

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**ERICK DE TOLEDO GOMES** 

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DO INIBIDOR DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO, MK571 NA PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS QUE AUMENTAM OS NÍVEIS DE AMPC E GMPC EM BEXIGA URINÁRIA DE PORCO

CAMPINAS

# **ERICK DE TOLEDO GOMES**

# CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DO INIBIDOR DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO, MK571 NA PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS QUE AUMENTAM OS NÍVEIS DE AMPC E GMPC EM BEXIGA URINÁRIA DE PORCO

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Taufic Mónica Iglesias

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO ERICK DE TOLEDO GOMES, E ORIENTADO PELA PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> FABÍOLA TAUFIC MÓNICA IGLESIAS.

## CAMPINAS

2023

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

 Gomes, Erick de Toledo, 1993-Caracterização do efeito *in vitro* do inibidor dos transportadores de efluxo, MK571, na presença de substâncias que aumentam os níveis de AMPc e GMPc em bexiga urinária de porco / Erick de Toledo Gomes. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.
Orientador: Fabíola Taufic Mónica Iglesias. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
1. MK571. 2. Proteínas associadas à resistência a múltiplos medicamentos. 3. Bexiga. 4. AMP cíclico. 5. GMP cíclico. 1. Mónica, Fabíola Zakia, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

#### Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Characterization of the *in vitro* effect of the efflux transporter inhibitor, MK571, in the presence of substances that increase cAMP and cGMP levels in pig urinary bladder

Palavras-chave em inglês: MK571 Multidrug resistance-associated proteins Bladder Cyclic AMP Cyclic GMP Área de concentração: Farmacologia Titulação: Mestre em Farmacologia Banca examinadora: Fabíola Taufic Mónica Iglesias [Orientador] Carlos Renato Tirapelli Ana Paula Couto Davel Data de defesa: 17-10-2023 Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-8758-8876

<sup>-</sup> Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/3007257974170657

# COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ERICK DE TOLEDO GOMES

# ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> FABÍOLA TAUFIC MÓNICA IGLESIAS

MEMBROS TITULARES

1. PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> FABÍOLA TAUFIC MÓNICA IGLESIAS

- 2. PROF. DR. CARLOS RENATO TIRAPELLI
- 3. PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ANA PAULA COUTO DAVEL

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 17/10/2023

#### AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é resultado de uma jornada na pesquisa marcada por inúmeros desafios, mas também de conquistas obtidas. Portanto, desejo expressar meus mais profundos agradecimentos a todos aqui mencionados por desempenharem papéis importantes para que essa dissertação possa ter sido concluída.

Primeiramente, expresso meus profundos agradecimentos à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Taufic Mónica Iglesias, pela confiança depositada e pela oportunidade de enriquecer minha formação por estar sempre disponível para orientar, ensinar, discutir e permitir transmitir o aprendizado que aqui adquiri. Sua dedicação à pesquisa é verdadeiramente inspiradora, pois não apenas ofereceu orientação, mas também providenciou a infraestrutura e os recursos necessários para a conclusão deste trabalho com excelência e precisão.

Agradeço a todos os docentes do Departamento de Farmacologia por generosamente partilharam seus conhecimentos, os quais foram de extrema relevância para a minha formação acadêmica e aos funcionários do Departamento pela atenção, dedicação e contribuírem para o pleno funcionamento do departamento, em especial à Gláucia, pela amizade, dedicação e prontidão em resolver imprevistos, garantindo a fluidez dos projetos.

Agradeço aos amigos do laboratório, especialmente à Gabriela Passos, Mariana Gonçalves, Ana Carolina Ghezzi, Guilherme Leonardi e Débora Helfstein, por todo ensinamento técnico e teórico compartilhados, os quais contribuíram fortemente para que esse trabalho pudesse ter sido concluído. Agradeço aos meus amigos do Departamento, por todo o conhecimento e experiências partilhados, pelas conversas e, principalmente, pela amizade construída nesses anos.

À minha família, pelo apoio e amor, e graças a vocês, pai e mãe, é que foi possível eu estar concluindo mais uma etapa da minha formação acadêmica, pois sempre me incentivaram a dar meu melhor e nunca parar de me aperfeiçoar. Ao Elielton, meu amor, por todo afeto, companheirismo, paciência, e principalmente por todo apoio dado durante esse percurso. A vocês, minha eterna gratidão.

Por fim, expresso minha gratidão pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, 001), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2017/15175-1) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, bolsa nº 131106/2021-0).

#### RESUMO

Introdução: Transportadores de efluxo são proteínas transmembranares que podem transportar substâncias para o meio intra- ou extracelular e têm relevância clínica devido à resistência a fármacos ou ao transporte de substâncias endógenas. MRP4 e MRP5 (codificados pelos genes ABCC4 e ABCC5) têm como substrato, dentre outros mediadores endógenos, os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, essenciais como segundos mensageiros intracelulares. MK571, classificado como antagonista dos receptores de leucotrieno e como inibidor não seletivo dos transportadores MRP4 e MRP5 é proposto como ferramenta farmacológica para avaliar tais atividades. A justificativa deste trabalho baseia-se, primeiramente, em resultados que demonstraram que o MK571 potencializou o relaxamento de substâncias que aumentam os níveis de nucleotídeos no trato geniturinário de camundongos, além da expressão de MRP4 e co-expressão de MRP5 e PDE5 em bexiga humana. A hipótese é que o uso do MK571, em presença de substâncias que elevam os níveis de nucleotídeos cíclicos na bexiga, cause aumento intracelular desses nucleotídeos, potencializando o relaxamento. Metodologia: Foram usadas bexigas urinárias isoladas de porcos. Foi avaliada a expressão gênica de ABCC4 e ABCC5, imunomarcação de MRP4 e curvas concentração-resposta de substâncias que aumentam os níveis de AMPc e GMPc, na ausência e presença de MK571 20 µM. Foi realizada a quantificação de nucleotídeos cíclicos intracelulares e extracelulares, além da expressão proteica de p-VASP<sup>Ser239</sup> e VASP sob estímulo de tadalafil + BAY 41-2272, com ou sem MK571 20 µM. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, N= 5-7 animais. Resultados: O gene ABCC4, mas não o ABCC5, está expresso em amostras de bexiga urinária de porco. A análise qualitativa da proteína MRP4 mostrou imunomarcação no detrusor, urotélio, estruturas neurais no interstício e em fibroblastos, com expressão equivalente tanto nos fibroblastos quanto nas estruturas neurais, porém, mais elevada em comparação ao urotélio e ao músculo liso, onde a expressão é similar. Os relaxamentos induzidos pelo MK571 e montelucaste foram de, aproximadamente, 26% e 25%, respectivamente. Montelucaste não potencializou relaxamento frente ao cilostazol ou tadalafil. MK571 potencializou resposta frente a inibidores de PDEs, como sildenafil, tadalafil e cilostazol, os quais induziu um deslocamento significativo das curvas, em aproximadamente 2.8, 3.9 e 4.5 vezes para a esquerda, respectivamente. As substâncias que aumentam os níveis de AMPc não exibiram um aumento correspondente em suas respostas na presença de MK571. Verificamos que as concentrações intracelulares e extracelulares de AMPc aumentam em aproximadamente 15,8 e 12 vezes, respectivamente, após 60 minutos no estímulo com forscolina, enquanto as concentrações intracelulares e extracelulares de GMPc aumentam em aproximadamente 8,2 e 3,4 vezes, respectivamente, após 60 minutos no estímulo com tadalafil + BAY 41-2272. O MK571 promoveu um aumento significativo na razão p-VASP Ser<sup>239</sup>/VASP, marcador da atividade da proteína quinase G, em tecidos estimulados com tadalafil + BAY 41-2272, em relação ao tecido estimulado sem MK571. **Conclusão:** Este é o primeiro trabalho a demonstrar a expressão do transportador de efluxo MRP4 em bexiga urinária de porco e que possui atividade biológica nesse tecido. Os dados aqui apresentados abrem novos caminhos para futuros estudos com modelos experimentais de bexiga hiperativa e amostras de bexiga humana para validar o potencial terapêutico na utilização concomitante de inibidor dos transportadores de efluxo e medicamentos já em uso na prática clínica, como sildenafil, tadalafil e cilostazol.

Palavras-chave: MK571, Proteínas associadas à resistência a múltiplos medicamentos, bexiga, AMP cíclico, GMP cíclico.

#### ABSTRACT

Introduction: Efflux transporters are transmembrane proteins that can transport substances into or out of cells and have clinical relevance due to drug resistance or the transport of endogenous substances. MRP4 and MRP5 (encoded by the genes ABCC4 and ABCC5) have, among other endogenous mediators, cyclic nucleotides, cAMP and cGMP, which are essential as intracellular second messengers. MK571, classified as a leukotriene receptor antagonist and a non-selective inhibitor of MRP4 and MRP5 transporters, is proposed as a pharmacological tool to evaluate such activities. The justification for this study is primarily based on results that demonstrated that MK571 potentiated the relaxation of substances that increase nucleotide levels in the genitourinary tract of mice, as well as the expression of MRP4 and co-expression of MRP5 and PDE5 in human bladder. The hypothesis is that the use of MK571 in the presence of substances that elevate cyclic nucleotide levels in the bladder causes intracellular increase of these nucleotides, enhancing relaxation. Methodology: isolated pig urinary bladders were used. Gene expression of ABCC4 and ABCC5, MRP4 immunostaining, and concentration-response curves of substances that increase cAMP and cGMP levels were evaluated in the absence and presence of MK571 20 µM. Intracellular and extracellular cyclic nucleotide quantification was performed, along with protein expression of p-VASP<sup>Ser239</sup> and VASP under tadalafil + BAY 41-2272 stimulation, with or without MK571 20 µM. Results were expressed as mean ± standard deviation, N= 5-7 animals. Results: Gene ABCC4, but not ABCC5, is expressed in pig urinary bladder samples. Qualitative analysis of MRP4 protein showed immunostaining in the detrusor, urothelium, neural structures in the interstitium, and fibroblasts, with equivalent expression in fibroblasts and neural structures but higher compared to urothelium and smooth muscle, where expression is similar. Relaxations induced by MK571 and montelukast were approximately 26% and 25%, respectively. Montelukast did not potentiate relaxation in the presence of cilostazol or tadalafil. MK571 potentiated responses to PDE inhibitors such as sildenafil, tadalafil, and cilostazol, inducing a significant leftward shift in the concentration-response curves, approximately 2.8, 3.9, and 4.5 times, respectively. Substances that increase cAMP levels did not show a corresponding increase in their responses in the presence of MK571. We found that intracellular and extracellular concentrations of cAMP increased approximately 15.8- and 12-fold, respectively, after

60 minutes of forskolin stimulation, while intracellular and extracellular cGMP concentrations increased approximately 8.2- and 3.4-fold, respectively, after 60 minutes of tadalafil + BAY 41-2272 stimulation. MK571 significantly increased the p-VASP Ser239/VASP ratio, a marker of protein kinase G activity, in tissues stimulated with tadalafil + BAY 41-2272 compared to tissue stimulated without MK571. **Conclusion**: This is the first study to demonstrate the expression of the efflux transporter MRP4 in pig urinary bladder and its biological activity in this tissue. The data presented here open new avenues for future studies with experimental models of overactive bladder and human bladder samples to validate the therapeutic potential of concurrent use of efflux transporter inhibitors and medications already in clinical practice, such as sildenafil, tadalafil, and cilostazol.

Keywords: MK571, Multidrug resistance-associated proteins, bladder, cyclic AMP, cyclic GMP.

# **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Contração da musculatura lisa da bexiga20
Figura 2: Relaxamento da musculatura lisa da bexiga21
Figura 3: Possíveis vias de segregação dos nucleotídeos cíclicos no interior da célula
Figura 4: Expressão de RNAm do ABCC4 em fragmentos de bexiga inteira, detrusor
isolado, mucosa isolada e ureter de porco
Figura 5: Imagens representativas da análise por imunohistoquímica para detecção
do transportador de efluxo MRP4 e controle negativo em bexiga isolada de porco40
Figura 6: Curva concentração-resposta ao MK571, montelucaste e relaxamento pelo
DMSO e curva de controle de tônus em fragmentos de bexiga isolada de porco41
Figura 7: Curva concentração-resposta ao tadalafil em fragmentos de bexiga isolada
de porco na presença e ausência de montelucaste (1 µM)42
Figura 8: Curva concentração-resposta ao cilostazol em fragmentos de bexiga isolada
de porco na presença e ausência de montelucaste (1 µM)42
Figura 9: Curva concentração-resposta ao SNP em fragmentos de bexiga isolada de
porco na presença e ausência de MK571 (20 µM)43
Figura 10: Curva concentração-resposta ao BAY 41-2272 em fragmentos de bexiga
isolada de porco na presença e ausência de MK571 (20 $\mu$ M)44
Figura 11: Curva concentração-resposta ao 8-Br-cGMP em fragmentos de bexiga
isolada de porco na presença e ausência de MK571 (20 $\mu$ M)44
Figura 12: Curva concentração-resposta ao sildenafil em fragmentos de bexiga
isolada de porco na presença e ausência de MK571 (20 $\mu$ M)45
Figura 13: Curva concentração-resposta ao tadalafil em fragmentos de bexiga isolada
de porco na presença e ausência de MK571 (20 µM)46
Figura 14: Curva concentração-resposta ao cilostazol em fragmentos de bexiga
isolada de porco na presença e ausência de MK571 (20 $\mu$ M)47
Figura 15: Curva concentração-resposta ao rolipram em fragmentos de bexiga isolada
de porco na presença e ausência de MK571 (20 μM)48
Figura 16: Curva concentração-resposta ao EHNA em fragmentos de bexiga isolada
de porco na presença e ausência de MK571 (20 µM)48
Figura 17: Curva concentração-resposta a forscolina em fragmentos de bexiga
isolada de porco na presença e ausência de MK571 (20 $\mu$ M)49

Figura 18: Curva concentração-resposta ao 8-Br-cAMP em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença e ausência de MK571 (20 µM) ......50 Figura 19: Curva concentração-resposta ao CL316,243 em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença e ausência de MK571 (20 µM) ......51 Figura 20: Curva concentração-resposta ao fenoterol em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença e ausência de MK571 (20 µM) ......51 Figura 21: Curva concentração-resposta ao salbutamol em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença e ausência de MK571 (20 µM) ......52 Figura 22: Quantificação intracelular e extracelular de AMPc em fragmentos de bexiga isolada de porco estimulados com forscolina (30 µM) e tadalafil (3 µM) + BAY 41-2272 (10 µM)......53 Figura 23: Quantificação intracelular e extracelular de GMPc em fragmentos de bexiga isolada de porco estimulados com forscolina (30 µM) e tadalafil (3 µM) + BAY 41-2272 (10 µM)......54 Figura 24: Razão da expressão proteica da p-VASP<sup>Ser239</sup> pela VASP total em fragmentos de bexiga isolada de porco estimulados com tadalafil (3 µM) e BAY 41-2272 (10 µM) na ausência e presença de MK571 (20 µM) ......55

# LISTA DE TABELAS

Tabela 19: Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para fenoterol na ausênci	а
e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco5	2
Tabela 20: Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para salbutamol na ausênci	а
e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco5	2

