

FERNANDO RICARDO BÁU

***AVALIAÇÃO DO EFEITO RELAXANTE DO BAY 41-2272 EM
DETRUSOR ISOLADO DE COELHOS***

CAMPINAS

2009

FERNANDO RICARDO BÁU

***AVALIAÇÃO DO EFEITO RELAXANTE DO BAY 41-2272 EM
DETRUSOR ISOLADO DE COELHOS***

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

CAMPINAS

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

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

B323a Báu, Fernando Ricardo
Avaliação do efeito relaxante do *BAY 41-2272* em detrusor isolado
de coelhos / Fernando Ricardo Báu. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Edson Antunes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bexiga. 2. Óxido Nítrico. 3. GMP cíclico. I. Antunes,
Edson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : **Evaluation of relaxant effect of *BAY 41-2272* in rabbit isolated detrusor**

Keywords: • Urinary Bladder
• Nitric oxide
• Cyclic GMP

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora:
Profº. Drº. Edson Antunes
Profº. Drº. Angélica Zanesco

Profª. Drª. Sisi Marcondes Paschoal

Data da defesa: 07-07-2009

*Ata da Sessão pública de defesa de dissertação para obtenção do título de Mestre em Farmacologia, a que se submeteu o aluno **Fernando Ricardo Báu** - RA058278, orientado pela Profa. Dr. Edson Antunes*

Aos sete dias do mês de julho do ano de dois mil e nove, às 10:00 horas, no Anfiteatro do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo Senhor Diretor da Faculdade de Ciências Médicas, composta pelos: Presidente e Orientador Professor Doutor Edson Antunes - FCM/Unicamp, Professora Doutora Angelina Zanesco - UNESP e Professora Doutora Sisi Marcondes Paschoal - FCM/Unicamp, para analisar o trabalho do candidato **Fernando Ricardo Báu**, apresentado sob o título "**Avaliação do efeito relaxante do BAY 41-2272 em detrusor de camundongos, coelhos e ratos**". O Presidente declarou aberto os trabalhos, a seguir ao candidato dissertou sobre o seu trabalho e foi argüido pela Comissão Julgadora. Terminada a exposição e a argüição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

☒ APROVADO

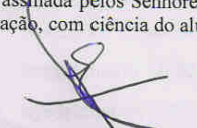
☐ APROVADO CONDICIONALMENTE

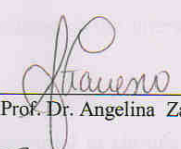
(ao atendimento das alterações sugeridas pela Comissão Julgadora especificadas no parecer anexo).

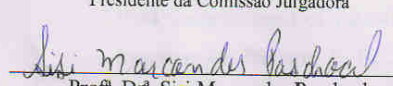
☐ REPROVADO (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora).

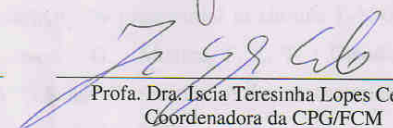
Para fazer jus ao título de Mestre à versão final da Dissertação, considerado Aprovado ou Aprovado Condicionamente devidamente conferida pela CPG/FCM, deverá ser entregue à CPG dentro do prazo de 60 dias, a partir da data da defesa. De acordo com o previsto na Deliberação CONSU-A8/08, Artigo 35, parágrafo 1º, inciso II e parágrafo 2º, o aluno Aprovado Condicionamente que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Comissão Central de Pós-Graduação da UNICAMP, conferindo título de validade nacional aos aprovados.

Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente declara a sessão encerrada, sendo a ata lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pelo Coordenador da Comissão de Pós-Graduação, com ciência do aluno.


Prof. Dr. Edson Antunes
Presidente da Comissão Julgadora


Prof. Dr. Angelina Zanesco


Prof. Dr. Sisi Marcondes Paschoal


Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes
Coordenadora da CPG/FCM


Salete Gobi Chiulle Dias
Secretária da Pós-Graduação


Ciência do Aluno

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

*Aos meus pais, Benedito e Vilma,
que foram fundamentais durante toda a minha vida, me apoiando e me
ajudando em todas as escolhas que fiz. Serei eternamente grato.*

*Aos meus irmãos Rodrigo e Adriana,
que tornam a minha vida mais feliz.*

*À minha namorada Márcia,
que me apoiou e me ajudou durante todo este trabalho.
Uma pessoa que eu amo e admiro muito.*

AGRADECIMENTOS

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

A
Profa. Dra. Alice Aparecida Olim Bricola
Agradeço pelos ensinamentos e por fazer despertar em mim o
interesse pela Farmacologia.

Ao
Prof. Dr. Cleber Evandro Teixeira
Agradeço pela convivência, pela amizade, mesmo que tenha
sido por menos tempo que gostaríamos. Apesar de não estar mais
presente fisicamente, deixou boas lembranças e importantes
ensinamentos.

Agradecimentos

Aos meus amigos da “Casca”, Camila, Celso, Clésio, Fernanda Priviero, Fernanda Dell, Haroldo, Julio Rojas, Luiz Osório, Maria Andréia, Mário, Rafael Annovazzi, Rodrigo Capel agradeço pela ajuda e pelos momentos descontraídos que me proporcionaram durante todo o período que permaneci no laboratório.

Agradeço especialmente a Fabíola que me acompanhou desde o início, me ensinando e ajudando em tudo que eu precisei.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Elen, Enilton, Ivani, Lineu, Luiz Gustavo, Marina, Nádia, Priscila, Rafael Prada, Sisi, Tatiane.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Francileuda, Elaine, Wanderlei, Marcos, Agnaldo, Adílson, 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 Mestrado [06/01904-7](#) (2006-2008)

SUMÁRIO

Lista de Drogas	xxi
Lista de Abreviações	xxiv
Lista de Tabelas	xxviii
Lista de Figuras	xxxix
1. Introdução	1
1.1 Anatomia da Bexiga Urinária	3
1.2 Inervação da Bexiga Urinária	4
1.3 Mecanismos Envolvidos Durante a Micção	5
1.4 Mecanismos Envolvidos Durante a Fase de Enchimento	6
1.5 Óxido Nítrico	7
1.6 Guanilil Ciclase solúvel e BAY 41-2272.....	10
2. Materiais e Métodos	15
2.1 Animais de Experimentação	17
2.2 Isolamento e Preparação do Detrusor	17
2.3 Curvas Concentração-Resposta	18
2.4 Protocolos Experimentais	19
2.4.1 Efeito do BAY 41-2272, SNP, GTN e 8Br-GMPc em detrusor de camundongos, coelhos e ratos	19
2.4.2 Efeito do L-NAME, ODQ, Sildenafil e Bloqueadores de Canais de Potássio.....	19
2.4.3 Curvas Concentração-Resposta ao Cloreto de Cálcio.....	19
2.4.4 Determinação dos Níveis de Nucleotídeos Cíclicos (AMPc e GMPc)	20
2.4.5 Determinação do Influxo de Cálcio em Plaquetas Isoladas de Coelho.....	21
3. Resultados	23
3.1 Efeito do BAY 41-2272 em detrusor de camundongos, coelhos e ratos	25
3.2 Efeito Relaxante do SNP, GTN e 8Br-GMPc.....	26
3.3 Efeito do L-NAME, ODQ e Sildenafil	28
3.4 Efeito do BAY 41-2272 nos Níveis de Nucleotídeos (AMPc e GMPc).....	29
3.5 Efeito dos Bloqueadores de Canais de Potássio	32
3.6 Efeito do BAY 41-2272 nas Respostas Contráteis ao CaCl ₂	33
3.7 Efeito do BAY 41-2272 na Mobilização de Cálcio em Plaquetas.....	35

4. Discussão	37
5. Conclusão	45
6. Referências Bibliográficas	48

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
CaCl ₂	Merck
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
MgSO ₄	Merck
NaCl	Merck
NaHCO ₃	Merck
Carbacol	Sigma
EGTA	Sigma
Ácido Ciclopiazônico	Sigma
BAY 41-2272	Bayer
Nitroprussiato de Sódio	Sigma
Nitroglicerina	Lipha Pharmaceuticals
8Br-GMPc	Sigma
L-NAME	Sigma
ODQ	Sigma
Sildenafil Citrato	Cristália
Apamina	Sigma
Charibdotoxina	Sigma
Glibenclamida	Sigma
Tetraetilamônio	Sigma
Fura 2AM	Sigma
Trombina	Sigma

LISTA DE ABREVIACÕES

ACD-C: ácido cítrico 3%, citrato trissódico 4 %, glicose 2 %; 1:9 v/v

AMPc: monofosfato cíclico de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

BAY 41-2272: 5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridin-3-il]-pirimidin-4-ilamina.

BH4: tetrahidro-biopterina

Kca: canal de potássio ativado por cálcio

CCh: carbacol

ChBTX: charibdotoxina

DAG: diacilglicerol

E_{max}: resposta máxima

eNOS: sintase do óxido nítrico endotelial

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

FMN: flavina adenina mononucleotídeo

GCs: guanilil ciclase solúvel

GMPC: monofosfato cíclico de guanosina

GTN: nitroglicerina

GTP: trifosfato de guanosina

iNOS: sintase do óxido nítrico induzível

IP₃: inositol trifosfato

K_{ATP}: canal potássio ativado por ATP

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

LNMA: L-N^G-monometil Arginina

MLC kinase: quinase cadeia leve miosina

MLC: cadeia leve miosina

MLCK: quinase da cadeia leve de miosina

ODQ: 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

nNOS: sintase do óxido nítrico neuronal

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase

NO: óxido nítrico

NOS: sintase do óxido nítrico
PDE5: fosfodiesterase tipo 5
PKA: proteína quinase A
PKC: proteína quinase C
PKG: proteína quinase G
PRP: plasma rico em plaquetas
SHR: ratos espontaneamente hipertensos
SIN-1: 3-morfolinossidnonimina
SNP: nitroprussiato de sódio
TCA: ácido tricloroacético
TEA: tetraetilamônio
THP-1: Linhagem celular de leucemia monocítica aguda
YC-1: 3-(5'-Hidroximetil-2'-fúril)-1-benzil indazol

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de resposta máxima (E_{MAX}) para o BAY 41-2272, nitroprussiato de sódio (SNP) e nitroglicerina (GTN) na ausência e na presença de ODQ 29

Tabela 2. Níveis de nucleotídeos cíclicos em detrusor de coelhos incubados com BAY 41-2272, nitroprussiato de sódio ou forskolina..... 31

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 em detrusor isolado de coelho, camundongo e rato.....	25
Figura 2. Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 (Painel A), nitroprussiato de sódio (SNP; Painel B), nitroglicerina (GTN; Painel C) e 8-Br-GMPc (Painel D) em detrusor isolado de coelho.	26
Figura 3. Painel A. Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 em detrusor isolado de coelho na ausência e na presença de L-NAME, ODQ ou sildenafil. Painel B. Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) na ausência e na presença de ODQ. Painel C. Curvas concentração-resposta a nitroglicerina (GTN) na ausência e na presença de ODQ.....	28
Figura 4. Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 em detrusor isolado de coelho na ausência (controle) e presença de charibtoxina (ChBTX) + apamina, tetraetilamônio ou glibenclamida.....	32
Figura 5. Painel A. Curvas concentração-resposta ao CaCl_2 extracelular em detrusor isolado de coelhos na ausência e na presença do BAY 41-2272. Painel B. Efeito do BAY 41-2272 e ODQ nas curvas concentração-resposta ao CaCl_2 . Painel C. Efeito do nitroprussiato de Sódio (SNP) nas curvas concentração-resposta ao CaCl_2	34
Figura 6. Painel A. Níveis intracelulares de íons cálcio em plaquetas isoladas de coelhos na ausência e na presença de BAY 41-2272, antes e após a estimulação com trombina (50 mU/ml). Painel B. Níveis intracelulares de cálcio em plaquetas isoladas de coelho na ausência e na presença de BAY 41-2272 (10 μM) ou de BAY 41-2272 (10 μM) + ODQ (100 μM), antes e após a estimulação com trombina.	36

