

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Stefânia Forner

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES B₁ E B₂ PARA AS
CININAS NA HIPERATIVIDADE DA BEXIGA URINÁRIA
INDUZIDA POR LESÃO MEDULAR EM RATOS**

Florianópolis

2011

Stefânia Forner

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES B₁ E B₂ PARA AS
CININAS NA HIPERATIVIDADE DA BEXIGA URINÁRIA
INDUZIDA POR LESÃO MEDULAR EM RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista
Calixto

Co-orientador: Dr^a. Janice Koepp

Florianópolis

2011

Catologação na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

F727e Forner, Stefânia

Envolvimento dos receptores B1 e B2 para as cininas na hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão medular em ratos [dissertação] / Stefânia Forner ; orientador, João Batista Calixto. - Florianópolis, SC, 2011.

102 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Medula espinhal - Lesão. 3. Bexiga. 4. Cininas. I. Calixto, João Batista. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais – Damir e Valério – por terem me ensinado desde a infância o valor dos livros e dos estudos e, conseqüentemente, os valores gerados por isso. Pessoas que são meus maiores exemplos de dedicação, persistência e força. Agradeço infinitamente por sempre acreditarem em mim.

Ao meu irmão, Marcos, minha cunhada Mariane e meu sobrinho Felipe pelo apoio e compreensão.

Ao professor Dr. João Batista Calixto que é um exemplo de dedicação a produtividade da ciência brasileira, pela orientação e por acreditar no meu trabalho.

À Dra. Janice Koepp pelo apoio, incentivo e por acreditar tanto no projeto quanto na minha capacidade.

À Dra. Edinéia L. de Andrade por ter me transmitido o conhecimento técnico e intelectual desde os anos de iniciação científica.

Ao Dr. Rodrigo Medeiros pelo incentivo desde o primeiro dia no laboratório, pela disposição em trocar idéias e por demonstrar que a ciência é feita de pessoas dedicadas e apaixonadas pelo desconhecido.

À Alessandra C. Martini por estar sempre presente nos dias bons e ruins. Por me ajudar a construir e desconstruir conceitos. Da ciência à gastronomia. Я тебя люблю. Sempre.

À Juliana Fabris Lima Garcia pela grande amizade que nasceu das horas compartilhadas dentro e fora do laboratório. Pelas conversas sobre e além farmacologia. Obrigada.

Aos atuais e antigos colegas de trabalho, em especial à Mariane Manjavachi, Maira Cola, Juliana Chaves, Daniela Leite, Raquel Schwanke, Flávia C. Meotti, Kathryn S. Silva, Ana Flávia Paszcuk, Cláudia Figueiredo, Eliziane Patrício, Maira Bicca, Gecioni L. Neckel, Andrey Nascimento, Fernanda Basei, Rodrigo Marcon, Allisson Freire Bento, Rafael Dutra, Rafaela Claudino e Jarbas Motta.

Ao Dr. Sheldon Cooper. Bazinga!

À Aline M.V. Garcia, à Patrícia V. Abreu e à Juliana G. da Cunha não somente pelas refeições compartilhadas, mas por facilitarem e colaborarem para que o trabalho tenha sido realizado.

Ao Pedro, por estar sempre disposto a me ajudar com os animais.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia por acreditarem que com dedicação pode-se, não somente fazer pesquisa, mas melhorar o nível educacional do nosso país.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

O envolvimento dos receptores B_1 e B_2 para as cininas em processos fisiopatológicos da bexiga urinária tem sido demonstrado em diversos estudos. No entanto, a implicação destes receptores na hiperatividade da bexiga urinária após lesão medular permanece inexplorada até o momento. Desse modo, este estudo investigou o envolvimento dos receptores B_1 e B_2 na hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão da medula espinhal por compressão ao nível torácico T_9 - T_{10} . A lesão medular induziu uma resposta inflamatória pronunciada e diversas mudanças funcionais na contratilidade e nos parâmetros urodinâmicos da bexiga urinária. A lesão medular resultou, ainda, em um aumento nos níveis de RNAm para os receptores B_1 na bexiga urinária, nos gânglios da raiz dorsal (L_6 - S_1) e nos segmentos correspondentes da medula espinhal. Houve também, em um aumento na expressão dos receptores B_1 e B_2 na bexiga urinária. Ensaio *in vitro* com preparações da bexiga urinária obtidas 2, 7, 14 e 28 dias após a lesão medular revelaram aumento significativo da resposta contrátil a agonistas seletivos dos receptores B_1 (des-Arg⁹-BK) ou B_2 (bradicinina) quando comparadas às respostas obtidas de grupos controle ou falso-operado. As respostas aos agonistas B_1 ou B_2 foram reduzidas pelos seus respectivos antagonistas seletivos, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK ou Hoe 140. De maneira interessante, estudos cistométricos em animais com lesão medular demonstraram que o tratamento sistêmico com Hoe 140 reduziu significativamente a amplitude e o número das contrações não-associadas a micção (CNMs) na bexiga urinária. Tratamento sistêmico com o antagonista do receptor B_1 , des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, apenas reduziu significativamente o número das CNMs na bexiga urinária dos animais lesionados. O presente estudo demonstra o importante envolvimento dos receptores B_1 e B_2 para as cininas na hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão medular em ratos e apontam novos alvos terapêuticos para o tratamento da hiperatividade da bexiga urinária decorrente de lesão medular traumática.

Palavras-chave: Lesão medular, bexiga urinária hiperativa, receptor B_1 e B_2 para cininas.

ABSTRACT

The B₁ (B₁R) and B₂ (B₂R) kinin receptors has been implicated in physiological and pathological conditions of the bladder, but its role in overactive bladder (OB) following spinal cord injury (SCI) remains elusive. Here we assessed by means of functional and molecular approaches the relevance of these receptors in OB caused by SCI in rats. SCI resulted in an inflammatory process, changes in bladder contractility and in urodynamic parameters. Moreover, SCI caused a marked up-regulation of B₁ mRNA levels in bladder, spinal cord and dorsal root ganglion (L₆-S₁). SCI also caused an up-regulation of B₁ and B₂ protein levels in bladder. The exposure of B₁ agonist, des-Arg⁹-BK, and B₂ agonist, bradykinin (BK), to bladder strips induced a contractile response significantly enhanced following SCI. Pre-incubation of the bladder preparations with des-Arg-Leu⁸-BK (B₁ antagonist) or Hoe 140 (B₂ antagonist), significantly reduced bladder contraction. In addition, cystometric studies on SCI animals revealed that systemic Hoe 140 treatment significantly reduced the amplitude and the number of non-voiding contractions (NVCs) while systemic treatment with DALBK only reduced the number of NVCs. There were no significant changes in basal pressure, threshold pressure, maximum voiding pressure, voided volume and voiding efficiency before administration of vehicle, HOE 140 or DALBK. Taken together, these results suggest that up-regulation of BK receptors are involved in the mechanism inducing OB following SCI in rats.

Keywords: Spinal cord injury, overactive urinary bladder, B₁ and B₂ kinin receptors

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfologia da bexiga urinária.....	3
Figura 2. Inervação do trato urinário inferior.....	6
Figura 3. Reflexo miccional entre indivíduos normais e com lesão medular.....	9
Figura 4. Sistema caliceína-cininas.....	16
Figura 5. Vias para a regulação da expressão do receptor B ₁	18
Figura 6. Avaliação locomotora após lesão medular através da escala BBB.....	32
Figura 7. Alterações histopatológicas da bexiga urinária após a lesão medular.....	33
Figura 8. Níveis teciduais de citocinas pró-inflamatórias na bexiga urinária após lesão medular.....	34
Figura 9. Efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm dos receptores B ₁ e receptores B ₂ na bexiga urinária, gânglio da raiz dorsal e medula espinhal.....	36
Figura 10. Efeito da lesão medular sobre a expressão dos receptores B ₁ e B ₂ na bexiga urinária.....	38
Figura 11. Efeito contrátil do agonista de receptores B ₁ para as cininas, a des-Arg ⁹ -BK, na bexiga urinária isolada de ratos submetidos à lesão medular.....	40
Figura 12. Efeito contrátil do agonista do receptor B ₂ para as cininas, a bradicinina, na bexiga urinária isolada de ratos após lesão medular.....	42
Figura 13. Efeito contrátil dos agonistas dos receptores B ₁ e B ₂ para as cininas, des-Arg ⁹ -BK e bradicinina na bexiga urinária de rato após lesão medular quando pré-incubados com seus antagonistas seletivos des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK e Hoe 140, respectivamente.....	44
Figura 14. Alterações urodinâmicas.....	47
Figura 15. Efeito do tratamento sistêmico com des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK ou veículo (salina).....	48
Figura 16. Efeito do tratamento sistêmico com Hoe 140 ou veículo (salina).....	49
Figura 17. Mecanismos propostos para a participação dos receptores B ₁ e B ₂ na hiperatividade da bexiga urinária decorrente da lesão medular traumática.....	60

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela 1. Fármacos antimuscarínicos utilizados na clínica para o tratamento da hiperatividade da bexiga urinária.....	12
Tabela 2. Alterações dos parâmetros urodinâmicos após a lesão medular.....	46
Tabela 3. Efeito do tratamento sistêmico com Hoe 140 ou des-Arg9[Leu8]-BK ou veículo (salina) sobre os parâmetros urodinâmicos avaliados 28 dias após a lesão medular.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína de ativação 1
BK	Bradicinina
CNM	Contração não-associada à micção
CBU	Capacidade da bexiga urinária
DABK	des-Arg ⁹ -BK
DALBK	des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK
EEV	Eficiência de esvaziamento vesical
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
E.P.M	Erro padrão da média
EUE	Esfíncter uretral externo
GRD	Gânglio da raiz dorsal
IL	Interleucina
IκB	Proteína inibitório do NF-κB
JNK	Proteína quinase c-Jun NH ₂ -terminal
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NF-κB	Fator nuclear-κB
PB	Pressão basal
PBS	Salina tamponada com fosfato
PL	Pressão limiar
PM	Pressão de micção
RNA_m	RNA mensageiro
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TNF	Fator de necrose tumoral
VE	Volume eliminado
μM	Micromolar
nM	Nanomolar
ng	Nanograma
mg	Miligrama

SUMÁRIO

Pág.

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Neurofisiologia do trato urinário inferior.....	1
1.1.1. O controle neural da micção.....	3
1.1.2. O processo de micção.....	4
1.2. Fisiopatologia do processo de micção e o efeito da lesão medular sobre a micção.....	7
1.3. Células uroteliais da bexiga urinária.....	10
1.4. Tratamento clínico para a hiperatividade da bexiga urinária.....	11
1.5. Histórico das cininas.....	13
1.6. Vias de síntese e degradação das cininas.....	14
1.7. Os receptores para as cininas.....	15
1.8. Indução do receptor B ₁	17
1.9. Clonagem e sequenciamento.....	19
1.10. Participação das cininas no trato urinário.....	20
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Animais.....	22
3.2. Lesão medular traumática.....	22
3.3. Avaliação da atividade locomotora.....	23
3.4. Análise histopatológica da bexiga urinária.....	24
3.5. Dosagem de citocinas.....	24
3.6. Extração do RNA total.....	25
3.7. Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real).....	25
3.8. Expressão protéica pelo imunoenensaio de Western blot.....	26
3.9. Preparações de bexiga urinária isolada de rato.....	27
3.10. Avaliação da resposta contrátil da bexiga urinária isolada a agonistas de receptores B ₁ e B ₂ para as cininas.....	28
3.11. Avaliação <i>in vivo</i> dos parâmetros urodinâmicos através da análise cistométrica.....	28
3.12. Análise estatística.....	30
3.13. Drogas e reagentes.....	30

4. RESULTADOS.....	31
4.1. Análise da atividade locomotora dos animais após a lesão medular.....	31
4.2. Alterações histopatológicas decorrentes da lesão medular...32	
4.3. Níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α na bexiga urinária de ratos submetidos à lesão medular.....	33
4.4. Efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm para os receptores B ₁ e B ₂	35
4.5. Análise da expressão dos receptores B ₁ e B ₂ na bexiga urinária após a lesão medular.....	37
4.6. Efeito do agonista de receptores B ₁ sobre a reatividade da bexiga isolada de rato após a lesão medular.....	39
4.7. Efeito do agonista de receptores B ₂ sobre a reatividade da bexiga isolada de rato após a lesão medular.....	41
4.8. Efeito dos antagonistas seletivos de receptores B ₁ e B ₂ sobre a resposta contrátil induzida pelos agonistas destes receptores em bexigas urinárias de ratos submetidos à lesão medular traumática.....	43
4.9. Alterações dos parâmetros urodinâmicos após lesão medular.....	45
5. DISCUSSÃO.....	51
6. ESQUEMA FINAL.....	60
7. REFERÊNCIAS.....	61
8. ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular é uma síndrome neurológica altamente incapacitante que acomete 250.000 pacientes no Brasil, com uma ocorrência de cerca de 8.950 novos casos por ano (MEYER et al., 2003). O trauma medular prejudica o funcionamento de vários órgãos e sistemas e produz uma alteração da homeostase física e emocional do paciente.

As lesões medulares são, na sua maioria, de origem traumática. De acordo com a Associação de Assistência à Criança Deficiente (AACD) (2007), os acidentes automobilísticos são responsáveis por 42% dos traumas medulares. Adultos jovens entre 16 e 30 anos são os mais acometidos por trauma medular (61%), sendo que 70% deles tornam-se paraplégicos por lesão medular torácica, lombar ou sacral, resultando em paralisia parcial ou completa de parte ou de ambos os membros inferiores e tronco, enquanto que 30% deles tornam-se tetraplégicos por lesão medular cervical, resultando em paralisia parcial ou completa do tronco e dos quatro membros (MEYER et al, 2003; SCHMITZ et al., 2004).

As lesões medulares em nível torácico e lombar resultam em disfunções do trato urinário inferior, tais como a hiperatividade da bexiga urinária, dissinergia vesico-esfincteriana e retenção urinária. Desta forma, esta dissertação estudou o envolvimento dos receptores B₁ e B₂ para as cininas na hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão medular traumática em ratos. Primeiramente, será apresentado um embasamento teórico sobre a neurofisiologia, a anatomia do trato urinário inferior, o histórico das cininas e a relevância das cininas na bexiga urinária. A seguir, serão apresentados os materiais e métodos utilizados para a realização deste estudo e os resultados obtidos. Por fim, a discussão do estudo versará sobre os resultados e a participação dos receptores B₁ e B₂ para as cininas na hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão medular.

1.1 Neurofisiologia do trato urinário inferior

O trato urinário inferior é composto pela bexiga urinária, uretra, esfíncteres uretrais e por uma complexa interação de impulsos neurais localizados no cérebro, medula espinhal e gânglios periféricos. A bexiga urinária é um órgão cavitário situado na cavidade pélvica que tem como função básica o armazenamento e a eliminação da urina produzida nos rins e transporte a ela através dos ureteres. Quando cheia, a bexiga

urinária pode conter até 700 ml de urina, que é eliminada periodicamente através da uretra (GUYTON, 1988). A grande distensibilidade, resistência e elasticidade da bexiga se deve aos seus músculos e à presença de colágeno e elastina. As paredes da bexiga são compostas por diferentes camadas de tecido: uma túnica mucosa, uma túnica submucosa, uma túnica muscular e uma camada externa. A túnica mucosa é constituída pela continuação da mucosa do ureter, ou seja, a parte interna da parede que está em contato direto com a urina. Esta camada é composta de células epiteliais que formam o urotélio, as quais se distendem e diminuem em espessura quando a bexiga urinária se enche. A túnica submucosa é composta de células conjuntivas que servem para dar suporte à mucosa. A túnica muscular é constituída por células musculares lisas dispostas em três camadas de músculo: uma interna onde as fibras se entrecruzam em todas as direções, uma intermédia na qual as fibras correm no sentido circular e uma camada mais externa em que as fibras se dispõem longitudinalmente, formando assim, o músculo detrusor. Esta disposição das fibras musculares permite ao órgão se dilatar quando está armazenando a urina, para que, após o esvaziamento, o órgão possa reduzir de tamanho. A camada externa, denominada serosa, é constituída por tecido conjuntivo e adiposo (GUYTON, 1988).

No interior da bexiga há três orifícios. Dois orifícios estão situados em cima da bexiga urinária e na parte posterior aos pontos de chegada dos dois ureteres; o terceiro orifício é a uretra. Os três orifícios determinam um triângulo que é chamado trígono vesical. O trígono tem a característica de ser quase inextensível. O desenvolvimento da musculatura que se encontra abaixo torna esta região de aspecto muito diferente em relação ao restante da parede vesical. Os ureteres encontram-se obliquamente na bexiga, o que faz com que a pressão exercida pela urina sobre as paredes da bexiga seja sentida, também, pelos ureteres e os comprima. Isso impede que a urina retorne aos rins quando a bexiga encontra-se cheia (MARTINI, 1992). A uretra é dividida em esfíncter externo ou distal, composto de músculo estriado, e em esfíncter interno ou proximal, composto de músculo detrusor entrelaçado com uma grande quantidade de tecido elástico. O tônus exercido pelo esfíncter interno normalmente mantém o colo vesical e a uretra posterior vazios e, portanto, evita o esvaziamento da bexiga até que a pressão na porção principal se eleve acima de um limiar crítico. Ao se contrair, o músculo detrusor impede o contínuo instilar da urina para o exterior. Ao se relaxar, ele permite a passagem da urina durante a micção. A sua ação é conjunta com a do esfíncter externo, o qual está

sob o controle voluntário do sistema nervoso central, e que pode ser usado para evitar conscientemente a micção até mesmo quando controles involuntários tentam esvaziar a bexiga.

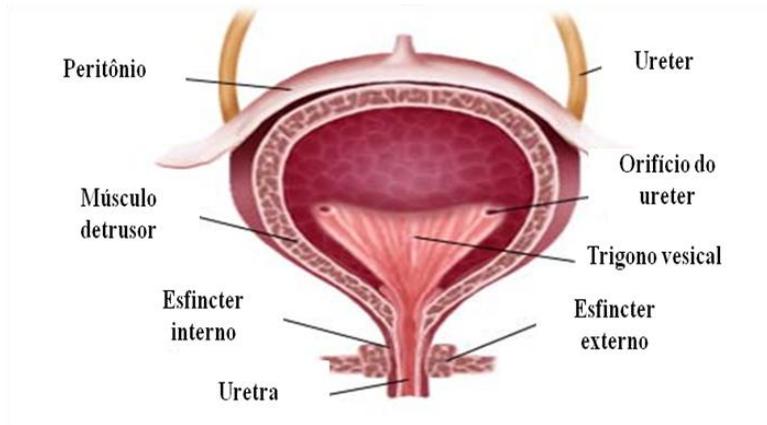


Figura 1. Morfologia da bexiga urinária (Adaptado de KOOP, 1996).

1.1.1 O controle neural da micção

A micção ocorre involuntariamente em recém-nascidos e crianças até atingirem a idade de 3 a 5 anos. Após essa idade, o processo de micção passa a ser regulado voluntariamente. O circuito neural que controla esse processo é complexo e altamente distribuído, envolvendo vias em diversos níveis cerebrais, medula espinhal e sistema nervoso periférico, bem como a participação de múltiplos neurotransmissores e outros mediadores químicos.

As vias neurais que controlam as funções do trato urinário inferior funcionam como um interruptor elétrico *liga/desliga*, ou seja, são capazes de manter uma relação funcional recíproca entre a bexiga urinária e a uretra. Sendo assim, os reflexos de armazenamento são ativados durante o enchimento da bexiga urinária e organizados primariamente na medula espinhal, enquanto que os reflexos de esvaziamento são mediados por mecanismos reflexos que são controlados pelo cérebro. A regulação supraespinhal das funções do trato urinário inferior depende de múltiplas vias, as quais conduzem informações entre o cérebro e a medula espinhal.

No cérebro, muitas populações neuronais estão envolvidas no controle da bexiga, uretra e esfíncter uretral. Algumas, tais como neurônios serotonérgicos presentes no núcleo da rafe, neurônios noradrenérgicos do loco cerúleo e as células noradrenérgicas A5 no tronco cerebral, representam mecanismos não-específicos com projeções espinhais difusas. Outros grupos neuronais são específicos para a micção. Entre eles estão os neurônios do núcleo de Barrington, conhecido também como centro pontino da micção, que está localizado nas regiões medial e dorso lateral da ponte, e aqueles da substância cinzenta periaquedutal que estão localizados nos neurônios de várias partes do córtex cerebral, em particular no córtex frontal medial. Algumas destas áreas cerebrais apresentam conexões entre si e também entre o cérebro e a medula espinhal lombo-sacral (FOWLER et al., 2008).

A medula espinhal lombo-sacral contém as vias eferentes autonômicas que integram o nervo pélvico (parassimpático), hipogástrico (simpático) e pudendo (somático). Esses nervos são ainda responsáveis pela condução da informação sensorial do trato urinário inferior para a medula espinhal lombo-sacral (MORRISON et al., 2005; FRY et al., 2005). Essa via participa do controle voluntário da micção sobre o trato urinário inferior (ANDERSSON E WEIN, 2004).

1.1.2 O processo de micção

A micção consiste do esvaziamento da bexiga urinária pela uretra. Os requisitos para o processo de micção normal são a sinalização aferente sobre o estado de enchimento da bexiga urinária, a contração coordenada e de magnitude adequada do músculo detrusor, a baixa resistência dos esfíncteres uretrais e a ausência de obstrução anatômica (CAMPBELL et al., 2002).

Durante a fase de enchimento ou armazenamento vesical, a bexiga acomoda quantidades crescentes de urina sem aumentar consideravelmente a pressão no seu interior. Nessa fase, o esfíncter uretral se mantém contraído com o objetivo de evitar vazamento da urina. Desse modo, quando a bexiga enche, receptores sensoriais de estiramento localizados na parede da bexiga, principalmente na uretra posterior, transmitem essa informação aos segmentos sacrais da medula espinhal através de nervos pélvicos, os quais constituem no principal suprimento nervoso da bexiga.

