigma
Leupeptina	Sigma
Inibidor tripsina	Sigma
Aprotinina	Sigma
PMSF	Sigma
NADPH	Sigma
L-valina	Sigma
EGTA	Sigma
EDTA	Sigma
Mio-inositol	Sigma
LiCl	Merck
pfHHSiD	Sigma
QNB	Sigma
Atropina	Sigma

LISTA DE ABREVIACÕES

LISTA DE ABREVIACÕES

ACh: acetilcolina

AMPC: monofosfato cíclico de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

BH4: tetrahidro-biopterina

BKca: canal de potássio ativado por cálcio

Ca²⁺: cálcio

CaM: calmodulina

CCh: carbacol

CIC: cálcio induzindo liberação de cálcio

CPA: ácido ciclopiazônico

DAG: diacilglicerol

E.P.M.: erro padrão da média

EDTA: ácido etilenodiaminotetra acético

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

E_{max}: resposta máxima

eNOS: sintase do óxido nítrico endotelial

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

FMN: flavina adenina mononucleotídeo

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GTP: trifosfato de guanosina

iNOS: sintase do óxido nítrico induzível

IP₂: difosfato de inositol

IP₃: inositol trifosfato

K_{ATP}: canal potássio ativado por ATP

L-NAME: N^o-nitro-L-arginina metil éster

MLC kinase: quinase cadeia leve miosina

MLC: cadeia leve miosina

MLCK: quinase da cadeia leve de miosina

MLC-P: fosforilação da cadeia leve miosina

NANC: não adrenérgico não colinérgico

nNOS: sintase do óxido nítrico neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: sintase do óxido nítrico

PAG: zona periaqueductal

PDE: fosfodiesterase

PDE5: fosfodiesterase tipo 5

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

PKA: proteína quinase A

PKC: proteína quinase C

PKG: proteína quinase G

PLC: fosfolipase C

PLC: fosfolipase C

ppHHSiD: p-fluoro-hexahydro-sila-diphenidol

sGC: guanilato ciclase solúvel

SR: retículo sarcoplasmático

UDIF: fator inibitório derivado do urotélio

β₃: receptor beta-3 adrenérgico

VIP: polipeptídeo intestinal vasoativo

PMSF: fenil-metil-sulfonil fluoreto

LiCl: cloreto de lítio

[³H] QNB: quinuclidynil benzilato

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores do peso corporal e da pressão arterial sistólica em ratos tratados com L-NAME por 7, 15 e 30 dias de tratamento e os respectivos grupos controle. Valores iniciais e após o término do período de tratamento.....	96
Tabela 2. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) do carbacol em músculo detrusor isolado de ratos controle e tratados cronicamente com L-NAME por 7, 15 e 30 dias.....	100
Tabela 3. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) do isoproterenol (agonista β -adrenérgico não seletivo), metaproterenol (agonista β_2 -adrenérgico seletivo) e BRL 34-377 (agonista β_3 -adrenérgico seletivo) em músculo detrusor isolado de rato após pré-contracção com KCl (80 mM).....	104
Tabela 4. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) do $CaCl_2$ na ausência e presença de nifedipina (1 μ M, 30 minutos) em músculo detrusor isolado de rato tratado tratado com L-NAME por 30 dias.....	107
Tabela 5. Valores da constante de dissociação (K_D) e da densidade de receptores muscarínicos (B_{max}) em preparações de membranas de bexiga de ratos de animais do grupo controle e tratados com L-NAME (30 dias).....	115
Tabela 6. Análise morfométrica das camadas total, muscular e submucosa dos músculos lisos detrusor e trígono de ratos controle e tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia) durante 30 dias.....	116

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do baixo trato urinário.....	53
Figura 2. Mecanismos neurais do relaxamento e esvaziamento do baixo trato urinário.....	55
Figura 3. Traçados de cistometria em humanos normais.....	56
Figura 4. Mecanismo de sinalização do receptor muscarínico M₃.....	58
Figura 5. Esquema da formação e hidrólise do AMPc.....	60
Figura 6. Biossíntese e mecanismo de ação do NO.....	62
Figura 7. Esquema da formação e hidrólise do GMPc.....	64
Figura 8. Esquema da hidrólise e ação dos subtipos de PDE na via do AMPc e GMPc.....	48
5	
Figura 9. Inibição da NOS pelo tratamento crônico com L-NAME em bexiga urinária de rato.....	97
Figura 10. Efeito do tratamento crônico e agudo com L-NAME sobre a ação contrátil do agonista carbacol em músculo detrusor isolado de rato.....	99
Figura 11. Concentração plasmática de nitrito e nitrato (NO_x) em ratos controles e tratados cronicamente com L-NAME.....	101
Figura 12. Efeito do tratamento crônico com L-NAME sobre o relaxamento induzido por agonistas beta (β)-adrenérgicos em músculo detrusor isolado de rato.....	103
Figura 13. Curva concentração-efeito ao CaCl₂ (0.01-1 mM) em ratos controle e tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia) por 30 dias.....	106

Figura 14. Curva concentração-efeito não cumulativa ao KCl (20-200 mM) em ratos controle e tratados com L-NAME por 30 dias.....	108
Figura 15. Curva frequência-resposta em músculo liso detrusor isolado de ratos controle e tratados cronicamente com L-NAME.....	110
Figura 16. Dosagem dos fosfatos de inositol em bexiga urinária de ratos controle e tratados com L-NAME por 30 dias na ausência e na presença do antagonista pfHHSiD.....	112
Figura 17. Ensaio de binding de saturação em bexiga urinária de ratos controles e tratados cronicamente com L-NAME.....	114

RESUMO

A bexiga urinária recebe inervação autonômica simpática e parassimpática, que atuam conjuntamente para a manutenção do ciclo normal da micção; ou seja, para a fase de enchimento e de esvaziamento. O mediador primário para a contração muscular do músculo liso detrusor é a acetilcolina (Ach), sendo suas ações mediadas, principalmente, pelos receptores muscarínicos dos subtipos M_2 e M_3 , cuja densidade é maior no corpo em comparação à base da bexiga. O músculo detrusor também é innervado por fibras NANC nitrérgicas, mas a função do NO neste tecido ainda não está bem definida. Com o objetivo de investigar se a inibição crônica do NO acarreta alterações funcionais, morfológicas e moleculares do músculo liso detrusor isolado da bexiga urinária de rato utilizamos ratos adultos machos WISTAR (200-350 g), tratados cronicamente L-NAME, na dose de 20 mg/rato/dia durante 7, 15 e 30 dias. Avaliamos os seguintes parâmetros: 1) Atividade da sintase de óxido nítrico (NOS) em bexiga urinária; 2) a dosagem de nitrito/nitrato (NO_x) plasmáticos; 3) a resposta contrátil aos agentes carbacol (agonista muscarínico), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e à estimulação elétrica (1-32 Hz, 80 V, 10 segundos) assim como a resposta relaxante a agonistas beta (β)-adrenérgicos; a dosagem de fosfatos de inositol; 5) a determinação dos parâmetros de K_D e B_{max} , 6) análise histológica quantitativa das camadas do músculo liso detrusor e trígono. Fragmentos do músculo detrusor foram adaptados em câmaras para órgãos isolados, contendo solução de Krebs-Henseleit e, após o período de equilíbrio, realizamos curvas concentração efeito cumulativas ao carbacol (0,001-10 μM), isoproterenol, metaproterenol e BRL- 37-344 (0,0001-100 μM), ao $CaCl_2$ (0,01-100 mM) e KCl (20-200 mM). Nossos dados mostraram que a inibição crônica de NO aumentou a potência (pEC_{50}) ao carbacol nos períodos de 15 e 30 dias de tratamento com L-NAME, sendo esse aumento cinco vezes maior aos trinta

dias de tratamento (6.82 ± 0.06) comparando-se com o respectivo grupo controle (6.09 ± 0.02). Não observamos alterações da resposta máxima ($E_{\max}$). Este aumento da sensibilidade ao agonista muscarínico pode ser explicado, em parte, pelo aumento do acúmulo de fosfato de inositol, que foi seis vezes maior nos ratos tratados com L-NAME por 30 dias em comparação ao respectivo grupo controle. Entretanto, nos ensaios de saturação, o número de receptores ($B_{\max}$) não se mostrou alterado, porém, observamos que o tratamento com L-NAME aumentou em, aproximadamente, duas vezes o valor da constante de afinidade (K_D) aos receptores muscarínicos em relação ao grupo controle. Observamos que a resposta relaxante ao agonista β_3 (BRL 37-344) mostrou-se diminuída nos ratos tratados com L-NAME, sem alterações na resposta ao isoproterenol e metaproterenol. A análise histológica quantitativa da bexiga urinária revelou que a camada muscular do trígono dos ratos tratados com L-NAME estava 28 % mais espessa em relação à do grupo controle, sem alterações na camada do detrusor. Não foram vistas alterações nas contrações mediadas pelo CaCl_2 e nem ao KCl em ambos os grupos. A estimulação elétrica (1-32 Hz, 80 V, duração estímulo 10 s) produziu contrações dependentes da frequência em ambos os grupos, sendo que na frequência de 32 Hz obtivemos a resposta máxima. Entretanto, nos ratos tratados com L-NAME não foram observadas alterações nas amplitudes das contrações em relação ao respectivo grupo controle. A adição do antagonista purinérgico, suramin (100 μM), reduziu as amplitudes das contrações; porém, a resposta do grupo L-NAME não se alterou em relação ao grupo controle. Nossos dados mostram que a inibição crônica de NO levou à redução da resposta relaxante mediada por agonista β_3 -adrenérgico e aumento da sensibilidade aos agonistas muscarínicos. As alterações observadas na resposta muscarínica é devido ao aumento do segundo mensageiro. Além disso,

aumentamos a hipótese que a hipersensibilidade do detrusor a agonistas muscarínicos pelo bloqueio crônico de NO passa ser secundária à hipertrofia do músculo liso trígono (mas não do trígono) e à deficiência do NO em nível de uretra, levando assim a um detrusor hiperativo.

ABSTRACT

The urinary bladder is innervated by parasympathetic and sympathetic fibers, which both contribute to the maintenance of the normal micturition cycle: the voiding and filling phase. Acetylcholine (ACh) is the main neurotransmitter responsible for the detrusor smooth muscle contraction, acting mainly at the muscarinic M_2 and M_3 subtypes. The detrusor smooth muscle is also innervated by the non adrenergic non cholinergic (NANC) nitrergic fibers, although the exactly mechanism of nitric oxide (NO) in this region is not well established. The aim of the present study was to investigated the functional, morphological and biochemical alterations in isolated detrusor smooth muscle after chronic NO inhibition. Male Wistar rats received N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) for 7 to 30 days. The following assays were carried out: 1) NO synthase activity; 2) plasma nitrite and nitrate (NOx) measurement; 3) functional assays to muscarinic, β -adrenoceptor agonists, potassium chloride (KCl) calcium chloride ($CaCl_2$) and electrical field stimulation; 4) Measurements of [3H]-inositol phosphate; 5) [3H]QNB binding assay to determine the dissociation constant (K_D) and the maximum specific binding (B_{max}) and 6) bladder morphology. Detrusor smooth muscle strips were mounted in organ baths, containing Krebs-Henseliet at 37°C and aerated with 95% O_2 and 5% CO_2 . Each tissue was connected to an isometric transducer. After the stabilization period concentration responses curves to carbachol (0.001-10 μM), isoproterenol, metaproterenol and BRL 37-344 (0.0001-100 μM), KCl (20-200 mM) and $CaCl_2$ (0.01-100 mM) were carried out. Our data showed that chronic NO inhibition has increased the potency values for carbachol after 15 and 30 days of treatment, being this increase 5-fold higher at 30 days (6.82 ± 0.06) when compared to the control group (6.09 ± 0.09). This alterations in the sensitivity for carbachol could be

explained, in part, by the 6-fold increase in [^3H]-inositol phosphate in bladder from L-NAME in comparison with the control group. Although no alterations on the B_{max} values were seen, a 2-fold increase in the K_D values was observed. At 30 days, detrusor smooth muscle relaxing responses to β_3 -adrenoceptor agonist BRL 34-377 was significantly reduced by L-NAME, whereas the relaxing responses to isoproterenol and metaproterenol were not modified. The constitutive NO synthase activity was reduced by 86% in bladder at 7-days L-NAME treatment, which was maintained up to 30 days. No morphological alterations in detrusor smooth muscle were found; however in the trigone smooth muscle, L-NAME treatment caused an increase, approximately 28%, in the thickness of the muscular layer. The amplitude of contraction induced by CaCl_2 and KCl was not different in L-NAME treated group when compared to the control one. The contraction induced by electrical field stimulation (1-32 Hz, 80 V, 10 sec) was not different between the treated and non treated group; the addition of suramin, a non selective purinergic antagonist, significantly reduced the amplitude of contraction on both groups; however, no difference on the amplitude response between these groups was observed.

Long-term NO-deficiency increases rat DSM contractile responses mediated by muscarinic agonist that are accompanied by significant enhancement in K_D values for muscarinic receptors and [^3H]-inositol phosphate accumulation in bladder. This supersensitivity for muscarinic agonists along with reductions of β_3 -adrenoceptor-mediated relaxations indicates that overactive DSM results from chronic NO deficiency. It is plausible to suggest that chronic NO deficiency at the level of trigone (and/or urethra) triggers a persistent contraction leading in turn to a DSM overactive.

1. INTRODUÇÃO

A hiperatividade da bexiga urinária resulta em urgência, polaciúria, com ou sem urge-incontinência, piorando grandemente a qualidade de vida da população (Kumar et al., 2005; Hashim & Abrams, 2007). A hipertrofia e a hiperplasia da bexiga urinária acarretam obstrução do efluxo à urina, mas os fatores primários que induzem o crescimento celular ainda não estão completamente caracterizados. Vários receptores, vias de sinalização e fatores de crescimento têm sido implicados nesta disfunção. Os estudos experimentais para tal fim têm empregado várias espécies animais e estratégias, como obstrução parcial da uretra, indução de diabetes e de diurese osmóticas, aplicação de bolos de parafina na bexiga e desnervação ou remoção do gânglio pélvico (Peterson et al., 1974; Ekstrom et al., 1984; Steers & de Groat, 1988; Longhrust et al., 1990; Malgren et al., 1992; Arner et al., 1993). De modo geral, os resultados têm revelado uma influência trófica dos nervos parassimpáticos, onde a atividade contrátil da bexiga não necessariamente depende do crescimento hipertrófico (Andersson & Arner, 2004). Estudos experimentais mostram que camundongos *knockout* para a enzima sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS) apresentam hiperatividade e hipertrofia da bexiga (Burnett et al., 1997). Em bexigas urinárias obstruídas de coelho, a densidade da NOS está reduzida (Khan et al., 1999). Em bexiga urinária de rato, o óxido nítrico (NO) apresenta efeito inibitório no crescimento das células da musculatura da bexiga, sugerindo que a redução da atividade da NOS pode levar à hipertrofia da bexiga (Johansson et al., 2002). Em ratos, a inibição aguda (*in vitro*) da NOS por L-NAME não modifica a atividade da musculatura detrusora. Por outro lado, nos modelos animais *in vivo* de obstrução parcial da uretra, observam-se redução da atividade da nNOS e aumento da atividade da iNOS (Johansson et al., 2002). Desta forma, é possível que a ausência prolongada de NO leve a hiperatividade e hipertrofia da bexiga urinária.

1.1 Fisiologia do Ciclo da Micção

1.1.1 Anatomia Trato Urinário Inferior

O baixo trato urinário é constituído pela bexiga urinária, uretra e esfíncteres. A bexiga é um órgão dividido em duas regiões distintas: uma ampla região localizada acima dos orifícios ureterais, denominada “corpo da bexiga”, que contém o músculo liso detrusor, e uma região menor, abaixo dos orifícios ureterais, denominada “base da bexiga”, que é constituída pelo músculo trígono e junção uretravesical (Morrison et al., 2005; Fry et al., 2005). A principal estrutura muscular da bexiga é o músculo liso detrusor. As fibras musculares do detrusor são capazes de se distender, permitindo um aumento do volume da bexiga, sem aumento da pressão intravesical, e de se contrair de maneira suficiente para gerar a pressão necessária para liberar a urina. A bexiga urinária é um órgão elástico que apresenta capacidade de estocar e liberar urina. Esta capacidade depende da atividade dos músculos lisos e estriados, uretra e esfíncter uretral externo (de Groat, 2006) (Figura 1).

O corpo da bexiga é dividido em três partes: a camada serosa que reveste a bexiga externamente; a túnica muscular, denominada de músculo detrusor e o urotélio que reveste internamente a bexiga com três camadas celulares formando não somente uma barreira impermeável como também uma região que secreta substâncias (de Groat et al., 2004). A bexiga, a uretra e os esfíncteres, os músculos envolventes, a inervação autonômica e somática e os neurotransmissores são peças fundamentais, cuja interação resulta no estabelecimento da continência urinária (Morrison et al., 2005).

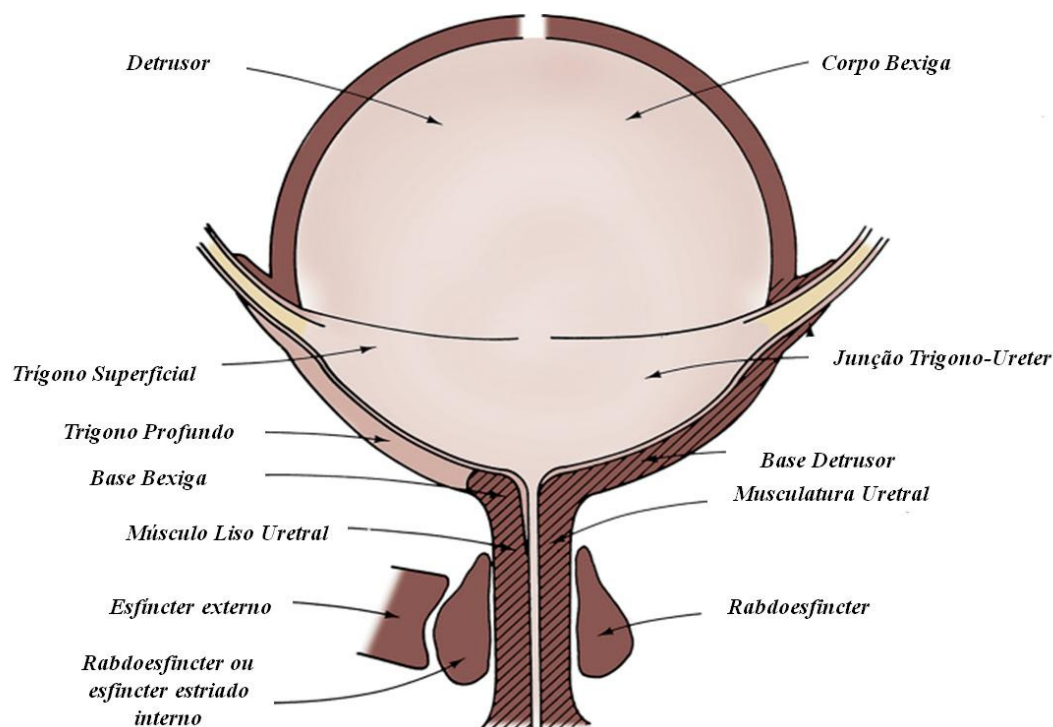


Figura 1. Desenho esquemático da bexiga (detrusor e trigono) e da saída da bexiga (uretra, orifícios ureterais, esfíncteres internos e externos), segundo Gosling et al., 1977 (legenda à esquerda) versus Elbadawi, 1984 (legenda à direita).

1.1.2 Controle Neural e Mecanismo Sinalização Ciclo Micção

A dinâmica vesicoesfincteriana compreende duas fases: Fase de enchimento e Fase de esvaziamento. A primeira corresponde ao período em que a urina, vinda dos ureteres, vai enchendo a bexiga, e depois segue-se a micção. Nesta fase de enchimento, há vários mecanismos que impedem a saída da urina para o exterior; são mecanismos que contêm a urina na bexiga, chamados “Mecanismos de Continência” (Morrison et al., 2005).