RESUMO

A síndrome da bexiga hiperativa atinge grande parte da população mundial, e gera sintomas que prejudicam a qualidade de vida dos portadores. Está associada com a hiperatividade do detrusor que se dá por um aumento das contrações espontâneas. Alguns estudos têm mostrado que a deficiência de NO é um dos fatores responsáveis por gerar estas contrações espontâneas. É sabido que o mecanismo de sinalização do NO envolve a ativação da guanilil ciclase solúvel e produção de GMPc. Atualmente, algumas drogas têm sido sintetizadas para mimetizar o efeito exercido pelo NO, tal como o BAY 41-2272, um potente estimulador da guanilil ciclase solúvel independente de NO. Vários trabalhos mostraram que o BAY 41-2272 causa relaxamento de vários tipos de musculatura lisa, podendo ser um composto com grande potencial terapêutico em doenças onde a via do NO/GMPc está prejudicada. O objetivo deste trabalho é investigar a capacidade do BAY 41-2272 de relaxar detrusor isolado de camundongo, coelho e rato *in vitro* e os mecanismos farmacológicos envolvidos na resposta relaxante. Camundongos C57b6 machos (30-40 g), coelhos New Zealand machos (2-3 kg) e ratos Wistar machos (250-300 g) foram anestesiados e mortos. As bexigas foram removidas e fragmentos de detrusor foram montados em banho para órgãos isolados contendo 10 ml de solução de Krebs. Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 (10^{-9} – 10^{-4} M) foram construídas em tecidos pré-contraídos com carbacol (10 μ M) ou KCl (80 mM), na ausência ou na presença de L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase; 100 μ M), ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel; 100 μ M), Sildenafil (inibidor da fosfodiesterase tipo-5; 10 μ M), ou inibidores de canais de potássio (0,1 μ M charibdotoxina + 1 μ M apamina; 1 μ M tetraetilamônio; ou 10 μ M glibenclamida). Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP; 10^{-8} – 10^{-4} M), gliceril trinitrato (GTN; 10^{-8} – 10^{-4} M) e 8Br-GMPc (10^{-8} – 10^{-4} M) foram também construídas. Contrações induzidas por CaCl_2 extracelular foram avaliadas na presença do BAY 41-2272, bem como o efeito no influxo de cálcio em plaquetas isoladas de coelho. Níveis de GMPc e AMPc foram avaliados após a estimulação do detrusor com BAY 41-2272 (10 e 100 μ M) e SNP (100 μ M) na ausência ou na presença de ODQ (100 μ M), através de imunoensaio enzimático (ELISA). O BAY 41-2272 produziu relaxamento de detrusor isolado de camundongos, ratos e coelhos de maneira concentração-dependente, com valores de resposta máxima de $61,3 \pm 6,6\%$, $91,7 \pm 5,9\%$ e $95,1 \pm 9,9\%$, respectivamente. Detrusor de coelhos foram selecionados para os experimentos subseqüentes. Os doadores de NO, SNP e GTN, bem com o 8Br-GMPc produziram um discreto relaxamento comparado ao BAY 41-2272. O tratamento dos tecidos com L-NAME (100 μ M) ou sildenafil (10 μ M) não afetou de maneira significativa o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272. Entretanto, o ODQ (100 μ M), reduziu significativamente a resposta ao BAY 41-2272. Os bloqueadores de canais de K^+ (apamin + charibdotoxina, glibenclamida ou tetraetilamônio) também não afetaram a resposta relaxante do BAY 41-2272. O BAY 41-2272 (10 e 100 μ M) elevou os níveis de GMPc em cerca de 14 e 20 vezes respectivamente, sem afetar os níveis de AMPc. Na menor concentração do BAY 41-2272 (10 μ M), o ODQ aboliu a elevação dos níveis de GMPc, ao passo que na maior concentração do BAY 41-2272 (100 μ M), o ODQ inibiu parcialmente a elevação dos níveis

de GMPc. A adição de CaCl_2 (0,01-30 mM) extracelular em detrusor isolado de coelhos causou contração de maneira concentração-dependente que foi significativamente reduzida pelo tratamento prévio com BAY 41-2272 (1 e 10 μM), sendo que este efeito não foi prevenido pelo ODQ. O BAY 41-2272 reduziu significativamente o aumento dos níveis intracelulares de cálcio em plaquetas de coelho induzido por trombina. Em resumo, o BAY 41-2272 produz relaxamento em detrusor isolado de camundongos, coelhos e ratos através da produção de GMPc e da inibição do influxo de cálcio que independe de GMPc.

ABSTRACT

Overactive bladder (OAB) is a highly prevalent condition that affects millions of people worldwide with a profound effect on quality of life. The bladder overactivity is related to spontaneous contractions of the detrusor smooth muscle causing an increase in the intravesical pressure and consequently stimulation of the micturition reflex. Evidences suggest that impairment of nitric oxide (NO) signaling pathway may account for OAB. It is well established that NO signaling pathways involves soluble guanylate cyclase (sGC) stimulation and cyclic GMP production. Recently, pharmacological agents capable of directly stimulating soluble guanylate cyclase independently of NO, such as BAY 41-2272 has been reported to produce relaxation of different types of smooth muscle, showing great therapeutic potential in disturbs which NO pathway is impaired. The present study aimed to evaluate the capacity of BAY 41-2272 to relax isolated mouse, rat and rabbit DSM and the mechanism underlying these response. C57b6 male mice, Wistar male rats and New Zealand male rabbits were anesthetized, and urinary bladder removed. DSM was transferred to 10-mL organ baths containing oxygenated and warmed Krebs-Henseleit solution. Tissues were connected to force-displacement transducers and changes in isometric force were recorded. Concentration-response curves to BAY 41-2272 (10^{-9} – 10^{-4} M) were constructed, in previously contracted tissues with carbachol (10 μ M) or KCl (80 mM), in the absence and in the presence of L-NAME (Nitric Oxide Synthase inhibitor; 100 μ M), ODQ (sGC inhibitor; 100 μ M), Sildenafil (phosphodiesterase type-5 inhibitor; 10 μ M), or potassium channel blockers (0.1 μ M charybdotoxin + 1 μ M apamin; 1 μ M tetraethylammonium; or 10 μ M glybenclamide). Concentration-response curves to sodium nitroprusside (SNP; 10^{-8} – 10^{-4} M), glyceryl trinitrate (GTN; 10^{-8} – 10^{-4} M) and 8Br-cGMP (10^{-8} – 10^{-4} M) were also constructed. CaCl_2 -induced contractions in DSM and calcium influx in rabbit isolated platelets were evaluated in the presence of BAY 41-2272. Levels of cAMP and cGMP in DSM strips were determined after treatment with BAY 41-2272 (10 and 100 μ M), SNP (100 μ M) in the absence or in the presence of ODQ (100 μ M) using specific EIA kit. BAY 41-2272 (0.001–100 μ M) produced concentration-dependent DSM relaxations in mouse, rat and rabbit with maximal responses of $61.3 \pm 6.6\%$, $95.1 \pm 9.9\%$ and $91.7 \pm 5.9\%$, respectively. The NO-donors sodium nitroprusside and glyceryl trinitrate, as well as 8-bromo-cGMP also produced concentration-dependent rabbit DSM relaxations, but to a lesser extent than BAY 41-2272. Pretreatment with L-NAME (NO synthesis inhibitor) or sildenafil (phosphodiesterase-5 inhibitor) had no effect in BAY 41-2272-induced responses. However, the soluble guanylyl cyclase inhibitor ODQ significantly reduced BAY 41-2272-induced relaxations. BAY 41-2272 (10 and 100 μ M) increased the bladder cGMP levels by about of 14- and 20-fold, respectively, without affecting the cAMP levels. The cGMP increases in response to BAY 41-2272 and SNP were markedly reduced by ODQ. CaCl_2 caused a concentration-dependent contraction in DSM strips and BAY 41-2272 significantly reduced the contractile responses to extracellular Ca^{2+} in an ODQ-insensitive manner. BAY 41-2272 also significantly reduced the increase of intracellular calcium levels induced by thrombin. This inhibitory effect was completely reverted after the treatment with ODQ. BAY 41-2272 relaxes DSM of the three animal species studied.

BAY 41-2272-induced DSM relaxation involves mainly cGMP production, but an additional mechanism involving Ca^{2+} influx blockade independently of cGMP production appears to be involved.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anatomia da Bexiga Urinária

A bexiga possui duas funções principais, o armazenamento e a eliminação de urina. Estes processos envolvem uma sincronia de ações do músculo detrusor e da uretra. 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 (Turner & Brading, 1997).

A bexiga é dividida em duas regiões distintas: uma ampla região localizada acima dos orifícios dos ureteres, denominada “corpo da bexiga”, formado pela parede da bexiga, e uma região menor, abaixo dos orifícios ureterais, denominada “base da bexiga”, que é formada pelo músculo trígono, pela junção uretrovesical e pela parede anterior da bexiga (Gosling, 1979).

A parede da bexiga é formada por uma camada mucosa interna, denominada de urotélio, e pela musculatura lisa, denominada de detrusor, a qual é recoberta externamente por fascia. O urotélio é uma camada epitelial composta por, uma camada de células basais, uma camada celular intermediária e uma camada celular superficial formada por células hexagonais denominadas “*umbrella cells*”. Estas células são conectadas através de *tight junctions* e possuem em sua superfície proteínas denominadas de uroplaquinas que reduzem a permeabilidade da bexiga a pequenas moléculas como água e íons, formando uma barreira impermeável. Além disso, o urotélio parece atuar dinamicamente na função da bexiga sendo capaz de detectar estímulos fisiológicos e químicos. Estes estímulos fazem com que as células uroteliais produzam transmissores como ATP, Óxido Nítrico (NO), substância P, acetilcolina, entre outros (Birdier & De Groat, 2007)

Imediatamente abaixo da camada mucosa, a parede da bexiga é constituída de três camadas de musculatura lisa. As duas camadas externas possuem orientação longitudinal

enquanto que a central é circular. Em pequenos animais de pequeno porte, os feixes de musculatura lisa se distribuem de maneira menos complexa, fáceis de visualizar, enquanto que em humanos os feixes não estão claramente divididos em camadas, mas percorrem diferentes direções. O detrusor apresenta tanto características de musculatura lisa unitária, onde o potencial de ação percorre rapidamente entre as células, como características de musculatura lisa multi-unitárias, descritas como fibras ricamente innervadas e controladas por impulsos nervosos (Andersson & Arner, 2004). Ou seja, o detrusor é dotado de uma importante atividade espontânea, entretanto depende também da modulação via sistema nervoso autônomo. A musculatura lisa contrai uniformemente durante a fase de esvaziamento da bexiga urinária, e relaxa durante a fase de enchimento.

1.2 Inervação da bexiga urinária

O controle da função da bexiga é feito principalmente pelo sistema nervoso autônomo. Durante o processo de enchimento ocorre ativação de fibras simpáticas e inativação de fibras parassimpáticas ao nível pré-sináptico. Por outro lado, durante a fase de eliminação ocorre a estimulação de fibras parassimpáticas que levam à contração da musculatura lisa e conseqüentemente à eliminação da urina (De Groat, 2006).

As fibras simpáticas originam-se do gânglio lombo sacral que atinge a bexiga via nervo pélvico e do gânglio mesentérico inferior que atinge a bexiga via nervo hipogástrico (De Groat, 2006). Estas fibras, quando estimuladas, liberam noradrenalina que promovem relaxamento do detrusor através da interação com receptores β -adrenérgicos.

As fibras parassimpáticas surgem da porção sacral da medula espinhal e innervam a bexiga via nervo pélvico. Essas fibras possuem axônios que se comunicam com células ganglionares presentes no gânglio pélvico através da interação da acetilcolina com

receptores nicotínicos ganglionares (De Groat, 2006). Os neurônios pós-sinápticos, quando estimulados, liberam acetilcolina provocando a contração da musculatura lisa via receptores muscarínicos

1.3 Mecanismos Envolvidos Durante a Micção

No processo de micção, a contração do músculo liso da bexiga é mediada predominantemente pela ativação de receptores muscarínicos (Andersson & Arner, 2004). Embora a bexiga expresse mais receptores M_2 do que M_3 , a resposta contrátil decorrente da estimulação muscarínica é evocada, principalmente, pela ativação de receptores M_3 (Yamaguchi et al., 1996; Sigala et al., 2002). Os mecanismos intracelulares observados no desenvolvimento da resposta contrátil incluem a ativação da fosfolipase C, com formação de inositol trisfosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), levando assim ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Andersson & Arner, 2004). Subseqüentemente, o cálcio se liga à calmodulina, a qual ativa a miosina quinase (MLCK), levando à fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC_{20}). Durante este processo, a MLC_{20} fosforilada interage com a α -actina, resultando na contração do músculo liso (Murthy et al., 2003). O aumento dos níveis de cálcio é consequência de sua mobilização a partir do retículo sarcoplasmático e/ou de seu influxo através de canais de cálcio presentes na membrana celular.