# LISTA DE DROGAS E REAGENTES

# **SUBSTÂNCIA** 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX) 8-Bromoadenosina 3',5'-cíclico monofosfato (8-Br-cAMP) 8-Bromoguanosina 3',5'-cíclico monofosfato (8-Br-cGMP) Acetonitrila Ácido Fórmico Albumina de Soro Bovino (BSA) BAY 41-2272 Bicarbonato de Sódio (NaHCO<sub>3</sub>) Carbacol Cilostazol Citrato de Sódio CL316.243 Clarity<sup>™</sup> Western ECL Substrate Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>) Cloreto de Potássio (KCI) Cloreto de Sódio (NaCl) Dimetilsulfóxido (DMSO) **EHNA Etanol Absoluto** Fenoterol Formaldeído Forscolina Fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Hematoxilina High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Inibidor de protease e fosfatase Kit de Transcrição Reversa de cDNA Laemmli buffer MK571 Montelucaste de sódio Nitroprussiato de sódio Normal Goat Serum Novolink<sup>™</sup> Polymer Detection Systems Peróxido de Hidrogênio 30% Reagente de Coloração de Proteínas (Bradford) Reagente TRIzol™ **RIPA** buffer Rolipram Sildenafil Sulfato de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>) SYBR™ Green PCR Master Mix Tadalafil β-Mercaptoetanol

# PROCEDÊNCIA

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

**Applied Biosystems** 

Leica Biosystems

Cayman Chemical

**Applied Biosystems** 

**Applied Biosystems** 

**Thermo Scientific** 

**Bio-Rad** 

Synth

Synth

J.T.Baker

**Bio-Rad** 

abcam

**Bio-Rad** 

Invitrogen

J.T.Baker

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Anatomia do trato urinário inferior, função e ciclo miccional	17
1.2 Fisiologia da bexiga	17
1.2.1 Fases do ciclo miccional	17
1.2.2 Anatomia da bexiga	17
1.2.3 Urotélio	17
1.2.3.1 Localização, classificação e divisão das camadas do urotélio	17
1.2.3.2 Funções do urotélio	18
1.2.3.3 Receptores expressos no urotélio	18
1.2.4 Inervação autonômica e somática da bexiga	18
1.2.4.1 Sinalização intracelular: componentes excitatórios	19
1.2.4.2 Sinalização intracelular: componentes inibitórios	20
1.3 Nucleotídeos cíclicos	21
1.3.1 Histórico	21
1.3.2 Mensageiros secundários e alvos	22
1.3.3 Vias de eliminação dos nucleotídeos cíclicos	23
1.3.3.1 Fosfodiesterases	23
1.3.3.2 Proteínas de Resistência à Múltiplas Drogas (MRPs)	23
1.3.4 Compartimentalização	24
1.4 MK571	25
1.5 A utilização de porco como modelo animal na pesquisa básica	27
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. METODOLOGIA	30
4.1 Animais	30
4.2 Avaliação da expressão gênica	30
4.3 Imunohistoquímica	31
4.4 Banho de órgão isolado	32
4.5 Quantificação intracelular e extracelular dos nucleotídeos cíclicos	33
4.5.1 Preparo das amostras	33
4.5.2 Análise por LC-MS/MS	34

# SUMÁRIO

4.5.3 Validação dos métodos analíticos35
4.6 Avaliação da expressão proteica35
4.7 Análise dos dados funcionais37
4.8 Delineamento estatístico37
<b>5. RESULTADOS</b>
5.1 Expressão gênica de ABCC4 e ABCC5 em bexiga urinária de porco39
<b>5.2 Localização do MRP4 em fragmentos de bexiga isolada de porco</b>
5.3 Efeitos do MK571, montelucaste e DMSO e curva de controle de tônus em
tecidos pré-contraídos com carbacol (CCh)40
5.4 Efeitos no relaxamento induzido por tadalafil e cilostazol na presença do
montelucaste41
5.5 Efeitos no relaxamento induzido por SNP, BAY 41-2272 e 8- Br-cGMP na
presença do MK57143
5.6 Efeitos no relaxamento induzido por sildenafil, tadalafil, rolipram,
cilostazol e EHNA na presença do MK57145
5.7 Efeitos no relaxamento induzido pela forscolina e 8-Br-cAMP na presença
do MK57149
5.8 Efeitos no relaxamento induzido por CL316,243, fenoterol e salbutamol na
presença do MK57150
5.9 Quantificação intra- e extracelular de AMPc e GMPc em tecidos
estimulados
5.10 Expressão proteica da p-VASP Ser <sup>239</sup> e VASP em fragmentos de bexiga
isolada de porco estimulados na ausência e presença do MK57154
6. DISCUSSÃO
7. SUMÁRIO DOS RESULTADOS
8. CONCLUSÃO
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> 62
<b>ANEXO 1</b>
<b>ANEXO 2</b>

# 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Anatomia do trato urinário inferior, função e ciclo miccional

O trato urinário inferior (TUI) é constituído pela bexiga e uretra, e desempenha funções essenciais no armazenamento e esvaziamento da urina produzida pelos rins (1). Essas funções são coordenadas por um complexo sistema de controle neural que envolve o cérebro, a medula espinhal e os gânglios periféricos (2). A alternância entre as fases de armazenamento e esvaziamento da urina é conhecida como ciclo miccional (3).

## 1.2 Fisiologia da bexiga

### 1.2.1 Fases do ciclo miccional

Durante a fase de enchimento, é essencial que a pressão dentro da bexiga seja menor do que a proveniente dos ureteres, o que leva ao relaxamento do músculo detrusor da bexiga e à contração da uretra e dos esfíncteres. Quando o limiar de acúmulo de urina é alcançado, sistemas aferentes, eferentes e mediadores liberados localmente entram em ação, resultando na contração do músculo detrusor da bexiga e no relaxamento da uretra e dos esfíncteres, levando à eliminação da urina acumulada (4, 5).

## 1.2.2 Anatomia da bexiga

A bexiga urinária é dividida em dois componentes principais: a região acima dos dois orifícios ureterais é denominada "corpo da bexiga", que é formada pelo músculo liso detrusor, e a região abaixo dos dois orifícios ureterais, chamada de "base da bexiga", que é formada pelo músculo trígono e pela junção uretrovesical (1). O músculo liso detrusor é revestido em sua face interna pelo urotélio e suburotélio, e na face externa, pela serosa (6).

## 1.2.3 Urotélio

1.2.3.1 Localização, classificação e divisão das camadas do urotélio

O urotélio reveste internamente a pelve renal, ureteres, bexiga e uretra proximal. É classificado como um epitélio estratificado, dividido em três camadas celulares distintas: camada superficial, formadas por células umbrela, que estão em contato direto com a urina; camada intermediária, formada por uma ou várias camadas de células, variando de espécie e; camada basal, formada por uma única camada de

células (6).

## 1.2.3.2 Funções do urotélio

A principal função do urotélio é formar uma barreira física contra patógenos, produtos de metabolismo e outros solutos presentes na urina, já que essa entra em contato com a pelve renal, ureteres e uretra, e é armazenada na bexiga por distintos períodos de tempo até que seja excretada, evitando que a urina atinja outros tecidos. Também é descrito que o urotélio atua como transdutor de sinal, incluindo a liberação de acetilcolina produzida no urotélio, compostos purinérgicos, prostaglandinas e óxido nítrico (NO) (6). Ferguson et al. (7) foi o primeiro a demonstrar que em resposta a distensão, o urotélio libera ATP. As prostaglandinas são liberadas em resposta ao estiramento do tecido, ao ATP (8) e à acetilcolina (9), como PGF2, PGD2, PGE2 e PGI2 (10, 11, 12, 13, 14), podendo modular funções nervosas e do músculo detrusor (15, 16), enquanto o NO atua modulando a produção de PGE2, inibindo-a (9).

#### 1.2.3.3 Receptores expressos no urotélio

Vários são os receptores expressos no urotélio de diferentes espécies, por exemplo: em roedores, são expressos todos os sete receptores P2X (P2X1-7), vários receptores P2Y, todos os cinco receptores muscarínicos acoplados à proteína G (CHRM1-5), e também subunidades dos receptores nicotínicos CHRNA3 e CHRNA7; em humanos são expressos os receptores P2XR7 nas células umbrela, P2RY1 e P2RY2 no urotélio da bexiga, e, embora controverso, P2RY6, além da expressão de CHRM1 e CHRM2. No urotélio ureteral humano, é expresso P2RX4 e P2Y1. Mesmo com numerosos estudos na literatura mostrando a existência de um sistema purinérgico presente no TUI, ainda não há uma compreensão concreta de quais vias são funcionais no urotélio (6).

#### 1.2.4 Inervação autonômica e somática da bexiga

A inervação do TUI é feita através de nervos parassimpáticos (originados da porção sacral), simpáticos (originados da porção superior lombar da medula espinhal e do gânglio mesentérico inferior), não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC) e somáticos (pudendo) (4).

Para a fase de esvaziamento vesical, quando ocorre a eliminação da urina armazenada na bexiga urinária, fibras parassimpáticas oriundas do nervo pélvico

liberam a acetilcolina (ACh), que ativa receptores muscarínicos, causando a contração do músculo detrusor e aumento na pressão intravesical. Em contrapartida, para o armazenamento da urina na bexiga urinária, fibras simpáticas oriundas do nervo hipogástrico liberam a noradrenalina (NA), que atua tanto em receptores  $\beta$ -adrenérgicos, promovendo o relaxamento do músculo detrusor, quanto em receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos no esfíncter uretral interno, levando a contração. O controle voluntário da continência urinária é feito através de fibras somáticas oriundas do nervo pudendo que contrai o esfíncter uretral externo através da liberação de ACh, que atua em receptores nicotínicos. (17).

### 1.2.4.1 Sinalização intracelular: componentes excitatórios

Os receptores muscarínicos encontram-se pela musculatura lisa do detrusor, sendo o subtipo M2 com maior prevalência, embora o subtipo M3 seja fundamental para contração (17). Os receptores M3 são metabotrópicos, ou seja, acoplados à proteína G, do subtipo q, e uma vez ativados pela ACh, promovem a ativação da fosfolipase C (PLC), gerando o trifosfato de Inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol bifosfato (PIP2). O IP3 atua em receptores específicos (IP3R) no retículo sarcoplasmático, resultando na liberação do cálcio para o citosol. O cálcio no citosol forma complexo com a calmodulina, o qual ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), promovendo a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC), gerando a contração. Outras vias independentes do cálcio também atuam na promoção da contração, como ativação da proteína quinase C (PKC) pelo DAG e ativação da rho-quinase, onde ambas levam a inibição da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), impedindo que ocorra a desfosforilação da cadeia leve de miosina fosforilada (p-MLC) auxiliando na manutenção da contração. Além disso, abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L na membrana do músculo detrusor contribuem para a contração (18, 19) (Figura 1).



Figura 1. Contração da musculatura lisa da bexiga. A ativação de receptores muscarínicos do subtipo M3 pela ACh leva a ativação de vias dependentes e independentes de cálcio. A via dependente do cálcio causa o aumento intracelular desse íon, levando a formação do complexo cálcio/calmodulina, resultando na fosforilação da MLC, gerando a contração, enquanto a via independente do cálcio, leva a diminuição da desfosforilação da MLC fosforilada. Já a ativação de receptores muscarínicos do subtipo M2 inibe a adenilato ciclase, auxiliando na manutenção da contração (17, 18).

## 1.2.4.2 Sinalização intracelular: componentes inibitórios

O relaxamento da musculatura detrusora decorre da formação de dois mensageiros secundários importantes: os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc. Assim, uma vez ativados, ambos os receptores β2- e β3-adrenérgicos, que são metabotrópicos, ou seja, acoplados à proteína G, do subtipo s, levam a ativação da adenilato ciclase (AC), aumentando os níveis de AMPc, o qual possui como alvos: canais iônicos regulados por nucleotídeos cíclicos (CNG), canais iônicos regulados por nucleotídeos cíclicos (CNG), canais iônicos regulados por nucleotídeos cíclicos (CNG), proteína de troca diretamente ativada por AMPc (EPAC) e a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (20). Outra via que também leva ao relaxamento é a via do óxido nítrico, onde o óxido nítrico (NO), o qual é sintetizado a partir de NO sintases, atua na guanilato ciclase solúvel (GCs), levando a formação do GMPc, o qual possui como alvos: fosfodiesterases (PDEs), CNG e a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (21, 22). Tanto a PKA quanto a PKG modular o relaxamento do detrusor, inibindo alvos como PLC, IP3R, MLCK e RhoA, ou também ativando canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância (23, 24) (**Figura 2**).



**Figura 2. Relaxamento da musculatura lisa da bexiga.** O relaxamento da bexiga resulta da produção dos nucleotídeos cíclicos AMPc, via ativação da adenilato ciclase por receptores β-adrenérgicos, e GMPc, via ativação da guanilato ciclase pelo NO. A ativação das proteínas quinases dependentes desses nucleotídeos cíclicos leva a fosforilação de vários alvos dentro da célula da musculatura lisa, promovendo o relaxamento (21, 22, 23, 24).

# 1.3 Nucleotídeos cíclicos

## 1.3.1 Histórico

O primeiro nucleotídeo cíclico a ser descrito na literatura foi o AMPc em 1958 por Sutherland & Rall (25). A descoberta do cAMP e sua função como segundo mensageiro desencadearam uma nova compreensão dos mecanismos de sinalização intracelular e lhes renderam o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1971. Nesse estudo, foi demonstrada a formação de um fator termoestável na presença de epinefrina e glucagon em homogenatos de fígado quando era incubado trifosfato de adenosina (ATP). Esse fator foi posteriormente isolado e caracterizado como um ribonucleotídeo de adenina, em diversos homogenatos de tecidos (25, 26). Em 1960, foram quimicamente sintetizados os nucleotídeos cíclicos de adenosina, guanosina, uridina e citidina (27). Assim, em 1963, o primeiro estudo a evidenciar a existência de GMPc produzido biologicamente foi realizado por Ashman et al., onde através da técnica de cromatografia, detectou a presença desse nucleotídeo cíclico em urina de rato, o qual seria produzido no interior das células, atravessaria as paredes celulares e seria eliminado através da urina por penetrar na membrana glomerular (28). Desde então, vários estudos foram realizados para caracterizar as atividades desses nucleotídeos cíclicos no sistema biológico, e embora as atividades do AMPc e GMPc tenham sido amplamente descritas, até 1976 acreditava-se que ambos atuariam como efetores biológicos de ações opostas, sendo um inibitório e o outro estimulatório (29).

#### 1.3.2 Mensageiros secundários e alvos

A transmissão de sinal pode ser desencadeada por ligantes que se ligam à receptores presentes na superfície ou dentro da célula, levando a formação de pequenas moléculas que se difundem rapidamente, também chamadas de mensageiros secundários ou segundos mensageiros, alterando a atividade de diversas proteínas intracelularmente. Assim, tanto o AMPc quanto o GMPc são descritos como mensageiros secundários (30) e desempenham papéis fundamentais como segundos mensageiros intracelulares, transmitindo sinais de diferentes estímulos extracelulares para o interior da célula (31).

O AMPc é gerado a partir da ativação da adenilato ciclase via receptores acoplados à Proteína G (RAPG) e tem como principal alvo a PKA. A PKA é um heterotetrâmero formado por duas subunidades reguladoras e duas subunidades catalíticas, quando em seu estado inativo, e uma vez que os níveis de AMPc se elevam, duas moléculas se ligam a cada subunidade regulatória, levando a uma mudança de conformação, liberando as subunidades catalíticas ativas (32, 33, 34).