É na fase de enchimento da bexiga urinária que ocorre a atividade fásica autônoma ou espontânea, uma atividade rítmica que ocorre internamente na bexiga e que envolve contrações e distensões do músculo detrusor, o qual é modulado por mediadores liberados de células uroteliais, neurônios aferentes e células intersticiais (GILLESPIE, 2004; KANAI E ANDERSSON, 2010). À medida que a bexiga urinária vai enchendo, as células uroteliais sensíveis à distensão liberam transmissores de forma contínua, aumentando a sinalização aferente mediada pelas fibras sensoriais do tipo A δ e as não mielinizadas do tipo C (DE GROAT, 2004, BIRDER, 2004). As fibras mielinizadas A δ estão envolvidas em dois processos: detecção do aumento do volume de urina e no monitoramento da contração do músculo detrusor. Já as fibras não mielinizadas do tipo C, localizadas na sua maioria no músculo detrusor e próximas às células uroteliais, não respondem facilmente à contração do músculo detrusor, pois apresentam maior limiar mecânico que as fibras A δ e não respondem ao enchimento da bexiga urinária em condições fisiológicas (ANDERSSON E HEDLUND, 2002; DE GROAT, 2004; DE GROAT E YOSHIMURA, 2010). Desse modo, essas fibras são conhecidas, como “*fibras silenciosas*”, uma vez que durante o processo de micção, se tornam responsivas a alterações de pressão vesical somente quando há estados patológicos instalados no órgão (YOSHIMURA et al., 2008; BIRDER et al, 2010; FRY et al, 2010; CHU E DMOCHOWSKI, 2006).

A sinalização aferente, por sua vez, ativa a inervação pós-ganglionar simpática via nervo hipogástrico que, através da liberação de noradrenalina induz o relaxamento do músculo detrusor através da ativação de receptores β_2 e β_3 adrenérgicos, bem como a contração do esfíncter uretral interno através da ativação de receptores adrenérgicos α_1 (DE GROAT E YOSHIMURA, 2006). Paralelamente, a ativação da inervação somática da bexiga urinária que integra o nervo pudendo, resulta em liberação de acetilcolina e consequente ativação de receptores nicotínicos, promovendo a contração do músculo esquelético do esfíncter uretral externo e do assoalho pélvico. Em conjunto, na fase de enchimento vesical, a continência é mantida pela complacência vesical associada à total inibição dos impulsos eferentes parassimpáticos e à ativação dos eferentes simpáticos e somáticos. O córtex cerebral envia impulsos descendentes inibitórios para o centro pontino e para o nervo pélvico (parassimpático), relaxando o detrusor. O córtex cerebral também envia impulsos excitatórios para o nervo hipogástrico (simpático) e nervo pudendo, o que aumenta a resistência uretral. Desse modo, a fase de enchimento é caracterizada pelo repouso das vias

neurais responsáveis pelo estímulo do processo de micção, enquanto as vias inibitórias estão ativas.

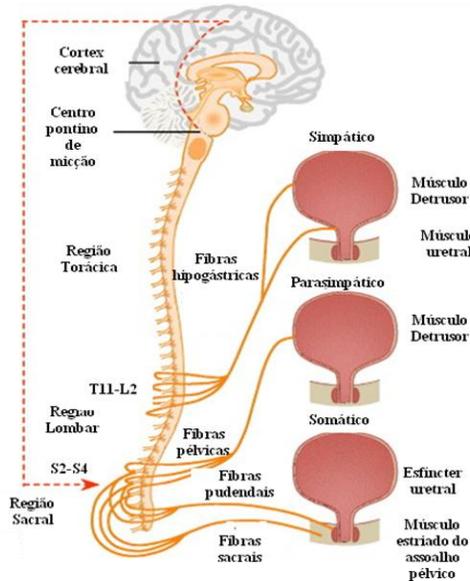


Figura 2. Inervação do trato urinário inferior. Coordenação entre a bexiga, a uretra e os esfíncteres uretrais é mediada por vias simpáticas (hipogástrico), parassimpáticas (pélvico) e somáticas (pudendo) (Adaptado de KANAI E ANDERSSON, 2010).

Quando o volume de urina atinge limiar crítico, o processo de micção é iniciado através da liberação de impulsos pelo centro pontino da micção para a medula espinhal sacral por meio da ativação de neurônios parassimpáticos e, também, pela produção estímulos inibitórios enviados para o centro simpático e somático. Desse modo, ocorre a contração do detrusor ocorre por meio da ativação dos receptores muscarínicos do tipo M_2 e M_3 pela acetilcolina e de receptores purinérgicos $P2X_1$ pelo ATP. Coordenado com estes eventos, ocorre o relaxamento do esfíncter uretral externo através da liberação de óxido nítrico, que promove abertura do colo vesical resultando no ato de urinar. Ao seu término, o ciclo de micção reinicia (FOWLER et al, 2005; ANDERSSON E ARNER, 2004).

1.2 Fisiopatologia do processo de micção e o efeito da lesão medular sobre a micção

Há diversas patologias que comprometem o esvaziamento normal da bexiga urinária, podendo estas serem de origem central e/ou periférica ou, ainda, devidas a efeitos colaterais de medicamentos. No contexto deste estudo, será enfatizada, de modo especial, a hiperatividade da bexiga urinária, síndrome caracterizada por contrações involuntárias do músculo detrusor durante a fase de enchimento, as quais podem provocar sintomas de urgência miccional usualmente acompanhada de noctúria e aumento da frequência urinária, com ou sem incontinência urinária (STEERS, 2002; ABRAMS, 2003; CHU, 2006; YAMAGUCHI et al, 2007).

A hiperatividade da bexiga urinária acomete pacientes de diferentes idades; no entanto, a progressão da doença é mais comum com o avanço da idade. Nos EUA, por exemplo, estima-se que 16,5% dos adultos acima de 18 anos de idade, aproximadamente 33 milhões de pessoas, apresentam sintomas de hiperatividade da bexiga (WEIN E RACKLEY, 2006). Essa síndrome é tradicionalmente classificada de acordo com a sua etiologia, podendo ser de origem miogênica (hiperplasia prostática benigna, como exemplo), neurogênica (lesão medular, doença de Alzheimer, por exemplo), inflamatória (cistite intersticial, por exemplo) ou idiopática (sem causa definida) (WEIN E ROVNER, 2002; CHU, 2006). Independente da sua etiologia, a sintomatologia da hiperatividade da bexiga urinária é semelhante, ou seja, há períodos de contração do músculo detrusor sem períodos de relaxamento (contrações tetânicas), e aumento da pressão intravesical com baixos volumes de urina e de resposta alterada do músculo detrusor a diferentes estímulos (STEERS, 2002).

A hiperatividade da bexiga urinária de origem neurogênica é uma patologia muito comum em pacientes que sofreram trauma medular. A altura e a extensão da lesão determinam a intensidade da hiperatividade da bexiga e a coordenação ou não entre o músculo detrusor e o esfíncter uretral. Lesões completas que afetam qualquer parte do circuito de reflexo de esvaziamento da bexiga, entre os quais os níveis sacrais S₂-S₄ ou os aferentes/eferentes parassimpáticos, produzem bexiga flácida e paralisada. A bexiga flácida se enche excessivamente de urina e ocorre transbordamento por falta de distensão muscular. Ao contrário, lesões completas acima da região sacral interrompem os axônios descendentes que controlam normalmente a função vesical, mas não interrompem o controle reflexo da bexiga. Consequentemente, a

bexiga urinária torna-se inicialmente arreflexa podendo ocorrer retenção urinária e incontinência por transbordamento seguida de restabelecimento do reflexo de micção mediado pelo arco reflexo medular. Isso acarreta o que é conhecido por bexiga hipertônica e hiper-reflexiva, com participação das fibras aferentes do tipo C (DE GROAT E YOSHIMURA, 2006).

Após a lesão medular, as fibras mielinizadas do tipo A δ não são mais as responsáveis por iniciar o esvaziamento da bexiga urinária. O esvaziamento passa a ocorrer pela ação das fibras aferentes não-mielinizadas do tipo C, as quais, em condições fisiológicas normais, não respondem à distensão do órgão, tornando-se mecanossensíveis e iniciando o reflexo de micção após a lesão medular (KANAI E ANDERSSON, 2010; DE GROAT E YOSHIMURA, 2010). Na maioria dos casos, há aumento das contrações vesicais reflexas, com contrações esfinterianas durante a contração vesical ou contrações vesicais de duração insuficiente. Portanto, micção de alta pressão, com elevado volume de resíduo pós-miccional, caracteriza a dissinergia detrusor-esfinteriana e, conseqüentemente, o esvaziamento inadequado da bexiga urinária. Além disso, após o trauma medular também ocorre a falta de capacidade da bexiga urinária de armazenar adequadamente o volume de urina, gerando incontinência pela hiperatividade do órgão (KARSENTY et al, 2005; DE GROAT E YOSHIMURA, 2006).

Na figura 3, pode-se observar o cistometrograma de indivíduos saudáveis e o de portadores de trauma medular.

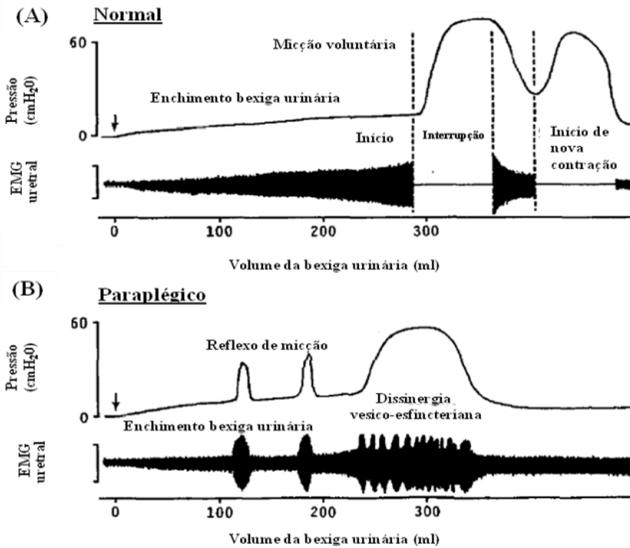


Figura 3. O reflexo de micção entre indivíduos saudáveis e paraplégicos. O painel A mostra o reflexo de micção normal onde há relaxamento do esfíncter (início) logo após a contração da bexiga urinária. Observar que onde há interrupção também há um aumento na pressão do esfíncter uretral e do músculo detrusor, seguido por um relaxamento recíproco da bexiga urinária. O painel B mostra a alteração do reflexo de micção em pacientes paraplégicos, sendo que a relação de resposta recíproca entre esfíncter uretral e bexiga é abolida. Durante o enchimento da bexiga urinária, há contrações do órgão ao mesmo tempo em que ocorrem atividades do esfíncter uretral. Com o aumento do volume da bexiga urinária há um número maior e sustentado de contrações da bexiga urinária e do esfíncter (dissinergia vesico-esfincteriana), o que retarda o fluxo da urina. Eletromiograma (EMG) realizado na uretra (Adaptado DE GROAT E YOSHIMURA, 2006).

Embora a etiologia da hiperatividade da bexiga urinária seja multifatorial, incluindo alterações nas propriedades, inervação e estrutura do detrusor, estudos recentes têm demonstrado que mudanças na sinalização aferente contribuem para a geração dos seus sintomas. A recuperação da atividade reflexa da bexiga urinária após a lesão medular depende da reorganização das vias medulares e alteração nas propriedades dos neurônios eferentes parassimpáticos, simpáticos e somáticos bem como das fibras aferentes da bexiga urinária.

Após a lesão medular, os neurônios aferentes sofrem modificações funcionais e morfológicas, caracterizadas por aumento do diâmetro celular e aumento da capacitância, podendo sofrer também

hipertrofia celular (DE GROAT E YOSHIMURA 2006; KRUSE et al., 1995). A hipertrofia associada à isquemia celular pode desencadear morte neuronal (STEERS, 2002). Após o trauma medular, observam-se também alterações eletrofisiológicas desses neurônios aferentes da bexiga urinária, por meio de mudanças nos canais de sódio e aumento na função desses canais sensíveis à tetrodotoxina (DE GROAT E YOSHIMURA, 2006). Neurônios de ratos com lesão medular apresentam maior número de potenciais de ação (DE GROAT E YOSHIMURA, 2010). Essa mudança nas propriedades dos canais de sódio pode aumentar o reflexo espinhal, e o que promove maior número de contrações do músculo detrusor.

As mudanças nas propriedades dos neurônios aferentes da bexiga urinária após a lesão medular podem ainda estar relacionadas à neuroplasticidade neuronal, mediada pelo fator de crescimento derivado do nervo (NGF), o qual é liberado tanto pela medula espinhal quanto pela bexiga urinária. A liberação aumentada de NGF induz tanto hiperexcitabilidade do órgão, quanto distensão e baixa eficácia de esvaziamento do mesmo (VIZZARD, 2000; VIZZARD, 2006; DE GROAT E YOSHIMURA, 2010). Além do NGF, os níveis de outros fatores de crescimento, tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e das neutrofinas do tipo 3 e 4 (NT3 e NT4) encontram-se aumentados após a lesão medular, favorecendo a neuroplasticidade das vias que inervam a bexiga urinária (VIZZARD, 2006).

1.3 Células uroteliais da bexiga urinária

Os mecanismos sensoriais da bexiga urinária não se devem somente a fibras nervosas, mas também a células uroteliais e/ou urotélio. Por muito tempo, essas células foram consideradas apenas uma barreira passiva da bexiga urinária. No entanto, comprovou-se que elas respondem à distensão da bexiga urinária e a diferentes estímulos químicos com formação e/ou liberação de diferentes transmissores, tais como o ATP, óxido nítrico e a acetilcolina (DE GROAT, 2004; BIRDER E DE GROAT, 2007).

As células uroteliais, desse modo, podem expressar diversos tipos de receptores, entre eles os receptores purinérgicos P2X e P2Y, os muscarínicos, os de potencial transitório (TRP) e os receptores para a bradicinina. Os receptores B₂ para as cininas encontram-se fisiologicamente no urotélio, enquanto que os receptores B₁ para cininas, são expressos apenas após dano tecidual ou processo inflamatório, estão

expressos no urotélio (BIRDER E DE GROAT, 2007; CHOPRA et al, 2005). Assim sendo, essas células podem regular direta ou indiretamente, a atividade das fibras aferentes do reflexo de micção (BIRDER E DE GROAT, 2007).

1.4 Tratamento clínico para hiperatividade da bexiga urinária

Na clínica, existem diferentes abordagens para o controle e o tratamento da hiperatividade da bexiga urinária, cujo objetivo é reduzir ou suprimir a incontinência por contração reflexa, a fim de eliminar ou prevenir a alta pressão intravesical e melhorar as condições sintomatológicas para possibilitar o cateterismo intermitente.

Entre os tratamentos farmacológicos mais utilizados estão os antimuscarínicos, como por exemplo, oxibutina e tolterodina, uma vez que reduzem as contrações do músculo detrusor por meio da ativação de receptores muscarínicos do tipo M_2 e M_3 . Resultados de estudos descritos na literatura têm demonstrado que os antimuscarínicos inibem as vias aferentes da bexiga urinária e, conseqüentemente, aumentam tanto a capacidade de armazenamento da bexiga urinária, quanto o intervalo entre as contrações (YAMAGUCHI, 2010; ABRAMS E ANDERSSON, 2007; ABRAMS et al., 2006).

Outro tratamento utilizado para a hiperatividade do músculo detrusor é a toxina botulínica. Essa toxina é a mais potente neurotoxina natural conhecida. Ela provoca paralisia flácida do músculo esquelético ao bloquear a liberação pré-sináptica da acetilcolina da terminação nervosa. Dentre os diferentes sorotipos estruturais, a toxina botulínica do tipo A é única utilizada no tratamento da hiperatividade da bexiga urinária, sendo administrada através de injeções diretas no músculo detrusor (LEIPPOLD et al, 2003).

A comprovação da presença dos canais iônicos da família de receptores TRP, denominados TRPV1 (receptores de potencial transitório vanilóide 1), na bexiga urinária, possibilita a utilização clínica de agonistas desses receptores (capsaicina e resiniferotoxina) no tratamento da hiperatividade da bexiga urinária. Ambos os fármacos dessensibilizam as fibras aferentes C da bexiga urinária e, conseqüentemente, causam diminuição na distensão vesical. Apesar de ambos os tratamentos apresentarem benefícios sobre a patologia, a instilação intravesical de capsaicina na bexiga urinária está associada a sensações de queimação e dor aguda visceral na região suprapúbica. Apesar disso, a instilação de resiniferotoxina não tem demonstrado efeitos colaterais severos. Assim

sendo, a utilização de capsaicina tem sido substituída pela resiniferotoxina (CHENG E DE GROAT, 2004; ANDERSSON E HEDLUND, 2002; WEIN E ROVNER, 2002).

Apesar dos tratamentos farmacológicos serem os mais utilizados, há também técnicas cirúrgicas que objetivam diminuir a resistência uretral ao esvaziamento. A colocação de *stents* uretrais, por sua vez, reduzem a pressão interna, facilitam o esvaziamento da bexiga urinária e controlam a dissinergia vesico-esfincteriana (BRUSHINI, 2003; NAMBIKIRAJAN ET AL, 2005).

Embora terapias que melhoram o esvaziamento da bexiga urinária estejam disponíveis no contexto das disfunções urinárias de origem inflamatória, pouca atenção tem sido dada ao desenvolvimento de agentes que possam ser efetivos no tratamento de disfunções de origem neurogênica. Um exemplo disso é a hiperatividade da bexiga urinária decorrente de lesão da medula espinhal.

As cininas têm sido alvo de estudos no trato urinário inferior, principalmente a bradicinina, uma vez que o uso do antagonista de receptores B₂, o Hoe 140, melhora significativamente os parâmetros urodinâmicos em estudos animais com hiperatividade da bexiga urinária decorrente de cistite. (MAGGI, 1997; BELICHARD et al, 1999; CHOPRA et al, 2005). No entanto, até o momento não há relatos de ensaios clínicos utilizando antagonistas dos receptores cininérgicos para o tratamento da hiperatividade da bexiga urinária

Tabela 1 Fármacos antimuscarínicos utilizados na clínica para o tratamento da hiperatividade da bexiga urinária

Fármaco	Dose recomendada
Oxibutina	2,5 – 5mg/4 vezes ao dia
Atropina	0.125 mg sublingual/4 em 4 horas
Brometo de propantelina	7,5 – 60mg/4 vezes ao dia
Trospium	20mg/2 vezes ao dia
Tolterodina	1-2mg/ 2 vezes ao dia

(adaptado de ABRAHMS et al., 2006; CARTWRIGHT et al., 2008)

1.5 Histórico das cininas

A bradicinina (BK) e os peptídeos relacionados a ela são denominados cininas, as quais estão inteiramente ligadas a eventos fisiopatológicos. Entre os eventos fisiopatológicos associados às cininas estão a formação de edema e a ativação de fibras aferentes sensoriais do tipo A δ e C que causam o aumento da permeabilidade vascular através da liberação de óxido nítrico (NO), histamina, prostaglandinas, taucicinas e outros mediadores inflamatórios. (TAIWO E LEVINE, 1988; CALIXTO et al., 2000; MOREAU et al., 2005).

O primeiro registro relativo às cininas foi realizado por Abelous e Bardier (1909), os quais observaram queda transitória na pressão sanguínea de cães, após uma injeção endovenosa de uma fração de urina humana insolúvel em álcool. Entretanto, foram os trabalhos de Frey e colaboradores (1926) que estabeleceram os conceitos que ainda prevalecem sobre a ação e o metabolismo das cininas. Esses pesquisadores observaram que a urina humana, quando administrada por via endovenosa em diferentes espécies de animais, causava hipotensão. Sendo assim, o efeito hipotensor foi atribuído à presença de uma substância termolábil e não-dialisável na urina. Posteriormente, Kraut e colaboradores (1930) caracterizaram a substância como sendo um hormônio circulante encontrado no pâncreas, sendo assim, foi chamada de caliceína (do grego *kallikreas* para pâncreas). Entretanto, foi somente em 1937, que Werle e colaboradores perceberam que a caliceína, quando incubada no plasma, liberava uma potente substância estimuladora do músculo liso, sendo que esta substância não era derivada da quebra da caliceína em si, mas de uma proteína plasmática. Consequentemente, os mesmos autores concluíram que o produto farmacologicamente ativo era a calidina, produto da ação proteolítica da enzima caliceína.

Foi em 1949, que Rocha e Silva e colaboradores observaram que a incubação do veneno da serpente *Bothrops jararaca* ou tripsina, com a fração pseudoglobulina do plasma, causava a liberação de um potente agente hipotensor e contracturante. Assim, o novo agente foi definido como sendo um polipeptídeo produzido por ação enzimática a partir de proteínas plasmáticas. Essa substância apresentava efeito contrátil lenta em relação à histamina ou acetilcolina, quando avaliada em preparações de íleo isolado de cobaia. Baseados nestes resultados, os autores denominaram a substância de bradicinina (BK; do grego: *bradys* para lento; *kinesia* para movimento). Posteriormente, Werle e Maier (1952) observaram que a BK e a calidina (Lys-BK) eram formadas em

condições muito parecidas e apresentavam ações farmacológicas semelhantes, sugerindo que ambas poderiam ser relacionadas ao mesmo substrato. No entanto, a confirmação desta hipótese aconteceu somente alguns anos mais tarde, quando Boissonas e colaboradores (1960) determinaram a sequência correta de aminoácidos que compunham a BK e sintetizaram o nonapeptídeo Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg. Com a possibilidade de produzir BK sintética, iniciaram-se os primeiros estudos para a caracterização das ações farmacológicas e fisiológicas deste peptídeo.

Durante meados do século XX, entre as décadas de 1960 e 1970, a comunidade científica se concentrou em determinar os efeitos fisiológicos da BK e seus análogos. Em 1964, Lewis demonstrou que as cininas eram capazes de evocar sinresposta inflamatória, tais como: edema, hiperemia e dor. Entretanto, somente em 1980 foi elucidado que as ações das cininas são mediadas pela ativação de receptores específicos. Esses receptores foram denominados receptores B_1 e B_2 . Essa classificação foi proposta por Regoli e Barabé (1980) com base na determinação da ordem de potências relativas dos seus agonistas em diversas preparações de músculo liso.