O papel da proteína quinase C (PKC) na contratilidade do músculo liso da bexiga permanece contraditório, pois grande parte dos estudos indica que a PKC não tem influência direta na potência ou eficácia em respostas contráteis mediadas por estimulação de receptores muscarínicos (Fleishman et al., 2004; Schneider et al., 2004; Braverman et al., 2006). Entretanto, a PKC pode ser importante durante a fase sustentada da contração da bexiga, podendo atuar conjuntamente com a Rho-kinase para mediar esta resposta

(Takahashi et al., 2004). Vários agonistas causam contração desproporcional ao aumento concomitante e transitório da concentração intracelular de cálcio, indicando a existência de sensibilização ao cálcio decorrente de sua ação (Bradley & Morgan, 1987). Este efeito é mediado por proteínas que se ligam ao GTP, as quais recrutam outros sistemas intracelulares (Karaki et al., 1997; Somlyo & Somlyo, 2003).

1.4 Mecanismos Envolvidos Durante o Armazenamento de Urina

O processo de armazenamento de urina compreende o relaxamento do detrusor e a contração da uretra impedindo o esvaziamento. A ativação de receptores β -adrenérgicos promove o relaxamento muscular e redução da pressão intravesical, ao passo que na uretra, a ativação de receptores α -adrenérgicos leva a contração do esfíncter interno impedindo a eliminação da urina (De Groat et al., 1999).

Três subtipos de receptores β -adrenérgicos (β_1 , β_2 e β_3) foram identificados no detrusor, porém a participação dos diferentes subtipos na resposta relaxante varia de acordo com a espécie animal. Em detrusor de humanos os receptores β -adrenérgicos são expressos na proporção de 1,5%, 1,4% e 97% para β_1 , β_2 e β_3 , respectivamente, sendo o relaxamento mediado principalmente pelos receptores β_3 (Seguchi et al., 1998; Yamaguchi, 2002). O subtipo β_1 parece não ter importância funcional no relaxamento do detrusor de ratos, ao passo que em cães e coelhos, a ativação destes receptores parece contribuir para o relaxamento da bexiga. Receptores β_2 e β_3 parecem ser igualmente responsáveis pelo relaxamento do detrusor em ratos; porém, em coelhos, os receptores β_2 têm maior participação nas respostas relaxantes quando comparados aos β_3 (Yamazaki et al., 1998).

A estimulação de receptores β -adrenérgicos dispara uma cascata de eventos celulares iniciando-se com a ativação da enzima adenilil ciclase induzindo acúmulo de

adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O aumento dos níveis de AMPc leva a ativação da proteína quinase A (PKA) que tem como função a fosforilação de proteínas específicas promovendo o relaxamento da musculatura lisa. Dentre as ações atribuídas à PKA está a inativação da MLCK e o aumento da recaptção de cálcio para o retículo sarcoplasmático através da fosforilação da fosfolambana, diminuindo o cálcio citosólico (Tanaka et al., 2005; Uchida et al., 2005). A ativação de receptores β pode promover o relaxamento do detrusor também por mecanismos independentes de AMPc, incluindo a ativação de canais de potássio. Dentre estes canais, destacam-se os canais de potássio ativados por cálcio (BK_{Ca}), que levam à hiperpolarização das células musculares, causando o fechamento dos canais de cálcio do tipo L e conseqüente bloqueio do influxo de cálcio para o meio intracelular.

O NO parece também contribuir para a fase de enchimento da bexiga, embora ainda não se saiba o exato papel desta molécula neste processo. Acredita-se que o NO participe do relaxamento do detrusor ajudando a manter o preenchimento da bexiga em condições de baixa pressão (Poladia & Bauer, 2004).

1.5 Óxido Nítrico

O NO é um radical livre formado a partir da L-arginina, através de uma reação catalisada por uma família de enzimas denominadas NO sintase (NOS). Essas enzimas são dímeros formados pelos domínios redutase e oxidase, semelhante às enzimas citocromo P-450. O domínio redutase apresenta grupos prostéticos, FAD, FMN e apresenta sítios de ligação para o complexo cálcio calmodulina e NADPH. O domínio oxigenase apresenta um grupo heme e sítios de ligação para a 5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina (BH_4) e para a L-arginina. O NADPH atua como doador de elétrons e as flavoproteínas transportam os

elétrons até o ferro, presente na porção heme, que reage como o oxigênio formando radical ânion superóxido. O oxigênio é responsável pela oxidação do nitrogênio terminal da guanidina. A reação inicial envolve a N-hidroxilação do nitrogênio terminal da guanidina formando N-hidroxi-L-arginina que também atua como substrato da NOS. A etapa subsequente consiste na oxidação da N-hidróxi-arginina em NO e L-citrulina. Existem três isoformas de NOS, denominadas de endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS), cada qual codificada por diferentes genes (Stuehr et al., 2004).

O mecanismo de sinalização intracelular do NO envolve a interação com a enzima guanilil ciclase solúvel que catalisa a conversão do GTP em GMPc (Arnold et al., 1977). O aumento dos níveis de GMPc em células musculares lisas está diretamente relacionado com o processo de relaxamento. O GMPc ativa uma proteína quinase dependente de GMPc (PKG) que fosforila uma série de alvos intracelulares provocando em última estância o relaxamento da musculatura lisa. Entre os fenômenos atribuídos à PKG estão ativação de BK_{Ca}, da miosina fosfatase, de bombas Ca²⁺ATPase presentes no retículo sarcoplasmático e inibição da produção de IP₃ (Hofmann et al., 2009).

Em bexiga urinária humana, verificou-se imunorreatividade para a nNOS nas fibras nitrérgicas da superfície submucosa e entre as células musculares (Persson et al., 1999), enquanto a eNOS foi detectada tanto em células endoteliais venulares como nas células do músculo liso (Fathian-Sabet et al., 2001). Vários estudos foram realizados a fim de avaliar o papel do NO no funcionamento da bexiga. Entretanto, os resultados obtidos são conflitantes, o que impossibilita o entendimento correto da função do NO na função da bexiga. Estudos in vitro realizados em detrusor isolado de ratos e porcos mostraram que a adição de doadores de NO em tecidos previamente contraídos produziram somente um discreto relaxamento, sendo que em camundongos, os mesmos compostos não produziram

qualquer efeito relaxante (Persson et al., 1992; Persson & Andersson, 1992; Fujiwara et al., 2000). Por outro lado, acredita-se na possibilidade que o NO exerça um efeito modulatório na contração do detrusor. Doadores de NO foram capazes de aumentar a atividade miogênica e a contração induzida pelo carbacol e por estimulação elétrica (Moon, 2000; Yanai et al., 2008).

A inibição da síntese de NO, bem como a deleção gênica da NOS e PKG, tem sido utilizadas como estratégia experimental para se compreender o papel do NO na bexiga urinária. Persson e colaboradores (1992) verificaram em ratos que a administração intra-arterial de L-NAME (inibidor não seletivo da NOS) promove a redução do volume miccional e da capacidade da bexiga, bem como aumenta as contrações espontâneas. De maneira similar, a administração aguda de L-NMMA (inibidor não seletivo da NOS) em gatos gerou redução do limiar de micção (volume necessário para disparar o reflexo miccional), sugerindo aos autores que o NO participa da fase de enchimento (Theobald, 1996). Além disso, recente estudo do nosso grupo, utilizando detrusor isolado de ratos, mostrou-se que a inibição crônica de NO causa um aumento significativo das contrações induzidas por agonistas muscarínicos, e redução do relaxamento induzido por agonistas β_3 -adrenérgicos (Monica et al., 2008).

Experimentos realizados em camundongos deficientes de nNOS mostraram aumento da massa total da bexiga, acompanhada de hipertrofia da camada muscular lisa e aumento da frequência miccional (Burnett et al., 1997). Somado a isso, Johansson e colaboradores (2002) demonstraram que ratos submetidos à obstrução parcial da uretra apresentaram hipertrofia da camada muscular e redução da expressão da nNOS. Este mesmo trabalho mostrou ainda o NO exerce um efeito inibitório sobre o crescimento das células musculares da bexiga. Além disso, em camundongos deficientes da proteína quinase

dependente de GMPc, verificou-se, que embora não se tenha encontrado alterações morfológicas na bexiga, os animais apresentaram aumento da frequência de contrações involuntárias que é característico de um detrusor hiperativo (Persson et al., 2000).

Todas as evidências levam a crer que o NO está envolvido com o funcionamento da bexiga, mais precisamente durante a fase de enchimento. Embora não se tenha idéia exata do papel exercido pelo NO nesta fase, os trabalhos sugerem que a falta deste mediador pode desencadear distúrbios no funcionamento da bexiga, levando a hiperatividade do detrusor.

1.6 Guanilil ciclase solúvel e BAY 41-2272

A guanilil ciclase solúvel (GCs) medeia várias funções importantes, como inibição da agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso, vasodilatação, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação (Lucas et al., 2000). A GCs é uma proteína heterodimérica contendo um grupamento heme, e consiste de duas subunidades, denominadas α e β , com pesos moleculares variando de 72 a 77 kDa cada. A região C-terminal de ambas as subunidades forma um domínio catalítico responsável pela conversão de GTP em GMPc, o qual é necessário e suficiente para a atividade basal da GCs (Foerster et al., 1996). O grupo prostético heme está localizado na região N-terminal da subunidade α e a formação do complexo nitrosil-heme induz uma mudança conformacional na GCs que resulta no aumento de sua atividade enzimática (Lucas et al., 2000). A formação do segundo mensageiro GMPc leva à ativação da PKG, regulando assim vários processos fisiológicos como *tônus* do músculo liso, excitabilidade neuronal, transporte de eletrólitos, fototransdução na retina e proliferação celular (Hobbs & Ignarro, 1996; Hobbs, 1997; Lucas et al., 2000; Rivero-Vilches et al., 2001).

Alguns trabalhos foram realizados com o intuito de se identificar o alvo do NO no

trato urinário inferior (Smet et al., 1996; Fathian-Sabet et al., 2001; Masuda et al., 2002). Entretanto, alguns trabalhos divergem sobre a identificação da GCs no detrusor. Smet e colaboradores (1996) demonstraram que somente células da camada mucosa apresentam marcação para GMPc, não havendo nenhuma marcação em células musculares lisas em bexigas de cobaias. De maneira similar, Masuda e colaboradores (2002) verificaram um aumento da atividade da GCs após estimulação com SNP em bexigas de coelho, sendo este efeito significativamente maior na mucosa comparado à musculatura lisa. Por outro lado, em bexigas urinárias humanas identificou-se marcação para GCs nas células da musculatura lisa, e secundariamente nas células uroteliais (Fathian-Sabet et al., 2001).