O trato urinário inferior é innervado pelos nervos parassimpáticos (pélvico), simpáticos (hipogástrico) e somáticos (pudendo). Os nervos pélvicos e hipogástricos localizam-se na região sacral e lombar, respectivamente (Morrison et al., 2005). O plexo pélvico, quando ativado, promove contração do corpo da bexiga, aumentando a pressão intravesical e relaxamento da uretra (Andersson, 1993; Andersson & Arner, 2004; Morrison et al., 2005). A ativação do hipogástrico, por sua vez, relaxa o corpo da bexiga e contrai a uretra e esfíncteres internos (de Groat et al., 1993) (Figura 2). O nervo pudendo, quando ativado, contrai o esfíncter uretral externo (de Groat et al., 2001) (Figura 3).

Na fase de enchimento, a pressão intravesical, em humanos e animais, mantém-se baixa e constante (Figura 3). A acomodação da bexiga durante esta fase é um processo passivo e depende das propriedades da musculatura lisa, assim como da inibição da atividade eferente parassimpática. A distensão das fibras musculares resultante do aumento do volume intravesical ativa as fibras simpáticas as quais fecham a uretra e esfíncter interno permitindo o armazenamento da urina. Durante esta fase, a atividade do esfíncter uretral externo está aumentada, refletindo aumento da atividade somática e conseqüente resistência da saída da bexiga, contribuindo para o processo de continência (Andersson et al., 1993; de Groat, 2006) (Figuras 2 e 3).

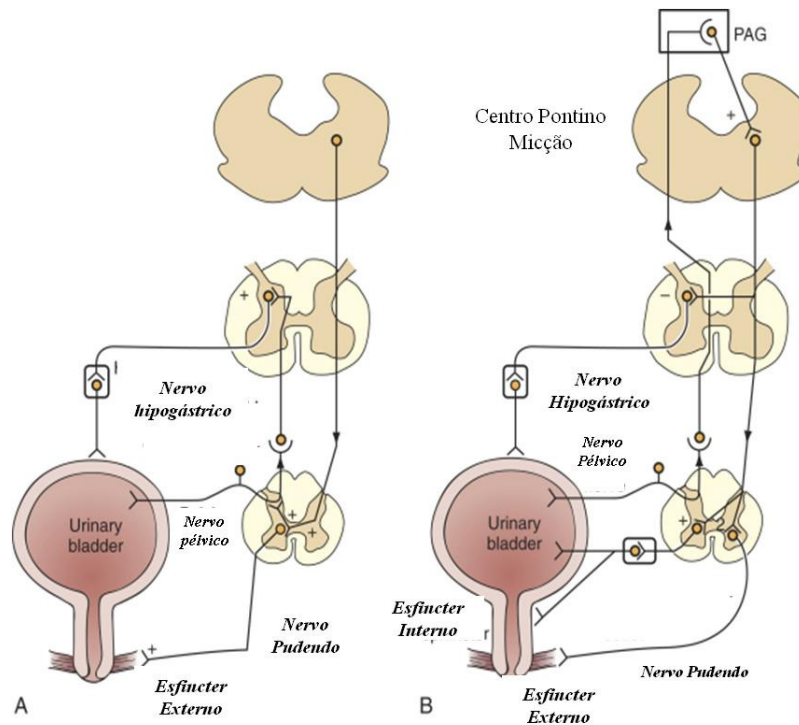


Figura 2. Mecanismos reflexos das fases de enchimento e esvaziamento. (A) Reflexos da fase enchimento: durante a fase de enchimento há a ativação de fibras nervosas simpáticas (hipogástrico) e somáticas (pudendo), que, quando ativadas, promoverão o fechamento da saída bexiga (base e uretra) assim como do esfíncter uretral externo, respectivamente. (B) Reflexos da fase de esvaziamento: o início da micção aumenta a atividade visceral aferente, a qual ativará o centro da micção (centro pontino micção), promovendo assim inibição das vias simpáticas e somáticas. O centro pontino estimulará as fibras nervosas eferentes parassimpáticas que inervam tanto a bexiga como a saída da bexiga. PAG: zona periaquedutal (de Groat, 2006).

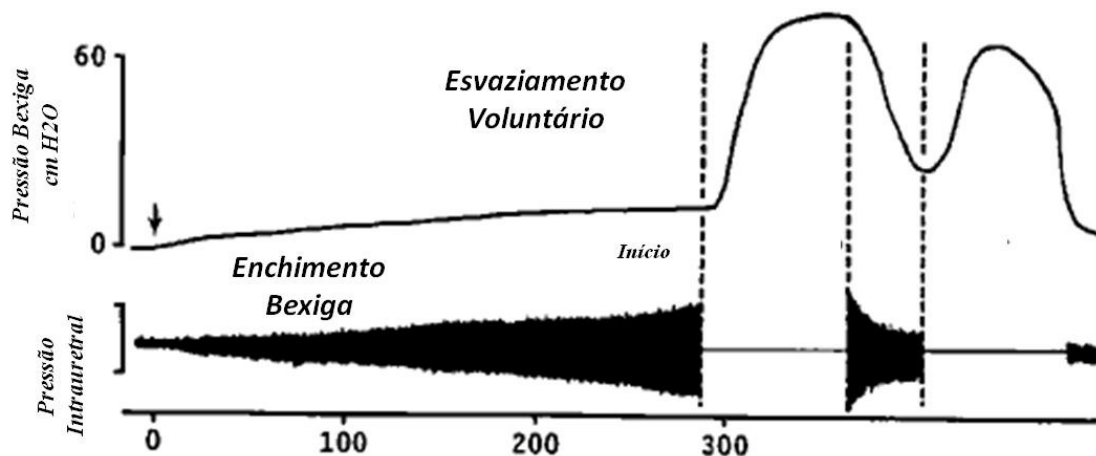


Figura 3. Traçados de cistometria (painel superior) e de eletromiograma do esfíncter (EMG; painel inferior) em humano normal. O eixo x representa volume (mL) e o eixo y representa a pressão intravesical (cmH₂O). A seta à esquerda representa o início da infusão de salina na bexiga (enchimento bexiga). As linhas verticais indicam o início e o término do relaxamento do esfíncter (de Groat, 2006).

Uma vez atingida a capacidade máxima da bexiga, os receptores sensíveis as variações de pressão, presentes no interior do músculo detrusor, emitem sinais aos centros corticais do cérebro para iniciar a fase de esvaziamento, que compreenderá a contração do músculo detrusor e relaxamento esfíncteriano. Para iniciar o processo da micção é necessário que o córtex cerebral reconheça o desejo de urinar e decida o momento de esvaziar a bexiga. Quando tal desejo é devidamente reconhecido, a uretra encurta-se diminuindo a resistência ao fluxo (Hostelge & Mouton, 2003); consequentemente, a bexiga libera o seu conteúdo sob controle voluntário, através de uma atividade coordenada do músculo detrusor e da uretra. Este contrai em resposta à estimulação dos receptores muscarínicos, e a uretra relaxa em resposta, principalmente, à

ação do óxido nítrico (NO) (Kavia et al., 2005; James et al., 1993; Smith et al., 1996). Assim, o reflexo da micção é completamente autônomo por parte da espinha-medula, mas pode ser voluntariamente facilitado ou inibido por centros cerebrais (de Groat et al., 1993; Yokoyama et al., 2000).

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor primário responsável pela micção. Os receptores muscarínicos são encontrados em toda a bexiga, ou seja, no músculo detrusor, no urotélio e nos terminais nervosos parassimpáticos e simpáticos. Apresentam maior densidade no corpo do que na base bexiga (Matsui et al., 2000, 2002).

No músculo detrusor, dois subtipos de receptores muscarínicos são encontrados, o receptor M_2 , que está presente em maior proporção (90%), e o M_3 que corresponde a aproximadamente 10% do total. As contrações do músculo detrusor são atribuídas ao receptor M_3 , que está acoplado a uma proteína $G_{q/11}$ que ativa a fosfolipase C (PLC) levando à hidrólise do fosfatidilinositol (IP_2) para inositol 1,4,5 (IP_3) e diacilglicerol (DAG) (Longhurst et al., 1995). O papel dos receptores M_2 ainda não está claro, possíveis ações como inibição da adenilato ciclase, ativação de canais iônicos não específicos e inativação de canais iônicos para o potássio parecem contribuir para a contração do músculo detrusor, mediada por este subtipo de receptor muscarínico (Anderson & Hedlung, 2002) (Figura 4).

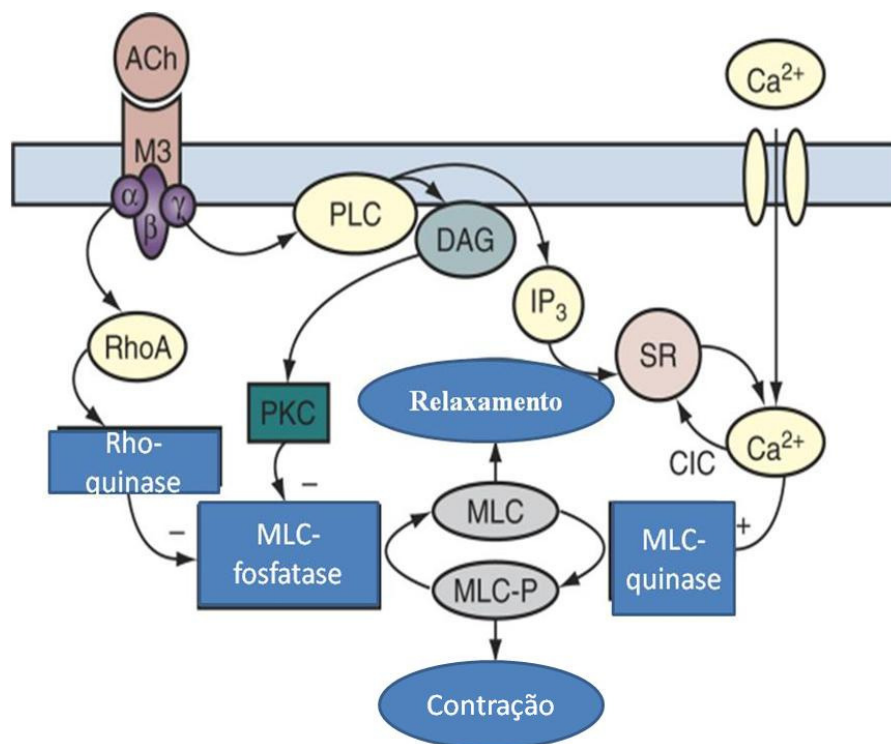


Figura 4. Mecanismo de biossinalização do subtipo M₃. A ativação dos receptores M₃ pela ACh ativa a PLC, produzindo IP₃ e DAG. O aumento de IP₃ leva ao aumento da [Ca]_i o qual ativará a MLC quinase, promovendo a fosforilação da MLC e consequentemente a contração. O DAG ativa a PKC que inibirá a MLC fosfatase. ACh: acetilcolina, PLC: fosfolipase C, IP₃: trifosfato de inositol, SR: retículo sarcoplasmático, Ca⁺²: íons cálcio, MLC kinase: quinase cadeia leve miosina, MLC: cadeia leve miosina, MLC-P: fosforilação da cadeia leve miosina, CIC: cálcio induzindo liberação de cálcio, PKC: proteína quinase C, MLC-fosfatase: fosfatase da cadeia leve miosina.

Mais recentemente, Bravermann et al. (2006) sugeriram que os receptores do subtipo M₂ contribuem para a contração da bexiga, apresentando um sinergismo com o M₃ na resposta contrátil, por mecanismos distintos. Por outro lado, Matsui et al. (2002) verificaram que a resposta contrátil da bexiga ao carbacol *in vivo* e *in vitro* permanece inalterada em camundongos deficientes do gene para o receptor do subtipo M₂, ao

passo ao passo que em camundongos deficientes do gene para o M_3 a resposta contrátil ao carbacol diminui para aproximadamente 5% da resposta máxima.

Os receptores muscarínicos também estão localizados no urotétio, onde podem induzir a liberação de um fator difusível, denominado *Fator Inibitório Derivado do Urotétio (UDIF)*, cuja ação parece ser a de inibir a contração subjacente do músculo liso detrusor. Este fator ainda não foi identificado, mas sabe-se que sua ação não é afetada por inibidores da via do NO ou da ciclooxigenase (COX) (Chaiyaprasithi et al., 2003). Em bexigas urinárias isoladas de ratos, o urotétio não apresenta receptores muscarínicos (Saito et al., 1997), e o UDIF parece ter origem no próprio músculo detrusor (Chess-Williams, 2002).

Em mamíferos, o relaxamento do detrusor se dá, principalmente, pela via do AMPc, e da proteína quinase A (PKA) a qual é ativada após ligação da noradrenalina (NOR) aos receptores beta (β)-adrenérgicos (Figura 5). Os subtipos $\beta_{1,2,3}$ estão presentes na bexiga urinária tanto de animais como de humanos; entretanto, em humanos 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 em coelhos com obstrução parcial da uretra, os níveis de AMPc estão diminuídos, e que substâncias capazes de aumentar estes níveis produziram melhora dos sintomas característicos desta desordem. Apesar da presença de adrenoceptores na bexiga, seu papel na função urinária ainda é controverso; a simpatectomia, o bloqueio dos receptores adrenérgicos, assim como a deficiência da dopamina hidroxilase (enzima que converte dopamina em noradrenalina) não produziram alterações no processo de micção (Gillespie, 2004).

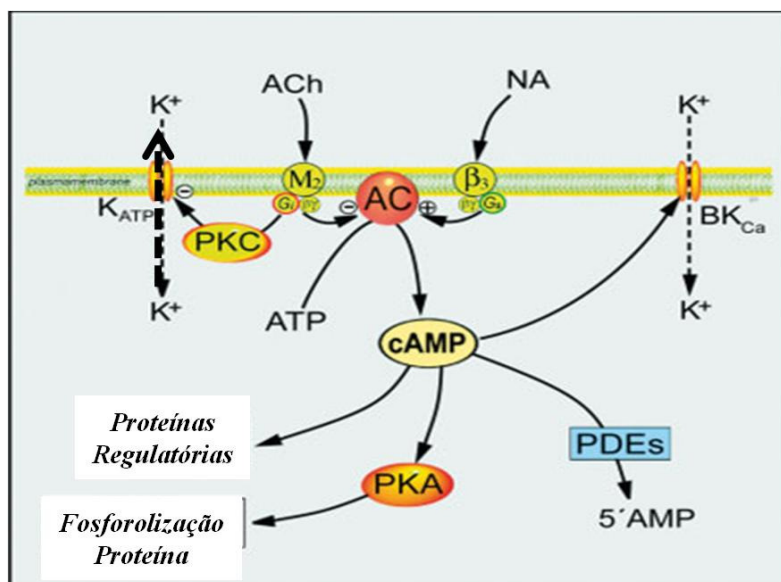


Figura 5. Esquema da formação e hidrólise do AMPc no detrusor. A estimulação do receptor do subtipo β_3 pela NA ativa a AC com conseqüente aumento do AMPc, o qual é degradado pela PDE a 5-AMP. NA: noradrenalina, AC: adenilato ciclase, PKA: proteína quinase A, PDEs: fosfodiesterases, K_{ATP} : canal potássio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

1.1.3 Inervação não adrenérgica não colinérgica (NANC) no baixo trato urinário: NO e ATP

1.1.3.1 Inervação NANC inibitória: NO

O NO é um neurotransmissor formado a partir da L-arginina, através de uma reação catalisada por uma família de enzimas denominadas sintase óxido nítrico (NOS). A NOS utiliza como substrato o NADPH e o oxigênio molecular (O_2) e oxida o grupo guanidina da L-arginina, em processo que consome cinco elétrons e resulta na formação do NO com quantidade estequiométrica de L-citrulina (Moncada et al., 1991) (Figura 6). A atividade da NOS se dá pela presença de diversos cofatores e grupos

prostéticos, dentre eles a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina adenina mononucleotídeo (FMN), ferro, zinco e o (6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina (BH₄).

Existem três isoformas de NOS, denominadas de endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) cada qual codificada por diferentes genes (Stuehr et al., 2004). Tanto a eNOS como a nNOS são denominadas de NOS constitutivas (cNOS), pois estão normalmente expressas nas células e atuam de modo dependente de cálcio e de calmodulina para sua ação. O NO formado através da eNOS regula o tônus vascular, previne a adesão dos leucócitos e das plaquetas, enquanto que o NO formado a partir da nNOS atua como neurotransmissor e/ou neuromodulador no sistema nervoso central e no periférico. A isoforma iNOS é expressa em diferentes tipos celulares como macrófagos, hepatócitos e músculo liso vascular; é estimulada por substâncias pró-inflamatórias, como o lipopolissacarídeo (LPS) e citocinas. Esta isoforma não é dependente de cálcio e, uma vez expressa, produz grandes quantidades de NO por longos períodos de tempo (Moncada et al., 1991). O mecanismo de ação do NO, de modo geral, envolve a sua ligação na porção heme da guanilato ciclase solúvel (sGC), induzindo uma mudança conformacional que leva a enzima a sintetizar 3',5' monofosfato guanosina cíclico (cGMP) a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (Figura 6). Esta enzima tem sido detectada em diversos tecidos, como pulmão, cérebro, coração, rim, fígado, placenta, pâncreas, medula, útero (Nakane et al., 1990; Budworth et al., 1999; Schoser & Behrends, 2001) e bexiga de humanos (Ehsan et al. 2002) e de cobaia (Smet et al.1996). O acúmulo de cGMP regula numerosas funções no organismo como o tônus dos vasos, neurotransmissão e respostas inflamatórias (Nakane et al., 1990; Budworth et al., 1999; Schoser & Behrends, 2001). Compostos endógenos e exógenos, incluindo autacóides, hormônios, neurotransmissores e toxinas

produzem respostas celulares mediadas pelo cGMP, que tem diferentes alvos no sistema celular, como canais iônicos, fosfodiesterase (PDE) ou proteínas quinases (Lucas et al., 2000). Duas proteínas quinases dependentes de GMPc foram identificadas: a cGKI, presente em altas concentrações no músculo liso, plaquetas, células de Purkinje e cerebelo, e a cGKII, expressa no intestino delgado, cérebro e cartilagens (Pfeifer et al., 1998). A inativação da cGKI em camundongos abole o relaxamento do músculo liso vascular e cerebral, dependente de NO/GMPc causando hipertensão arterial e perda da motilidade (Pfeifer et al., 1998).

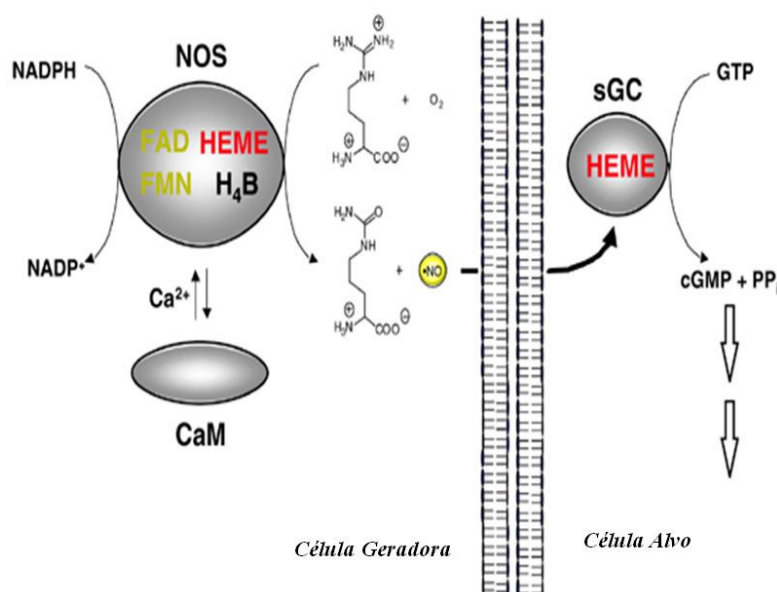


Figura 6. Biossíntese e mecanismo de ação do óxido nítrico. NOS: sintase óxido nítrico, CaM: calmodulina, NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, NADP: nicotinamida adeniana dinucleotídeo fosfato, FAD: flavina adenina dinucleotídeo, FMN: , flavina mononucleotídeo, BH₄: tetrahydrobiopterina, Ca⁺²: cálcio, sGC: guanilato ciclase solúvel, cGMP: monofosfato guanosina cíclico, GTP: trifosfato guanosina, PP_i: pirofosfato (Proskuryakov et al., 2005).