1.6 Vias de síntese e degradação das cininas

As cininas, ao contrário dos neurotransmissores clássicos, não são estocadas na sua forma ativa, mas se originam endogenamente a partir de moléculas precursoras – os cininogênios. Estes, por sua vez são divididos em α -globulinas de alto peso molecular (120KDa), precursores da BK, e de baixo peso molecular (66 KDa), precursores da calidina. A distribuição dos cininogênios é ampla e pode ser encontrada em diferentes tecidos, células e estruturas celulares do tecido conectivo. Há um terceiro tipo de cininogênio denominado T-cininogênio, o qual é equivalente ao de alto peso molecular sendo encontrado apenas em ratos (BHOOLA et al., 1992; MCLEAN et al., 2000).

Os cininogênios são clivados por proteases denominadas calicreínas encontradas no sangue (calicreína plasmática) ou nas glândulas exócrinas (calicreína tecidual). A partir do cininogênio de alto peso molecular, a ação da calicreína plasmática gera BK, processo que é exacerbado durante o processo inflamatório. Já, a calicreína tecidual produz calidina através do cininogênio de baixo peso molecular (STERANKA et al., 1988).

Uma vez formadas, as cininas se difundem nas paredes dos vasos linfáticos aos tecidos e ali são degradadas rapidamente por meio

de peptidases denominadas cininas I e II e encefalinase ou enzima conversora de angiotensina.

1.7 Os receptores para as cininas

Conforme mencionado anteriormente, as cininas têm suas ações mediadas através da ativação de dois subtipos de receptores específicos denominados B₁ e B₂. Estes receptores pertencem à família de receptores compostos por sete domínios transmembranares acoplados à proteína G (HESS et al., 1992; MENKE et al., 1994; PESQUERO et al., 1996). Apesar de possuírem os mesmos mecanismos transduccionais, os receptores apresentam somente 36% de homologia na sequência de aminoácidos, sendo essa identidade preferencialmente evidente nas regiões transmembranares (Marceau et al., 1997). Os receptores B₁ e B₂ estão, geralmente, acoplados aos mesmos tipos de proteína G – a G α i e a G α q e sua ativação depende da estimulação indireta ou direta de diferentes mecanismos de transdução, como, por exemplo, aumento do cálcio intracelular, do AMP cíclico e do GMP cíclico e da liberação de prostaglandinas (Hess et al., 2001; Prado et al., 2002). A ativação desses receptores, também pode levar à estimulação de proteínas quinases, como, por exemplo, as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), tirosina quinases, fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a esfingosina-6-quinase (Schanstra et al., 1999; Liebmann e Böhmer, 2000; LIEBMANN, 2001; GABRA et al., 2001). Outro aspecto importante dos receptores B₂ para as cininas é a extraordinária rapidez com que eles se tornam dessensibilizados, seja por desacoplamento das proteínas G ou pela sua internalização e inativação. A atividade só retorna após período prolongado depois da remoção da cinina (LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

A maior diferença entre os receptores das cininas está relacionada ao padrão de expressão das proteínas. Os receptores B₁ são ativados pelos fragmentos des-Arg⁹-BK ou pela des-Arg¹⁰-calidina e, geralmente, são expressos quando há trauma tecidual, processo inflamatório, longos períodos de incubação *in vitro*, infecções, citocinas pró-inflamatórias, luz ultravioleta, estresse térmico ou durante processos inflamatórios agudos, inclusive os da na bexiga urinária (MAGGI, 1997; MARCEAU E BACHVAROV, 1998; AHLUWALIA E PERRETTI, 1999; CALIXTO et al., 2000). Já foi elucidado por meio de diversos estudos que esse receptor pode ser induzido em diversos tecidos, tais como: íris de porco, cólon, íleo e aorta de ratos.

(MARCEAU, 1995; MEDEIROS et al., 2004; EL SAYAH et al., 2006; HARA, 2008).

Os receptores B₂, diferentemente dos receptores B₁, são constitutivos ao longo do sistema nervoso central e periférico e são responsáveis por respostas fisiológicas, tais como: contração da musculatura lisa, hipotensão, vasodilatação, dor e hiperalgesia – eventos estes mediados pela BK (HALL E MORTON, 1997; DENDORFER et al., 1999).

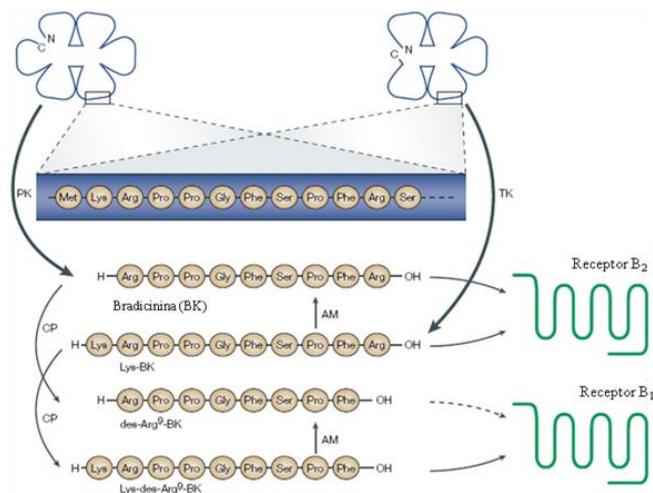


Figura 4. Esquema do sistema caliceínas-cininas. Receptores B₁ e B₂ acoplados a proteína G. CP: Carboxipeptidases N e AM (= cininases I); PK: caliceína plasmática; TK: caliceína tecidual (Adaptado de MARCEAU E REGOLI, 2004)

Tantos os eventos fisiológicos quanto os patológicos mediados pela ativação dos receptores para as cininas foram estudados através da utilização de antagonistas seletivos. Os primeiros antagonistas seletivos para os receptores B₂ surgiram na década de 1980 e tinham suas estruturas baseadas no protótipo [D-Phe]⁷-BK (Vavrek e Stewart, 1985). A segunda geração de antagonistas peptídicos para os receptores B₂, apesar de possuírem maior seletividade e ação mais prolongada, apresentaram baixa atividade por via oral (CALIXTO et al., 2000), como por exemplo o Hoe 140 (icatibante). Assim, no início do século XXI, foi possível a síntese da terceira geração de antagonistas peptidérgicos para receptores B₂, tais como o WIN64338, o FR173657,

o FR167344, o NPC18884 e o bradizide. Esses antagonistas são eficazes em reduzir, ou até mesmo bloquear, a resposta inflamatória induzida por BK em diferentes modelos experimentais (HALL, 1995; MARCEAU E BACHVAROV, 1998; CALIXTO et al., 2000; MARCEAU E REGOLI, 2004; CAMPOS et al., 2006).

Já a determinação e a definição da existência dos receptores B₁ foram confirmadas a partir do desenvolvimento de antagonistas seletivos, tendo como base o protótipo [Leu]⁸-des-Arg⁹-BK (REGOLI et al., 1977; REGOLI E BARABÉ, 1980). Potentes antagonistas dos receptores B₁ surgiram a partir das modificações estruturais dos antagonistas peptidérgicos dos receptores B₂, sendo eles: [des-Arg¹⁰]-HOE140 e des-Arg⁹-NPC17731, R715, B9958 e antagonista misto B₁/B₂, B9430 (STEWART et al., 1999; REGOLI et al., 1998; CAMPOS et al., 2006). Posteriormente, antagonistas de natureza não peptidérgica, como os compostos benzodiazepínico 1 (BZ-1), os compostos dihidroquinoxalina, o 2,3-diaminopiridina, o SSR240612, o 2-alquilamina-5-sulfamoilbenzamida e o LF220542 foram sintetizados (WOOD et al., 2003; GOUGAT et al., 2004; KUDUK et al., 2004; MARCEAU E REGOLI, 2004; RITCHIE et al., 2004; CAMPOS et al., 2006; PORRECA et al., 2006). É de fundamental importância o estudo com antagonistas para confirmar os papéis fisiopatológicos dos receptores B₁ e B₂,

1.8 Indução do receptor B₁

A indução dos receptores B₁ tem sido estudada em diversas condições *in vitro* e *in vivo*, podendo ser observada *in vitro* em tecidos obtidos de coelhos, ratos, camundongos, suínos e também de humanos (MARCEAU et al., 1998; ZHANG et al., 2004). O fenômeno de indução do receptor B₁ parece depender da síntese *de novo* de proteínas, uma vez que sua resposta funcional é bloqueada em tecidos pré-tratados com inibidores de transcrição de RNA, translação ou maturação proteica (CAMPOS E CALIXTO, 1994; HADDAD et al., 2000; SARDI et al., 2000; ZHANG et al., 2004). Além disso, a adição de substâncias pró-inflamatórias, como as endotoxinas bacterianas e algumas citocinas, tais como interleucina-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-8, interferon γ e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) amplificam a resposta mediada pelos receptores B₁ (MARCEAU et al., 1998). Estudos prévios confirmam que a IL-1 β , o fator de crescimento epidermal α , e o lipopolissacarídeo (LPS) aumentam a expressão de receptores B₁ em células de musculatura vascular de coelhos (MARCEAU et al., 1998; MEDEIROS et al., 2004).

O controle do aumento de expressão dos receptores B_1 está associado ao aumento do seu RNAm e de sua proteína quando há produção de citocinas específicas produzidas durante o trauma ou após o estresse tecidual (MARCEAU et al, 1998; CALIXTO et al, 2000). Desse modo, o aumento das respostas mediadas pela ativação dos receptores B_1 em consequência de estímulos imunopatológicos e/ou inflamatórios é decorrência do aumento da produção de $IL-1\beta$ (MCLEAN et al, 2000). A $IL-1\beta$ é capaz de estimular a indução de diversos genes, os quais são regulados por interações com fatores de transcrição. Uma vez que a $IL-1\beta$ se liga ao seu receptor, ocorre a estimulação de diferentes enzimas da família das proteínas ativadas por mitógenos (MAPKs), como a: p38 MAPK, JNK e ERK (SAKLATVALA et al, 1999). Por sua vez, essas proteínas estão envolvidas na regulação e/ou ativação de diversos fatores transcricionais que controlam os níveis de expressão de vários genes, incluindo o gene do receptor B_1 (LARRIVÉE et al, 1998; LAGNEUX et al., 1998; 2001)

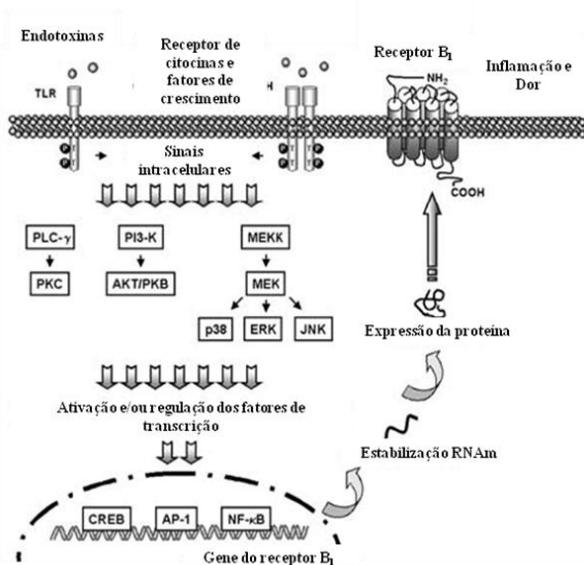


Figura 5. Possíveis vias de regulação da expressão do receptor B_1

TLR: receptor tipo Toll; LPS: lipopolissacarídeo; PLC: fosfolipase C; PI3K: fosfatidoinositol-3 quinase; PKB: proteína quinase B; MEKK: proteína ativadora da MEK; MEK: proteína quinase ativadora da MAPK; ERK: proteína quinase regulada por sinal extracelular; JNK: proteína quinase c-Jun NH_2 -terminal (Adaptado de CALIXTO et al., 2004).

Há estudos que comprovam que a indução do receptor B₁ envolve a ativação de fatores transcripcionais, como AP-1, CREB e NF-κB. A estimulação com LPS ou citocinas pró-inflamatórias induz a fosforilação do inibidor endógeno IκB e, assim, promove a ativação do NF-κB, modulando por sua vez, a síntese de novo dos receptores B₁ (NI et al., 1998; CAMPOS et al., 1999; CALIXTO et al., 2000; FERNANDES et al., 2003; PASSOS et al., 2004).

A identificação da sequência que constitui a região promotora do gene do receptor B₁ foi muito importante para os estudos relacionados ao controle da expressão deste receptor *in vivo* e *in vitro*. (CHAI et al., 1996; YANG et al., 1998; NI et al., 1998a). Além disso, outros elementos regulatórios podem existir fora das regiões examinadas (Marceau et al., 1998). Foi sugerido por Yang e colaboradores (1998) que diferentes elementos regulatórios podem induzir a transcrição do gene do receptor B₁. Estudos que utilizaram a reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) e Southern blot demonstraram a presença de transcritos do gene do receptor B₁ em diversos tecidos, tais como: cólon, útero, ovário, tireóide, fígado, entre outros (CHAI et al., 1996).

Por fim, a identificação do gene do receptor B₁ em diferentes tecidos demonstra a capacidade para a sua indução nos diferentes processos patológicos e, reforça a necessidade de novos estudos para melhor caracterizar e compreender os mecanismos envolvidos na sua regulação.

1.9 Clonagem e sequenciamento

Estudos de biologia molecular e sequenciamento de genes iniciaram na década de 1990 com a clonagem do receptor B₂ a partir do DNA complementar (cDNA) obtido do útero de ratas. Em seguida, este receptor foi clonado em camundongos (MENKE et al., 1994; PESQUERO et al., 1996). Posteriormente, esse receptor foi clonado em humanos, apresentando uma sequência de 364 aminoácidos, com 81% de homologia com os receptores do rato e do camundongo. O gene desse receptor possui 3 éxons separados por dois íntrons. O receptor B₁ foi clonado em humanos e, posteriormente, em coelhos, camundongos, ratos, cães e macacos, apresentando uma homologia de 69% a 97% na sequência de aminoácidos entre as espécies. Possui 3 éxons separados por 2 íntrons e encontra-se próximo ao sítio do receptor B₂, no cromossomo 14q32. (MENKE et al., 1994; MACNEIL et al., 1995; PESQUERO et al., 1996; NI et al., 1998; HESS et al., 2001, 2002; PRADO et al., 2002).

Com a clonagem e sequenciamento dos receptores B₁ e B₂, tornou-se possível o desenvolvimento de linhagens de camundongos com deleção gênica para esses receptores e, conseqüentemente, estudos posteriores constataram que os receptores B₂ são importantes para o processo de inflamação, hiperalgesia, contração e relaxamento da musculatura lisa e na modulação da pressão arterial (BORKOWSKI et al., 1995; BOYCE et al., 1996). Por outro lado, a deleção do receptor B₁ permitiu determinar sua importância nas respostas dolorosas e inflamatórias (PESQUERO et al., 2000; ARAÚJO et al., 2001; FERREIRA et al., 2005).

1.10 Participação das cininas no trato urinário

Diversos estudos apontam o envolvimento das cininas e de seus receptores na fisiopatologia do trato urinário, especialmente na bexiga urinária (MAGGI, 1997; SJUVE et al., 2000; CHOPRA et al, 2005). Sabe-se que a ativação dos receptores B₂ em estados fisiológicos resulta na contratilidade do músculo detrusor, uma vez que esses receptores estão presentes nas fibras aferentes pélvicas e, assim, exercem um importante papel na inervação excitatória motora da bexiga urinária (BELICHARD et al., 1999; LECCI et al. 1995; PATRA & WESTFALL et al., 1996; MEINI et al 2000).

Os receptores B₂ também parecem ser importantes na instalação do quadro de cistite (MAGGI et al., 1997). Nesse contexto, foi demonstrado que a liberação das cininas é capaz de sensibilizar diretamente fibras aferentes sensoriais da bexiga urinária através da estimulação dos receptores B₂ e, conseqüentemente, induzir a liberação de ATP e outros neurotransmissores. Essa sequência de eventos é responsável pelo desenvolvimento do processo inflamatório e as alterações no tônus da bexiga urinária (CHOPRA et al., 2005).

Por sua vez, a expressão dos receptores B₁ na bexiga urinária ocorre durante processos patológicos como a cistite induzida por ciclofosfamida (LECCI et al, 1999; BELICHARD et al, 1999). A estimulação dos receptores B₁ *in vitro* por agonistas seletivos desse receptor induz a liberação de mediadores que, por sua vez, atuam em fibras aferentes, especialmente do tipo Aδ, causando, por conseqüência, a contração da bexiga urinária (LECCI et al., 1999).

Considerando o envolvimento das cininas na hiperatividade da bexiga urinária, esse estudo se propôs a pesquisar o papel exercido pelos receptores para as cininas na hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão medular traumática.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral pesquisar, através de estudos farmacológicos, histológicos e com o emprego de técnicas de biologia molecular, o envolvimento dos receptores B₁ e B₂ para as cininas na hiperatividade da bexiga urinária induzida pela lesão medular traumática em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações locomotoras dos animais e as alterações histopatológicas da bexiga urinária decorrentes da lesão medular traumática;
- Avaliar a reatividade farmacológica *in vitro* da bexiga urinária de ratos submetidos à lesão medular traumática para agonistas e antagonistas dos receptores B₁ e B₂;
- Analisar os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α na bexiga urinária de animais controle, falso-operados e com lesão medular;
- Determinar os níveis de RNAm através da utilização de PCR em tempo real para os receptores B₁ e B₂ na bexiga urinária, nos neurônios do GRD (segmentos medulares L₆-S₁) e na porção correspondente da medula espinhal antes e após a indução da lesão medular;
- Detectar o decurso temporal de expressão dos receptores B₁ e B₂ na bexiga urinária de animais falso-operados ou com lesão medular através do ensaio de Western Blot;
- Investigar a influência do bloqueio farmacológico dos receptores B₁ e B₂ *in vivo* sobre o processo de micção de animais falso-operados ou com lesão medular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando ratos Wistar machos (10 semanas de idade e peso entre 270-300 g), criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram alojados em grupos de 5 animais por caixa (42 x 34 x 17 cm) e mantidos em estantes ventiladas (ALESCO[®]) a uma temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}$ C), umidade entre 60 – 80% e ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com água e ração *ad libitum*. Os experimentos seguiram as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institute of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América (*Publication No. 85-23, revisado em 1996*). Todos os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais da UFSC (processo número PP00158).

3.2 Lesão Medular Traumática

Para a indução da lesão medular traumática foi utilizado o modelo experimental previamente descrito por Vanický e colaboradores (2001) e Andrade e colaboradores (2011). Para tal, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (70 e 10 mg/kg, respectivamente, Bayer, São Paulo, SP, Brasil) pela via intraperitoneal (i.p.). Após a anestesia, os animais receberam antibiótico de amplo espectro (cloridrato de oxitetraciclina, 300 mg/kg). Em seguida, foram realizadas assepsia e tricotomia do dorso do animal, seguidas da administração subcutânea de anestésico local contendo vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% + epinefrina 1:50000 - Xylestesin[®]) e da incisão de aproximadamente 3 cm na linha média dorsal em sentido rostro-caudal. O tecido gorduroso da região foi removido e os músculos que se inserem no nível das vértebras torácicas 10-12 foram dissecados, seguido pela remoção dos processos espinhosos e fixação da coluna espinhal através de um fórceps.

Para expor a medula espinhal, foi realizado um pequeno orifício (1,5 mm de diâmetro) no nível da 11^a vértebra torácica com o auxílio de microscópio e broca cirúrgicos. O orifício permitiu a inserção de um cateter de embolectomia (Fogarty 2F, Lemaitre Catheters, Burlington, MA, EUA), diretamente no espaço epidural do canal medular, sem

danificar a dura máter. O cateter inserido no canal medular foi então deslocado na direção rostral em aproximadamente 1 cm até repousar sobre a medula espinhal ao nível da 10^a vértebra torácica, onde o mesmo foi inflado atingindo um diâmetro pré-calibrado de 4,5 mm e mantido inflado até o desaparecimento dos reflexos espinhais, o que ocorre em aproximadamente 1 min.

Após este período, o cateter foi cuidadosamente removido e foi realizada a sutura por planos (muscular e pele). Os animais falso-operados foram submetidos ao mesmo protocolo descrito acima, porém o cateter não foi inserido no canal medular. Finalizado o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em ambiente limpo e aquecido até a recuperação anestésica e observados diariamente para evitar desconforto ou infecção. Como o procedimento cirúrgico acarreta alterações na contratilidade/relaxamento da bexiga urinária e do esfíncter uretral externo, a bexiga dos animais submetidos à lesão medular foi esvaziada, diariamente, através da compressão manual da região abdominal do animal (método de Crede), até a restauração do reflexo normal de micção (Santos-Benito e col., 2006), o qual ocorre geralmente 20 dias após a indução da paraplegia. Todos os cuidados pré- e pós-operatórios seguiram o protocolo de Santos-Benito e colaboradores (2006), as normas do MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) e as do comitê de ética local.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: controle (nenhuma intervenção cirúrgica), falso-operados (intervenção cirúrgica; sem inserção do cateter) e lesionados (intervenção cirúrgica; com inserção de cateter).

3.3 Avaliação da Atividade Locomotora

A atividade locomotora dos animais foi avaliada através da escala desenvolvida por Basso e colaboradores, denominada BBB (BASSO, BEATTIE E BRESNAHAN, 1995). Esta escala varia de 0 a 21 e os principais escores são: 0 - nenhum movimento dos membros inferiores; 1 - movimentos leves de uma ou duas articulações; 4 - movimentos leves de todas as três articulações; 7 - movimento de extensão de todas as três articulações; 10 - suporta ocasionalmente o peso sobre as patas traseiras; 21 - atividade locomotora normal. As definições operacionais para cada escore encontram-se descritas no Anexo 1. O teste foi realizado com o emprego do modelo do campo

aberto a cada dois dias, do dia 0 ao dia 28 após o procedimento cirúrgico, por um período de 5 minutos até o momento da eutanásia.

3.4. Análise histopatológica da bexiga urinária

A análise histopatológica da bexiga urinária foi realizada em amostras de animais não-operados, falso-operados e lesionados nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Para isto, os animais foram anestesiados, submetidos a eutanásia e perfundidos com solução de PBS (solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2 a 7,4) e paraformaldeído 4% nos períodos descritos acima. Após a perfusão dos animais, as bexigas urinárias foram removidas, fixadas em paraformaldeído 4% por 48 h e desidratadas em etanol 70% por 24 h; ambas as etapas em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram emblocadas em parafina, seccionadas (espessura de 5 μ m) e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para posterior avaliação microscópica.