O GMPc é gerado a partir da ativação de guanilato ciclase particulada ou solúvel, sendo a primeira via ligação de fatores peptídicos e a segunda pelo óxido nítrico. O GMPc tem como alvo a PKG, que é uma enzima dimérica com um domínio regulatório e um catalítico dentre da mesma cadeia polipeptídica em seu estado inativo, e após a elevação dos níveis de GMPc, duas moléculas se ligam a cada domínio regulatório, externando o domínio catalítico (35).

Essas subunidades catalíticas podem fosforilar até 500 proteínas intracelulares diferentes em resíduos de serina ou treonina no substrato alvo (32, 33, 34), como por exemplo a fosfoproteína estimulada por vasodilatador (do inglês, *vasodilator-stimulated phosphoprotein*, VASP), que por análises cinéticas foi demonstrado que o sítio Ser157 é mais rapidamente fosforilado pela PKA e o sítio Ser239 pela PKG. Portanto, a fosforilação da VASP nesses sítios pode ser utilizada para avaliar a atividade das vias de cada uma dessas proteínas (35, 36).

Além disso, é importante notar que a PKA e a PKG desempenham um papel crucial no controle da atividade da PDE5, enquanto a fosforilação da PKA pode, por exemplo, reduzir a atividade enzimática da PDE3 e PDE5 (37).

#### 1.3.3 Vias de eliminação dos nucleotídeos cíclicos

A inativação das atividades dos mensageiros secundários AMPc e GMPc é resultado da eliminação desses de suas vias de sinalização. Em adição ao estabelecido conhecimento de que os nucleotídeos cíclicos são degradados pelas PDEs, Jedlitschky, Burchell e Keppler (2000), demonstraram evidências de que o efluxo de AMPc e GMPc via Proteínas de Resistência à Múltiplas Drogas (MRPs) representa, também, a eliminação dos nucleotídeos cíclicos de suas vias de sinalização (38).

### 1.3.3.1 Fosfodiesterases

As PDEs são as enzimas responsáveis pela hidrólise dos anéis de fosfato cíclicos do AMPc e GMPc, gerando metabólitos que são inativos intracelularmente. Assim, o AMPc é convertido em 5'-AMP e o GMPc em 5'-GMP (39).

As PDEs são compostas de 21 genes e agrupadas em 11 famílias em mamíferos, tendo aquelas que são específicas para hidrólise de AMPc, no caso as PDEs 4, 7 e 8; as específicas para hidrólise do GMPc, as PDEs 5, 6 e 9 e as que não possuem especificidade, as PDEs 1, 2, 3, 10 e 11 (39). Tanto na bexiga humana quanto na de porco, foram detectadas expressões de praticamente todas as PDEs (40). Também foram caracterizadas as atividades das PDE1-5 nas bexigas humana (41) e suína (42) utilizando ferramentas farmacológicas disponíveis.

## 1.3.3.2 Proteínas de Resistência à Múltiplas Drogas (MRPs)

Os transportadores de efluxo são proteínas transmembranares que desempenham um papel vital na eliminação de substâncias do interior das células de diferentes organismos e possuem uma significativa relevância clínica, uma vez que estão associados à resistência a múltiplos fármacos em diversos organismos, como bactérias, fungos e células cancerígenas. Essa resistência ocorre devido à capacidade desses transportadores de eliminar agentes terapêuticos do interior das células, resultando na redução da eficácia dos tratamentos (43).

Uma das maiores famílias são dos transportadores ABC (do inglês, *ATP-binding cassette*) que utilizam a energia proveniente da hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP) para eliminar uma ampla variedade de compostos, incluindo toxinas, metabólitos, moléculas hidrofóbicas e fármacos para o meio extracelular (43, 44). Em humanos, os transportadores ABC consistem de 48 membros, divididos em 7

Foram identificadas expressões de MRP4 e MRP5 em várias linhagens celulares humanas, incluindo linhagens renais e da bexiga (45). Foi observada uma alta expressão e amplificação de MRP4 em uma linhagem celular resistente ao análogo de nucleosídeo, o anti-HIV PMEA (adefovir) (46). A transfecção de MRP5 em linhagens celulares conferiu resistência ao PMEA e a drogas anticâncer análogas às purinas (47). Por meio da técnica de imunolocalização, foi constatada a expressão de MRP4 (48), e MRP5 e PDE5 em diversos tecidos do trato geniturinário humano, além da co-expressão de MRP5 e PDE5 em células do urotélio e da lâmina na bexiga (49).

#### 1.3.4 Compartimentalização

A compartimentalização dos nucleotídeos cíclicos refere-se ao processo de segregação espacial do AMPc e GMPc dentro de compartimentos celulares específicos. Essa segregação ocorre por meio de mecanismos regulatórios que controlam a produção, degradação e difusão desses nucleotídeos em diferentes áreas da célula – e não somente para o meio extracelular - e permite que os sinais desses mensageiros secundários sejam precisamente direcionados para determinadas vias de sinalização e regiões celulares, garantindo uma resposta celular adequada (31) (**Figura 3**).

Em plaquetas humanas, foi observada alta expressão de MRP4 na membrana plasmática e nos grânulos densos. Assim, o MRP4 desempenhou um papel crucial como promotor da agregação plaquetária, transportando os nucleotídeos cíclicos para dentro dos grânulos densos e para o meio extracelular. A utilização de MK571 mostrou levar ao efeito antiagregante plaquetário, por promover o aumento dos nucleotídeos cíclicos no citosol (50). No epitélio intestinal de ratos, a utilização da linaclotida, ativadora da guanilato ciclase particulada (GCp), promoveu aumento intracelular de GMPc no epitélio. Além disso, houve um aumento na secreção de GMPc nas membranas apical e basolateral. O uso do MK571 resultou na inibição seletiva da secreção de GMPc apenas na membrana apical, sem afetar os níveis na

membrana basolateral. Adicionalmente, neste estudo, a proximidade entre o local de produção de GMPc e os transportadores de efluxo foi avaliada por meio de imunohistoquímica (51). Em aorta de ratos, observou-se que o MK571 promoveu um aumento do relaxamento em resposta ao isoproterenol, um agonista  $\beta$ -adrenérgico não-seletivo, e ao ANP, um ativador da GCp, mas não em resposta à ACh. Os autores levantaram a hipótese de que esse efeito de potencialização ocorreu devido à proximidade entre os transportadores de efluxo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos e da GCp, que são receptores e enzima de membrana, enquanto a GCs está presente no citosol. Portanto, o efeito do MK571 foi mais pronunciado nas drogas que atuam nesses alvos específicos (52).



Figura 3. Possíveis vias de segregação dos nucleotídeos cíclicos no interior da célula. As vias de segregação dos nucleotídeos cíclicos ainda não estão completamente compreendidas. No entanto, é reconhecido que esses nucleotídeos desempenham um papel crucial ao serem direcionados para uma variedade de locais distintos dentro da célula, o que resulta em uma regulação altamente precisa de suas atividades biológicas.

## 1.4 MK571

A busca por um antagonista de receptores de leucotrienos (LT), em específico o D4, devido ao papel desses na fisiopatologia da asma como o principal mediador responsável pela obstrução das vias aéreas, levou ao desenvolvimento pela Merck & Co de uma molécula potente e com alta afinidade ao LTD4, identificado

inicialmente como L-660,711 (MK571) (53).

Em humanos, através de um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, foi demonstrado que o MK571 é bem tolerado em doses até 1500 mg, via intravenosa ou 300 mg, três vezes ao dia, via oral por 11 dias (54). Embora o MK571 tenha sido considerado como uma droga promissora para o tratamento da asma em diversos estudos (53, 55, 56, 57, 58), seu desenvolvimento foi interrompido a favor do seu enantiômero R, o MK679 (59).

Estudos demonstraram que o leucotrieno LTC4, que é o conjugado do leucotrieno LTA4 com GSH, é transportado de maneira dependente de ATP para vesículas de membrana derivadas de células de mastocitoma de camundongos (60), células HL60/ADR com superexpressão de MRP (61) ou células HeLa transfectadas com MRP (62). Nesses estudos, a utilização do MK571 mostrou inibir o transporte do LTC4. Um estudo realizado por Gekeler et al. (1995) utilizando as linhagens de células com superexpressão de MRP HL60/AR e GLC4/ADR, a utilização de MK571 nas concentrações de 30 µM (HL60/AR) e 50 µM (GLC4/ADR) – concentrações que não interferem na proliferação celular – reverteu completamente a resistência a vincristina (agente quimioterápico) e com esses resultados apontaram que o MK571 pode ser utilizado como uma nova ferramenta estrutural para o desenvolvimento de modulares específicos dos MRPs (63).

Assim, a utilização do MK571 foi proposta como uma ferramenta farmacológica importante para avaliação das atividades dos transportadores de efluxo, em especial àqueles relacionados ao transporte dos nucleotídeos cíclicos. Sinha et al. (2013), demonstraram que fibroblastos de camundongos deficientes de MRP4 migram mais rápido (*ex vivo*) e a aplicação de MK571 em linhagens de células de fibroblastos aumentou rapidamente os níveis dos nucleotídeos cíclicos (64). Boydens et al. (2017), demonstraram que o MK571 potencializou as respostas relaxantes de substâncias que aumentam os níveis de GMPc em corpo cavernoso de camundongos *in vitro* (65). Bertollotto et al. (2018), demonstraram que o MK571 potencializou o relaxamento frente às substâncias que aumentam os níveis de AMPc em bexiga e GMPc em próstata e uretra de camundongos machos *in vitro* (66). Além disso, de Oliveira et al. (2023), demonstram que o tratamento de camundongos machos obesos com MK571 reverteu completamente as disfunções de relaxamento em corpos cavernosos *in vivo* e *in vitro*, devido ao aumento intracelular de GMPc, mas sem alterar significativamente os níveis de AMPc nesse tecido (67). Mendes-Silvério

et al. (2018), demostraram que o MK571 também potencializa o efeito antiagregante plaquetário do ativador da GCs, BAY 60-2770, através do aumento dos níveis intracelulares de GMPc, e uma maior fosforilação da p-VASP<sup>Ser239</sup> (68).

## 1.5 A utilização de porco como modelo animal na pesquisa básica

Na pesquisa básica, a utilização de modelos animais desempenha um papel essencial no desenvolvimento de novos tratamentos (69, 70). Nesse contexto, as similaridades anatômicas, estruturais e fisiológicas entre porcos e humanos tornam os porcos uma alternativa interessante como modelo animal (71, 72).

Nos últimos anos, tem crescido a preferência por empregar órgãos de porcos em xenotransplantes para pacientes humanos, buscando uma alternativa para reduzir a taxa de mortalidade entre aqueles que aguardam na lista de espera por um transplante. Essa opção é especialmente atrativa devido às notáveis similaridades fisiológicas e ao tamanho dos órgãos entre porcos e seres humanos. Essas características compartilhadas tornam ainda mais valiosa a utilização desses animais como fonte potencial de órgãos para transplante (73, 74, 75).

São preferíveis em relação ao desenvolvimento de novos fármacos para a definição da faixa terapêutica (76) e ensaios toxicológicos (77). Além disso, é importante ressaltar que aproximadamente 80% do sistema imunológico dos suínos assemelha-se ao dos seres humanos, em contraste aos 10% de semelhança encontrados entre camundongos e humanos. Essa marcante semelhança imunológica torna o porco um modelo animal altamente vantajoso em pesquisas na área de imunologia (72).

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A justificativa deste trabalho baseia-se, primeiramente, em resultados previamente publicados pelo grupo de pesquisa. Esses resultados demonstraram que o MK571 potencializou o relaxamento de substâncias que aumentam os níveis de nucleotídeos cíclicos na bexiga, próstata, corpo cavernoso e uretra de camundongos. Além disso, um estudo observou a expressão de MRP4, assim como a co-expressão de MRP5 e PDE5 na bexiga humana. Também foi levado em consideração que os suínos possuem várias similaridades anatômicas, estruturais e fisiológicas com os humanos. Assim a hipótese deste estudo é que, diante de substâncias que aumentam os níveis de nucleotídeos cíclicos na bexiga, o uso do inibidor não seletivo dos MRPs, o MK571, resultará em um aumento intracelular dos nucleotídeos cíclicos e, como consequência, na potencialização do efeito de relaxamento na bexiga.

# 3. OBJETIVOS

# **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito *in vitro* do inibidor dos transportadores de efluxo, MK571, na presença de substâncias que aumentam os níveis de AMPc e/ou GMPc em bexiga urinária isolada de porco.

# **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Avaliar a expressão gênica dos genes ABCC4 e ABCC5;
- 2. Avaliar por imunohistoquímica os locais de expressão do MRPs;
- Avaliar o relaxamento de substâncias que aumentam os níveis intracelulares de AMPc e GMPc na ausência e presença de MK571 20 μM;
- Quantificar os níveis intracelulares de AMPc e GMPc em tecidos estimulados com substâncias quem aumentam os níveis de AMPc e/ou GMPc;
- Avaliar a expressão proteica da p-VASP<sup>Ser239</sup> e VASP em tecidos estimulados com substâncias que aumentam os níveis de AMPc e/ou GMPc na ausência e presença de MK571 20 μM.

#### 4. METODOLOGIA

#### 4.1 Animais

As bexigas de porcos domésticos (*Sus domesticus*) foram obtidas de animais provenientes de abatedouro, de ambos os sexos, com 6 meses de idade e peso de aproximadamente 100 kg. Assim que foram isoladas, foram imediatamente colocadas em Solução Krebs-Henseleit gelada e em, no máximo, 1 hora foram processadas. Os protocolos foram submetidos e aprovados pelo CEUA/UNICAMP n° 5585-1/2020.

### 4.2 Avaliação da expressão gênica

O RNA total foi extraído de amostras de bexiga inteira, detrusor isolado, mucosa isolada e ureter de porco usando 1 mL do reagente TRIzol (Invitrogen Corp., California, EUA) para rompimento das células e 20% de clorofórmio para a extração. Após a adição dos reagentes, as amostras foram homogeneizadas por 15 segundos em um vórtex e mantidas por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13200 RPM por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa contendo o RNA foi cuidadosamente transferida para microtubos. Nestes microtubos contendo a fase aquosa, foram adicionados 500 µL de isopropanol 100% gelado e homogeneizados por inversão dos tubos 15 vezes, seguido de uma incubação de 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, ocorreu uma centrifugação a 13200 RPM por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado através da inversão dos tubos, mantendo somente o pellet formado no interior do microtubo. Para lavar o pellet, adicionou-se 1 mL de etanol 75% gelado, e as amostras foram centrifugadas a 11500 RPM por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado. Após a secagem do pellet em temperatura ambiente por 15 minutos, foi adicionado 50 µL de água DEPC para a reconstituição final do RNA.

A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria usando o espectrofotômetro NanoDrop<sup>™</sup> Lite (ThermoFisher Scientific, MA, EUA) em um comprimento de onda de 260 nm. A conversão utilizada foi que 1 unidade de absorbância óptica a 260 nm (1DO260 nm) corresponde aproximadamente a 40 µg de RNA por mL. Para estimar o grau de contaminação do RNA por proteínas, foi avaliada a relação entre as leituras obtidas a 260 nm e 280 nm. Valores da relação dentro da faixa de 1.8 a 2.1 foram considerados como indicativos de um RNA de boa qualidade.

A transcrição do cDNA foi realizada empregando a enzima transcriptase reversa (SuperScript III; Invitrogen, Maryland, EUA). A reação de RT-PCR foi conduzida utilizando Sybr Green Master Mix, e a detecção da amplificação em tempo real ocorreu no termociclador StepOnePlus<sup>™</sup> System (Applied Biosystems, California, EUA).