Vários estudos têm demonstrado que o composto 5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridin-3-il]-pirimidin-4-ilamina (BAY 41-2272) constitui um potente estimulador de GCs (Stasch et al., 2001; Becker et al., 2001; Straub et al., 2001). Ao contrário dos nitratos orgânicos convencionais, cuja eficácia é limitada algumas vezes pelo desenvolvimento de tolerância após administração crônica (Chen et al., 2002), a estimulação da GCs pelo BAY 41-2272 não causa o desenvolvimento de tolerância, a julgar por experimentos realizados em animais espontaneamente hipertensos (SHR; Stasch et al., 2001). Além disso, a administração oral do BAY 41-2272 reduz a hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos e ratos deficientes crônicos de NO, que é acompanhada de redução da hipertrofia cardíaca e efeitos antiplaquetários (Stasch et al., 2001; Zanfolin et al., 2006). Em diferentes preparações vasculares, incluindo aorta de coelho, artéria mesentérica e artéria basilar de ratos, o BAY 41-2272 causa relaxamento vascular acompanhado por aumento dos níveis intracelulares de GMPc (Priviero et al., 2005; Teixeira et al., 2006a,b). Em corpo cavernoso humano e de coelhos, bem como em músculo anococcígeo de ratos, o BAY 41-2272 causa relaxamentos concentração-dependentes, os

quais são parcialmente inibidos na vigência de inibição da GCs (Baracat et al., 2003; Teixeira et al., 2006c). De modo semelhante, demonstrou-se recentemente que o BAY 41-2272 relaxa corpo cavernoso de camundongos e potencializa as respostas eréteis mediadas pelo NO (Teixeira et al., 2007). Interessantemente, ao lado da via NO-GMPc, tem sido descrito que o BAY 41-2272 causa aumento dos níveis de AMPc em outros tipos celulares como eosinófilos humanos e células THP-1 (Thomazzi et al., 2005; Borges de Oliveira-Jr et al., 2007). Ao mesmo tempo, vários trabalhos têm mostrado efeitos adicionais do BAY 41-2272, independentes da produção de GMPc. Por exemplo, em diferentes tecidos vasculares e em músculo anococcígeo, demonstrou-se que o efeito relaxante induzido pelo BAY 41-2272 não é totalmente abolido pela inibição da GCs pelo ODQ (Teixeira et al., 2006a,b,c). Entretanto, em aorta de coelhos, o ODQ mostrou-se capaz de inibir completamente os níveis elevados de GMPc em resposta ao BAY 41-2272 (Priviero et al., 2005). Tem sido proposto que o BAY 41-2272 atua por diferentes mecanismos para geração da resposta relaxante. Em estudos realizados com artéria basilar e mesentérica de ratos, verificou-se que o BAY 41-2272 reduz o influxo de cálcio (Teixeira et al., 2006a,b). Em outro estudo utilizando artéria pulmonar de ovinos, verificou-se que o BAY 41-2272 produz relaxamento desta musculatura através da estimulação de bombas de sódio, de maneira independente de GMPc (Bawankule et al., 2005).

Justificativa

A síndrome da bexiga hiperativa constitui uma série de sintomas caracterizados por urgência, com ou sem incontinência de urgência, acompanhada por aumento de frequência urinária e noctúria (micção à noite) que compromete a qualidade de vida dos pacientes. É caracterizada por aumento das contrações involuntárias durante a fase de enchimento, características de um detrusor hiperativo (Abrams et al., 2002). Os estudos epidemiológicos mostram que cerca de 16% da população estudada apresenta a síndrome da bexiga hiperativa (Milsom et al., 2001; Stewart et al., 2003).

A inibição da síntese de NO e a deleção gênica de enzimas envolvidas na via NO/GMPc levando a hiperatividade do detrusor foi mostrada em diversos estudos com animais indicando que o mediador tem papel importante no funcionamento da bexiga urinária. Entretanto estudos funcionais mostraram somente uma ação discreta de compostos doadores de NO em detrusor isolado de diferentes espécies animais, permanecendo confuso o papel do NO neste sistema.

O BAY 41-2272 é um potente estimulador da guanilil ciclase solúvel independente de NO que mostrou grande efeito relaxante em musculatura lisa vascular *in vitro*, e reduziu a pressão de animais espontaneamente hipertensos. De maneira similar, o BAY 41-2272 produziu o relaxamento de musculatura lisa cavernosa e uretral, *in vitro*. Curiosamente, nenhum estudo foi realizado a fim de avaliar a resposta do BAY 41-2272 em bexiga urinária. Como o composto produz relaxamento de diferentes tipos de musculatura lisa atuando na via NO/GMPc, via que parece estar envolvida com o aparecimento da bexiga hiperativa, o composto pode ter grande potencial terapêutico na síndrome da bexiga hiperativa.

Objetivos

Investigar a capacidade do BAY 41-2272 de relaxar detrusor isolado de camundongo, coelho e rato *in vitro* e os mecanismos farmacológicos envolvidos na resposta relaxante.

Objetivos Específicos

1. Realizar curvas concentração-resposta para o BAY 41-2272 em detrusor isolado de camundongos, coelhos e ratos;
2. Realizar curvas concentração-resposta para os doadores de NO (SNP e GTN) e para o análogo do GMPc, 8Br-GMPc em detrusor isolado de coelhos;
3. Realizar estudos funcionais e bioquímicos para investigar a importância do GMPc na resposta relaxante do BAY 41-2272 em detrusor de coelhos; para tanto, curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 foram construídas na ausência e na presença de L-NAME, ODQ ou sildenafil. Os níveis de GMPc foram também quantificados nos tecidos estimulados com o BAY 41-2272.
4. Realizar estudos bioquímicos para investigar a importância do AMPc no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 em detrusor de coelhos; para tanto, os níveis de AMPc foram quantificados nos tecidos estimulados com o BAY 41-2272.
5. Realizar estudos funcionais para investigar a possibilidade de o BAY 41-2272 causar bloqueio de influxo de cálcio em detrusor isolado de coelho. Isto foi realizado através de curvas concentração-resposta ao cloreto de cálcio na ausência e na presença do BAY 41-2272 em meio desprovido de cálcio. O efeito do BAY 41-2272 na mobilização de cálcio em plaquetas de coelhos ativadas com trombina foi também investigado.
6. Realizar estudos funcionais para investigar a possibilidade de o BAY 41-2272 causar relaxamento via ativação de canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) e/ou ativados por cálcio (K_{Ca}^{2+}); para tanto, curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 foram construídas na ausência e na presença de glibenclamida (bloqueador de K_{ATP}), apamina (bloqueador de K_{Ca}^{2+} de baixa condutância) e charibdotoxina (bloqueador de K_{Ca}^{2+} de alta condutância).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais de experimentação

Foram empregados camundongos adultos machos C57b6 (30 – 40 g), coelhos adultos machos New Zealand (2 - 3 kg) e ratos adultos Wistar machos (250 – 300 g) procedentes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética em experimentação Animal (Protocolos 1479-1; 1480-1; 1481-1).

2.2 Isolamento e preparação do detrusor

Ratos e camundongos foram mortos por inalação excessiva de halotano e os coelhos foram anestesiados com uretano (1 g/kg i.v.). Após exsanguinação dos animais, realizou-se uma abertura na porção inferior do abdômen e a bexiga foi exposta. Em seguida, o órgão foi removido, e a parte superior, que corresponde ao músculo detrusor, foi selecionada. Nesta porção foram feitos dois pequenos cortes na região inferior central do tecido, e com auxílio de agulhas o tecido foi fixado na forma retangular. Em seguida, foram feitos cortes longitudinais separando dois fragmentos.

Os fragmentos do detrusor foram colocados em câmaras para órgãos isolados, cuja capacidade é de 10 ml, contendo solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl (118,5); KCl (4,8); CaCl₂ (2,5); MgSO₄ (1,2), NaHCO₃ (25,0), KH₂PO₄(1,2) e glicose (10,1), aquecido a 37°C, pH 7,4, e oxigenados com uma mistura de 5% de CO₂: 95% de O₂. Os tecidos foram fixados pelas extremidades com linha de nylon, sendo que uma delas ficou presa a um suporte de resina para a fixação, e a outra ligada a um transdutor isométrico. A tensão basal inicial foi de 20 mN para bexigas de coelhos e ratos e

de 10 mN para bexiga de camundongos. O período de equilíbrio compreendeu 1 h, com lavagens sucessivas a cada 20 min. A tensão foi ajustada para a manutenção do tônus basal.

2.3 Curvas concentração-resposta

A viabilidade do tecido foi testada com a adição uma solução de cloreto de potássio (80 mM). Os relaxamentos induzidos pelo BAY 41-2272, SNP, GTN e 8Br-GMPc foram obtidos em tecidos pré-contraídos com carbacol (10 μ M). O BAY 41-2272 foi dissolvido em dimetil sulfoxido (DMSO) atingindo a concentração final de 0,3% na cuba.

Os inibidores L-NAME, ODC, sildenafil, glibenclamida, apamina, charibdotoxina e tetratetilamônio (TEA) foram adicionados 30 min antes do início da construção das curvas concentração-efeito. A resposta foi detectada através de transdutores isométricos e registrada em um sistema Power Lab v 4.2. Os valores da potência dos agonistas 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 $E_{\max}$, $\log EC_{50}$ e o “n” são feitas utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism, considerando o parâmetro Φ como zero.

2.4 Protocolos Experimentais

2.4.1 Efeito do BAY 41-2272, SNP, GTN e 8Br-GMPc em detrusor de camundongos, coelhos e/ou ratos

Foram feitas curvas concentração-resposta cumulativas ao BAY 41-2272 (0,001 – 100 μ M) em detrusor isolado de camundongos, coelhos e ratos. Em coelhos foram feitas curvas concentração-resposta SNP (0,01 – 100 μ M), GTN (0,01 – 100 μ M) e ao análogo de GMPc, 8Br-GMPc (0,01 – 100 μ M).

2.4.2 Efeito do L-NAME, ODQ, sildenafil e bloqueadores de canais de potássio

Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272, na presença de L-NAME (100 μ M), ODQ (100 μ M) ou sildenafil (10 μ M) foram construídas para se avaliar o papel funcional do GMPc nas respostas induzidas pelo BAY 41-2272.

Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 na presença de TEA (1 μ M) foram construídas para se avaliar a participação de canais de potássio sensíveis a voltagem. Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 na presença de glibenclamida (10 μ M) foram realizadas para se avaliar a participação de K_{ATP} na resposta relaxante induzida por BAY 41-2272; e curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 na presença de apamina (1 μ M) + charibdotoxina (100 nM) foram realizadas para se avaliar a participação de K_{Ca}^{2+} de alta e de baixa condutância.

2.4.3 Curvas concentração-resposta ao cloreto de cálcio

Para se avaliar o efeito do BAY 41-2272 no influxo de cálcio nas células musculares lisas de detrusor isolado de coelhos, o tecido, após estabilização e teste com a

solução de KCl, foi incubado com Krebs desprovido de cálcio (na presença de EGTA). Em seguida, várias incubações com carbacol e lavagens com Krebs desprovido de cálcio (na presença de EGTA), foram realizadas para que o cálcio do meio intracelular fosse removido. Os tecidos foram novamente incubados com KCl (80 mM) e ácido ciclopiazônico (inibidor da bomba Ca^{2+} /ATPase; 1 μM) durante 10 min. Feito isso, os tecidos foram incubados com o BAY 41-2272 (0,1 a 10 μM) ou nifedipina (1 μM) por 30 min após o qual foram realizadas curvas concentração-resposta ao cloreto de cálcio (0,01 mM – 10 mM). Este protocolo experimental foi realizado de acordo com estudo prévio em artéria mesentérica de ratos (Lagaud et al., 1999).

2.4.4 Determinação dos níveis de nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc)

Para determinação dos níveis de AMPc e GMPc em detrusor isolado de coelhos, os fragmentos foram equilibrados durante 30 min em solução de Krebs continuamente oxigenada à 37°C. Os tecidos foram então estimulados por 10 min com BAY 41-2272 (10 μM ; 100 μM), SNP (100 μM) ou forskolina (ativador da adenilil ciclase; 1 μM). Alguns tecidos foram incubados previamente com ODQ (100 μM) por 20 min antes da incubação com BAY 41-2272. Em seguida, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, pulverizados, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA, 5%) e centrifugados a 1500 g por 10 min a 4 °C. O TCA foi extraído das amostras através de três lavagens com solução de éter saturado com água. A preparação do *tracer*, amostras, padrões e incubação com anticorpo foram feitas conforme descrito no kit disponível comercialmente (Cayman Chemical Cyclic GMP EIA kit, Cayman Chemical Cyclic AMP EIA kit, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.4.5 Determinação do influxo de cálcio em plaquetas isoladas de coelho

Sangue de coelho colhido na presença de anticoagulante ACD-C (ácido cítrico 3%, citrato trissódico 4 %, glicose 2 %; 1:9 v/v) foi centrifugado a 300 g por 15 min, obtendo-se o plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi centrifugado a 800 g por 12 min, o sobrenadante foi desprezado e as plaquetas foram ressuspensas em solução Krebs-Ringer. As plaquetas (3×10^8 plaquetas/ml) foram incubadas com Fura2-am ($2 \mu\text{M}$) por 45 min à temperatura ambiente (Pollock et al., 1986). O Iloprost (mimético estável da prostaciclina; $0.8 \mu\text{M}$) foi adicionado à suspensão, e a mesma foi novamente centrifugada a 800 g por 12 min. O precipitado foi ressuspendido em solução de Krebs-Ringer e o número de plaquetas ajustado para $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml. Alíquotas plaquetárias de 1 ml foram incubadas com o BAY 41-2272 na concentração de 0,3 a $10 \mu\text{M}$ por 20 min. Em seguida, alíquotas de plaquetas (1 ml) foram colocadas em cubetas e mantidas à 37°C sob constante agitação. A concentração de cálcio externo foi ajustada para 1 mM com CaCl_2 . Após 3 min de equilíbrio, adicionou-se trombina (50 mU/ml) a suspensão plaquetária. A fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (Hitachi F-2000, Japan) utilizando comprimento de onda de 340 nm de excitação e 500 nm de emissão. A concentração de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) em nM foi calculada utilizando a equação de Grynkiewicz e colaboradores (1985): $[\text{Ca}^{2+}]_i = k_d \cdot (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$, onde o k_d (224) é a constante de dissociação do marcador fluorescente fura.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito do BAY em detrusor de camundongos, coelhos e ratos

O BAY 41-2272 produziu relaxamento de maneira concentração-dependente em detrusor isolado das três espécies estudadas, sendo que em coelhos e ratos houve um relaxamento maior comparado a camundongos (Figura 1). Os valores de resposta máxima (E_{MAX}) para o BAY 41-2272 em coelhos ($91,7 \pm 5,9\%$; $n=11$) e ratos ($95,1 \pm 9,9\%$; $n=4$) que foram significativamente maiores que em camundongos ($61,3 \pm 6,6\%$; $n=5$; $p<0,05$). A concentração final de veículo gerou somente uma pequena redução do tônus (cerca de 25%) nos tecidos previamente contraídos. O detrusor de coelho foi selecionado para os próximos experimentos.