3.5. Dosagem de citocinas

Os níveis teciduais de TNF- α (fator de necrose tumoral α), IL- 1 β (interleucina - 1 β) e IL-6 (interleucina 6) foram avaliados como descrito anteriormente por Bento e colaboradores (2008), com algumas modificações. As bexigas urinárias de animais não-operados, falso-operados ou lesionados foram coletadas 2, 7, 14 ou 28 dias após o procedimento cirúrgico e homogeneizadas em PBS contendo Tween 20 (0,05 %), fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,1 mM, cloreto de benzometônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, e aprotinina A 2 ng/ml. O homogenato foi centrifugado a 3,000 x g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante armazenado a - 70 °C até o momento da análise. Os níveis de citocinas foram determinados utilizando-se kits específicos de ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). A dosagem de proteínas existentes nas amostras foi realizada segundo o método de Bradford.(BRADFORD, 1976). Os resultados foram expressos por densidade óptica por miligrama de proteína (DO/mg proteína).

3.6 Extração do RNA total

Para a extração do RNA total (RNAt), amostras de bexiga urinária, gânglios da raiz dorsal (GRDs) (segmentos medulares L₆-S₁) e a porção correspondente da medula espinhal de animais não-operados, falso-operados e lesionados coletadas nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico, foram rapidamente colocadas em Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) na proporção de 1 ml do reagente para cada 100 mg de tecido. Os tecidos foram homogeneizados com triturador automático. Ao homogenato foram adicionados 200 µl de clorofórmio, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (12,000 x g, 15 minutos, 4 ° C). A fase aquosa contendo RNAt foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 500 µl de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e, posteriormente mantido em repouso em temperatura ambiente durante 10 minutos. A mistura foi, então centrifugada (12,000 x g, 15 minutos, 4 ° C), sendo o pellet resultante re-suspensão em 1 ml de etanol 75% gelado. Após a centrifugação (7,000 x g, 5 minutos, 4 ° C), o pellet contendo RNAt foi suspenso em água tratada com 0,1% de dietilpirocarbanato (DEPC), sendo a sua concentração e pureza determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 1100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). O RNA foi aliquoteado e estocado a -70 ° C até o momento do uso. Uma vez obtido o RNAt, realizou-se o ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real) como descrito abaixo.

3.7 Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

Com o objetivo de determinar o efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm para os receptores B₁ e B₂, foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time PCR*). Para a reação da transcrição reversa, foi utilizada a enzima *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Amostras de bexiga urinária urinária, GRDs (segmentos medulares L₆-S₁) e porção correspondente da medula espinhal contendo 2 µg de RNA total foram incubadas com 1 µg de oligo dT (500 µg/ml), 1 µl de dNTPs mix (10 mM) e água ultra pura para um volume final de 12 µl. Para a obtenção do DNA complementar (DNAc), as amostras foram aquecidas a 65 ° C por 5 minutos, resfriadas a 4 ° C por 5 minutos para a adição de 4 µl de

tampão de primeira fita [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂], 2 µl de DTT (0,1 M)] e 1 µl de inibidor de RNase. A mistura foi incubada a 37 ° C por 50 minutos e a reação foi inativada a 75 ° C por 15 minutos. O DNAc foi estocado a 4 ° C até a realização da reação em cadeia de polimerase (PCR). A reação de PCR foi realizada para promover a amplificação do DNAc para B₁ ou B₂ e para β-actina. Para tal, o DNAc foi amplificado em duplicata utilizando o kit Master Mix TaqMan[®] Universal PCR (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil), com primers específicos para ratos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para B₁ (Rn00570261_m1) ou B₂ (Rn01430057_m1) e 3'quencher MGB e VIC para o controle endógeno β-actina ACTB (Rn00667860_m1) (Applied Biosystems). A reação de PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços (Applied Biosystems). Cada reação continha 1 µl de DNAc (300 ng), 5 µl de Master Mix (2x), 0,5 µl de primer (sonda Taqman) e 3,5 µl de água ultrapura, em um volume final de 10 µl. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus; Applied Biosystems) para 55 ciclos. Os parâmetros do termociclador foram os seguintes: 50 ° C por 2 min, 95 ° C por 15 s, e 60 ° C por 1 minuto. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a quantificação relativa (QR). A expressão do gene alvo foi calibrada contra condições encontradas em animais controle.

3.8 Expressão protéica pelo imunoensaio molecular de Western Blot

Com o objetivo de determinar o efeito da lesão medular sobre a expressão das proteínas B₁ e B₂, foi empregada a técnica de Western Blot. Para isso, amostras de bexiga urinária obtidas de animais não-operados, falso-operados e lesionados nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico foram homogeneizadas com processador de tecidos em tampão lise gelado, contendo: HEPES 10 mM (pH 7,9) 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fenilmetilsulfonifluoreto (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 50 mM de NaF, 2 mM de Na₃VO₄, 1,5 µg/ml de inibidor de tripsina, 7 µg/ml de pepstatina A, 5 µg/ml de leupeptina e 10 µg/ml de aprotinina. O homogenato foi centrifugado a 14,000 x g por 45 minutos e o sobrenadante, contendo a fração citosólica das preparações, foi separado. O pellet foi re-suspenso com o mesmo tampão anterior, mas com adição de Triton X-100 1%. O homogenato foi centrifugado a 14,000 x g por 45 minutos, sendo o sobrenadante coletado como a fração membranária das preparações. A

determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada utilizando o kit Bio-Rad para determinação de proteínas (Bio-Rad Protein Assay Kit) (Hercules, CA, EUA) segundo as recomendações do fabricante.

Amostras de proteínas obtidas do extrato de membrana foram misturadas com tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM, pH 6,8, contendo: β -mercaptoetanol 15%, SDS 6%, azul de bromofenol 0,3%) e fervidas por 5 minutos. Quantidades de 50 μ g/proteína foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (10 %). A transferência foi efetuada em membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) por 2 horas em tampão Tris-base 48 mM (pH 8,4), glicina 39 mM, SDS 0,037% e metanol 20%.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada por solução de leite desnatado (5%) e gelatina 1,5% e, posteriormente incubada com um dos anticorpos para as proteínas de interesse: B₁ (sc 15048, 1:500) ou B₂ (sc 25671, 1:500) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). A visualização das proteínas foi realizada usando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunoreativas foram visualizadas usando kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech., PA, EUA) e filme radiográfico, segundo as recomendações do fabricante.

3.9 Preparações de bexiga urinária isolada de rato

Os animais foram submetidos à eutanásia por superdosagem de pentobarbital de sódio (100 mg/kg, i.p.) e após a laparotomia, a bexiga urinária foi rapidamente removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit (composição mmol/l: NaCl 119,0; KCl 4,7; MgSO₄ 1,5; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25,0; KHPO₄ 1,2 e glicose 11,0; pH 7,4). A bexiga urinária foi seccionada longitudinalmente em quatro partes de aproximadamente 10 mm de comprimento, e 3 mm de largur, e das quais se removeu o tecido conectivo e gordura aderentes, sem danificar a camada de células uroteliais. Em seguida, cada preparação foi transferida para uma cuba de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit, aquecida a 37 °C e aerada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂, onde foi suspensa através de dois fios de algodão, um em cada extremidade do tecido, sendo que um dos fios foi conectado a um transdutor de força (TRI-201-Letica Scientific Instruments, Barcelona, Espanha). A preparação foi submetida a uma tensão basal de 1g e as mudanças de tensão isométrica foram registradas em polígrafo (TRI-201-Letica Scientific Instruments).

3.10 Avaliação da resposta contrátil da bexiga urinária isolada a agonistas de receptores B₁ e B₂ para as cininas

Após o período de estabilização das preparações por 60 minutos, durante o qual a solução de Krebs-Henseleit foi renovada a cada 15 minutos, as preparações de bexiga de animais não-operados, falso-operados e lesionados coletadas nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico foram expostas a concentrações crescentes e cumulativas de des-Arg⁹-BK (0,001 - 10 µM), um agonista do receptor B₁ ou BK (0,001 - 10 µM), um agonista seletivo de receptor B₂.

Em outro grupo experimental, após o período de estabilização, as preparações de bexiga urinária de animais não-operados, falso-operados ou lesionados, coletadas 28 dias após o procedimento cirúrgico, foram incubadas com captopril (3µM) e em seguida incubadas durante 20 min com o antagonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (30 µM) ou com antagonista seletivo de receptores B₂, o Hoe 140 (30 nM). Após este período, as preparações foram expostas a concentrações crescentes e cumulativas de des-Arg⁹-BK (0,001 - 10 µM) ou à BK (0,001 - 10 µM), respectivamente.

As respostas contráteis obtidas em todos os experimentos foram expressas como g de tensão.

3.11 Avaliação *in vivo* dos parâmetros urodinâmicos através da análise cistométrica

Para obtenção dos dados funcionais relativos à participação dos receptores B₁ e B₂ para as cininas na hiperatividade da bexiga urinária após a lesão medular, foi avaliado o processo de micção de animais falso-operados ou lesionados através da análise de parâmetros urodinâmicos pela técnica de cistometria. O protocolo experimental foi realizado no 28º dia após o procedimento cirúrgico, período este em que se observou um restabelecimento parcial do processo miccional.

Para tal, os animais foram anestesiados com uretano (0,9 g/kg para animais lesionados e 1,2 g/kg para animais falso-operados) e, então, a bexiga urinária foi exposta através de uma pequena incisão realizada no abdômen do animal. Em seguida, foi realizado um pequeno corte em seu corpo, o qual permitiu a inserção de um cateter de polietileno (PE-60; Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) na luz do órgão. O cateter intravesical, foi conectado por meio de uma torneira de três vias a um transdutor de pressão (ADInstruments, Castle Hill, Austrália)

para registrar a pressão intravesical e à uma bomba de infusão (Insight Equipamentos Científicos, São Paulo, SP, Brasil), para permitir a infusão contínua de salina para o interior da bexiga urinária. A pressão intravesical, foi registrada continuamente através de um sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/30; ADInstruments).

Uma vez implantado o cateter no corpo da bexiga, os animais foram mantidos aquecidos e em repouso durante 60 minutos para a estabilização da pressão da bexiga urinária. Após esse período, iniciou-se a infusão contínua de salina (NaCl, 37 ° C) para o interior da bexiga urinária dos animais, a uma taxa de 0,1 ml/minuto. Em seguida, foram avaliados os seguintes parâmetros urodinâmicos: pressão de micção (PM, pressão intravesical máxima durante a micção), pressão basal (PB, menor pressão intravesical entre as micções), pressão limiar (PL, pressão intravesical imediatamente antes da micção), intervalo entre as contrações (IC), amplitude e número de contrações não associadas à micção (CNMs). As CNMs foram definidas como a pressão intravesical rítmica maior que 5 mmHg em relação à pressão basal sem a liberação de salina da uretra, de acordo com os critérios estabelecidos por Ogawa e colaboradores (2008).

O volume da solução salina eliminado pela uretra (VE) foi coletado e medido. Com o intuito de determinar o volume residual (VR), interrompeu-se a infusão de salina no início de uma contração de micção e o VR foi medido através da retirada de salina do cateter intravesical e pelo esvaziamento do conteúdo intravesical através de pressão manual sobre a bexiga urinária. A capacidade da bexiga urinária (CBU) foi calculada pela soma de VE e VR. A eficiência de esvaziamento vesical (EEV) foi estimada em porcentagem, através da equação: $EE = [(VE/CBU) \times 100]$.

Os parâmetros urodinâmicos avaliados foram calculados a partir dos ciclos de micção obtidos durante 45 minutos. Inicialmente, foram avaliados os ciclos de micção de animais falso-operados e lesionados. Posteriormente foram investigados os ciclos de micção registrados antes (usados como valores basais) e depois da administração sistêmica do antagonista de receptores B₁, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (300 nmol/kg, intravenoso (i.v) caudal); do antagonista de receptores B₂, Hoe 140 (100 μmol/kg, i.v., caudal); ainda do veículo (salina, i.v., caudal) em animais falso-operados ou lesionados.

3.12 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (e.p.m). As porcentagens de inibição ou de aumento de contração e/ou expressão são expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m) das inibições ou dos aumentos máximos individuais obtidos em cada experimento. A significância estatística entre os grupos foi avaliada através da análise de variância (ANOVA de uma via) seguido do teste *post hoc* de Bonferroni ou teste *t* de Student pareado ou não pareado ou apenas pelo teste *U* de Mann-Whitney, conforme as características de cada situação. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o programa estatístico *GraphPad 4* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

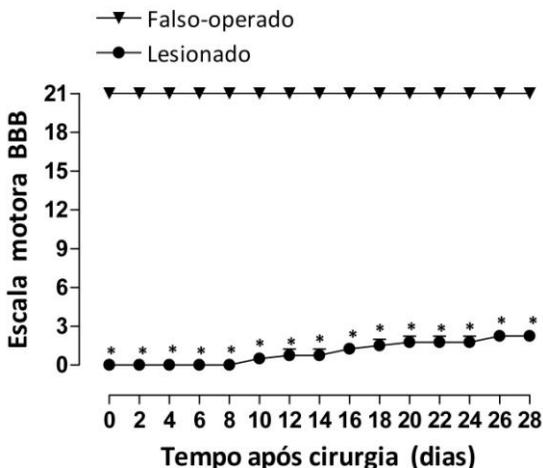
3.13 Drogas e reagentes

As seguintes drogas foram utilizadas: pentobarbital sódico e uretano (Sigma, St. Louis, MO, EUA), des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, des-Arg⁹-BK e bradicinina (Bachem, Bubendorf, Suíça), cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina[®] Pfizer, São Paulo, SP, Brasil), quetamina e xilazina (Virbac, São Paulo, SP, Brasil), Xylestesin[®] (Cristália, Itapira, São Paulo, SP, Brasil), Hoe 140 (Aventis Pharma Deutschland, Frankfurt Main, Alemanha). As soluções estoque de des-Arg⁹-BK, Hoe 140, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK e bradicinina utilizadas nos experimentos *in vitro* e *in vivo* foram preparadas em água e salina (NaCl, 0,9%), respectivamente, e então armazenados em tubos plásticos siliconizados e mantidos a -20 °C em uma concentração de 10⁻³M. O veículo utilizado não teve nenhum efeito farmacológico tanto no tónus das preparações quanto nas contrações induzidas por agonistas ou nos parâmetros urodinâmicos avaliados pela cistometria.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da atividade locomotora dos animais após a lesão medular

Visando a reprodutibilidade do modelo experimental, no que concerne o estabelecimento da hiperatividade da bexiga urinária de origem neurogênica, avaliamos inicialmente a performance locomotora dos animais através da escala de atividade locomotora desenvolvida por Basso e colaboradores (1995), denominada escala BBB. Conforme ilustrado na Figura 1, os animais falso-operados apresentaram atividade locomotora normal (escore 21) durante o período de avaliação de 28 dias. Os animais falso-operados apresentaram passadas plantares consistentes, marcha coordenada, liberação dos dedos, estabilidade consistente do tronco e cauda elevada. Por outro lado, a lesão da medula espinhal induziu nos animais um déficit locomotor acentuado, caracterizado por ausência de movimento do membro posterior no segundo dia após a cirurgia, seguido de recuperação funcional sutil, sendo possível observar somente o movimento discreto de duas articulações. No dia 28 o escore BBB destes animais foi de $3,0 \pm 0,3$ até o final do período de observação. Esses escores estão em conformidade com os obtidos por Vanický e colaboradores (2001) e que caracterizam uma paraplegia severa, sendo que 100 % dos animais submetidos ao trauma desenvolveram hiperatividade da bexiga urinária. Todos os animais cujos escores ultrapassaram o valor médio de 3 foram excluídos dos experimentos subsequentes.



*Figura 1. Avaliação da atividade locomotora de animais submetidos à lesão da medula espinhal, através da escala BBB. Triângulos fechados representam o grupo de animais falso-operados. Círculos fechados representam o grupo de animais lesionados. Cada grupo representa a média \pm e.p.m. de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo falso-operado. * $P < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).*

4.2 Alterações histopatológicas decorrentes da lesão medular

Para detectar possíveis alterações histopatológicas da bexiga urinária decorrentes da lesão medular, realizamos uma análise histológica qualitativa do tecido. Comparada à bexiga urinária de animais não-operados e falso-operados, a bexiga urinária de animais lesionados apresentou migração de células inflamatórias, edema, alterações vasculares, redução no número de camadas de células uroteliais. Em tecidos de animais lesionados, nos períodos de 14 e 28 dias após a cirurgia, foi observada a presença de formação de ninhos de Von Brunn, caracterizados como proliferação focal da camada basal do epitélio transicional, localizados na lâmina própria (ROSAI, 2004) (Figura 2E e F). O dano na estratificação do urotélio foi severo e generalizado no 2º dia após a lesão medular (Figura 2C). Esses resultados mostram que a lesão medular induziu processo inflamatório agudo e que há mudanças estruturais, também, em períodos crônicos na bexiga urinária.

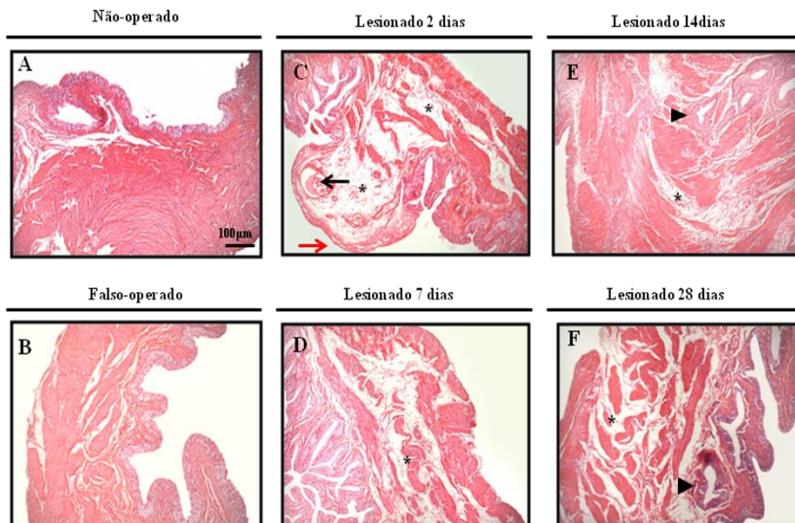


Figura 2. Alterações histopatológicas da bexiga urinária após a lesão medular. Análise histológica realizada em bexigas urinárias de animais não-operados (painel A), falso-operados (painel B) e lesionados 2 (painel C), 7 (painel D), 14 (painel E) e 28 dias (painel F) após a cirurgia. São destacados dano no urotélio (seta vermelha), congestão e dilatação de vasos sanguíneos (seta preta), edema (*) e ninhos de Von Brun (▶) (coloração H&E: aumento de 40x, escala 100 µm).

4.3 Níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α na bexiga urinária de ratos submetidos à lesão medular

Com o objetivo de investigar o estabelecimento de processo inflamatório no trato urinário inferior em resposta à lesão da medula espinhal, foram avaliados os níveis de citocinas pró-inflamatórias na bexiga urinária. Na figura 3 é possível observar um aumento significativo nos níveis de IL-1 β e IL-6 (60 e 14 vezes, respectivamente) em bexigas urinárias de animais lesionados, quando comparado às bexigas urinárias de animais falso-operados. No entanto, este aumento foi evidente somente no segundo dia após a lesão medular, e não nos demais períodos analisados, caracterizando assim, uma resposta inflamatória aguda. Por outro lado, não houve alteração significativa nos níveis de TNF- α , nas amostras de bexiga urinária de animais lesionados, em comparação aos grupos falso-operado e não-operado nos diferentes períodos avaliados (Figura 3C).

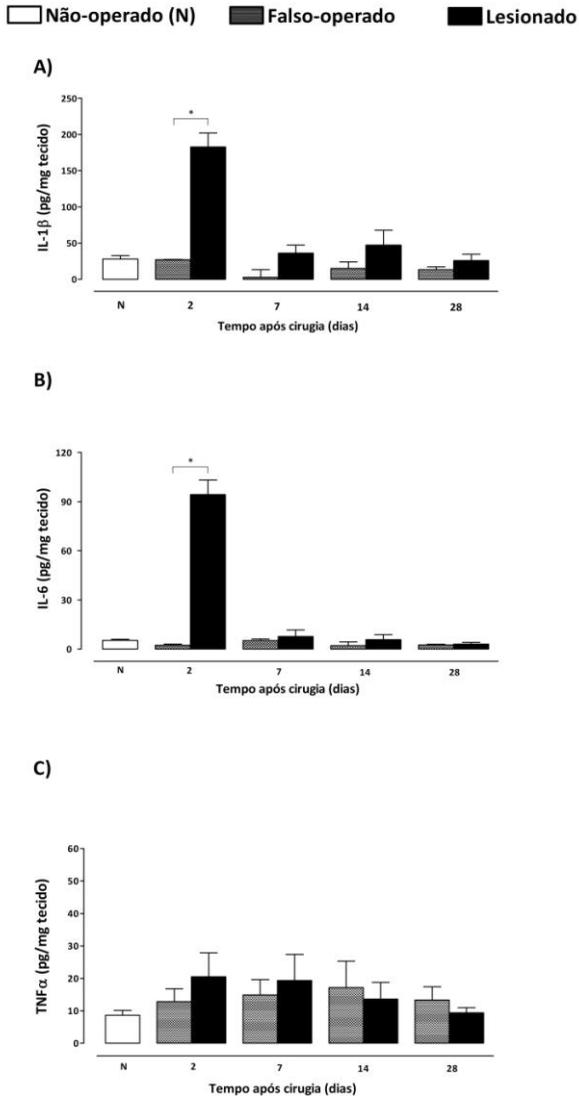


Figura 3. Níveis teciduais de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α na bexiga urinária após lesão medular. Quantificação dos níveis de IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) na bexiga urinária de animais não-operados, falso-operados ou lesionados nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. Cada grupo representa a média \pm e.p.m. de 4 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo falso-operado. * $P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.4 Efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm para os receptores B₁ e B₂

Visando avaliar a participação das cininas e seus receptores na hiperatividade da bexiga urinária após a lesão medular traumática, foi realizada uma análise dos níveis de RNAm para os receptores B₁ e B₂ para as cininas na bexiga urinária, neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD; segmentos medulares L₆-S₁) e na porção correspondente da medula espinhal de animais não-operados, falso-operados e lesionados, coletadas 2, 7 e 14 dias após o procedimento cirúrgico.