A atividade da NOS é detectada no urotélio, músculo liso, músculo estriado, nervos e vasos sanguíneos do baixo trato urinário. O músculo liso detrusor tem pouca

densidade de fibras nitrérgicas quando comparado ao trígono e uretra (Mamas et al., 2003). A nNOS foi identificada em terminações nervosas no músculo detrusor, embora com densidade inferior à encontrada na uretra e no trígono (Burnett et al., 1997). Em bexigas urinárias de humanos verificou-se imunoreatividade para a nNOS nas fibras nitrérgicas da superfície submucosa e entre as células musculares (Persson et al., 1999), enquanto que a eNOS foi detectada tanto em células endoteliais das veias como nas células do músculo liso do baixo trato urinário (Fathian-Sabet et al., 2001). Além disso, camundongos machos deficientes de nNOS apresentam aumento da massa e hiperatividade da bexiga, sugerindo que o NO está envolvido no relaxamento muscular durante a fase de enchimento da bexiga (Burnett et al., 1997). Foi visto que a infusão intrauretral de doadores de NO (S-nitroso-N-acetilpenicilamina [SNAP] ou nitroprussiato (SNP, 1-2 mM) diminui em, aproximadamente, 30% a pressão uretral e 45-75% as frequências de contrações da bexiga, sem alterar as amplitudes de contração da mesma (Jung et al., 1999).

Estudos prévios mostraram que drogas que aumentam as concentrações intracelulares do nucleotídeo GMPc relaxam o baixo trato urinário. Se presume que o AMPc desempenha um importante papel no relaxamento do detrusor, enquanto o GMPc desempenha um papel no relaxamento da uretra (Andersson & Wein, 2004; Wheeler et al., 2005). A inativação do GMPc (figura 7) ocorre através da ação de enzimas denominadas de (PDE).

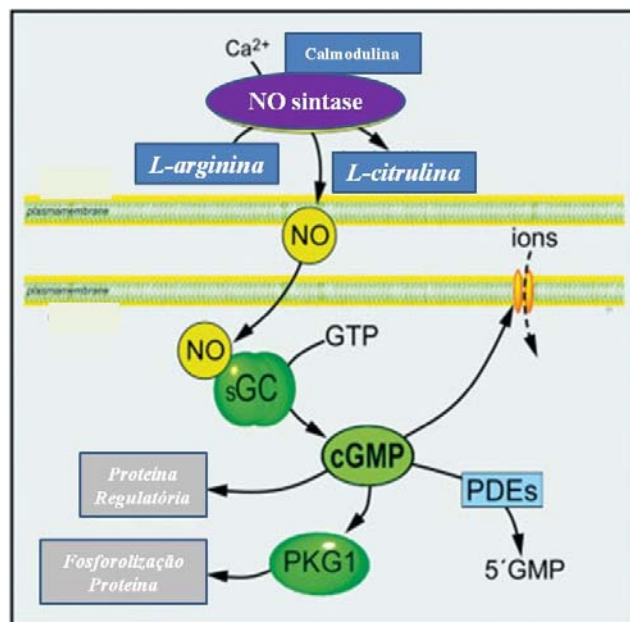


Figura 7. (B) Esquema da hidrólise do GMPc. O NO ativa a sGC, aumentando a concentração de GMPc, o qual é degradado a 5-GMP pela PDE. NO: óxido nítrico, PDE: fosfodiesterase, sGC: guanilato ciclase solúvel, GTP: trifosfato de guanosina, PHG: proteína quinase G.

Até o presente momento foram identificadas onze diferentes famílias de PDE, as quais diferem em estrutura, regulação e especificidade para os substratos (Figura 8) (Soderling & Beavo, 2000). Alguns autores demonstraram a presença da PDE-5 em próstata (Uckert et al., 2001), bexiga (Qiu et al., 2001) e uretra de rato (Kuhn et al., 2000), sugerindo que a via o GMPc contribui também para a manutenção do tônus do baixo trato urinário.

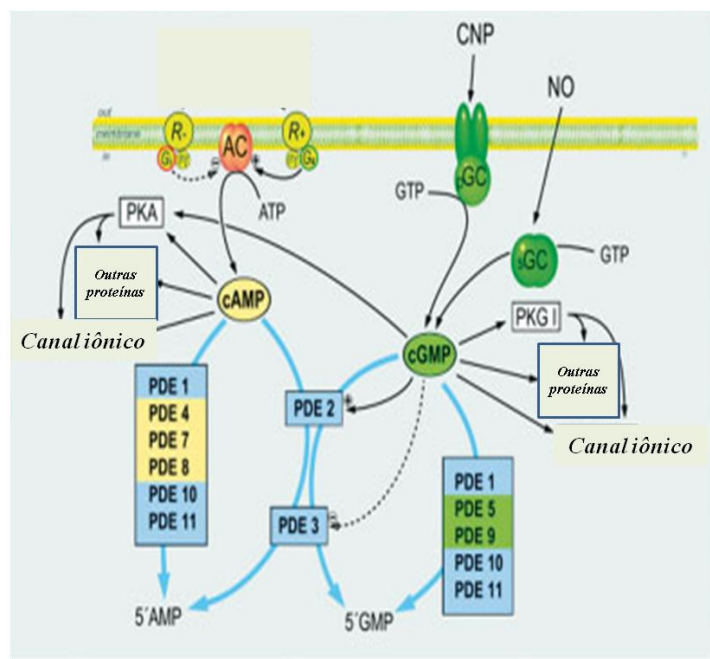


Figura 8. Esquema ilustrando a hidrólise do AMPc/GMPc pelos subtipos de PDE e uma possível interação entre os nucleotídeos cíclicos. R+ e R- significa receptores que estão ou não acoplados à AC. PDE, fosfodiesterase, AC, adenilato ciclase, NO, óxido nítrico, PKG1, proteína quinase G1, GCs, guanilato ciclase solúvel, PKA, proteína quinase A.

1.1.3.2 Inervação NANC excitatória: ATP

As contrações induzidas por estímulo elétrico em bexigas urinárias de várias espécies de mamíferos não são exclusivamente de natureza colinérgica. Em bexiga urinária de rato, a atropina inibe em, aproximadamente, 25% a resposta contrátil, ao passo que em bexiga de coelho e de cobaia, a redução pela atropina é estimada em 40% e 75%, respectivamente (Brading & Inoue, 1991).

As contrações induzidas por estímulo elétrico são mimetizadas pela administração exógena de ATP e, por isso, acredita-se que o ATP seja o principal mediador responsável pelo componente NANC-excitatório neste tecido (Burnstock, 2001). As contrações induzidas pelo ATP no músculo detrusor envolvem duas famílias

de receptores purinérgicos: um ligado ao canal iônico (P_{2X}), que promove o influxo de cálcio extracelular, e outro acoplado à proteína-G (P_{2Y}), que envolve a sinalização via fosfolipase C/ IP_3 e liberação de cálcio extracelular (Burnstock & Willians, 2000). Em cobaia foi visto que os subtipos P_{2X1} e P_{2X2} são responsáveis pela ação excitatória na musculatura detrusora, enquanto que em outras espécies (coelho, cão e rato) a ação excitatória foi atribuída ao P_{2X1} e P_{2X4} (Burnstock, 2000). Técnicas de imunohistoquímica mostraram que em humanos o subtipo predominante é o P_{2X1} , e que em condições de obstrução parcial da uretra este subtipo de receptor encontra aumentado (O'Reilly et al., 2001).

Técnicas de imunohistoquímica revelaram a presença do subtipo $P_{2X_{2/3}}$ em neurônios aferentes assim como na parede da bexiga, no ureter e na camada suburotelial. Estudos de *patch clamp* revelam que a grande maioria de neurônios aferentes oriundos da bexiga responderam ao análogo mais resistente à hidrólise (α,β metil-ATP) e ao próprio ATP, sugerindo que a via aferente expressa predominantemente estes tipos de receptores. A administração intravesical de ATP aumenta a atividade reflexa das fibras; por outro lado, a dessensibilização dos receptores purinérgicos pela administração intravesical do α,β metil-ATP ou através do antagonista suramin, diminui a atividade aferente reflexa. Além disso, em camundongos *knockout* para o receptor P_{2X3} , a atividade aferente é praticamente abolida (Pandita & Andersson, 2002; Zhang et al., 2003; Nishiguchi et al., 2005).

1.2 Sintomas Trato Urinário Inferior

Segundo a Sociedade Internacional de Continência (2002), os sintomas do baixo trato urinário podem ser divididos em três grupos:

- 1) Sintomas na Fase de Enchimento, onde ocorrem alterações durante o enchimento da bexiga e caracteriza-se por urgência, polaciúria, noctúria e urgeincontinência;
- 2) Sintomas na Fase de Esvaziamento, onde ocorrem alterações durante a fase de esvaziamento e caracteriza-se por jato urinário fraco, dificuldade para iniciar micção, esforço miccional, gotejamento terminal;
- 3) Sintomas Pós Miccionais, onde são ocasionados imediatamente após a micção e incluem sensação de esvaziamento incompleto e gotejamento pós-miccional.

O enfoque deste presente trabalho será nas alterações da fase de enchimento, onde se encontra a síndrome da bexiga hiperativa.

1.2.1 Síndrome da Bexiga Hiperativa

A síndrome da bexiga hiperativa, síndrome de urgência ou síndrome de urgência-freqüência caracteriza-se pela presença de urgência miccional, com ou sem urge-incontinência, usualmente acompanhada de noctúria e aumento da freqüência urinária, na ausência de fatores infecciosos, metabólicos ou locais (Abrams et al., 2002).

É condição que compromete sobremaneira a qualidade de vida, sendo causa de isolamento social, frustração e ansiedade. Steers & Lee (2001) referiram que a depressão é mais comum em pacientes com urge-incontinência em comparação àquelas com incontinência urinária mista ou incontinência urinária de esforço. Abrams (2000) e

Milson *et al.* (2001) ressaltam que mesmo as pacientes com bexiga hiperativa sem perda urinária tem a qualidade de vida bastante comprometida. Estima-se que a prevalência da bexiga hiperativa nos Estados Unidos seja de 17% (Stewart et al., 2001), no Oeste Europeu de 16% (Milsom et al., 2001) e na América do Sul de 18% (Teloken et al., 2006).

1.2.2 FISIOPATOLOGIA

A fisiopatologia da bexiga hiperativa não é totalmente conhecida. Existem vários mecanismos envolvidos, de origem periférica (Drake et al., 2001), central (de Groat, 1997; de Groat 1998) ou miogênica [Brading, 1997; Drake et al., 2000], que talvez explique a diversidade de sintomas aos tratamentos disponíveis.

A) BEXIGA HIPERATIVA NEUROGÊNICA

O armazenamento e a eliminação periódica de urina dependem da atividade coordenada de duas unidades funcionais do trato urinário inferior: o reservatório (bexiga) e a saída (colo vesical, uretra e esfíncter uretral). O sincronismo entre essas estruturas é mediado pelo controle neurológico localizado no cérebro, na substância reticular da ponte, no cerebelo, na medula e nos gânglios periféricos, com a participação de diversos neurotransmissores e neuromoduladores. A forma neurogênica de bexiga hiperativa decorre de afecções neurológicas, como lesões suprapontinas (acidentes vasculares cerebrais, tumores, traumatismos cranianos, doença de Alzheimer, doença de Parkinson) e lesões medulares (dissinergia detrusor-esfincteriana) (Vizzard, 2006).

B) BEXIGA HIPERATIVA NÃO NEUROGÊNICA

B1) OBSTRUÇÃO URINÁRIA

A obstrução vesical é reconhecida como etiologia da bexiga hiperativa há muito tempo, em especial em homens com hiperplasia prostática. Após a desobstrução, os sintomas desaparecem em dois terços dos casos (Thomas & Abrams; Patel & Chapple, 2008). Nas mulheres, as distopias acentuadas e as causas iatrogênicas (hipercorreções de incontinência urinária) podem determinar uma condição semelhante (Smith et al., 2006).

Várias são as hipóteses para explicar a associação entre obstrução vesical e bexiga hiperativa. Alterações histológicas incluem hipertrofia e hiperplasia dos miócitos, aumento na deposição do colágeno e diminuição da inervação parassimpática. Alguns estudos sugerem que esta denervação parcial do detrusor seja consequência de lesões isquêmicas provocadas pela redução do fluxo sanguíneo ao detrusor hipertrofiado (Malmqvist et al., 1991; Gabella & Uvelius, 1994; Turner & Brading, 1997; Gosling et al., 2000).

Estudos experimentais mostram que a hipertrofia do detrusor se acompanha de diminuição da função contrátil e do aparecimento de atividade elétrica espontânea. Como consequência as fibras musculares se tornam mais irritáveis e perdem o sincronismo. Outra teoria causal envolve o aumento do fator de crescimento neuronal (NGF) que causaria hipertrofia de fibras nervosas aferentes e eferentes e aumento da atividade reflexa da bexiga (Tanner et al., 2000; Lluel et al., 2002; Johansson et al., 2002; Su et al., 2003).

B2) HIPERSENSIBILIDADE AFERENTE

Os impulsos aferentes são essenciais para o controle da micção. Alterações nesta atividade aferente estão implicadas na etiologia da bexiga hiperativa. Os impulsos aferentes provenientes da bexiga são conduzidos predominantemente por fibras pequenas e mielinizadas do tipo A, que são sensíveis à distensão e/ou à contração vesical. As fibras aferentes do tipo C, localizadas principalmente na região sub-urotelial, não são mielinizadas e sua ativação se dá por estímulos químicos, irritativos e térmicos, mas existem dúvidas de sua real participação na micção normal. Na bexiga hiperativa, mecanismos excitatórios secundários podem ser predominantes e as fibras C ficarem mais ativas (Gabella & Davis, 1998; de Groat & Yoshimura, 2006; Birder & de Groat, 2007).

Sabe-se que vários neurotransmissores produzidos e liberados pelo urotélio e pelo plexo nervoso suburotelial, em resposta à distensão vesical, podem facilitar ou dificultar o início da micção e, por conseguinte, estarem implicados na fisiopatologia da bexiga hiperativa (Baskin et al., 2001). De acordo com Burnstock (1999), o ATP liberado pelo urotélio de ratos em resposta à distensão vesical, atuaria sobre os receptores purinérgicos P2X3 de nervos subepiteliais, estimulando fibras nervosas aferentes que transmitiriam o impulso ao sistema nervoso central, dando início ao reflexo da micção. A utilização de antagonistas do ATP tem se mostrado eficaz em reduzir a atividade aferente induzida pela distensão vesical *in vitro* (Lu et al., 2007). Outro neurotransmissor provavelmente envolvido na fisiopatologia da bexiga hiperativa é o NO. Estudos mostram que este neurotransmissor é liberado pelo urotélio e por nervos suburoteliais e intramurais em resposta à distensão vesical. Atua como importante fator para o relaxamento não-adrenérgico e não-colinérgico do

músculo detrusor durante o enchimento vesical (Ozawa et al., 1999; Yoshimura et al., 2001). Além disso, o NO pode ser um dos fatores envolvidos na queda da pressão intra-uretral que precede a contração do detrusor no início do esvaziamento vesical. Em estudos de cistometria em ratos, o seqüestrador de NO, oxihemoglobina, causou aumento das contrações involuntárias durante a fase de enchimento, sugerindo que a deficiência de NO poderia contribuir para o surgimento da hiperatividade vesical (Pandita et al., 2000).

As taquicininas e neurocininas A e B (NKA e NKB) também foram detectadas em fibras nervosas aferentes do tipo C, sendo liberadas em resposta ao estímulo irritativo. Lecci and Maggi (2001) mostraram que a hiperatividade vesical induzida por estímulo químico pode ser inibida ou prevenida por antagonistas das neurocininas.

O polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) tem sido considerado um agente inibitório das vias eferentes parassimpáticas e excitatório das vias aferentes, juntamente com a substância P. Concentrações reduzidas de VIP têm sido encontradas em biópsias de detrusor com bexiga hiperativa quando se compara com a musculatura vesical normal, que pode estar relacionado com o desencadeamento da bexiga hiperativa (Uckert et al., 2002). A participação de outros neurotransmissores e mediadores como os prostanóides, serotonina, dopamina, histamina, cálcio e fator de crescimento neuronal também têm sido implicadas na gênese da bexiga hiperativa.

C) ALTERAÇÕES NO MÚSCULO DETRUSOR (TEORIA MIOGÊNICA)

Achados microscópicos mostraram anormalidades estruturais no músculo detrusor provenientes de bexigas hiperativas, incluindo aumento de elastina e de colágeno, bem como predomínio de dois tipos de junções celulares; protusões

juncionais e aposições ultrapróximas, que é compatível com a facilitação de transmissão celular elétrica (Brading, 1997). As teorias neurogênicas e miogênicas não são mutuamente exclusivas. Os dois processos podem coexistir produzindo manifestações clínicas. Assim, alterações primárias do detrusor podem desencadear anormalidades neurológicas, que, por sua vez, facilitariam a condução da atividade elétrica, predominante na bexiga hiperativa (German et al., 1995; Charlton et al., 1999; Drake et al., 2000). Da mesma forma, as alterações neurológicas podem levar a mudanças na estrutura, sensibilidade e comportamento do músculo detrusor.

1.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Anticolinérgicos

Os agentes antimuscarínicos são antagonistas competitivos e bloqueiam a ação da ACh oriunda da inervação parassimpática. São os fármacos de escolha para o tratamento da bexiga hiperativa-detrusor hiperativo, já que diminuem a capacidade de contração da bexiga. Estes fármacos atuam, principalmente, durante a fase de enchimento, diminuindo os sintomas de urgência, aumentando assim a capacidade da bexiga (Morrison et al., 2002). Os agentes antimuscarínicos podem ser divididos em amins terciárias e quaternárias (Guay, 2003). Diferem quanto à lipofilicidade, carga molecular e peso molecular. Os compostos terciários (tartarato de tolterodina, cloridrato de oxibutinina, cloridrato de darifenacina e solifenacina) geralmente têm maior lipofilicidade, são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal, enquanto que os compostos quaternários (cloridrato de trospium) não são bem absorvidos e têm pouca absorção pelo sistema nervoso central (Guay, 2003). Apresentam efeitos colaterais sistêmicos uma vez que o bloqueio dos receptores muscarínicos não ocorre apenas na bexiga, onde

predominam receptores M_2 e M_3 . Dentre as principais queixas dos pacientes destacam-se boca seca, tontura, constipação, sonolência e turvação visual.

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Os sintomas do baixo trato urinário em homens sempre estiveram associados à hiperplasia prostática benigna. Acreditava-se que o aumento da massa prostática e, conseqüentemente, a obstrução do fluxo urinário fosse a base para as alterações miccionais. Entretanto, nem todos os homens com bexiga hiperativa apresentavam hiperplasia prostática; além disso, alterações miccionais também ocorrem em mulheres. Sabe-se que a patofisiologia dos sintomas do baixo trato urinário é multifatorial; muitos alvos terapêuticos têm sido explorados, não somente para o entendimento como também para o tratamento desta desordem. Sendo assim, atualmente, substâncias que atuem na via NO-GCs-GMPc, agonistas beta-adrenérgicos, ativadores dos canais de potássio tem ganho grande enfoque para o tratamento desta desordem.

Até o presente momento, nenhum estudo relata o emprego da inibição crônica da atividade da NOS com o objetivo de se estudar o papel do NO na bexiga urinária. O modelo proposto neste presente trabalho, de inibição crônica da atividade da NOS pelo L-NAME, nos possibilitará a compreensão da função do NO nas alterações funcionais e morfológicas do músculo detrusor em bexiga urinária de rato. O modelo da inibição crônica da NOS pelo L-NAME, primeiramente descrito por Ribeiro et al. (1992) e Baylis et al. (1992) em ratos, tem sido amplamente descrito na literatura, e apresenta grandes facilidades metodológicas no estudo da função do NO em diversos tecidos.

OBJETIVO

Objetivo Geral

Investigar os efeitos da inibição crônica da sintase de NO na reatividade do músculo liso detrusor de ratos em resposta a agonista muscarínico e α -adrenérgico, assim como à estimulação elétrica. Tivemos também como objetivo analisar a morfologia da bexiga urinária, e quantificar a atividade da NOS, os níveis de fosfato de inositol e o número de afinidade de receptores muscarínicos.

