



EDUARDO COSTA ALEXANDRE

**DISFUNÇÃO DO TRATO URINÁRIO INFERIOR EM
CAMUNDONGOS OBESOS E POTENCIAL TERAPÊUTICO DO
ATIVADOR DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL, BAY 60-2770**

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

EDUARDO COSTA ALEXANDRE

**DISFUNÇÃO DO TRATO URINÁRIO INFERIOR EM
CAMUNDONGOS OBESOS E POTENCIAL TERAPÊUTICO DO
ATIVADOR DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL, BAY 60-2770**

Orientador(a): Prof. Dr. Edson Antunes

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO EDUARDO
COSTA ALEXANDRE E ORIENTADO PELO PROF. DR. EDSON
ANTUNES.

Assinatura do Orientador

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Edson Antunes", written over a light gray grid background.

CAMPINAS
2014

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

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

Alexandre, Eduardo Costa, 1986-
AL27d Disfunção do trato urinário inferior em camundongos obesos e
potencial terapêutico do ativador da guanilato ciclase solúvel BAY 60-
2770 / Eduardo Costa Alexandre. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Edson Antunes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bexiga urinária hiperativa. 2. Uretra. 3. BAY 60-2770. 4.
Camundongos obesos. I. Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Role of oxidative stress and soluble guanylate cyclase
degradation in micturition dysfunction of insulin resistant obese mice

Palavras-chave em inglês:

Urinary bladder,

Overactive Urethra

BAY 60-2770

Mice, Obese

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]

Cássio Luiz Zanettini Riccetto

Gerson Jhonatan Rodrigues

Data de defesa: 04-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

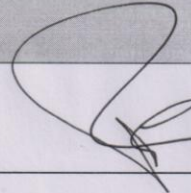
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

EDUARDO COSTA ALEXANDRE

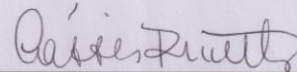
Orientador (a) PROF(A). DR(A). EDSON ANTUNES

MEMBROS:

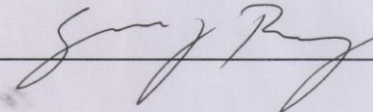
1. PROF(A). DR(A). EDSON ANTUNES



2. PROF(A). DR(A). CÁSSIO LUÍS ZANETTINI RICCETTO



3. PROF(A). DR(A). GERSON JHONATAN RODRIGUES



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

Data: 04 de junho de 2014

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai, Antônio Carlos, que com sua sabedoria sempre me
guiou aos melhores caminhos.*

*A minha mãe, Neusa Maria, quem me espelha e sempre apoiou
minhas escolhas.*

A meu irmão, Alvaro, pela amizade que só pode vir de um irmão.

*A minha namorada, Bárbara, pelo seu companheirismo e carinho
nos momentos difíceis.*

AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador,
Prof. Dr. Edson Antunes,
Agradeço por sua orientação; tenho absoluta certeza que te
levarei para minha vida como um exemplo de professor e
pesquisador.*

Aos amigos da cascata, Luiz Osório Silveira Leiria, Fábio Henrique da Silva, Fabiano Calmasini, Celso Saragossa Filho, Julio Rojas, Fernanda Dell, Fernando Báu, Lorenzo Pincinatti, Paulo Gonzales, Tuany Candido, Fabiano Calmasini, Marcy Pereira, Renan Shaka, Rafael Campos, Carmem Peres, Renata Lopes, Camila Fernandes pela amizade e companhia diária, pelo respeito e ajuda indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de laboratório Marina Calixto, Edith Bastos, Diana Majolli, Dalize Squebola, Lineu Baldissera, Gláucia Mello, Gisele Goulart, Carolina Solon, Ana Carolina Naime, Maria Elisa Pires, e Camila Mendes.

Aos professores e pesquisadores Fabíola Mónica, Maria Andréia Delbin, Gabriel Anhô, Stephen Hyslop, Ellen Landucci e Mário Claudino.

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

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado Acadêmico.

RESUMO

Estudos clínicos vêm relacionando a síndrome metabólica / obesidade a sintomas do trato urinário inferior, também referidos como LUTS (da sigla *Lower Urinary Tract Symptoms*), os quais compreendem diversas queixas relacionadas a problemas de armazenamento e/ou esvaziamento da bexiga urinária. Estes sintomas acometem milhares de pessoas em todo o mundo, estando relacionados à frequência, urgência e noctúria, e frequentemente associados à bexiga hiperativa, que pode evoluir para incontinência urinária. O trato urinário inferior (TUI) é composto basicamente pela bexiga e uretra. A dinâmica vesicoesfincteriana compreende duas fases: Fase de armazenamento e Fase de eliminação. Estes processos envolvem uma sincronia de ações do músculo liso detrusor e uretra para um correto ciclo miccional. Apesar dos estudos epidemiológicos apontarem para uma correlação positiva entre síndrome metabólica/obesidade e LUTS, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos permanecem pouco compreendidos. Portanto, utilizando um modelo animal de obesidade associada à bexiga hiperativa, procuramos analisar as alterações causadas pela obesidade no trato urinário inferior antes e após o tratamento com o ativador da GCs, BAY 60-2770. O BAY 60-2770 faz parte de uma nova classe de drogas, denominadas ativadores da GCs. Essas drogas são capazes de ativar a GCs de maneira independente do NO e/ou grupamento heme, e apresentam uma potência aumentada quando o ferro se encontra em sua forma oxidada (Fe^{3+}). Especificamente, realizamos os seguintes experimentos em camundongos controles e obesos: 1) cistometria; 2) curvas concentração-resposta a diferentes agentes contráteis e relaxantes na bexiga e/ou uretra; 3) determinação dos níveis de GMPc; 4) expressão das subunidades de α_1 e/ou β_1 da GCs; 5) medida das espécies reativas de oxigênio. O camundongo obeso apresentou um padrão miccional irregular caracterizado pelo aumento do número de contrações miccionais e de contrações involuntárias, alterações normalizadas após o tratamento com BAY 60-2770. Na bexiga, o carbacol, KCl e $CaCl_2$ produziram contrações de forma concentração-dependente em tiras isoladas de bexiga, contrações que foram maiores em animais obesos quando comparado aos controles. O tratamento com BAY 60-2770 normalizou as contrações da bexiga em animais obesos. Um aumento de 78% nas espécies reativas de oxigênio foi observado em bexigas de animais obesos, resultado não alterado pelo BAY 60-2770. O tratamento com BAY 60-2770 gerou um aumento de 10 vezes nos níveis de GMPc em bexiga de animais obesos, sem afetar a produção desse nucleotídeo cíclico nos animais controles. A expressão protéica das subunidades α_1 e β_1 da GCs estava 40% diminuída em bexiga de animais obesos, esse resultado foi normalizado após o tratamento com BAY 60-2770. Em uretra, relaxamentos induzidos por NO (nitrito de sódio acidificado), doadores de NO (s-nitrosoglutationa e nitroglicerina) e BAY 41-2272 (estimulador da GCs) se apresentaram reduzidos em obeso quando comparado ao grupo controle. O relaxamento uretral por BAY 60-2770 apresentou um padrão diferente e foi 43% maior em camundongos obesos, resultado acompanhado pelo aumento nos níveis de GMPc. A oxidação da GCs potencializou o relaxamento uretral induzido por BAY 60-2770. O tratamento crônico reverteu completamente as disfunções uretrais dos animais obesos. A produção de espécies reativas de oxigênio estava aumentada e a expressão da subunidade β_1 da GCs diminuída na uretra do animal obeso, ambas as alterações foram revertidas pelo tratamento com BAY 60-2770. Concluímos então que as contrações aumentadas da bexiga e a disfunção no relaxamento uretral estão associadas com a

produção de espécies reativas de oxigênio e “downregulation” da sinalização GCs – GMPc. A prevenção da degradação da GCs pelo tratamento crônico com BAY 60-2770 melhora as disfunções miccionais de camundongos obesos. Portanto, o BAY 60-2770 pode ser de grande valor terapêutico no tratamento de complicações urológicas associadas à obesidade.

Palavras-chave: Uretra. Bexiga. BAY60-2770. Bexiga hiperativa. Obesidade. LUTS. ERO.

ABSTRACT

Clinical studies have shown an association between metabolic syndrome / obesity and lower urinary tract symptoms (LUTS), name given to a group of symptoms affecting the bladder during urine storage and voiding. These symptoms affect thousands of people throughout the world and are related with frequency, urgency, nocturia and often associated with overactive bladder (OAB), which may result in urinary incontinence. The low urinary tract consists of the bladder and urethra. Vesical sphincter dynamics is divided into two phases: storage and voiding phase. Each phase requires a coordinated interaction between urethra and bladder to allow a healthy urinary function. Despite epidemiological studies suggest a positive correlation between metabolic syndrome / obesity and LUTS, its pathophysiological mechanisms are still poorly studied. Therefore, using an animal model of obesity associated OAB we studied low urinary tract before and after treatment with the sGC activator BAY 60-2770. BAY 60-2770 is a novel class of drugs, classified as soluble guanylyl cyclase (sGC) activators. This class of drugs acts by NO- and heme-independent mechanisms and present a higher potency to oxidated form of sGC heme iron (Fe³⁺). More specifically we conducted the following experiments: 1) cystometry; 2) concentration – response curves to contractile and relaxing agents in bladder and/or urethra; 3) determination of cGMP levels; 4) evaluated expressions of $\alpha 1$ and/or $\beta 1$ sGC subunits; 5) measurement of reactive oxygen species. Obese mice displayed an irregular micturition pattern characterized by significant increases in voiding and non-voiding contractions, both of which were normalized by BAY 60-2770 treatment. In the bladder, carbachol, KCl and CaCl₂ produced concentration-dependent contractions in isolated bladder strips that were markedly greater in obese compared with control group. BAY 60-2770 treatment normalized the bladder contractions in obese group. A 78% increase in reactive-oxygen species (ROS) generation in bladder tissues of obese mice was observed, and that was unaffected by BAY 60-2770. Treatment with BAY 60-2770 generated a 10-fold increase in GMPc levels in bladder from obese mice, without affecting this nucleotide level in lean group. Protein expression of $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits of sGC was decreased by 40% in bladder tissues of obese animals, which was restored by BAY 60-2770. In the urethra, relaxations induced by NO (acidified sodium nitrite), NO-donors (S-nitrosolutathione and glyceryl trinitrate) and BAY 41-2272 (sGC stimulator) were markedly reduced in obese compared with control mice. As opposed, urethral relaxations induced by BAY 60-2770 were 43% greater in obese mice, which was accompanied by increases in cGMP levels. Oxidation of sGC with potentiated BAY 60-2770-induced USM responses in control group. Long-term oral BAY 60-2770 administration fully prevented the impairment of urethral relaxations in obese mice. Reactive-oxygen species (ROS) production was enhanced, whereas protein expression of $\beta 1$ sGC subunit was reduced in USM from obese mice, both of which were restored by BAY 60-2770 treatment. In conclusion, enhanced bladder contractions and impaired urethral relaxations in obese mice are associated with ROS generation and downregulation of sGC- cGMP signaling. Prevention of sGC degradation by long-term BAY 60-2770 administration ameliorates the micturition dysfunction in obese mice. Therefore, BAY 60-2770 could be of great therapeutic value in the treatment of urological complications associated with obesity.

Keywords: Urethra. Bladder. BAY60-2770. OAB. Obesity. LUTS. ROS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático da bexiga (detrusor e trígono) e da saída da bexiga (uretra, orifícios ureterais, esfíncteres internos e externos).....	37
Figura 2. Mecanismos reflexos das fases de armazenamento e eliminação.....	39
Figura 3. Traçados de cistometria (painel superior) e de eletromiograma do esfíncter (EMG; painel inferior) em humano saudável.....	40
Figura 4. Traços cistométricos representativos dos grupos controle (A) e obeso (B)....	70
Figura 5. Parâmetros cistométricos obtidos de camundongos controle e obesos.....	71
Figura 6. Curvas concentração resposta ao carbacol (A), cloreto de cálcio (CaCl ₂ ; B) e cloreto de potássio (KCl; C) em bexiga de camundongo controle e obeso.....	72
Figura 7. Curvas concentração-resposta ao nitrito de sódio acidificado (NaNO ₂ , A), S-nitrosoglutaciona (SNOG, B) e gliceril trinitrato (GTN, C) em uretra de camundongos controle e obesos, com e sem pré-incubação com ODQ (10 µM).....	74
Figura 8. Relaxamento uretral por estimulação (A; BAY 41-2272) ou ativação (B; BAY 60-2770) da guanilato ciclase solúvel em uretra de camundongo controle e obeso, com e sem pré-incubação com ODQ (10 µM).....	76
Figura 9. Curvas concentração resposta ao tadalafil (A) e 8-BR-GMPc (B) em uretra de camundongos controle e obesos.	77
Figura 10. Níveis de GMPc em uretra de camundongos controle e obesos.....	78
Figura 11. Níveis de GMPc em bexiga de camundongos controle e obesos.....	78
Figura 12. Imagens representativas de western blotting da expressão protéica das subunidades β1 em uretra (A) e subunidades α1 e β1 em bexiga (B e C) de camundongos controle e obesos.	80

Figura 13. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) medidas por fluorescência pela marcação com hidroetidina de uretra (A e B) e bexiga (C e D) de camundongos controle e obeso.....	82
Figura 14. Traçados cistométricos representativos dos grupos controle + veículo (A), obeso + veículo (B) e obeso + BAY 60-2770 (C).	85
Figura 15. Parâmetros cistométricos obtidos de camundongos controle e obesos, tratados ou não com BAY 60-2770 (1 mg/Kg/dia).....	86
Figura 16. Curvas concentração-resposta ao carbacol (A), cloreto de cálcio (CaCl ₂ ; B) e cloreto de potássio (KCl; C) em bexiga de camundongo controle e obeso, tratados ou não com BAY 60-2770 (1 mg/kg/dia).....	87
Figura 17. Curvas concentração resposta ao nitrito de sódio acidificado em uretra de camundongos controle e obesos, tratados ou não cronicamente com BAY 60-2770 (1 mg/kg/dia).....	88
Figura 18. Níveis de GMPc após o tratamento crônico com BAY 60-2770 (1 mg/kg/dia) em bexiga de camundongos controle e obesos.....	89
Figura 19. Imagens representativas de western blotting da expressão protéica das subunidades β 1 em uretra (A) e subunidades α 1 e β 1 em bexiga (B e C) de camundongos controle e obesos após o tratamento crônico com BAY 60-2770 (1 mg/kg/dia).	90
Figura 20. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) medidas por fluorescência pela marcação com hidroetidina em uretra (A e B) e bexiga (C e D) de camundongos controle e obesos tratados ou não com BAY 60-2770 (1 mg/kg/dia).	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimuladores e ativadores da GCs.	45
Tabela 2. Composição da dieta experimental.	58
Tabela 3. Valores de peso corporal, peso da gordura epididimal, glicose e perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total, LDL) de camundongos controle e obesos. Os resultados são expressos como media \pm EPM para 5-8 animais. *P <0,05.	69
Tabela 4. Valores de Resposta máxima (E_{max}) e potência (pEC_{50}) das curvas concentração-resposta de relaxamento ao NaNO ₂ , SNOG e GTN em musculatura lisa uretral. Foram utilizados camundongos controle e obesos incubados ou não previamente com ODQ (10 μ M).	73
Tabela 5. Valores de Resposta máxima (E_{max}) e potência (pEC_{50}) das curvas concentração-resposta de relaxamento ao BAY 41-2272 e BAY 60-2770 em musculatura lisa uretral de camundongos controles e obesos, na ausência e na presença de ODQ (10 μ M).	75
Tabela 6. Valores de peso corporal, peso da gordura epididimal, níveis de glicose e perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total e LDL) de camundongos controle e obesos, tratados ou não com BAY 60-2770 (1 mg/Kg/dia, 2 meses).	84

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIAS	FABRICANTE	ORIGEM
CaCl ₂	Merck	Darmstadt, Alemanha
HCl	Merck	Darmstadt, Alemanha
KCl	Merck	Darmstadt, Alemanha
KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt, Alemanha
MgSO ₄	Merck	Darmstadt, Alemanha
NaCl	Merck	Darmstadt, Alemanha
Carbacol	Sigma	St. Louis, LO, EUA
ODQ	Sigma	St. Louis, LO, EUA
Tadalafil	Biolab Pharma	São Paulo, SP, Brasil
BAY 41-2272	Bayer	Leverkusen, Alemanha
BAY 60-2770	Bayer	Leverkusen, Alemanha
Nitrito de sódio	Sigma	St. Louis, LO, EUA
S-nitrosoglutaciona	Sigma	St. Louis, LO, EUA
Gliceril trinitrato	Sigma	St. Louis, LO, EUA
8-Br-GMPc	Sigma	St. Louis, LO, EUA
Uretana	Sigma	St. Louis, LO, EUA
Hidroetidina	Sigma	St. Louis, LO, EUA
Isoflurano	Cristália	Itapira, SP, Brasil

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

NOR: adrenalina

AMPc: monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA: análise de Variância

ATP: trifosfato de adenosina

Ca²⁺: cálcio

CaCl₂: cloreto de cálcio

CCh: carbacol

DAG: diacilglicerol

DM2: diabetes mellitus tipo 2

E.P.M.: erro padrão da média

E_{max}: resposta máxima

GTN: gliceril trinitrato

IP₂: difosfato de inositol

IP₃: inositol trifosfato

LUTs: sintomas do trato urinário inferior

M2: receptores muscarínicos M2

M3: receptores muscarínicos M3

MLC: cadeia leve miosina

MLCK: quinase da cadeia leve de miosina

MLC-P: fosforilação da cadeia leve miosina

NANC: não adrenérgico não colinérgico

NO: óxido nítrico

P2X₁: receptores purinérgicos

P2Y: receptores purinérgicos PAG: zona periaqueductal

PDE: fosfodiesterase

PDE5: fosfodiesterase tipo 5

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

PKA: proteína quinase A
PKC: proteína quinase C
PLC: fosfolipase C
ROS: espécies reativas de oxigênio
sGC: guanilato ciclase solúvel
SNOG: S-nitrosoglutathione
SR: retículo sarcoplasmático
 β_3 : receptor beta-3 adrenérgico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1 OBESIDADE E SISTEMA URINÁRIO.....	35
1.2 FISILOGIA DA MICÇÃO	36
1.2.1. Anatomia do Trato Urinário Inferior (TUI).....	36
1.2.2. Controle Neural e Ciclo Miccional.....	38
1.2.3 Sinalização da Maquinaria Contrátil e Relaxante na Bexiga e Uretra Durante o Ciclo Miccional.....	41
1.2.4. Síndrome da Bexiga Hiperativa	45
1.2.5. Síndrome Metabólica/Obesidade e Estresse Oxidativo	47
1.2.6. Obesidade, Estresse Oxidativo e Sintomas do Trato Urinário Inferior.....	50
JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	53
OBJETIVO	54
Objetivo Geral.....	54
Objetivos específicos	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	57
2.2. TRATAMENTO ORAL COM BAY 60-2770	58
2.3. MEDIDA DO PERFIL LIPÍDICO	58
2.4. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FUNCIONAIS	59

2.4.1. Cistometria.....	59
2.4.2. Preparação do Músculo Liso da Uretra <i>in vitro</i>	60
2.4.3. Preparação do Músculo Liso Detrusor <i>in vitro</i>	61
2.5. DETERMINAÇÃO DE MEDIDAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES	63
2.5.1. Determinação dos níveis de GMPc.....	63
2.5.2. Western Blotting de Bexiga Urinária e Uretra.....	63
2.5.3. Medida de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	64
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
3. RESULTADOS	67
3.1. PRIMEIRA PARTE.....	69
3.1.1. Características Gerais	69
3.1.2. Parâmetros Funcionais	70
3.1.2.1. Parâmetros Cistométricos.....	70
3.1.2.2. Reatividade do Músculo Liso Detrusor <i>in vitro</i>	71
3.1.2.3. Reatividade do Músculo Liso da Uretra <i>in vitro</i>	72
3.1.3. Determinação de medidas bioquímicas e moleculares	77
3.1.3.1. Níveis de GMPc	77
3.1.3.2. Western Blotting para GCs (Subunidades α_1 e β_1).....	79
3.1.3.3. Espécies Reativas de Oxigênio	81
3.2. SEGUNDA PARTE.....	83

3.2.1. Características Gerais	83
3.2.2. Parâmetros Funcionais	84
3.2.2.1. Parâmetros Cistométricos.....	84
3.2.2.2. Reatividade do Músculo Liso Detrusor in vitro.....	86
3.2.2.3. Reatividade do Músculo Liso da Uretra in vitro.....	87
3.2.3. Determinação de medidas bioquímicas e moleculares	89
3.2.3.1. Níveis de GMPc e bexiga.....	89
3.2.3.2. Western Blotting para GCs (Subunidades α_1 e β_1).....	90
3.2.3.3. Espécies Reativas de Oxigênio	91
4. DISCUSSÃO	93
5. SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E SISTEMA URINÁRIO

O excesso de peso é sabidamente um dos mais importantes fatores de risco para a morbi-mortalidade de doenças cardiovasculares e diabetes, causando a morte de aproximadamente 3 milhões de pessoas por ano no mundo. Em 2008, estimou-se que 1,48 bilhões de adultos no mundo possuíam índice de massa corporal (IMC) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$, sendo que mais de 200 milhões de indivíduos já eram considerados obesos (1). Conforme a ciência avança sobre o conhecimento da obesidade, novas comorbidades são relatadas. Pesquisas clínicas recentes têm também relacionado a síndrome metabólica / obesidade a sintomas do trato urinário inferior, também referidos como LUTS (da sigla *Lower Urinary Tract Symptoms*), os quais compreendem diversas queixas relacionadas a problemas de armazenamento e/ou esvaziamento da bexiga urinária (2, 3). Estes sintomas acometem milhares de pessoas em todo o mundo, homens e mulheres, estando relacionados a frequência, urgência e noctúria, e frequentemente associados a bexiga hiperativa, que pode evoluir para incontinência urinária (4, 5). De modo geral, o LUTS têm um impacto negativo sobre a qualidade de vida do paciente. No Brasil, estudo epidemiológico envolvendo 848 indivíduos (mulheres e homens) mostrou que 18,9% apresentam sintomas de bexiga hiperativa associada a má qualidade de sono e de vida social e sexual, assim como a depressão e cansaço (6).