Na figura 4, pode-se observar um aumento significativo nos níveis de RNAm codificador dos receptores B₁ no segundo e sétimo dia após a lesão medular tanto na bexiga (Figura 4A, 12 e 5 vezes, respectivamente) quanto nos neurônios do GRD (Figura 4C, 6 vezes), quando comparado às amostras teciduais provenientes de animais falso-operados. Já na medula espinhal (Figura 4E), os níveis do RNAm dos os receptores B₁ aumentaram no segundo e no sétimo dia após a lesão medular (3 e 7 vezes, respectivamente). Em contraste, a lesão da medula espinhal não alterou os níveis de RNAm dos receptores B₂, houve uma diminuição dos níveis de RNAm no 14 dia nos neurônios do GRD (Figura 4D 14%), no entanto nos demais tecidos avaliados não houve alterações significativas quando comparados aos animais falso-operados (Figura 4B e F).

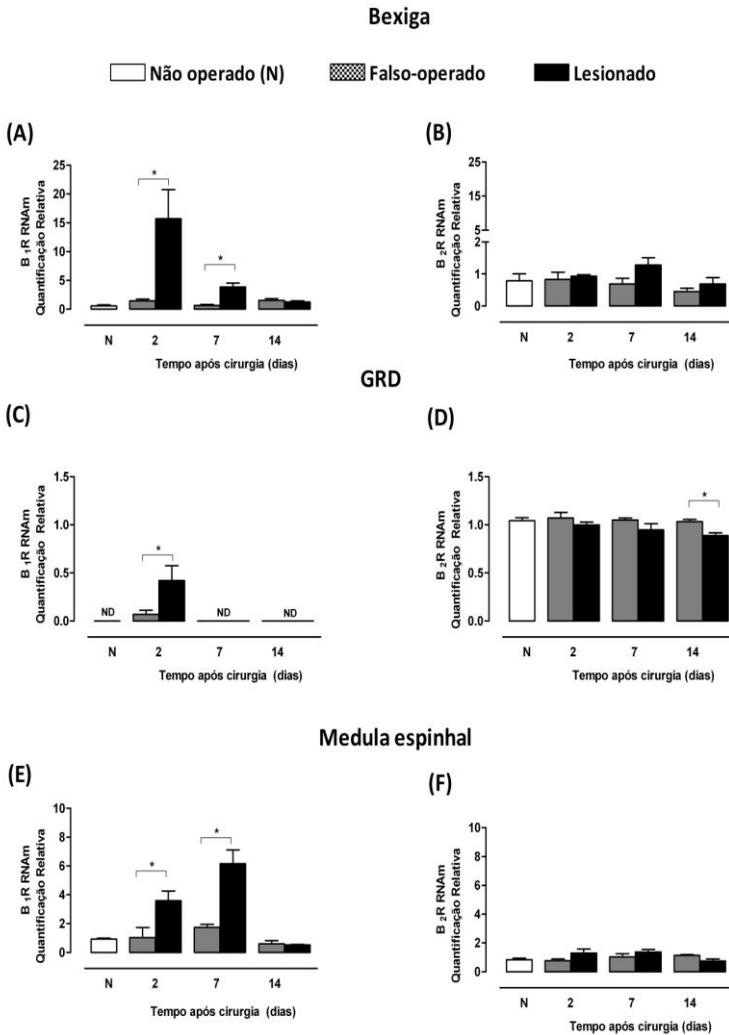


Figura 4. Efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm para receptores B_1 e B_2 na bexiga urinária, gânglio da raiz dorsal e medula espinal após a lesão medular. Níveis de RNAm para receptores B_1 (A, C e E) e B_2 (B, D e F) na bexiga urinária, gânglio da raiz dorsal e na medula espinal coletados 2, 7 e 14 dias após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média \pm e.p.m. de 3 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo falso-operado, $*P < 0,05$ (test t não paramétrico).

4.5 Análise da expressão dos receptores B₁ e B₂ na bexiga urinária após a lesão medular

A seguir foram investigadas as possíveis alterações na expressão protéica dos receptores B₁ e B₂ para as cininas na bexiga urinária de ratos submetidos à lesão medular traumática. Corroborando com estudos prévios, os resultados apresentados na figura 5 mostram expressão constitutiva tanto de receptores B₁ quanto B₂ na bexiga urinária de animais não-operados ou falso-operados (BELICHARD et al, 1999; MA Q.P. et al, 2001). Após a lesão da medula espinhal, a expressão de receptores B₁ aumentou em aproximadamente 109% nas bexigas urinárias coletadas 7 dias após o procedimento cirúrgico e 59% no 14^o dia após a lesão medular (Figura 5A). Não houve alteração significativa na expressão deste receptor nos demais tempos observados. De forma interessante, embora a lesão medular não tenha induzido alteração significativa nos níveis de RNAm para receptores B₂, a mesma induziu aumento significativo da expressão de receptores B₂ em bexigas urinárias coletadas 14 e 28 dias após a lesão medular (aproximadamente 205% e 55%, respectivamente), quando comparadas a bexigas de animais falso-operados (Figura 5B).

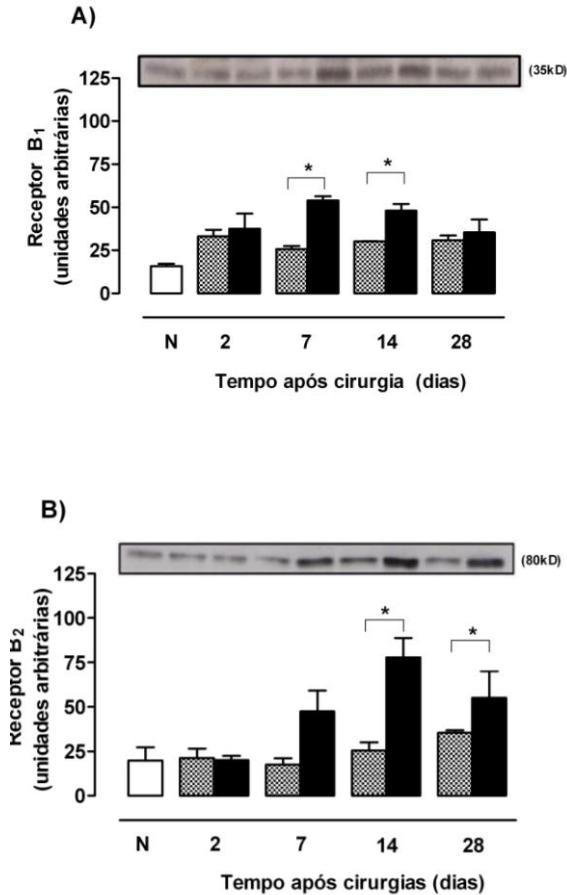


Figura 5. Efeito da lesão medular sobre a expressão dos receptores B₁ e B₂ na bexiga urinária após a lesão medular. O gráfico indica a quantificação por densitometria óptica (D.O.) da expressão dos receptores B₁ e B₂ (A e B, respectivamente) para as cininas na bexiga urinária de animais não-operados, falso-operados e lesionados nos períodos de 2, 7 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média ± e.p.m. de 3 animais e os valores estão expressos em unidades arbitrárias. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo falso-operado. * $P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni).

4.6 Efeito do agonista de receptores B₁ sobre a reatividade da bexiga isolada de rato após a lesão medular

Uma vez detectado aumento na expressão dos receptores B₁ e B₂ na bexiga urinária de animais submetidos à lesão medular traumática, foi avaliada a reatividade das preparações de bexiga urinária aos agonistas seletivos destes receptores. Desse modo, comparada com as preparações de bexiga urinária de animais não-operados, a adição do agonista de receptores B₁, DABK (0,0001-10 µM) em preparações de bexiga de animais falso-operados, resultou em uma curva-concentração resposta (CCRs) moderada quando avaliada no 2^o dia após o procedimento cirúrgico e discreta nos períodos subsequentes. No entanto, ao considerarmos as áreas sob a curva (AUC), estas contrações não foram estatisticamente significantes. Por outro lado, em preparações de bexiga de animais lesionados, o agonista de receptores B₁ foi capaz de induzir resposta contrátil sustentada e significativa no 2^o, 14^o e 28^o, mas não no 7^o dia após a lesão medular. (Figura 6).

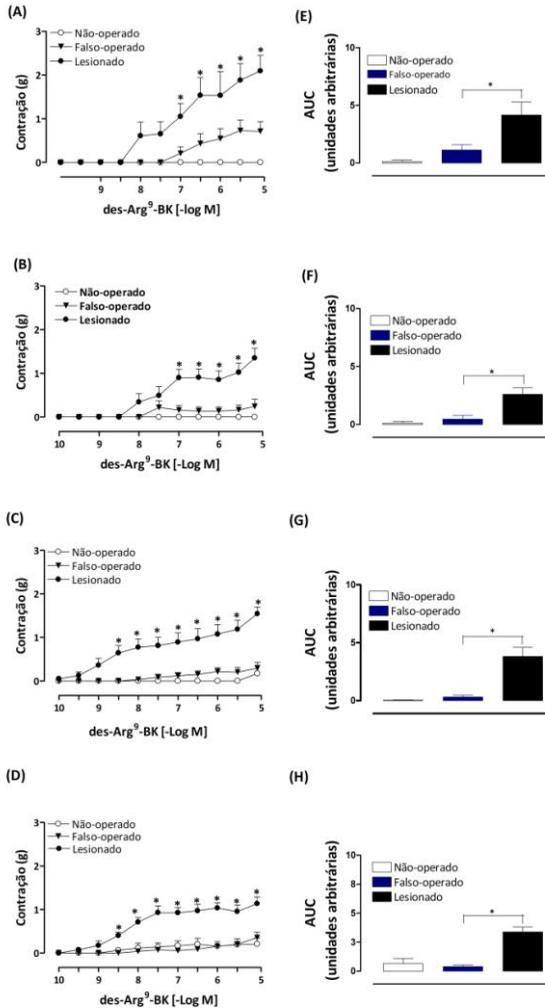


Figura 6. Efeito contrátil do agonista de receptores B_1 para as cininas, a des-Arg⁹-BK, na bexiga urinária isolada de ratos submetidos à lesão medular. Os painéis A, B, C e D representam as curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg⁹-BK (DABK, 0,001 - 10 μM) em bexiga urinária de ratos não-operados, falso-operados ou lesionados 2, 7, 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico, respectivamente, enquanto os painéis E, F, G e H representam as respectivas áreas sobre a curva (AUC) das curvas-concentração resposta. Os valores são expressos em gramas (g) de tensão e representados como a média \pm e.p.m. de 6 experimentos independentes. * $P < 0,05$ comparado ao grupo falso-operado (ANOVA de duas vias com *post hoc* Bonferroni).

4.7 Efeito do agonista de receptores B₂ sobre a reatividade da bexiga urinária isolada de rato após a lesão medular

Foram avaliados ainda as respostas contráteis induzidas pelo agonista preferencial dos receptores B₂, a bradicinina (BK), na bexiga urinária de animais não-operados, falso-operados e lesionados. A figura 6 mostra que em preparações de bexiga urinária de animais falso-operados, a adição de concentrações crescentes e cumulativas de BK (0,001-10 μ M) induziu respostas contráteis dependentes da concentração, similares àsquelas observadas em animais não-operados, independente do período após a cirurgia. De forma interessante, a lesão da medula espinhal resultou em potencialização da resposta contrátil induzida pelo agonista B₂ a qual foi dependente do tempo pós-lesão.

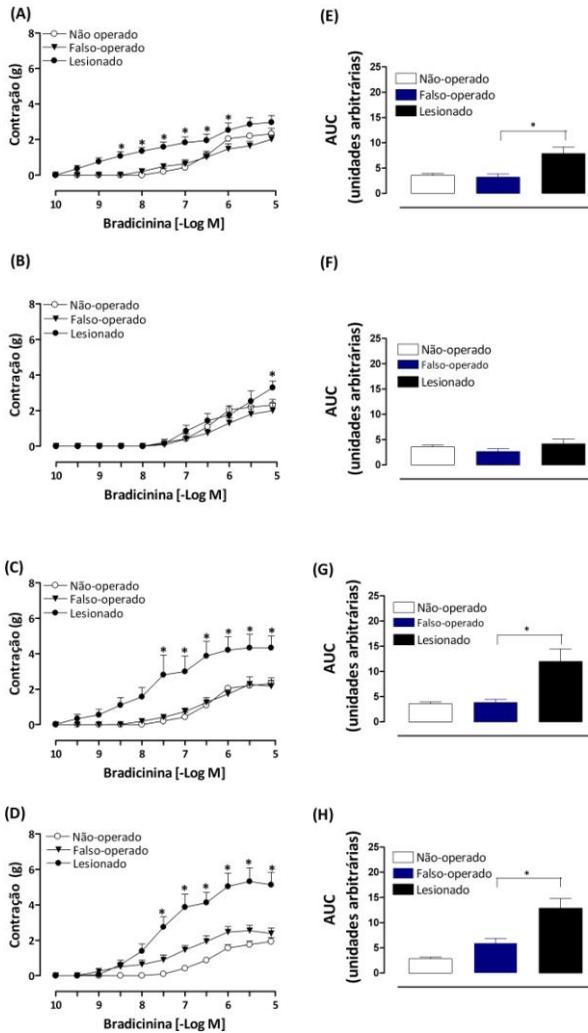


Figura 7. Efeito contrátil do agonista do receptor B_2 para as cininas, a bradicinina, na bexiga urinária de ratos submetidos à lesão medular. Os painéis A, B, C e D representam as curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a bradicinina (BK, 0,001 - 10 μ M) em bexiga urinária de ratos não-operados, falso-operados ou lesionados 2, 7, 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico, respectivamente. Os painéis E, F, G e H representam as respectivas áreas sob a curva (AUC) das curvas-concentração resposta dos painéis A, B, C, D e E, respectivamente. Os valores são expressos em gramas (g) de tensão e representados como a média \pm e.p.m. de 6 experimentos independentes. * $P < 0,05$ comparado ao grupo falso-operado (ANOVA de duas vias com *post hoc* Bonferroni).

4.8 Efeito dos antagonistas seletivos de receptores B₁ e B₂ sobre a resposta contrátil induzida pelos agonistas destes receptores em bexigas urinárias de ratos submetidos à lesão medular traumática

No intuito de verificar a seletividade de ação dos agonistas B₁ e B₂, avaliamos o efeito de antagonistas dos receptores B₁ e B₂ em bexigas urinárias coletadas 28 dias após o procedimento cirúrgico. A incubação prévia de preparações coletadas 28 dias após a lesão com o antagonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (30 μM) reduziu em 28,6 ± 12,5% a resposta contrátil induzida por concentrações baixas do agonista de receptores B₁. Por outro lado, em concentrações mais elevadas do mesmo houve uma reversibilidade do efeito antagônico (Figura 6A). No entanto, quando as preparações de bexigas urinárias foram pré-incubadas com o antagonista seletivo de receptores B₂, Hoe 140 (30nM), houve uma redução de 89,9 ± 2,5% na curva concentração-resposta desencadeada pelo agonista de receptores B₂, BK (Figura 8B).

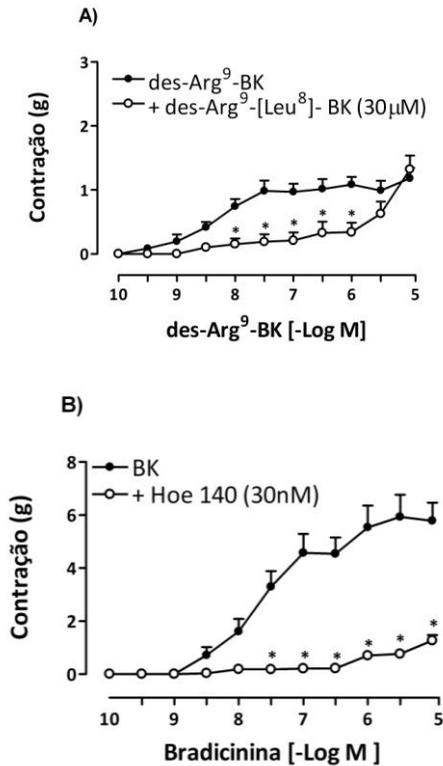


Figura 8. Antagonistas de receptores B_1 ($des-Arg^9-[Leu^8]-BK$) e B_2 ($Hoe\ 140$) inibem a resposta contrátil induzida por agonistas destes receptores em preparações de bexiga urinária de ratos submetidos à lesão medular. O painel A representa a curva concentração-resposta cumulativa obtida para $des-Arg^9-BK$ (0,001 - 10 μM) na ausência ou na presença de $des-Arg^9-[Leu^8]-BK$ (DALBK, 30 μM) e no painel B a curva concentração-resposta cumulativa obtida para a bradicinina (BK 0,001 - 10 μM) na ausência ou na presença de $Hoe\ 140$ (30 nM). As preparações de bexiga urinária foram coletadas 28 dias após a indução da lesão medular. Os valores são expressos em gramas (g) de tensão e representados como a média \pm e.p.m de 6 experimentos independentes * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

4.9 Alterações dos parâmetros urodinâmicos após lesão medular

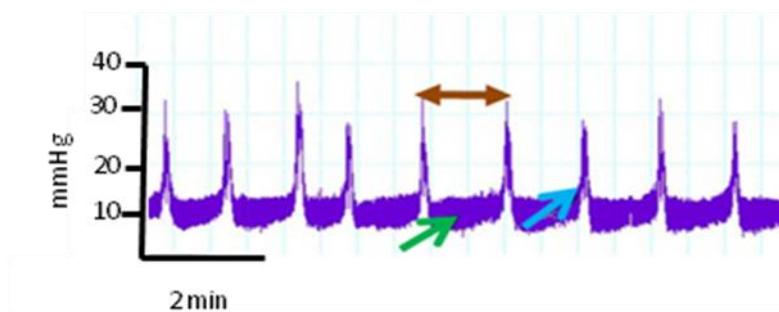
Por fim, foram avaliados as modificações nos parâmetros urodinâmicos decorrentes da lesão da medula espinhal no 28º dia após o procedimento cirúrgico, pois nesse período os animais com lesão medular já apresentam alguma recuperação parcial do processo de micção. Foram avaliados também os efeitos de antagonistas de receptores B₁ e B₂ sobre estas alterações. Primeiramente, é importante salientar que não houve diferença entre os registros cistométricos de animais não-operados ou falso-operados. Por outro lado, os registros cistométricos feitos no 28º dia após a lesão da medula espinhal apresentaram diversas alterações urodinâmicas em comparação aos registros de animais falso-operados. Essas alterações foram: maior número de contrações não associadas à micção (CNMs) ($10,0 \pm 2,6$), redução do intervalo entre as contrações (IC) ($49,0 \pm 7,1\%$), do volume eliminado (VE) ($18,9 \pm 1,5\%$) e da eficiência de esvaziamento vesical (EEV) ($2,4 \pm 0,3\%$), aumento na pressão limiar (PL) ($212,7 \pm 30,6\%$) e capacidade da bexiga urinária (CBU) ($655,2 \pm 72,4\%$) (Tabela 1). No entanto, não houve alteração significativa na pressão basal (PL) e na amplitude de pressão de micção (PM) entre os grupos experimentais (Tabela 1; Figura 9A, B).

Tabela 2. Alterações dos parâmetros urodinâmicos após lesão medular. Os resultados são expressos como a média \pm e.p.m de 6 animais. * $P < 0,05$ comparado com o grupo falso-operado (Teste t de Student não-pareado).

<u>Parâmetros urodinâmicos</u>	<u>Falso-operado</u>	<u>Lesionado</u>
Amplitude de CNMs (mmHg)	8,2 \pm 5,3	22,6 \pm 1,9*
Número de CNMs	0,5 \pm 0,3	10,0 \pm 2,6*
Pressão basal (mmHg)	7,2 \pm 3,3	15,7 \pm 2,7
Pressão limiar (mmHg)	8,3 \pm 2,4	17,7 \pm 2,5*
Pressão máximo de esvaziamento (mmHg)	28,7 \pm 6,1	30,4 \pm 5,7
Intervalo entre as contrações (min)	1,4 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1*
Volume de esvaziamento (ml)	0,2 \pm 0,02	0,04 \pm 0,003*
Capacidade da bexiga (ml)	0,4 \pm 0,076	2,6 \pm 0,3*
Eficiência de Esvaziamento (%)	63,7 \pm 10,9	1,5 \pm 0,2*

Falso-operado

A



Lesionado

B

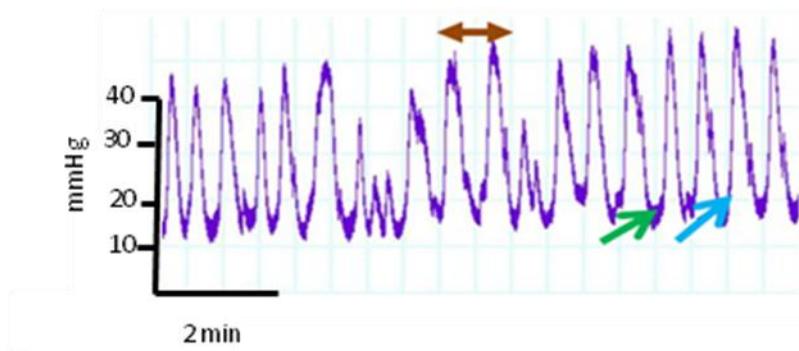


Figura 9. Registros cistométricos típicos de ratos falso-operados ou lesionados obtidos no 28º dia após o procedimento cirúrgico. Em A, registro típico dos parâmetros urodinâmicos de animal falso-operado e em B registro típico mostrando alterações dos parâmetros urodinâmicos no animal com lesão da medula espinhal. As setas indicam a pressão basal (PB; seta verde), pressão limiar (PL; seta azul) e intervalo entre as contrações (IC; seta marrom).