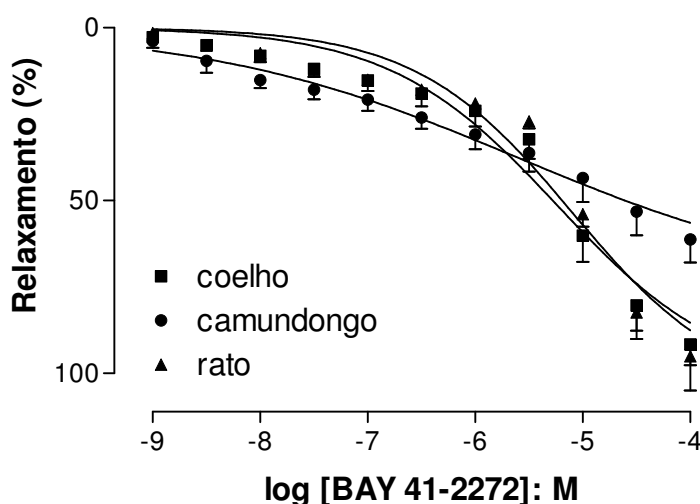


Figura 1 Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 em detrusor isolado de coelho, camundongo e rato. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média para 4-11 animais.

3.2 Efeito relaxante do SNP, GTN e 8-Br-GMPc

O SNP (0,01 μ M – 100 μ M) e GTN (0,01 μ M – 100 μ M) bem como o análogo de GMPc 8-Br-GMPc (0,01 μ M – 100 μ M) também causaram relaxamento concentração-dependente em detrusor de coelhos. Os valores de resposta máxima para o SNP ($52,2 \pm 2,4\%$; n=6), GTN ($56,1 \pm 5,7\%$; n=6) e 8-Br-GMPc ($57,2 \pm 6,5\%$; n=7) foram significativamente menores do que os encontrados para o BAY 41-2272 ($p < 0,01$; Figura 2).

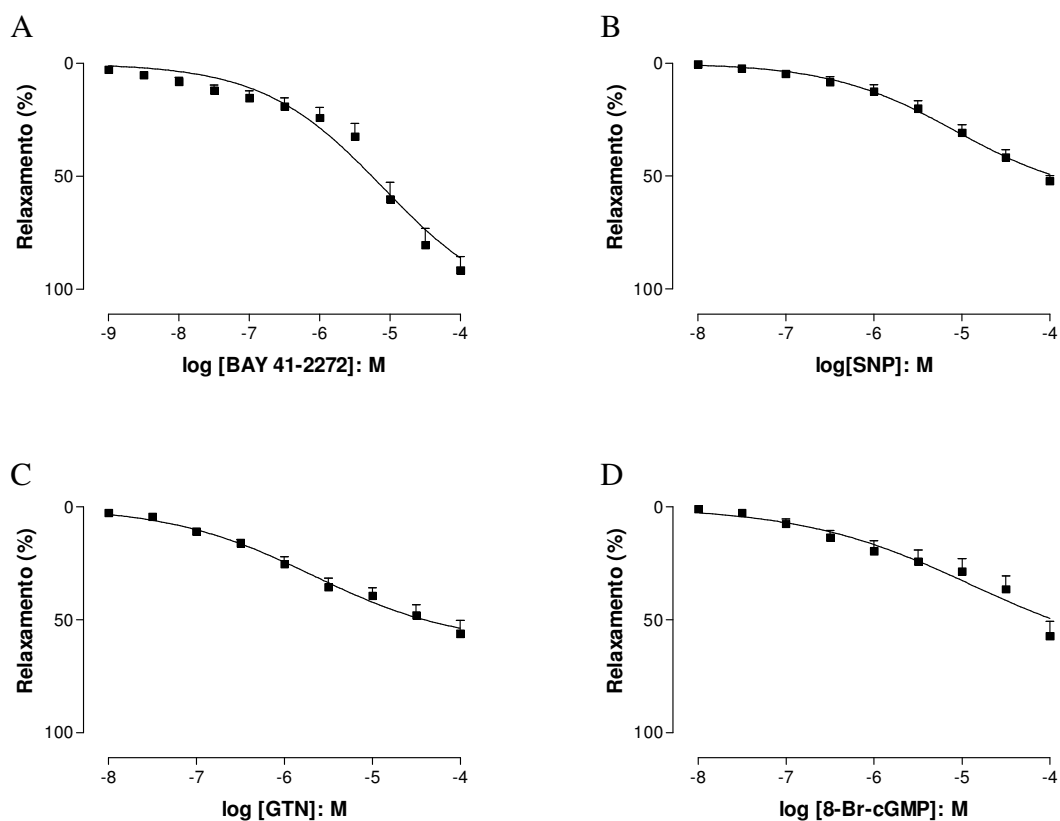


Figura 2 Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 (Painel A), nitroprussiato de sódio (SNP; Painel B), nitroglicerina (GTN; Painel C) e 8-Br-GMPc (Painel D) em detrusor isolado de coelho. Os dados estão apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média para 6-11 animais.

3.3 Efeito do L-NAME, ODQ e sildenafil

A figura 3 mostra que o tratamento prévio das preparações de detrusor de coelhos com o L-NAME (100 μ M) ou sildenafil, (0,1 μ M) não alterou de modo significativo o efeito relaxante do BAY 41-2272 ($78,2 \pm 9,4\%$ e $87,3 \pm 6,6\%$ respectivamente; n=8), comparado com o relaxamento do grupo controle ($91,7 \pm 5,9\%$; n=11). Entretanto, o tratamento prévio com ODQ (100 μ M) reduziu de modo significativo ($p<0,01$) a resposta máxima ao BAY 41-2272 (Figura 3; n=8-11). De maneira semelhante, o tratamento com ODQ inibiu significativamente o relaxamento induzido pelo SNP e GTN (tabela 1).

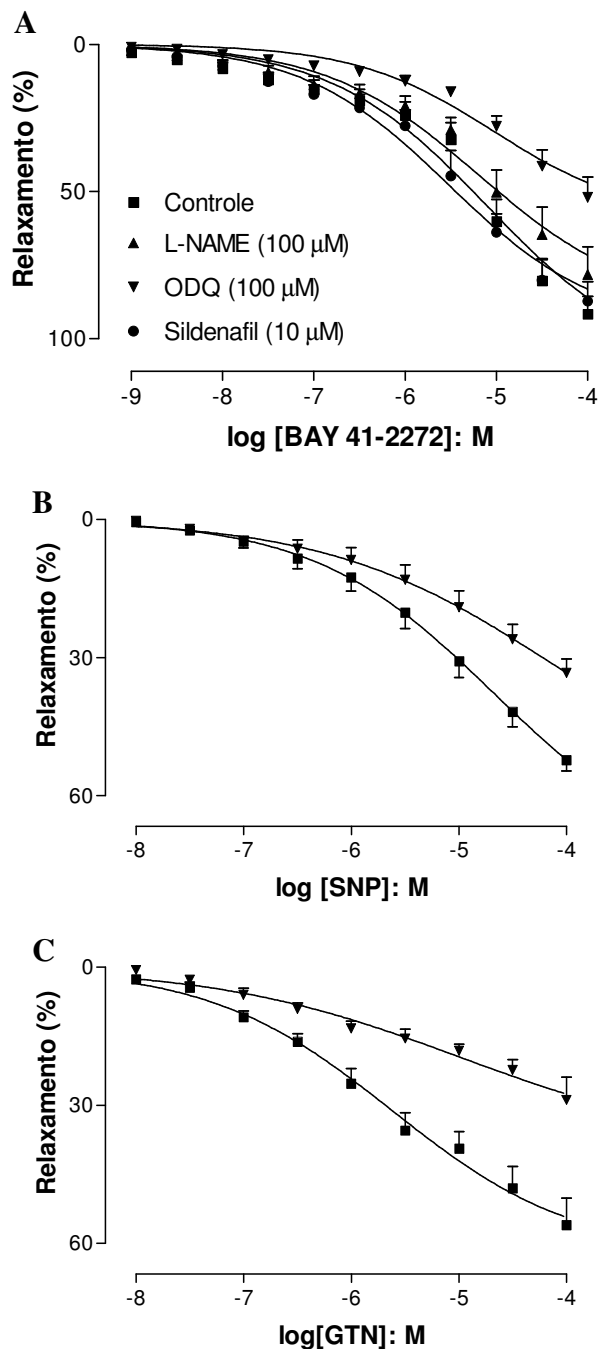


Figura 3 Paineis A, B e C. Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 em detrusor isolado de coelho na ausência e na presença de L-NAME, ODQ ou sildenafil. Paineis B e C. Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) na ausência e na presença de ODQ. Os dados estão apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média para 5-11 animais.

Tabela 1. Valores de resposta máxima (E_{MAX}) para o BAY 41-2272, nitroprussiato de sódio (SNP) e nitroglicerina (GTN) na ausência e na presença de ODQ. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média para n=6-11 animais. *p<0,001 comparado com o respectivo controle.

	E_{MAX} (% de relaxamento)
BAY 41-2272	91,7 $\pm$ 5,9
BAY 41-2272 (10 μ M) + ODQ	52,0 $\pm$ 6,9*
SNP	52,2 $\pm$ 1.13
SNP + ODQ	36,6 $\pm$ 4.1*
GTN	56,1 $\pm$ 5,8
GTN + ODQ	24.2 $\pm$ 2.16*

3.4 Efeito do BAY 41-2272 nos níveis de nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc)

Como mostrado na tabela 2, o BAY 41-2272 aumentou os níveis de GMPc em detrusor de coelhos em cerca de 14 vezes e 20 vezes, nas concentrações de 10 e 100 μM , respectivamente. De maneira similar, o SNP (100 μM) aumentou cerca de 26 vezes os níveis intracelulares de GMPc. O prévio tratamento dos tecidos com ODQ praticamente aboliu o aumento dos níveis de GMPc induzidos por 10 μM de BAY 41-2272, e inibiu parcialmente o aumento de GMPc induzido por 100 μM deste composto. Os níveis elevados de GMPc em resposta ao SNP foram parcialmente reduzidos pelo ODQ (Tabela 2).

O tratamento dos tecidos com BAY 41-2272 (100 μM) não produziu alterações significativas nos níveis de AMPc comparado com tecidos não tratados, enquanto que o tratamento com o estimulador da adenilil ciclase, forskolina (1 μM), produziu grande elevação nos níveis intracelulares de AMPc (Tabela 2).

Tabela 2. Níveis de nucleotídeos cíclicos em detrusor de coelhos incubados com BAY 41-2272, nitroprussiato de sódio ou forskolina. Os dados estão apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média para 4-5 animais. * $p < 0.05$ comparado com o controle; # $p < 0.05$ comparado com o respectivo grupo não tratado.