1.2 FISILOGIA DA MICÇÃO

A bexiga, a uretra e os esfíncteres, assim como a inervação autonômica e somática e seus neurotransmissores são peças fundamentais para a fisiologia de micção (7).

1.2.1. Anatomia do Trato Urinário Inferior (TUI)

O TUI é composto basicamente pela bexiga e uretra. A bexiga é dividida em duas regiões distintas, a saber: uma ampla região localizada acima dos orifícios dos ureteres, denominada “corpo da bexiga”, formado pela parede da bexiga e uma região menor, abaixo dos orifícios ureterais, denominada “base da bexiga”, que é formada pelo músculo trígono, pela junção uretrovesical e pela parede anterior da bexiga (8). A parede da bexiga é formada por uma camada mucosa interna denominada urotélio e outra camada de musculatura lisa denominada detrusor, sendo esta recoberta externamente pela fáscia. O urotélio é uma camada epitelial composta por uma camada de células basais, uma camada celular intermediária e uma camada celular superficial formada por células hexagonais denominadas “células guarda-chuva” (*umbrella cells*) (9) (Figura 1).

A uretra se estende do orifício uretral interno ao externo, sendo formada por três camadas musculares: uma camada longitudinal espessa e mais interna de musculatura lisa, uma camada circular delgada e central de musculatura lisa e uma camada mais externa de músculo estriado, também chamada de rabdoesfíncter. As três camadas são ativas na manutenção do tônus muscular durante a fase de enchimento bem como no relaxamento durante a fase de esvaziamento da bexiga (10). A maior diferença anatômica entre homens e mulheres reside na uretra, que em homens é mais longa e possui a próstata em sua porção

proximal (8).

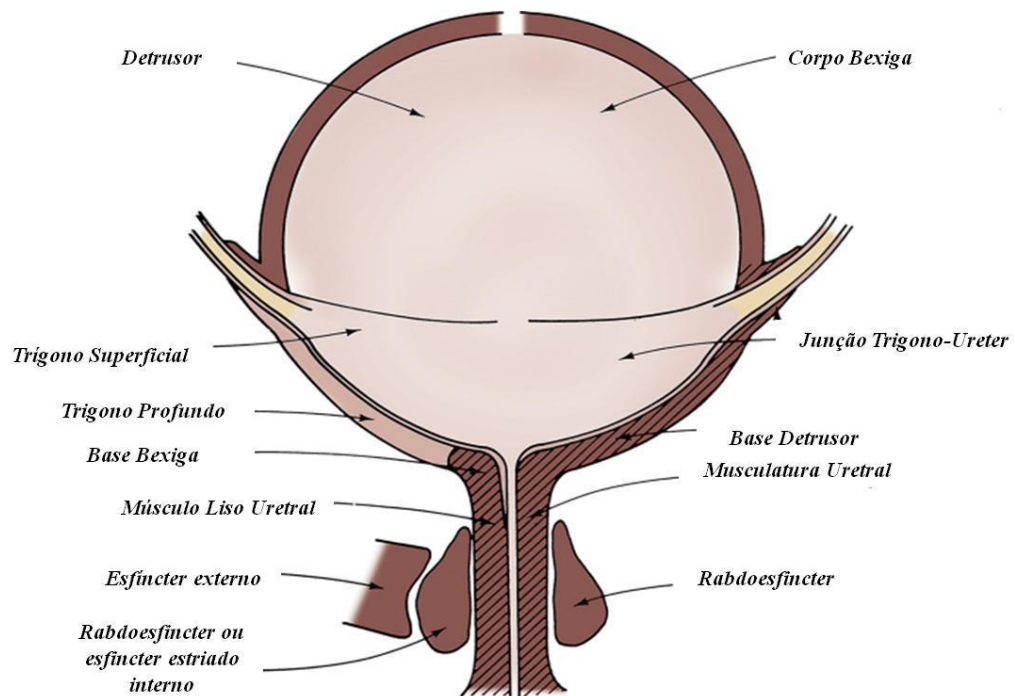


Figura 1. Desenho esquemático da bexiga (detrusor e trigono) e da saída da bexiga (uretra, orifícios ureterais, esfíncteres internos e externos).

Fonte: Segundo Gosling *et al*, 1977 (11) (legenda à esquerda) versus Elbadawi, 1984 (12) (legenda à direita).

1.2.2. Controle Neural e Ciclo Miccional

A dinâmica vesicoesfincteriana compreende duas fases: Fase de armazenamento e Fase de eliminação. Estes processos envolvem uma sincronia de ações do músculo liso detrusor e uretra, cuja função principal é manter a continência urinária através da contração na fase de armazenamento e de relaxamento na fase de eliminação. As fibras musculares do detrusor são capazes de relaxar simultaneamente à contração da uretra, permitindo um aumento do volume da bexiga, sem aumento concomitante da pressão intra-vesical, e de contrair de modo coordenado com o relaxamento da uretra, gerando a pressão necessária para liberar a urina (7, 13).

O controle da função miccional é feito principalmente pelo sistema nervoso autônomo. O trato urinário inferior é inervado pelos nervos parassimpático (pélvico), simpático (hipogástrico) e somático (pudendo). Os nervos pélvicos e hipogástricos localizam-se na região sacral e lombar, respectivamente (7). O plexo pélvico, quando ativado, promove contração do corpo da bexiga, aumentando a pressão intravesical e relaxando a uretra (7, 14, 15). A ativação do hipogástrico, por sua vez, relaxa o corpo da bexiga e contrai a uretra (15) (Figura 2). O nervo pudendo, quando ativado, contrai o esfíncter uretral externo (16) (Figura 3).

Na fase de armazenamento, a pressão intravesical, em humanos e animais, mantém-se baixa e constante (Figura 3). A acomodação da urina durante esta fase é um processo passivo, e depende das propriedades da musculatura lisa e da inibição da atividade eferente parassimpática. A distensão das fibras musculares resultante do aumento do volume intravesical ativa as fibras simpáticas as quais fecham a uretra e o esfíncter interno permitindo o armazenamento da urina. Durante esta fase, a atividade do esfíncter uretral

externo está aumentada, refletindo aumento da atividade somática e conseqüente resistência da saída da bexiga, contribuindo para o processo de continência (17, 18) (Figuras 2 e 3).

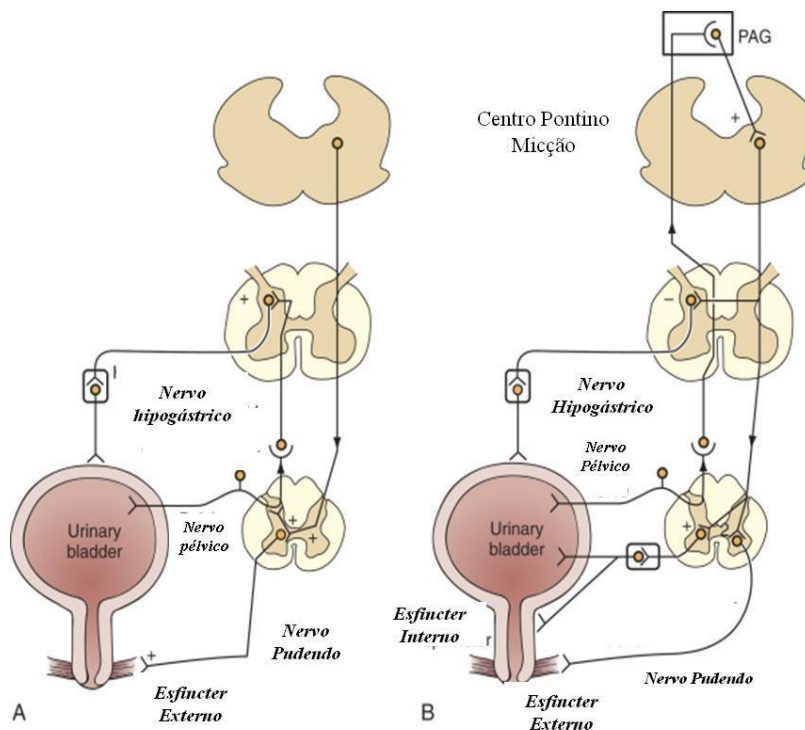


Figura 2. Mecanismos reflexos das fases de armazenamento e eliminação.

(A) Reflexos da fase armazenamento: durante a fase de armazenamento há a ativação de fibras nervosas simpáticas (hipogástrico) e somáticas (pudendo), que, quando ativadas, promovem o fechamento da saída da bexiga (base e uretra) assim como do esfíncter uretral externo. (B) Reflexos da fase de eliminação: o início da micção aumenta a atividade visceral aferente, a qual ativará o centro da micção (centro pontino de micção), promovendo assim inibição das vias simpáticas e somáticas. O centro pontino estimulará as fibras nervosas eferentes parassimpáticas (pélvico) que inervam tanto a bexiga como a uretra. PAG: zona periaquedutal (19).

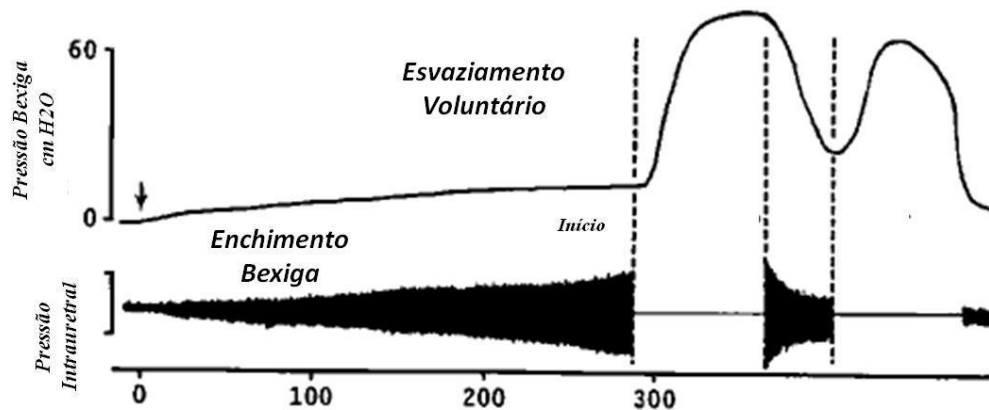


Figura 3. Traçados de cistometria (painel superior) e de eletromiograma do esfíncter (EMG; painel inferior) em humano saudável. O eixo x representa volume (mL) e o eixo y representa a pressão intravesical (cmH₂O) e pressão intrauretral. A seta à esquerda representa o início da infusão de salina na bexiga (enchimento bexiga). As linhas verticais indicam o início e o término do relaxamento do esfíncter (17).

Uma vez atingida a capacidade máxima da bexiga, os receptores sensíveis às variações de pressão, presentes no interior do detrusor, emitem sinais aos centros corticais do cérebro para iniciar a fase de eliminação, que compreenderá a contração do músculo detrusor e relaxamento uretral. Para iniciar o processo da micção é necessário que o córtex cerebral reconheça o desejo de urinar e decida o momento de esvaziar a bexiga. Quando tal desejo é devidamente reconhecido, a uretra relaxa, diminuindo a resistência ao fluxo (20); conseqüentemente, a bexiga libera o seu conteúdo sob controle voluntário, através de uma atividade coordenada do músculo detrusor e da uretra. O detrusor se contrai em resposta à estimulação dos receptores muscarínicos, e a uretra relaxa em resposta, principalmente, à ação do óxido nítrico (NO) (21-24). Assim, o reflexo da micção é completamente autônomo por parte da medula espinhal, mas pode ser voluntariamente facilitado ou inibido

por centros cerebrais (25).

1.2.3 Sinalização da Maquinaria Contrátil e Relaxante na Bexiga e Uretra Durante o Ciclo Miccional

Como referido acima, o processo de armazenamento de urina compreende o relaxamento do detrusor e a contração da uretra, impedindo o esvaziamento. No músculo detrusor, a noradrenalina interage com receptores β -adrenérgicos, promovendo o relaxamento muscular e redução da pressão intravesical, ao passo que na uretra a noradrenalina interage com receptores α -adrenérgicos, levando à contração dessa estrutura.

Os receptores β -adrenérgicos, quando ativados, levam à ativação da adenilil ciclase induzindo acúmulo de AMPc, que, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA). Esta proteína promove a fosforilação da quinase de cadeia leve de miosina (MLCK; *myosin light-chain kinase*), levando à inativação da mesma, que resulta em aumento da recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático por meio da fosforilação da fosfolambana (26, 27). Sabe-se também que a ativação de receptores β -adrenérgicos pode promover o relaxamento do detrusor por mecanismos independentes de AMPc, como por exemplo a ativação de canais de potássio (28). O subtipo de β -adrenoceptor responsável pelo relaxamento do músculo detrusor depende da espécie animal. Os três subtipos (β_1 , β_2 e β_3) são expressos em detrusor de ratos, ao passo que em humanos, a proporção de β_1 , β_2 e β_3 , é de 1,5%, 1,4% e 97%, respectivamente, sendo o relaxamento mediado principalmente pelos receptores β_3 (29, 30). Os receptores β_2 e β_3 são igualmente responsáveis pelo relaxamento do detrusor em ratos; porém, em coelhos, os receptores β_2 desempenham maior participação nas respostas relaxantes quando comparados aos β_3 (31).

Diferentemente de coelhos, a ativação de receptores β_3 em cães promove relaxamento cerca de 10 vezes maior que a ativação do receptor β_2 (31). Existem poucas informações sobre os receptores β -adrenérgicos em uretra, mas sabe-se que os mesmos estão presentes neste tecido, mediando relaxamento tecidual (32).

A contração da uretra se dá pela ativação de receptores α -adrenérgicos, principalmente α_{1A} , que está acoplado à proteína G cuja sinalização envolve ativação da fosfolipase C, hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (IP2) para inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O DAG ativa a PKC que catalisa a fosforilação de várias proteínas intracelulares fazendo com que ocorra também a entrada de cálcio extracelular através de canais de Ca^{2+} do tipo L. O IP3 atua em receptores específicos no retículo sarcoplasmático, estimulando a liberação de cálcio. O cálcio se liga à calmodulina, e este complexo, por sua vez, ativa a MLCK. Esta enzima ativada leva à fosforilação da cadeia leve da miosina, promovendo consequentemente a contração deste tecido (32).

No processo de eliminação da urina, a contração do músculo liso da bexiga é mediada predominantemente pela ativação de receptores muscarínicos que se faz de forma coordenada com o relaxamento da uretra, este dependente de NO nitrérgico (33). A resposta contrátil decorrente da estimulação muscarínica é evocada principalmente pela ativação de receptores muscarínicos M3 (34, 35). Os mecanismos intracelulares observados na resposta contrátil pela ACh incluem a ativação da fosfolipase C, com formação de IP3 e DAG, levando ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio (15). Subseqüentemente, o cálcio se liga à calmodulina, que ativa a MLCK, levando ao aumento expressivo de fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC20). Durante este processo, a MLC20 fosforilada interage com a α -actina resultando na contração do músculo liso (36). O

aumento dos níveis de cálcio citosólico resultam de sua mobilização a partir do retículo sarcoplasmático e/ou de seu influxo através de canais de cálcio presentes na membrana celular. O influxo extracelular de cálcio se reveste de grande importância nas respostas contráteis, visto que as mesmas deixam de ser observadas com o uso de bloqueadores de canais de cálcio dependentes de voltagem. De forma semelhante, o papel da PKC na contratilidade do músculo liso da bexiga e uretra também permanece incerto, pois grande parte dos estudos indica que esta proteína não tem influência direta na potência ou eficácia em respostas contráteis mediadas por estimulação de receptores muscarínicos (37, 38). Estudo do nosso grupo mostrou que existe aumento na expressão de PKC em detrusor de camundongos obesos resistentes à insulina (39). Portanto, a PKC parece ser importante durante a fase de contração de ambos, podendo atuar conjuntamente com a Rho-quinase para mediar a resposta contrátil (40, 41).

Nas últimas duas décadas têm se estudado no TUI as vias purinérgicas, destacando-se os receptores P2X1, ativados pelo ATP. As contrações induzidas por estímulo elétrico em bexigas urinárias não são exclusivamente de natureza colinérgica. Estas contrações são parcialmente mimetizadas pela administração exógena de ATP, e, por isso, acredita-se que o ATP seja o principal mediador responsável pelo componente NANC-excitatório neste tecido (42). As contrações induzidas pelo ATP no detrusor envolvem duas famílias de receptores purinérgicos: um ligado ao canal iônico (P2X), que promove o influxo de cálcio extracelular, e outro acoplado à proteína-G (P2Y) que atua via fosfolipase C/IP3 e liberação de cálcio extracelular (43). Ainda não é claro se os receptores purinérgicos são encontrados em uretra e a função dos mesmos neste tecido (44).

O relaxamento uretral se dá principalmente pela liberação de NO de fibras

nitrérgicas. O NO ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), um heterodímero que consiste nas subunidades α e β ; ambos apresentam um domínio homólogo que constitui o centro catalítico responsável por gerar o GMPc. A GCs também possui um grupamento heme que é ligado a um resíduo de histidina da subunidade β , necessário para a ativação da enzima pelo NO. Esse grupamento heme é sensível às alterações do equilíbrio oxidativo da célula, e quando o ferro é oxidado (de Fe^{2+} para Fe^{3+}) a enzima fica insensível ao NO (45). A droga mais utilizada em estudos para mimetizar esse efeito oxidativo é o ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo [3,4-a]quinoxalin-1-one) (46). A ligação do NO permite uma mudança conformacional na enzima, induzindo a formação do segundo-mensageiro, GMPc, e ativação da proteína quinase dependentes de GMPc (PKG) que regula vários processos fisiológicos, incluindo tónus do músculo liso (47). Estudos prévios mostraram que drogas que aumentam as concentrações intracelulares de GMPc relaxam o trato urinário inferior, incluindo detrusor e uretra (48, 49). A inativação do GMPc ocorre através da ação da fosfodiesterase-5 (PDE5). Outros autores reportaram a presença da PDE-5 em próstata, bexiga e uretra de rato, sugerindo que a via do GMPc contribui também para a manutenção do tónus relaxante do TUI (50-52).

Dois grupos de pequenas moléculas são capazes de ativar a GCs independentemente do NO, e vem sendo empregados como valiosas ferramentas para elucidar alterações nessa enzima. São os chamados “estimuladores” e “ativadores” da GCs (53). O YC-1, derivado indazol, foi o primeiro estimulador descrito da GCs. A otimização química desta molécula levou ao descobrimento do BAY 41-2272, composto que apresenta maior especificidade e potência ao estimular a GCs, além de possuir forte sinergismo quando combinado com NO (54). A ativação da GCs pelo BAY 41-2272 requer que o ferro presente no grupamento prostético dessa enzima esteja em seu estado reduzido (Fe^{2+}), semelhante à ativação do NO

(55). Estudo prévio mostrou que o BAY 41-2272 é capaz de relaxar diferentes tipos de musculatura lisa, incluindo detrusor isolado de ratos, coelhos e camundongos (56). Este composto também é capaz de prevenir a disfunção vesical em modelo de bloqueio crônico de NO em ratos (57). Em 2002, o BAY 58-2667 foi apresentado pela *Bayer* como um “ativador” da GCs, uma vez que apresentou características diferentes dos estimuladores. Os ativadores, incluindo o BAY 60-2770, são capazes de ativar a GCs de maneira independente do NO e/ou grupamento heme, e apresentam uma potência maior quando o ferro se encontra em sua forma oxidada (Fe^{3+}) (58) (Tabela 1)

Tabela 1. Estimuladores e ativadores da GCs.