De forma importante, o tratamento sistêmico dos animais lesionados com o antagonista dos receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (DALBK, 300 nmol/kg, i.v.) aumentou o intervalo entre as CNMs, reduziu seu número em $55,0 \pm 19,0\%$ em comparaç

ão aos valores basais. Já a amplitude das CNMs não foi modificada significativamente pelo tratamento com DALBK (300 nmol/kg i.v.) (Tabela 2 e Figura 9). De forma similar, a administração do antagonista dos receptores B₂, Hoe 140 (100 μmol/kg, i.v.) retardou o aparecimento das CNMs, reduziu significativamente o número ($59,0 \pm 5,8\%$) e também a amplitude das CNMs ($21,0 \pm 9,2\%$) (Tabela 2 e Figura 10). No entanto, os demais parâmetros urodinâmicos avaliados, quais sejam PB, PL, PM, VE, CBU, EEV e IC não foram restabelecidos pelo tratamento sistêmico com antagonistas do receptor B₁ ou do receptor B₂ (Tabela 2).

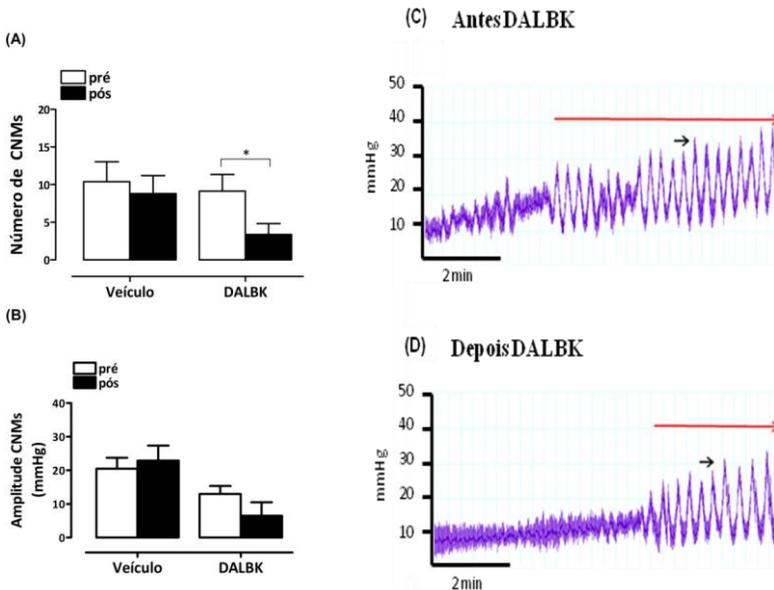


Figura 10. Efeito do tratamento sistêmico com des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (DALBK, 300 nmol/kg i.v.) ou veículo (salina) sobre as contrações não associadas à micção (CNMs). O gráfico A representa o número, enquanto o B representa a amplitude das CNMs antes e após o tratamento dos animais no 28º dia após a indução da lesão medular com veículo ou DALBK. Os painéis à direita mostram os registros cistométricos típicos relativos aos gráficos A e B, antes (C) e após (D) a administração de DALBK, respectivamente. As setas vermelhas representando as CNMs e as setas pretas a amplitude dessas contrações. Os resultados são expressos como a média e o e.p.m de 8 animais. * $P < 0,05$ comparado ao grupo veículo (Teste *t* de Student pareado).

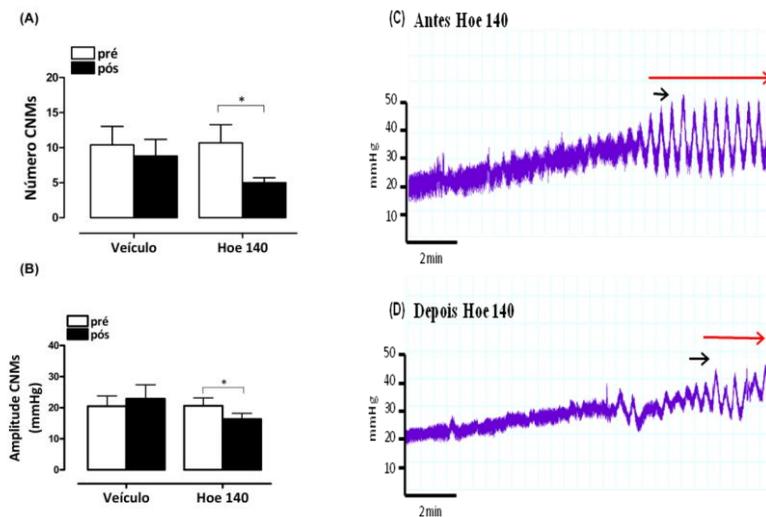


Figura 10. Efeito do tratamento sistêmico com o antagonista de receptores B_2 , Hoe 140 (100 $\mu\text{mol/kg}$ i.v.) ou veículo (salina) sobre as contrações não associadas a micção (CNMs). O gráfico A representa o número, enquanto o B representa a amplitude das CNMs antes e após o tratamento dos animais no 28º dia após a indução de lesão medular com veículo ou Hoe 140. O painel a direita mostra os registros cistométricos típicos representativos dos gráficos A e B antes (C) e após (D) a administração de Hoe 140. Sendo as setas vermelhas representando as CNMs e as setas pretas a amplitude dessas contrações. Os resultados são expressos como a média \pm e.p.m. de 8 animais. * $P < 0,05$ comparado ao grupo veículo (Teste t de Student pareado).

Tabela 3. Efeito do tratamento sistêmico com Hoe 140 (100 $\mu\text{mol/kg}$), des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (300 nmol/kg) ou veículo (salina) sobre os parâmetros urodinâmicos avaliados 28 dias após a lesão medular. Os resultados são expressos como a média e o e.p.m de 6-8 animais. * $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado com veículo (Teste *t* de Student não-pareado).

	Lesionado Veículo n=6-8		Lesionado Hoe 140 n=6-8		Lesionado DALBK n=6-8	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Amplitude de CNIMs (mmHg)	20,5 \pm 3,2	22,9 \pm 4,4	20,6 \pm 2,6	16,3 \pm 1,9*	16,7 \pm 2,7	10,9 \pm 3,9
Número de CNIMs	10,4 \pm 2,6	8,2 \pm 2,6	12,2 \pm 2,6	5,4 \pm 0,5*	8,3 \pm 2,5	3,8 \pm 1,5*
Pressão basal (mmHg)	17,4 \pm 4,1	17,9 \pm 4,2	13,5 \pm 3,1	11,6 \pm 2,0	9,2 \pm 3,4	7,9 \pm 3,1
Pressão limiar (mmHg)	20,2 \pm 4,2	20,6 \pm 4,2	15,5 \pm 3,1	13,1 \pm 2,0	9,9 \pm 3,6	8,6 \pm 3,2
Pressão máx. de esvaziamento (mmHg)	27,9 \pm 3,6	26,5 \pm 2,5	27,3 \pm 5,8	20,3 \pm 2,4	17,0 \pm 3,3	15,7 \pm 2,7
Intervalo de intercontrações (min)	0,5 \pm 0,02	0,5 \pm 0,04	0,6 \pm 0,06	0,5 \pm 0,03	0,8 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1
Volume de esvaziamento (ml)	0,05 \pm 0,06	0,05 \pm 0,03	0,04 \pm 0,004	0,05 \pm 0,06	0,2 \pm 0,05	0,03 \pm 0,06
Capacidade da bexiga (ml)	2,7 \pm 0,3	2,7 \pm 0,4	2,8 \pm 0,4	2,6 \pm 0,2	2,9 \pm 0,4	2,8 \pm 0,3
Eficiência de Esvaziamento (%)	2,1 \pm 0,4	2,15 \pm 0,4	1,5 \pm 0,2	2,1 \pm 0,3	1,1 \pm 0,4	1,3 \pm 0,4

5 DISCUSSÃO

A lesão medular traumática, afeta cerca de 2.5 milhões de pessoas mundialmente e causa grande impacto tanto na qualidade quanto na expectativa de vida das pessoas, representando também um desafio socioeconômico (THURET, 2006). Frequentemente interrompe o fluxo de impulsos supra e intraespinhais decorrentes da lesão medular causa danos severos ao trato urinário inferior. Consequentemente, os indivíduos com lesão medular desenvolvem hiperatividade da bexiga urinária, perda do controle voluntário da micção e dissinergia vesicoesfinteriana. O tratamento clínico da hiperatividade urinária, atualmente, restringe-se à utilização de fármacos antimuscarínicos, agonistas dos receptores adrenérgicos β_3 e/ou intervenção cirúrgica. No entanto, essas intervenções não são totalmente eficazes na redução dos sintomas desta patologia.

Utilizando um modelo experimental de lesão medular traumática em ratos o presente estudo mostrou alterações moleculares e funcionais da bexiga urinária associadas a condição e, de forma inédita, o envolvimento dos receptores B_1 e B_2 para as cininas na patogênese da hiperatividade da bexiga urinária. As cininas representam um grupo de peptídeos endógenos que agem localmente e são produzidos no plasma ou em tecidos periféricos em resposta a estímulos fisiológicos ou traumáticos. Esses peptídeos exercem múltiplas ações fisiológicas em diferentes tecidos, tais como contração e relaxamento da musculatura lisa e controle da pressão sanguínea nos processos inflamatórios e na dor (MARCEAU E REGOLI, 2004).

As ações exercidas pelas cininas são mediadas pela ativação dos receptores B_1 e B_2 . Os receptores do tipo B_2 são expressos constitutivamente em vários tipos celulares e estão amplamente distribuídos no SNC e no SNP. Os receptores do tipo B_1 não são constitutivos e necessitam de indução por mediadores inflamatórios ou estímulos externos estressores (MARCEAU E BACHVAROV, 1998; MARCEAU E REGOLI, 2004). Estudos prévios têm demonstrado o envolvimento da bradicinina na fisiologia da bexiga urinária sadia ou em disfunções de origem inflamatória, tais como cistite (LECCI et al., 1995; MAGGI et al., 1993; CHOPRA et al., 2005). Por outro lado, a participação da bradicinina na hiperatividade da bexiga urinária decorrente de trauma medular, ou seja, aquela de origem neurogênica, é uma área pouco estudada pela comunidade científica, provavelmente devido à grande dificuldade em padronizar o modelo experimental, uma

vez que o estabelecimento dessa patologia é dependente da intensidade da lesão. Desse modo, o modelo de hiperatividade da bexiga urinária induzido por trauma da medula espinhal utilizado neste estudo está relacionado a uma lesão traumática de intensidade severa. Tal fato foi confirmado pela avaliação da atividade locomotora através da escala BBB cujo escore não ultrapassou o valor três durante os 28 dias de observação que se seguiram à cirurgia. Ao longo deste período, observou-se que os animais com trauma medular apresentavam perda da função motora nos membros posteriores, recuperando apenas parcialmente os movimentos e finalizando o período de observação com escore 3, o qual é caracterizado por movimento extenso de duas articulações.

Concomitante às alterações locomotoras, a análise histológica da bexiga urinária permitiu visualizar as alterações fisiopatológicas que acometem a bexiga urinária após a lesão medular. Foi detectada a presença de um processo inflamatório nos primeiros dias após a lesão medular, caracterizado por edema, infiltração de neutrófilos e estratificação do urotélio. Já nos períodos mais tardios, observou-se a formação de ninhos de Von Brunn na bexiga urinária. Estas estruturas originadas da proliferação focal da camada basal do epitélio transicional, levando à formação de aglomerados celulares que se transformam em nódulos sólidos localizados na lâmina própria e que estão presentes em processos patológicos crônicos da bexiga urinária (ROSAI, 2004).

Apodaca e colaboradores (2003) demonstraram alterações nas funções e na morfologia do urotélio nos primeiros dias após a lesão medular traumática tais como regiões de rompimento urotelial e aumento da permeabilidade à uréia e à água. No entanto, diferentemente do nosso estudo, os autores observaram um retorno à normalidade das funções do urotélio em, aproximadamente, quatro semanas após a lesão medular traumática, o que se deve provavelmente aos diferentes modelos experimentais utilizados em cada estudo.

Além das alterações uroteliais, foram também observadas alterações no músculo detrusor, apesar da redução do esforço mecânico sobre a bexiga urinária proporcionado pelo esvaziamento manual diário do órgão durante todo o período analisado. Dados ainda não publicados pelo nosso grupo de pesquisa mostram hipertrofia da bexiga urinária decorrente do alargamento e alongamento dos feixes musculares do músculo detrusor, da formação de edema e do aumento da quantidade de elastina e colágeno decorrente do processo inflamatório (ANDRADE et al, 2011).

O músculo detrusor hipertrófico apresenta alterações tanto na resposta contrátil quanto na funcionalidade de receptores. As modificações nas células do músculo detrusor e na parede da bexiga urinária, que incluem degeneração das células musculares e nervosas, resultam em alterações nas ações das fibras aferentes. Como consequência, ocorre uma mudança morfológica do órgão e, possivelmente, alterações também nas vias eferentes (SJUVE et al, 2000 *apud* MALMAGREN et al, 1987; SJUVE et al 2000, *apud* EKSTROM et al, 1986; SJUVE et al, 2000 *apud* ELBADAWI, 1993, GABELLA et al, 1984). Em conjunto, esses resultados sugerem a indução de um processo inflamatório agudo associado com mudanças estruturais crônicas na bexiga urinária decorrentes da lesão medular traumática.

No presente estudo, observamos ainda a presença de sangue na urina dos animais lesionados nos primeiros dias após o procedimento cirúrgico indicativo de cistite hemorrágica. O quadro de cistite provavelmente se deve ao rompimento do urotélio e dos vasos sanguíneos gerados pela distensão da bexiga urinária, levando à infiltração de urina para tecidos subjacentes. É importante ressaltar que é comum pacientes com lesão medular traumática desenvolverem alterações no urotélio por ulcerações na bexiga urinária e, também, infecções bacterianas advindas de cistites (APODACA et al, 2003; HERRERA et al, 2010).

Corroborando os achados histopatológicos, nossos resultados demonstram ainda níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 na bexiga urinária, nos primeiros dias após a lesão medular, ainda na fase aguda que segue o trauma. De fato, após a lesão tecidual, células inflamatórias como macrófagos, mastócitos, neutrófilos e plaquetas expressam e liberam uma grande variedade de mediadores e proteínas, sendo que as citocinas pró-inflamatórias são transitoriamente produzidas (GRUTKOSKI et al., 1999). Atuando através da associação com receptores específicos, as citocinas compõem um grupo de proteínas presentes em diversas células e são responsáveis por iniciar a complexa resposta inflamatória, por promover aumento da permeabilidade vascular e infiltração leucocitária. As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) são os responsáveis pelo início desta resposta inflamatória aguda (SOMMER E KRESS, 2004; BRENNAN E McINNES, 2008).

A bexiga urinária de animais lesionados apresenta, além de mudanças estruturais, alterações funcionais relacionadas à resposta a estímulos exógenos. Nossos resultados mostram uma resposta contrátil proeminente de preparações de bexiga urinária de animais lesionados

expostas ao agonista de receptor B_1 (des-Arg⁹-BK). Curiosamente, a des-Arg⁹-BK induziu efeito contrátil na bexiga urinária de animais falso-operados no segundo dia após o procedimento cirúrgico, sugerindo que nos primeiros dias após o procedimento o estresse cirúrgico poderia levar à indução do receptor B_1 . Já nos demais períodos avaliados (7, 14 e 28 dias) a resposta contrátil da bexiga urinária de animais falso-operados ao agonista B_1 não diferiu dos resultados observados nos animais controle. Diferentemente das bexigas urinárias dos animais falso-operados, as de animais com lesão medular. Apresentaram respostas contráteis à des-Arg⁹-BK dependentes da concentração em todos os períodos analisados, embora a magnitude dessas respostas contráteis fosse mais discreta em períodos mais tardios ao trauma. Essa diminuição da resposta contrátil pode estar correlacionada à resolução do processo inflamatório. Especialmente em vista que coincide com o decurso temporal dos níveis de citocinas e os dados histológicos. Por outro lado, o surgimento da resposta ao agonista B_1 coincide com a presença de um processo inflamatório nos primeiros dias após o trauma, o que se enquadra bem no tipo de com o tipo de condição que promove a expressão do receptor B_1 .

Diversos estudos demonstram que os receptores para bradicinina podem ter suas ações potencializadas pelas citocinas pró-inflamatórias. Estímulos mediados por citocinas pró-inflamatórias induzem a fosforilação do inibidor endógeno I κ B e, assim, promovem a ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) que é responsável pela transcrição de vários genes, como aqueles que realizam a transcrição de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento tanto em estados fisiológicos quanto patológicos, tendo papel fundamental na indução e na síntese de novo do receptor B_1 (NI et al., 1998; MEDEIROS et al., 2004; PASSOS et al., 2004).

Campos e colaboradores (1999) demonstraram que apesar das diversas vias de sinalização responsáveis pela indução dos receptores B_1 , a indução pela IL-1 β é muito rápida. Ademais, a indução do receptor B_1 envolve a ativação da PKC, a qual está relacionada ao aumento da resposta do receptor B_1 em diferentes preparações isoladas de tecidos (MEDEIROS et al, 2001; UENO et al, 2002).

Já a citocina pró-inflamatória IL-6 exerce seus efeitos através da ativação da via de sinalização JAK/STAT3 dos receptores de citocinas (Heinrich et al., 2003). Estudos recentes demonstraram que IL-6 ativa PI3K/Akt (Ohbayashi et al., 2007) e NF- κ B (LEE et al., 2007), um processo que pode ocorrer de forma concomitante ou independente da via de sinalização JAK/STAT3. Em relação ao envolvimento da IL-6

nos mecanismos inflamatórios, ela é essencial na amplificação da fase aguda da inflamação. A IL-6 estimula a produção de proteínas da fase aguda da inflamação, especialmente Proteína C Reativa, um dos principais marcadores da resposta inflamatória (GABAY, 1995). Ademais, a IL-6 contribui na transição para a fase crônica da inflamação pelo acúmulo de células mononucleares no local da lesão (FONSECA et al., 2009).

Apesar da ocorrência de um aumento significativo nos níveis de IL-1 β e IL-6 na bexiga urinária de ratos com lesão medular, não há quaisquer alterações nos níveis de TNF- α nos períodos avaliados neste trabalho. Sabe-se que esta citocina possui um aumento significativo de sua produção em poucas horas após o dano tecidual e, considerando a avaliação por esse trabalho em períodos referentes a dias, independente do número de dias, não foi possível verificar modificações nos níveis de TNF- α na bexiga urinária de animais após a lesão medular, uma vez que o primeiro período avaliado no trabalho foi de 2 dias.

Através da técnica de *Western blot*, demonstramos aumento na expressão do receptor B₁ na bexiga urinária de animais com lesão medular no 7º dia após o procedimento cirúrgico. Esse aumento poderia ser explicado pela elevação prévia das citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, atuariam regulando a translocação do NF- κ B. De fato, estudos anteriores demonstraram que o aumento da expressão dos receptores B₁ pode ser induzido por IL-1 β através da ativação de NF- κ B (SCHANSTRA et al., 1998).

A reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR *real time*) apresentou uma elevação dos níveis de RNAm dos receptores B₁ na bexiga urinária de animais com lesão medular nos primeiros dias após o procedimento cirúrgico. Chopra e colaboradores (2005) demonstraram que há aumento dos níveis de RNAm dos receptores B₁ tanto no músculo detrusor quanto no urotélio de animais com cistite. Nesse sentido, nossos resultados também demonstram um aumento nos níveis de RNAm dos receptores B₁ no gânglio da raiz dorsal (L₆-S₁) e nos segmentos correspondentes da medula espinhal nos dias 2 e 7 após a lesão medular, respectivamente. Estudos demonstram ainda que há níveis constitutivos de RNAm para os receptores B₁ tanto na bexiga urinária quanto na medula espinhal (BELICHARD et al, 1999; MA Q.P. et al, 2001). Alinham-se a esses achados, uma vez que há níveis de RNAm do receptor B₁ tanto na bexiga urinária quanto na medula espinhal de animais controle, falso-operados e lesionados. Dessa forma, nossos achados, em conjunto com dados da literatura, permitem sugerir uma possível regulação da expressão do receptor B₁ mediado pelas

citocinas pró-inflamatórias, que permite induzir aumento da contração da bexiga urinária durante o processo inflamatório observado nos primeiros dias após a lesão medular.

Este estudo também examinou, em ensaios *in vitro*, a resposta contrátil da bexiga urinária de animais lesionados a agonista do receptor B₂, a bradicinina. Estudos prévios têm demonstrado o envolvimento fisiopatológico da bradicinina na bexiga urinária (LECCI et al, 1995; MAGGI, 1997; SJUVE et al, 2000). Os resultados do presente estudo mostraram aumento significativo da resposta contrátil da bexiga urinária em animais lesionados ao agonista B₂ em relação ao grupo falso-operado em todos os períodos avaliados, com aumento mais pronunciado nos períodos mais tardios após o trauma medular. Interessantemente, apesar dos níveis de expressão do receptor B₂ em bexigas urinárias de animais com lesão medular estarem significativamente aumentados no 14º e 28º dia após o procedimento cirúrgico, esse aumento não parece decorrer de elevação na taxa de transcrição de RNAm dos receptores B₂, uma vez que não houve alterações nos níveis de RNAm para esse receptor na bexiga urinária de animais com lesão medular em quaisquer dos períodos avaliados. Estes dados nos permitem sugerir que os níveis constitutivos de RNAm do receptor B₂ parecem ser suficientes para a síntese de novo de receptores B₂ na bexiga urinária de animais com lesão medular traumática. Alternativamente, é possível que a lesão medular possa ter reduzido taxa de renovação desses receptores no tecido. Assim sendo, a resposta contrátil exacerbada da bexiga urinária ao agonista B₂ parece não decorrer do aumento da expressão de RNAm para os receptores B₂, mas sim de mecanismos adicionais tais como sensibilização dos receptores e/ou sua exposição na membrana celular após dano e inflamação tecidual. A expressão aumentada dos receptores B₁ e B₂, na bexiga urinária de animais com lesão medular, poderia contribuir para o desenvolvimento de hiperatividade da bexiga urinária se ocorresse em terminações de fibras aferentes e/ou em células uroteliais do órgão. Estudos recentes demonstram a expressão de receptores da bradicinina no urotélio, em terminações de fibras aferentes e no músculo detrusor da bexiga urinária (BIRDER, 2005; CHOPRA et al, 2005;).