	GMPc (pmol/mg tecido)	AMPc (pmol/mg tecido)
Controle	$0,40 \pm 0,17$	$1,19 \pm 0,14$
ODQ (100 μ M)	$0,14 \pm 0,04$	ND
BAY 41-2272 (10 μ M)	$5,54 \pm 1,13^*$	ND
BAY 41-2272 (10 μ M) + ODQ	$0,69 \pm 0,18^\#$	ND
BAY 41-2272 (100 μ M)	$8,14 \pm 2,44^*$	$1,38 \pm 0,32$
BAY 41-2272 (100 μ M) + ODQ	$2,93 \pm 0,85^\#$	ND
SNP (100 μ M)	$10,42 \pm 1,05^*$	ND
SNP + ODQ	$3,04 \pm 0,87^\#$	ND
Forskolina (1 μ M)	ND	$10,78 \pm 2,93^*$

ND, não determinado.

3.5 Efeito dos bloqueadores de canais de potássio

A incubação de bloqueadores de canais de potássio TEA (bloqueador de canais de potássio dependentes de voltagem; 1 μ M), apamina (1 μ M; bloqueador de canais de potássio ativados por cálcio de baixa condutância) + charibdotoxina (0,1 μ M; bloqueador de canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância) ou glibenclamida (10 μ M; bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP) não afetaram a resposta relaxante do BAY 41-2272 (Figura 4). Os Valores de resposta máxima na ausência e na presença de TEA, charibdotoxina + apamina e glibenclamida foram $91,7 \pm 5,9\%$ (n=11), $84,6 \pm 14,7\%$ (n=8), $81,3 \pm 9,7\%$ (n=8) e $88,8 \pm 8,8\%$ (n=8), respectivamente.

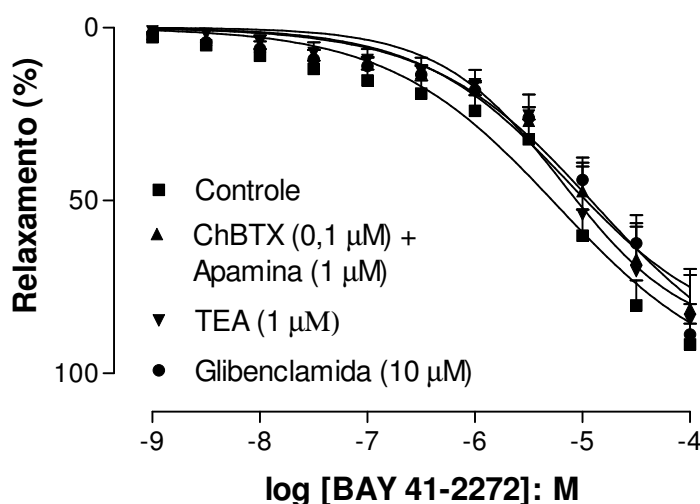


Figura 4 Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 em detrusor isolado de coelho na ausência (controle) e presença de charibdotoxina (ChBTX) + apamina, tetraetilamônio ou glibenclamida. Os dados estão apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média para 8-11 animais.

3.6 Efeito do BAY 41-2272 nas respostas contráteis ao CaCl₂

A adição cumulativa de CaCl₂ (0,01 a 30 mM) em fragmentos de detrusor, em meio nutritivo desprovido de cálcio foi utilizada para avaliar as contrações dependentes do influxo de cálcio (Figura 5A). A adição de CaCl₂ produziu uma contração concentração dependente com resposta máxima de $137,3 \pm 11,6\%$ em relação à contração produzida com carbacol (10 μ M). O tratamento prévio com BAY 41-2272, na concentração de 0,1 μ M, não alterou significativamente a contração ao CaCl₂; porém nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M notamos redução significativa na resposta contrátil ao CaCl₂. A adição de ODQ (100 μ M) não modificou o efeito inibitório produzido pelo BAY 41-2272 (Figura 5B).

Em detrusor tratado com SNP (100 μ M) houve cerca de 20% de redução ($P < 0,05$) da contração ao CaCl₂ ($97,4 \pm 4,9\%$ na ausência $79,7 \pm 4,0\%$ e presença de SNP; Figura 5C). Entretanto, este efeito inibitório do SNP foi significativamente menor que aquele produzido pelo BAY 41-2272.

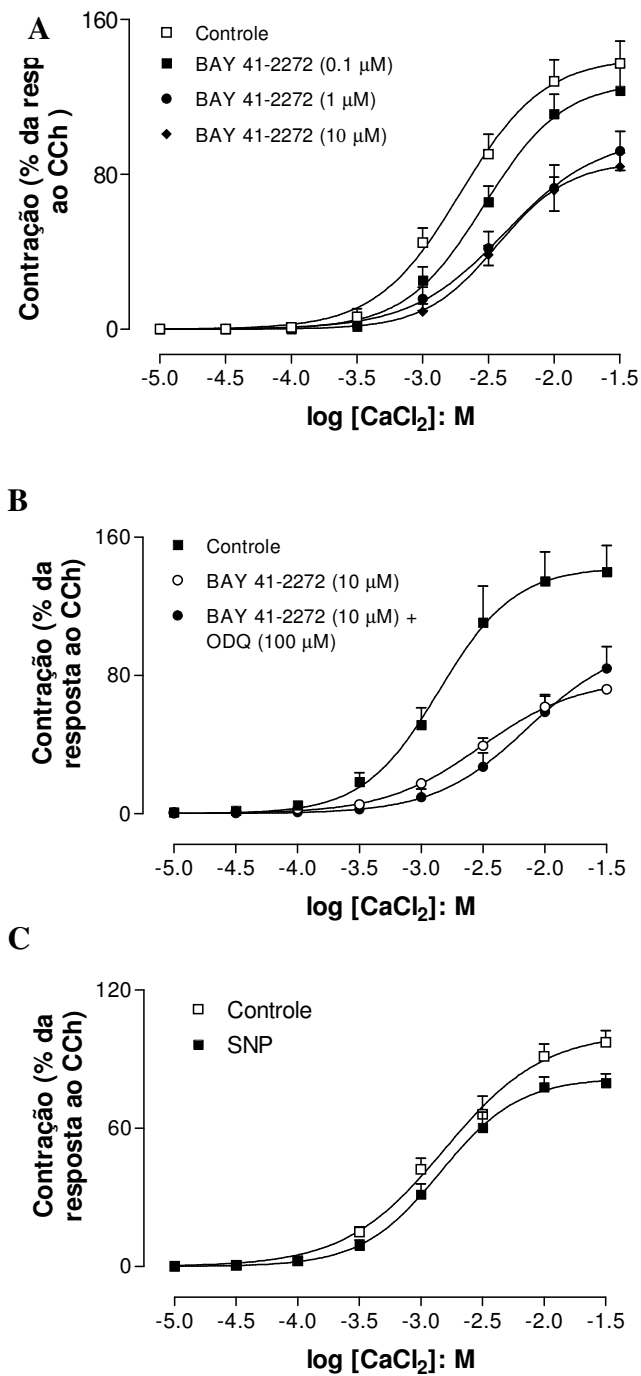


Figura 5 Paineis A, B e C. Curvas concentração-resposta ao CaCl₂ extracelular em detrusor isolado de coelhos na ausência e na presença do BAY 41-2272. Paineis B e C. Efeito do BAY 41-2272 e ODQ nas curvas concentração-resposta ao CaCl₂. Os dados estão apresentados como a média ± erro padrão da média para 5-6 animais. CCh, carbacol.

3.7 Efeito do BAY 41-2272 na mobilização de cálcio em plaquetas

A adição de trombina às plaquetas, em meio rico em cálcio (1 mM), elevou a concentração intracelular de cálcio de $154,1 \pm 5,8$ para $325,9 \pm 20,7$ nM (Figura 6A; $n=4$). O tratamento das plaquetas com BAY 41-2272 (10 μ M) reduziu de maneira significativa a elevação de cálcio intraplaquetária, atingindo concentrações próximas às basais (obtidas em plaquetas não estimuladas). Nas concentrações menores de BAY 41-2272 (0,1 e 1 μ M), não observamos alterações significativas dos níveis de cálcio intraplaquetários. Este efeito inibitório produzido pelo BAY 41-2272 foi completamente revertido em plaquetas incubadas previamente com ODQ (Figura 6B).

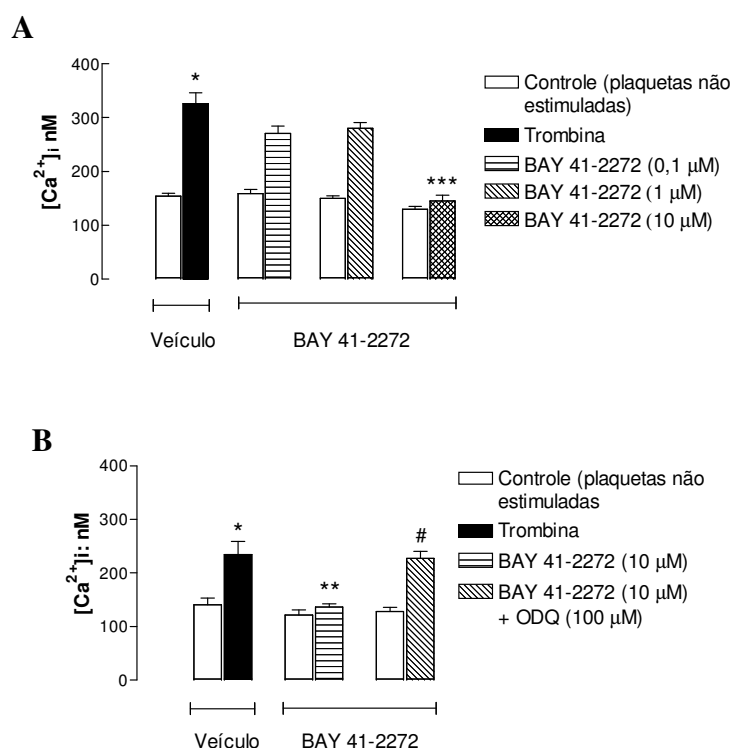


Figura 6 Painei A. Níveis intracelulares de íons cálcio em plaquetas isoladas de coelhos na ausência e na presença de BAY 41-2272, antes e após a estimulação com trombina (50 mU/ml). Painei B. Níveis intracelulares de cálcio em plaquetas isoladas de coelho na ausência e na presença de BAY 41-2272 (10 μ M) ou de BAY 41-2272 (10 μ M) + ODQ (100 μ M), antes e após a estimulação com trombina (50 mU/ml; * p <0,05 em relação às plaquetas não estimuladas). Os dados estão apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos. ** p <0,01; *** p <0,001 comparado com o veículo; # p <0,05 comparado com grupo incubado com BAY 41-2272 individualmente.

4. DISCUSSÃO

O BAY 41-2272 é um potente estimulador da GCs independente de NO e quando ligado à subunidade α da enzima estimula a produção de GMPc (Stasch et al., 2001). Vários efeitos biológicos foram relatados para este composto como inibição da agregação plaquetária, relaxamento da musculatura lisa vascular, bem como redução da pressão arterial, (Stasch et al., 2001; Hobbs & Moncada, 2003; Bawankule et al., 2005). Em nosso estudo, verificamos que o BAY 41-2272 foi capaz de produzir relaxamento total do detrusor de coelhos e ratos, e relaxamento parcial do detrusor de camundongos. Além disso, o relaxamento produzido pelo BAY 41-2272 foi significativamente maior do que aquele produzido por doadores de NO, como o SNP e GTN, assim como o análogo do GMPc, 8Br-GMPc, em detrusor de coelhos.

Estudos prévios avaliaram a resposta funcional de doadores de NO em detrusor de diferentes espécies animais e mostraram diferenças do percentual de relaxamento. Em estudo realizado em camundongos, verificou-se que a adição cumulativa de SNP não foi capaz de gerar nenhum efeito relaxante; entretanto, em detrusor isolado de ratos e porcos observou-se que a incubação com SIN-1 e SNP gerou, ainda que parcial, um efeito relaxante (Persson et al., 1992; Persson & Andersson, 1992; Fujiwara et al., 2000). De maneira semelhante o efeito do BAY 41-2272 em camundongos foi menor comparado com coelhos e ratos, o que sugere haver uma diferença na participação da via NO/GMPc entre as diferentes espécies animais.