Objetivos Específicos:

- Investigar as alterações funcionais em detrusor isolado após tratamento crônico com L-NAME através de curvas concentração resposta a agonista muscarínico (carbacol), β -adrenérgico (isoproterenol, metaproterenol e BRL 37-344), cloreto de cálcio e potássio, e estimulação elétrica.
- Investigar as alterações bioquímicas após tratamento crônico com L-NAME através da dosagem de nitrito/nitrato, atividade da sintase de óxido nítrico e avaliação do acúmulo de fosfatos de inositol total;
- Investigar as alterações nos receptores muscarínicos através de binding de saturação;
- Investigar as alterações morfológicas quantitativas dos músculos detrusor e trígono.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos Wistar machos (8-12 semanas), pesando entre 220, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP, Campinas, SP). Os ratos ficaram alojados no biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia – UNICAMP, mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), a uma temperatura de 25°C, em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê Ética em Experimentação Animal (CEEAA-IB/UNICAMP), protocolo nº 962-1

2.2 Tratamento Crônico com L-NAME

O tratamento crônico com L-NAME foi conduzido de acordo com Ribeiro *et al.* (1992). O L-NAME foi dissolvido em água a uma concentração de 400 mg/mL oferecidos através da ingestão hídrica, em uma dose aproximada de 20 mg/rato/dia (L-NAME) por 7, 15 e 30 dias tratamento. Foram controlados, semanalmente, o peso corpóreo e pressão arterial em todos os grupos estudados. Os animais do grupo controle foram submetidos às mesmas condições experimentais, porém receberam apenas água.

2.3 Medida da Pressão Arterial

As pressões arteriais dos grupos controle e L-NAME foram determinadas antes de se iniciar o tratamento, sendo consideradas como médias basais. Iniciado o tratamento, as pressões arteriais foram determinadas semanalmente. Para a medida das pressões artérias, os animais foram colocados em gaiolas aquecidas à 37°C por 20

minutos, para provocar dilatação dos vasos caudais. Após este período, os animais foram colocados em um contensor modelo 1262 (Narco Bio Systems, Texas, USA). Na cauda do animal adaptava-se um manguito acoplado a um sistema de microfones capaz de captar sinais de 0.5 mv de amplitude. As oscilações foram registradas através do osciloscópio modelo CS 4025 (Kenwood Corporation, Japão).

O manguito foi inflado até 200 mmHg, de modo a não se visualizarem as pulsações. Logo após era desinsuflado até reiniciarem as pulsações, e o valor da pressão arterial era lido no manômetro. As medidas foram consideradas válidas quando não houve variações significativas, isto é, acima de 2 mmHg (Zatz, 1990).

2.4 Ensaio da atividade da NOS

A medida de atividade de NOS foi baseada na conversão de [³H] L-arginina para [³H] L-citrulina pela NOS conforme proposto por Hiki et al. (1992). Os tecidos foram homogeneizados com homogeneizador de teflon-vidro na presença de tampão Tris-HCl 50 mM, (pH 7,4) contendo L-citrulina (1 mM), leupeptina (10 µg/ml), inibidor de tripsina (10 µg/ml), aprotinina (2 µg/ml) e PMSF (1 mM), 5 volumes/g tecido. Os homogenatos foram centrifugados à 12000 g por 10 minutos à 4°C e os sobrenadantes foram passados em colunas contendo 0.6 ml de resina Dowex (troca iônica) para a retirada da arginina endógena. Cinquenta microlitros dos eluídos foram usados na incubação (37°C por 15 minutos) em um volume final de 100 µL de reação contendo CaCl₂ (1 mM), calmodulina (CaM, 1 µg/mL), FAD (10 µM), tetrahidrobiopterina (3 µM), NADPH (2 mM) e L-arginina/L-[³H]arginina (100 µM, 100.000 cpm),

preparados em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) contendo L-valina (1 mM). Em paralelo, controles farmacológicos foram realizados utilizando-se EGTA (1 mM) (omitindo-se o CaCl_2 para a determinação da atividade da iNOS) ou L-NAME (1 mM) no meio de incubação.

A atividade de NOS dependente de Ca^{2+} foi calculada como a diferença entre as que continham Ca^{2+} e EGTA no meio de incubação. A reação foi interrompida com 1 mL de tampão à 4°C HEPES (20 mM, pH 5.4 contendo EGTA 1 mM e EDTA 1 mM). Os conteúdos totais dos tubos onde foram realizados os ensaios foram transferidos para colunas contendo 0.6 mL de resina Dowex (equilibrada com tampão HEPES; pH 5,4) para separar a [^3H] L-arginina da [^3H] L-citrulina formada.

Os volumes eluídos foram coletados em viais de cintilação e 10 mL de líquido de cintilação foram adicionados. A medida da radioatividade foi realizada em contador β . As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976). A quantidade de citrulina produzida em 15 min é calculada como:

$$\text{pmol citrulina} = 1000 \times (\text{cpm}_{\text{amostra}} - \text{cpm}_{\text{branco}}) / (\text{cpm}_{\text{TC}} - \text{cpm}_{\text{branco}})$$

O valor obtido deve ser corrigido pelo tempo de incubação e pela quantidade de proteína em 50 μL de homogenato. A atividade da NOS foi expressa como picomoles de citrulina por minuto por miligrama de proteína (pmol L-cit/min/mg).

2.5 *Determinação da formação dos fosfatos de inositol (mono-, bi- e trifosfato de inositol) em bexiga*

A bexiga de rato (aproximadamente 70-90 mg) foi pesada, seccionada em pequenos fragmentos e incubada em líquido nutritivo Krebs (37°C, 10 minutos), e, a seguir, foi adicionado 3 μCi [^3H] mio-inositol (80 minutos) e posteriormente cloreto de lítio (LiCl , 10 mM, 30 minutos). Após esse período, o tecido foi incubado na ausência (para determinação do nível basal de fosfatos de inositol) e na presença de carbacol (1 nM a 1 mM), por 40 minutos. Em algumas amostras, o antagonista muscarínicos p-fluoro-hexahydro-sila-diphenidol (pfHHSiD, 100 μM), em concentração próxima de seu valor de pK_i (descrito na literatura por Doods et al., 1993 e Dong et al., 1995), foi adicionado 5 minutos antes do carbacol. A seguir, o tecido foi retirado e lavado com líquido nutritivo Krebs.

Para a extração dos fosfatos de inositol (mono-, bi- e trifosfato de inositol) foi utilizado o método de Fox et al. (1985), com algumas modificações. A bexiga foi homogeneizada em 2 ml de metanol:clorofórmio (2:1 v/v), empregando-se homogenizador *Ultra-Turrax*, a 9.500 rpm, 3 vezes, 30 segundos. Em seguida, ao homogenato foi acrescido 0,62 ml de clorofórmio e 0,93 ml de água destilada, centrifugado a 2.000 g (5 minutos, 4°C), para separação das fases orgânica (fosfolipídeos) e aquosa (fosfatidilinositóis).

Os fosfatos de inositol foram separados segundo o método descrito por Ascoli et al., (1989) com algumas modificações. Assim, a fase aquosa contendo os fosfatidilinositóis foi incubada com 1 ml de resina de troca iônica (Dowex AG1-X8, 200-400 mesh) por 30 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação em vortex.

Decorrido esse período foi centrifugada a 2.000 g (5 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi descartado. A resina foi tratada, sequencialmente, com 4 ml de mio-inositol (10 mM) e com 2 ml de uma solução de borato de sódio 5 mM/formiato de sódio 60 mM para a eluição de mio-inositol livre (inespecífico) e de glicerofosfo-inositol, respectivamente. Em seguida, a resina foi incubada com 2 ml de uma solução de ácido fórmico 0,1 M/formiato de amônio 1 M (30 minutos, temperatura ambiente) e sob agitação em vórtex. Decorrido esse período, a resina foi centrifugada (1.000 g, 5 minutos, 4°C) e os fosfatos de inositol foram eluídos. Alíquotas de 1 ml do sobrenadante foi colocado em frascos contendo 5 ml de líquido de cintilação e a radioatividade determinada em contador β (LS 6500 IC, Beckman). O nível basal de fosfatos de inositol (dpm/mg de tecido) foi determinado e os demais valores obtidos foram expressos em relação ao basal.

2.6 Ensaios de saturação para receptor muscarínico para determinação dos parâmetros de número de receptores (B_{max}) e afinidade (K_D) em bexiga

Os animais do grupo controle e tratados foram mortos e exanguinados. A cavidade abdominal foi aberta e a bexiga foi removida e limpa com tampão Tris-HCl (pH=7,4), contendo $MgCl_2$ 5mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM e sacarose. A seguir os tecidos foram cortados e homogeneizados em “Ultra-Turax” (T25, Ika Labortechnik) a 9500 rpm , 5 vezes, por trinta segundos, a intervalos de 1 minuto. Todos os procedimentos foram realizados a 4°C. O homogenato foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi filtrado em dupla camada de gaze e o pellet foi novamente ressuspensionado com tampão, homogeneizado e centrifugado. O sobrenadante

foi centrifugado à 37000 rpm, por 60 minutos a vácuo. O precipitado foi ressuspendido no tampão acima descrito sem a adição de sacarose, com auxílio de homogeneizador “Dounce”, à 4°C e as membranas recém preparadas foram utilizadas para dosagem de proteína e para o ensaio de saturação.

Dosagem de proteína

Nos ensaios com radioligante, a concentração de proteína foi determinada, pelo método de BRADFORD (1976), empregando-se suspensão de membranas diluídas (1:100) em tampão de ensaio Tris-HCl (pH 7,4). A albumina bovina foi utilizada como padrão e a concentração de proteína foi determinada através de um leitor de microplacas (Multiskan EX, Labsystems, USA), lidas a uma absorbância de 620 nm. Os ensaios foram feitos em duplicata.

Ensaio de Saturação

Os ensaios de saturação foram realizados pela metodologia descrita por Sales et al. (1997), com algumas modificações. Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio revestidos com albumina bovina na concentração de 0,1 %. A cada tubo foi adicionado: alíquota de membrana (200 µg proteína/200 µg tampão), 50 µL [³H]-quinuclidinil benzilato ([³H] QNB), com atividade específica de 42,0 Ci/mmol, nas concentrações de 0,05 a 8 nM, na ausência (ligação total) e presença (ligação inespecífica) de 50 µL atropina 1 mM e 200 µL tampão Tris-HCl descrito anteriormente, incubados à 30°C, por 60 minutos. Os ensaios foram feitos em duplicata e a vácuo em filtros Whatman GF/B. Os filtros foram lavados 3 vezes com 1 mL de PBS gelado e transferidos para frascos contendo 5 mL de líquido de cintilação

(OptiPhase HiSafe 3, Perkin Elmer). A radioatividade foi lida em dpm em um contador β (LS 6000 IC, Beckman).

2.7 *Estudo morfológico quantitativo do músculo liso trígono e detrusor*

Microscopia óptica

A bexiga foi removida e lavada com solução salina. A seguir o tecido foi imerso em solução de Bouin por 24 horas. Após esse período, os tecidos foram lavados em água corrente várias vezes e, posteriormente, imersos em álcool 70% para o processamento. Os tecidos foram processados de acordo com os métodos rotineiros para microscopia óptica. A primeira etapa foi à desidratação, seguida de diafanização e impregnação. O meio de inclusão empregado foi a parafina. A bexiga foi dividida nos seus respectivos constituintes, músculo trígono e detrusor, e incluídos na posição vertical. Cortes histológicos de 5 μ m de espessura foram submetidos à coloração pela hematoxilina e pela eosina (HE).

Avaliação Histológica Quantitativa

Dos cortes histológicos corados em HE foram capturadas de 2 a 4 imagens utilizando-se câmara fotográfica digital Canon (PowerShot G5, 5,0 megapixels) em microscópio óptico comum (Zeiss, Alemanha) com objetiva de 10 vezes e ampliação digital de 1,25 vez, tanto do músculo trígono como do detrusor.

Imaginando-se a circunferência vesical como o mostrador de um relógio, foram selecionadas as regiões correspondentes às 12, 3, 6 e 9 horas. Em cada região foram

feitas as seguintes medidas a partir da região mais profunda do epitélio: espessura total da parede, espessura da submucosa e espessura da camada muscular própria.

Após capturar e salvar as imagens em extensão “.jpg”, as mesmas foram trabalhadas no programa *ImageLab-2000*, através de sua função “cálculo de reta”. Após adequada calibração, com a distância calculada em micrômetro (μm), selecionou-se em cada imagem o ponto inicial e o final para cada medida da seguinte forma, tanto do músculo liso detrusor como do trígono:

- membrana basal do epitélio e primeira célula do feixe muscular – medida da submucosa;
- primeira e última células do feixe muscular – medida da espessura da camada muscular;
- membrana basal do epitélio e término do tecido conjuntivo perivesical ou última célula do feixe muscular – medida da espessura total da parede.

2.8 Dosagem dos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NO_x)

Separação do plasma

Os animais foram anestesiados com halotano e amostras de sangue dos animais controle e tratados com L-NAME foram coletadas da aorta abdominal, em tubos contendo citrato ou EDTA (conforme instrução do fabricante), centrifugados à 1.000 g por 10 minutos, à 4°C, para separação do plasma. As amostras de plasma foram aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C até a realização das dosagens.

Nitrito/Nitrato (NO_x)

As amostras de plasma foram ultra-filtradas usando-se tubos de ultra-filtração (Millipore) que permitem que moléculas com peso molecular entre 10 a 30 kDa sejam filtradas. Os filtros foram lavados com água ultra-pura antes da filtração. A ultrafiltração reduz a absorbância devido à presença de hemoglobina e “melhora” a formação da cor usando o reagente de Griess. O preparo das amostras, dos padrões, dos cofatores e do reagente de Griess foi realizado de acordo com a descrição do kit empregado (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicatas usando-se diferentes diluições da amostra.

2.9 Ensaios funcionais

2.9.1 Isolamento e montagem dos tecidos

Para o isolamento do músculo liso detrusor os animais foram anestesiados com halotano 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 músculo detrusor foi obtido retirando-se a porção da base da bexiga; a porção remanescente foi aberta de modo a formar um retângulo de, aproximadamente, 2x2x10 mm para posterior obtenção dos “strips”. Os tecidos foram montados em câmaras de incubação de tecido (10 ml volume) preenchidas com a solução Krebs-Henseleit, continuamente gaseificadas com O₂:CO₂ (95:5 %), mantidas à temperatura de 36,5°C e pH entre 7,3 a 7,5. Os tecidos foram lavados com solução nutritiva Krebs-Henseleit a 37°C, 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 aplicada aos tecidos (20 mN) foi periodicamente ajustada até a estabilização, e solução nutritiva trocada a cada 15 minutos 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 5.0, AD Instruments, Austrália). A viabilidade dos tecidos foi verificada através da contração produzida pela adição ao banho de uma solução de Krebs modificada ao banho, em que 80 mM NaCl foi substituído de forma equimolar por KCl. Somente aqueles tecidos que responderam ao KCl foram aproveitados e utilizados nos protocolos experimentais.

2.10 Protocolos Experimentais

2.10.1 Avaliação do efeito agudo e crônico do L-NAME sobre o efeito contrátil ao agonista muscarínico em detrusor isolado

Foram realizadas curvas concentração-efeito ao agonista pleno carbacol (1 nM- 30 µM) em ratos controles e tratados cronicamente com L-NAME por 7, 15 e 30 dias de tratamento.

Em alguns experimentos procuramos investigar se a adição aguda de L-NAME alterava a resposta contrátil ao carbacol. Para tanto, foram realizadas curvas concentração-efeito ao carbacol (1 nM- 30 µM) em ratos *naive*, na ausência e na presença de L-NAME *in vitro* (100 µM), incubado por 30 minutos. A curva

concentração-efeito do carbacol obtida na ausência do inibidor da NOS foi considerada como controle.

Ao final de cada experimento, os segmentos foram pesados para se corrigir o efeito máximo por peso úmido de tecido, sendo o $E_{\max}$ expresso em mN/mg tecido úmido. Foram determinadas a potência (pEC_{50}) e a resposta máxima ($E_{\max}$).

2.10.2 Avaliação dos efeitos relaxantes dos agonistas β -adrenérgicos em detrusor isolado de ratos tratados com L-NAME por 30 dias

O relaxamento aos agonistas β -adrenérgicos foi avaliado em músculo detrusor pré-contraído com KCl (80 mM). Após atingir a resposta contrátil máxima, foram construídas curvas concentração-resposta ao agonista β -adrenérgico não seletivo, isoproterenol (100 pM-10 μ M), β_2 -seletivo, metaproterenol (10 nM-100 μ M) e β_3 -seletivo, BRL 37-344 (100 pM-100 μ M) em ratos controles e tratados com L-NAME por 30 dias.

2.10.3 Avaliação da resposta contrátil ao $CaCl_2$ em detrusor isolado de ratos tratados com L-NAME por 30 dias

Para a avaliação dos efeitos diretos do $CaCl_2$, utilizou-se o protocolo experimental descrito por Lagaud *et al.* (1999). Inicialmente, os tecidos foram contraídos com KCl (80 mM) para determinação da contração máxima dos mesmos. Em seguida, a solução nutritiva de Krebs foi substituída por Krebs desprovido de cálcio, em presença de EGTA (1 mM), para a total remoção do cálcio do meio. Em seguida, foi adicionado ao banho 1 μ M de carbacol para a remoção do cálcio do retículo

sarcoplasmático. Os tecidos foram novamente lavados com Krebs desprovido de cálcio contendo EGTA, e em seguida foram incubados por 20 minutos com o inibidor da Ca^{2+} -ATPase, o ácido ciclopiazônico (CPA; 10 μM). Após este período, o Krebs foi substituído por uma solução de KCl (80 mM) desprovida de cálcio. O CPA foi adicionado novamente ao banho, e após 15 minutos, curvas concentração-efeito ao CaCl_2 (0,3 – 30 mM) foram construídas.

2.10.4 Resposta contrátil ao KCl em músculo liso detrusor de ratos tratados com L-NAME por 30 dias

Foram realizadas curvas concentração-efeito não cumulativa (20- 200 mM) em músculo liso detrusor de ratos controle e tratados com L-NAME por 30 dias. Para a realização destas curvas foi preparada uma solução estoque de KCl 4 M. A contração ao KCl foi expressa em mN.

2.10.5 Curva frequência-resposta em músculo liso detrusor de ratos tratados com L-NAME por 30 dias

O músculo liso detrusor de ratos controles e tratados cronicamente com L-NAME por 30 dias foram isolados e montados em um sistema de ganchos para estimulação elétrica. Os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 80 V, duração de 0,2 milissegundos por 10 segundos nas frequências de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 Hz com intervalo de 2 minutos entre os pulsos. As curvas frequência-resposta foram construídas na ausência (curva controle) e na presença do antagonista purinérgico não-seletivo suramin (100 μM , 30 minutos) para avaliar a resposta colinérgica após a

estimulação elétrica. Em alguns experimentos adicionou-se o bloqueador dos canais de Na^+ dependente de voltagem, tetrodotoxina (TTX 1 μM , 30 minutos) para averiguar se a contração produzida pela estimulação elétrica era de origem neurogênica.

2.11 Parâmetros Farmacológicos

As respostas contráteis dos agonistas foram medidas em mN e comparadas em relação à resposta do cloreto de potássio (KCl), considerada como sendo 100%. O logaritmo das concentrações molares dos agonistas foi colocado em abscissas e a porcentagem do efeito em ordenadas. Os gráficos foram traçados e analisados através do programa computacional “GraphPad PRISM” (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores de potência e respostas máximas foram calculados pela seguinte equação:

$E = E_{\max} / [1 + (10^c / 10^x)^N + \Phi]$, onde E é elevação do tônus basal, $E_{\max}$ é a máxima resposta que o agonista pode produzir, “c” é o logaritmo da EC_{50} , que é a 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 $E_{\max}$, $\log \text{EC}_{50}$ e o “n” foram feitas utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism, considerando o parâmetro Φ como zero.

2.12 Análise estatística

Os relaxamentos provocados pelos agonistas de adrenoceptores β foram calculados como porcentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M) de um número experimental (n). Para comparações múltiplas de variáveis independentes foi usado o teste de análise de variância (ANOVA-*two way*), seguido pelo teste de Tukey. O programa Instat (GraphPad Software) foi usado para estas análises. Em algumas situações experimentais, usou-se o teste “t” de STUDENT. $P < 0.05$ foi aceito como significativo.

3. RESULTADOS

3.1 *Valores do peso corporal e da pressão sistólica*

A administração prolongada de L-NAME causou aumento significativo da pressão arterial quando comparado à dos animais do grupo controle, sendo este aumento dependente do tempo de administração

Paralelamente, também foi controlado o peso corpóreo dos animais. Não houve diferenças significativas entre os pesos corpóreos dos animais tratados com L-NAME comparados aos do grupo controle. A *tabela 1* ilustra os valores da pressão arterial e do peso corpóreo dos animais do grupo controle e tratado com L-NAME antes e após os tempos de tratamento.