Foram utilizados iniciadores específicos para os genes *ABCC4* e *ABCC5*, que codificam MRP4 e MRP5, respectivamente, em suínos. Como controle interno da reação de amplificação e qualidade da amostra foi utilizado iniciador para gene endógeno *GAPDH*. Assim, foram utilizados os seguintes iniciadores:

rubela 1. Nelação de inteladores dinizados			
Genes	Fita molde e codificadora		
MRP4-F	5'-TTCGGAAAGCTGCAGCCGA-3'		
MRP4-R	5'-GGTAGACCTACCACGCGAC-3'		
MRP5-F	5'-CGAGGGAGGGTCTCTGGATT-3'		
MRP5-R	5'-CCACGAAGGCCTACAGTTGGA-3'		
GAPDH-F	5'-ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA-3'		
GAPDH-R	5'-GATCGAGTTGGGGCTGTGACT-3'		

Tabela 1. Relação de iniciadores utilizados

#### 4.3 Imunohistoquímica

Os fragmentos de bexiga de porco foram submetidos à fixação em formalina 10% por 48 horas. Após a fixação, as amostras foram lavadas em água corrente por 10 minutos e preservadas em álcool 70% até o processamento. Cortes de 5 µm foram obtidos a partir dos blocos de parafina contendo os fragmentos de bexiga de porco e foram colocados em lâminas previamente tratadas com silano. Em seguida, os cortes foram desparafinizados em estufa, submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena com água oxigenada 3% e, posteriormente, realizada a recuperação antigênica utilizando um banho em panela a vapor *T-fall* contendo tampão citrato de sódio 10 mM (pH=6.0) por 10 minutos, seguido de lavagem em água corrente. Para evitar reações inespecíficas, as lâminas foram bloqueadas com *Normal Serum Goat* 2,5% por 20 minutos. Na sequência, as amostras foram incubadas com o anticorpo anti-MRP4 por 2 horas, a temperatura ambiente. Posteriormente, foram incubadas com ImmPRESS® HRP Goat Anti-Rat IgG por 30 minutos, seguido de incubação com o anticorpo secundário Rabbit Anti-Goat IgG Antibody por 1 hora. Para a detecção, foi utilizado o sistema de revelação baseado em polímero NovoLink<sup>™</sup>

Polymer Detection System (cod # RE7260-K, Leica Biosystems). O sistema de revelação foi aplicado nas amostras, começando com a incubação do Post Primary por 30 minutos, seguida da incubação com o polímero por mais 30 minutos, conforme as instruções do fabricante. O DAB foi aplicado nas amostras por 5 minutos para revelar a presença do anticorpo, e então as lâminas foram coradas com hematoxilina por 5 minutos, proporcionando uma coloração de contraste nos núcleos celulares. Finalmente, as lâminas foram desidratadas e montadas em Entellan™ (Merck, MA, EUA). Foram realizados controles negativos para cada amostra, onde o anticorpo primário foi omitido e substituído pelos diluentes do anticorpo primário, com o objetivo de identificar possíveis reações de coloração de fundo.

Todas as amostras foram analisadas por fotomicrografia utilizando um microscópio trinocular Nikon Eclipse 50i acoplado a uma câmera digital 10MP CMOS (AmScope, EUA), sendo a análise qualitativa feita por dois observadores (cegos) e os resultados expressos como a média entre os dois observadores. Abaixo está a descrição dos anticorpos utilizados no processo:

Nome Concentração **Fabricante** Identificação Anticorpo Anti-MRP4 Antibody 1:100 abcam ab15602 primário Rabbit Anti-Goat IgG Anticorpo 1:250 Sigma AP106 secundário Antibody

Tabela 2. Relação dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica

Esta etapa foi realizada em colaboração com o laboratório do médico patologista, Prof. André Almeida Schneka.

#### 4.4 Banho de órgão isolado

Para a avaliação funcional do relaxamento, fragmentos de bexiga foram montadas em banho de órgão isolado, mantidos em Solução Krebs-Henseleit, continuamente borbulhado com mistura carbogênica de 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, à 37°C e pH 7,4, sendo presos de um lado no gancho fixo ao suporte, e o outro lado no transdutor de força. A aquisição dos dados foi realizada através do PowerLab<sup>™</sup> 4/30 (ADInstrument, MA, EUA) e o registro dos dados pelo software LabChart<sup>™</sup> (versão 8.0, ADInstrument, MA, EUA). Foram realizadas curvas concentração-resposta na ausência e presença de MK571 (20 µM) em tecidos pré-contraídos com carbacol (3

 $\mu$ M), sendo obtidos parâmetros de resposta-máxima (Emax) e potência (pEC50). A concentração de 3  $\mu$ M de carbacol foi escolhida através de ensaios prévios, onde essa concentração gerou 70% da Emax, e concentrações menores que 3  $\mu$ M não gerou amplitude suficiente (5 mN) para induzir relaxamento. As seguintes substâncias foram utilizadas: CL316,243 (agonista  $\beta$ 3-seletivo), fenoterol (agonista  $\beta$ 2-seletivo), salbutamol (agonista  $\beta$ 2-seletivo), forscolina (ativador da adenilato ciclase), 8-Br-AMPc (análogo estável do AMPc), 8-Br-GMPc (análogo estável do GMPc), BAY 41-2272 (estimulador da guanilato ciclase solúvel), SNP (doador de óxido nítrico), sildenafil (inibidor de PDE5), tadalafil (inibidor de PDE5), rolipram (inibidor de PDE4), cilostazol (inibidor de PDE3) e EHNA (inibidor de PDE2). Também foram realizadas curvas concentração-resposta na ausência e presença de montelucaste (1  $\mu$ M) em tecidos pré-contraídos com carbacol (3  $\mu$ M), sendo obtidos parâmetros de Emax e pEC50 frente ao tadalafil e cilostazol. Foram realizadas curvas controle frente ao MK571, montelucaste (antagonista de LTD4), DMSO e controle de tônus.

## 4.5 Quantificação intracelular e extracelular dos nucleotídeos cíclicos

## 4.5.1 Preparo das amostras

Para determinação dos níveis intracelulares e extracelulares de AMPc e GMPc, fragmentos de bexiga de porco com massa entre 150 e 163 mg foram mantidos em Solução Krebs-Henseleit, continuamente borbulhados com mistura carbogênica de 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, à 37°C e pH 7,4. Para a verificação da atividade dos transportadores de efluxo durante um período de 60 minutos, os tecidos foram incubados com IBMX 1 mM por 30 minutos, seguindo para estimulação na ausência (basal) e presença de tadalafil 3  $\mu$ M + BAY 41-2272 10  $\mu$ M e forscolina 30  $\mu$ M. Durante os minutos 5, 10, 20, 30, 45 e 60 após estímulo com as drogas citadas, foram coletados os fragmentos (intracelular) e também o sobrenadante (extracelular) para análise, em duplicata.

As amostras de tecidos de bexiga de porco foram purificadas por extração líquido-líquido. Alíquotas de 500 µL da solução de padrão interno (8-Br-AMPc e 8-Br-GMPc 100 ng/mL) em metanol foram adicionadas aos tubos contendo o tecido de bexiga congelado, os quais foram homogeneizados utilizando o homogeneizador BeadBlaster™ (20 ciclos de 6,0 m/s). Os tubos foram adicionados de 250 µL de água ultrapura e agitados por 5 min a 2.500 rpm em um agitador Bench Mixer (Benchmark®, Sayreville, USA). Em seguida, 600 µL da solução em suspensão foram transferidos

para tubos Eppendorf de 2,0 mL, os quais foram adicionados de 400  $\mu$ L de clorofórmio, agitados por 5 min a 2.500 rpm em um agitador Bench Mixer (Benchmark®, Sayreville, USA) e centrifugados a 14.000 rpm, por 15 min, à 4°C (Hettich® Universal 320 R, Darmstadt, Alemanha). Alíquotas de 400  $\mu$ L do sobrenadante (camada transparente superior) foram transferidos para filtros de seringa PTFE (politetrafluoretileno) hidrofóbicos de 0,22  $\mu$ m e 13 mm de diâmetro. O filtrado foi transferido para placa cromatográfica e 1  $\mu$ L foi injetado no sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) para análise.

Para as amostras dos sobrenadantes, 500 µL do conteúdo coletado foram transferidos para tubos de 2 mL, adicionados 500 µL da solução de padrão interno (8-Br-AMPc e 8-Br-GMPc 100 ng/mL) em metanol e agitados por 5 min a 2.500 rpm em um agitador Bench Mixer (Benchmark®, Sayreville, USA). Em seguida, 600 µL da solução em suspensão foram transferidos para tubos Eppendorf de 2,0 mL, os quais foram adicionados de 400 µL de clorofórmio, agitados por 5 min a 2.500 rpm em um agitador Bench Mixer (Benchmark®, Sayreville, USA) e centrifugados a 14.000 rpm, por 15 min, à 4°C (Hettich® Universal 320 R, Darmstadt, Alemanha). Alíquotas de 400 µL do sobrenadante foram transferidos para filtros de seringa PTFE hidrofóbicos de 0,22 um e 13 mm de diâmetro. O filtrado foi transferido para placa cromatográfica e 1 µL foi injetado no sistema LC-MS/MS para análise.

#### 4.5.2 Análise por LC-MS/MS

A quantificação dos analitos foi realizada empregando LC-MS/MS. O equipamento consiste em um sistema UHPLC acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo LCMS 8060 (Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de pentafluorofenilpropil (PFPP) Discovery® HS F5-3, 21 mm × 150 mm, 3 µM (Supelco Analytical, Bellefonte, USA) mantida à 40°C e 0,1% de ácido fórmico em água deionizada como fase móvel A e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila como fase móvel B a um fluxo de 0,25 mL/min. O gradiente aplicado começou em 0% B, que se manteve por 2 min, seguido por uma mudança linear para 25% B ao longo de 1 min. A % da fase móvel B foi então mantida a 25% por 1 min, seguida por um aumento até 95% ao longo de 1 min. Essa proporção foi mantida por 1min e então reduzida às condições iniciais (0%) ao longo de 0,2 min (tempo total de execução de 10 min). A temperatura do auto injetor foi mantida a 10°C. O espectrômetro de massas equipado com uma interface de electrospray (ESI),

operando no modo de ionização positiva. Os parâmetros serão otimizados por infusão direta de soluções dos padrões no espectrômetro de massa. A voltagem do capilar foi ajustada em 4,0 kV, a temperatura de dessolvatação em 250°C, o fluxo de gás nebulizador em 3,0 L/min, a temperatura do bloco de aquecimento em 400°C e fluxo de gás de secagem em 5 L/min. As análises foram executadas no modo de monitoramento de reações múltiplas (Multiple Reaction Monitoring, MRM). As transições dos íons, voltagem do cone (Q1 e Q3), energias de colisão (CE) e o tempo de retenção estão apresentados na Tabela 1. A aquisição e a análise dos dados serão realizadas utilizando-se o programa LabSolutions 5,97 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Analito	Transição dos íons (m/z)	Q1 (V)	Q3 (V)	Energia de colisão (V)	Tempo de retenção (min)
AMPo	330 > 136	13	25	24	606+04
AWIFC	330 > 119	24	24	52	$0,90 \pm 0,4$
GMPc	346 > 152	14	29	21	$6.07 \pm 0.4$
Giviec	346 > 135	26	13	45	$0,97 \pm 0,4$
8-Br-AMPc	408 > 214	30	22	27	$6,96 \pm 0,4$
	404 . 000	10	15	22	
8-Br-GMPc	424 > 230	10	14	22	6,96 ± 0,4
	424 > 213	Z1		47	. ,

Tabela 3. Condições de operação do espectrômetro de massas

#### 4.5.3 Validação dos métodos analíticos

Os métodos foram validados de acordo com as recomendações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução RDC No. 27 de 17 de maio de 2012) para validação de métodos bioanalíticos. Foram avaliados os parâmetros efeito matriz, recuperação, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão, seletividade e estabilidade. Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o laboratório do Prof. José Luiz da Costa, docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unicamp.

### 4.6 Avaliação da expressão proteica

Para a determinação de proteínas fosforiladas, fragmentos isolados de bexiga de porco foram previamente estimulados por 20 minutos *in vitro* com tadalafil 3 μM + BAY41-2272 10 μM na ausência e presença MK571 20 μM pré-incubado por 20 minutos.

Os fragmentos de bexiga de porco foram homogeneizados em tampão

RIPA com inibidores de fosfatase e protease utilizando-se homogeneizador BeadBlaster™ (Benchmark Scientific D2400-E; Burlington, MA, EUA), operado na velocidade 5,5 m/s por 25 segundos, durante 5 ciclos, recolocados em gelo por 10 minutos, e então submetidos novamente a operação anterior. Os extratos foram centrifugados à 12.600 RPM, 4°C, durante 30 minutos para remoção materiais insolúveis. As concentrações de proteína no sobrenadante foram determinadas pelo método de Bradford. Quantidades iguais de proteína de cada amostra (50 µg) foram tratadas com tampão Laemmli contendo β-mercaptoetanol (25%). As amostras foram aquecidas em banho seco por 10 minutos e, em seguida, aplicadas em gel de poliacrilamida 8%. A eletroforese foi realizada utilizando o Sistema Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-rad) e PowerPab<sup>™</sup> Basic 300 V Power Supply (Bio-rad) por, aproximadamente, 3 horas à 120 V. A eletrotransferência das proteínas para membrana de nitrocelulose foi realizada durante 10 minutos a 25 V (constante) em sistema semi-seco Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As ligações inespecíficas das proteínas à nitrocelulose foram reduzidas através da incubação da membrana de nitrocelulose à temperatura ambiente com BSA 3% por 2 horas, seguida por 3 lavagens de 10 minutos da membrana com solução basal. Assim, foram incubados nas membranas os anticorpos primários: phospho-VASP<sup>Ser239</sup>, VASP e β-actina por 48 horas à 4°C. Por fim, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário HRP-conjugado. Para a revelação foi utilizado Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-rad, Hercules, EUA) e realizado conforme instrução do fabricante. A densitometria foi realizada através do Software Image Lab™ (Bio-rad, Hercules, EUA). Abaixo está a descrição dos anticorpos utilizados no processo:

Anticorpos	Nome	Concentração	Fabricante	Identificação	
Primário	VASP Antibody	1:1000	Cell Signaling	3112	
Primário	Phospho-VASP (Ser239) Antibody	1:250	Cell Signaling	3114	
Secundário	Anti-rabbit IgG, HRP- linked Antibody	1:5000	Cell Signaling	7074	
Endógeno	β-Actin (8H10D10) Mouse mAb (HRP Conjugate)	1:25000	Cell Signaling	12262	

Tabela 4. Relação de	anticorpos utilizados	na técnica de	Western Blotting
----------------------	-----------------------	---------------	------------------

## 4.7 Análise dos dados funcionais

As respostas relaxantes foram determinadas em porcentagem (%) em
relação ao valor de pré-contração. O logaritmo das concentrações molares dos agonistas/estimuladores foi colocado em abscissas e a resposta de relaxamento em % nas ordenadas dos gráficos. Os valores de potência (pEC50) e respostas máximas (Emax) foram calculados pela seguinte equação:

$$E = \frac{Emax}{\left(1 + \left(\frac{\mathbf{10}^{(c-x)}}{\mathbf{10}^{(c-x)^N}}\right) + \Phi\right)}$$

Onde, "E" é a elevação do tônus basal, ou seja, a resposta observada do agonista/estimulador acima do tônus basal ou da resposta na ausência do agonista; "Emax" é a resposta máxima que o agonista/estimulador pode produzir, na concentração saturante; "c" é o logaritmo da EC50 (concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima); "x" é o logaritmo da concentração do agonista; "N" é o expoente que representa a inclinação da curva concentração-resposta (Hill slope) e; "Φ" é a resposta observada na ausência do agonista (resposta basal ou tônus basal), sendo considerado como valor zero.