Estimuladores	Ativadores
YC - 1	BAY 58 – 2667 (cinaciquat)
BAY 41 - 2272	BAY 60 - 2770
BAY 41 - 8543	HMR - 1766
BAY 63 – 2521 (riociguat)	A - 778935
CFM - 1571	
A - 350619	

Fonte: Adaptado de Gur S, 2010(59).

1.2.4. Síndrome da Bexiga Hiperativa

Os problemas para estocar a urina são resultantes de fatores complexos, gerando os chamados “sintomas do trato urinário inferior”, também referidos como LUTS. Esta é uma condição que afeta milhões de pessoas em todo mundo, cujos sinais e sintomas incluem urgência miccional, alterações da frequência e hiperatividade vesical, podendo levar a

incontinência urinária. A síndrome da bexiga hiperativa é multifatorial e ainda pobremente entendida, pois depende essencialmente do fator de risco associado a esta condição patológica. Os fatores de risco para bexiga hiperativa incluem obesidade, envelhecimento, lesão medular, hipertensão arterial e diabetes (3, 60-63). A obesidade/síndrome metabólica é relatada como um dos fatores de risco mais importantes para LUTS que é positivamente relacionado à bexiga hiperativa (2, 60). Doenças endócrino-metabólicas assim como IMC elevado têm sido associados com incontinência urinária (64). A bexiga hiperativa em homens com HPB está associada à síndrome metabólica, incluindo diabetes mellitus e hipertensão (65).

Segundo a Sociedade Internacional de Continência (ICS, 2002), os sintomas do TUI são divididos em três grupos: (1) sintomas na “Fase de Enchimento”, caracterizados por urgência, poliúria, noctúria e urge-incontinência; (2) sintomas na “Fase de Esvaziamento”, caracterizados por jato urinário fraco, dificuldade para iniciar micção, esforço miccional, gotejamento terminal; e (3) sintomas “Pós Miccionais”, iniciados imediatamente após a micção e incluem sensação de esvaziamento incompleto e gotejamento pós-miccional. A síndrome da bexiga hiperativa constitui uma série de sintomas caracterizados por urgência, com ou sem incontinência de urgência, geralmente acompanhada por aumento de frequência urinária e noctúria. Está relacionada à hiperatividade do detrusor e aumento das contrações involuntárias durante a fase de enchimento (66). Estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos mostraram que 16,5% da população (aproximadamente 33 milhões) com idade igual ou superior a dezoito anos possuem sintomas de bexiga hiperativa (67), enquanto que na Europa a prevalência de bexiga hiperativa em pessoas com idade igual ou superior a 40 anos é de 16,6% (68). A hiperatividade da bexiga pode ser de origem neurogênica e/ou miogênica. A hiperatividade

de origem miogênica ocorre geralmente em pacientes com obstrução da uretra. A obstrução do fluxo leva à denervação da bexiga e modificações morfológicas como hipertrofia da musculatura lisa. Essas mudanças levam ao aumento da atividade miogênica, levando a aumento da pressão intravesical, causando ativação de fibras aferentes, gerando assim o reflexo miccional. No estado de hiperatividade da bexiga, o reflexo autonômico se dá antes do completo preenchimento da mesma (69). Os agentes antimuscarínicos são os fármacos de escolha para o tratamento da bexiga hiperativa-detrusor hiperativo, já que diminuem a capacidade de contração da bexiga. Estes fármacos atuam, principalmente, durante a fase de enchimento, diminuindo os sintomas de urgência, aumentando a capacidade vesical (70). Existem hoje outras possibilidades de tratamento, com a aprovação de novas drogas pelo FDA para este fim (71), como a toxina botulínica tipo A (BoNT/A), o agonista β 3-adrenérgico (Mirabegron) e o inibidor da PDE5 (Tadalafil).

1.2.5. Síndrome Metabólica/Obesidade e Estresse Oxidativo

A Síndrome metabólica é um termo que descreve um conjunto de fatores de risco independentes que aumentam a chance de doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, deposição central de gordura, dislipidemia (LDL e triglicérides elevados e HDL reduzido) e resistência à insulina (72). Identificada pela primeira vez em 1922, possui diferentes terminologias como quarteto mortal, síndrome X, síndrome plurimetabólica e síndrome de resistência à insulina (73). Os parâmetros mais utilizados para o diagnóstico da síndrome metabólica são os da Organização Mundial de Saúde (OMS) e os da *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III). A definição da OMS requer a avaliação da resistência à insulina como componente obrigatório, ao

passo que a da NCEP não requer esta avaliação, facilitando seu uso em estudos epidemiológicos (74).

O aumento da prevalência da síndrome metabólica é um fenômeno de proporção epidêmica mundial, que parece crescer paralelamente à obesidade, estimando-se que atinja de 15 a 25% dos indivíduos em países industrializados (75-77). A predisposição genética, a alimentação inadequada e a inatividade física estão entre os principais fatores que contribuem para o surgimento da síndrome metabólica, cuja prevenção primária é um desafio mundial (78). Cerca de 23% da população americana apresenta síndrome metabólica. Dentre todos os fatores de risco que fazem parte da síndrome, a obesidade é um dos mais importantes, acometendo 59,6% dos indivíduos (79). Atualmente, os estudos estão focados na compreensão das correlações moleculares entre obesidade e doenças metabólicas crônicas. Hotamisligil e colaboradores (1993)(80) foram os primeiros a identificar as primeiras ligações entre obesidade, inflamação e resistência à insulina. A obesidade e doenças associadas, como resistência à insulina, diabetes do tipo 2, dislipidemia e esteatose hepática, são um grande desafio para a ciência básica e clínica. É evidente que o desenvolvimento de modelos animais apropriados é crucial para os estudos da patogênese e terapia desta complexa desordem metabólica. Do ponto de vista científico é racional a necessidade não somente de um fenótipo, mas também de um modelo que reproduza em animais as condições patológicas encontradas nos humanos (81). Por essa razão, diversos estudos vêm utilizando dietas enriquecidas com gordura, conhecidas como dietas hiperlipídicas, para produzir modelos de obesidade em roedores. A primeira descrição desta intervenção nutricional data da década de 40. Estudos subsequentes revelaram que as dietas hiperlipídicas promovem hiperglicemia e resistência à insulina (82, 83). Baseado nestas experiências está bem estabelecido que dietas hiperlipídicas podem ser

utilizadas para criar um modelo válido de obesidade em roedores (81). Dentre estas linhagens, os camundongos C57BL/6J são os mais utilizados como modelo de síndrome metabólica e resistência à insulina (84). A predisposição desta linhagem para desenvolver obesidade tem sido explicada pelo aumento na resistência à leptina quando comparado a outras linhagens (85, 86).

O aumento do estresse oxidativo parece desempenhar um papel central na obesidade/síndrome metabólica e doenças correlatas (87), podendo ser um fator determinante para a progressão dos sintomas do TUI (88). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas de vida curta, derivadas do metabolismo do oxigênio. Desempenham papel importante em processos como expressão gênica, transdução de sinais e são altamente reativas. Em condições saudáveis, a eliminação de ROS é mantida em equilíbrio por antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, glutathione, catalase, peroxidase) e não enzimáticos (vitaminas C e E). Em estados patológicos como obesidade, ocorre um aumento da produção de ROS, diminuição da capacidade de eliminação e conseqüentemente um desequilíbrio do meio, caracterizando o chamado estresse oxidativo. O aumento das ROS oxida carboidratos, lipídios e proteínas, sendo importante para a progressão de doenças cardiovasculares (72, 89). A principal fonte enzimática de ROS são as NADPH oxidases (NOX). A família das NOXs possuem 7 homólogos catalíticos. Essas enzimas transferem elétrons da NADPH para o oxigênio molecular, produzindo o ânion superóxido (O_2^-), que reage com o NO, formando uma espécie ainda mais reativa, o peroxinitrito ($ONOO^-$). O ânion superóxido pode ser rapidamente convertido em H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD) e posteriormente em água pela catalase (90, 91). Em modelos experimentais de síndrome metabólica induzida por dieta, estudo prévio mostrou um aumento no estresse oxidativo associado a disfunção endotelial. Existe um aumento na

produção de ROS pela NADPH oxidase, concomitante com uma diminuição de isoformas da SOD, indicando uma defesa antioxidante prejudicada na síndrome metabólica (92).

1.2.6. Obesidade, Estresse Oxidativo e Sintomas do Trato Urinário Inferior

Estudos epidemiológicos têm revelado a existência de associação positiva entre síndrome metabólica/obesidade e LUTS, no qual a bexiga hiperativa ocupa um papel central (62, 93, 94). A síndrome metabólica é, portanto, considerada fator de risco para o LUTS (5, 62, 95). A prevalência de bexiga hiperativa e síndrome metabólica na população adulta dos Estados Unidos é de 16% e 26%, respectivamente (96), sendo que homens com três ou mais componentes da síndrome metabólica tem maior probabilidade de desenvolver sintomas do TUI (97).

Modelos animais também têm proporcionado evidências que confirmam a relação entre síndrome metabólica/obesidade e bexiga hiperativa, e por isso vem sendo utilizados para o entendimento da fisiopatologia dos distúrbios miccionais na síndrome metabólica/obesidade/diabetes (98-101). Ratos Wistar alimentados com 60% de ração enriquecida com frutose por 6 semanas apresentam sobrepeso, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hiperatividade vesical (102). Fêmeas Wistar tratadas com essa mesma ração por um período mais prolongado (24 semanas) não mostraram aumento no peso corporal, mas sim resistência à insulina. Notou-se marcante diminuição da resposta contrátil da bexiga in vitro em resposta à estimulação elétrica, carbacol e KCl (103). Em ratos Zucker obesos, mostrou-se diminuição na frequência de eliminação e contrações involuntárias desses animais (diabéticos ou não), sugerindo que a obesidade crônica per se reduz a atividade da bexiga (99). Embora a obesidade humana seja principalmente decorrente do

consumo de dieta rica em gorduras combinada com baixo gasto energético (104), há poucos estudos experimentais investigando a atividade de bexiga em modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Trabalho pioneiro mostrou que ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta hiperlipídica durante 24 semanas tiveram elevação do ganho ponderal, aumento da frequência de micção e de contrações involuntárias, sugerindo o desenvolvimento de detrusor hiperativo (105). Mais recentemente, nosso grupo avaliou a resposta urodinâmica e reatividade da musculatura lisa detrusora em modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica por 10-12 semanas em murinos (39, 106). Basicamente, mostramos que os animais exibem aumento do peso corporal e da gordura epididimal, assim como hiperglicemia e resistência à insulina. Os camundongos obesos apresentam detrusor hiperativo como resultado do aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais de Ca^{2+} do tipo L, relacionado ao aumento da expressão de PKC no detrusor. O tratamento com o agente anti-hiperglicêmico, metformina, restaurou a sensibilidade à insulina nos camundongos obesos, além de concomitantemente normalizar os níveis protéicos de PKC e a disfunção vesical nestes animais. Estes resultados indicaram que a resistência à insulina é crítica para a progressão da hiperatividade vesical resultante de obesidade associada à dieta rica em gorduras (39). Mostramos ainda que a resposta relaxante do detrusor à insulina é reduzida em camundongos obesos devido à resistência à insulina a qual foi associada a marcadores da resposta a proteínas maldobradas (UPR) no urotélio vesical (106).

Trabalhos envolvendo estresse oxidativo no TUI se limitam a estudar a bexiga, independente do modelo animal ou da causa da disfunção vesical, e quase sempre relacionados às doenças ligadas à obesidade (107-109). Em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, estudo prévio mostrou aumento de ROS em bexiga e diminuição da atividade da catalase (107). Outros grupos trabalharam com modelos de

isquemia/reperfusão em bexiga urinária, e também relataram aumento de ROS e/ou perda da capacidade antioxidante (109, 110). Os mecanismos envolvidos nas mudanças funcionais da bexiga pela isquemia ainda são desconhecidos, mas estudos epidemiológicos sugerem que doenças arteriais obstrutivas, como a aterosclerose, eventualmente progridem para LUTS (111, 112).

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A despeito dos estudos epidemiológicos apontarem para uma correlação positiva entre síndrome metabólica/obesidade e LUTS, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos permanecem pouco compreendidos, o que é evidenciado pela escassez de estudos experimentais abordando o impacto da síndrome metabólica/obesidade sobre a função do trato urinário inferior. Nas últimas décadas, o NO ganhou espaço como um importante neurotransmissor no âmbito das disfunções do TUI. O NO possui um papel inibitório no TUI, seja por sua ação direta como neurotransmissor, seja pela ação inibitória na neurotransmissão eferente (113). O estudo da ativação do seu principal alvo biológico, a GCs, é um caminho interessante para a compreensão da via NO-GCs-GMPc no TUI em condições normais a patológicas. Os ativadores da GCs, como o BAY 60-2770, surgiram como boas ferramentas para a pesquisa, tendo em vista que ativam essa enzima preferencialmente no seu estado oxidativo, se mostrando uma classe de fármaco promissora na terapêutica do LUTS (114-116). O estresse oxidativo parece exercer um papel central na fisiopatologia da obesidade e suas comorbidades, que resulta em oxidação de componentes celulares e afeta vias de sinalização (87). Portanto, utilizar uma droga que ativa a GCs independente do seu estado oxidativo, resultando em relaxamento da musculatura lisa, diminuição da atividade neuronal e aumento da perfusão tecidual é, teoricamente, um caminho para se seguir na resolução da bexiga hiperativa (113, 114, 117). Dessa forma, pesquisas que procurem entender as desordens do trato urogenital e suas relações com a obesidade podem repercutir positivamente não somente para o esclarecimento da fisiopatologia destas mesmas, como também para a melhora da terapêutica e para a prevenção da doença.

OBJETIVO

Objetivo Geral

No presente estudo buscamos investigar a disfunção da via de sinalização NO/GCs/GMPc no baixo trato urinário de camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica, e se o tratamento crônico com o ativador da GCs, BAY 60-2770, é capaz de reverter essa disfunção, melhorando a atividade da GCs e a produção de GMPc.

Objetivos específicos

- ✓ Investigar as alterações cistométricas em camundongos controle e obesos;
- ✓ Investigar as respostas relaxantes e contráteis em bexiga e uretra de camundongos controle e obesos;
- ✓ Identificar alterações nos níveis de GMPc em bexiga e uretra de camundongos controle e obesos;
- ✓ Determinar a expressão protéica da GCs em bexiga e uretra de camundongos controle e obesos;
- ✓ Determinar a produção de ROS em bexiga e uretra de camundongos controle e obesos;
- ✓ Avaliar como a bexiga e uretra respondem ao tratamento crônico com BAY 60-2770, por meio das medidas funcionais e moleculares descritas acima.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos machos com 4 semanas de idade, da linhagem C57BL6. A obesidade foi induzida através da substituição da dieta padrão por dieta AIN-93G, modificada para hiperlipídica, a qual consiste em 35% do peso de lipídeos (Tabela 2), durante 12 semanas (118). Os grupos controles receberam dieta comercial padrão para roedores de acordo com o AIN-93G, da marca PRAGSOLUÇÕES (Jaú, Brasil). As dietas e a água foram oferecidas *ad libitum*. Os animais foram mantidos em estantes apropriadas, com temperatura controlada em torno de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, além da regulação de fotoperíodo em 12 horas claro/escuro. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-IB/UNICAMP), protocolo n° 2582-1.

Tabela 2. Composição da dieta experimental.

Ingredientes	AIN-93	AIN-93 modificada
	g/100	g/100g
Amido de milho	39,8	11,8
Caseína	20,0	20,0
Dextrina	13,2	13,2
Sacarose	10	10
Óleo de soja	7,0	4
Banha de porco	0	31
Celulose microfina (fibra)	5,0	5,0
Mix de minerais	3,5	3,5
Mix de Vitaminas	1	1
L-cistina	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25
TOTAL	100,0	100,0

Fonte: American Institution of Nutrition-93 G (118).

2.2. TRATAMENTO ORAL COM BAY 60-2770

Camundongos controle e obesos foram tratados com BAY 60-2770 por gavagem (1 mg/kg/dia, diariamente da 10^a a 12^a semana) ou com veículo (Transcutol[®]: Cremophor[®]: água, 1:2:7, v/v/v) (116).

2.3. MEDIDA DO PERFIL LIPÍDICO

As dosagens de colesterol total, LDL, triglicerídeos e glicose foram realizadas ao final da 12^a semana de tratamento com dieta hiperlipídica através de kits comerciais

(Katal Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda, Belo Horizonte, Brasil).

2.4. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FUNCIONAIS

2.4.1. Cistometria

Os camundongos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de uretana (1.8 g/Kg). O animal foi posto em posição de supino e uma cisão longitudinal de 1 cm foi realizada na região abdominal. A bexiga foi exposta e um “butterfly” (25G), conectado a um cateter (PE50), foi introduzido no ápice da bexiga. O catéter foi conectado simultaneamente a um transdutor de pressão e a uma bomba de infusão. Antes do início da cistometria, a bexiga foi completamente esvaziada. O cistometograma foi conduzido através da infusão contínua de solução salina na bexiga a um fluxo de 0,6 mL/h. Os seguintes parâmetros urodinâmicos foram avaliados:

(1) **Frequência de micção (FM)** que é o número de contrações de micção por minuto;

(2) **Frequência de contrações involuntárias (CIs)**, calculada como número de CIs por minuto, sendo considerada como CI aquela contração com amplitude superior a 4 mmHg que não resulta em micção;

(3) **Capacidade (CP)** da bexiga, calculada pelo tempo necessário para desencadear a primeira micção $\times 0,6$ (mL) / 60 minutos;

(4) **Pressão limiar (PL)**, que é a pressão imediatamente anterior ao início da contração de micção, e representa a variação de pressão intravesical durante a fase de enchimento;

(5) **Complacência (CM)**, que é a razão entre CP / PL;

(6) **Pressão de pico (PP)**, pressão mais alta antes que a bexiga libere a urina;

2.4.2. Preparação do Músculo Liso da Uretra *in vitro*

Para o isolamento do músculo liso da uretra, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Em seguida, realizou-se uma incisão na parede abdominal, e a bexiga foi exposta e removida juntamente com a uretra, retirando-se a porção prostática da mesma, em forma de anel. Os anéis de uretra foram montados em câmaras de incubação de tecido com capacidade de 5 ml, preenchida com igual volume de solução de Krebs-Henseleit, continuamente gaseificadas com O₂:CO₂ (95:5 %), mantidas à temperatura de 36,5° C e pH entre 7,3 a 7,5. Os tecidos foram lavados com solução nutritiva Krebs-Henseleit à 37° C, com a seguinte composição (mM): NaCl (118), KCl (4,8), CaCl₂ (1,9), MgSO₄ (1,2), NaHCO₃ (25), KH₂PO₄ (1,2) e glicose (10,1). O anel foi suspenso sob uma tensão de 2 mN entre duas bases, sendo uma delas conectada ao transdutor de força e a outra com a regulação da tensão. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistema PowerLab 8/30 de aquisição de dados (Software versão 7.0, AD Instruments, Austrália). Foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas aos seguintes agentes relaxantes: nitrito de sódio acidificado (NaNO₂, 0,001 – 300 µM), S-nitrosoglutathiona (SNOG, 0,001 - 100 µM), nitroglicerina (GTN, 0,001 - 100 µM), tadalafil (0.00001 - 10 µM), BAY 41-2272 (300 pM - 30 µM), BAY 60-2770 (0.0003 - 30 µM) e 8Br-GMPc (0.003 - 300 µM). Foram determinadas a potência (pEC₅₀) e a resposta máxima (E_{max})

em todas as curvas concentração-resposta. As respostas de relaxamento foram expressas como % em relação à contração decorrente da pré-contração com agonista adrenérgico, fenilefrina (10 μ M). Os gráficos foram traçados e analisados através do programa computacional “GraphPad PRISM” (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores de potência e respostas máximas foram calculados pela seguinte equação (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA): $E = E_{max} / [(1 + (10^c / 10^X)^N) + \Phi]$, onde E é elevação do tônus basal, E_{max} é a máxima resposta que o agonista pode produzir, “c” é o logaritmo da EC_{50} , que é a concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima; “x” é o logaritmo da concentração do agonista, o expoente, “N”, significa a inclinação da curva concentração-resposta e Φ é a resposta observada na ausência do agonista. As análises de regressões não lineares para determinar os parâmetros E_{max} , log EC_{50} e o “n” foram feitas utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism, considerando o parâmetro Φ como zero.