Tabela 1. Valores iniciais e finais do peso corporal e da pressão arterial sistólica em ratos controles e tratados com L-NAME por 7, 15 e 30 dias.

		Peso corporal (g)		Pressão arterial sistólica (mmHg)	
		<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>
7 dias	Controle	219 ± 6	268 ± 7	117 ± 1	116 ± 2
	L-NAME	225 ± 7	262 ± 2	114 ± 1	166 ± 3*
15 dias	Controle	223 ± 3	282 ± 3	122 ± 2	118 ± 3
	L-NAME	198 ± 2	268 ± 2	116 ± 3	170 ± 2*
30 dias	Controle	228 ± 3	342 ± 5	120 ± 1	124 ± 2
	L-NAME	217 ± 5	339 ± 5	114 ± 1	198 ± 1*

Os dados representam média ± erro padrão média para 7-10 animais

* $P < 0.05$ comparado com os respectivos grupos controles.

3.2 Ensaio temporal da atividade da NOS em bexiga urinária de rato

A figura 9 mostra que o tratamento crônico com L-NAME reduziu, significativamente, a atividade da NOS em bexiga urinária de rato aos 7, 15 e 30 dias de tratamento. Na ausência de íons cálcio e adição de EGTA (0,1 mM) no meio de incubação, a atividade enzimática foi significativamente inibida em todos os grupos experimentais, em aproximadamente 86%, confirmando que a conversão de [^3H]-arginina à [^3H]-citrulina foi devida à NOS constitutiva dependente de cálcio. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos L-NAME nos períodos de 7, 15 e 30 dias de tratamento na situação onde se omitiu o cálcio e adicionou-se o EDTA.

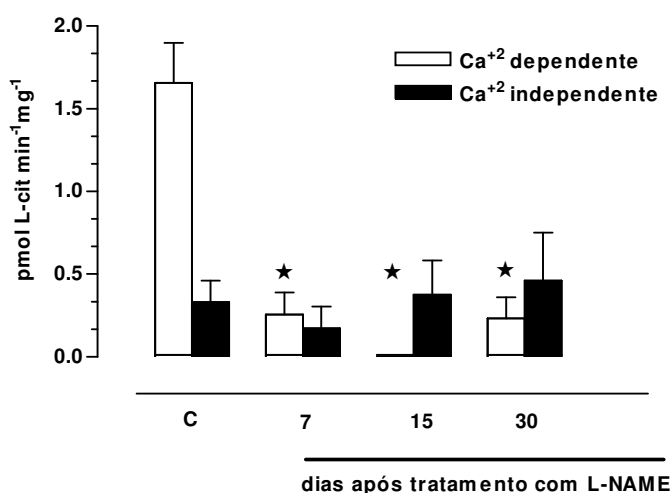


Figura 9. Inibição da óxido nítrico sintase (NOS) pelo tratamento crônico com L-NAME em bexiga urinária de rato. A atividade enzimática da NOS em homogenatos de bexiga urinárias de ratos do grupo controle (C) e tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia) durante 7, 15 e 30 dias. As barras brancas representam a atividade da NOS cálcio-dependente em condições padronizadas para o controle (C) e as barras pretas representam atividade enzimática na ausência de íons Ca^{+2} e presença de EGTA (1 mM). A atividade foi expressa como picomol de citrulina/mg proteína/minuto. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão média, $n = 10$ ratos. * $P < 0.05$ comparado com os respectivos grupos controles.

3.3 Efeito agudo e crônico do L-NAME sobre a resposta contrátil ao agonista muscarínico

Neste protocolo experimental buscamos avaliar se a sensibilidade ao carbacol era influenciada pelo tempo de tratamento com o L-NAME durante os períodos de 7, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram um deslocamento significativo da curva concentração-efeito ao carbacol para a esquerda nos períodos de 15 e 30 dias de tratamento com L-NAME quando comparado aos respectivos grupos controles. O deslocamento foi maior aos 30 dias, com um aumento de, aproximadamente, cinco vezes na potência do agonista (Figura 10 C, tabela 2).

Após os estudos acima realizados, procuramos verificar se à supersensibilidade ao carbacol também era desenvolvida “*in vitro*”. Para isto, curvas concentração-efeito ao carbacol em tecidos de animais virgens de qualquer tratamento foram construídas na presença de L-NAME (100 μ M), incubado por 30 minutos. Não houve alterações nem na resposta máxima nem na potência do carbacol (Figura 10D).

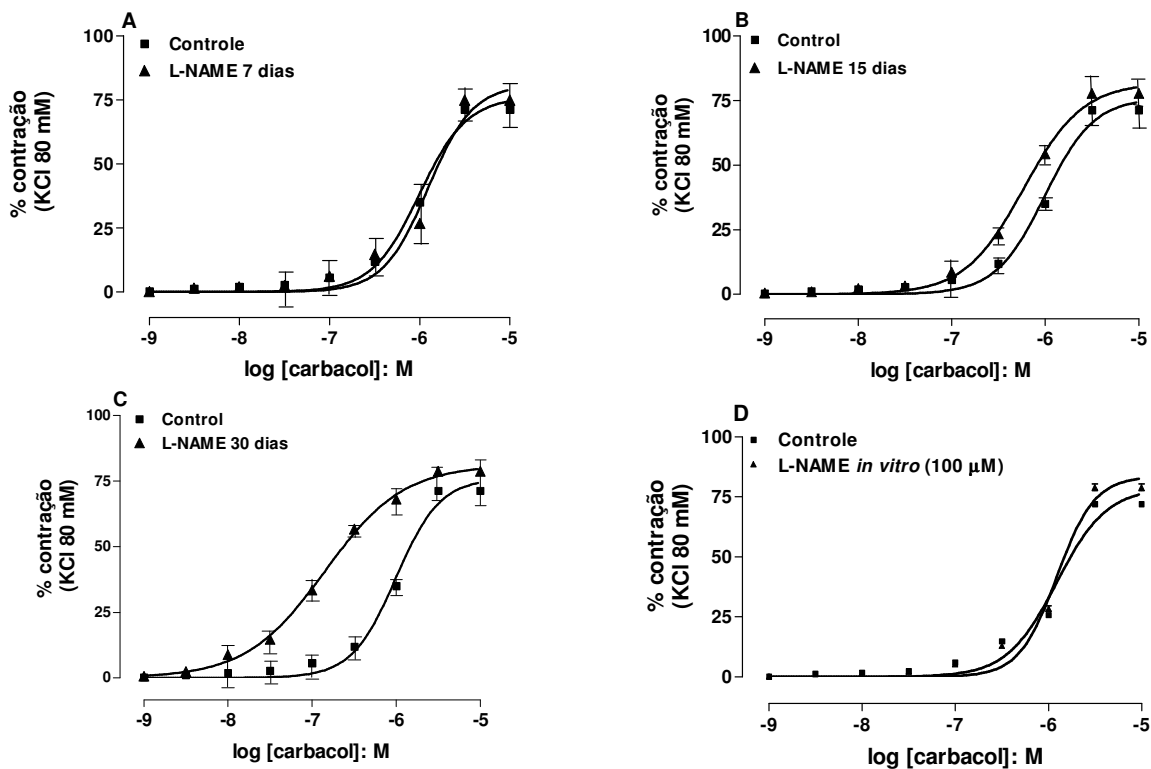


Figura 10. Efeito do tratamento agudo e crônico com L-NAME sobre a ação contrátil do agonista carbacol em músculo detrusor isolado de rato. Curvas concentração-efeito ao carbacol (1 nM- 10 μM) durante 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias de tratamento com L-NAME (20 mg/rato/dia) e após a adição de L-NAME *in vitro* (D; 100 μM, 30 minutos) e os respectivos grupos controles. A contração foi calculada como porcentagem de contração produzida pelo KCl (80 mM), que foi tomada como 100%. Dados representam as médias $\pm$ EPM de 7-10 experimentos.

Tabela 2. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) do carbacol em músculo detrusor isolado de ratos controle e tratados cronicamente com L-NAME por 7, 15 e 30 dias.

	pEC_{50}	Deslocamento	E_{max} (mN/mg tecido úmido)
Controle 7 dias	$5,9 \pm 0,03$		$2,5 \pm 0,03$
LN 7 dias	$5,9 \pm 0,01$	—	$2,5 \pm 0,02$
Controle 15 dias	$5,9 \pm 0,03$		$2,9 \pm 0,02$
LN 15 dias	$6,2 \pm 0,04^*$	2,0	$2,7 \pm 0,12$
Controle 30 dias	$6,0 \pm 0,02$		$2,5 \pm 0,10$
LN 30 dias	$6,8 \pm 0,06^*$	5,4	$2,4 \pm 0,07$

Dados representam média $\pm$ erro padrão média, n=7-10 animais.

* $P < 0,05$ comparado com os respectivos grupos controle

3.4 Dosagem dos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx)

Os níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx) foram dosados no plasma de animais controles e submetidos ao tratamento crônico com L-NAME por 30 dias. Observamos redução de aproximadamente 55% dos níveis plasmáticos de NOx em animais submetidos ao tratamento com L-NAME comparado ao grupo controle (Figura 11).

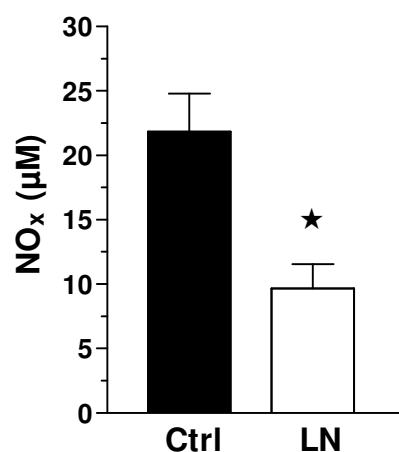


Figura 11. Concentração plasmática de nitrito/nitrato (NOx) em animais controle (Ctrl) ou tratados com L-NAME (LN, 20 mg/rato/dia). Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão média para 6- 8 experimentos. *P<0,05 comparado ao respectivo grupo controle.

3.5 Curva concentração-efeito aos agonistas β -adrenérgicos em ratos tratados com L-NAME por 30 dias

Como o tratamento crônico com L-NAME causou alterações na resposta contrátil ao agonista muscarínico, procuramos investigar se a inibição crônica do NO também proporcionava alterações na resposta relaxante. Para isto foram realizadas curvas-concentração efeito aos agonistas β -adrenérgicos em tecidos pré-contraídos com KCl (80 mM). Podemos observar que o tratamento crônico por 30 dias promoveu deslocamento de, aproximadamente, três vezes para a direita ao agonista β_3 -seletivo, sem alterar as repostas aos agonistas isoproterenol (agonista β -não seletivo) e metaproterenol (agonista β_2 -seletivo) (Figura 12 C, tabela 3).

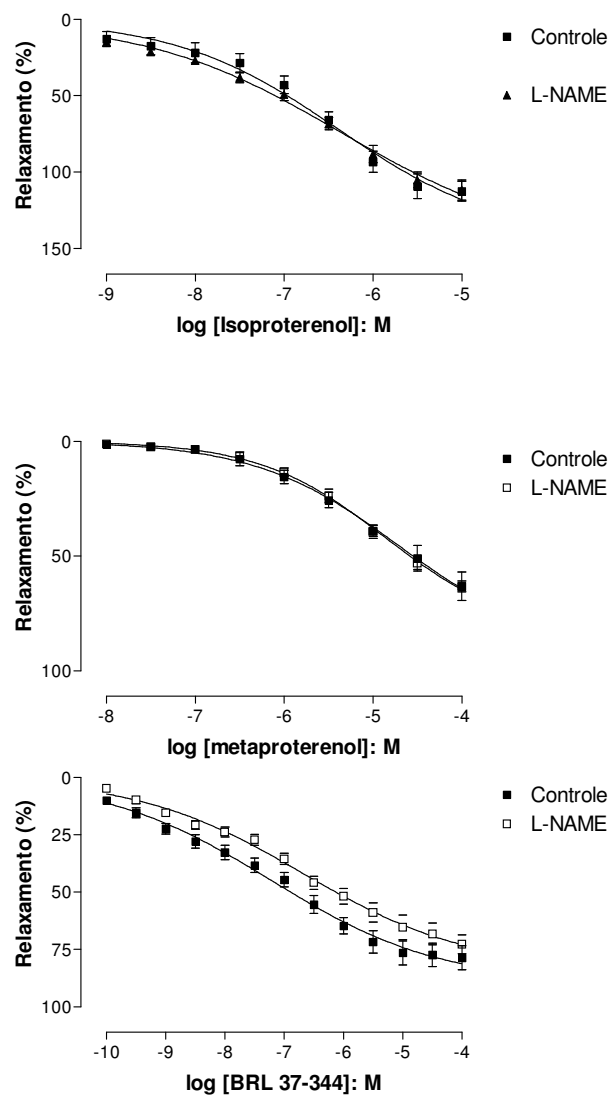


Figura 12. Efeito do tratamento crônico com L-NAME sobre o relaxamento induzido por agonistas (β)-adrenérgicos em músculo detrusor isolado de rato. Curvas concentração-efeito ao isoproterenol (100 pM-10 μ M; painel A), metaproterenol (10 nM- 100 μ M, painel B) e BRL 37-344 (100 pM-100 μ M; painel C) em ratos controle e tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia) durante 30 dias. O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média de experimentos de 5-6 experimentos.

Tabela 3. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) do isoproterenol (agonista β -adrenérgico não seletivo), metaproterenol (agonista β_2 -adrenérgico seletivo) e BRL 34-377 (agonista β_3 -adrenérgico seletivo) em músculo detrusor isolado de rato após pré-contracção com KCl (80 mM).

	pEC_{50}		E_{max}	
	Control	L-NAME	Control	L-NAME
Isoproterenol	6.38 ± 0.19	6.48 ± 0.06	105.72 ± 4.86	103.03 ± 4.98
Metaproterenol	4.70 ± 0.24	4.89 ± 0.08	63.18 ± 6.24	64.74 ± 2.32
BRL 37-344	7.22 ± 0.16	$6.68 \pm 0.16^*$	78.78 ± 5.18	72.81 ± 4.15

Dados representam media $\pm$ erro padrão média, n=5-6 animais.

P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle

3.6 Curvas concentração-efeito ao CaCl_2 em músculo liso detrusor após tratamento crônico com L-NAME por 30 dias

Neste protocolo buscamos avaliar se a sensibilidade ao íon cálcio proveniente do meio extracelular estava modificada nos ratos tratados cronicamente com L-NAME por 30 dias. Podemos observar que o CaCl_2 produziu resposta contrátil concentração-dependente em ambos os grupos. Entretanto, não encontramos diferenças significativas nos parâmetros de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) entre os grupos L-NAME e controle (figura 13, tabela 4). Em alguns experimentos, adicionamos a nifedipina (1 μM , 30 minutos) para assegurarmos que o cálcio que estávamos trabalhando provinha do meio extracelular. Após a adição deste bloqueador, observamos uma redução na resposta máxima de, aproximadamente 83% (figura 13, tabela 4).

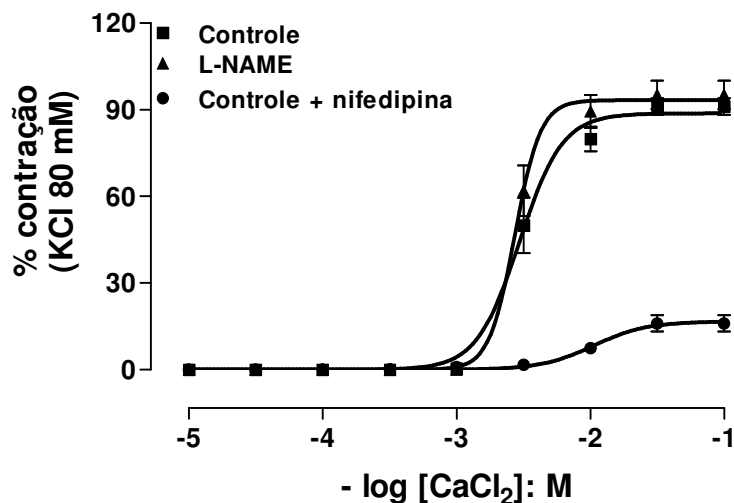


Figura 13. Curva concentração-efeito ao CaCl_2 (0.01-1 mM) em ratos controle e tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia) por 30 dias. Em animais do grupo controle a curva de contração ao CaCl_2 foi também realizada na presença de nifedipina (1 μM , 30 minutos). A contração foi calculada como porcentagem da contração produzida pelo KCl (80 mM), que foi tomada como 100%. Dados representam média $\pm$ erro padrão média, n= 4-6 animais.

Tabela 4. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) do $CaCl_2$ na ausência e presença de nifedipina (1 μM , 30 minutos) em músculo detrusor isolado de rato tratado tratado com L-NAME por 30 dias.

	pEC_{50}	E_{max}
Controle	$2,53 \pm 0,02$	$91,17 \pm 2,92$
L-NAME	$2,56 \pm 0,02$	$95,16 \pm 4,89$
+ Nifedipina (1 μM)	$1,77 \pm 0,07^*$	$16,11 \pm 2,85^*$

Valores expressos como média $\pm$ erro padrão média, n=4-6 experimentos.

* $P < 0,05$ comparado com o respectivo grupo controle

3.7 Curvas concentração-efeito não cumulativa ao KCl em músculo liso detrusor após tratamento crônico com L-NAME por 30 dias

Neste protocolo experimental avaliamos se a inibição crônica de NO alterava a resposta contrátil de agentes que agem independentemente da ativação de receptores.

A adição de KCl (20- 200 mM) produziu resposta concentração-dependente. Pudemos observar que as amplitudes de contração ao KCl não diferiram em relação ao grupo controle em nenhuma concentração utilizada. Sendo assim, como não obtivemos alterações nas amplitudes de contração de ambos os grupo, os dados puderam ser corrigidos pelo KCl (Figura 14).

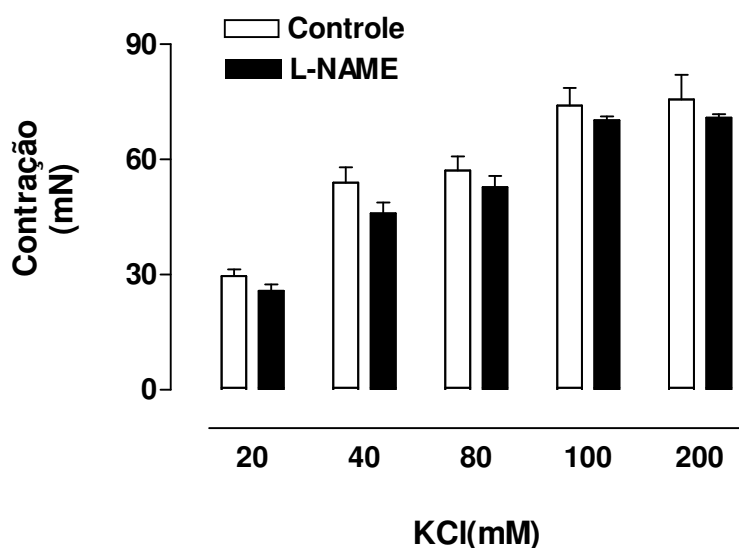


Figura 14. Curva concentração-efeito não cumulativa ao KCl (20-200 mM) em ratos controle e tratados com L-NAME por 30 dias. Os dados foram expressos como amplitude de contração (mN) produzida pelas diferentes concentrações de KCl. Dados representam média $\pm$ erro padrão média, n=4-6 animais.

3.8 Curva frequência resposta em músculo liso detrusor de ratos tratados com L-NAME por 30 dias: efeito da tetrodotoxina (TTX) e suramin

A estimulação elétrica produziu resposta contrátil dependente da frequência em ambos os grupos, sendo que na frequência de 32 Hz obtivemos a resposta máxima. Entretanto, não observamos diferenças significativas entre os grupos controle e L-NAME para as amplitudes de contrações (figura 15). A adição de tetrodotoxina (TTX, 1 μ M, 30 minutos) praticamente aboliu a resposta ao estímulo elétrico, indicando que as contrações produzidas pela estimulação foram de fato oriundas de terminações nervosas.