Para o cálculo de deslocamento das curvas, foi calculado o antilogaritmo da diferença entre as médias das pEC50 das curvas na ausência e presença do MK571.

As análises de regressões não-lineares para determinar os parâmetros de Emax e pEC50, assim como os gráficos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism (Versão 8, GraphPad Software, EUA).

#### 4.8 Delineamento estatístico

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão de um número experimental (N) de animais por grupo para cada experimento.

Para o cálculo do número de animais foi utilizada a seguinte fórmula:

$$N = \left\{ 1 + \left[ 2C \left( \frac{s}{d} \right)^2 \right] \right\}$$

Onde, "N" é o tamanho da amostra; "C" é o fator relacionado ao nível de confiança e ao desvio padrão da amostra, sendo associado a um valor de Z na distribuição normal padrão; "s" é o desvio padrão da amostra e; "d" é a diferença aceitável entre os grupos. Assim, considerando os valores de desvio padrão aceitável de 10%, diferença aceitável entre os grupos de 20% (por experiência prévia e resultados preliminares do grupo de pesquisa); poder de teste de 90% e nível de

significância de 0,05 (indicado para experimentos na área biológica), então:

$$N = \left\{ 1 + \left[ 2 \times 10, 51 \times \left(\frac{0, 1}{0, 2}\right)^2 \right] \right\} = 6, 25 \cong 7 \text{ animais por experimento}$$

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism (Versão 8, GraphPad Software, EUA), onde os dados passaram por análise de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e por identificação e remoção de outliers pelo método de ROUT (Q = 5%). Como todos os dados mostraram possuir distribuição normal, foram utilizados os seguintes testes paramétricos: para comparação de 2 grupos de dados, teste *t* de *Student* não pareado foi utilizado e para comparação de 3 ou mais grupos de dados, ANOVA de uma via foi utilizada, seguida do teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações. Para considerar estatisticamente significante, o valor de P<0.05 foi definido.

#### **5. RESULTADOS**

#### 5.1 Expressão gênica de ABCC4 e ABCC5 em bexiga urinária de porco

O primeiro passo foi avaliar a expressão dos genes *ABCC4* e *ABCC5*, que codificam as proteínas MRP4 e MRP5, respectivamente. O ureter foi utilizado como controle positivo. Na bexiga, a expressão do *ABCC4* não diferiu entre as camadas detrusora e mucosa (Figura 4). Com relação ao *ABCC5*, nas condições testadas, não foi possível detectar a expressão deste transcrito em nenhuma das amostras avaliadas (dados não mostrados).



**Figura 4**. Expressão de RNAm do gene *ABCC4* em fragmentos de bexiga inteira (•), detrusor isolado ( $\blacktriangle$ ), mucosa isolada ( $\nabla$ ) e ureter ( $\blacksquare$ ) de porco. Os resultados foram expressos como o valor do  $\Delta$ Ct, o qual representa o valor do Ct do gene *ABCC4* menos o valor do Ct do gene *GAPDH*. Valores apresentados como Média ± DP.

#### 5.2 Localização do MRP4 em fragmentos de bexiga isolada de porco

O transportador de efluxo MRP4 é expresso na bexiga suína, sendo detectado nas células uroteliais, fibroblastos, células musculares lisas e estruturas neurais. Sua expressão é equivalente tanto nos fibroblastos quanto nas estruturas neurais, porém, é mais elevada em comparação ao urotélio e ao músculo liso, onde a expressão é similar (Figura 5).



**Figura 5.** Imagens representativas da análise por imunohistoquímica para detecção do transportador de efluxo MRP4 (A) e (B) e controle negativo (C) e (D) em bexiga isolada de porco: (A) urotélio (U) e lâmina própria (LP), (B) musculatura lisa (M) e interstício contendo estrutura neural (N), (C) urotélio (U) e lâmina própria (LP), (D) musculatura lisa (M) e interstício contendo estrutura neural (N). Magnificação: 20x.

# 5.3 Efeitos do MK571, montelucaste e DMSO e curva de controle de tônus em tecidos pré-contraídos com carbacol (CCh)

Realizamos curva-concentração resposta ao MK571 e montelucaste em tecidos pré-contraídos com CCh (3  $\mu$ M). Ambos MK571 e montelucaste promoveram um discreto relaxamento nos tecidos de, aproximadamente, 26% (Figura 6A, tabela 5, N=5) e 25% (Figura 6B, tabela 5, N=5) respectivamente. Na presença do DMSO 0,2% (concentração final), o relaxamento foi de, aproximadamente, 2,15% (Figura 6C, N=5). Além disso, foi realizado o controle do tônus em tecidos pré-contraídos com CCh (3  $\mu$ M) e verificada a queda do tônus durante o experimento após a estabilização do tecido pela pré-contração ao CCh, resultando em uma queda de, aproximadamente, 17% (Figura 6D, N=5).



**Figura 6**. Curva concentração-resposta ao MK571 (A), montelucaste (B), relaxamento pelo DMSO (C) e curva de controle de tônus (D) em fragmentos de bexiga isolada de porco. Valores apresentados como Média ± DP.

Tabela 5. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para MK571 e montel	ucaste
em fragmento de bexiga isolada de porco.	

	pEC50	Emax (%)	Ν
MK571	5.58 ± 0.64	26.35 ± 10.59	5
Montelucaste	5.63 ± 0.34	24.88 ± 4.80	5

# 5.4 Efeitos no relaxamento induzido por tadalafil e cilostazol na presença do montelucaste

Diferentemente do observado com os relaxamentos induzidos na presença do MK571, o montelucaste não alterou significativamente os parâmetros farmacológicos frente aos relaxamentos induzidos pelo tadalafil (Figura 7, tabela 6) e cilostazol (Figura 8, tabela 7).



**Figura 7**. Curva concentração-resposta ao tadalafil em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença ( $\blacksquare$ ) e ausência ( $\bullet$ ) de montelucaste (1  $\mu$ M). Valores apresentados como Média  $\pm$  DP.

**Tabela 6**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para tadalafil na ausência e presença de montelucaste em fragmento de bexiga isolada de porco.

	pEC50	Emax (%)	N
Tadalafil	5.50 ± 0.42	46.59 ± 13.08	5
Tadalafil + montelucaste	5.48 ± 0.37	49.94 ± 17.75	5



**Figura 8**. Curva concentração-resposta ao cilostazol em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença (■) e ausência (●) de montelucaste (1 µM). Valores apresentados como Média ± DP.

presença de montelucaste em tragmento de bexiga isolada de porco.				
pEC50 Emax (%) N				
Cilostazol	5.31 ± 0.26	38.57 ± 8.60	5	
Cilostazol + montelucaste	5.48 ± 0.61	35.16 ± 16.93	5	

Tabela 7. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para cile	ostazol na ausência e
presença de montelucaste em fragmento de bexiga isolada de p	oorco.

# 5.5 Efeitos no relaxamento induzido por SNP, BAY 41-2272 e 8- Br-cGMP na presença do MK571

MK571 não alterou nenhum parâmetro frente ao relaxamento induzido pelo SNP (Figura 9, tabela 8), BAY 41-2272 (Figura 10, tabela 9) e 8-Br-GMPc (Figura 11, tabela 10).



**Figura 9**. Curva concentração-resposta ao SNP em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença (■) e ausência (●) de MK571 (20 µM). Valores apresentados como Média ± DP.

**Tabela 8**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para SNP na ausência e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.

	pEC50	Emax (%)	Ν
SNP	6.27 ± 0.56	72.59 ± 34.14	5
SNP + MK571	6.41 ± 0.71	67.02 ± 35.16	5



**Figura 10**. Curva concentração-resposta ao BAY 41-2272 em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença (■) e ausência (●) de MK571 (20 µM). Valores apresentados como Média ± DP.

**Tabela 9**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para BAY 41-2272 na ausência e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.

	pEC50	Emax (%)	Ν
BAY 41-2272	5.21 ± 0.34	65.67 ± 23.28	5
BAY 41-2272 + MK571	5.19 ± 0.44	66.95 ± 27.07	6



**Figura 11**. Curva concentração-resposta ao 8-Br-cGMP em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença (■) e ausência (●) de MK571 (20 µM). Valores apresentados como Média ± DP.

3	0 0		
	pEC50	Emax (%)	N
8-Br-cGMP	4.65 ± 0.34	53.04 ± 20.70	6
8-Br-cGMP + MK571	4.75 ± 0.19	68.11 ± 11.82	7

**Tabela 10**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para 8-Br-cGMP na ausência e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.

## 5.6 Efeitos no relaxamento induzido por sildenafil, tadalafil, rolipram, cilostazol e EHNA na presença do MK571

Os relaxamentos induzidos por alguns inibidores de fosfodiesterases foram potencializados na presença do MK571.

O efeito de relaxamento induzido pelo inibidor de PDE5, sildenafil, foi potencializado na presença do MK571, levando a um deslocamento da curva em, aproximadamente, 2,8 vezes à esquerda (Figura 12, tabela 11).



**Figura 12**. Curva concentração-resposta ao sildenafil em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença ( $\blacksquare$ ) e ausência ( $\bullet$ ) de MK571 (20 µM). Valores apresentados como Média  $\pm$  DP. p < 0,05 (\*) Sildenafil na presença de MK571 em relação ao sildenafil na ausência de MK571 (Teste *t* de *Student*).

Tabela 11. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para sildenafil na aus	sência
e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.	

	pEC50	Emax (%)	Ν
Sildenafil	4.73 ± 0.23	80.90 ± 17.94	8
Sildenafil + MK571	5.17 ± 0.25 *	92.75 ± 17.30	8

p < 0,05 (\*) Sildenafil na presença de MK571 em relação ao sildenafil na ausência de MK571 (Teste *t* de *Student*).

Esse deslocamento também foi observado com outro inibidor de PDE5, tadalafil, onde o deslocamento da curva foi de, aproximadamente, 3,9 vezes à esquerda (Figura 13, tabela 12).



**Figura 13**. Curva concentração-resposta ao tadalafil em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença ( $\blacksquare$ ) e ausência ( $\bullet$ ) de MK571 (20 µM). Valores apresentados como Média  $\pm$  DP. p < 0,05 (\*) Tadalafil na presença de MK571 em relação ao tadalafil na ausência de MK571 (Teste *t* de *Student*).

**Tabela 12**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para tadalafil na ausência e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.

	pEC50	Emax (%)	N
Tadalafil	5.76 ± 0.50	53.36 ± 10.78	6
Tadalafil + MK571	6.35 ± 0.56 *	74.13 ± 24.42 *	6

p < 0,05 (\*) Tadalafil na presença de MK571 em relação ao tadalafil na ausência de MK571 (Teste *t* de *Student*).

O relaxamento frente ao inibidor de PDE3, cilostazol, foi potencializado, levando a um deslocamento de, aproximadamente, 4,5 vezes à esquerda (Figura 14, tabela 13).



**Figura 14**. Curva concentração-resposta ao cilostazol em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença (**■**) e ausência (**●**) de MK571 (20  $\mu$ M). Valores apresentados como Média ± DP. p < 0,05 (\*) Cilostazol na presença de MK571 em relação ao cilostazol na ausência de MK571 (Teste *t* de *Student*).

Tabela 13. Potência (p	pEC50) e respos	ta máxima	(Emax) para	cilostazol r	na ausência
e presença de MK571	em fragmento de	e bexiga isc	olada de porc	ю.	

	pEC50	Emax (%)	N
Cilostazol	4.97 ± 0.50	46.61 ± 14.75	5
Cilostazol + MK571	5.63 ± 0.32 *	60.01 ± 13.71	5

p < 0,05 (\*) Cilostazol na presença de MK571 em relação ao cilostazol na ausência de MK571 (Teste *t* de *Student*).

MK571 não interferiu nos parâmetros de relaxamentos induzidos pelos inibidores de PDE4 e PDE2, rolipram (Figura 15, tabela 14) e EHNA (Figura 16, tabela 15), respectivamente.



**Figura 15**. Curva concentração-resposta ao rolipram em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença (■) e ausência (●) de MK571 (20 µM). Valores apresentados como Média ± DP.

**Tabela 14**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para rolipram na ausência e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.

	pEC50	Emax (%)	N
Rolipram	6.20 ± 0.28	82.01 ± 12.42	5
Rolipram + MK571	6.38 ± 0.68	74.46 ± 29.18	5



**Figura 16**. Curva concentração-resposta ao EHNA em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença (■) e ausência (●) de MK571 (20 µM). Valores apresentados como Média ± DP.

presença de Mixor i em nagmento de bexiga isolada de porco.				
pEC50 Emax (%)				
EHNA	6.19 ± 0.78	70.44 ± 31.12	5	
EHNA + MK571	5.93 ± 0.61	70.45 ± 24.60	5	

**Tabela 15**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para EHNA na ausência e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.

## 5.7 Efeitos no relaxamento induzido pela forscolina e 8-Br-cAMP na presença do MK571

MK571 não alterou nenhum parâmetro do relaxamento induzido pela forscolina (Figura 17, tabela 16) e 8- Br-cAMP (Figura 18, tabela 17).



**Figura 17**. Curva concentração-resposta a forscolina em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença (■) e ausência (●) de MK571 (20 µM). Valores apresentados como Média ± DP.

**Tabela 16**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para forscolina na ausência e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.

	pEC50	Emax (%)	Ν
Forscolina	5.09 ± 0.20	94.65 ± 12.21	8
Forscolina + MK571	5.16 ± 0.17	99.12 ± 12.14	8



**Figura 18**. Curva concentração-resposta ao 8-Br-cAMP em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença ( $\blacksquare$ ) e ausência ( $\bullet$ ) de MK571 (20  $\mu$ M). Valores apresentados como Média  $\pm$  DP.

**Tabela 17**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para 8-Br-cAMP na ausência e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.

	pEC50	Emax (%)	Ν
8-Br-cAMP	5.61 ± 0.38	48.00 ± 14.82	5
8-Br-cAMP + MK571	5.56 ± 0.54	57.54 ± 25.87	6

5.8 Efeitos no relaxamento induzido por CL316,243, fenoterol e salbutamol na presença do MK571

MK571 não alterou nenhum parâmetro dos relaxamentos induzidos pelo agonista  $\beta$ 3- adrenérgico, CL316,243 (Figura 19, tabela 18), nem pelos agonistas  $\beta$ 2- adrenérgicos, fenoterol (Figura 20, tabela 19) e salbutamol (Figura 21, tabela 20).



**Figura 19.** Curva concentração-resposta ao CL316,243 em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença ( $\blacksquare$ ) e ausência ( $\bullet$ ) de MK571 (20  $\mu$ M). Valores apresentados como Média  $\pm$  DP.

**Tabela 18**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para CL316,243 na ausência e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.

	pEC50	Emax (%)	Ν
CL316,243	6.71 ± 0.42	52.52 ± 14.86	6
CL316,243 + MK571	6.58 ± 0.51	60.44 ± 22.27	6



**Figura 20**. Curva concentração-resposta ao fenoterol em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença (■) e ausência (●) de MK571 (20 µM). Valores apresentados como Média ± DP.

		pEC50	Emax (%)	N
	Fenoterol	7.15 ± 0.69	66.31 ± 19.26	6
	Fenoterol + MK571	7.43 ± 0.71	70.62 ± 24.41	6
laxamento (%)	0 - ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■		<b>T</b>	

**Tabela 19**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para fenoterol na ausência e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.