Dando continuidade aos estudos *in vitro*, nos ativemos à seletividade de ação dos agonistas dos receptores B₁ e B₂ em preparações de bexiga urinária coletadas 28 dias após o trauma medular pré-incubadas com o antagonista do receptor B₁, des-Arg⁹-[Leu⁸] - BK (DALBK) ou o antagonista do receptor B₂, o Icatibante (Hoe 140). O Hoe 140 é um potente antagonista seletivo do receptor B₂ que possui

ação antiinflamatória (LEMBECK et al, 1991; HOCK et al, 1991) e foi capaz de reduzir o extravasamento protéico e a hiperatividade da bexiga urinária em modelos experimentais de cistite (GIULIANI et al., 1993; MAGGI et al., 1993; AHLUWALIA et al., 1994; GRIESBACHER, 1997). Por outro lado, o antagonista seletivo do receptor B₁, DALBK, apresenta cinética de ação tão rápida quanto a sua reversibilidade e tem demonstrado ter boa afinidade pelo seu alvo em bexiga urinária de coelhos (HALL, 1997; REGOLI et al, 1998). Assim sendo, nossos resultados demonstram que a incubação prévia de preparações de bexiga urinária de animais lesionados com Hoe 140 (30 nM) aboliu a resposta contrátil induzida pela adição cumulativa de concentrações crescentes de bradicinina, sugerindo que a exacerbação da resposta contrátil da bexiga urinária após a lesão medular decorre da ativação direta de receptores B₂. No entanto, a concentração do antagonista seletivo de receptores B₁ não foi suficiente para bloquear a resposta contrátil desencadeada por concentrações crescentes de des-Arg⁹-BK. Isto provavelmente se deve ao perfil do antagonista utilizado neste estudo, ou seja, um antagonista competitivo reversível, passível de ser deslocado do seu sítio de ligação quando diante de altas concentrações do agonista, des-Arg⁹-BK.

Por fim, visando uma proximidade à condição clínica, avaliamos se receptores B₁ e B₂ contribuem às alterações urodinâmicas resultantes do trauma medular. Segundo Takahara e colaboradores (2007), nos primeiros dias após a lesão medular a bexiga urinária torna-se arreflexa e que a partir do quinto dia começam a surgir as contrações não-associadas à micção (CNMs). De fato, a análise dos registros cistométricos obtidos da bexiga urinária de animais lesionados, 28 dias após o procedimento cirúrgico, mostrou aumento significativo no número de CNMs durante a fase de enchimento do órgão. Ademais, e em conformidade com os dados de Takahara e colaboradores (2007), nossos achados também mostraram que os animais avaliados no 28º dia após o trauma medular, apresentaram aumento no volume de urina eliminado sem, no entanto, alterar o volume residual. Observamos ainda redução do intervalo entre as CNMs da bexiga urinária de animais lesionados em comparação aos animais controle e falso-operados, indicando que, nesta condição, a bexiga urinária contrai exageradamente. Essa contração exacerbada da bexiga urinária poderia facilitar a micção e, conseqüentemente, favorecer um quadro de incontinência urinária. Contudo devido à contração simultânea do esfíncter uretral externo (dissinergia vesicoesfincteriana) isso não ocorre. Esse fenômeno é evidenciado através das alterações urodinâmicas representadas pela redução do volume eliminado, aumento

no volume residual e a diminuição drástica da eficiência no esvaziamento vesical, provocando conseqüentemente o aumento da pressão basal e da pressão limiar. O desenvolvimento da dissinergia vesicoesfincteriana decorrente da lesão medular traumática poderia ser explicado, em parte, pela transmissão de impulsos pelas fibras aferentes do tipo C, da bexiga urinária para a medula espinhal sacral intacta, situada abaixo do sítio da lesão traumática, onde as mesmas estimula neurônios motores parassimpáticos que controlam o esfíncter uretral externo, através de novas conexões sinápticas estabelecidas após a lesão medular (KARSENTY et al., 2005).

A hiperatividade da bexiga urinária decorrente da lesão medular traumática tem sido tratada, majoritariamente, com fármacos antimuscarínicos. No entanto, como Kim e colaboradores (2005) demonstraram em um modelo de cistite, apesar desta classe de medicamentos melhorar parâmetros urodinâmicos, tais como diminuição do intervalo entre as contrações, aumento da capacidade de armazenamento da bexiga urinária e da pressão limiar do órgão, eles promovem também diversos efeitos colaterais indesejáveis aos pacientes, tais como boca seca, visão alterada entre outros (ABRAMS E ANDERSSON, 2007; ABRAMS et al., 2006).

Visando avaliar a capacidade dos receptores B_1 e B_2 em modular as alterações urodinâmicas conseqüentes ao trauma medular, nosso estudo avaliou o efeito da administração sistêmica de antagonistas dos receptores B_1 (DALBK) ou B_2 (Hoe 140) em animais falso-operados ou lesionados 28 dias após o procedimento cirúrgico, sendo que o Hoe 140 reduziu tanto a amplitude (21%) quanto o número de CNMs (59%). Por outro lado, a administração de DALBK reduziu somente o número de CNMs (54%). A diferença da eficácia dos tratamentos poderia ser explicada, em parte, pela distribuição tecidual dos receptores para bradicinina e pela extensão da área atingida, ou seja, a administração sistêmica de Hoe 140 poderia estar atuando preferencialmente no músculo detrusor, produzindo alterações motoras na regulação do reflexo de micção.

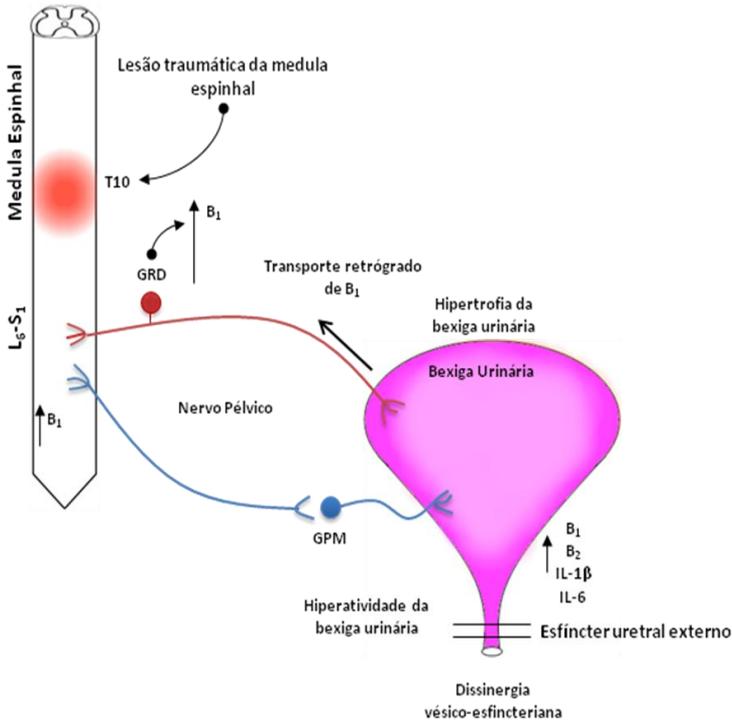
Conforme demonstrado por Chopra e colaboradores (2005), o RNAm para o receptor B_2 está presente tanto no músculo detrusor quanto no urotélio, enquanto o RNAm para o receptor B_1 está presente apenas no urotélio em períodos ainda menores do que aqueles avaliados neste estudo. Estes dados permitem sugerir que, enquanto os receptores B_2 estão atuando majoritariamente no músculo detrusor e no urotélio, o antagonista do receptor B_1 DALBK parece alterar principalmente o tônus muscular do detrusor através da regulação da liberação de

mediadores presentes nas células uroteliais, como foi descrito em um modelo de cistite por Chopra e colaboradores (2005).

Por outro lado, apesar do tratamento com o antagonista dos receptores B₁ ou B₂ terem reduzido o número de CNMs, não houve melhora na eficiência de esvaziamento, o qual é um parâmetro urodinâmico fortemente associado à lesão medular. Desse modo, sugere-se que o bloqueio dos receptores cininérgicos é inefetivo em reverter, adequadamente, a dissinergia vesicoesfincteriana presente após a lesão medular, embora possa atenuar a sensibilização de vias neurais envolvidas no desencadeamento e manutenção da hiperatividade da bexiga urinária.

Desse modo, apesar do sistema calicreína-cininas estar sendo estudado desde o início do século XX, pesquisas relacionadas a esses peptídeos são ainda de grande interesse, pois as cininas exercem funções fundamentais em processos fisiopatológicos. Trabalhos recentes têm descrito a expressão dos receptores B₁ e B₂ na bexiga urinária em processos patológicos. Por outro lado, até o momento, não existem trabalhos que propõem investigar o papel das cininas na hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão medular. Em resumo, nosso estudo apresenta evidências da expressão constitutiva de ambos os receptores cininérgicos B₁ e B₂ na bexiga urinária e sugere que a bradicinina possa estar envolvida na função fisiológica do órgão. Ademais, o aumento da expressão dos receptores B₁ e B₂ para as cininas após a lesão medular parece contribuir para as alterações nas vias reflexas da bexiga urinária observadas na hiperatividade do órgão após a lesão medular traumática. Sendo assim, a utilização de antagonistas dos receptores B₁ e B₂ foi capaz de reduzir a exacerbação da resposta contrátil observada *in vitro* e as contrações de não micção observadas *in vivo*. A utilização de antagonistas de receptores B₁ e B₂ para as cininas poderia constituir uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da hiperatividade da bexiga urinária após lesão medular traumática.

6. ESQUEMA FINAL



AFB.

Figura 11. Mecanismos propostos para a participação dos receptores B_1 e B_2 na hiperatividade da bexiga urinária decorrente da lesão medular. A lesão medular interrompe o controle motor do esfíncter uretral externo, induzindo dissinergia vésico-esfincteriana. Desta forma, a obstrução funcional do esfíncter uretral externo causa retenção urinária e prejuízo no esvaziamento vesical. A distensão excessiva da bexiga urinária pelo grande volume residual de urina induz hipertrofia do órgão, resultando em aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6, bem como na expressão dos receptores B_1 e B_2 em células uroteliais e fibras aferentes que inervam a bexiga urinária. A expressão do receptor B_1 também está aumentada na medula espinhal e nos neurônios do GRD indicando uma possível participação deste receptor nas alterações dos reflexos centrais do processo de micção após a lesão medular. Ocorrendo um transporte retrógrado pelas vias aferentes até os corpos celulares dos neurônios do GRD, onde promovem entre outras ações, aumento na síntese proteica, em especial no contexto deste estudo, de receptores B_1 . O aumento da expressão dos receptores B_1 e B_2 na bexiga urinária, assim contribuem para o desenvolvimento e manutenção da hiperatividade da bexiga urinária. GRD: gânglio da raiz dorsal; GPM: gânglio pélvico maior; EUE: esfíncter uretral externo;

7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABELOUS, J.E., BARDIER, E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. **C.R. Senaces. Soc. Biol.**, 66:511, 1909.
- ABRAMS P, CARDOZO L, FALL M, *et al.* The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardization sub-committee of the International Continence Society. **Urology**, 61:37-49, 2003.
- ABRAMS, P., ANDERSSON, K.E., BUCCAFUSCO, J.J., CHAPPLE, C., CHET, W., *et al.*, Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. **Brit Journ Pharmacol**, 148: 565–578, 2006.
- ABRAMS, P., ANDERSSON, K.E. Muscarinic receptor antagonists for overactive bladder. **B J U International** 100: 987 – 1006, 2007.
- AHLUWALIA A., MAGGI C.A., SANTICIOLI P., LECCI A., GIULIANI S. Characterization of the capsaicin-sensitive component of cyclophosphamide-induced inflammation in the rat urinary bladder. **Br J Pharmacol**. 111(4):1017-22, 1994.
- AHLUWALIA, A., PERRETI, M. B₁ receptors as a new inflammatory target, Could this B be the 1? **Trends. Pharmacol. Sci.**, 20:100-104, 1999.
- ANDERSSON, K.E., HEDLUND, P. Pharmacology perspective on the physiology of the lower urinary tract. **Urology**, 60; 13-20, 2002.
- ANDERSSON, K.E. ARNER, A. Urinary Bladder Contraction and Relaxation: Physiology and pathophysiology **Physiol Rev.**, 84: 935-986, 2004.
- ANDRADE, E. L., FORNER, S., BENTO, A.F., LEITE, D.F.P., DIAS, M.A., LEAL, P.C., KOEPP, J., CALIXTO, J.B. TRPA1 receptor modulation attenuates bladder overactivity induced by spinal cord injury. *American Journal of Physiology. Renal, Fluid and Electrolyte Physiology* p. 1-1, 2011.
- ANGERS, M., DROUIN, R., BACHVAROVA, M., PARADIS, I., MARCEAU, F., BACHVAROV, D. R. In vivo protein-DNA interactions at the kinin B1 receptor gene promoter: no modification on interleukin-1 beta or lipopolysaccharide induction. **J Cell Biochem**, 78: 278-296, 2000.
- APODACA, G., KISS, S., RUIZ, W., MEYERS, S., ZEIDEL, M., BIRDER, L. Disruption of bladder epithelium barrier function after spinal cord injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, 284: F966-976, 2003.
- ARAÚJO, R. C., KETTRITZ, R., FICHTNER, I., PAIVA, A. C. M., PESQUERO, J. B., BADER, M. Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. **Biol. Chem.**, 382: 91-95, 2001.

ASSOCIAÇÃO DE ASSISTÊNCIA À CRIANÇA DEFICIENTE. Disponível em: <http://www.aacd60anos.com.br/>. Acesso em: 15 de Dezembro 2010

BATHON, J., PROUD, D. Bradykinin antagonists. **Annu. Rev. Pharmac. Toxicol.**, 31: 129-162, 1991.

BASSO, D.M., BEATTIE, M.S., BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma**, 12: 1-21, 1995.

BELICHARD, P., LUCCARINI, J.M., DEFRENE, E., FAYE, P., FRANCK, R.M., DUCLOS, H., PAQUET, J.L., PRUNEAU, D. Pharmacological and molecular evidence for kinin B₁ receptor expression in urinary bladder of cyclophosphamide-treated rats. **Br J Pharmacol**, 128: 213-219, 1999.

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

BENTO A.F., LEITE D.F., CLAUDINO R.F., HARA D.B., LEAL P.C., CALIXTO J.B. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. **J Leukoc Biol.** 84:1213-21, 2008.

BIRDER, L.A. More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. **Am J Physiol Renal Physiol** 289:489-495, 2005.

BIRDER, L.A.; DE GROAT, W. Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. **Nat Clin Pract Urol** 4: 46, 2007.

BIRDER, L.A., DE GROAT, W., MILLS, I., MORRISON, J., THOR, K., DRAKE, M. Neural Control of the Lower Urinary Tract: Peripheral and Spinal Mechanisms. **Neurology and Urodynamics.**, 29: 128-139, 2010.

BHOOLA, K.D., FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: Kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44:1-80, 1992.

BOISSONAS, R.A. GUTTMANN, S., JAQUENOUD, P.A. Synthèse de la L-arginyl - L- propyl - L - propy - glycil - L - phénylalanil - L - arginine, un nonapeptide présentant les propriétés de la bradykinine. **Helv. Chim. Acta.**, 43: 1349-1358, 1960.

BORKOWSKI, J.A., RANSON, R.W., SEABROOK, E. R., TRUMBAUER, M., CHEN, H., HILL, R. E., STRADER, C. D., HESS, J. F. Target disruption of bradykinin B₂ receptor gene eliminates

- bradykinin action in smooth muscles and neurons. **J. Biol. Chem.**, 270:13706-13710, 1995.
- BOYCE, S., RUPNIAK, N. M. J., CARLSON, E. J., WEBB, J., BORKOWSKI, J. A., HESS, J. F., STRADER, C. D., HILL, R. G. Nociception and inflammatory hyperalgesia in B2 kinin receptor knockout mice. **Immunopharmacology.**, 33:333-335, 1996.
- BRENNAN, F., McINNES. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, 118:3537-3545, 2008.
- BRUSHINI, H. Bexiga Neurogênica. In: **Guia Prático de Urologia**. Ed. Segmento Farma, 2003.
- CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain.**, 87: 1-5, 2000.
- CALIXTO, J.B. MEDEIROS, R.; FERNANDES, E.S., FERREIRA, J., CABRINI, D.A., CAMPOS, M.M. Kinin B₁ receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol.** 143: 803–818, 2004.
- CAMPOS, A. H., CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the contractile responses of kinins in rat portal vein rings: Mediation by B₁ and B₂ receptors. **J Pharmacol. Exp. Ther.**, 268:902-909, 1994.
- CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E.P., CALIXTO, J.B. In vivo B₁ kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kB pathways. **Br J Pharmacol.**, 127: 1851 ± 1859, 1999.
- CAMPOS, M. M., LEAL, P. C., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Non-peptide antagonists for kinin B₁ receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. **TIPS.**, 27: 646-651, 2006.
- CARTWRIGHT, R., RENGANATHAN, A., CARDOZO, L. Current management of overactive bladder. *Curr Opin Obstet Gynecol* 20:489–495, 2008.
- CHAI, K.X. NI, A.; WANG,D., WARD, D.C., CHAO,J., CHAO, L. Genomic DNA sequence expression and chromosomal localization of the human B₁ bradykinin receptor gene BDKRB₁. **Genomics.** 31: 51-57, 1996.
- CHENG, C.L.; DE GROAT, W.C. The role of capsaicin-sensitive afferent fibers in the lower urinary tract dysfunction induced by chronic spinal cord injury in rats. **Experim Neurol.**, 187: 445-454, 2004.
- CHOPRA, B., BARRICK, S.R., MEYERS, S. BECKER, J.M., ZEIDEL, M.L., FORD, A.P.D.W., GROAT, W.C., BIRDER, L.A. Expression and function of bradykinin B₁ and B₂ receptors in normal

and inflamed rat urinary bladder urothelium. **J Physiol**, 562: 859-871, 2005.

CHU, F.M., Dmochowski, R. Pathophysiology of overactive bladder. **The American Journ of Med.**, 119, 3S-8S, 2006.

DAVID. B.T., STEWARD, O. Deficits in bladder function following spinal cord injury vary depending on the level of the injury. **Experimental Neurology** 226: 128–135, 2010.

DE GROAT, W.C. The urothelium in overactive bladder: passive bystander or active participant? **Urology**, 64; 7-11, 2004.

DE GROAT. W., YOSHIMURA, N. Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. In: **Progress in Brain Research**. Elsevier : Amsterdam, 59-83, 2006.

_____ Changes in afferent activity after spinal cord injury. **Neurology and Urodynamics**, 29:63-76, 2010.

DENDORFER, A., WOLFRUM, S., DOMINIAK, P. Pharmacology and cardiovascular implications of kinin-kallikrein system. **Jpn. J. Pharmacol.**, 79: 403-426, 1999.

EL SAYAH, M., MEDEIROS, R., FERNANDES, E. S., CAMPOS, M. M., CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying up-regulation in the pig Iris sphincter in vitro. **Mol. Pharmacol.**, 69: 1701-1708, 2006.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F; CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, J.G.; PESQUERO, J.L.; AVELAR, M.C.; TEIXEIRA, M.M, CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B1 receptor in the rat paw. **Br. J. Pharmacol.** 133:693-698, 2003.

FERREIRA, J., BEIRITH, A., MORI, M. A. S., ARAÚJO, R. C., BADER, M., PESQUERO, J. B., *et al.* Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out. **J.Neurosci.**, 25:2405-2412, 2005.

FONSECA JE, SANTOS MJ, CANHÃO H, CHOY E. Interleukin- 6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. **Autoimmun Rev.** 8:538- 42, 2009.

FOWLER, C.J., GRIFFITHS, D., DE GROAT, W. The neural control of micturition. **Nat. Neurosc.**, 9:453-466, 2008.

FRY, C.H., MENG, E., YOUNG, J.S. The physiological function of lower urinary tract smooth muscle. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clin.**, 154: 3-13, 2010.

FREY , E.K. Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit. **Arch. Klin. Chir.**, 142: 633-669, 1926.

GABAY C., SILACCI P., GENIN B., MENTHA G., LE COULTRE C., GUERNE P.A. Soluble interleukin- 6 receptor strongly increases the

- production of acute- phase protein by hepatoma cells but exerts minimal changes on human primary hepatocytes. **Eur J Immunol.** 25:2378- 83, 1995.
- GABELLA, G. Size of neurons and glial cells in the intramural ganglia of the hypertrophic intestine of the guineapig, **J. Neurocytol.**, 13: 73-84, 1984.
- GILLEPSIE, J.I., VAN KOEVERINGE, G.A., DE WACHTER, S.G., DE VENDE, J. On the origins of the sensory output from the bladder: the concept of afferent noise. **BJU Int**, 103: 1324-1333, 2004.
- GIULIANI S., SANTICIOLI P., LIPPE I.T., LECCI A., MAGGI C.A. Effect of bradykinin and tachykinin receptor antagonist on xylene-induced cystitis in rats. **J Urol.** 150(3):1014-7, 1993.
- GOUGAT, J., BERNARD, F., SARRAN, L., PLANCHENAU, C., PONCELET, M., MARUANI, J. SSR240612[(2R)-2-[[[(3R)-3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino}prpanoyl)amino]-3-(4-{[2R,6S]-2,6-dimethylpiperidinyl)methyl}phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide Hydrochloride], a New Nonpeptide Antagonist of the Bradykinin B1 receptor: Biochemical and Pharmacological Characterization. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 309:661-669, 2004.
- GRAY, H. Anatomy, Descriptive and Surgical. New York City: Barnes & Noble, 2005.
- GRIESBACHER T., SAMETZ W., LEGAT F.J., DIETHART S., HAMMER S., JUAN H. Effects of the non-peptide B2 antagonist FR173657 on kinin-induced smooth muscle contraction and relaxation, vasoconstriction and prostaglandin release. **Br J Pharmacol.** 21(3):469-76, 1997.
- GUYTON, A.C. Fisiologia Humana. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
- GUYTON, A.C; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 11ed. São Paulo: Elsevier, 2006.
- GRUTKOSKI, P.S., D'AMICO, R., AYALA, A. & SIMMAS, H.H. IL-1 β stimulation induces paracrine regulation of PMN function and apoptosis. **Shock**, 12, 373 \pm 381, 1999.
- HADDAD, E.B., FOX, A.J., ROUSELL, J., BURGESS, G., MCINTYRE, P., BARNES, P. J., CHUNG, K. F. Post-transcriptional regulation of bradikinin B1 and B2 receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor- α : modulation by dexamethasone. **Mol. Pharmacol.**, 57:1123-1131, 2000.