2.4.3. Preparação do Músculo Liso Detrusor in vitro

Para o isolamento do detrusor, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Em seguida, realizou-se uma incisão na parede abdominal, e a bexiga foi exposta e removida através de uma secção horizontal no nível dos ureteres. O isolamento do músculo detrusor foi obtido retirando-se a base da bexiga. Os tecidos foram montados em câmaras de incubação de tecido com capacidade de 10 ml, e preenchidas com a solução Krebs-Henseleit (composição descrita acima), continuamente gaseificadas com O₂:CO₂ (95:5 %), mantidas à temperatura de 36,5° C e pH entre 7,3 a 7,5. Os tecidos

foram lavados com solução nutritiva Krebs-Henseleit à 37° C. As tiras de detrusor foram suspensas através de fio de algodão, sendo que uma das pontas foi conectada a um transdutor de força. A tensão aplicada aos tecidos (5 mN) foi periodicamente ajustada até a estabilização (45 min), e a solução nutritiva trocada a cada 15 min durante este período. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (Software versão 7.0, AD Instruments, Austrália). Foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas de contração aos seguintes agentes contráteis: carbacol (0,001 – 100 µM), cloreto de cálcio (CaCl₂, 0.001 - 30 mM) e cloreto de potássio (KCl, 1 – 300 mM). As respostas contráteis dos agonistas foram apresentadas como mN/mg de peso do tecido. O logaritmo das concentrações molares dos agonistas foi colocado em abscissa e a resposta contrátil em mN/mg nas ordenada. Os gráficos foram traçados e analisados através do programa computacional “GraphPad PRISM” (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores de potência e de resposta máxima foram calculados como detalhado acima para a uretra.

2.5. DETERMINAÇÃO DE MEDIDAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES

2.5.1. Determinação dos níveis de GMPc

Para determinação dos níveis de GMPc em homogenatos de uretra e bexiga de camundongos, os tecidos foram equilibrados durante 45 min em solução de Krebs continuamente oxigenada à 37° C. A bexiga foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido afim de se determinar o GMPc basal. As uretras foram estimulados por 10 min com GTN (10 µM) ou BAY 60-2770 (BAY; 10 µM). Algumas uretras foram incubadas com ODQ (10 µM) por 30 min antes da adição de BAY 60-2770. Em seguida, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, pulverizados, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA, 5%) e centrifugados à 1500 g por 10 min à 4° C. O TCA foi extraído das amostras através de três lavagens com solução de éter saturado com água. A preparação do *tracer*, amostras, padrões e incubação com anticorpo foram feitas conforme descrito no kit disponível comercialmente (Cayman Chemical Cyclic GMP EIA kit, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.5.2. Western Blotting de Bexiga Urinária e Uretra

Para a detecção das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs, foi feito separação das proteínas das amostras biológicas de homogenatos de detrusor e uretra por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% + lauril sulfato de sódio 0,1% (SDS-PAGE). Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente em sistema

submerso para membrana de nitrocelulose. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com caseína (solução a 0,2% em tampão Tris-Salina - TBS, pH 7,4) durante 1 h. A seguir, as membranas foram incubadas de 15 a 18 horas à 4° C com anticorpos primários específicos para as diferentes subunidades. Os anticorpos primários utilizados foram Anti-GCs subunidade α_1 (1:1000, ab50358, Abcam, Cambridge, UK) e Anti-GCs subunidade β_1 (1:1000, NBP1-58869, Novus Biologicals, Oakville, ON, CA).

A detecção foi realizada utilizando-se Anticorpos secundários HRP- conjugados e solução de luminol. O peso molecular das bandas foi calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular (faixa: 29 a 205 kDa). A intensidade das bandas, como uma medida da expressão da proteína, foi determinada por análise densitométrica mediante ao uso do Scion Image Software (Scion Corporation, Frederick, MD).

2.5.3. Medida de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A uretra e bexiga foram removidas e colocados em meio para congelamento (TCA), em seguida foram congeladas em nitrogênio líquido. Os tecidos foram cortados (12 μ M) em criostato e colocados em lâminas com silanina. As lâminas com os cortes ficaram em placa quente (37° C) por 20 min. Os cortes foram circulados com caneta hidrofóbica e incubados com tampão fosfato por 10 min à 37° C em câmara úmida. O tampão fosfato foi retirado, e os cortes foram incubados com hidroetidina (Sigma, St Louis, LO, EUA), 10 μ M, diluída em tampão fosfato por 30 minutos à 37° C em câmara úmida. Os cortes foram observados em microscópio de fluorescência (Eclipse 80i, Nikon, Japan) e câmara (DS-U3, Nikon, Japão) com filtro para rodamina, usando-se objetiva de

20x. A quantificação foi feita pelo Image J Software (National Institute of Health, Bethesda-MD, EUA).

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

3. RESULTADOS

3.1. PRIMEIRA PARTE

3.1.1. Características Gerais

Após 12 semanas de dieta hiperlipídica os camundongos obesos apresentaram aumentos significativos ($P < 0,05$) do peso corporal e da gordura epididimal, assim como dos níveis de glicose em relação ao grupo controle. Os níveis de colesterol total e de LDL também se mostraram aumentados enquanto o nível de triglicerídeos permaneceu inalterado entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de peso corporal, peso da gordura epididimal, glicose e perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total, LDL) de camundongos controle e obesos. Os resultados são expressos como média \pm EPM para 5-8 animais. * $P < 0,05$.

	Controle	Obeso
Peso corporal (g)	27,9 \pm 0,9	44,2 \pm 0,7*
Peso da gordura epididimal (g)	0,21 \pm 0,04	1,96 \pm 0,11*
Glicose (mg/dL)	135,0 \pm 11,5	208,8 \pm 12,8 *
Triglicerídeos (mg/dL)	123,98 \pm 5,9	120,98 \pm 5,2
Colesterol total (mg/dL)	140,08 \pm 2,8	297,9 \pm 11,9*
LDL (mg/dL)	54,43 \pm 1,7	176,41 \pm 11,3*

3.1.2. Parâmetros Funcionais

3.1.2.1. Parâmetros Cistométricos

O padrão de micção do grupo controle apresentou-se regular e com um esvaziamento efetivo da bexiga (Figura 4A). A micção do grupo obeso foi irregular (Figura 4), caracterizado por um aumento significativo ($P < 0,05$) na frequência de micção e no número de contrações involuntárias (Figura 5, A e B). A capacidade, pressão limiar, complacência e pressão de pico não apresentaram diferenças entre os dois grupos (Figura 5, C-F).

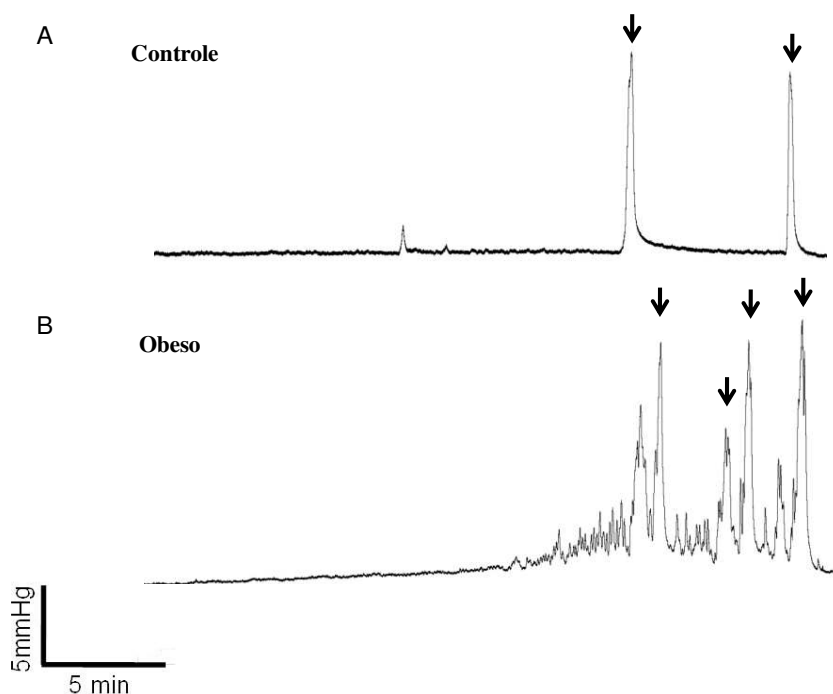


Figura 4. Traços cistométricos representativos dos grupos controle (A) e obeso (B).

As setas pretas indicam os picos de micção.

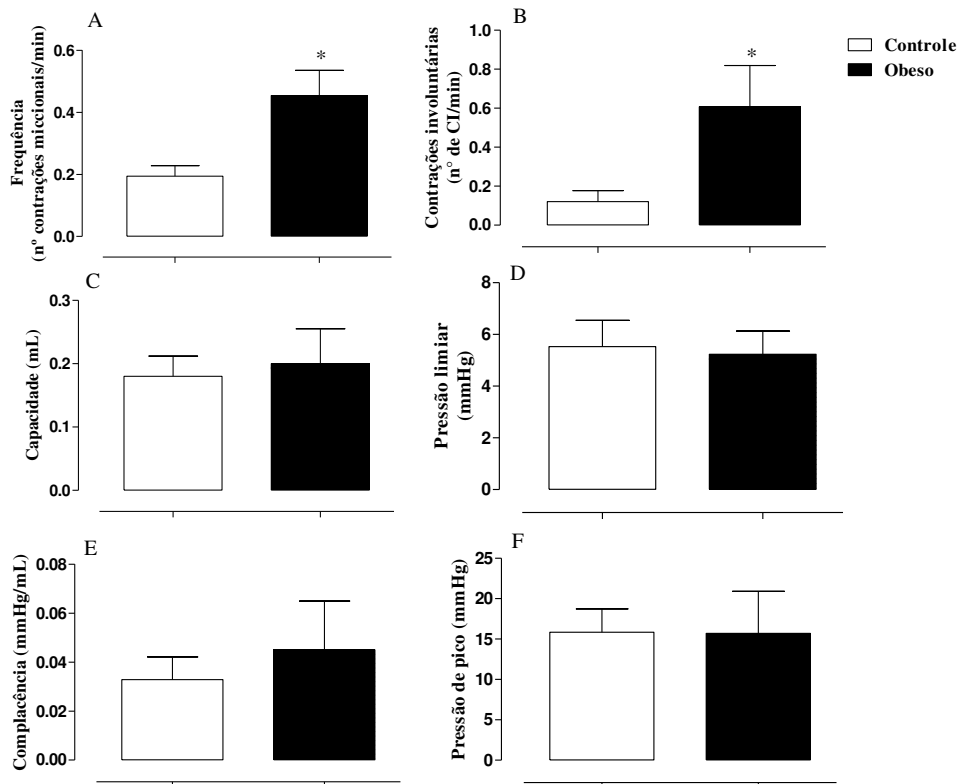


Figura 5. Parâmetros cistométricos obtidos de camundongos controle e obesos. Frequência de contrações miccionais (A), Contrações involuntárias (B), Capacidade (C), Pressão limiar (D), Complacência (E) e Pressão de pico (F). Dados são apresentados como média ± EPM. *P < 0,05 em comparação com grupo Controle.

3.1.2.2. Reatividade do Músculo Liso Detrusor in vitro

As respostas contráteis ao agonista muscarínico carbacol (0,001 - 100 μ M), CaCl_2 (0,001 - 100 mM) e KCl (1 - 300 mM) foram maiores ($P < 0,05$) em detrusor de camundongos obesos quando comparado com o grupo Controle (Fig. 6, A, B e C, respectivamente).

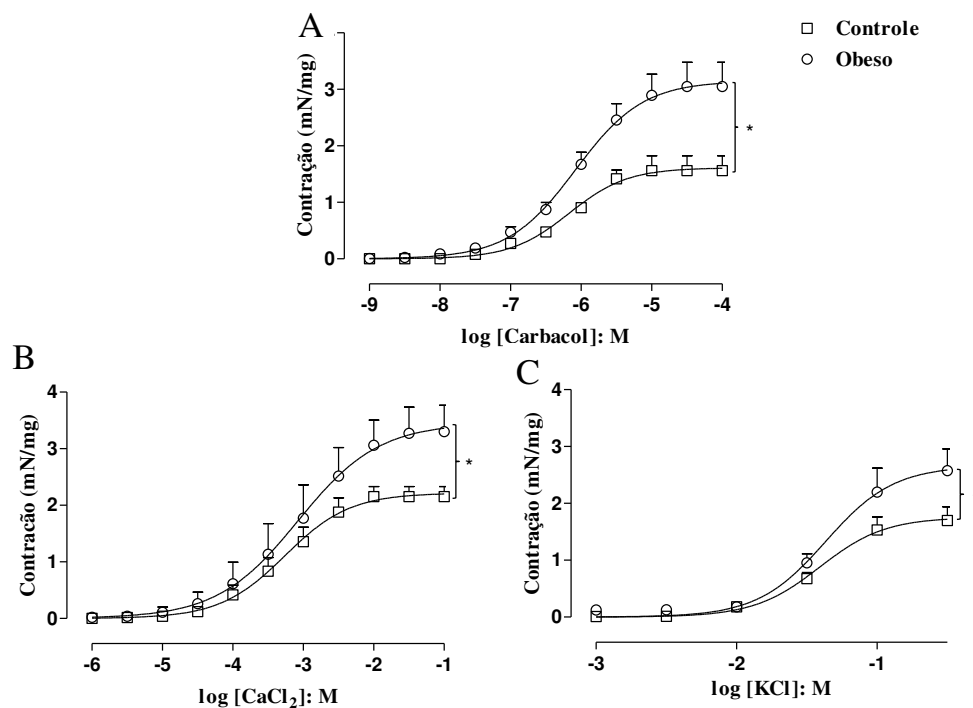


Figura 6. Curvas concentração resposta ao carbacol (A), cloreto de cálcio (CaCl₂; B) e cloreto de potássio (KCl; C) em bexiga de camundongo controle e obeso. Dados são apresentados como média ± EPM (mN/mg) (n=5 - 8).* P<0,05.

3.1.2.3. Reatividade do Músculo Liso da Uretra in vitro

Nestes protocolos experimentais buscamos investigar o efeito da obesidade sobre o relaxamento da uretra. Esse relaxamento foi obtido após pré-contração com felinefrina (10 μ M). Não foram observadas diferenças para o tônus induzido pela felinefrina entre os grupos controle e obeso (2,0 \pm 0,27 mN e 2,10 \pm 0,36 mN, respectivamente, n=15).

O relaxamento uretral foi induzido pelos seguintes agentes: nitrito de sódio acidificado (NaNO₂, 0,001 – 300 μ M), S-nitrosoglutationa (SNOG, 0,001 - 100 μ M) e nitroglicerina (GTN, 0,001 - 100 μ M) (figura 7 A, B e C). O grupo obeso apresentou um

relaxamento uretral menor (E_{max}) quando comparado ao grupo controle para NaNO₂, SNOG e GTN (Tabela 4, Figura 7). Os valores de potência (pEC_{50}) não diferenciam entre ambos os grupos. Após a pré incubação com ODQ, o relaxamento foi inibido em ambos os grupos, não se notando diferenças estatísticas entre os mesmos, em termos de E_{max} e pEC_{50} (Tabela 4, Figura 7).

Tabela 4. Valores de Resposta máxima (E_{max}) e potência (pEC_{50}) das curvas concentração-resposta de relaxamento ao NaNO₂, SNOG e GTN em musculatura lisa uretral. Foram utilizados camundongos controle e obesos incubados ou não previamente com ODQ (10 μ M).

Grupo	NaNO ₂		SNOG		GTN	
	E_{max} (%)	pEC_{50}	E_{max} (%)	pEC_{50}	E_{max} (%)	pEC_{50}
Controle	51,2 \pm 1,9	6,58 \pm 0,07	66,3 \pm 7,3	6,58 \pm 0,10	43,7 \pm 3,3	6,78 \pm 0,07
Obeso	36,5 \pm 0,8**	6,42 \pm 0,04	36,3 \pm 4,2**	6,31 \pm 0,11	29,3 \pm 1,4*	6,70 \pm 0,05
Controle + ODQ	18,2 \pm 5,2**	6,65 \pm 0,22	28,1 \pm 0,8**	6,26 \pm 0,10	23,7 \pm 2,9**	7,16 \pm 0,19
Obeso + ODQ	20,3 \pm 7,4 [#]	6,77 \pm 0,35	27,4 \pm 2,2	6,73 \pm 0,14	26,6 \pm 2,3	7,17 \pm 0,09 [#]

Os dados são apresentados como média \pm EPM (n= 4 – 6). *P < 0,05, **P < 0,01 quando comparado com respectivo grupo controle não tratado; e [#]P < 0,05 quando comparado com o grupo obeso.

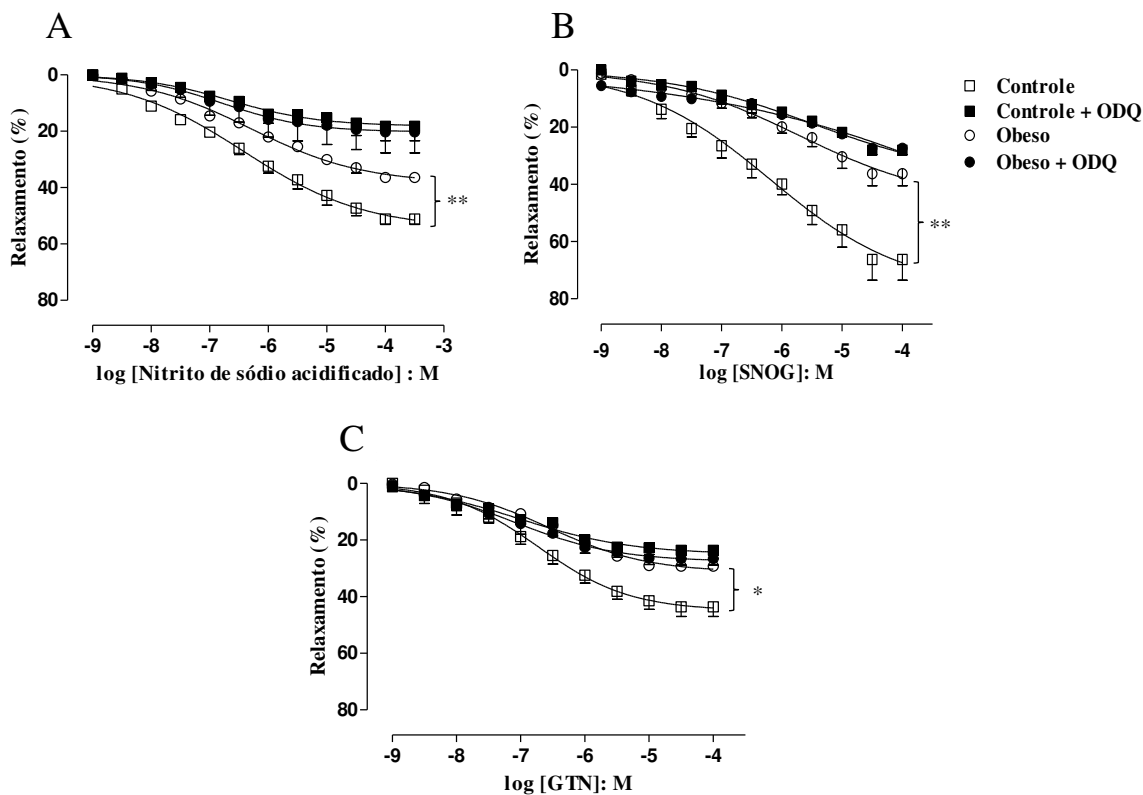


Figura 7. Curvas concentração-resposta ao nitrito de sódio acidificado (NaNO_2 , A), S-nitrosoglutationa (SNOG, B) e gliceril trinitrato (GTN, C) em uretra de camundongos controle e obesos, com e sem pré-incubação com ODQ ($10 \mu\text{M}$). Dados são apresentados como \pm SEM ($n=4 - 6$). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

A curva concentração-resposta de relaxamento ao estimulador da GCs, BAY 41-2272 ($0,0001 - 30 \mu\text{M}$), foi semelhante a dos doadores de NO. Ou seja, a resposta máxima de relaxamento uretral ao BAY 41-2272 foi significativamente menor no grupo obeso em relação ao controle. Após pré-incubação com ODQ ($10 \mu\text{M}$), houve inibição do relaxamento em ambos os grupos (Tabela 5, Figura 8A). Não notamos alterações de potência em nenhum grupo avaliado para o BAY 41-2272.