**Figura 21**. Curva concentração-resposta ao salbutamol em fragmentos de bexiga isolada de porco na presença ( $\blacksquare$ ) e ausência ( $\bullet$ ) de MK571 (20  $\mu$ M). Valores apresentados como Média  $\pm$  DP.

**Tabela 20**. Potência (pEC50) e resposta máxima (Emax) para salbutamol na ausência e presença de MK571 em fragmento de bexiga isolada de porco.

	pEC50	Emax (%)	Ν
Salbutamol	7.29 ± 0.23	33.64 ± 4.93	5
Salbutamol + MK571	$7.24 \pm 0.20$	35.95 ± 4.86	5

### 5.9 Quantificação intra- e extracelular de AMPc e GMPc em tecidos estimulados

A estimulação com forscolina resultou em um aumento significativo na concentração intracelular e extracelular de AMPc. De acordo com a Figura 22A, o aumento intracelular de AMPc foi observado nos primeiros 5 minutos após a estimulação com forscolina. Ao final dos 60 minutos de estimulação, a concentração intracelular aumentou aproximadamente 15,8 vezes em comparação com os tecidos não estimulados (basais) durante o mesmo período. Paralelamente, a Figura 22B mostra que nos primeiros 5 minutos, houve um aumento de aproximadamente 3,4 vezes em relação aos níveis basais e ao final dos 60 minutos de estímulo, esse aumento foi cerca de 12 vezes.

Já o estímulo com tadalafil + BAY 41-2272 resultou em um aumento significativo na concentração intracelular e extracelular de GMPc. Conforme mostrado na Figura 23A, observou-se um aumento nos níveis intracelulares de GMPc de aproximadamente 1,5 vez após 5 minutos de estímulo. Após 45 minutos, os níveis de GMPc atingiram um aumento mais pronunciado, chegando a cerca de 6 vezes os níveis intracelulares em comparação ao basais e, ao final dos 60 minutos, alcançando aproximadamente 8,2 vezes em relação às concentrações dos níveis basais. Simultaneamente, os níveis extracelulares de GMPc exibiram um aumento gradual, com uma tendência crescente após 10 minutos de estímulo, resultando em um aumento na concentração de cerca de 2,3 vezes em relação aos basais até os 45 minutos. Após 60 minutos, os níveis extracelulares de GMPc atingiram aproximadamente 3,4 vezes em relação aos níveis basais.



**Figura 22**. Quantificação intracelular (A, C) e extracelular de AMPc (B, D) em fragmentos de bexiga isolada de porco estimulados com forscolina (30  $\mu$ M) ( $\Box$ ) e

tadalafil (3  $\mu$ M) + BAY 41-2272 (10  $\mu$ M) ( $\blacktriangle$ ). Basal ( $\bullet$ ) representa os fragmentos sem estímulo. Valores apresentados como Média ± DP. p < 0,05 (\*) Forscolina em relação ao basal (Teste *t* de *Student*).



**Figura 23.** Quantificação intracelular (A, C) e extracelular de GMPc (B, D) em fragmentos de bexiga isolada de porco estimulados com forscolina ( $30 \mu$ M) ( $\Box$ ) e tadalafil ( $3 \mu$ M) + BAY 41-2272 ( $10 \mu$ M) ( $\blacktriangle$ ). Basal (•) representa os fragmentos sem estímulo. Valores apresentados como Média ± DP. p < 0,05 (\*) Tadalafil + BAY 41-2272 em relação ao basal (Teste *t* de *Student*).

# 5.10 Expressão proteica da p-VASP Ser<sup>239</sup> e VASP em fragmentos de bexiga isolada de porco estimulados na ausência e presença do MK571

Em fragmentos de bexiga isolada de porco estimuladas com Tadalafil 3  $\mu$ M e BAY 41-2272 10  $\mu$ M, a incubação com MK571 20  $\mu$ M promoveu um aumento significativo na razão entre a p-VASP Ser<sup>239</sup> e VASP em relação ao tecido estimulado sem MK571 (Figura 24, N=7).



**Figura 24**. Razão da expressão proteica da p-VASP Ser<sup>239</sup> pela VASP total em fragmentos de bexiga isolada de porco estimulados com tadalafil 3  $\mu$ M e BAY 41-2272 10  $\mu$ M na ausência e presença de MK571 20  $\mu$ M. Valores apresentados como Média ± DP. p < 0,05 (\*) Tadalafil + BAY 41-2272 na presença de MK571 em relação ao Tadalafil + BAY 41-2272 na ausência de MK571 (Teste *t* de *Student*).

#### 6. DISCUSSÃO

Os transportadores de efluxo MRP4 e MRP5, codificados pelos genes *ABCC4* e *ABCC5*, respectivamente são pertencentes à família dos transportadores do tipo ABC, que utilizam a energia proveniente da hidrólise do ATP para a extrusão de diversos substratos, entre eles, dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc (44). Neste contexto, esse estudo teve como objetivo caracterizar o efeito *in vitro* do MK571, inibidor não-seletivo dos transportadores de efluxo, em bexiga urinária isolada de porco na presença de substâncias que aumentam os níveis de AMPc e GMPc, uma vez que a literatura não dispunha dessas informações.

O comprometimento prolongado das vias de sinalização do NO-GCs-GMPc e AC-AMPc na musculatura lisa presente na bexiga, tem sido reconhecida como um fator contribuinte para o desenvolvimento e manifestação de condições adversas no sistema urogenital, podendo incluir, entre outras, a hiperatividade vesical. Portanto, é plausível considerar que substâncias capazes de aumentar os níveis dos nucleotídeos cíclicos poderiam apresentar eficácia ao desempenhar um papel importante na melhoria dos sintomas que são desencadeados por esse comprometimento funcional (78). Estudos *in vivo* e *in vitro* em ratos e camundongos utilizando estimuladores ou ativadores da GCs demonstraram serem efetivamente capazes de reverter diversos parâmetros anormais na micção desses animais (79, 80, 81, 82). Além disso, a aprovação do uso do mirabegron (nome comercial Myrbetriq<sup>™</sup>) em 2012 pela FDA para bexiga hiperativa (83), sabendo que os receptores β3-adrenérgicos são os receptores adrenérgicos mais abundantes na bexiga humana (84), corrobora com a ideia de que o aumento dos níveis de nucleotídeos cíclicos pode ser efetivo em situações de comprometimento das vias de sinalização.

Nosso estudo demonstrou pela primeira vez a expressão gênica de *ABCC4* em amostras de bexiga urinária isolada de porco, mas sem diferenças significativas nas amostras de detrusor ou mucosa isolados, enquanto não foi detectada expressão do gene *ABCC5*, assim nossos estudos foram direcionados ao MRP4. A expressão desse gene (*ABCC4*) já foi visualizada em órgãos do trato geniturinário humano, como rins (85), bexiga, ureter, corpo cavernoso, próstata e vesícula seminal (48), enquanto em porcos, até o momento, só foi determinada a expressão no endométrio uterino (86). Embora a imunomarcação para MRP4 em amostras de bexiga humana tenha sido realizada apenas no detrusor (48), demonstramos que também, além do detrusor, há marcação em outras regiões da bexiga de porco, como no urotélio, estruturas neurais no interstício e em fibroblastos. Esse achado é importante, dado que o funcionamento do urotélio é permeado por várias incógnitas (87) e que há conhecimento de que alterações sensoriais e na sinalização no urotélio podem estar relacionadas à patogênese da hiperatividade detrusora (88), são necessárias investigações adicionais para aprofundar nossa compreensão sobre a relação entre a expressão do MRP4 e o funcionamento dessa via no urotélio. Além disso, não há informações a respeito da atividade biológica e importância do MRP4 nas outras regiões marcadas.

Uma vez que os achados demonstraram a presença de MRP4 na bexiga de porco, visamos avaliar o efeito in vitro desse transportador de efluxo por inibi-lo, utilizando como ferramenta farmacológica o MK571 20 µM. A escolha da concentração utilizada partiu de dados prévios publicados pelo grupo demonstrando que o MK571 nessa concentração potencializou respostas de relaxamento na presença de substâncias que aumentam os níveis de nucleotídeos cíclicos em órgãos geniturinário de camundongos (66, 67) e, além disso, nesse estudo foram realizados ensaios funcionais com fragmentos de bexiga de porco para verificar o relaxamento através curvas concentração-resposta (CRC) do MK571 (1 nM – 300 µM) e curva de controle do tônus após pré-contração com CCh 3 µM. Assim, verificamos que a Emax do MK571 foi de 22,76 ± 7,96%, enquanto a queda de tônus, ao final do experimento foi de 17,36  $\pm$  7,26%, demonstrando que mesmo em concentrações maiores que 20  $\mu$ M, o relaxamento induzido pelo MK571 é discreto. Outra informação relevante, é de que o MK571 atua como antagonista de LTD4, fazendo com que experimentos sejam necessários para assegurar que as respostas frente aos relaxamentos sejam direcionadas ao mecanismo de efluxo de nucleotídeos cíclicos, e não por inibir o receptor citado. Portanto, foi realizada CRC ao montelucaste, descrito como antagonista de LTD<sub>4</sub> (89). Os parâmetros farmacológicos entre MK571 e montelucaste foram bem similares, além de que o relaxamento frente ao tadalafil e cilostazol não foram potencializados pelo montelucaste, demonstra que possivelmente o discreto relaxamento promovido pelo MK571 possa ser devido a sua atividade como antagonista de LTD<sub>4</sub>, já que o MK571, diferente do montelucaste, potencializou o relaxamento frente aos inibidores de PDEs citados acima.

Posto isto, foram avaliadas as respostas de relaxamento diante de substâncias que elevam os níveis *in vitro* de GMPc de AMPc na presença de MK571 20 µM na bexiga de porco, já que através de estudos prévios publicados, as respostas

de relaxamento na presença do MK571 foram potencializadas nos órgãos do trato geniturinário de camundongos, incluindo o corpo cavernoso (65), próstata e uretra somente em resposta de substâncias que elevam os níveis de GMPc, e por outro lado, a potencialização observada na bexiga de camundongos ocorreu somente em resposta de substâncias que elevam os níveis de AMPc nesse órgão (66), resultado que contrasta com os resultados obtidos no presente estudo. Em fragmentos de bexiga urinária de porco, observou-se uma potencialização da resposta frente a inibidores de PDEs, como sildenafil, tadalafil e cilostazol, os quais o MK571 induziu um deslocamento significativo das curvas, em aproximadamente 2.8, 3.9 e 4.5 vezes para a esquerda, respectivamente. Note que, embora o sildenafil e tadalafil sejam classificados como inibidores de PDE5, ambos possuem diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica (22), além de que sildenafil também é descrito como sendo um inibidor de MRP4, porém com menor potência em relação ao MK571 (Sildenafil IC<sub>50</sub> = 20  $\mu$ M vs. MK571 IC<sub>50</sub> = 10  $\mu$ M) (90). Em contrapartida, todas as outras substâncias que aumentam os níveis de AMPc não exibiram um aumento correspondente em suas respostas na presença de MK571. Entre todas as substâncias utilizadas neste caso, a forscolina foi mais efetiva em promover o relaxamento da musculatura lisa da bexiga, com a Emax de 94,65 ± 12,21% no grupo controle (N=8, ausência de MK571), contra a Emax de 66,31 ± 19,26% (N=6), 32,90  $\pm$  6,73% (N=3) e 52,51  $\pm$  14,86% (N=6) nos grupos controles do fenoterol, salbutamol e CL316,243, respectivamente. Apesar do mirabegron ter sido aprovado e ser utilizado na prática clínica como sendo um agonista β3-adrenérgico (83), estudos demonstraram além de atuar nessa via, também bloqueia receptores muscarínicos em bexiga humana (91), receptores α1-adrenérgicos em próstata humana (92), uretra (93) e corpo cavernoso (94) de camundongos. Assim, optamos por utilizar o CL316,243 no lugar do mirabegron.

Nossos achados de que o MK571 potencializa o efeito de certas classes de drogas podem ser explicados pelo processo de compartimentalização dos nucleotídeos cíclicos (31). Se, por exemplo, os transportadores estiverem espacialmente mais próximos da PDE5 e PDE3, mas não da GCs, PDE2, PDE4 ou AC, o efeito da sua inibição será mais pronunciado na presença de substâncias que inibem a PDE5 e PDE3. Achados semelhantes foram vistos em aorta de ratos, onde observou-se que o MK571 promoveu um aumento do relaxamento em resposta ao isoproterenol, um agonista β-adrenérgico não-seletivo, e ao ANP, um ativador da GCp,

mas não em resposta à ACh. Os autores levantaram a hipótese de que esse efeito de potencialização ocorreu devido à proximidade entre os transportadores de efluxo dos receptores β-adrenérgicos e da GCp, que são receptores e enzima de membrana, enquanto a GCs está presente no citosol. Portanto, o efeito do MK571 foi mais pronunciado nas drogas que atuam nesses alvos específicos (51). Em outro estudo que envolveu a utilização de traqueia de ratos, foi observado que o uso de MK571 resultou em uma significativa redução nos níveis extracelulares de AMPc, após a incubação com formoterol, um agonista β2-adrenérgico seletivo, bem como inibidores não-seletivos de PDEs, como IBMX e aminofilina, mas nos ensaios funcionais, o MK571 demonstrou potencializar apenas o relaxamento induzido pelo formoterol, não apresentando o mesmo efeito com o IBMX e a aminofilina (95). Esses dados sugerem que o efeito do MK571 dependerá da localização do estímulo, com uma expressividade mais acentuada nesse tecido na presença dos agonistas β2-adrenérgicos.

Após os ensaios funcionais, avaliamos o transporte de efluxo dos nucleotídeos cíclicos e quantificamos a concentração dos nucleotídeos cíclicos em fragmentos estimulados com ferramentas farmacológicas utilizadas como controle positivo das vias de síntese do AMPc e GMPc, respectivamente a forscolina e tadalafil + BAY 41-2272. Por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, verificamos que as concentrações intra- e extracelulares de ambos os nucleotídeos cíclicos aumentam durante um período de tempo após o estímulo inicial, até atingir a região de platô, demonstrando que o transporte incumbido de realizar a extrusão dos nucleotídeos cíclicos encontra-se fisiologicamente ativo. Assim como foi previamente publicado, o efluxo para o meio extracelular também é considerado uma via de eliminação dos nucleotídeos cíclicos, além da degradação por PDEs (38).

Dado que os inibidores de PDEs, sildenafil, tadalafil e o cilostazol tiveram suas respostas potencializadas na presença do MK571, optamos pelo tadalafil para realizar o estímulo, e assim executamos a técnica de *Western Blotting* para validar se essa potencialização foi devido ao aumento intracelular de GMPc, o qual promove a ativação da PKG que leva a uma maior fosforilação da VASP no sítio da Ser<sup>239</sup>, alvo indicado para avaliar a atividade da PKG (35, 36). Neste sentido, o MK571 promoveu um aumento significativo na razão p-VASP Ser<sup>239</sup>/VASP em tecidos estimulados com tadalafil + BAY 41-2272, em relação ao tecido estimulado sem MK571, demonstrando então um aumento na expressão proteica nos tecidos incubados com MK571.