O suramin é um antagonista purinérgico não seletivo e foi adicionado ao banho para omitir a ação do ATP (componente NANC excitatório) oriundo da estimulação elétrica. Sendo assim, com a adição deste antagonista mantivemos somente a resposta colinérgica. Dessa forma, verificamos que as amplitudes de contrações no grupo controle se reduziram após a adição do suramin, indicando que o ATP age nos receptores pós-juncionais presentes no músculo liso detrusor. Entretanto, a resposta do grupo L-NAME não foi diferente em relação ao grupo controle após a adição de suramin.

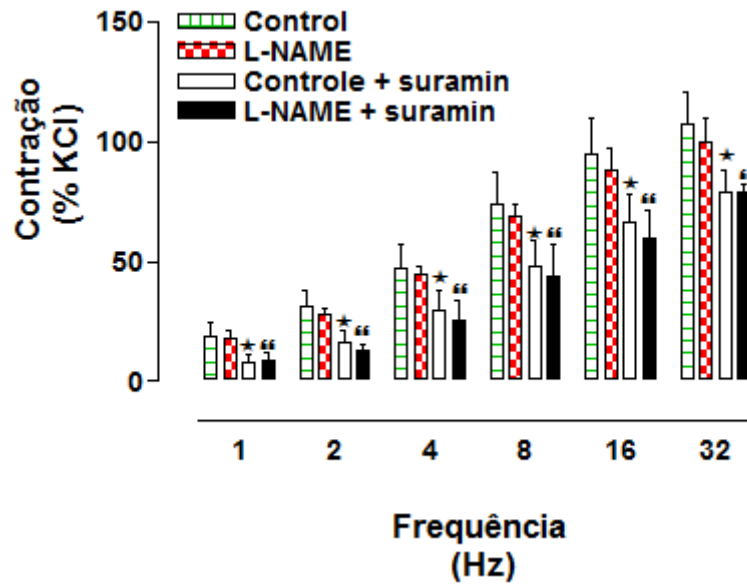


Figura 15. Curva frequência-resposta em músculo liso detrusor isolado de ratos controle e tratados cronicamente com L-NAME. Curva frequência-resposta (1-32 Hz, 80 V, 0,2 msegundos, duração estímulo 10 segundos) em ratos controle e tratados cronicamente com L-NAME (20 mg/rato/dia) na ausência e presença do antagonista não seletivo suramin (100 μ M, 30 minutos). A contração foi calculada como porcentagem da contração do KCl (80 mM), que foi tomada como 100%. Valores expressos média $\pm$ erro padrão média, n=4-6 animais. *, "P<0,05 comparado aos respectivos grupos controle e LN, respectivamente.

3.9 Dosagem do acúmulo dos fosfatos de inositol total em bexiga urinária de rato após estímulo com carbacol

O tratamento crônico com L-NAME por 30 dias não promoveu alterações nos níveis basais de fosfatos de inositol em bexiga urinária de rato ($78,1 \pm 15,5$ dpm/100 mg tecido, n=25) quando comparado ao grupo controle ($69,3 \pm 5,2$ dpm/100 mg tecido, n=20). Entretanto, a adição de carbacol causou um aumento significativo, concentração-dependente, da quantidade de fosfatos de inositol em bexiga urinária de ratos tratados com L-NAME, que foi significativamente maior do que o respectivo grupo controle. Na resposta máxima (100 μ M), a concentração de fosfatos de inositol foi, aproximadamente, seis vezes maior em ratos tratados do que nos controles (Figura 16 A).

A adição prévia do antagonista muscarínico pfHHSiD (antagonista com maior seletividade para os receptores M_3/M_1) praticamente aboliu o acúmulo de fosfatos de inositol após a adição de carbacol (100 μ M) em ambos grupos, indicando a participação do receptor muscarínico do subtipo M_3 no acúmulo de fosfatos de inositol após adição de carbacol (Figura 16 B).

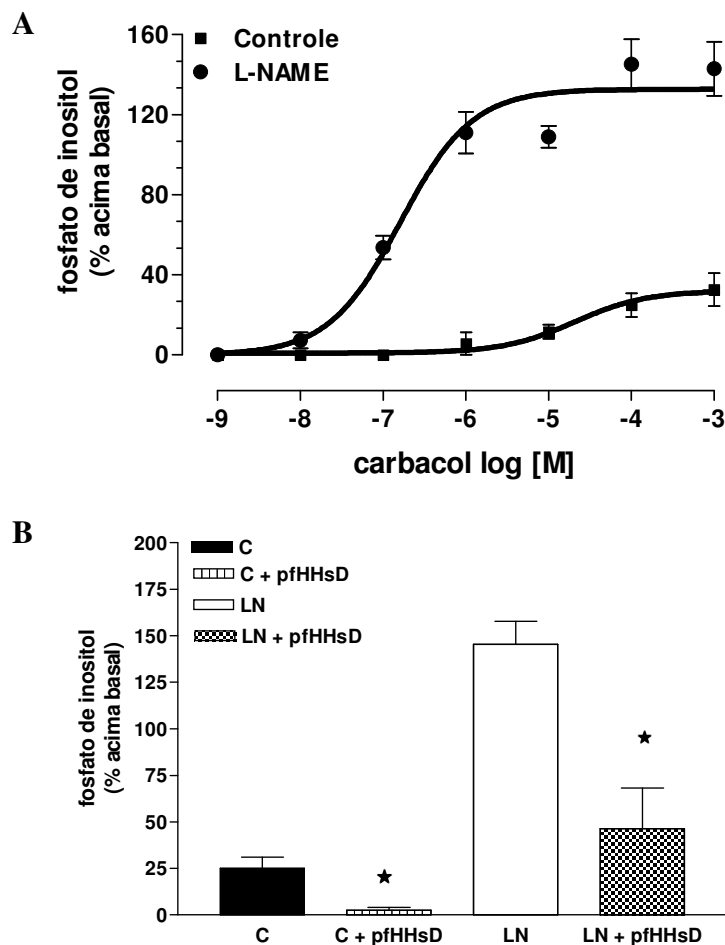


Figura 16. Dosagem dos fosfatos de inositol em bexiga urinária de ratos controle e tratados com L-NAME. (A) Efeito do carbacol (1nM- 1mM) no acúmulo de fosfato de inositol total ($[^3\text{H}]$ fosfato inositol) em bexiga urinária de ratos controle e tratados com L-NAME (LN, 20 mg/rato/dia) durante 30 dias. (B) Efeito do antagonista muscarínico M_1/M_3 , p-fluoro-hexahydrosiladiphenidol (pfHHSd, 100 μM , 10 minutos) no acúmulo de $[^3\text{H}]$ fosfato de inositol induzido pela adição de carbacol (1 mM) em ratos controle (C) e tratados com L-NAME (LN, 20 mg/rato/dia) durante 30 dias. Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão média, n=4-6 experimentos. * $P < 0,05$, comparado aos respectivos grupos controle e LN.

3.10 Determinação dos parâmetros de B_{max} e K_D em bexiga urinária de rato em ensaios de saturação

Os gráficos representativos da ligação total, inespecífica e específica do [^3H] QNB em preparações de membranas de bexigas isoladas de ratos do grupo controle e tratado com L-NAME por 30 dias estão mostradas na figura 17. A ligação do [^3H] QNB às membranas de bexiga de rato de ambos os grupos foi específica e saturável (figura 17 A).

Os gráficos de “Scatchard” da ligação específica do [^3H] QNB de membranas de ratos controle e tratados estão representados na figura 17B. A análise de “Scatchard” revelou a presença de um único sítio de ligação, de alta afinidade em ambos os grupos. Entretanto, podemos observar que nos ratos tratados com L-NAME houve um aumento dos valores de K_D (Tabela 5).

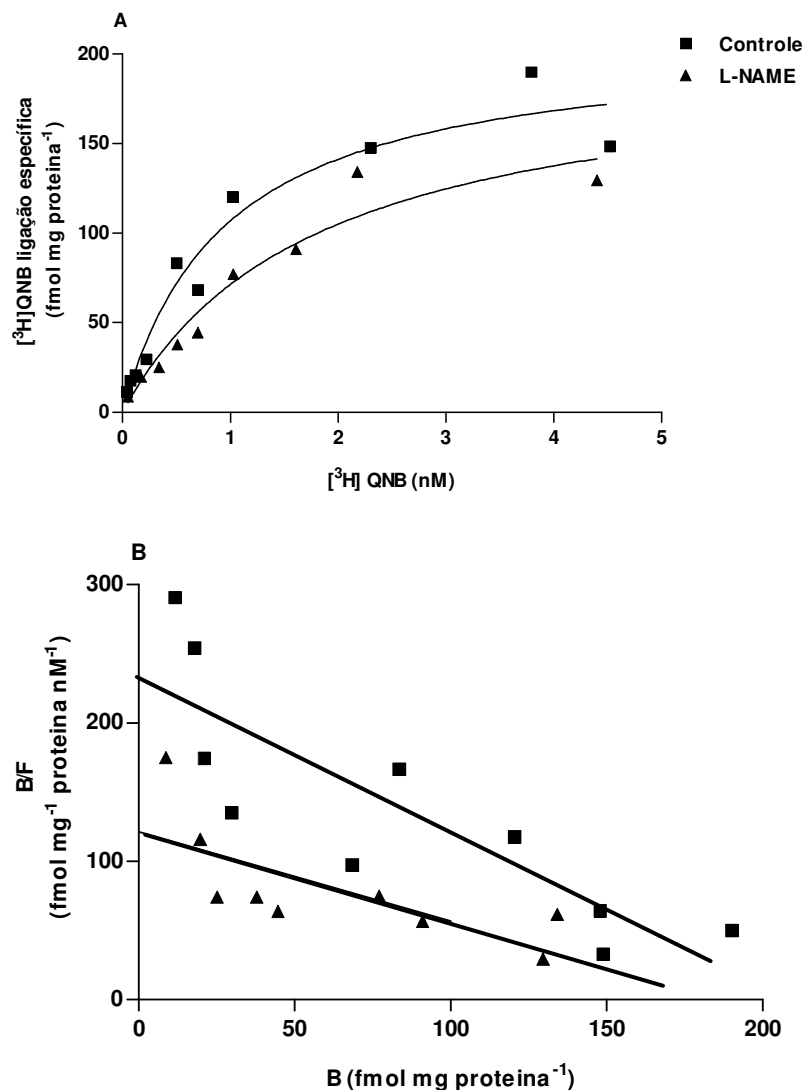


Figura 17. Ensaios de binding de saturação em bexiga urinária de ratos controles e tratados cronicamente com L-NAME. (A) Gráfico relativo à ligação total, inespecífica e específica do $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (30°C, 60 minutos) em membrana de bexiga isolada de rato controle e tratado com L-NAME (20 mg/rato/dia) durante 30 dias. (B) Gráfico de Scatchard relativo à ligação específica do $[^3\text{H}]\text{QNB}$ em membrana isolada de rato. “B” representa a ligação específica e “F” representa a concentração livre do radioligante. Gráficos representativos de quatro experimentos em duplicata.

Tabela 5. Valores da constante de dissociação (K_D) e da densidade de receptores muscarínicos (B_{max}) em preparações de membranas de bexiga de ratos de animais do grupo controle e tratados com L-NAME (30 dias).

	Controle	L-NAME
K_D (nM)	$0,9 \pm 0,14$ (4)	$2,1 \pm 0,34$ *(3)
B_{max} (fmol/mg proteína)	$234,07 \pm 47,5$ (4)	$221,3 \pm 46,7$ (3)

Valores expressos como média $\pm$ erro padrão média.

*P<0,05 comparado ao grupo controle.

3.11 *Análise histológica quantitativa de músculo liso detrusor e trígono de ratos tratados com L-NAME por 30 dias*

A medida das espessuras das porções da bexiga de ratos tratados com L-NAME revelou que no músculo liso detrusor não houve alterações na espessura das camadas submucosa e muscular (Tabela 6). Entretanto, no músculo liso trígono, o tratamento com L-NAME aumentou significativamente a espessura da camada muscular em aproximadamente 28 % quando comparado ao respectivo grupo controle. A espessura da camada submucosa não apresentou modificações nesta porção da bexiga (Tabela 6).

Tabela 6. Análise morfométrica das camadas total, muscular e submucosa dos músculos lisos detrusor e trígono de ratos controle e tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia) durante 30 dias.

Camadas	Detrusor (µm)		Trígono (µm)	
	Controle	L-NAME	Controle	L-NAME
Total	1194.5 ± 73.09	1098.3 ± 67.72	705.73 ± 19.56	861.47 ± 21.85*
Muscular	610.75 ± 37.18	658.67 ± 32.24	526.89 ± 24.29	677.85 ± 30.49*
Sub-mucosa	547.0 ± 66.36	494.89 ± 56.15	176.90 ± 12.47	183.20 ± 17.11

Valores expressos como média ± erro padrão da média, (n=10 experimentos).

*P<0,05 comparado ao respectivo grupo controle.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho é o primeiro a mostrar que a deficiência crônica de NO aumenta as contrações mediadas pelos agonistas muscarínicos, efeito este acompanhado pelo aumento da constante de dissociação (K_D) e pelos níveis de fosfato de inositol. Além disso, observamos que o tratamento crônico com L-NAME diminuiu o relaxamento mediado pela ativação dos receptores β_3 -adrenérgicos. Nossos dados histológicos mostram aumento da espessura da camada do músculo liso trígono sem alterações no músculo liso detrusor. Não foram observadas alterações nas contrações induzidas pelo KCl, CaCl_2 e pela estimulação elétrica.

Evidências mostram que a bexiga hiperativa está relacionada com aumento da sensibilidade do músculo liso detrusor (Chapple *et al.*, 2002; Stevens *et al.*, 2007). Em bexigas hiperativas de humanos, alguns pesquisadores verificaram um aumento da sensibilidade do músculo liso detrusor aos agonistas muscarínicos (Saito *et al.*, 1993; Chess-Williams, 2002; Chess-Williams, 2004). Alguns possíveis mecanismos para esse aumento da sensibilidade aos agonistas muscarínicos incluem aumento da densidade dos receptores muscarínicos e/ou alteração na sinalização intracelular. Está bem estabelecido que a acetilcolina ativa os receptores muscarínicos do subtipo M_3 através dos segundos mensageiros IP_3 e DAG (Chess-Williams, 2002). Nossos dados funcionais mostram que o tratamento com L-NAME entre os períodos de 7-30 dias produziu aumento da sensibilidade ao agonista carbacol, sendo este aumento significativo aos 15 e 30 dias em relação ao grupo controle.

Nossos dados de atividade da NOS mostram que a partir dos sete dias de tratamento com L-NAME a enzima estava inibida em, aproximadamente, 86%. Entretanto, apesar desta inibição podemos observar alterações funcionais somente aos 15 e 30 dias de tratamento, mostrando que o aumento da sensibilidade se dá devido à

inibição crônica de NO. Além disso, a adição *in vitro* de L-NAME nas cubas (100 μ M) não produziu alterações na resposta ao carbacol. A remoção de Ca^{+2} (e adição de EGTA) ao meio de incubação reduziu em 80 % a atividade da NOS tanto no grupo controle como no tratado, confirmando que a conversão da [^3H]-arginina em [^3H]-citrulina se dá, principalmente, pelas NOS constitutivas, sem envolvimento da iNOS. A presença desta última isoforma foi detectada somente em bexigas urinárias submetidas à condições inflamatórias (Poljakovic *et al.*, 2001; Felsen *et al.*, 2003).

No nosso estudo observamos que a estimulação *in vitro* de bexigas urinárias com carbacol (100 μ M) promoveu um acúmulo dos fosfatos de inositol seis vezes maior nos grupo tratado com L-NAME (30 dias) quando comparado ao grupo controle. Além disso, após a adição do antagonista pffHSi, um antagonista com maior seletividade para os receptores M_1/M_3 , observamos a inibição do acúmulo dos fosfatos de inositol pelo carbacol, sugerindo a participação dos receptores muscarínicos M_3 no processo de contração da bexiga. Esses dados reforçam a idéia de que a inibição crônica de NO promove uma supersensibilidade pós-juncional frente aos agonistas muscarínicos, visto que a potência ao agonista carbacol estava aumentada nos ratos tratados. Altas concentrações de íons potássio despolariza a membrana e ativa canais de cálcio do tipo L, levando ao aumento das concentrações deste íon e à ativação das proteínas contráteis (Andersson and Arner 2004). Neste presente estudo a contração frente ao KCl exógeno em ratos tratados com L-NAME não se mostrou alterada em comparação aos ratos não tratados, indicando que o aumento da corrente de cálcio não contribui para a supersensibilidade da bexiga sob condições de inibição crônica de NO. Nossos dados de ensaio de saturação revelam que o valor de K_d aumentou nos ratos tratados com L-NAME sem alterar o número de receptores (B_{max}). Estudos de binding utilizando [^3H]

N-metilescopolamina realizados na bexiga urinária e na glândula salivar mostram que ratos tratados cronicamente com oxibutinina (antagonista muscarínico), por via oral, houve aumento dos valores de Kd nas glândulas salivares, bexiga, sendo que o Bmax diminuiu somente na glândula salivar. Além disso, a secreção salivar induzida pela estimulação com pilocarpina diminuiu. Estes dados mostram que o uso crônico do antagonista muscarínico altera a afinidade aos receptores (Oki, 2004, 2006).

O relaxamento do músculo detrusor durante a fase de enchimento se dá, principalmente, pela ativação de receptores β -adrenérgicos (Anderson & Arer, 2004). No nosso estudo, o isoproterenol, metaproterenol e BRL 37-344 (agonista não seletivo e β_2 e β_3 - seletivo, respectivamente) produziu relaxamento concentração dependente, sendo a ordem de potência BRL 37-344 > isoproterenol > metaproterenol. Nossos dados mostram que o relaxamento produzido pelo receptor β_3 -adrenérgico se mostrou alterado nos ratos tratados com L-NAME por 30 dias. Estes dados sugerem que a inibição crônica do NO pode interferir no relaxamento produzido por este subtipo de receptor, desde que a adição de L-NAME *in vitro* não promoveu alteração na resposta a este agonista. Não existem trabalhos vinculando o papel do NO e o relaxamento induzido por agonistas beta no baixo trato urinário; entretanto, em outros tecidos, como no endotélio de aorta de rato e nas artérias coronárias de humanos, assim como no miocárdio, a ativação do subtipo β_3 pelo agonista BRL 37344 ou CL 316-243 induziu resposta celular através da ativação da NOS (Gauthier *et al.*, 1998; Trochu *et al.*, 1999; Dessy *et al.*, 2004) fosforilação ou translocação da eNOS (Brixius *et al.*, 2004). Estudos prévios mostram grande variabilidade dos valores de potência dos agonistas não seletivos (isoproterenol), β_2 (terbutalina, procaterol) e β_3 seletivo (BRL 37344, SR 58611A, CGP 12,177, CL 316243) em músculo liso detrusor de rato (Yamazaki *et al.*,

1998; Longhurst and Levensky, 1999; Moore *et al.*, 2002; Frazier *et al.*, 2006). Estas discrepâncias nos valores de pEC₅₀ podem ser explicadas devido à diferentes metodologias empregadas, como medida do relaxamento em tecidos pré-contráidos com KCl ou carbachol ou ambos agentes juntos; linhagem de rato (Wistar Sprague-Dawley) e presença ou não de bloqueadores da recaptação neuronal.

Contrações espontâneas aumentadas do detrusor são observadas em preparações *in vitro* e em cistometria *in vivo*. Foi visto em experimentos *in vitro* que a atividade espontânea está aumentada tanto em pacientes com diagnóstico de bexiga hiperativa e modelos animais de obstrução parcial da uretra (Kinder *et al.*, 1987; Persson *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 1999; Igawa *et al.*, 2000). Estas contrações são insensíveis à ação das neurotoxinas, porém são atenuadas pela adição de antagonistas dos íons Mg⁺² e Ca⁺² sugerindo que as contrações involuntárias são de origem miogênica (Montgomery *et al.*, 1992; Levin *et al.*, 1991). Procuramos avaliar se a hiperatividade observada em ratos tratados com L-NAME envolvia também alterações na resposta à adição extracelular de CaCl₂. Recentemente, Priviero *et al.* (2007) realizaram curvas concentração efeito ao CaCl₂ em artéria mesentérica de ratos tratados cronicamente com L-NAME, e observaram um aumento da resposta ao CaCl₂, sugerindo que a deficiência de NO pode interferir na via da Rho-quinase favorecendo assim o estado contrátil da célula. Procuramos realizar curvas concentração efeito ao CaCl₂ em detrusor de ratos tratados cronicamente com L-NAME para verificarmos se a hiperatividade apresentada nestes ratos envolvia a participação do cálcio. Entretanto, não observamos aumento de resposta à adição extracelular de CaCl₂ nos ratos tratados cronicamente.