A resposta ao BAY 60-2770 seguiu um padrão diferente de relaxamento. O grupo controle apresentou uma E_{max} menor quando comparado ao grupo obeso. A pré-incubação

com ODQ (10 μ M) aumentou a E_{max} , de modo semelhante ao grupo obeso (Tabela 5, Figura 8B). Notamos ainda aumento significativo da potência no grupo obeso (não tratado) em relação ao controle.

Nas curvas ao tadalafil e 8Br-GMPc não foram observadas diferenças entre os grupos controle e obeso para os parâmetros de E_{max} e pEC_{50} (Figura 9, A e B).

Tabela 5. Valores de Resposta máxima (E_{max}) e potência (pEC_{50}) das curvas concentração-resposta de relaxamento ao BAY 41-2272 e BAY 60-2770 em musculatura lisa uretral de camundongos controles e obesos, na ausência e na presença de ODQ (10 μ M).

Grupo	BAY 41-2272		BAY 60-2770	
	E_{max} (%)	pEC_{50}	E_{max} (%)	pEC_{50}
Controle	75,9 \pm 2,3	6,65 \pm 0,05	41,9 \pm 2,7	7,19 \pm 0,08
Obeso	60,9 \pm 0,5*	6,46 \pm 0,06	63,4 \pm 4,0**	7,75 \pm 0,07*
Controle + ODQ	54,4 \pm 3,9**	6,91 \pm 0,07	59,7 \pm 0,4*	7,33 \pm 0,04
Obeso + ODQ	42,0 \pm 3,5 [#]	6,49 \pm 0,08	72,7 \pm 5,9	7,24 \pm 0,08

Os dados são apresentados como média \pm EPM (n= 4 – 8). *P < 0,05, **P < 0,01 quando comparado com respectivo grupo controle não tratado; #P < 0,05 quando comparado com o grupo obeso.

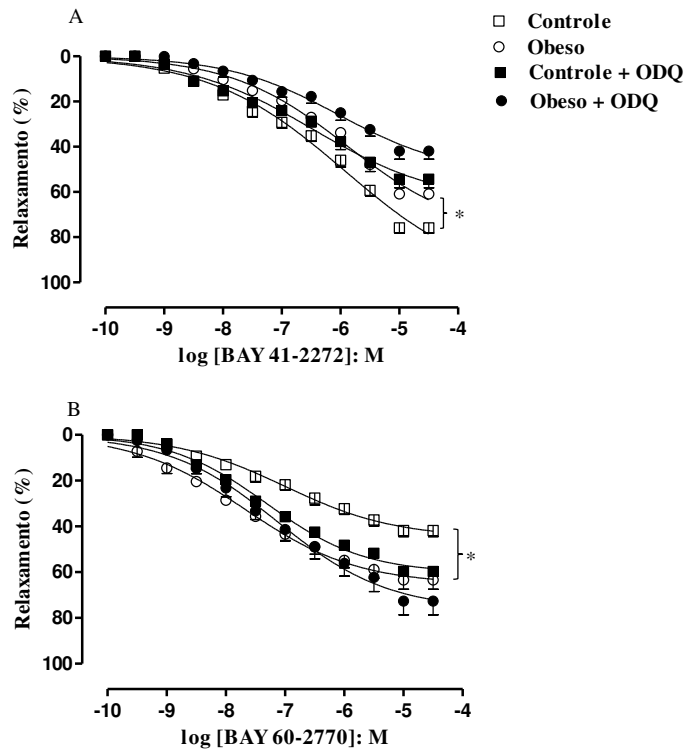


Figura 8. Relaxamento uretral por estimulação (A; BAY 41-2272) ou ativação (B; BAY 60-2770) da guanilato ciclase solúvel em uretra de camundongo controle e obeso, com e sem pré-incubação com ODQ (10 μ M).

Dados são apresentados como média \pm EPM (%) (n=4-8). *P<0,05 em comparação com grupo controle.

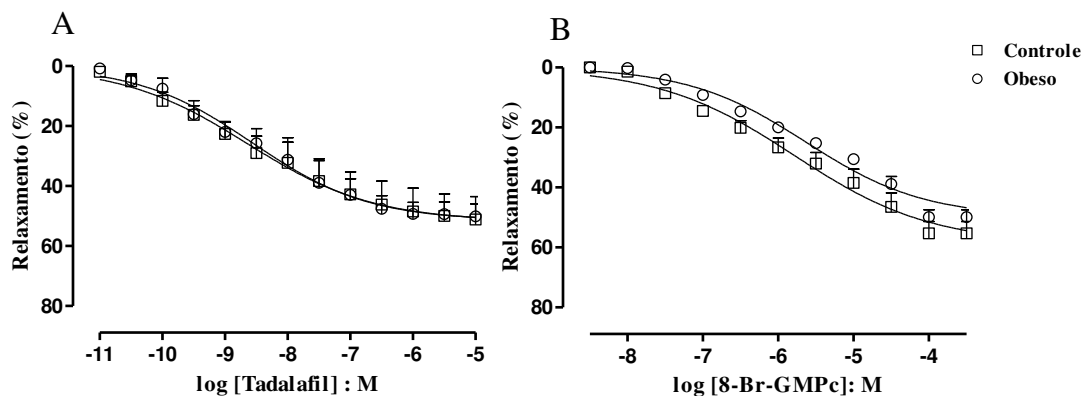


Figura 9. Curvas concentração resposta ao tadalafil (A) e 8-BR-GMPc (B) em uretra de camundongos controle e obesos.

Dados são apresentados como média \pm EPM (%) (n=5-8).

3.1.3. Determinação de medidas bioquímicas e moleculares

3.1.3.1. Níveis de GMPc

Após a estimulação com GTN (10 μ M), os níveis de GMPc foram significativamente menores em uretras do grupo obeso quando comparado com o grupo controle ($0,69 \pm 0,09$ e $1,67 \pm 0,13$ pmol/ μ g de proteína de tecido, respectivamente, $P < 0,05$, n=3).

A incubação com BAY 60-2770 (10 μ M) gerou um aumento de 82% ($p < 0,01$) dos níveis de GMPc no grupo obeso quando comparado com o respectivo grupo controle (Figura 10, n=3). A incubação prévia com ODQ não modificou a produção de GMPc em resposta ao BAY 60-2770 no grupo obeso, mas elevou significativamente os níveis deste nucleotídeo cíclico no grupo controle (Figura 10).

Como demonstrado na figura 11, o nível de GMPc foi significativamente menor ($p < 0,05$) em bexiga de camundongos obesos quando comparado com o grupo controle.

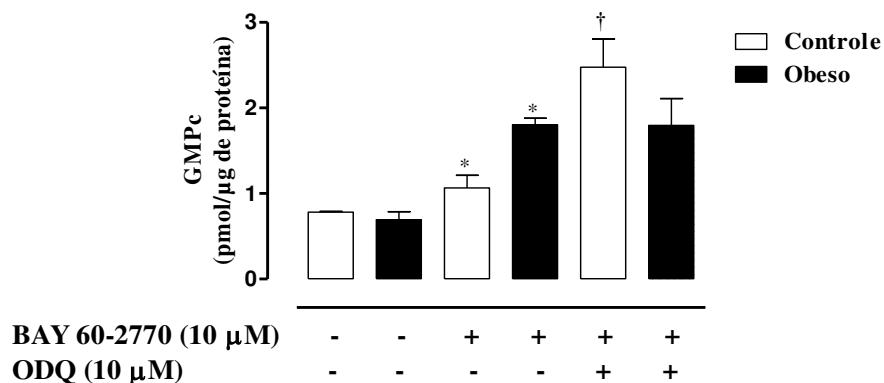


Figura 10. Níveis de GMPc em uretra de camundongos controle e obesos. Os tecidos foram incubados com BAY 60-2770 com ou sem a presença de ODQ (10 μ M). Dados apresentados como média \pm EPM. * $P < 0,05$ quando comparado com respectivo controle e † $P < 0,05$ quando comparado com controle sem ODQ.

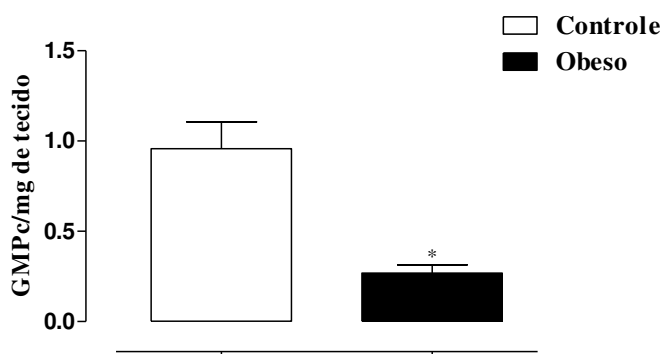


Figura 11. Níveis de GMPc em bexiga de camundongos controle e obesos. Dados apresentados como média \pm EPM (n=4 - 5). * $P < 0,05$ em relação ao controle.

3.1.3.2. Western Blotting para GCs (Subunidades α_1 e β_1)

Assim como demonstrado na figura 12 A, a expressão protéica da subunidade β_1 da GCs foi 37% menor em tecido uretral de animais obesos quando comparado com o grupo controle ($P < 0,05$, $n = 7-10$).

Na bexiga de obesos, a expressão protéica das subunidades α_1 e β_1 tiveram uma diminuição de 41% e 43%, respectivamente ($P < 0,05$, $n = 4-5$, figuras 12, B e C).

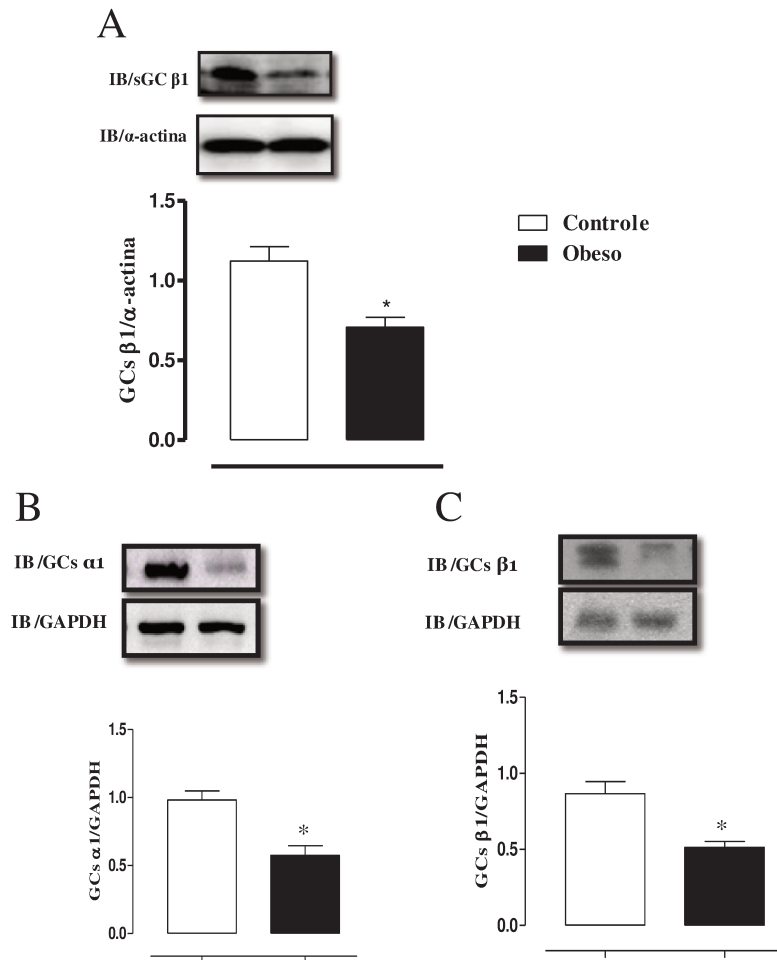


Figura 12. Imagens representativas de western blotting da expressão protéica das subunidades β 1 em uretra (A) e subunidades α 1 e β 1 em bexiga (B e C) de camundongos controle e obesos.

Dados apresentados como média \pm EPM (n=4 - 10). *P <0,05.

3.1.3.3. Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio em uretra foram marcadas por hidroetidina e analisadas em microscópio de fluorescência. A intensidade da fluorescência foi 118% maior ($P < 0,05$) no tecido uretral do grupo obeso quando comparado com o grupo controle (Figura 13A). Na bexiga, a produção de espécies reativas no tecido de camundongos obesos foi 78% maior ($P < 0,05$) comparado com grupo controle (U.A. $2,5 \pm 0,2$ e $4,7 \pm 0,1$, respectivamente; Figura 13 B).

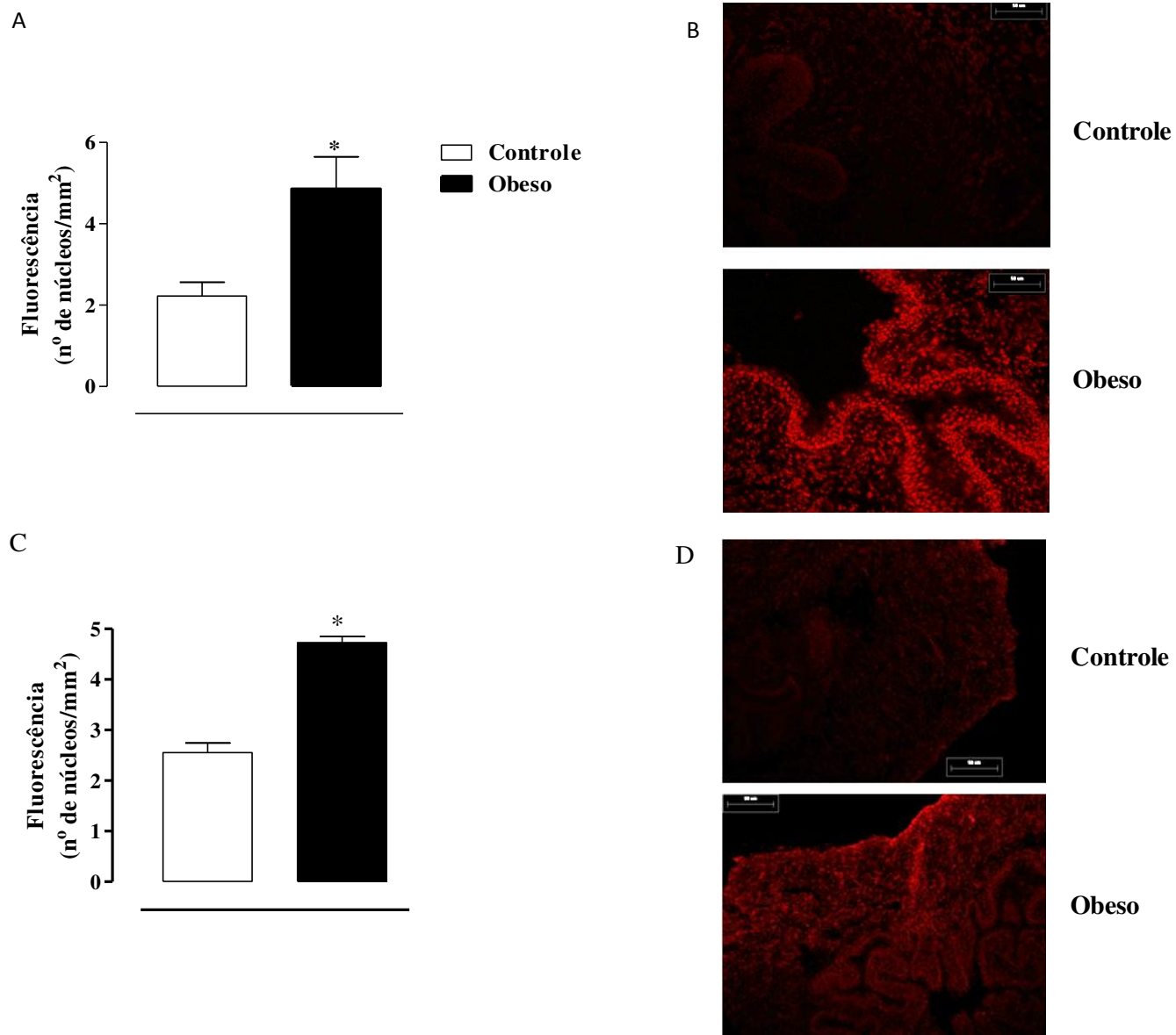


Figura 13. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) medidas por fluorescência pela marcação com hidroetidina de uretra (A e B) e bexiga (C e D) de camundongos controle e obeso.

Dados apresentados como média \pm EPM (n=5). *P <0,05.

3.2. SEGUNDA PARTE

Investigação do potencial terapêutico do BAY 60-2770 na disfunção miccional do camundongo obeso

3.2.1. Características Gerais

O tratamento oral com BAY 60-2770 não exerceu efeito significativo sobre o peso corporal, peso da gordura epididimal e níveis glicêmicos em animais controles o obesos (Tabela 6). Foi observada uma diminuição dos valores do perfil lipídico (triglicérides e colesterol total) nos animais tratados com BAY 60-2770. Entretanto, o tratamento produziu redução similar nos grupos controle e obeso, tanto no nível de triglicérides (38% e 57% respectivamente, $P < 0,05$) como no de colesterol total (34% e 35% respectivamente, $P < 0,05$). O BAY 60-2770 reduziu em 42% os níveis séricos de LDL no obeso, sem mostrar efeito significativo no grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de peso corporal, peso da gordura epididimal, níveis de glicose e perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total e LDL) de camundongos controle e obesos, tratados ou não com BAY 60-2770 (1 mg/Kg/dia, 2 meses).

	Controle	Controle + BAY 60-2770	Obeso	Obeso + BAY 60-2770
Peso corporal (g)	27,9 ± 0,9	28.15 ± 1.0	44,2 ± 0,7*	44.3 ± 0.9*
Peso da gordura epididimal (g)	0,21 ± 0,04	0.22 ± 0.02	1,96 ± 0,11*	1.90 ± 0.11*
Glicose (mg/dL)	135,0 ± 11,5	152.8 ± 3.7	208,8 ± 12,8 *	225.8 ± 13.3*
Triglicerídeos (mg/dL)	123,98 ± 5,9	76.55 ± 4.9*	120,98 ± 5,2	52.41 ± 3.1†
Colesterol total (mg/dL)	140,08 ± 2,8	92.9 ± 5.1*	297,9 ± 11,9*	192.76 ± 16.5†
LDL (mg/dL)	54,43 ± 1,7	54.30 ± 8.9	176,41 ± 11,3*	102.65 ± 16.9†

Os resultados são expressos como media ± EPM para 5-8 animais. *P <0,05 quando comparado com respectivo grupo controle e † P <0.05 quando comparado com grupo obeso + veículo.

3.2.2. Parâmetros Funcionais

3.2.2.1. Parâmetros Cistométricos

O tratamento com BAY 60-2770 normalizou a micção no camundongo obeso, sem afetar os parâmetros no grupo controle (Figuras 14 e 15 A, B).