## 7. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- ABCC4 é expresso em bexiga urinária de porco e no ureter;
- Não há diferenças entre a expressão de ABCC4 em amostras de mucosa isolada ou detrusor isolado;
- Expressão de ABCC5 não foi detectada em nenhuma amostra de bexiga e ureter;
- Há marcação para MRP4 nas seguintes regiões da bexiga urinária de porco: urotélio, estruturas neurais no interstício, fibroblastos e musculatura lisa, com a seguinte intensidade: nervo = fibroblastos > urotélio e musculatura lisa;
- MK571 induz apenas um discreto relaxamento;
- Relaxamento frente ao inibidor de PDE3, cilostazol e inibidores de PDE5, sildenafil e tadalafil foram potencializados na presença do MK571;
- Após estímulo, concentração intra- e extracelulares de AMPc e GMPc aumentam;
- Maior fosforilação da p-VASP<sup>Ser239</sup> nos tecidos estimulados com tadalafil na presença do MK571 em relação ao estimulado na ausência do MK571.

### 8. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos achados demonstraram a atividade fisiológica do transportador MRP4 em bexiga urinária de porco, uma vez que foram detectados níveis extracelulares de AMPc e GMPc. Os dados aqui apresentados abrem novos caminhos para avaliar se a atividade destes transportadores está alterada em modelo de disfunção miccional (bexiga hiper- ou hipoativa) e o potencial terapêutico na utilização concomitante de inibidor dos transportadores de efluxo e medicamentos já em uso na prática clínica, como sildenafil, tadalafil e cilostazol. Além disso, os resultados de bexiga de porco diferem dos resultados publicados pelo grupo com bexiga urinária de camundongo, mostrando assim diferenças entre as espécies.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Canda AE, Cinar MG, Turna B, Sahin MO. Pharmacologic targets on the female urethra. Urol Int. 2008;80(4):341-54. doi: 10.1159/000132690. Epub 2008 Jun 27. PMID: 18587243.
- de Groat WC, Griffiths D, Yoshimura N. Neural control of the lower urinary tract. Compr Physiol. 2015 Jan;5(1):327-96. doi: 10.1002/cphy.c130056. PMID: 25589273; PMCID: PMC4480926.
- Drake MJ. Fundamentals of terminology in lower urinary tract function. Neurourol Urodyn. 2018 Aug;37(S6):S13-S19. doi: 10.1002/nau.23768. PMID: 30614063.
- Sugaya K, Nishijima S, Miyazato M, Ogawa Y. Central nervous control of micturition and urine storage. J Smooth Muscle Res. 2005 Jun;41(3):117-32. doi: 10.1540/jsmr.41.117. PMID: 16006745.
- Fry CH, Meng E, Young JS. The physiological function of lower urinary tract smooth muscle. Auton Neurosci. 2010 Apr 19;154(1-2):3-13. doi: 10.1016/j.autneu.2009.10.006. Epub 2009 Nov 24. PMID: 19939745.
- Dalghi MG, Montalbetti N, Carattino MD, Apodaca G. The Urothelium: Life in a Liquid Environment. Physiol Rev. 2020 Oct 1;100(4):1621-1705. doi: 10.1152/physrev.00041.2019. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32191559; PMCID: PMC7717127.
- Ferguson DR, Kennedy I, Burton TJ. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism? J Physiol. 1997 Dec 1;505 (Pt 2)(Pt 2):503-11. doi: 10.1111/j.1469-7793.1997.503bb.x. PMID: 9423189; PMCID: PMC1160080.
- Nile CJ, de Vente J, Gillespie JI. Stretch independent regulation of prostaglandin E(2) production within the isolated guinea-pig lamina propria. BJU Int. 2010 Feb;105(4):540-8. doi: 10.1111/j.1464-410X.2009.08705.x. Epub 2009 Aug 11. PMID: 19673869.
- Nile CJ, Gillespie JI. Interactions between cholinergic and prostaglandin signaling elements in the urothelium: role for muscarinic type 2 receptors. Urology. 2012 Jan;79(1):240.e17-23. doi: 10.1016/j.urology.2011.08.029. Epub 2011 Nov 4. PMID: 22055690.

- Ali M, Angelo-Khattar M, Thulesius L, Fareed A, Thulesius O. Urothelial synthesis of prostanoids in the ovine ureter. Urol Res. 1998;26(3):171-4. doi: 10.1007/s002400050042. PMID: 9694598.
- Guan NN, Gustafsson LE, Svennersten K. Inhibitory Effects of Urotheliumrelated Factors. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2017 Oct;121(4):220-224. doi: 10.1111/bcpt.12785. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28371382.
- 12. Guan NN, Nilsson KF, Wiklund PN, Gustafsson LE. Release and inhibitory effects of prostaglandin D2 in guinea pig urinary bladder and the role of urothelium. Biochim Biophys Acta. 2014 Dec;1840(12):3443-51. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.09.010. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25224734.
- Kang SH, Chess-Williams R, Anoopkumar-Dukie S, McDermott C. Induction of inflammatory cytokines and alteration of urothelial ATP, acetylcholine and prostaglandin E2 release by doxorubicin. Eur J Pharmacol. 2013 Jan 30;700(1-3):102-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.053. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23219793.
- 14. McDermott C, Chess-Williams R, Mills KA, Kang SH, Farr SE, Grant GD, Perkins AV, Davey AK, Anoopkumar-Dukie S. Alterations in acetylcholine, PGE2 and IL6 release from urothelial cells following treatment with pyocyanin and lipopolysaccharide. Toxicol In Vitro. 2013 Sep;27(6):1693-8. doi: 10.1016/j.tiv.2013.04.015. Epub 2013 May 9. PMID: 23665401.
- 15.Birder LA. More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. Am J Physiol Renal Physiol. 2005 Sep;289(3):F489-95. doi: 10.1152/ajprenal.00467.2004. PMID: 16093424.
- Sellers D, Chess-Williams R, Michel MC. Modulation of lower urinary tract smooth muscle contraction and relaxation by the urothelium. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2018 Jul;391(7):675-694. doi: 10.1007/s00210-018-1510-8. Epub 2018 May 28. PMID: 29808232.
- 17. Fowler CJ, Griffiths D, de Groat WC. The neural control of micturition. Nat Rev Neurosci. 2008 Jun;9(6):453-66. doi: 10.1038/nrn2401. PMID: 18490916; PMCID: PMC2897743.
- 18. Leiria LO, Mónica FZ, Carvalho FD, Claudino MA, Franco-Penteado CF, Schenka A, Grant AD, De Nucci G, Antunes E. Functional, morphological and molecular characterization of bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: evidence of a role for L-type voltage-operated Ca2+ channels. Br

J Pharmacol. 2011 Jul;163(6):1276-88. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01311.x. PMID: 21391978; PMCID: PMC3144540.

- 19. Leiria LO, Sollon C, Calixto MC, Lintomen L, Mónica FZ, Anhê GF, De Nucci G, Zanesco A, Grant AD, Antunes E. Role of PKC and CaV1.2 in detrusor overactivity in a model of obesity associated with insulin resistance in mice. PLoS One. 2012;7(11):e48507. doi: 10.1371/journal.pone.0048507. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23144896; PMCID: PMC3492456.
- Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2004 Jul;84(3):935-86. doi: 10.1152/physrev.00038.2003. PMID: 15269341.
- 21. Schmidt HH, Hofmann F, Stasch JP. Handbook of Experimental Pharmacology 191. cGMP: generators, effectors and therapeutic implications. Preface. Handb Exp Pharmacol. 2009;(191):v-vi. PMID: 19192509.
- 22. Mónica FZ, De Nucci G. Tadalafil for the treatment of benign prostatic hyperplasia. Expert Opin Pharmacother. 2019 Jun;20(8):929-937. doi: 10.1080/14656566.2019.1589452. Epub 2019 Mar 22. PMID: 30901259.
- 23. Shabb JB. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. Chem Rev. 2001 Aug;101(8):2381-411. doi: 10.1021/cr000236I. PMID: 11749379.
- 24. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. Pharmacol Rev. 2010 Sep;62(3):525-63. doi: 10.1124/pr.110.002907. PMID: 20716671; PMCID: PMC2964902.
- 25. SUTHERLAND EW, RALL TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. J Biol Chem. 1958 Jun;232(2):1077-91. PMID: 13549488.
- 26. RALL TW, SUTHERLAND EW. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. J Biol Chem. 1958 Jun;232(2):1065-76. PMID: 13549487.
- Smith, M.; Khorana, H. G.; Drummond, G. I. Cyclic Phosphates. IV. Ribonucleoside-3',5' Cyclic Phosphates. A General Method of Synthesis and some Properties. J. Am. Chem. Soc. 1961, 83 (3), 698–706
- ASHMAN DF, LIPTON R, MELICOW MM, PRICE TD. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. Biochem Biophys Res Commun. 1963 May 22;11:330-4. doi: 10.1016/0006-291x(63)90566-7. PMID: 13965190.

- 29. Goldberg ND, Haddox MK, Nicol SE, Glass DB, Sanford CH, Kuehl FA Jr, Estensen R. Biologic regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: the Yin Yang hypothesis. Adv Cyclic Nucleotide Res. 1975;5:307-30. PMID: 165672.
- 30. Heldin CH, Lu B, Evans R, Gutkind JS. Signals and Receptors. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016 Apr 1;8(4):a005900. doi: 10.1101/cshperspect.a005900. PMID: 27037414; PMCID: PMC4817805.
- Zaccolo M. Spatial control of cAMP signalling in health and disease. Curr Opin Pharmacol. 2011 Dec;11(6):649-55. doi: 10.1016/j.coph.2011.09.014. Epub 2011 Oct 13. PMID: 22000603; PMCID: PMC4126235.
- 32. Sassone-Corsi P. The cyclic AMP pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol.
  2012 Dec 1;4(12):a011148. doi: 10.1101/cshperspect.a011148. PMID: 23209152; PMCID: PMC3504441.
- Taylor SS, Ilouz R, Zhang P, Kornev AP. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012 Oct;13(10):646-58. doi: 10.1038/nrm3432. Epub 2012 Sep 20. PMID: 22992589; PMCID: PMC3985763.
- Kemp BE, Benjamini E, Krebs EG. Synthetic hexapeptide substrates and inhibitors of 3':5'-cyclic AMP-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1976 Apr;73(4):1038-42. doi: 10.1073/pnas.73.4.1038. PMID: 177970; PMCID: PMC430195.
- 35. Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. J Biol Chem. 1994 May 20;269(20):14509-17. PMID: 8182057.
- 36. Haffner C, Jarchau T, Reinhard M, Hoppe J, Lohmann SM, Walter U. Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. EMBO J. 1995 Jan 3;14(1):19-27. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb06971.x. PMID: 7828592; PMCID: PMC398048.
- 37. Newton AC, Bootman MD, Scott JD. Second Messengers. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016 Aug 1;8(8):a005926. doi: 10.1101/cshperspect.a005926.
  PMID: 27481708; PMCID: PMC4968160.

- 38. Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. J Biol Chem. 2000 Sep 29;275(39):30069-74. doi: 10.1074/jbc.M005463200. PMID: 10893247.
- Uckert S, Stief CG, Mayer M, Jonas U, Hedlund P. Distribution and functional significance of phosphodiesterase isoenzymes in the human lower urinary tract. World J Urol. 2005 Dec;23(6):368-73. doi: 10.1007/s00345-005-0017-3. Epub 2005 Dec 6. PMID: 16331503.
- 40. Lakics V, Karran EH, Boess FG. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. Neuropharmacology. 2010 Nov;59(6):367-74. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.05.004. Epub 2010 May 21. Erratum in: Neuropharmacology. 2013 Apr;67:532. PMID: 20493887
- 41. Truss MC, Uckert S, Stief CG, Kuczyk M, Jonas U. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isoenzymes in the human detrusor smooth muscle.
  I. Identification and characterization. Urol Res. 1996;24(3):123-8. doi: 10.1007/BF00304074. PMID: 8839478.
- 42. Truss MC, Uckert S, Stief CG, Schulz-Knappe P, Hess R, Forssmann WG, Jonas U. Porcine detrusor cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes: characterization and functional effects of various phosphodiesterase inhibitors in vitro. Urology. 1995 May;45(5):893-901. doi: 10.1016/S0090-4295(99)80103-4. PMID: 7747383.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATPdependent transporters. Nat Rev Cancer. 2002 Jan;2(1):48-58. doi: 10.1038/nrc706. PMID: 11902585.
- 44. Amawi H, Sim HM, Tiwari AK, Ambudkar SV, Shukla S. ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer. Adv Exp Med Biol. 2019;1141:549-580. doi: 10.1007/978-981-13-7647-4\_12. PMID: 31571174.
- 45. Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. Cancer Res. 1997 Aug 15;57(16):3537-47. PMID: 9270026.
- 46. Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A, Fridland A. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-

based antiviral drugs. Nat Med. 1999 Sep;5(9):1048-51. doi: 10.1038/12487. PMID: 10470083.

- 47. Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, Borst P. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 20;97(13):7476-81. doi: 10.1073/pnas.120159197. PMID: 10840050; PMCID: PMC16570.
- 48. Rius M, Thon WF, Keppler D, Nies AT. Prostanoid transport by multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) localized in tissues of the human urogenital tract. J Urol. 2005 Dec;174(6):2409-14. doi: 10.1097/01.ju.0000180411.03808.cb. PMID: 16280858.
- 49. Nies AT, Spring H, Thon WF, Keppler D, Jedlitschky G. Immunolocalization of multidrug resistance protein 5 in the human genitourinary system. J Urol. 2002 May;167(5):2271-5. PMID: 11956491.
- 50. Jedlitschky G, Tirschmann K, Lubenow LE, Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Greinacher A, Kroemer HK. The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. Blood. 2004 Dec 1;104(12):3603-10. doi: 10.1182/blood-2003-12-4330. Epub 2004 Aug 5. PMID: 15297306.
- 51. Tchernychev B, Ge P, Kessler MM, Solinga RM, Wachtel D, Tobin JV, Thomas SR, Lunte CE, Fretzen A, Hannig G, Bryant AP, Kurtz CB, Currie MG, Silos-Santiago I. MRP4 Modulation of the Guanylate Cyclase-C/cGMP Pathway: Effects on Linaclotide-Induced Electrolyte Secretion and cGMP Efflux. J Pharmacol Exp Ther. 2015 Oct;355(1):48-56. doi: 10.1124/jpet.115.224329. Epub 2015 Jul 27. PMID: 26216942.
- 52. Grange RMH, Preedy MEJ, Renukanthan A, Dignam JP, Lowe VJ, Moyes AJ, Pérez-Ternero C, Aubdool AA, Baliga RS, Hobbs AJ. Multidrug resistance proteins preferentially regulate natriuretic peptide-driven cGMP signalling in the heart and vasculature. Br J Pharmacol. 2022 Jun;179(11):2443-2459. doi: 10.1111/bph.15593. Epub 2021 Jul 13. PMID: 34131904.
- 53. Jones TR, Zamboni R, Belley M, Champion E, Charette L, Ford-Hutchinson AW, Frenette R, Gauthier JY, Leger S, Masson P, et al. Pharmacology of L-660,711 (MK-571): a novel potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist. Can

J Physiol Pharmacol. 1989 Jan;67(1):17-28. doi: 10.1139/y89-004. PMID: 2540892.