Neste estudo demonstramos que a resposta relaxante do BAY 41-2272 foi significativamente maior do que a resposta de doadores de NO e do análogo do GMPc. É sabido que tanto doadores de NO quanto o BAY 41-2272 estimulam a GCs, levando a conversão de GTP a GMPc, com a ressalva de que o BAY 41-2272 estimula a enzima através da ligação em outro sítio da enzima. A relação entre GMPc e relaxamento da

musculatura lisa está bem estabelecida na literatura. Diversos estudos mostraram que inibição da GCs (e portanto da produção de GMPc) resulta em redução do relaxamento de musculatura lisa vascular e não vascular, em resposta à estimulação de fibras NANC-nitrérgicas ou adição de drogas que atuam na via NO (Cellek et al., 1996; Moro et al., 1996; Olson et al., 1997; Teixeira et al., 1998). Além disso, a inibição da PDE5, enzima que degrada o GMPc, leva a relaxamento direto da musculatura lisa cavernosa, bem como potencializa o efeito da estimulação de fibras NANC-nitrérgica (Ballard et al., 1998; Toque et al., 2009). Somando-se a isso, a inibição da PDE-5 com o sildenafil gera a potencialização da resposta aos doadores de NO, SNP e GTN, bem como dos estimuladores da GCs, BAY 41-2272 e YC-1 em artérias basilar e mesentérica, mostrando uma correlação entre aumento da concentração intracelular de GMPc e relaxamento vascular. Diferentemente, em nossos resultados a prévia incubação com sildenafil, não alterou o relaxamento produzido pelo BAY 41-2272. Esses resultados estão de acordo com os mostrados em corpo cavernoso de coelhos e humanos, onde verificou-se que embora o sildenafil tenha potencializado a resposta ao GTN, não houve nenhuma mudança na resposta ao BAY 41-2272. Considerando que o BAY 41-2272 tem atividade inibitória sobre a PDE-5 é possível especular que a falta de sinergismo entre o BAY 41-2272 e sildenafil ocorre devido a uma competição pelo sítio de ligação da PDE-5 (Mullershausen et al., 2004).

Em estudos realizados com aorta de coelhos e artérias basilar e mesentérica de ratos, verificou-se que o relaxamento provocado pelo BAY 41-2272 tem contribuição de NO proveniente do endotélio, demonstrado através da prévia inibição da NOS (Priviero et al., 2005; Teixeira et al., 2006a,b). Entretanto, em nossos estudos, a prévia inibição da NOS com o L-NAME não gerou nenhuma alteração na resposta relaxante do BAY 41-2272,

excluindo a possibilidade de contribuição do NO endógeno na resposta relaxante do BAY 41-2272 no detrusor.

Por outro lado, nossos resultados mostram que o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 foi inibido pelo tratamento com ODQ, indicando que o GMPc participa ativamente da resposta relaxante. O tratamento do detrusor com o BAY 41-2272 elevou significativamente os níveis intracelulares de GMPc, sendo este aumento significativamente atenuado pelo tratamento prévio dos tecidos com ODQ. Isto reforça a importância do GMPc na resposta relaxante ao BAY 41-2272 em detrusor isolado de coelhos. Entretanto, pode-se notar que o ODQ, nos experimentos funcionais, não aboliu a resposta relaxante do BAY 41-2272. Outro aspecto é que o tratamento do detrusor com SNP causou a elevação dos níveis de GMPc na mesma proporção que o BAY 41-2272, porém, a resposta funcional dos doadores de NO (SNP e GTN) e 8Br-GMPc foi marcadamente menor do que aquela encontrada para o BAY 41-2272, sugerindo que o BAY 41-2272 ativa mecanismos intracelulares adicionais, independentes da produção de GMPc. Dessa forma, resolvemos investigar as outras possíveis vias de sinalização que estariam envolvidas na resposta relaxante ao BAY 41-2272.

O AMPc é um segundo mensageiro produzido pela ativação da adenilil ciclase que através da ativação de uma proteína quinase dependente de AMPc, produz tem ação relaxante em musculatura lisa (Adelstein & Hathaway, 1979). Além disso, demonstrou-se que o BAY 41-2272 estimula a produção de AMPc em certos tipos celulares, incluindo eosinófilos e células THP-1 (Thomazzi et al., 2005; Borges de Oliveira Jr et al., 2007). Dessa maneira, investigamos a contribuição do AMPc para as ações relaxantes do BAY 41-2272 em detrusor de coelhos. Nossos resultados mostraram que o BAY 41-2272 foi incapaz de aumentar os níveis de AMPc, excluindo a possibilidade de o AMPc participar da

sinalização do BAY 41-2272. De maneira semelhante, estudos prévios em artéria basilar e anococcígeo isolados mostraram que o BAY 41-2272 não modifica os níveis de AMPc, reforçando que este composto não atua por essa via (Teixeira et al., 2006b,c).

A participação de canais iônicos na regulação do tônus muscular liso é bastante explorada na literatura. Em artérias cerebrais e coronárias foi demonstrada a importância dos canais de potássio ativados por cálcio (BK_{Ca}) e sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na regulação do tônus vascular (Nelson & Quayle, 1995). Similarmente, em detrusor demonstrou-se, a participação dos BK_{Ca} na resposta relaxante de agonistas β -adrenérgicos e o efeito relaxante de ativadores dos K_{ATP} , pinacidil e cromacalina (Zografos et al., 1992; Petkov & Nelson, 2005). Em nossos experimentos, a incubação do detrusor com inibidores de canais de potássio, tanto BK_{Ca} como K_{ATP} , não modificou a resposta ao BAY 41-2272, indicando que a resposta produzida por este composto não se dá através da ativação de canais de potássio. Estes resultados vão ao encontro do que já foi verificado em artérias basilar e mesentérica, onde se mostrou que o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 não foi afetado após a incubação com bloqueadores de canais de potássio (Teixeira et al., 2006a,b).

Em seguida, nos preocupamos em investigar uma possível interferência direta do BAY 41-2272 no influxo de cálcio no detrusor de coelhos. Os trabalhos existentes na literatura mostram a importância do influxo de cálcio do meio extracelular para a contração da musculatura lisa; entretanto, divergem quanto à importância da participação de canais do retículo sarcoplasmático nesta resposta. Primeiramente, foi apontado que a contração mediada por agonistas muscarínicos, bem como por solução concentrada de potássio, independe da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Por outro lado outros trabalhos mostraram que a liberação de cálcio dos estoques internos é um evento inicial e importante na contração induzida por agonistas muscarínicos, que desencadearia o influxo

do cálcio externo (Batra et al., 1995; King et al., 1998; Visser & Mastrigt, 2000). Em nossos experimentos verificamos que detrusor previamente incubado com BAY 41-2272 sofreram grande redução da resposta contrátil ao CaCl_2 , sendo este efeito não prevenido pelo tratamento com ODQ. Isto sugere que a resposta inibitória do BAY 41-2272 não está relacionada com produção elevada de GMPc, reforçando assim a idéia de que este composto atua também por mecanismos independentes de GMPc. Esses resultados estão de acordo com dados previamente publicados mostrando que o BAY 41-2272 reduz a resposta ao CaCl_2 em artérias basilar e mesentérica, mesmo após o tratamento com ODQ (Teixeira et al., 2006a;b). Por outro lado, o tratamento dos tecidos com SNP também gerou uma redução na resposta ao CaCl_2 ; entretanto, esta redução foi muito menor comparada àquela encontrada para o BAY 41-2272. Esses resultados sugerem que o BAY 41-2272 reduz o influxo de cálcio proveniente do meio extracelular de maneira independente de GMPc; entretanto, são necessários mais estudos para elucidar o exato mecanismo com que o BAY 41-2272 exerce esta ação.

Buscando elucidar o efeito do BAY 41-2272 em curva de CaCl_2 , utilizamos plaquetas isoladas de coelho marcadas com um composto que emite fluorescência quando interage com íons cálcio (Fura-2AM), para melhor avaliar a movimentação intracelular do cálcio. Nossos resultados mostraram que a estimulação de plaquetas com trombina provoca um grande influxo de cálcio para o meio intracelular comparado com os níveis basais, como esperado. O tratamento com BAY 41-2272, na concentração mais elevada (10 μM), reduziu significativamente o aumento da concentração de cálcio no meio intracelular, mostrando que este composto impede o influxo de cálcio neste tipo celular. Entretanto, diferentemente do que vimos para o detrusor, o tratamento com ODQ reverteu completamente a inibição provocada pelo BAY 41-2272. Isto sugere que o efeito inibitório

no influxo de cálcio em plaquetas de coelho é totalmente dependente da produção de GMPc. A diferença de resposta encontrada no detrusor e em plaquetas pode ser explicada pela participação de determinados canais de cálcio na resposta funcional destes tipos celulares. Em plaquetas humanas, verificou-se que a mobilização de cálcio interno parece ser muito mais importante para a função plaquetária que o influxo de cálcio do meio extracelular, por canais voltagem dependentes (Sage, 1997). Diferentemente, a contração do detrusor, parece depender quase exclusivamente do influxo de cálcio do meio externo, como mostrado em estudo de *patch-clamp* no qual se verificou que a principal fonte de cálcio para o aumento dos níveis intracelulares é o meio extracelular (Ganitkevich & Isenberg, 1992).

5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que o estimulador da GCs independente de NO, BAY 41-2272, produz relaxamento em detrusor isolado de camundongos, coelhos e ratos de maneira concentração dependente. Em detrusor de coelho, o relaxamento produzido pelo BAY 41-2272 envolve a produção de GMPC e influxo de cálcio. A resposta relaxante produzida pelo BAY 41-2272 pode ter grande potencial terapêutico para tratar distúrbios da bexiga urinária como a síndrome da bexiga hiperativa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn*. v. 21, n. 2, p. 167-78, 2002
- Adelstein RS, Hathaway DR. Role of calcium and cyclic adenosine 3':5' monophosphate in regulating smooth muscle contraction. Mechanisms of excitation-contraction coupling in smooth muscle. *Am J Cardiol*. v. 44, n. 5, p. 783-7, 1979.
- Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. v. 84, n. 3, p. 935-86, 2004.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 74, n. 8, p. 3203-7, 1977.
- Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, et al. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J Urol*. 1998 Jun;159(6):2164-71.
- Barakat JS, Teixeira CE, Okuyama CE. et al. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol*. v. 477, p. 163-9, 2003.
- Batra S, Sjögren C, Andersson KE, et al. M. Source of calcium for contractions induced by depolarization and muscarinic receptor stimulation in rabbit urinary bladder. *Acta Physiol Scand*. v. 130, n. 4, p. 545-51, 1987.
- Bawankule DU, Sathishkumar K, Sardar KK. et al. BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine]-induced dilation in ovine pulmonary artery: role of sodium pump. *J Pharmacol Exp Ther*. v. 314, n. 1, p. 207-13, 2005.
- Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H. et al. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol*. v. 1, p. 1-12, 2001.
- Birder LA, de Groat WC. Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol*. v. 4, n. 1, p. 46-54, 2007.

- Borges de Oliveira-Junior E, Thomazzi SM, Rehder J, et al. Effects of BAY 41-2272, an activator of nitric oxide-independent site of soluble guanylate cyclase, on human NADPH oxidase system from THP-1 cells. *Eur J Pharmacol.* v. 567, n 1-2, p. 43-49, 2007.
- Bradley AB, Morgan KG. Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin. *J Physiol.* v. 385, p. 437-48, 1987.
- Braverman AS, Tibb AS, Ruggieri MR Sr. M2 and M3 muscarinic receptor activation of urinary bladder contractile signal transduction. I. Normal rat bladder. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 316, n. 2, p. 869-74, 2006.
- Burnett AL, Calvin DC, Chamness SL. et al. Urinary bladder urethral sphincter dysfunction in mice with targeted disruption on neural nitric oxide synthase models idiopathic voiding disorders in humans. *Nature Medicine*, v.3, pp. 571-574, 1997.
- Cellek S, Kasakov L, Moncada S. Inhibition of nitrenergic relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase. *Br J Pharmacol.* v. 118, n, 1, p. 137-40, 1996.
- Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 99, p. 8306-11, 2002.
- De Groat WC. Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol.* v. 147, Suppl 2, p. S25-40, 2006.
- De Groat, W.C., Dowine J. W., Levin R. M. et al. Basic neurophysiology and neuro pharmacology. In: *Incontinence. 1st International Consultation on Incontinence*, Monaco, June 28 – July 1, 1998. Edited by P. Abrams, S Khoury and A Wein. Plymouth, United Kingdom: Plymbridge Distributors, Ltd., p. 107, 1999.
- Fathian-Sabet B, Bloch W, Klotz T. et al. Localization of constitutive nitric oxide synthase isoforms and the nitric oxide target enzyme soluble guanylyl cyclase in the human bladder. *J Urol*, v. 165, pp. 1724, 2001.
- Fleishman M, Schneider T, Fetscher C, et al. Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. II. Protein kinases. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 308, n. 1, p. 54-8, 2004.