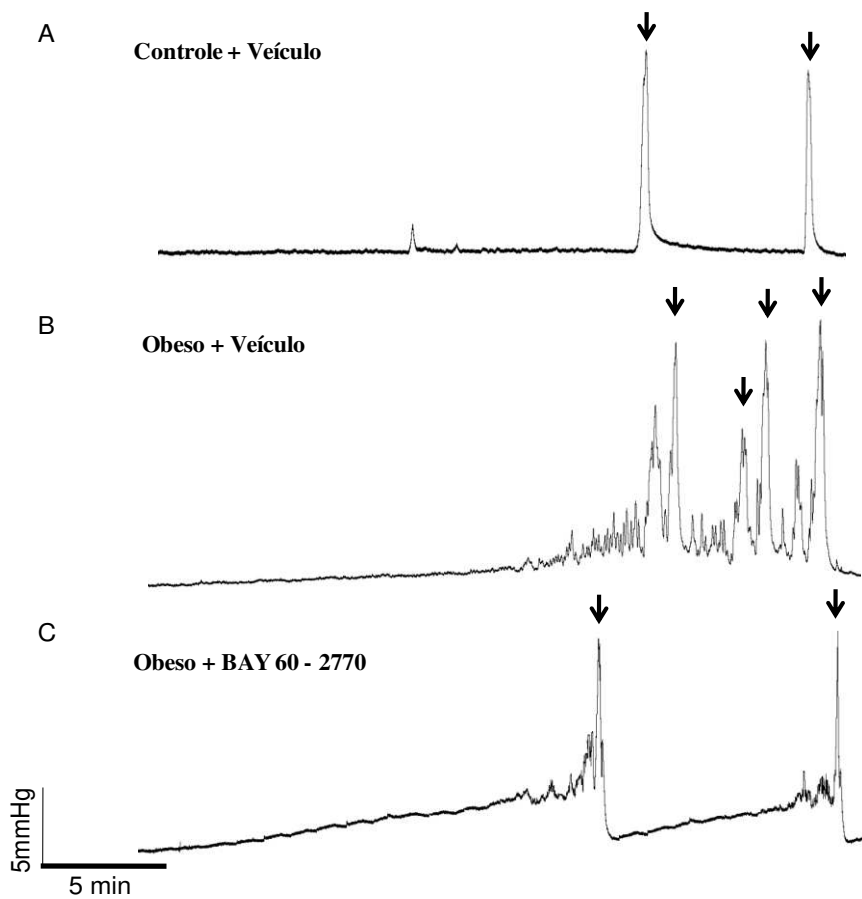


Figura 14. Traçados cistométricos representativos dos grupos controle + veículo (A), obeso + veículo (B) e obeso + BAY 60-2770 (C). As setas pretas indicam os picos de micção.

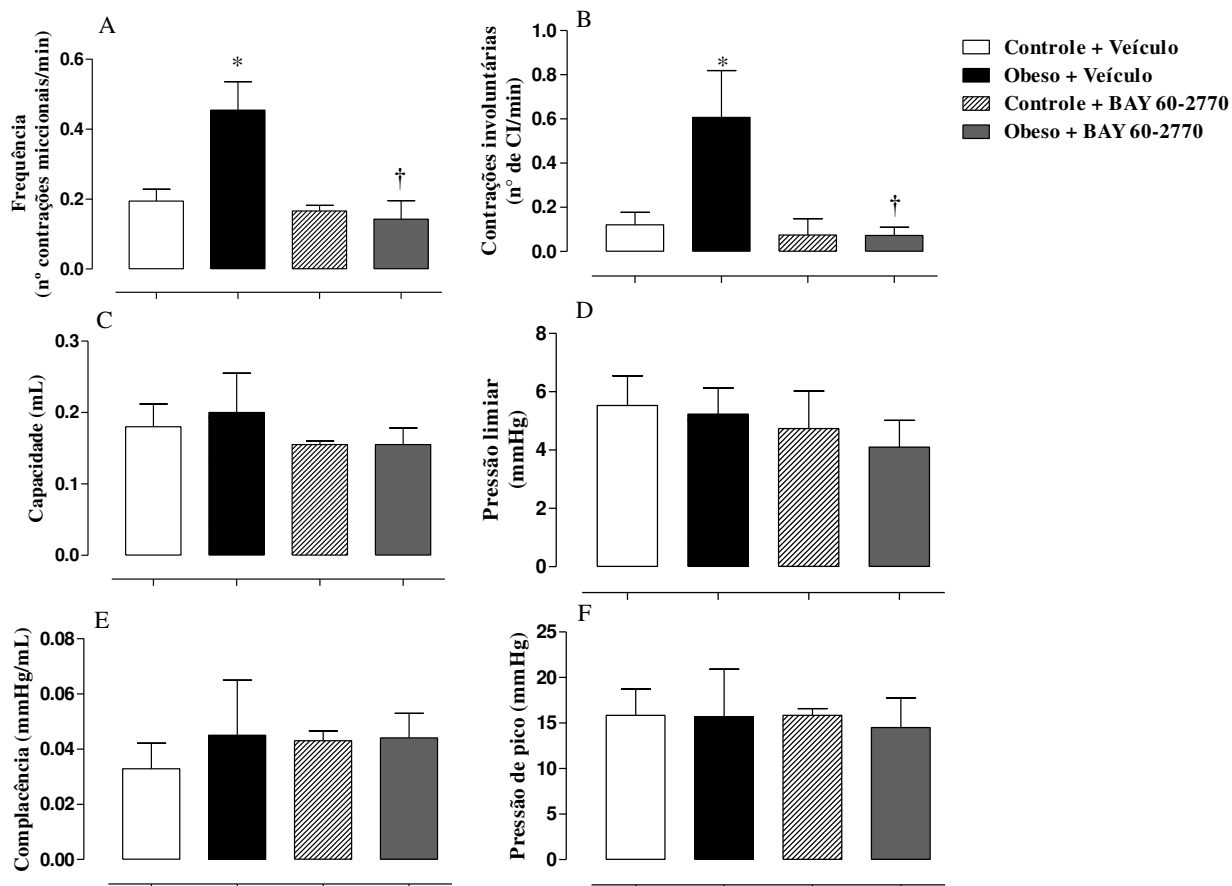


Figura 15. Parâmetros cistométricos obtidos de camundongos controle e obesos, tratados ou não com BAY 60-2770 (1 mg/Kg/dia). Freqüência de contrações miccionais (A), Contrações involuntárias (B), Capacidade (C), Pressão limiar (D), Complacência (E) e Pressão de pico (F). Dados são apresentados como média \pm EPM (n=5). *P < 0,05 em comparação com grupo controle + veículo. † P < 0,05 em comparação com grupo obeso + veículo.

3.2.2.2. Reatividade do Músculo Liso Detrusor *in vitro*

O carbacol, CaCl₂ e KCl produziram respostas contráteis dependentes da concentração as quais foram significativamente maiores no grupo obeso em relação ao controle (Figura 16). O tratamento crônico com BAY 60-2770 normalizou a

hipercontratibilidade observada com os três agentes no grupo obeso ($P < 0,05$). Por outro lado, as respostas contráteis ao carbacol, CaCl_2 e KCl em detrimento do grupo controle não foram afetadas pelo tratamento com BAY 60-2770 (Figura 16).

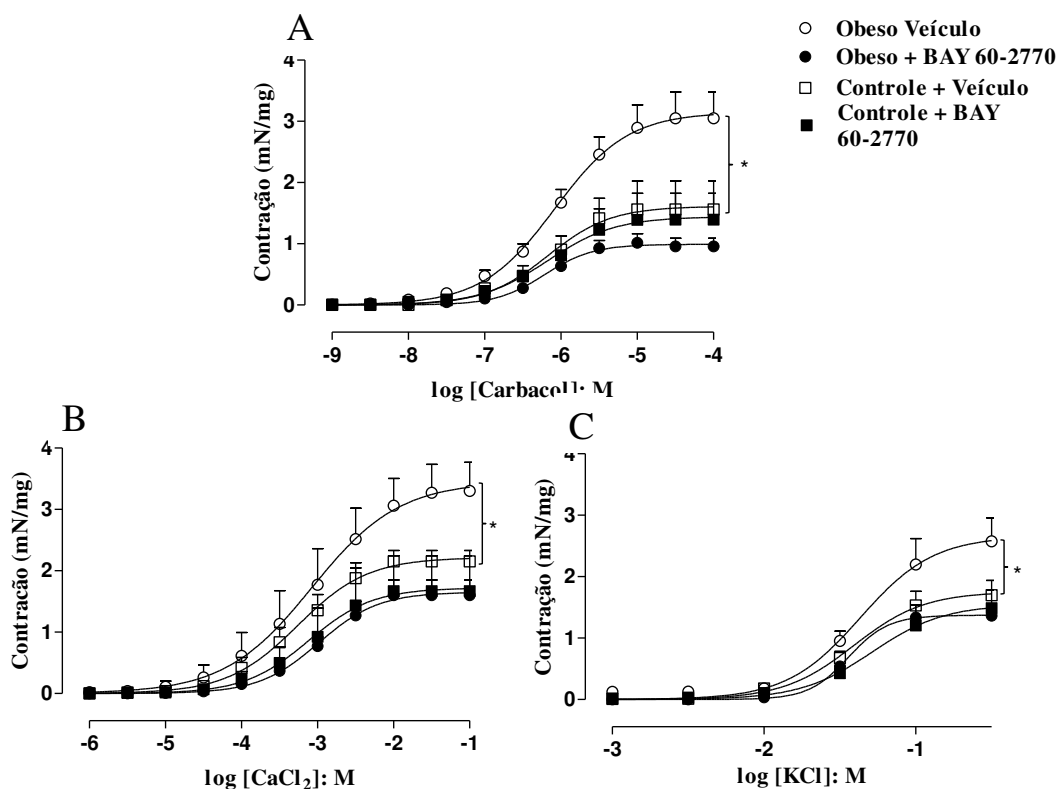


Figura 16. Curvas concentração-resposta ao carbacol (A), cloreto de cálcio (CaCl_2 ; B) e cloreto de potássio (KCl ; C) em bexiga de camundongo controle e obeso, tratados ou não com BAY 60-2770 (1 mg/kg/dia).

Dados são apresentados como média \pm EPM (mN/mg; $n=5 - 8$). * $P < 0,05$ em relação aos demais grupos.

3.2.2.3. Reatividade do Músculo Liso da Uretra *in vitro*

O nitrito de sódio acidificado (0,001 - 300 μM) produziu relaxamento dependente

da concentração em uretra de camundongos controle e obesos, sendo que o relaxamento uretral foi significativamente menor em camundongos obesos em relação aos controles (Figura 17). A redução da resposta máxima pelo nitrito de sódio acidificado em uretra de obeso foi revertida pelo tratamento com BAY 60-2770 (Figura 17). Não foi observada diferença entre o controle e controle tratado com BAY 60-2770 (n=5-6, Figura 17).

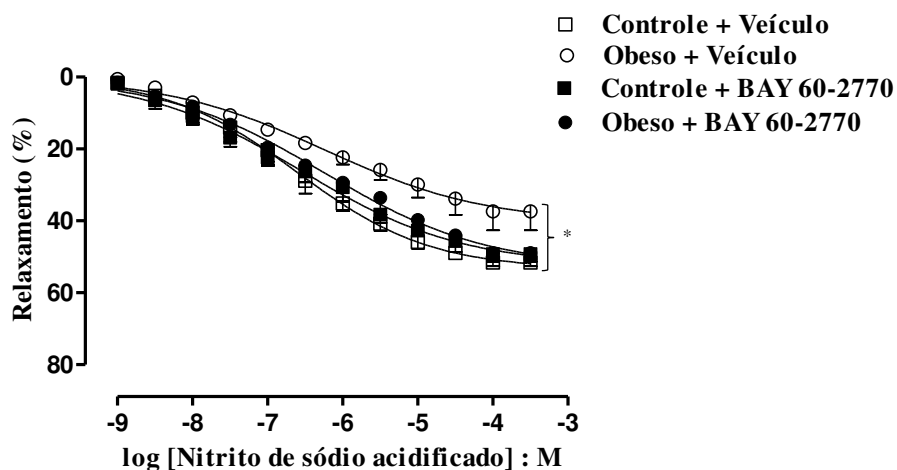


Figura 17. Curvas concentração resposta ao nitrito de sódio acidificado em uretra de camundongos controle e obesos, tratados ou não cronicamente com BAY 60-2770 (1 mg/kg/dia).

Dados são apresentados como média \pm EPM (n= 6). *P<0,05.

3.2.3. Determinação de medidas bioquímicas e moleculares

3.2.3.1. Níveis de GMPc e bexiga

Os níveis basais de GMPc em bexiga de animais obesos mostraram-se significativamente menores em relação ao grupo controle. O tratamento com o BAY 60-2770 provocou um aumento de 10 vezes nos níveis de GMPc em bexigas de camundongos obesos, sem afetar os níveis deste nucleotídeo cíclico no grupo controle (Figura 18).

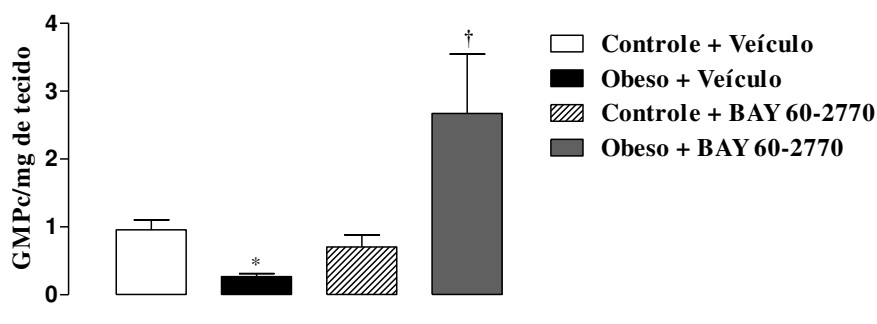


Figura 18. Níveis de GMPc após o tratamento crônico com BAY 60-2770 (1 mg/kg/dia) em bexiga de camundongos controle e obesos.

Dados apresentados como média ± EPM (n= 4 - 5). *P <0,05 em comparação com grupo controle + veículo. †P <0.01 em comparação com grupo obeso + veículo.

3.2.3.2. Western Blotting para GCs (Subunidades α_1 e β_1)

O tratamento oral com BAY 60-2770 por duas semanas restaurou o nível protéico da subunidade β_1 em uretra (Figura 19 A) e de ambas as subunidades (α_1 e β_1) na bexiga (Figura 19, B e C).

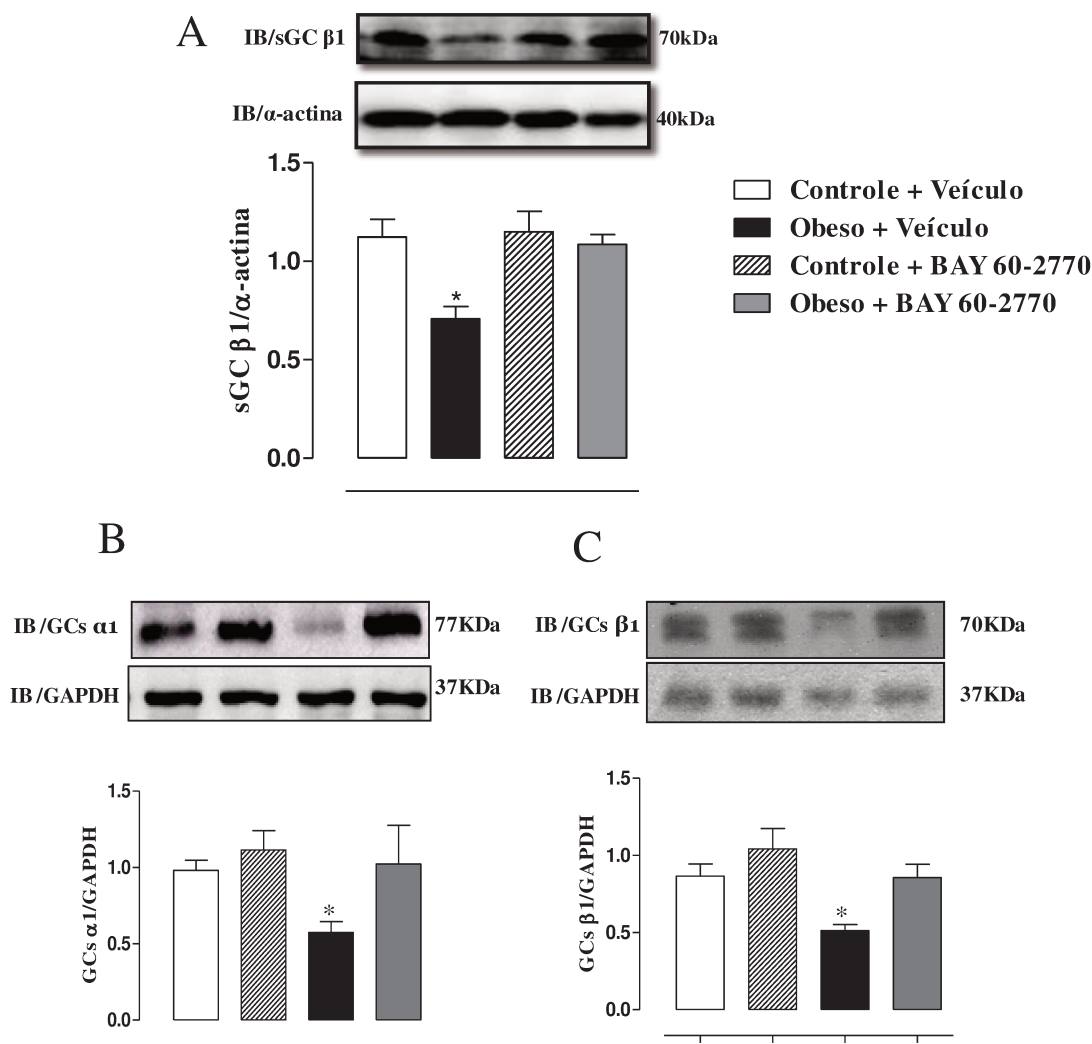


Figura 19. Imagens representativas de western blotting da expressão protéica das subunidades β_1 em uretra (A) e subunidades α_1 e β_1 em bexiga (B e C) de camundongos controle e obesos após o tratamento crônico com BAY 60-2770 (1 mg/kg/dia).

Dados apresentados como média \pm EPM (n=5 - 10). *P <0,05 em relação aos demais grupos.

3.2.3.3. Espécies Reativas de Oxigênio

Os níveis de ânion superóxido mostraram-se significativamente maiores em uretra (Figura 20 A) e bexiga (Figura 20 B) de camundongos obesos em relação ao grupo controle. O tratamento com BAY 60-2770 restaurou a produção exacerbada de ROS na uretra de camundongo obeso (figura 20, A e B), mas não afetou significativamente a produção aumentada de espécies reativas na bexiga dos grupos controle e obeso (Fig 20 , C e D).

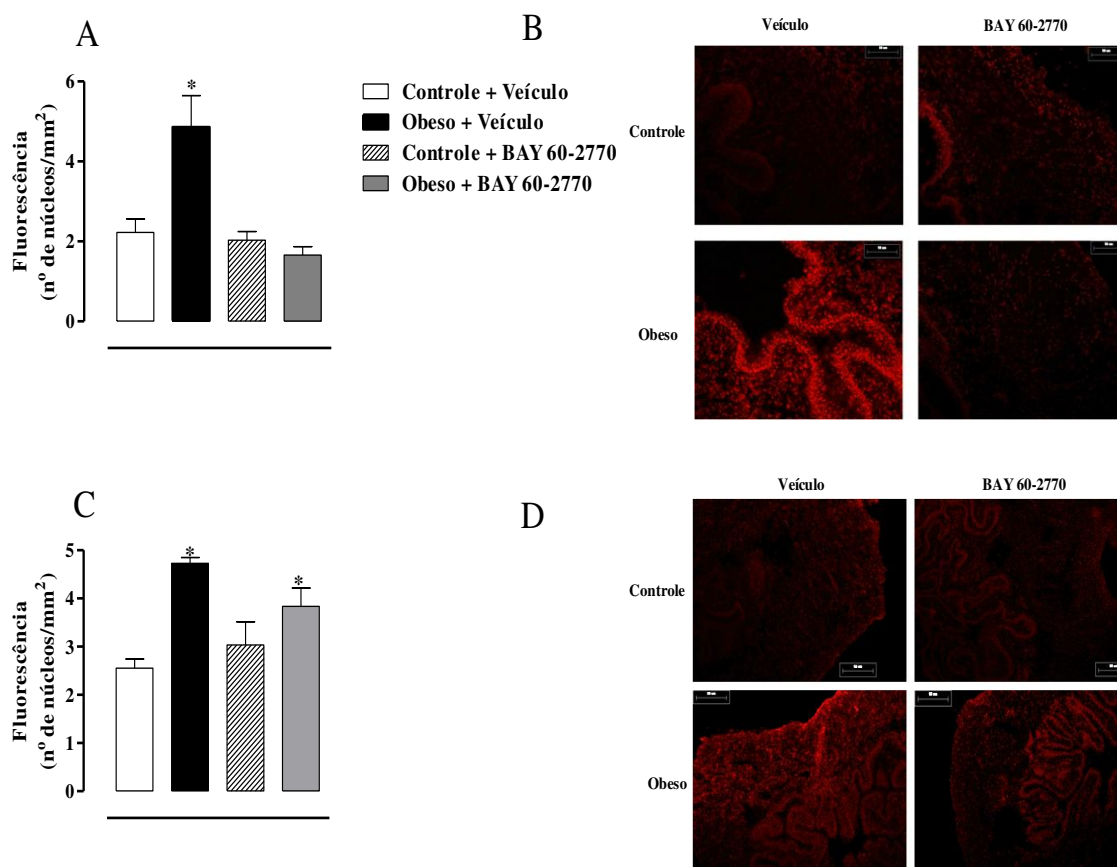


Figura 20. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) medidas por fluorescência pela marcação com hidroetidina em uretra (A e B) e bexiga (C e D) de camundongos controle e obesos tratados ou não com BAY 60-2770 (1 mg/kg/dia). Dados são apresentados como média \pm EPM de Unidade Arbitrária * $p < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo controle

4. DISCUSSÃO

A obesidade é um problema importante de saúde pública que eleva os riscos de complicações urológicas como bexiga hiperativa e incontinência urinária (3, 94, 119, 120). Alterações no perfil urodinâmico e na reatividade da bexiga tem sido confirmados em diferentes modelos animais de obesidade (39, 99, 100, 105). No presente estudo mostramos, de modo geral, que o animal obeso apresenta aumento na frequência de micção e nas contrações involuntárias (estudo cistométrico), assim como hipercontratilidade *in vitro* do detrusor em resposta ao agonista muscarínico, carbacol, e aos agentes independentes de receptores, KCl e CaCl₂. Encontramos também evidências de disfunção uretral nos animais obesos, pois notamos redução do relaxamento uretral em resposta à ativação da via NO-GCs. Constatamos ainda no detrusor e uretra dos obesos uma menor expressão das subunidades de GCs ($\alpha 1$ e/ou $\beta 1$), menor produção de GMPc e aumento da produção de ROS.