HALL, J. M., MORTON, I. K. M. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In **The Kinin System.**, Farmer, S.G.Ed. Academic Press, 9-43, 1997.

HARA, D.B., LEITE, D.F.P., FERNANDES, E.S., PASSOS, G.F., GUIMARÃES, A.O., PESQUERO, J.B., CAMPOS, M.M., CALIXTO J.B. The relevance of kinin B1 receptor upregulation in a mouse model of colitis. **Br. J. Pharmacol.**, 154: 1276-1286, 2008.

HEINRICH P.C., BEHRMANN I., HAAN S., HERMANN H.M., MÜLLER-NEWEN G., SCHAPER F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem J** 374:1-20, 2003.

HERRERA, J.J., HAYWOOD-WATSON, R.J., GRILL, R.J. Acute and chronic deficits in the urinary bladder after spinal contusion injury in the adult rat. **J Neurotrauma**, 27: 423-431, 2010.

HESS, J.F. BORKOWSKI, J.A., YOUNG, G.S. STRADER, C.D., RANSON, R.W. Cloning and pharmacological characterization of human bradykinin (BK-2) receptor. **Biochem. Res. Commun.**, 184: 260-268, 1992.

HESS, J.F., HEY, P.J., CHEN, T.B., O'BRIEN, J., OMALLYE, S.S., PETTIBONE, D.J., CHANG, R.S.L. Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B1 and B2 bradykinin receptors. **Biol. Chem.**, 382: 123-129, 2001.

HESS, J. F., HEY, P. J., CHEN, T. B., PETTIBONE, D. J., CHANG, R. S. L. Molecular and Pharmacological diversity of the kinin B₁ receptor. **Int. Immunopharmacol.**, 2:1747-1754, 2002.

HOCK FJ, WIRTH K, ALBUS U, LINZ W, GERHARDS HJ, WIEMER G, HENKE ST, BREIPOHL G, KONIG W, KNOLLE J, SCHOLKENS BA. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. **Br. J. Pharmacology**. 102, 769-773, 1991.

KANAI, A., ANDERSSON, K.E. Bladder afferent signaling: recent findings. **J Urol** 183: 128812-12895, 2010.

KARSENTY, G., REITZ, A., WEFER B., BOY, S., SCHURSCH, B. Understanding detrusor sphincter dyssynergia – significance of chronology. **Urology.**, 66: 763-768, 2005.

KRAUT, H., FREY, E.K, WERLE, E. Der Nachweis eines krieslaufhomons in derer pankreasdrüse. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.**, 189:97-106, 1930.

KIM, J.C., YOO, J.S., PARK, E.Y., HONG, S.H., SEO, S.I., HWANG, T.K. Muscarinic and purinergic receptor expression in the urothelium of

rats with detrusor overactivity induced by bladder outlet obstruction. **BJU Int**, 101: 371-375, 2008.

KIM, Y., YOSHIMURA, N., MASUDA, H., DE MIGUE, F., CHANCELLOR, M.B. Antimuscarinic agents exhibit local inhibitory effects on muscarinic receptors in bladder-afferent pathways. **Urology**, 65:238-42, 2005

KOOP, E.C. The urinary system. Time Life Medical. 1ed, 1996.

KRUSE, M.N., BRAY, L.A.; DE GROAT, W.C. Influence of spinal cord injury on the morphology of bladder afferent and efferent neurons. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 54: 215-224, 1995.

KUDUK, S. D., NG, C., FENG, D. M., WAI, J. M., CHANG, R. S., HARRELL, C. M., *et al.* 2,3- diaminopyridine bradykinin B1 receptor antagonist. **J. Med Chem.**, 47:6439-6442, 2004.

LAGNEUX, D., RIBUOT, C. *In vivo* evidence for B1-receptor synthesis induction by heat stress in the rat. **Br. J. Pharmacol.** 121:1045-1046, 1997.

LAGNEUX, C., LEBRIN, F., DEMENGE, P., GODIN-RIBUOT, D., RIBUOT, C. Map-kinase dependent activation of kinin B1 receptor gene transcription after heat stress in rat vascular smooth muscle cells. **Int. Immunopharmacol.** 1:533-538, 2001.

LARRIVÉE, J.F.; BACHVAROV, D.R.; HOUSEL, F.; LANDRY, J.; HOUT, J; MARCEAU, F. Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. **J. Immunol.** 160: 1419-1426, 1998.

LECCI A., GIULIANI S., MEINI S., MAGGI C.A. Pharmacological analysis of the local and reflex responses to bradykinin on rat urinary bladder motility in vivo. **Br J Pharmacol.** 114(3): 708–714, 1995

LECCI, A. GIULIANI, S.; MEINI, S.; MAGGI, C.A. Pharmacological analysis of the local and reflex responses to bradykinin on rat urinary bladder motility in vivo. **Br J Pharmacol.**, 114(3): 708–714, 1995.

LECCI, A., MEINI, S., TRAMONTANA, M., GIULIANI, S., CRISCUOLI, M. AND MAGGI, C.A., Kinin B1 receptor-mediated motor responses in normal or inflamed rat urinary bladder in vivo. **Regul Pept**, 80: 41-47, 1999.

LEE Y.J.,HEO J.S., SUH H.N., LEE M.Y., HAN H.J. Interleukin- 6 stimulates a- MG uptake in renal proximal tubule cells: Involvement of STAT3, PI3K/Akt, MAPKs, and NF- kB. **Am J Physiol Renal Physiol.** 293:1036- 46, 2007.

LEEB-LUNDBERG, L.M.F.; MARCEAU, F.; MÜLLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D.J.; ZURAW, B. L. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. **Pharmacol. Rev.**, 57: 27-77, 2005.

LEIPPOLD, T., REITZ, A., SCHURSCH, B. Botulinum Toxin as a new Therapy Option for Voiding Disorders: Current State of the Art. **European Urology**, 44: 165–174, 2003.

LEMBECK F., GRIESBACHER T., ECKHARDT M., HENKE S., BREIPOHL G., KNOLLE J. New, long-acting, potent bradykinin antagonists. **Br. J. Pharmacology**. 102, 297-304, 1991.

LEWIS, G.P. Plasma kinin and other vasoactive compounds in acute inflammation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 116:847-854, 1964.

LIEBMANN, C. Bradykinin signalling to MAP kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. **Biol. Chem.**, 382: 49-55, 2001.

LIEBMANN, C., BÖHMER F. D. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signalling. **Curr. Med. Chem.**, 7: 911-943, 2000.

MA Q.P., Heavens R. Basal expression of bradykinin B1 receptor in the spinal cord in humans and rats. **Neuroreport**.12; 2311-2314, 2001.

MACNEIL, T., BIERILLO, K.K., MENKE, J. G., HESS, J. F. Cloning and Pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B1 receptor. **Biochim. Biophys. Acta. Gene. Struct. Express.**, 1264:223-228, 1995.

MAGGI, C.A., SANTICIOLI, P., DEL BIANCO, E., LECCI, A., GULIANI, S. Evidence for the involvement of bradykinin in chemically-evoked cystitis in anaesthetized rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, 347(4):432-7, 1993.

MAGGI, C.A., Bradykinin as an inflammatory mediator in the urinary tract. In: **The Kinin System**, Farmer, S.G. Ed. Academic Press pp. 235–247, 1997.

MARCEAU F. Kinin B₁ receptor: a review. **Immunopharmacology**, 30:1, 1995.

MARCEAU, F.; BACHVAROV, D.R. Kinin receptors. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, 16: 385-401, 1998.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: Therapeutics perspectives. **Nature Rev Drug Discov.**, 3: 845-852, 2004.

- MARCEAU, F., LARRIVÉE, J.F., SAINT-JACQUES, E., BACHVAROV, D.R. The kinin B₁ receptor: an inducible G protein coupled receptor. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 75: 725-731, 1997.
- MARTINI, F. *Fundamental of Anatomy and Physiology*. 2ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1992.
- MCLEAN, P.G; AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. Association Between kinin (B₁) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. **J. Exp. Med.**, 192: 367-380, 2000.
- MEDEIROS, R., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., FERNANDES, E.S., MORI, M.A., PESQUERO, J.B., BADER, M., AVELLAR, M.C., CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. Bradykinin B₁ receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein. A critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-κB signaling pathways. **Circ Res.**, 94: 1375-1382, 2004.
- MENKE, J.G. BOROWSKI, J.A., BIERILKO, K.K., MACNEIL, T., DERRIC, A.W., SCHENCK, KA, RANSOM, R.W., STRADER, C.D., LINEMEYER, D.L., HESS, J.F. Expression of cloning of a human B₁ bradykinin receptor. **J. Biol. Chem.**, 269:21583-21586, 1994.
- MEYER, F., VIALLE, L.R., VIALLE, E.N., LEGGI-TORRES, L.F., RASERA, E., LEONEL, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cirúrgica brasileira**, 18 :203-207, 2003.
- MOREAU, M.E., GARBACKI, N., MOLINAR, G., BROWN, N.J., MARCEAU, F., ADAM, A. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. **J Pharmacology Sci.**, 99: 6-38, 2005.
- NAMBIRAJAN, T., WOOSLEY, S., MAHENDRA, V., STONE, A.R., WALSH, I.K. Urethral stents for detrusor sphincter dyssynergia. **B J U International**, 95: 350 – 353, 2005.
- NI, A., CHAI, K.X., CHAO, L., CHAO, J. Molecular cloning and expression of rat bradykinin B₁ receptor. **Biochem. Biophys. Acta**. 1442: 177-185, 1998a.
- NI, A., CHAO, L., CHAO, J. Transcription factor nuclear factor-κB regulates the inducible expression of the human B₁ receptor gene in inflammation. **J. Biol. Chem.**, 273: 2784-2791, 1998b.
- OHBAYASHI N, IKEDA O, TAIRA O, YAMAMOTO Y, MUROMOTO R, SEKINE Y, SUGIYAMA Y, HONJOH T, MATSUDA T. LIF- and IL- 6- induced acetylation of STAT3 at Lys- 685 through PI3K/Akt activation. **Biol Pharm Bull**. 30:1860- 64, 2007.
- PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S. CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, J.G.; PESQUERO, J.L. SOUZA, G.E.; AVELLAR, M.C.; TEIXEIRA, M.M;

- CALIXTO, J.B. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysachcharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. **J. Immunol.** 172:1839-1847, 2004.
- PATRA, P.B., WESTFALL, D.P. Potentiation by bradykinin and substance P of purinergic neurotransmission in urinary bladder. **Journal of Urology**, 156: 532-535, 1996
- PRADO, G.N., TAYLOR, L., ZHOU, X., RICUPERO, D., MIERKE, D.F., POLGAR, P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B₂ and B₁ receptors. **J. Cell Physiol.**, 193: 275-286, 1985.
- PESQUERO, J.B., PESQUERO, J.L., OLIVEIRA, S.M., ROSCHER, A.A., METZGER, R., GANTEN, D., BADER, M. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B₁ receptor gene. **Biochem. Biophys.** 220: 219-225, 1996.
- PORRECA, F., VANDERAH, T.W., GUO, W., BARTH, M., DODEY, P., PEYROU, V., *et al.* Antinociceptive pharmacology of LF22-0542, a novel non-peptidic bradykinin B1 receptor antagonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 318: 195-205, 2006
- REGOLI, D., BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, 32:1-45, 1980.
- REGOLI, D., BARABÉ, J., PARK, W.K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 55:855-867, 1977.
- REGOLI, D., ALLOGHO, S. N., RIZZI, A., GOBEIL, F.J. Bradykinin receptors and their antagonists. **Eur. J. Pharmacol.**, 348:1-10, 1998.
- RITCHIE, T. J., DZIADULEWICZ, E. K., CULSHAW, A.J., MÜLLER, W., BURGESS, G.M., BLOOMFIELD, G. C., *et al.* Potent and orally bioavailable non-peptide antagonist at the human bradykinin B(1) receptor based on a 2-alkylamino-5-sulfamoylbenzamide core. **J. Med. Chem.**, 47:4642-4644, 2004.
- ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W.T., ROSENFELD, G. Bradykinin a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, 156:261-273, 1949.
- ROSAI, J. **Surgical Pathology**. 9th. Vol. 1 p.1322, 2004.
- SAKLTVALA, J., DEAN, J., FINCH, A. Protein kinase cascades in intracellular signaling by interleukin-1 and tumor necrosis factor. **Biochem. Soc. Symp.**, 64:63-67, 1999.
- SARDI, S. P., ERRASTI, A. E., REY-ARES, V., ROGINES-VELLO, M. P., ROTHLIN, R. P. Bradykinin B1 receptor in isolated human umbilical vein: an experimental model of the in vitro up-regulation. **Acta. Pharmacol. Sinica.**, 21:105-110, 2000.

- SCHANSTRA, J. P., ARLIC, C., MARIN-CASTANO, M. B., GIROLAMI, J., BASCANDS, J. Renal bradykinin receptors: localisation, transduction pathways and molecular basis for a possible pathological role. **Int. J. Mol. Med.**, 3:185-191, 1999.
- SCHANSTRA, J.P., BATAILLÉ, E., MARIN CASTAÑO, M.E., BARASCUD, Y., HIRTZ, C., PESQUERO, J.B., PECHER, C., GAUTHIER, F., GIROLAMI, J.P., BASCANDS, J.L. The B1-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF- κ B and induces homologous up-regulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. **J Clin Invest.**, 101: 2080-2091, 1998.
- SCHMITZ, T.J. Lesão Medular Traumática. In: **Fisioterapia Avaliação e Tratamento**. Manole: São Paulo, 874-87, 2004.
- SEKI, S., SASAKI, K., IGAWA, Y., NISHIZAWA, O., CHANCELLOR, M.B., *et al.* Suppression of detrusor-sphincter dyssynergia by immunoneutralization of nerve growth factor in lumbosacral spinal cord in spinal cord injured rats. **Journal Urol.**, 171:478-482, 2004.
- SHEFCHYK, S.J. Spinal mechanisms contributing to urethral striated sphincter control during continence and micturition: "how good things might go bad". **Prog Brain Res**, 52: 85-95, 2006.
- SJUVE, R. BOELS, P.J., UVELIUS, B., ARNER, A. Up-regulation of bradykinin response in rat and human bladder smooth muscle. **J. Urol.**, 164: 1757-1763, 2000.
- SOMMER, C., KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters** 361:184-187, 2004.
- STEERS, W. Pathophysiology of Overactive Bladder and Urge Urinary Incontinence. **Rev in Urol.**, 4:S7-S18, 2002.
- STERANCKA, L.R., MANNING, D.C., DEHAAS C., FERKANY, J.W., BOROSKY, S.A., CONNOR, J.R., *et al* Bradykinin as a pain mediator: receptor are localized to sensory neurons and antagonists have analgesic actions. **Proc. Natl Acad Sci USA.**, 85: 3245-3249, 1988.
- STEWART, J. M., GERA, L., YORK, E. J., CHAN, D. C., BUNN, P. Bradykinin antagonist: present progress and future prospects. **Immunopharmacology.**, 43:155-161, 1999.
- STRENG T., TALO, A. ANDERSSON, K.E. Transmitters contributing to the voiding contraction in female rats, **BJU Int**; 94(6): 910-4, 2004.
- TAIWO, Y.O., LEVINE, J.D. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia. **Brain Res.** 458:402-406, 1988.

TAKAHARA, Y., MAEDA, M., NAKATANI, T., KIYAMA, H. Transient suppression of the vesicular acetylcholine transporter in urinary bladder pathways following spinal cord injury. **Brain Res**, 1137: 20-28, 2007.

THURET S., MOON L.D.F, GAGE F.H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. **Nature Neuroscience Review**, 7: 628-643, 2006.

UENO, A., DEKURA, E., KOSUGI, Y., YOSHIMURA, M., NARABA, H., KOJIMA, F., OH-ISHI, S. Effects of dexamethasone and protein kinase C inhibitors on the induction of bradykinin B1 mRNA and the bradykinin B1 receptor-mediated contractile response in isolated rat ileum. **Biochem. Pharmacol.**, 63: 2043–2053, 2002.

VANICKY I., URDZIKOVA L., SAGANOVA K., CIZKOVA D., GALIK J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. **J. Neurotrauma**, 18: 1399 – 1407, 2001.

VAVREK, R., STEWART, J. M. Competitive antagonist of bradykinin. **Peptides.**, 6:161- 164,1985.

VIZZARD, M.A. Changes in urinary bladder neurotrophic factor mRNA and NGF protein following urinary bladder dysfunction. **Exp. Neurol.**, 161:273-284, 2000.

_____ Neurochemical plasticity and the role of neurotrophic factors in bladder reflex pathways after spinal cord injury. In: **Progress in Brain Research**. Elsevier : Amsterdam, 97-115, 2006.

WEIN, A.J., ROVNER, E.S. Definition and epidemiology of overactive bladder. **Urology**, 60:7-12, 2002.

WERLE, E. TRAUTSCHOLD, I., LEYSATH, G. Isolierung und struktur des kalidin. **Hoppe-Seylers Z. Chem.** 326: 174-176, 1961.

WERLE, E., MAIER, L. Uber die chemische und pharmakologische unterscheidung von kallikrein verschieden herkunft. **Biochem. Z.**, 323: 279-288, 1952.

WOOD, M. R., KIM, J. J., HAN, W., DORSEY, B. D., HOMMICK, C. F., DIPARDO, R. M., *et al.* Benzodiazepines as potent and selective bradykinin B1 antagonists. **J. Med.Chem.**, 46:1803-1806, 2003.

YANG, X., TAYLOR, L., POLGAR, P. Mechanisms in the transcription regulation of bradykinin B1 receptor gene expression. **J. Biol. Hem.** 273:10763-10770, 1998.

YAMAGUCHI, O., HONDA, K., NOMIYA, M., SHISHIDO, K., KAKIZAKI, H., *et al.* Defining overactive bladder as hypersensitivity. **Neurology and Urodyn.**, 26:904-907, 2007.

- YAMAGUCHI, O. Antimuscarinics and Overactive Bladder: Other mechanisms of action. **Neurology and Urodyn.**, 29:112-115, 2010.
- YOSHIMURA, N., CHANCELLOR, M. Neurophysiology of lower urinary tract function and dysfunction. **Rev. Urol.**, 5: S3-S10, 2003.
- YOSHIMURA, N., KAIHO, Y., MIYAZATO, M., YONOKI, T., TAI, C., *et al.* Therapeutic receptor targets for lower urinary tract dysfunction. **Naunym-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, 377:437-448, 2008.
- ZHANG, Y., ADNER, M., CARDELL, L. O. Up-regulation of bradykinin receptors in a murine in vitro model of chronic airway inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, 489:117-126, 2004.

8 ANEXO A

Escala de atividade locomotora BBB
(BASSO et al., 1995)

Movimento do Membro Posterior						Posição do Tronco		Abdome	Movimento da Pata Dianteira				Pisada		C	Liberação dos Dedos		Posição Predominante da Pata			I a s t r a b i l i d a d e	Cauda		
Quadril		Joelho		Tornozelo		Lado	Apoio		Balanço	Apoio da Pata		Dorsal	Planta	E		D	E	D	E	D			E	D
E	D	E	D	E	D					Sem Suporte de Peso	Com Suporte de Peso													
0	0	0	0	0	0	E	D	Arrastando	E	D	E	D	E	D	0	0*	0*	I	I	I	Para Cima (elevada)			
S	S	S	S	S	S	Central	E								D	E	D	E	D	E		D	O	O
E	E	E	E	E	E			Alto	E	D	E	D	E	D							E		D	F

Rato: _____ Data / / 200 _____ Dias Pós-Operatório _____ Pontuação Esquerdo: _____ Direito: _____

Movimento	+	Pisada Dorsal > 4 passos da pata posterior	0	Nunca (0%)	I	Rotação Interna
0	Nenhum	* Liberação < 50%	O	Ocasional (< 50%)	E	Rotação Externa
S	Suave (discreto)	** Dedos Arrastando > 4 passos da pata posterior	F	Frequente (51-94%)	P	Paralelo
E	Extenso		C	Consistente (95-100%)		

Pontuação	Definições operacionais de categorias e atributos
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (<50% da amplitude) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou joelho.
2	Movimento extenso (>50% da amplitude) de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreto de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior.
8	Pedalada (movimento rítmico do membro posterior) sem suporte de peso <u>ou</u> apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional (0 – 50% do tempo), freqüente (50 – 94% do tempo) ou consistente (95 – 100% do tempo) com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
12	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação freqüente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície bem como antes de liberar os dedos no final da fase de apoio <u>ou</u> passada plantar

freqüente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.

15 Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.

16 Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.

17 Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos.

18 Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.

19 Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.

20 Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.

21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, a cauda consistentemente elevada.
----	--

DEFINIÇÕES

Discreta	Movimento parcial da articulação, inferior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Extensa	Movimento parcial da articulação, superior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Pedalada	Movimento rítmico do membro posterior no qual suas três articulações estão estendidas, em seguida completamente flexionadas e novamente estendidas, o animal geralmente inclina-se lateralmente, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, nenhum suporte de peso corpóreo é evidente por toda a pata posterior.
Sem suporte de peso	Nenhuma contração dos músculos extensores do membro posterior durante pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Com suporte de peso	Contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Passada plantar	A pata está em contato plantar com suporte de peso, em seguida ocorre o movimento do membro para frente até ser restabelecido o contato plantar com suporte de peso.

Passada dorsal	O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo do passo.
Coordenação dos membros anterior e posterior	Para todo o passo do membro anterior ocorre um passo do membro posterior e os membros posteriores se alternam.
Ocasional	Menos do que ou igual à metade das vezes, < ou igual a 50%.
Freqüente	Mais do que a metade, mas não sempre, 51 – 94%.
Consistente	Quase sempre ou sempre, 95 – 100%.
Instabilidade do tronco	Lateralização do peso que causa oscilação de um lado a outro ou colapso parcial do tronco