Estudos de imunohistoquímica em cobaia e humanos revelaram que o NO induz acúmulo de cGMP no músculo liso da uretra proximal, mas este acúmulo não é visto no

músculo liso detrusor, apesar de a NOS estar expressa nesta porção da bexiga. O NO é um importante fator responsável pelo relaxamento da uretra e do esfíncter uretral (Mumtaz et al., 2000; Mamas et al., 2003). Alguns autores mostraram que a infusão sistêmica de doadores de NO aumenta o relaxamento uretral assim como diminui a pressão uretral basal (Mumtaz et al., 2000; Mamas et al., 2003). Estes achados sugerem que a hiperatividade do músculo liso detrusor observada em situações de obstrução parcial da uretra, pode ser devida a diminuição da biodisponibilidade do NO na base da bexiga e na uretra. Assim, os doadores de NO poderiam servir como fármacos para o tratamento da espasticidade do esfíncter assim como na obstrução (Haab, 2000). Dados de urodinâmica realizados por nosso grupo de trabalho revelaram que o volume necessário para produzir a primeira micção (limiar de volume) nos ratos tratados com L-NAME foi cerca de duas vezes maior em comparação ao grupo controle. Estes dados sugerem que a inibição crônica do NO produz um estado de contração persistente tanto da base e/ou uretra, fazendo com que haja uma incoordenação durante o esvaziamento da bexiga, já que nesta fase da micção a base da bexiga, a uretra e os esfíncteres devem relaxar para a saída da urina. Os nossos dados histológicos reforçam esta idéia, já que somente o músculo liso trígono apresentou hipertrofia na porção muscular nos ratos tratados cronicamente com L-NAME. A densidade de nervos positivos para a enzima NOS no baixo trato urinário varia tanto entre espécies animais como entre as regiões do baixo trato urinário. Muitas destas análises de positividade para NOS foram realizadas em nervos de porco (Persson et al., 1993), coelho (Waldeck et al., 1998) e cobaias (Zhou et al., 1998). A NOS estava mais expressa no trígono e na uretra, sendo o detrusor um local de baixa densidade (Zhou et al., 1997). Sendo assim, se a atividade da via NO-cGMP no baixo trato urinário está diminuída, o relaxamento da porção basal da

bexiga assim como da uretra estará comprometido gerando assim contrações involuntárias durante a fase de enchimento da bexiga. Nos dados de urodinâmicas foram também vistos aumentos nas frequências de contrações do detrusor por minuto durante a fase de enchimento, caracterizando um estado de hiperatividade do detrusor.

O papel do NO como um agente modulador na neurotransmissão do baixo trato urinário ainda é controverso. Persson et al. (1992) demonstraram que o relaxamento da uretra de porco e de rato é devido à liberação de NO, o que já não ocorre no músculo detrusor. Por outro lado, alguns trabalhos mostram positividade para a NOS em fibras nervosas que inervam o detrusor (Smet et al., 1996; McNeill et al., 1992). Miyamamoto et al. (2001) avaliaram os efeitos do NO na liberação de acetilcolina após estímulo elétrico em bexiga urinária de coelho e verificaram que em baixas frequências (5 Hz) o pré-tratamento com o inibidor da NOS (L-NNA) aumentou significativamente a liberação de acetilcolina (Ach). Além disso, adicionaram ao banho o doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP), e verificaram uma diminuição nas amplitudes da contração produzidas pelo estímulo. Esses dados sugerem que o NO modula a liberação de Ach liberada das terminações nervosas parassimpáticas em bexiga de coelho. Em nossos experimentos de estimulação elétrica não observamos alterações significativas nas amplitudes de contrações no detrusor após inibição crônica de NO. Adicionamos ao banho o antagonista purinérgico não seletivo, suramin, para trabalharmos somente com a resposta colinérgica, e, mesmo assim, nenhuma diferença foi observada. Estes dados sugerem que, diferentemente do coelho, o NO parece não possuir um papel modulatório na liberação de Ach em ratos. Como obtivemos aumento da sensibilidade ao agonista muscarínico após inibição crônica do NO era de se esperar que na estimulação elétrica obtivéssemos um aumento nas amplitudes de contração. Alguns trabalhos de obstrução

parcial da uretra mostram resultados distintos quando se compara estímulo elétrico em relação à resposta aos agonistas exógenos. Murakami et al. (2007) mostraram que após três meses de obstrução parcial da uretra em ratas nenhuma alteração na contração ao carbacol foi vista; porém, houve uma diminuição na amplitude de contração ao estímulo elétrico. Por outro lado, Lluet et al. (2002) mostraram que após quinze dias de obstrução em ratas houve uma significativa diminuição na contração ao carbacol; porém, nenhuma alteração foi vista nas amplitudes de contração ao estímulo elétrico em comparação aos controles. Outro estudo de obstrução parcial da uretra por três semanas mostra diminuição e aumento, respectivamente, na contração ao carbacol e ao estímulo elétrico, mostrando que a obstrução pode ter causado aumento na inervação assim como alterações nos mecanismos de contração pós-juncionais (Banks et al., 2006).

O mecanismo pelo qual o NO regula as alterações dos sintomas do baixo trato urinário é ainda controverso. O principal papel das fibras nitrérgicas é promover o relaxamento do baixo trato urinário, principalmente da uretra e trígono durante a micção (Mamas et al., 2003), porém o papel desta molécula no músculo detrusor ainda não foi bem estabelecido. O músculo liso detrusor e vascular, assim como as células intersticiais e o epitélio são importantes sítios para a ação do NO, pois foi visto que a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) está expressa nestes locais (Fathian-Sabet et al., 2001). Estudos anteriores mostraram que estímulo elétrico promove um relaxamento sensível ao L-NAME em bexigas de humanos, porém, resistentes à ação da TTX, sugerindo que o NO é formado junto à musculatura detrusora, sendo um importante fator de relaxamento durante a fase de enchimento (James et al., 1993; Anderson & Arner, 2004).

Em detrusor de porco, o SIN-1 (doador de NO) e o próprio NO relaxaram as preparações pré-contraídas com carbacol e endotelina-1 (ET-1), entretanto, em músculo detrusor isolado de rato e de coelho, o nitroprussiato, SIN-1 e o próprio NO não foram efetivos em relaxar este músculo quando comparado ao músculo uretral (Persson, et al. 1998). O relaxamento promovido pelo NO é dependente de duas proteínas quinases dependentes de cGMP: a cGKI, presente em altas concentrações no músculo liso, plaquetas, células de Purkinje e cerebelo, e a cGKII, expressa no intestino delgado, cérebro e cartilagens (Pfeifer et al., 1998). O envolvimento da cGKI no baixo trato urinário de camundongos foi investigado por Persson et al. (2000) usando-se camundongos nocaute para a cGKI (cGKI^{-/-}). Estes autores mostraram através de estudos urodinâmicos, que os animais cGKI^{-/-} desenvolvem hipereatividade da bexiga urinária, com aumento da frequência urinária, das contrações involuntárias e incapacidade de relaxamento da uretra ao NO (PERSSON et al., 2000). Além disso, camundongos nocaute para o gene nNOS apresentaram alterações na bexiga, como hipertrofia, aumento da frequência urinária e disfunções na junção uretravesical (Burnett et al., 1997; Anderson & Arner, 2004)

Garcia et al., (1999) verificaram que o NO está envolvido tanto no relaxamento da uretra como no controle da atividade do colo vesicouretral (Mevorach et al., 1994; Stothers et al., 2003). Sendo assim, é plausível especular que a deficiência crônica de NO em nível de trígono e/ou uretra em nosso tratamento crônico pode levar a uma contração persistente causando assim, uma quadro de detrusor hiperativo. Além disso, foi visto que em coelho a hiperatividade do detrusor após a obstrução parcial da uretra pode ser devida à perda de atividade do NO na região da base da bexiga e da uretra, e

sugere que os doadores de NO podem ser úteis para o tratamento da espasticidade do esfíncter e da obstrução (Haab, 2000).

Em ratos com obstrução parcial da uretra, Johansson et al (2002), verificaram que a obstrução da bexiga causou aumento e diminuição, respectivamente, da atividade da iNOS e nNOS. Estes autores concluíram que o NO tem um papel inibitório no crescimento das células musculares lisas da bexiga, sugerindo que alterações na atividade da NOS pode influenciar na formação da hipertrofia da bexiga (Johansson et al., 2002). Um estudo mostrou aumento da expressão do mRNA para iNOS e da quantidade de proteínas após a obstrução parcial da uretra em camundongos (Lemarck et al., 2000). Entretanto, em modelos de obstrução em coelhos, a NOS estava menos expressa (Khan et al., 1999).

Em conclusão, nossos dados mostram que a inibição crônica da NOS levou a um aumento da sensibilidade ao agonista muscarínico, principalmente através do aumento dos níveis de fosfato de inositol e de diminuição da resposta mediada pelo agonista β_3 -adrenérgico, gerando um quadro de detrusor hiperativo. Sendo assim, o tratamento crônico com L-NAME constitui um modelo adequado para se estudar a fisiopatologia da bexiga hiperativa.

5. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

- O tratamento crônico com L-NAME aumentou significativamente as respostas contráteis induzidas pelo carbacol, e reduziu o relaxamento induzido pelo agonista β 3-adrenérgico, BRL 37-344. As respostas contráteis induzidas pelo CaCl_2 , KCl e estímulo elétrico não foram alteradas pelo tratamento crônico com L-NAME;
- O tratamento crônico com L-NAME reduziu marcadamente a atividade da NOS e elevou os níveis de fosfatos de inositol na bexiga urinária;
- O tratamento crônico com L-NAME diminui a afinidade aos receptores muscarínicos na bexiga urinária;
- A análise histológica quantitativa mostrou aumento da camada muscular no músculo trígono, e ausência de alterações no músculo detrusor;
- Em conclusão, nossos dados mostram que a deficiência crônica de NO em ratos produz supersensibilidade a agonistas muscarínicos e redução da resposta relaxante mediada por agonista β 3-adrenérgicos levando, conseqüentemente, a um detrusor hiperativo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

ABRAMS P, KELLEHER CJ, KERR LA, ROGERS RG (2000). Overactive bladder significantly affects quality of life. *Am J Manag Care*, 6 (Suppl 11), S580-S590.

ANDERSSON KE & ARNER A (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology, *Physiol Rev.*, 84, 935-986.

ANDERSSON KE & HEDLUND P (2002). Pharmacologic perspective on the physiology of the lower urinary tract. *Urology*, 60, 13-20.

ANDERSSON KE (1993). Pharmacology of the lower urinary tract smooth muscle and penile erection tissues. *Pharmacol Rev.*, 45, 253-308.

ANDERSSON KE & ARNER A (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 84, 9835-9864.

ARNER A, MALMQVIST U, OSTERMAN A, UVELIUS B (1993). Energy turnover and lactate dehydrogenase activity in detrusor smooth muscle from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Physiol Scand*, 147, 375-383.

BANKS FC, KNIGHT GE, CALVERT RC, MORGAN RJ, BURNSTOCK G (2006). Alterations in purinergic and cholinergic components of contractile responses of isolated detrusor contraction in a rat model of partial bladder outlet obstruction. *BJU Int.*, 97, 372-378.

BASKIN L, DISANDRO M, LI Y, LI W, HAYWARD S, CUNHA G. Mesenchymal-epithelial interactions in bladder smooth muscle development: effects of the local tissue environment. *J Urol.*, 165, 1283-1288.

BAYLIS C, MITRUKA B, DENG A (1992). Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest.*, 90, 278-281.

BIRDER LA, de GROAT WC (2007). Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol.*, 4, 46–54.

BRADFORD MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

BRADING AF & INOUE R (1991). Ion channel and excitatory transmission in the smooth muscle of urinary bladder. *Z Kardio*, 80, 47-53.

BRADING AF (1997). A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology*, 50 (Suppl 6A), 57-67.

BRAVERMAN AS, DOUMANIAN LR, RUGGIERI MR (2006). M2 and M3 muscarinic receptor activation of urinary bladder contractile signal transduction. II. Denervated rat bladder. *J Pharmacol Exp Ther.*, 316. 875-880.

BRIXIUS K, BLOCH W, POTT C, NAPP A, KRAHWINKEL A, ZISKOVE C, Koriller M, Mehlhorn U, Hescheler J, Fleischmann B, Schwinger RH (2004). Mechanisms of beta 3-adrenoceptor-induced eNOS activation in right atrial and left ventricular human myocardium. *Br J Pharmacol.*, 143, 1014-1022.

BUDWORTH J, MEILLERAIS S, CHARLES I, POWELL K (1999). Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun.*, 263, 696-701.

BURNETT AL, CALVIN DC, CHAMNESS SL, LIU JX, NELSON RJ, KLEIN SL, DAWSON VL, SNYDER SH (1997). Urinary bladder urethral sphincter dysfunction in

mice with targeted disruption on neural nitric oxide synthase models idiopathic voiding disorders in humans. *Nature Medicine*, 3, 571-574.

BURNSTOCK G & WILLIAMS M (2000). P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther.*, 295, 862-869.

BURNSTOCK G (2000). P2X receptors in sensory neurones. *Br J Anaesth.*, 84, 476-88.

BURNSTOCK G (2001). Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci.*, 22, 182-188.

BURNSTOCK G (1999). Current status of P2X receptors: distribution and pathophysiology roles, *Proc West Pharmacol Soc*, 42, 119-121.

CHAIYAPRASITHI B, MANG CF, KILBINGER H, HOHENFELLNER M (2003). Inhibition of human detrusor contraction by a urothelium derived factor. *J Urol*, 170, 1897-1900.

CHAPPLE CR, YAMANISHI T, CHESS-WILLIAMS R. (2002). Muscarinic receptor subtypes and management of the overactive bladder. *Urology* 60: 88-89.

CHARLTON RG, MORLEY AR, CHAMBERS P, GILLESPIE JI (1999). Focal changes in nerve, muscle and connective tissue in normal and unstable human bladder. *Br J Urol* 84, 953-960.

CHESS-WILLIAMS R (2002). Muscarinic receptors of the urinary bladder: detrusor, urothelial and prejunctional. *Auton Autacoid Pharmacol*, 22, 133-145.

CHESS-WILLIAMS, R (2004). Potential therapeutic target for the treatment of detrusor overactivity. *Expert Opin Ther Targets*, 8, 95-106.

COYNE KS, SEXTON CC, IRWIN DE, KOPP ZS, KELLEHER CJ, MILSOM I. The impact of overactive bladder, incontinence and other lower urinary tract symptoms on quality of life, work productivity, sexuality and emotional well-being in men and women: results from the EPIC study. *BJU Int.*, 101, 1388-1395.

de GROAT WC & BOOTH AM, YOSHIMURA N (1993). Neurophysiology of micturition and its modification in animal models of human disease. In: *The Autonomic Nervous System, 3, Nervous Control of the Urogenital System*, ed. Maggi, CA, London: Harwood Academic Publishers, 227-289.

de GROAT WC & YOSHIMURA N (2006). Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. *Prog Brain Res.*, 152, 59–84.

de GROAT WC (1997). A neurologic basis for the overactive bladder (1997). *Urology*, 50, 36-52.

de GROAT WC (2004). The urothelium in overactivity bladder: passive bystander or active participant? *Urology*, 59 (Suppl.5A), 30-36.

de GROAT WC (2006). Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *BJP*, 147, S25-S40.

de GROAT WC, FRASER MO, YOSHIYAMA M, SMERIN S, TAI C, CHANCELLOR MB, YOSHIMURA N, ROPOLLO JR (2001). Neural control of the urethra. *Scand J Urol., Nephrol*, 35 (Suppl. 201), 35-43.

de GROAT WC, ARAKI I, VIZZARD MA, YOSHIYAMA M, YOSHIMURA N, SUGAYA K, TAI C, ROPPOLO JR (1998). Developmental and injury induced plasticity in the micturition reflex pathway. *Behav Brain Res.*, 92, 127-140.

DESSY C, MONIOTTE S, GHISDAL P, HAVAUX X, NOIRHOMME P, BALLIGAND JL (2004). Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization, *Circulation*, 110: 948-954.

DONG GZ, KAMEYAMA K, RINKEN A, HAGA T (1995). Ligand binding properties of muscarinic acetylcholine receptor subtypes (m1-m5) expressed in baculovirus-infected insect cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 274, 378-384.

DOODS HN, WILLIM KD, BODDEKE HWGM, ENTZEROTH M (1993). Characterization of muscarinic receptors in guinea-pig uterus. *Eur J Pharmacol*, 250, 223-230.

DRAKE MJ, HEDLUND P, MILLS IW, McCOY R, McMURRAY G, GARDNER BP, ANDERSSON KE, BRADING AF (2000). Structural and functional denervation of human detrusor after spinal cord injury. *Lab Invest.*, 80, 1491-1499.

DRAKE MJ, MILLS IW, GILLESPIE JI (2001). Model of peripheral autonomous modules and a myovesical plexus in normal and overactive bladder function. *Lancet*, 358, 401-403.

EHSAN A, SOMMER F, SCHMIDT A, KLOTZ T, KOSLOWSKI J, NIGGEMANN S, JACOBS G, ENGELMANN U, ADDICKS K, BLOCH W (2002). Nitric oxide pathways in human bladder carcinoma. The distribution of nitric oxide synthases, soluble guanylyl cyclase, cyclic guanosine monophosphate, and nitrotyrosine. *Cancer*, 95, 2293-2301.

EKSTROM J, HENNINGSSON AC, HENNINGSSON S, MALMBERG L (1984). Hyperplasia and hypertrophia in the denervated and distended rat urinary bladder. *Acta Physiol Scand*, 122, 45-48.

ELBADAWI A (1984). Ultrastructure of vesicourethral innervation: II. Postganglionic axoaxonal synapses in intrinsic innervation of the vesicourethral lissosphincter: A new structural and functional concept in micturition, *J Urol.*, 131, 781-790.

FATHIAN-SABET, B.; BLOCH, W; KLOTZ, T, NIGGEMANN, S, JACOBS, G, ADDICKS, K, ENGELMANN (2001). Localization of constitutive nitric oxide synthase isoforms and the nitric oxide target enzyme soluble guanylyl cyclase in the human bladder. *J Urol.*, 165, 1724-1729.

FELSEN D, DARDASHTI K, OSTAD M, LEMER ML, GROSS S, CHEN J et al. (2003). Inducible nitric oxide synthase promotes pathophycal consequences of experiments of bladder outlet obstruction. *J Urol* 169: 1569-1572.

FOX AW, ABEL, PW, MINNEMAN KP (1985). Activation of α -adrenoceptors increases [3H] inositol metabolism in rat vas deferens and caudal artery. *Eur J Pharmacol*, 166, 145-152.

FRAZIER EP, SCHNEIDER T, MICHEL DC (2006). Effects of gender, age and hypertension on beta-adrenergic receptor function in rat urinary bladder. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 373: 300-309.

FRY CH, BRADING AF, HUSSAIN M, LEWIS SA, TAKEDA M, TUTTLE JB, UVELIUS B, WOOD DN, DRAKE M (2005). Cell biology. In: *Incontinence*, eds. Abrams, P, Cardozo, L, Khoury, S, Wein, A, Jersey: Health Publications, 313-362.

GABELLA G & UVELIUS B (1994). Reversal of muscle hypertrophy in the rat urinary bladder after removal of urethral obstruction. *Cell Tissue Res.*, 277, 333-9.

GABELLA G & DAVIS C (1998). Distribution of afferent axons in the bladder of rats. *J Neurocytol.*, 27, 141–155.

GARCIA-PASCUAL A, COSTA G, LABADIA A, LIMENEZ E, TRIGUERO D (1999). Differential mechanisms of urethral smooth muscle relaxation by several NO donors and nitric oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 360, 80-91.

GAUTHIER C, LEBLAIS V, KOBZIK L, TROCHU JN, KHANDOUDI N, BRIL A, BALLIGAND, JL, LeMAREC, H (1998). The negative inotropic effect of β 3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest.*, 102, 1377-1384.

GERMAN K, BEDWANI J, DAVIES J, BRADING AF, STEPHENSON TP (1995). Physiological and morphometric studies into the pathophysiology of detrusor hyperreflexia in neuropathic patients. *J Urol.*, 153, 1678-1683.

GILLESPIE JI (2004). Phosphodiesterase-linked inhibition of nonmicturition activity in the isolated bladder. *BJU Int.*, 93:1325.