- Foerster J, Harteneck C, Malkewitz J, Schultz G, Koesling D. A functional hemebinding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini alpha 1 and beta subunits. *Eur J Biochem* v. 240, p. 380-6, 1996.
- Fujiwara M, Andersson K, Persson K. Nitric oxide-induced cGMP accumulation in the mouse bladder is not related to smooth muscle relaxation. *Eur J Pharmacol.* v. 401, n. 2, p. 241-50, 2000.
- Ganitkevich VY, Isenberg G. Contribution of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release to the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in myocytes from guinea-pig urinary bladder. *J Physiol.* v. 458, p. 119-37, 1992.
- Gosling J. The structure of the bladder and urethra in relation to function. *Urol Clin North Am.* v. 6, n. 1, p. 31-38, 1979.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* v. 260, n. 6, p. 3440-50, 1985.
- Hobbs AJ, Ignarro LJ. Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol.* v. 269, p. 134-48, 1996.
- Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sc.* v. 18. p. 484-91, 1997.
- Hobbs AJ, Moncada S. Antiplatelet properties of a novel, non-NO-based soluble guanylate cyclase activator, BAY 41-2272. *Vascul Pharmacol.* v. 40, n. 3, p. 149-54, 2003.
- Hofmann F, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P. cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp Pharmacol.* v. 191, p.137-62, 2009.
- Johansson R, Pandita RK, Poljakovic M, Garcia-Pascual A, De Vente J, Persson K. Activity and expression of nitric oxide synthase in the hypertrophied rat bladder and the effect of nitric oxide on bladder smooth muscle growth. *J Urol.* v. 168, n.6, p. 2689-94, 2002.
- Karaki H, Ozaki H, Hori M, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev.* v. 49, p. 157-230, 1997.
- King JA, Huddart H, Staff WG. Effect of choline ester analogues, noradrenaline and nifedipine on normal and hypertrophied human urinary bladder detrusor muscle. *Gen Pharmacol.* v. 30, n. 1, p. 131-6, 1998.

- Lagaud GJ, Randriamboavonjy V, Roul G, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanism of Ca^{2+} release and entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. *Am J Physiol.* v. 276, n. 1, p. 300-8, 1999.
- Longhurst PA, Briscoe JA, Rosenberg DJ, et al. *Br J Pharmacol.* v. 121, n. 8, p. 1665-72, 1997.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* v. 52, p. 375-414, 2000.
- Masuda H, Okuno T, Suzuki M, Kihara K, Goto M, Azuma H. Different distribution of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase activities in the detrusor and proximal urethra of the rabbit. *J Urol.* v. 168, n. 5, p. 2286-90, 2002.
- Milsom I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thüroff J, Wein AJ. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU Int.* 2001 Jun;87(9):760-6.
- Mónica FZ, Bricola AA, Báú FR, Freitas LL, Teixeira SA, Muscará MN, Abdalla FM, Porto CS, De Nucci G, Zanesco A, Antunes E. Long-term nitric oxide deficiency causes muscarinic supersensitivity and reduces beta(3)-adrenoceptor-mediated relaxation, causing rat detrusor overactivity. *Br J Pharmacol.* v. 153, n. 8, p. 1659-68, 2008.
- Moon A. Influence of nitric oxide signalling pathways on pre-contracted human detrusor smooth muscle in vitro. *BJU Int.* v. 89, n. 9, p. 942-9, 2002.
- Moro MA, Russel RJ, Celtek S, et al. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 93, n. 4, p. 1480-5, 1996.
- Müllershausen F, Russwurm M, Friebe A, Koesling D: Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272. *Circulation.* v. 109, p. 1711-3, 2004.
- Murthy KS, Zhou H, Grider JR, Brautigan DL, Eto M, Makhlouf GM.. Differential signaling by m3 and m2 receptors in smooth muscle: m2-mediated inactivation of MLCK via Gi_3 , Cdc42/ Rac1, and PAK1, and m3-mediated MLC20 phosphorylation via Rho kinase/ MYPT1 and PKC/CPI-17 pathways. *Biochem. J.* v. 374, p. 145–55, 2003.

- Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* v. 268, n. 4, p. C799-822, 1995.
- Olson LJ, Knych ET Jr, Herzig TC, Drewett JG. Selective guanylyl cyclase inhibitor reverses nitric oxide-induced vasorelaxation. *Hypertension.* v. 29, n. 1 Pt 2, p. 254-61, 1997.
- Persson K, Andersson KE. Nitric oxide and relaxation of pig lower urinary tract. *Br J Pharmacol.* v. 106, n. 2, p. 416-22, 1992.
- Persson K, Igawa Y, Mattiasson A, Andersson KE. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway in the rat lower urinary tract in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.* v. 107, n. 1, p. 178-84, 1992.
- Persson K, Poljakovic M, Johansson K. et al. Morphological and biochemical investigation of nitric oxide synthases and related enzymes in the rat and pig urothelium. *J Histochem Cytochem.* v. 47, p. 739, 1999.
- Persson K, Pandita RK, Aszòdi A, Ahmad M, Pfeifer A, Fässler R, Andersson KE. Functional characteristics of urinary tract smooth muscles in mice lacking cGMP protein kinase type I. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v. 279, n. 3, p. 1112-20, 2000.
- Petkov, GV, Nelson, MT. Differential regulation of Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels by {beta}-adrenoceptors in guinea pig urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* v. 288, p. 1255– 1263, 2005.
- Poladia DP, Bauer JA. Nitric oxide in the urinary bladder: involvement of auto-relaxation. *Nitric Oxide.* v. 10, n. 1, p. 51-2, 2004.
- Pollock WK, Irvine RF, Rink TJ. Free Ca²⁺ requirements of agonist-induced thromboxane A₂ synthesis in human platelets. *Eur J Pharmacol.* v. 132, n. 2-3, p. 309-12, 1986
- Priviero FB, Baracat JS, Teixeira CE. et al. Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide independent soluble guanylate cyclase activator. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* v. 32, p. 728-34, 2005.
- Rivero-Vilches F, de Frutos S, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D, Saura M. Guanylate cyclases: physiological processes mediated by cyclic GMP. *Nefrologia.* v. 21, p. 233-9, 2001.

- Sage SO. The Wellcome Prize Lecture. Calcium entry mechanisms in human platelets. *Exp Physiol*. v. 82, n. 5, p. 807-23, 1997.
- Schneider T, Fetscher C, Kroke S, et al. Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of human urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther*. v. 309, n. 3, p. 1148-53, 2004.
- Seguchi H, Nishimura J, Zhou Y, Niino N, Kumazawa J, Kanaide H. Expression of beta3-adrenoceptors in rat detrusor smooth muscle. *J Urol*. v. 159, n. 6, p. 2197-201, 1998.
- Sigala S, Mirabella G, Peroni A, et al. Differential gene expression of cholinergic muscarinic receptor subtypes in male and female normal human urinary bladder. *Urology*. v. 60, p. 719-725, 2002.
- Smet PJ, Jonavicius J, Marshall VR, de Vente J. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience*. v. 71, n. 2, p. 337-48, 1996.
- Somlyo AP, Somlyo AV. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*. v. 83, p. 1325-58, 2003.
- Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C. et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature*. v. 410, p. 212-5, 2001.
- Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, Abrams P, Herzog AR, Corey R, Hunt TL, Wein AJ. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol*. v. 20, n. 6, p. 327-36, 2003.
- Straub A, Stasch JP, Alonso-Alija C. et al. NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett*. v. 11, p. 781-4, 2001.
- Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC, Adak SJ. Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, n. 28, p. 16841-5, 2004.
- Takahashi R, Nishimura J, Hirano K, et al. Ca^{2+} sensitization in contraction of human bladder smooth muscle. *J Urol*. v. 172, n. 2, p. 748-52, 2004.

- Tanaka Y, Horinouchi T, Koike K. New insights into beta-adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* v. 32, n. 7, p. 503-14, 2005.
- Teixeira CE, Bento AC, Lopes-Martins RA, Teixeira SA, von Eickstedt V, Muscará MN, Arantes EC, Giglio JR, Antunes E, de Nucci G. Effect of Tityus serrulatus scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitrergic nerve fibres. *Br J Pharmacol.* v. 123n. 3, p. 435-42, 1998
- Teixeira CE, Priviero FB, Claudino MA. et al. Stimulation of soluble guanylyl cyclase by BAY 41-2272 relaxes anococcygeus muscle: interaction with nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* v. 530, p. 157-65, 2006c.
- Teixeira CE, Priviero FB, Todd J Jr, Webb RC. Vasorelaxing effect of BAY 41-2272 in rat basilar artery: involvement of cGMP-dependent and independent mechanisms. *Hypertension.* v. 47, p. 596-602, 2006b.
- Teixeira CE, Priviero FB, Webb RC Molecular mechanisms underlying rat mesenteric artery vasorelaxation induced by the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulators BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1Hpyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-4-ylamine] and YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole]. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 317, p. 258-66, 2006a.
- Teixeira CE, Priviero FB, Webb RC Effects of BAY 41-2272 on smooth muscle tone, soluble guanylyl cyclase activity and NADPH oxidase activity/expression in corpus cavernosum from wild-type, neuronal and endothelial NOS null mice. *J Pharmacol Exp Ther* DOI:10.1124/jpet.107.124594, 2007.
- Theobald RJ Jr. The effect of NG-monomethyl-L-arginine on bladder function. *Eur J Pharmacol.* v. 311, n. 1, p. 73-8, 1996.
- Thomazzi SM, Moreira J, De Nucci G, Antunes E. Inhibitory effects on human eosinophil chemotaxis in vitro by BAY 41-2272, an activator of nitric oxide-independent site of soluble guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol.* v. 69, n. 6, p. 875-882, 2005.
- Toque HA, Priviero FB, Teixeira CE, Claudino MA, Baracat JS, Fregonesi A, De Nucci G, Antunes E. Comparative Relaxing Effects of Sildenafil, Vardenafil, and Tadalafil in

- Human Corpus Cavernosum: Contribution of Endogenous Nitric Oxide Release. *Urology*. 2009. doi:10.1016/j.urology.2008.12.056
- Turner WH, Brading AF. Smooth muscle of the bladder in the normal and the disease state: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Pharmacol Ther*, v. 75, n. 2, pp. 77-110, 1997.
- Uchida H, Shishido K, Nomiya M. et al. Involvement of cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms in the relaxation of rat detrusor muscle via beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*. v. 22, n. 518, p. 195-202, 2005.
- Visser AJ, Van Mastrigt R. Simultaneous recording of mechanical and intracellular electrical activity in human urinary bladder smooth muscle. *BJU Int*. v. 86, n. 1, p. 113-20, 2000.
- Yamaguchi O, Shishido K, Tamura K, et al. Evaluation of mRNAs encoding muscarinic receptor subtypes in human detrusor muscle. *J Urol*. v. 156, p. 1208–1213, 1996.
- Yamaguchi O. Beta3-adrenoceptors in human detrusor muscle. *Urology*. v. 59, n.5, p. 25-9, 2002.
- Yamazaki Y, Takeda H, Akahane M. et al. Species differences in the distribution of beta-adrenoceptor subtypes in bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol*. v. 124, n.3, p. 593-9, 1998.
- Yanai Y, Hashitani H, Hayase M, Sasaki S, Suzuki H, Kohri K. Role of nitric oxide/cyclic GMP pathway in regulating spontaneous excitations in detrusor smooth muscle of the guinea-pig bladder. *Neurourol Urodyn*. v. 27, n. 5, p. 446-53, 2008.
- Zanfolin M, Faro R, Araujo EG. et al. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. v. 47, p. 391-5, 2006.
- Zografos P, Li JH, Kau ST. Comparison of the in vitro effects of K⁺ channel modulators on detrusor and portal vein strips from guinea pigs. *Pharmacology*. v. 45, n. 4, p. 216-30, 1992.