Estudo prévio do grupo, usando modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica durante 10 semanas, mostrou elevação do peso corporal e da gordura epididimal assim como resistência à insulina, indicando que o presente modelo reproduz, ao menos parcialmente, as alterações observadas em humanos com síndrome metabólica / obesidade (39). Este estudo prévio mostrou ainda que os camundongos obesos apresentam bexiga hiperativa e hipercontratilidade *in vitro* do detrusor devida a aumento do influxo extracelular de cálcio por meio de canais de Ca²⁺ do tipo L associado a aumento da expressão de PKC no tecido vesical (39). Para o presente estudo, decidimos incluir a uretra em nossos protocolos experimentais, pois como referido anteriormente, este tecido encontra-se largamente negligenciado na literatura quanto as alterações de reatividade em diferentes condições fisiopatológicas. A função principal da uretra é a de manter a continência urinária por meio da contração na fase de armazenamento e de

relaxamento na fase de eliminação (7). Dessa forma, várias causas de bexiga hiperativa podem ser, em princípio, devido a problemas uretrais que secundariamente repercutem no detrusor, não deixando de mencionar que nenhum estudo experimental avaliou até o momento as eventuais disfunções uretrais em modelo de bexiga hiperativa induzida por obesidade.

Doadores de NO, agonistas da GCs e inibidores da PDE5 têm sido bastante empregados para se avaliar as alterações da musculatura lisa vascular e não vascular frente a diferentes condições fisiopatológicas. Em nosso estudo, empregamos, inicialmente, doadores de NO (NaNO₂ acidificado, SNOG e GTN) para se explorar as alterações de reatividade uretral nos animais controles e obesos. Os efeitos biológicos dos nitratos (GTN) e nitrosotióis (SNOG) são atribuídos à formação de NO por vias enzimáticas ou não-enzimáticas. A acidificação do NaNO₂ faz com que ocorra a formação de ácido nitroso, este se decompõe espontaneamente em NO e outros óxidos de nitrogênio (121, 122). Posteriormente, para se avaliar a via *downstream* ao GMPc, empregamos o tadalafil (inibidor da PDE5) e o 8-bromo-GMPc (análogo estável e permeável do GMPc). No grupo controle, mostramos que o NaNO₂ acidificado, SNOG e GTN produziram relaxamento uretral de forma concentração-dependente, sendo o mesmo marcadamente reduzido após a oxidação do grupamento heme da GCs (Fe³⁺) pelo ODQ, confirmando a participação do GMPc no relaxamento uretral. Por outro lado, os animais obesos apresentaram relaxamento uretral significativamente menor e semelhante aos tecidos controles incubados com ODQ, apontando a deficiência na produção de GMPc como provável causa da disfunção uretral no estado obeso. De fato, o GTN elevou acentuadamente os níveis de GMPc no tecido uretral dos controles, mas não dos obesos. É improvável que a deficiência dessa via NO-GCs na uretra de obesos seja

downstream ao GMPc, já que os relaxamentos induzidos por tadalafil e 8-Br-GMPc não foram diferentes entre os grupos controle e obeso. Observamos, ainda, uma menor expressão da subunidade $\beta 1$ da GCs e aumento na produção de ROS no tecido uretral dos obesos. Portanto, hipotetizamos que a disfunção uretral no obeso reside na enzima GCs. Em relação à musculatura lisa detrusora, confirmamos, no presente estudo, o quadro de bexiga hiperativa (estudo cistométrico) bem como a hipercontratilidade *in vitro* do detrusor frente ao carbacol, KCl e CaCl_2 nos animais obesos (39). Complementando este trabalho inicial, mostramos agora no detrusor dos obesos uma redução das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs e menor produção basal de GMPc, assim como aumento significativo de ROS.

Os estimuladores e ativadores da GCs foram desenvolvidos na última década (54, 117). Fazem parte de um novo grupo de moléculas capazes de aumentar a atividade da GCs e, conseqüentemente, de produzir níveis maiores de GMPc, ampliando assim as respostas biológicas mediadas por este segundo mensageiro. A efetividade desses compostos depende do estado oxidativo da enzima. À semelhança do ligante endógeno NO, os estimuladores da GCs, como o BAY 41-2272, ativam a enzima somente quando a mesma se encontra em seu estado reduzido (Fe^{2+}). Por outro lado, os ativadores, como o BAY 60-2770 e BAY 58-2667, acabam por induzir a ativação da enzima preferencialmente quando a mesma está em seu estado oxidado ou mesmo quando o grupamento heme não está presente (117). O aumento na potência dos ativadores de GCs também foi observado em aorta de ratos SHR e artérias do mesocólon de pacientes com diabetes tipo 2 (114). Essa interação positiva entre ativadores da GCs e oxidação da GCs pelo ODQ também foi previamente reportada em célula endotelial suína (114) e corpo cavernoso de rato (115). É por isso que os ativadores da GCs têm sido descritos como

valiosas ferramentas para o tratamento de doenças cardiovasculares, pois é no estado oxidado que supostamente se encontra essa enzima em condições patológicas (115). Porém, até o momento, nunca havia se pensado no uso de ativadores de GCs para o tratamento da disfunção da musculatura lisa não vascular, como a detrusora e uretral em desordens como o LUTS.

Estudo prévio do grupo já havia demonstrado que, em condições fisiológicas, o BAY 41-2272 produz relaxamento de detrusor isolado de camundongos, ratos e coelhos de maneira concentração-dependente. No tecido de coelho, a pré-incubação com ODQ reduziu significativamente os relaxamentos induzidos pelo BAY 41-2272, assim como os níveis de GMPc (56). No presente estudo em camundongos obesos, não avaliamos a resposta do detrusor frente ao BAY 41-2272, pois o camundongos havia sido a espécie animal que menos respondeu a este composto nessa preparação (56). Por isso, partimos para o estudo da musculatura lisa uretral já que a literatura é escassa nesse tecido. O BAY 41-2272 produziu relaxamentos uretrais dependentes da concentração no grupo controle os quais foram significativamente inibidos pela incubação prévia com ODQ. No animal obeso, os relaxamentos uretrais induzidos pelo BAY 41-2272 foram menores do que o grupo controle, sendo os mesmos inalterados pelo ODQ. Estudos anteriores reportaram essa mesma ação inibitória do ODQ frente à estimulação por BAY 41-2770 em aorta (123, 124).

O ativador da GCs, BAY 60-2770, também promoveu relaxamentos uretrais dependentes da concentração nos grupos controle e obeso. Entretanto, diferentemente do estimulador, o BAY 60-2770 teve sua ação relaxante potencializada na uretra controle pré-incubada com ODQ e em uretras de animais obesos. Esse resultado foi consistente com os níveis maiores de GMPc na uretra após a incubação do BAY 60-2770 na

presença do ODQ em animais controle. Esse nível permaneceu elevado em uretra de animais obesos, mesmo na ausência do ODQ.

O tratamento crônico de ratos deficientes crônicos de NO com BAY 41-2272 reverte a hipertensão arterial e as disfunções urodinâmicas neste modelo animal (57). Visto que a musculatura lisa detrusora e uretral do animal obeso está também associada à deficiência da via NO-GCs-GMPc, decidimos, na segunda parte deste trabalho, estudar o efeito do tratamento prolongado com BAY 60-2770 nas alterações miccionais do animal obeso. Como referido anteriormente, acredita-se que a degradação vascular da GCs em condições de síndrome metabólica / obesidade seja devido à produção excessiva de espécies reativas (125), não deixando de mencionar que o BAY 60-2770 é capaz de reativar a GCs oxidada (114).

O tratamento via oral com BAY 60-2770, por duas semanas, restaurou o perfil cistométrico, normalizou a hipercontratibilidade da bexiga e o relaxamento uretral dos obesos, sem modificar as respostas funcionais no animal controle. Por sua provável capacidade de se ligar na GCs e promover a estabilização dessa enzima (114, 125), o BAY 60-2770 foi capaz de reverter a expressão das sub-unidades $\alpha 1$ e/ou $\beta 1$ da GCs no detrusor e uretra. O efeito do BAY 60-2770 também favoreceu a formação de GMPc na bexiga de animais obesos (não foi possível medirmos os níveis de GMPc na uretra destes animais por problemas técnicos surgidos na ocasião).

O estresse oxidativo crônico é fator central em doenças endócrino-metabólicas e cardiovasculares, resultando em uma menor biodisponibilidade de NO e deficiência na perfusão sanguínea de tecidos (114, 126). O NO possui uma atividade inibitória sobre os nervos aferentes via GCs-PKG e musculatura lisa; portanto, a falta desse agente inibitório pode contribuir para a hiperatividade da bexiga e disfunção uretral observada em

camundongos obesos (127). O aumento do estresse oxidativo no trato urinário inferior já foi observado em infecções do trato urinário, células tumorais de bexiga, isquemia/reperfusão vesical e bexigas de animais idosos (128-131). Nossos achados mostram um aumento na produção de ROS em bexiga e uretra de animais obesos. Como também existe uma deficiência na via do NO nesses tecidos, podemos levantar a hipótese que os mesmos têm uma perfusão sanguínea prejudicada e, portanto, uma maior formação de ROS. Esse desequilíbrio oxidativo pode oxidar a GCs, e por meio de S-nitrosilação resultar em menor expressão dessa proteína (132, 133). Essa menor expressão já foi relatada em músculo liso vascular de ratos hipertensos (134, 135) e coelhos hipercolesterolêmicos, provavelmente devido a um estado crônico de estresse oxidativo (136, 137). Em nosso estudo, obtivemos resultados divergentes quando analisamos a produção de ROS. O tratamento prolongado com BAY 60-2770 foi capaz de diminuir o estresse oxidativo na uretra, mas não na bexiga. A densidade de nervos que expressam iNOS é maior no trígono e na uretra proximal, sendo a via do NO mais ativa na uretra quando comparado com a bexiga (52). Outro estudo mostrou que a uretra é mais sensível à injúria isquêmica que a bexiga (138). Portanto, se pensarmos que a formação de ROS está associada ao grau de perfusão sanguínea tecidual, é possível especular que o BAY 60-2770 seja mais eficiente em produzir vasodilatação do leito vascular uretral, facilitando assim a remoção das espécies reativas locais.

O modelo murino de obesidade induzida por dieta hiperlipídica por 10-12 semanas relatado neste trabalho está associado com aumento de ganho ponderal e de glicose de jejum, assim como de resistência à insulina (39). O tratamento dos animais obesos com o agente anti-hiperglicemiante, metformina, restabelece tanto a resistência à insulina quanto as disfunções miccionais (135). Nosso estudo mostrou que o tratamento

prolongado com BAY 60-2770 não altera o ganho de peso ou o perfil glicêmico dos obesos, indicando que a melhora do perfil miccional não se deve à eventual reversão da resistência à insulina neste animal.

É interessante que o BAY 60-2770 diminuiu os valores do perfil lipídico (colesterol total, triglicérides e/ou LDL) em controles e obesos. Entretanto, a redução dos níveis de colesterol total e de triglicérides proporcionada pelo BAY 60-2770 foi similar em ambos os grupos. Visto que o BAY 60-2770 não modifica os parâmetros funcionais no grupo controle, é de supor que a melhora da disfunção miccional proporcionada por este fármaco nos obesos não seja consequência da redução do perfil lipídico associado à obesidade. Entretanto, como já foi relatado anteriormente uma correlação positiva entre o aumento de GMPc plasmático e melhora no perfil lipídico (139), não podemos descartar que o aumento dos níveis de GMPc tenha contribuído para melhora do fluxo sanguíneo local e restauração da função do trato urinário inferior.

Em resumo, nossos dados mostram que duas semanas de tratamento com BAY 60-2770 foi capaz de elevar os níveis de GMPc e de restaurar a expressão das subunidades α_1 e/ou β_1 da GCs na bexiga e uretra, resultando em uma melhora na disfunção vesical. Na uretra observamos também um restabelecimento dos níveis de ROS em animais obesos, que deve contribuir para a melhora da disfunção miccional. O tratamento de LUTS permanece restrito a algumas classes de drogas como antimuscarínicos e, mais recentemente, agonistas dos receptores adrenérgicos β_3 (mirabegron) (140, 141). O presente trabalho destaca a possibilidade de se utilizar ativadores da GCs no tratamento de LUTS decorrentes da obesidade.

5. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

- Existe disfunção do trato urinário inferior de camundongos obesos no qual a deficiência da via NO-GMPc parece contribuir para esta desordem.
- A administração oral do ativador BAY 60-2770 normalizou a atividade do detrusor e uretra.
- O ativador da GCs pode ser uma opção inovadora para o tratamento de disfunções do trato urinário inferior secundária à síndrome metabólica / obesidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011;377(9765):557-67. Epub 2011/02/08.
2. Steers WD. Food for thought: obesity as the major contributing factor for most urological disorders. *J Urol*. 2009;181(5):1983-4. Epub 2009/03/17.
3. Liu RT, Chung MS, Lee WC, Chang SW, Huang ST, Yang KD, et al. Prevalence of overactive bladder and associated risk factors in 1359 patients with type 2 diabetes. *Urology*. 2011;78(5):1040-5. Epub 2011/10/01.
4. Laven BA, Orsini N, Andersson SO, Johansson JE, Gerber GS, Wolk A. Birth weight, abdominal obesity and the risk of lower urinary tract symptoms in a population based study of Swedish men. *J Urol*. 2008;179(5):1891-5; discussion 5-6. Epub 2008/03/21.
5. Richter HE, Kenton K, Huang L, Nygaard I, Kraus S, Whitcomb E, et al. The impact of obesity on urinary incontinence symptoms, severity, urodynamic characteristics and quality of life. *J Urol*. 2010;183(2):622-8. Epub 2009/12/19.
6. Teloken C, Caraver F, Weber FA, Teloken PE, Moraes JF, Sogari PR, et al. Overactive bladder: prevalence and implications in Brazil. *Eur Urol*. 2006;49(6):1087-92. Epub 2006/02/25.
7. Fowler CJ, Griffiths D, de Groat WC. The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(6):453-66. Epub 2008/05/21.
8. Pradidarcheep W, Wallner C, Dabhoiwala NF, Lamers WH. Anatomy and histology of the lower urinary tract. *Handb Exp Pharmacol*. 2011(202):117-48. Epub 2011/02/04.
9. de Groat WC. The urothelium in overactive bladder: Passive bystander or active participant? *Urology*. 2004;64(6A):7-11.
10. Canda AE, Cinar MG, Turna B, Sahin MO. Pharmacologic targets on the female urethra. *Urologia Internationalis*. 2008;80(4):341-54.
11. Gosling JA, Dixon JS, Lendon RG. The autonomic innervation of the human male and female bladder neck and proximal urethra. *J Urol*. 1977;118(2):302-5. Epub 1977/08/01.
12. Elbadawi A. Ultrastructure of vesicourethral innervation. II. Postganglionic axoaxonal synapses in intrinsic innervation of the vesicourethral lissosphincter: a new structural and functional concept in micturition. *J Urol*. 1984;131(4):781-90. Epub 1984/04/01.

13. Turner WH, Brading AF. Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Pharmacol Ther.* 1997;75(2):77-110. Epub 1997/08/01.
14. Anderson KE. Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev.* 1993;45(3):253-308. Epub 1993/09/01.
15. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2004;84(3):935-86. Epub 2004/07/23.
16. de Groat WC, Fraser MO, Yoshiyama M, Smerin S, Tai C, Chancellor MB, et al. Neural control of the urethra. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2001(207):35-43; discussion 106-25. Epub 2001/06/21.
17. de Groat WC. Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 2:S25-40. Epub 2006/02/09.
18. Coyne KS, Sexton CC, Irwin DE, Kopp ZS, Kelleher CJ, Milsom I. The impact of overactive bladder, incontinence and other lower urinary tract symptoms on quality of life, work productivity, sexuality and emotional well-being in men and women: results from the EPIC study. *BJU Int.* 2008;101(11):1388-95. Epub 2008/05/06.
19. Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, et al. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Brit J Pharmacol.* 2006;148(5):565-78.
20. Holstege G, Mouton LJ. Central nervous system control of micturition. *International review of neurobiology.* 2003;56:123-45. Epub 2003/12/31.
21. Kavia RB, Dasgupta R, Fowler CJ. Functional imaging and the central control of the bladder. *J Comp Neurol.* 2005;493(1):27-32. Epub 2005/10/29.
22. James MJ, Birmingham AT, Hill SJ. Partial mediation by nitric oxide of the relaxation of human isolated detrusor strips in response to electrical field stimulation. *Br J Clin Pharmacol.* 1993;35(4):366-72. Epub 1993/04/01.
23. Smith PP, McCrery RJ, Appell RA. Current trends in the evaluation and management of female urinary incontinence. *CMAJ.* 2006;175(10):1233-40. Epub 2006/11/14.
24. Bennett BC, Kruse MN, Roppolo JR, Flood HD, Fraser M, Degroat WC. Neural Control of Urethral Outlet Activity in-Vivo - Role of Nitric-Oxide. *J Urology.* 1995;153(6):2004-9.
25. Yokoyama O, Yoshiyama M, Namiki M, de Groat WC. Role of the forebrain in bladder overactivity following cerebral infarction in the rat. *Exp Neurol.* 2000;163(2):469-76. Epub 2000/06/02.

26. Tanaka Y, Horinouchi T, Koike K. New insights into beta-adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(7):503-14. Epub 2005/07/20.
27. Uchida H, Shishido K, Nomiya M, Yamaguchi O. Involvement of cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms in the relaxation of rat detrusor muscle via beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*. 2005;518(2-3):195-202. Epub 2005/08/02.
28. Frazier EP, Peters SL, Braverman AS, Ruggieri MR, Sr., Michel MC. Signal transduction underlying the control of urinary bladder smooth muscle tone by muscarinic receptors and beta-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2008;377(4-6):449-62. Epub 2007/12/07.
29. Seguchi H, Nishimura J, Zhou Y, Niuro N, Kumazawa J, Kanaide H. Expression of beta3-adrenoceptors in rat detrusor smooth muscle. *J Urol*. 1998;159(6):2197-201. Epub 1998/05/23.
30. Yamaguchi O, Chapple CR. Beta3-adrenoceptors in urinary bladder. *Neurourol Urodyn*. 2007;26(6):752-6. Epub 2007/06/30.
31. Yamazaki Y, Takeda H, Akahane M, Igawa Y, Nishizawa O, Ajisawa Y. Species differences in the distribution of beta-adrenoceptor subtypes in bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1998;124(3):593-9. Epub 1998/07/01.
32. Michel MC, Vrydag W. Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 2:S88-119. Epub 2006/02/09.
33. Bennett BC, Kruse MN, Roppolo JR, Flood HD, Fraser M, de Groat WC. Neural control of urethral outlet activity in vivo: role of nitric oxide. *J Urol*. 1995;153(6):2004-9. Epub 1995/06/01.
34. Sigala S, Mirabella G, Peroni A, Pezzotti G, Simeone C, Spano P, et al. Differential gene expression of cholinergic muscarinic receptor subtypes in male and female normal human urinary bladder. *Urology*. 2002;60(4):719-25. Epub 2002/10/19.
35. Yamaguchi O, Shishido K, Tamura K, Ogawa T, Fujimura T, Ohtsuka M. Evaluation of mRNAs encoding muscarinic receptor subtypes in human detrusor muscle. *J Urol*. 1996;156(3):1208-13. Epub 1996/09/01.
36. Murthy KS, Zhou H, Grider JR, Brautigan DL, Eto M, Makhlof GM. Differential signalling by muscarinic receptors in smooth muscle: m2-mediated inactivation of myosin light chain kinase via Gi3, Cdc42/Rac1 and p21-activated kinase 1 pathway, and m3-mediated MLC20 (20 kDa regulatory light chain of myosin II) phosphorylation via Rho-associated kinase/myosin phosphatase targeting subunit 1 and protein kinase C/CPI-17 pathway. *Biochem J*. 2003;374(Pt 1):145-55. Epub 2003/05/08.