GOSLING JA, DIXON JS, LENDON RG (1977). The autonomic innervation of the human male and female bladder neck and proximal urethra, *J Urol.*, 118, 302-305.

GOSLING, JA, KING, LS, DIXON, JS, HORAN, P, WHITBECK, C, LEVIN, RM (2000). Correlation between the structure and function of the rabbit urinary bladder following partial outlet obstruction, *J Urol*, 163, 1349-1356.

GUAY DR (2003). Clinical pharmacokinetics of drugs used to treat urge incontinence. Clin Pharmacokinet., 42, 1243-1285.

HAAB F (2000). Nitric oxide and bladder overactivity. Urology, 55, 58-59.

HIKI K, HATTORI R, KAWAI C, YUI Y (1992). Purification of insoluble nitric oxide synthase from rat cerebellum. J Biochem., 111, 556-8.

HASHIM H & ABRAMS P (2005). Overactive bladder: an update. Curr Opin Urol, 17, 231-236.

HOLSTEGE, G & MOUTON, LJ (2003). Central nervous control of micturition. Int Rev Neurobiol., 56, 123-145.

IGAWA Y, YAMAZAKI Y, TAKEDA H, KAIDOH K, AKAHANE M, AJISAWA Y, YONEYAMA T, NISHIZAWA O, ANDERSSON KE (2000). Relaxant effects of isoproterenol and selective beta3-adrenoceptor agonists on normal, low compliant and hyperreflexic human bladders. J Urol., 165, 240-4.

JAMES MJ, BIRMINGHAM AT, HILL SJ (1993). Partial mediation by nitric oxide of the relaxation of human isolated detrusor strips in response to electrical field stimulation. Br J Clin Pharmacol., 35, 366-72.

JOHANSSON R, KUMAR, PANDITA RK, POLJAKOVIC M, GARCIA-PASCUAL A, DE VENTE J, PERSSON K (2002). Activity and expression of the nitric oxide synthase in the hypertrophied rat bladder and the effect of nitric oxide on bladder smooth muscle growth. J Urol., 168, 2689-2694.

JUNG SY, FRASER MO, OZAWA H, YOKOYAMA T, YOSHIYAMA M, de GROAT WC, CHANCELLOR MB (1999). Urethral afferent nerve activity affects the micturition reflex, implication for the relationship between stress incontinence and detrusor instability. J Urol., 162:204-212.

- KAVIA RBC, DASGUPTA R, FOWLER, CJ (2005). Functional imaging and the central control of the bladder. *J Comp Neurol.*, 493, 27-32.
- KHAN MA, DASHWOOD MR, THOMPSON CS, MUMTAZ FH, MIKHAILIDIS DP, MORGAN RJ (1999). Up-regulation of endothelin ETA and ETB receptors and down-regulation of nitric oxide synthase in the detrusor of a rabbit model of partial outlet obstruction. *Urol Res*, 27, 445-453.
- KHUN R, UCKERT S, STIEF CG, TRUSS MC, LIETZ B, BISCHOFF E, SCHRAMM M, JONAS U (2000). Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide-dependent pathways. *Urol Res*, 28, 110-115.
- KINDER RB, MUNDY AR (1987). Pathophysiology of idiopathic detrusor instability and detrusor hyper-reflexia. An in vitro study of human detrusor muscle. *BJU*, 60, 509-515.
- KUMAR V, CROS RL, CHESSE-WILLIAMS CHAPPLE, CR (2005). Recent advances in basic science for overactive bladder. *Curr Opin Urol*, 15, 222-226.
- LAGAUD GJ, RANDRIAMBOAVONJY V, ROUL G, STOCLET JC, ANDRIANTSITOHAINA R (1999). Mechanism of Ca²⁺ release and entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. *Am J Physiol*, 276, H300-308.
- LECCI A & MAGGI CA (2001). Tachykinins as modulators of the micturition reflex in the central and peripheral nervous system. *Regul Pept.*, 15, 1-18.
- LEMARCK GE, ZIMMERN PE, VAZQUEZ D, CONNELL JD, LIN VK (2000). Altered response to partial bladder outlet obstruction in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J Urol.*, 163, 1981-1987.

LEVIN RM, KITADA S, HAYES L, KAU ST, FROMM-FREECK S, HOWE BB, WEIN AJ (1991). Experimental hyperreflexia: effect of intravesical administration of various agents. *Pharmacology*, 42, 54-60.

LONGHURST PA, BELI, J, O DONNEL, JP, GALI, JR, WESTFAL, DP (1995). Characterization of the functional muscarinic receptor in the rat bladder. *BJP*, 116, 2279-2285.

LONGHRUST PA, LEVENDUSKY M (1999). Pharmacological characterization of beta-adrenoceptors mediating relaxation of the rat urinary bladder in vitro. *Br J Pharmacol* 127: 1744-1750.

LONGHURST PA, KANG J, WEIN AJ, LEVIN RM (1990). Length-tension relationship of urinary bladder strips from streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacology*, 40, 110-121.

LU SH, DE GROAT WC, LIN AT, CHEN, KK, CHANG LS (2007). Evaluation of purinergic mechanism for the treatment of voiding dysfunction: a study in conscious spinal cord-injured rats. *J Chin Med Assoc.*, 70, 439-44.

LUCAS KA, PITARI GM, KAZEROUNIAN S, RUIZ-STEWART I, PARK J, SCHULZ S, CHEPENIK KP, WALDMAN SA (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.*, 53, 375-414.

LLUEL P, BARRAS M, PALEA S (2002). Cholinergic and purinergic contribution to the micturition Reflex in conscious rats with long-term bladder outlet obstruction. *Neurol Urodynam.*, 21, 142-153.

MALMGREN A, UVELIUS B, ANDERSSON KE, ANDERSSON PO (1992). Urinary bladder functions in rats with hereditary diabetes insipidus; a cystometrical and in vitro evaluation. J Urol., 148, 1134-1138.

MAMAS, MA, REYNARD, JM, BRADING, AF (2003). Nitric oxide and the lower urinary tract: current concepts, future prospects. Urology, 61, 1079-85.

MATSUI M, MOTOMURA D, FUJIKAWA T, JIANG J, TAKAHASHI S, MANABE T, TAKEDO MM (2002). Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. J Neurosci, 22, 10627-10632.

MATSUI M, MOTOMURA D, KARASAWA H, FUJIKAWA T, JIANG J, KOMIYA Y, TAKAHASHI S, TAKEDO MM. (2000). Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. Proc Natl Acad Sci USA., 97, 9579-9584.

McNEILL DL, TRAUGH NE., VAIDVA AM, HUA HT, PAPKA RE (1992). Origin and distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons and fibers innervating the urinary bladder of the rat, Neurosci Lett, 147, 33-36.

MEVORACH RA, BOGAERT GA, KOGAN BA (1994). Role of nitric oxide in fetal lower urinary tract function. J Urol, 152, 510-514.

MILSOM I, ABRAMS P, CARDOZO L, ROBERTS RG, THUROFF J, WEIN AJ. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. BJU Int., 87, 760-766.

MIYAMOTO Y, YOSHIDA M, TAKAHASHI W, INADOME A, YONO M, SESHITA H, MURAKAMI S, UEDA S (2001). The effect of nitric oxide on acetylcholine release in the rabbit bladder. EJP, 428, 59-67.

MONCADA S, REESDD, SCHULZ R, PALMER RMJ (1991). Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilator after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 88, 2166-2170.

MONTGOMERY BS, THOMAS PJ, GRY CH (1992). The action of extracellular magnesium on isolated human detrusor muscle function. *BJU Int.*, 70, 262-268.

MOORE CK, LEVENDUSKY M, LONGHRUST PA (2002). Relationship of mass of obstructed rat bladders and responsiveness to adrenergic stimulation. *J Urol* 168: 1621-1625.

MORRISON J., BIRDER L., CRAGGS M., DE GROAT WC., DOWNIE J, DRAKE M., FOWLER C, THOR K (2005). Neural control. In: *Incontinence*, eds. Abrams, P, Cardozo, L, Khoury, S, Wein, A, Jersey: Health Publications, Ltd, 363-422.

MUMTAZ FH, KHAN MA, THOMPSON CS, MORGAN RJ, MIKHAILIDIS DP (2000). Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological implications. *BJU Int.*, 85, 567-78.

MURAKAMI S, YOSHIDA M, MASUNAGA K, MAEDA Y, UEDA S (2007). Change in acetylcholine release from rat bladder with partial outlet obstruction. *BJU Int*, 101, 633-639.

NAKANE M, ARAI K, SAHEKI S, KUNO T, BUECHLER W, MURAD FJ (1990). Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem*, 265, 16841-16845, 1990.

NISHIGUCHI J, HAYASHI Y, CHANCELLOR MB, DE MIGUEL, F, DE GROAT, WC, KUMON, H, YOSHIMURA, N (2005). Detrusor overactivity induced by

intravesical application of adenosine 5'-triphosphate (ATP) under different delivery conditions in rats. *Urology*, 66:1332-1337.

OKI, T, KIMURA, R, SAITO, M, MIYAGAWA, I, YAMADA, S (2004).
Demonstration of bladder selective muscarinic receptor binding by intravesical oxybutinin to treat overactive bladder. *J Urol.*, 172, 2059-2064.

O'REILLY BA, KOSAKA AH, CHANG TK, FORD, AP, POPERT, R, MCMAHON, SB (2001). A quantitative analysis of purinoceptor expression in the bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. *BJU Int.*, 87:617-622.

OZAWA H, CHANCELLOR MB, JUNG SY, YOKOHAMA T, FRASER MO, U Y, de GROAT WC, YOSHIMURA N (1999). Effect of intravesical nitric oxide therapy on cyclophosphamide-induced cystitis. *J Urol.*, 162, 2211-2216.

PANDITA RK, ANDERSSON KE (2002). Intravesical adenosine triphosphate stimulates the micturition reflex in awake, freely moving rats. *J Urol.*, 168, 1230-1234.

PANDITA RK, MIZUSAWA H, ANDERSSON KE (2000). Intravesical oxyhemoglobin initiates bladder overactivity in conscious, normal rats. *J Urol.*, 164, 545-550.

PATEL AK, CHAPPLE CR. Medical management of lower urinary tract symptoms in men: current treatment and future approaches. *Nat Clin Pract Urol.*, 5, 211-219.

PERSSON K, POLJAKOVIC M, JOHANSSON, K, LARSSON B (1999).
Morphological and biochemical investigation of nitric oxide synthases and related enzymes in the rat and pig urothelium. *J Histochem Cytochem*, 47, 739-750, 1999.

PERSSON K, ALM P, JOHANSSON K, LARSSON B, ANDERSSON KE (1993). Nitric oxide synthase in pig lower urinary tract: immunohistochemistry, NADPH diaphorase histochemistry and functional effects. *BJP*, 110, 521-530.

PERSSON K, ALM P, UVELIUS B, ANDERSSON KE (1998). Nitrenergic and cholinergic innervation of the lower urinary tract after pelvic ganglionectomy. *American Physiological Society*, 43, R 389-R397.

PERSSON K, ANDERSSON KE (1992). Nitric oxide and relaxation of pig lower urinary tract. *BJP.*, 106, 416-422.

PERSSON K, PANDITA RK, ASZODI A, AHMAD M, PFEIFER A, FASSLER R, ANDERSSON KE (2000). Functional characteristics of urinary tract smooth muscle in mice lacking cGMP proteinase type I. *Am J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 279, R1112-R1120.

PERSSON K, PANDITA RK, WALDECK K, ANDERSSON KE (1996). Angiotensin II and bladder obstruction in the rat: influence on hypertrophic growth and contractility. *Am J Physiol*, 271, R1186-1192.

PETERSON GA (1977). Simplification of the protein assay method of lowry et al. Wich is more generally applicable. *Anal Biochem.*, 83, 346-356.

PFEIFER A, KLATT P, MASSBERG S, NY L, SAUSBIER M, HIRNEISS C, WANG GX, KORTH M, ASZÓDI A, ANDERSSON KE, KROMBACH F, MAYERHOFER A, RUTH P, FÄSSLER R, HOFMANN F (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.*, 17, 3045-51.

POLLOCK DM, POLAKOWSKI JS, DIVISH BJ, OPGENORTH TJ (1993).

Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension*, 21, 660-666.

PRIVIERO FB, TEIXEIRA CE, CLAUDINO MA, de NUCCI G, ZANESCO A,

ANTUNES E (2007). Vascular effects of long-term propranolol administration after chronic nitric oxide blockade. *Eur J Pharmacol*, 571, 189-196.

POLJAKOVIC M, SVENSSON ML, SVANBORG C, JOHANSSON K, LARSSON B,

PERSSON K (2001). Escherichia coli-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in the mouse bladder and kidney. *Kidney Int* 59: 893-904.

PROSKURYAKOV SY, KONOPLYANNIKOV AG, SKVORTSOV VG,

MANDRUGIN AA, FEDOSEEV VM (2005). Structure and activity of NO synthase inhibitors specific to the L-arginine binding site. *Biochemistry*, 70, 8-23.

QIU Y, KRAFT P, CRAIG EC, LIU X, HAYNES-JOHNSON D (2001). Identification

and functional study of phosphodiesterases in rat urinary bladder. *Urol Res*, 29, 388-392.

RIBEIRO MO, ANTUNES E, NUCCI G, LOVISOLO SM, ZATZ R (1992). Chronic

inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension*, 20, 298-303.

ROBINSON D, KHULLAR, V, CARDOZO, L (2001). Pharmacological management

of detrusor instability. *Int Urogynecol J*, 12, 271-278.

ROBERTSON AS (1999). Behaviour of the human bladder during natural filling: the Newcastle experience of ambulatory monitoring and conventional artificial filling cystometry. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 201, 19-24.

SAITO M, NAKAMURA L, MIYAGAWA L (1997). Autoradiographic localization of muscarinic receptor in the diabetic rat bladder. *J Urol.*, 88, 858-867.

SAITO M, WEIN AJ, LEVIN RM (1993). Effect of partial outlet obstruction on contractility: comparison between severe and mild obstruction. *Neurourol Urodyn*, 12, 573-583.

SALES, ME, STERIN-BORDA L, RODRIGUEZ M, BORDA ES (1997). Intracellular signals coupled to different rat ileal muscarinic receptor subtypes. *Cell Signals*, 9, 373-378.

SCHOSER BG & BEHREND S (2001). Soluble guanylate cyclase is localized at the neuromuscular function in human skeletal muscle. *Neuroreport*, 12, 979-81.

SMET PJ, JONAVICIUS J, MARSHALL VR, de VENTE J (1996). Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience*, 71, 337-348.

SMITH PP, McCRERY RJ, APPELL RA (2006). Current trends in the evaluation and management of female urinary incontinence. *CMAJ.*, 175, 1233-1240.

SODERLING SH & BEAVO JA (2000). Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 174-179.

STEERS WD & de GROAT WC (1988). Effects of bladder outlet obstruction on micturition reflex pathways in the rat. *J Urol*, 140, 864-871.

STEERS WD, Lee KS (2001). Depression and incontinence. *World J Urol.*, 19, 351-7.

STEVENS L, CHAPPLE CR, CHESS-WILLIAMS R (2007). Human idiopathic and neurogenic overactive bladders and the role of M₂ muscarinic receptors in contraction. *Eur Urol*, 171: 531-538.

STEWART WF, VAN ROOYEN JB, CUNDIFF GW, ABRAMS P, HERZOG AR, COREY R (2001). Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol*, 20, 327-336.

STOTHER S, LLAHER I, CHRIST GT (2003). A review of the L-arginine-nitric oxide-guanylate cyclase pathways as a mediator of lower urinary tract physiology and symptoms. *Can J Urol.*, 10, 1971-1980.

STUEHR DJ (2004). Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr*, 134, 2748S-2751S.

SU X, STEIN R, STANTON MC, ZDERIC S, MORELAND RS (2003). Effect of partial outlet obstruction on rabbit urinary bladder smooth muscle function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284, F644-F652.

TANNER R, CHAMBERS P, KHADRA MH, GILLESPIE JI (2000). The production of nerve growth factor by human bladder smooth muscle cells in vivo and in vitro. *BJU Int*, 85, 1115-1119.

TELOKEN C, CARAVER F, WEBER FA, TELOKEN PE, MORAES JF, SOGARI PR, GRAZIOTTIN TM (2006). Overactivity bladder: prevalence and implications in Brazil. *Eur Urol.*, 49, 1087-1092.

THOMAS AW & ABRAMS P (2000). Lower urinary tract symptoms, benign prostatic obstruction and the overactive bladder. *BJU Int.*, 85 (Suppl 3), 57-68.

TROCHU JN, LEBLAIS V, RAUTUREAU Y, BÉVERELLI F, Le MAREC H, BERDEAUX A, GAUTHIER C (1999). Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol.*, 128, 69-76.

TURNER WH & BRADING AF (1997). Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Pharmacol Ther.*, 75, 77-110.

UCKERT, S, KUTHE, A, STIEF, CG (2001). Characterization and functional relevance of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes of the human prostate. *J Urol.*, 166, 2484-

UCKERT S, STIEF CG, LIETZ B, BURMESTER M, JONAS U, MACHTENS SA (2002). Possible role of bioactive peptides in the regulation of human detrusor smooth muscle - functional effects in vitro and immunohistochemical presence. *World J Urol.*, 20, 244-249.

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

WALDECK K, NY L, PERSSON K, ANDERSSON KE (1998). Mediators and mechanisms of relaxation in rabbit urethral smooth muscle. *BJP*, 123, 617-624.

WHEELER MA, AYYAGARI RR, WHEELER GL, WEISS RM. Regulation of cyclic nucleotides in the urinary tract. *J Smooth Muscle Res*, 41, 1-21.

YAMAZAKI Y, TAKEDA H, AKAHANE M, IGAWA Y, NISHIZAWA O, AJISAWA Y (1998). Species different in the distribution of β -adrenoceptor subtypes in bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 124: 593-599.

YOKOYAMA O, YOSHIYAMA M, NAMIKI M, DE GROAT WC. (2000). Role of the forebrain in bladder hyperactivity following cerebral infarction in the rat. *Exp Neurol*, 169, 148-155.

YOKOYAMA T, KUMON H, SMITH CP. Botulinum toxin treatment of urethral and bladder dysfunction. *Acta Med Okayama* 2002; 56:271-277.

YOSHIMURA N, SEKI S, de GROAT WC (2001). Nitric oxide modulates Ca^{2+} channels in dorsal root ganglion neurons innervating rat urinary bladder. *J Neurophysiol.*, 86, 304-311.

ZHANG X, IGAWA Y, ISHIZUKA O, NISHIZAWA, O, ANDERSSON, KE (2003). Effects of resiniferatoxin desensitization of capsaicin-sensitive afferents on detrusor over-activity induced by intravesical capsaicin, acetic acid or ATP in conscious rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 367, 473-479.

ZATZ R (1990). A low cost tail-cuff method for the estimation of means arterial pressure in conscious rats. *Lab Anim Sci*, 40, 198-201.

ZHOU Y & LING,EA (1998). Colocalization of nitric oxide synthase and neurotransmitters in the intramural ganglia of the guinea pig urinary bladder. J Comp Neurol, 394, 496-505, 1998.

ZHOU Y, TAN CK, LING EA (1997). Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase-containing neurons in the intramural ganglia of guinea-pig urinary bladder. J Anat, 190, 135-145.

7. APÊNDICE



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEIA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEIA-IB-UNICAMP

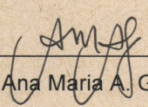
CERTIFICADO

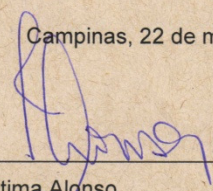
Certificamos que o Protocolo nº 962-1, sobre "ESTUDO MORFOLÓGICO E FUNCIONAL DO MÚSCULO DETRUSOR ISOLADO DE RATO DEFICIENTE CRÔNICO DE ÓXIDO NÍTRICO" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Antunes / Fabíola Zakia Taufic Mônica está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEIA)-IB-UNICAMP em reunião de 22 de março de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 962-1, entitled "MORFOLOGICAL AND FUNCTIONAL STUDIES IN THE RAT ISOLATED DETRUSOR SMOOTH MUSCLE AFTER CHRONIC NITRIC OXIDE INHIBITION", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on March 22, 2006.

Campinas, 22 de março de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEIA/IB - Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3788-6356
E-mail: ceea@cemib.unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>