- 54. Depré M, Margolskee DJ, Hsieh JY, Van Hecken A, Buntinx A, De Lepeleire I, Rogers JD, De Schepper PJ. Plasma drug profiles and tolerability of MK-571 (L-660,711), a leukotriene D4 receptor antagonist, in man. Eur J Clin Pharmacol. 1992;43(4):427-30. doi: 10.1007/BF02220621. PMID: 1451725.
- 55. Amirav I, Pawlowski N. Inhibition of exercise-induced bronchoconstriction by MK-571, a potent leukotriene D4-receptor antagonist. N Engl J Med. 1991 May 2;324(18):1288. doi: 10.1056/NEJM199105023241815. PMID: 1849613.
- 56. Kips JC, Joos GF, De Lepeleire I, Margolskee DJ, Buntinx A, Pauwels RA, Van der Straeten ME. MK-571, a potent antagonist of leukotriene D4-induced bronchoconstriction in the human. Am Rev Respir Dis. 1991 Sep;144(3 Pt 1):617-21. doi: 10.1164/ajrccm/144.3\_Pt\_1.617. PMID: 1892302.
- 57. Gaddy JN, Margolskee DJ, Bush RK, Williams VC, Busse WW. Bronchodilation with a potent and selective leukotriene D4 (LTD4) receptor antagonist (MK-571) in patients with asthma. Am Rev Respir Dis. 1992 Aug;146(2):358-63. doi: 10.1164/ajrccm/146.2.358. PMID: 1489125.
- 58. Rasmussen JB, Eriksson LO, Margolskee DJ, Tagari P, Williams VC, Andersson KE. Leukotriene D4 receptor blockade inhibits the immediate and late bronchoconstrictor responses to inhaled antigen in patients with asthma. J Allergy Clin Immunol. 1992 Aug;90(2):193-201. doi: 10.1016/0091-6749(92)90071-9. PMID: 1323587.
- 59. Chung KF. Leukotriene receptor antagonists and biosynthesis inhibitors: potential breakthrough in asthma therapy. Eur Respir J. 1995 Jul;8(7):1203-13. doi: 10.1183/09031936.95.08071203. PMID: 7589406.
- 60. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Keppler D. Characterization of the ATPdependent leukotriene C4 export carrier in mastocytoma cells. Eur J Biochem. 1994 Mar 1;220(2):599-606. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18661.x. PMID: 8125120.
- 61. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, Keppler D. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. Cancer Res. 1994 Sep 15;54(18):4833-6. PMID: 7915193.
- 62. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and

structurally related conjugates. J Biol Chem. 1994 Nov 11;269(45):27807-10. PMID: 7961706.

- 63. Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, Beck J. The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. Biochem Biophys Res Commun. 1995 Mar 8;208(1):345-52. doi: 10.1006/bbrc.1995.1344. PMID: 7887949.
- 64. Sinha C, Ren A, Arora K, Moon CS, Yarlagadda S, Zhang W, Cheepala SB, Schuetz JD, Naren AP. Multi-drug resistance protein 4 (MRP4)-mediated regulation of fibroblast cell migration reflects a dichotomous role of intracellular cyclic nucleotides. J Biol Chem. 2013 Feb 8;288(6):3786-94. doi: 10.1074/jbc.M112.435925. Epub 2012 Dec 21. PMID: 23264633; PMCID: PMC3567633.
- 65. Boydens C, Pauwels B, Vanden Daele L, Van de Voorde J. Inhibition of Cyclic GMP Export by Multidrug Resistance Protein 4: A New Strategy to Treat Erectile Dysfunction? J Sex Med. 2017 Apr;14(4):502-509. doi: 10.1016/j.jsxm.2017.02.005. Epub 2017 Mar 1. PMID: 28258955.
- 66. Bertollotto GM, de Oliveira MG, Alexandre EC, Calmasini FB, Passos GR, Antunes E, Mónica FZ. Inhibition of Multidrug Resistance Proteins by MK 571 Enhances Bladder, Prostate, and Urethra Relaxation through cAMP or cGMP Accumulation. J Pharmacol Exp Ther. 2018 Oct;367(1):138-146. doi: 10.1124/jpet.118.250076. Epub 2018 Aug 14. PMID: 30108158.
- 67. de Oliveira MG, Passos GR, de Gomes ET, Leonardi GR, Zapparoli A, Antunes E, Mónica FZ. Inhibition of multidrug resistance proteins by MK571 restored the erectile function in obese mice through cGMP accumulation. Andrology. 2023 Mar;11(3):611-620. doi: 10.1111/andr.13340. Epub 2022 Nov 25. PMID: 36375168.
- 68. Mendes-Silverio CB, Lescano CH, Zaminelli T, Sollon C, Anhê GF, Antunes E, Mónica FZ. Activation of soluble guanylyl cyclase with inhibition of multidrug resistance protein inhibitor-4 (MRP4) as a new antiplatelet therapy. Biochem Pharmacol. 2018 Jun;152:165-173. doi: 10.1016/j.bcp.2018.03.028. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29605625.
- 69. Lunney JK. Advances in swine biomedical model genomics. Int J Biol Sci. 2007 Feb 10;3(3):179-84. doi: 10.7150/ijbs.3.179. PMID: 17384736; PMCID: PMC1802015.

- Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerdts V. The pig: a model for human infectious diseases. Trends Microbiol. 2012 Jan;20(1):50-7. doi: 10.1016/j.tim.2011.11.002. Epub 2011 Dec 5. PMID: 22153753; PMCID: PMC7173122.
- 71. Gutierrez K, Dicks N, Glanzner WG, Agellon LB, Bordignon V. Efficacy of the porcine species in biomedical research. Front Genet. 2015 Sep 16;6:293. doi: 10.3389/fgene.2015.00293. PMID: 26442109; PMCID: PMC4584988.
- 72. Pabst R. The pig as a model for immunology research. Cell Tissue Res. 2020 May;380(2):287-304. doi: 10.1007/s00441-020-03206-9. Epub 2020 Apr 30.
  PMID: 32356014; PMCID: PMC7223737.
- 73. Chiappalupi S, Salvadori L, Luca G, Riuzzi F, Calafiore R, Donato R, Sorci G. Do porcine Sertoli cells represent an opportunity for Duchenne muscular dystrophy? Cell Prolif. 2019 May;52(3):e12599. doi: 10.1111/cpr.12599. Epub 2019 Mar 26. PMID: 30912260; PMCID: PMC6536415.
- 74. Tang H, Mayersohn M. Porcine Prediction of Pharmacokinetic Parameters in People: A Pig in a Poke? Drug Metab Dispos. 2018 Nov;46(11):1712-1724. doi: 10.1124/dmd.118.083311. Epub 2018 Aug 31. PMID: 30171162.
- Raia SMA. Xenotransplantation: a consistent perspective. Rev Col Bras Cir.
   2022 Feb 28;49:e2022EDIT01. English, Portuguese. doi: 10.1590/0100-6991e 2022EDIT01. PMID: 35239857.
- 76. Klymiuk N, Seeliger F, Bohlooly-Y M, Blutke A, Rudmann DG, Wolf E. Tailored Pig Models for Preclinical Efficacy and Safety Testing of Targeted Therapies. Toxicol Pathol. 2016 Apr;44(3):346-57. doi: 10.1177/0192623315609688. Epub 2015 Oct 27. PMID: 26511847.
- 77. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ Jr, Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. Vet Pathol. 2012 Mar;49(2):344-56.
  doi: 10.1177/0300985811402846. Epub 2011 Mar 25. Erratum in: Vet Pathol. 2012 Jul;49(4):738. PMID: 21441112.
- Mónica FZ, Antunes E. Stimulators and activators of soluble guanylate cyclase for urogenital disorders. Nat Rev Urol. 2018 Jan;15(1):42-54. doi: 10.1038/nrurol.2017.181. Epub 2017 Nov 14. PMID: 29133940.
- 79. Mónica FZ, Bricola AA, Báu 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. 2008 Apr;153(8):1659-68. doi: 10.1038/bjp.2008.39. Epub 2008 Feb 25. PMID: 18297104; PMCID: PMC2438257.

- 80. Füllhase C, Hennenberg M, Sandner P, Strittmatter F, Niedworok C, Bauer RM, Gratzke C, Soler R, Stief C, Andersson KE. Reduction of obstruction related bladder overactivity by the guanylyl cyclase modulators BAY 41-2272 and BAY 60-2770 alone or in combination with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. Neurourol Urodyn. 2015 Nov;34(8):787-93. doi: 10.1002/nau.22665. Epub 2014 Sep 17. PMID: 25230878.
- 81. Leiria LO, Silva FH, Davel AP, Alexandre EC, Calixto MC, De Nucci G, Mónica FZ, Antunes E. The soluble guanylyl cyclase activator BAY 60-2770 ameliorates overactive bladder in obese mice. J Urol. 2014 Feb;191(2):539-47. doi: 10.1016/j.juro.2013.09.020. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24050894.
- 82. de Oliveira MG, Calmasini FB, Alexandre EC, De Nucci G, Mónica FZ, Antunes E. Activation of soluble guanylyl cyclase by BAY 58-2667 improves bladder function in cyclophosphamide-induced cystitis in mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2016 Jul 1;311(1):F85-93. doi: 10.1152/ajprenal.00041.2016. Epub 2016 Apr 27. PMID: 27122537.
- 83. FDA. Summary of safety and efficacy as basis for Advisory Committee briefing document for mirabegron, 2012 Jun 12. Division of Reproductive and Urologic Products, Office of New Drugs Center for Drug Evaluation and Research of Food and Drug Administration; Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/nda/2012/202611Orig1s000 SumR.pdf (accessed 2023 Aug 08).
- 84. Nomiya M, Yamaguchi O. A quantitative analysis of mRNA expression of alpha 1 and beta-adrenoceptor subtypes and their functional roles in human normal and obstructed bladders. J Urol. 2003 Aug;170(2 Pt 1):649-53. doi: 10.1097/01.ju.0000067621.62736.7c. PMID: 12853849.
- 85. van Aubel RAMH, Smeets PHE, Peters JGP, Bindels RJM, Russel FGM. The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. J

Am Soc Nephrol. 2002 Mar;13(3):595-603. doi: 10.1681/ASN.V133595. PMID: 11856762.

- 86. Seo H, Choi Y, Shim J, Yoo I, Ka H. Prostaglandin transporters ABCC4 and SLCO2A1 in the uterine endometrium and conceptus during pregnancy in pigs. Biol Reprod. 2014 May;90(5):100. doi: 10.1095/biolreprod.113.114934. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24695625.
- Jafari NV, Rohn JL. The urothelium: a multi-faceted barrier against a harsh environment. Mucosal Immunol. 2022 Jun;15(6):1127-1142. doi: 10.1038/s41385-022-00565-0. Epub 2022 Sep 30. PMID: 36180582; PMCID: PMC9705259.
- Peyronnet B, Mironska E, Chapple C, Cardozo L, Oelke M, Dmochowski R, Amarenco G, Gamé X, Kirby R, Van Der Aa F, Cornu JN. A Comprehensive Review of Overactive Bladder Pathophysiology: On the Way to Tailored Treatment. Eur Urol. 2019 Jun;75(6):988-1000. doi: 10.1016/j.eururo.2019.02.038. Epub 2019 Mar 26. PMID: 30922690.
- Markham A, Faulds D. Montelukast. Drugs. 1998 Aug;56(2):251-6; discussion
   257. doi: 10.2165/00003495-199856020-00010. PMID: 9711449.
- 90. Reid G, Wielinga P, Zelcer N, De Haas M, Van Deemter L, Wijnholds J, Balzarini J, Borst P. Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. Mol Pharmacol. 2003 May;63(5):1094-103. doi: 10.1124/mol.63.5.1094. PMID: 12695538.
- 91. Yamada S, Chimoto J, Shiho M, et al. Possible Involvement of Muscarinic Receptor Blockade in Mirabegron Therapy for Patients with Overactive Bladder. J Pharmacol Exp Ther. 2021;377(2):201-206. doi:10.1124/jpet.120.000301
- 92. Calmasini FB, Candido TZ, Alexandre EC, et al. The beta-3 adrenoceptor agonist, mirabegron relaxes isolated prostate from human and rabbit: new therapeutic indication?. *Prostate*. 2015;75(4):440-447. doi:10.1002/pros.22930
- 93. Alexandre EC, Kiguti LR, Calmasini FB, et al. Mirabegron relaxes urethral smooth muscle by a dual mechanism involving β3 -adrenoceptor activation and α1 -adrenoceptor blockade. *Br J Pharmacol.* 2016;173(3):415-428. doi:10.1111/bph.13367
- 94. de Oliveira MG, Rojas-Moscoso JA, Bertollotto GM, et al. Mirabegron elicits rat corpus cavernosum relaxation and increases in vivo erectile response. *Eur J Pharmacol.* 2019;858:172447. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172447
- 95. Satori NA, Pacini ESA, Godinho RO. Impact of the cAMP efflux and extracellular cAMP-adenosine pathway on airway smooth muscle relaxation induced by formoterol and phosphodiesterase inhibitors. Chem Biol Interact. 2023 Jul 11;382:110630. doi: 10.1016/j.cbi.2023.110630. Epub ahead of print. PMID: 37442289.

**ANEXO 1** 

CERTIFICADO CEUA nº 98/2022





## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada <u>Avaliação da resistência vascular pulmonar e</u> concentração plasmática de 6-nitrodopamina em suínos submetidos a hipertensão pulmonar induzida por hipóxia, registrada com o nº <u>5585-1/2020</u>, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Gilberto De Nucci e Mariana Goncalves de Oliveira Taranto, José Britto Junior**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido** aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da **Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **20/08/2020**.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/11/2020 a 01/11/2021
Vigência da autorização para	20/08/2020 a 01/11/2021
manipulação animal:	
Espécie / linhagem/ raça:	Suíno / Large White
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Kilos
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Suíno / Large White
No. de animais:	6
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 30.00 Kilos
Sexo:	6 Machos
Origem:	Granja Geraldo Jose Vermeulen e Outro - CNPJ
	08.075.146/0001-08
Biotério onde serão mantidos	Biotérios do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia
os animais:	Experimental - I e II, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA,SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 04 de maio de 2022.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Rosangela dos Santos
Presidente Secretária Executiva
<u>MPORTANTE</u>: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O
formulário encontra-se disponível na página da CEU/A/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que
novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica Informar código 983CCEAD F2F94EE7 9F9101D6 B5F374C0

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO**, **PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 06/05/2022, às 19:31 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS**, **SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 05/05/2022, às 14:16 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: 983CCEAD F2F94EE7 9F9101D6 B5F374C0



## **ANEXO 2**

CERTIFICADO CEUA nº 99/2022



Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp



ADD 3 TODA TODAY OF MANY AND A TO A DAY OF A

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "<u>Avaliação da</u> resistência vascular pulmonar e concentração plasmática de 6nitrodopamina em suínos submetidos a hipertensão pulmonar induzida por hipóxia", (protocolo CEUA/UNICAMP nº <u>5585-1/2020</u>), de responsabilidade do Prof. Dr. Gilberto De Nucci, teve aprovada a inclusão dos novos executores: ERICK DE TOLEDO GOMES.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP, aprovado em reunião do dia 20/08/2020.

Campinas, 04 de maio de 2022.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Presidente da CEUA/UNICAMP Rosangela dos Santos Secretária Executiva CEUA/UNICAMP

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

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica Informar código 524D8F9D E9B948E8 9335630C E511D711

Documento assinado eletronicamente por WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP, em 06/05/2022, às 19:31 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP, em 05/05/2022, às 14:16 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: 524D8F9D E9B948E8 9335630C E511D711