37. Fleichman M, Schneider T, Fetscher C, Michel MC. Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. II. Protein kinases. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(1):54-8. Epub 2003/10/09.
38. Braverman AS, Doumanian LR, Ruggieri MR, Sr. M2 and M3 muscarinic receptor activation of urinary bladder contractile signal transduction. II. Denervated rat bladder. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(2):875-80. Epub 2005/10/26.
39. Leiria LO, Sollon C, Calixto MC, Lintomen L, Monica FZ, Anhe GF, et al. Role of PKC and CaV1.2 in detrusor overactivity in a model of obesity associated with insulin resistance in mice. *PLoS One.* 2012;7(11):e48507. Epub 2012/11/13.
40. Yoshida M, Nishi K, Machida J, Sakiyama H, Ikeda K, Ueda S. Effects of phorbol ester on lower urinary tract smooth muscles in rabbits. *Eur J Pharmacol.* 1992;222(2-3):205-11. Epub 1992/11/10.
41. Takahashi R, Nishimura J, Hirano K, Seki N, Naito S, Kanaide H. Ca²⁺ sensitization in contraction of human bladder smooth muscle. *J Urol.* 2004;172(2):748-52. Epub 2004/07/13.
42. Burnstock G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(4):182-8. Epub 2001/04/03.
43. Burnstock G, Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295(3):862-9. Epub 2000/11/18.
44. Ford AP, Cockayne DA. ATP and P2X purinoceptors in urinary tract disorders. *Handb Exp Pharmacol.* 2011(202):485-526. Epub 2011/02/04.
45. Derbyshire ER, Marletta MA. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annual review of biochemistry.* 2012;81:533-59. Epub 2012/03/13.
46. Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* 1996;50(1):1-5. Epub 1996/07/01.
47. Gao Y. The multiple actions of NO. *Pflugers Arch.* 2010;459(6):829-39. Epub 2009/12/22.
48. Andersson KE, Wein AJ. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4):581-631. Epub 2004/12/17.
49. Wheeler MA, Ayyagari RR, Wheeler GL, Weiss RM. Regulation of cyclic nucleotides in the urinary tract. *J Smooth Muscle Res.* 2005;41(1):1-21. Epub 2005/04/28.

50. Kuhn R, Uckert S, Stief CG, Truss MC, Lietz B, Bischoff E, et al. Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide-dependent pathways. *Urol Res.* 2000;28(2):110-5. Epub 2000/06/13.
51. Qiu Y, Kraft P, Craig EC, Liu X, Haynes-Johnson D. Identification and functional study of phosphodiesterases in rat urinary bladder. *Urol Res.* 2001;29(6):388-92. Epub 2002/02/07.
52. Uckert S, Kuczyk MA. Cyclic nucleotide metabolism including nitric oxide and phosphodiesterase-related targets in the lower urinary tract. *Handb Exp Pharmacol.* 2011(202):527-42. Epub 2011/02/04.
53. Galle J, Zabel U, Hubner U, Hatzelmann A, Wagner B, Wanner C, et al. Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol.* 1999;127(1):195-203. Epub 1999/06/16.
54. Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature.* 2001;410(6825):212-5. Epub 2001/03/10.
55. Stasch JP, Hobbs AJ. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol.* 2009(191):277-308. Epub 2008/12/18.
56. Bau FR, Monica FZ, Priviero FB, Baldissera L, Jr., de Nucci G, Antunes E. Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2010;637(1-3):171-7. Epub 2010/04/20.
57. Monica FZ, Reges R, Cohen D, Silva FH, De Nucci G, D'Ancona CA, et al. Long-term administration of BAY 41-2272 prevents bladder dysfunction in nitric oxide-deficient rats. *Neurourol Urodyn.* 2011;30(3):456-60. Epub 2011/03/18.
58. Schmidt HH, Schmidt PM, Stasch JP. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol.* 2009(191):309-39. Epub 2008/12/18.
59. Gur S, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Exploring the potential of NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase for the medical treatment of erectile dysfunction. *Curr Pharm Des.* 2010;16(14):1619-33. Epub 2010/03/06.
60. Steers WD. Overactive bladder (OAB): what we thought we knew and what we know today. *Eur Urol Suppl.* 2002;1(4):3-10.
61. Staskin DR. Overactive bladder in the elderly: a guide to pharmacological management. *Drugs Aging.* 2005;22(12):1013-28. Epub 2005/12/21.

62. Lawrence JM, Lukacz ES, Liu IL, Nager CW, Luber KM. Pelvic floor disorders, diabetes, and obesity in women: findings from the Kaiser Permanente Continence Associated Risk Epidemiology Study. *Diabetes Care*. 2007;30(10):2536-41. Epub 2007/07/11.
63. Kennelly MJ, Devoe WB. Overactive bladder: pharmacologic treatments in the neurogenic population. *Rev Urol*. 2008;10(3):182-91. Epub 2008/10/07.
64. Teleman PM, Lidfeldt J, Nerbrand C, Samsioe G, Mattiasson A. Overactive bladder: prevalence, risk factors and relation to stress incontinence in middle-aged women. *BJOG*. 2004;111(6):600-4. Epub 2004/06/17.
65. Kirby MG, Wagg A, Cardozo L, Chapple C, Castro-Diaz D, de Ridder D, et al. Overactive bladder: Is there a link to the metabolic syndrome in men? *Neurourol Urodyn*. 2010;29(8):1360-4. Epub 2010/07/01.
66. Abrams P. Describing bladder storage function: overactive bladder syndrome and detrusor overactivity. *Urology*. 2003;62(5 Suppl 2):28-37; discussion 40-2. Epub 2003/12/10.
67. Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, Abrams P, Herzog AR, Corey R, et al. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol*. 2003;20(6):327-36. Epub 2003/06/18.
68. Milsom I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thuroff J, Wein AJ. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *Bju International*. 2001;87(9):760-6.
69. Wein AJ, Rackley RR. Overactive bladder: A better understanding of pathophysiology, diagnosis and management. *J Urology*. 2006;175(3):S5-S10.
70. Hegde SS. Muscarinic receptors in the bladder: from basic research to therapeutics. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 2:S80-7. Epub 2006/02/09.
71. Soler R, Andersson KE, Chancellor MB, Chapple CR, de Groat WC, Drake MJ, et al. Future direction in pharmacotherapy for non-neurogenic male lower urinary tract symptoms. *Eur Urol*. 2013;64(4):610-21. Epub 2013/05/29.
72. Hutcheson R, Rocic P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. *Experimental diabetes research*. 2012;2012:271028. Epub 2012/07/26.
73. Lopes HF, Egan BM. Autonomic dysregulation and the metabolic syndrome: pathologic partners in an emerging global pandemic. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87(4):538-47. Epub 2006/11/28.

74. Moraes AC, Fulaz CS, Netto-Oliveira ER, Reichert FF. [Prevalence of metabolic syndrome in adolescents: a systematic review]. *Cad Saude Publica*. 2009;25(6):1195-202. Epub 2009/06/09. Prevalencia de sindrome metabolica em adolescentes: uma revisao sistematica.
75. Balkau B, Vernay M, Mhamdi L, Novak M, Arondel D, Vol S, et al. The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabetes Metab*. 2003;29(5):526-32. Epub 2003/11/25.
76. Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes Care*. 2003;26(3):575-81.
77. Hossain P, Kawar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med*. 2007;356(3):213-5. Epub 2007/01/19.
78. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*. 2005;85(2):571-633. Epub 2005/03/25.
79. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med*. 2003;163(4):427-36. Epub 2003/02/18.
80. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91. Epub 1993/01/01.
81. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(4):798-808. Epub 2007/04/12.
82. Sclafani A. Diet-Induced Obesity in Rodents. *Prog Obes R*. 1991:441-4.
83. Ikemoto S, Takahashi M, Tsunoda N, Maruyama K, Itakura H, Ezaki O. High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: Differential effects of dietary oils. *Metabolism-Clinical and Experimental*. 1996;45(12):1539-46.
84. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiology & Behavior*. 2004;81(2):243-8.
85. Takahashi N, Patel HR, Qi Y, Dushay J, Ahima RS. Divergent effects of leptin in mice susceptible or resistant to obesity. *Hormone and Metabolic Research*. 2002;34(11-12):691-7.

86. Prpic V, Watson PM, Frampton IC, Sabol MA, Jezek GE, Gettys TW. Differential mechanisms and development of leptin resistance in A/J versus C57BL/6J mice during diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2003;144(4):1155-63.
87. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114(12):1752-61. Epub 2004/12/16.
88. Poladia DP, Bauer JA. Early cell-specific changes in nitric oxide synthases, reactive nitrogen species formation, and ubiquitinylation during diabetes-related bladder remodeling. *Diabetes Metab Res Rev*. 2003;19(4):313-9. Epub 2003/07/25.
89. Cavalca V, Veglia F, Squellerio I, Marenzi G, Minardi F, De Metrio M, et al. Glutathione, vitamin E and oxidative stress in coronary artery disease: relevance of age and gender. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(4):267-72. Epub 2009/03/19.
90. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite - Implications for Endothelial Injury from Nitric-Oxide and Superoxide. *P Natl Acad Sci USA*. 1990;87(4):1620-4.
91. Lassegue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(4):653-61. Epub 2009/11/17.
92. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdai A, Vaziri ND. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism*. 2006;55(7):928-34.
93. Richter HE, Burgio KL, Clements RH, Goode PS, Redden DT, Varner RE. Urinary and anal incontinence in morbidly obese women considering weight loss surgery. *Obstetrics and Gynecology*. 2005;106(6):1272-7.
94. Kupelian V, McVary KT, Kaplan SA, Hall SA, Link CL, Aiyer LP, et al. Association of lower urinary tract symptoms and the metabolic syndrome: results from the Boston area community health survey. *J Urol*. 2013;189(1 Suppl):S107-14; discussion S15-6. Epub 2012/12/19.
95. Steers WD. Food for Thought: Obesity as the Major Contributing Factor for Most Urological Disorders. *J Urology*. 2009;181(5):1983-4.
96. Irwin DE, Kopp ZS, Agatep B, Milsom I, Abrams P. Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction. *BJU Int*. 2011;108(7):1132-8. Epub 2011/01/15.
97. Rohrmann S, Smit E, Giovannucci E, Platz EA. Association between markers of the metabolic syndrome and lower urinary tract symptoms in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Int J Obesity*. 2005;29(3):310-6.

98. Nobe K, Yamazaki T, Kumai T, Okazaki M, Iwai S, Hashimoto T, et al. Alterations of glucose-dependent and -independent bladder smooth muscle contraction in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(2):631-42. Epub 2007/11/03.
99. Gasbarro G, Lin DL, Vurbic D, Quisno A, Kinley B, Daneshgari F, et al. Voiding function in obese and type 2 diabetic female rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298(1):F72-7. Epub 2009/11/06.
100. Lee WC, Chuang YC, Chiang PH, Chien CT, Yu HJ, Wu CC. Pathophysiological studies of overactive bladder and bladder motor dysfunction in a rat model of metabolic syndrome. *J Urol.* 2011;186(1):318-25. Epub 2011/05/24.
101. Leiria LO, Sollon C, Calixto MC, Lintomen L, Monica FZ, Anhe GF, et al. Role of PKC and CaV1.2 in Detrusor Overactivity in a Model of Obesity Associated with Insulin Resistance in Mice. *PLoS One.* 2012;7(11).
102. Tong YC, Cheng JT. Alterations of M2,3-muscarinic receptor protein and mRNA expression in the bladder of the fructose fed obese rat. *J Urol.* 2007;178(4 Pt 1):1537-42. Epub 2007/08/21.
103. Lee WC, Chien CT, Yu HJ, Lee SW. Bladder dysfunction in rats with metabolic syndrome induced by long-term fructose feeding. *J Urol.* 2008;179(6):2470-6. Epub 2008/04/25.
104. Galgani J, Ravussin E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int J Obes (Lond).* 2008;32 Suppl 7:S109-19. Epub 2009/01/16.
105. Rahman NU, Phonsombat S, Bochinski D, Carrion RE, Nunes L, Lue TF. An animal model to study lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction: the hyperlipidaemic rat. *BJU Int.* 2007;100(3):658-63. Epub 2007/06/26.
106. Leiria LO, Sollon C, Bau FR, Monica FZ, D'Ancona CL, De Nucci G, et al. Insulin relaxes bladder via PI3K/AKT/eNOS pathway activation in mucosa: unfolded protein response-dependent insulin resistance as a cause of obesity-associated overactive bladder. *J Physiol.* 2013;591(Pt 9):2259-73. Epub 2013/03/13.
107. Beshay E, Carrier S. Oxidative stress plays a role in diabetes-induced bladder dysfunction in a rat model. *Urology.* 2004;64(5):1062-7. Epub 2004/11/10.
108. Azadzoi KM, Yalla SV, Siroky MB. Oxidative stress and neurodegeneration in the ischemic overactive bladder. *J Urol.* 2007;178(2):710-5. Epub 2007/06/19.
109. Kirpatovsky VI, Plotnikov EY, Mudraya IS, Golovanov SA, Drozhzheva VV, Khromov RA, et al. Role of oxidative stress and mitochondria in onset of urinary bladder dysfunction under acute urine retention. *Biochemistry (Mosc).* 2013;78(5):542-8. Epub 2013/07/16.

110. Yamaguchi O, Nomiya M, Andersson KE. Functional consequences of chronic bladder ischemia. *Neurourol Urodyn.* 2014;33(1):54-8. Epub 2013/12/03.
111. Kaplan SA. Male pelvic health: a urological call to arms. *J Urol.* 2006;176(6 Pt 1):2351-2. Epub 2006/11/07.
112. Ponholzer A, Temml C, Wehrberger C, Marszalek M, Madersbacher S. The association between vascular risk factors and lower urinary tract symptoms in both sexes. *Eur Urol.* 2006;50(3):581-6. Epub 2006/03/08.
113. Andersson KE, de Groat WC, McVary KT, Lue TF, Maggi M, Roehrborn CG, et al. Tadalafil for the treatment of lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: pathophysiology and mechanism(s) of action. *Neurourol Urodyn.* 2011;30(3):292-301. Epub 2011/02/02.
114. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H SA, Meurer S, et al. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest.* 2006;116(9):2552-61. Epub 2006/09/07.
115. Lasker GF, Pankey EA, Frink TJ, Zeitzer JR, Walter KA, Kadowitz PJ. The sGC activator BAY 60-2770 has potent erectile activity in the rat. *Am J Physiol-Heart C.* 2013;304(12):H1670-H9.
116. Knorr A, Hirth-Dietrich C, Alonso-Alija C, Harter M, Hahn M, Keim Y, et al. Nitric oxide-independent activation of soluble guanylate cyclase by BAY 60-2770 in experimental liver fibrosis. *Arzneimittelforschung.* 2008;58(2):71-80. Epub 2008/04/17.
117. Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Haerter M, et al. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol.* 2002;136(5):773-83. Epub 2002/06/28.
118. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-51. Epub 1993/11/01.
119. Rohrmann S, Smit E, Giovannucci E, Platz EA. Associations of obesity with lower urinary tract symptoms and noncancer prostate surgery in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol.* 2004;159(4):390-7. Epub 2004/02/11.
120. Rohrmann S, Smit E, Giovannucci E, Platz EA. Association between markers of the metabolic syndrome and lower urinary tract symptoms in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Int J Obes (Lond).* 2005;29(3):310-6. Epub 2005/01/27.

121. Wang PG, Xian M, Tang X, Wu X, Wen Z, Cai T, et al. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chemical reviews*. 2002;102(4):1091-134. Epub 2002/04/11.
122. Lundberg JO, Weitzberg E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):915-22. Epub 2005/03/05.
123. Priviero FB, Baracat JS, Teixeira CE, Claudino MA, De Nucci G, Antunes E. Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(9):728-34. Epub 2005/09/22.
124. Teixeira CE, Priviero FB, Todd J, Jr., Webb RC. Vasorelaxing effect of BAY 41-2272 in rat basilar artery: involvement of cGMP-dependent and independent mechanisms. *Hypertension*. 2006;47(3):596-602. Epub 2006/01/05.
125. Hoffmann LS, Schmidt PM, Keim Y, Schaefer S, Schmidt HH, Stasch JP. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br J Pharmacol*. 2009;157(5):781-95. Epub 2009/05/27.
126. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S170-80. Epub 2008/02/15.
127. Kanai A, Zabarova I, Oefelein M, Radziszewski P, Ikeda Y, Andersson KE. Mechanisms of action of botulinum neurotoxins, beta3-adrenergic receptor agonists, and PDE5 inhibitors in modulating detrusor function in overactive bladders: ICI-RS 2011. *Neurourol Urodyn*. 2012;31(3):300-8. Epub 2012/01/26.
128. Olsson LE, Wheeler MA, Sessa WC, Weiss RM. Bladder instillation and intraperitoneal injection of *Escherichia coli* lipopolysaccharide up-regulate cytokines and iNOS in rat urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;284(3):1203-8. Epub 1998/03/13.
129. Yalcin O, Karatas F, Erulas FA, Ozdemir E. The levels of glutathione peroxidase, vitamin A, E, C and lipid peroxidation in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int*. 2004;93(6):863-6. Epub 2004/03/31.
130. Saito M, Suzuki H, Yamada M, Miyagawa I. Preventive effect of long-chain fatty alcohol on ischemia-reperfusion injury in the rat bladder. *Eur J Pharmacol*. 2002;454(1):81-4. Epub 2002/11/01.
131. Perse M, Injac R, Erman A. Oxidative status and lipofuscin accumulation in urothelial cells of bladder in aging mice. *PLoS One*. 2013;8(3):e59638. Epub 2013/03/26.

132. Sayed N, Baskaran P, Ma X, van den Akker F, Beuve A. Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(30):12312-7. Epub 2007/07/20.
133. Mayer B, Kleschyov AL, Stessel H, Russwurm M, Munzel T, Koesling D, et al. Inactivation of soluble guanylate cyclase by stoichiometric S-nitrosation. *Mol Pharmacol*. 2009;75(4):886-91. Epub 2008/12/31.
134. Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HH. Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1999;85(6):534-41. Epub 1999/09/17.
135. Kloss S, Bouloumie A, Mulsch A. Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension*. 2000;35(1 Pt 1):43-7. Epub 2000/01/21.
136. Priviero FB, Zemse SM, Teixeira CE, Webb RC. Oxidative stress impairs vasorelaxation induced by the soluble guanylyl cyclase activator BAY 41-2272 in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2009;22(5):493-9. Epub 2009/02/28.
137. Kagota S, Maruyama K, Tada Y, Fukushima K, Umetani K, Wakuda H, et al. Chronic oxidative-nitrosative stress impairs coronary vasodilation in metabolic syndrome model rats. *Microvasc Res*. 2013;88:70-8. Epub 2013/04/11.
138. Bratslavsky G, Kogan B, Levin RM. Urethra is more sensitive to ischemia than bladder: evidence from an in vitro rat study. *J Urol*. 2001;165(6 Pt 1):2086-90. Epub 2001/05/24.
139. Zhu Y, Xia M, Yang Y, Liu F, Li Z, Hao Y, et al. Purified anthocyanin supplementation improves endothelial function via NO-cGMP activation in hypercholesterolemic individuals. *Clin Chem*. 2011;57(11):1524-33. Epub 2011/09/20.
140. Monica FZ, Bricola AA, Bau FR, Freitas LL, Teixeira SA, Muscara MN, et al. Long-term nitric oxide deficiency causes muscarinic supersensitivity and reduces beta(3)-adrenoceptor-mediated relaxation, causing rat detrusor overactivity. *Br J Pharmacol*. 2008;153(8):1659-68. Epub 2008/02/26.
141. Andersson KE, Martin N, Nitti V. Selective beta(3)-adrenoceptor agonists for the treatment of overactive bladder. *J Urol*. 2013;190(4):1173-80. Epub 2013/03/06.