

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

Universidade do Porto

Mestrado Integrado em Medicina

Tese de Mestrado Integrado em Medicina

**SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NUM MODELO DE BEXIGA
HIPERACTIVA NO RATO *IN VIVO***

José Emanuel Gomes Marinhos

Orientador: Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá

Co-orientador: Dr. Miguel Silva Ramos

Porto e ICBAS, Junho de 2009

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

Universidade do Porto

Mestrado Integrado em Medicina

Tese de Mestrado Integrado em Medicina

**SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NUM MODELO DE BEXIGA
HIPERACTIVA NO RATO *IN VIVO***

José Emanuel Gomes Marinhos

Artigo científico para obtenção do grau de Mestre em Medicina pela
Universidade do Porto.

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia, Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB), do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar – Universidade do Porto sob a orientação científica do Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá (Professor Catedrático de Farmacologia), em colaboração com o Serviço de Urologia do Centro Hospitalar do Porto, E.P.E. (HSA) sob a co-orientação do Dr. Miguel Silva Ramos (Assistente Hospitalar de Urologia).

Porto e ICBAS, Junho de 2009

Dedico esta tese à minha avó, Ermelinda da Conceição

AGRADECIMENTOS

Desde já gostaria de agradecer todo o apoio e disponibilidade do Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá, cuja capacidade para transmitir conhecimentos assumiu a importância que um trabalho deste tipo tem: a de desenvolvimento de novas competências que nem sempre o curso de Medicina tem.

Ao Dr. Miguel Silva Ramos, por todo o apoio e incentivo que transmitiu ao longo de todo o trabalho.

Um agradecimento especial à Dra. Margarida Duarte-Araújo e Dr. Miguel Faria pelo ensinamento na manipulação dos animais.

Ao Diogo Monteiro, meu colega e amigo de trabalho, por toda a colaboração e pela troca de conhecimentos.

A todos os funcionários, professores e técnicos do laboratório e Biotério aqui fica um agradecimento por todo o apoio e dedicação.

Aos meus colegas e amigos do laboratório ficam momentos de diversão e a partilha de experiências, conhecimentos e opiniões.

A toda a família e amigos, a quem dedico esta tese.

Um agradecimento especial ao patrocínio que o trabalho recebeu da FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia, Ministério da Ciência e Ensino Superior), Caixa Geral de Depósitos e Sociedade Portuguesa de Urologia.

NOTA

Parte do trabalho neste artigo foi apresentado no IJUP 2009 (Encontro de Jovens Investigadores da Universidade do Porto 2009), Congresso Nacional de Uro-neurologia (Aveiro) e 11.º congresso da Sociedade Portuguesa de Neurociências (Braga).

ÍNDICE REMISSIVO

RESUMO / ABSTRACT	1
I. Introdução	5
1.1. Sinalização purinérgica no Tracto Urinário Inferior	5
1.2. Cistometria em condição de irritação vesical	7
1.3. Objectivos	7
II. Material e Métodos	7
2.1. Preparação cirúrgica e monitorização dos animais de experiência	7
2.2. Estudos urodinâmicos e administração de fármacos	8
2.3. Ensaio de luminescência	11
2.4. Análise estatística	12
2.5. Fármacos e soluções usadas	12
III. Resultados	13
3.1. Caracterização do modelo animal de hiperactividade da bexiga induzido através da administração intravesical de ácido acético 0,2% (v/v).	13
3.2. Efeito da inibição da ecto-ATPase pelo ARL 67156 aplicado por via intravesical.	14
3.3. Efeito da Apirase aplicada por via intravesical no modelo de bexiga hiperactiva	14
3.4. Efeito dos receptores P2X no padrão contráctil do modelo de bexiga hiperactiva: Administração intravesical de α,β -meATP	15
3.5. Efeito tónico dos receptores P2 sobre o reflexo miccional	15
3.6. Efeito dos receptores P2X ₁ no padrão contráctil do modelo de bexiga hiperactiva: Administração intravesical de NF 023	17
3.7. Envolvimento dos receptores P2Y ₁ na actividade contráctil do modelo de hiperactividade da bexiga	19
IV. Discussão e Conclusão	20
V. Referências bibliográficas	26

ARTIGO

SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NUM MODELO DE BEXIGA HIPERACTIVA NO RATO *IN VIVO*

Sinalização purinérgica num modelo de bexiga hiperactiva no rato *in vivo*

Gomes-Marinhas J.¹

D. Monteiro¹, N. Silva¹, M. Faria¹, M. Duarte-Araújo¹, M. Silva-Ramos^{1,2}, P. Correia-de-Sá¹

¹ Laboratório de Neurobiologia e Farmacologia, UMIB, ICBAS, UP

² Serviço de Urologia do Hospital de Santo António (CHP, EPE)

L. Prof. Abel Salazar, 2

4099-003 Porto

Portugal

Tel: 351 22 2062243

Fax: 351 22 2062232

RESUMO

O urotélio da bexiga liberta ATP em resposta a estímulos mecânicos (e irritantes químicos). Este nucleótido pode activar fibras nervosas sensitivas suburoteliais responsáveis pelo reflexo miccional. Existem evidências de que a actividade purinérgica (contrações resistentes à atropina) aumenta nos doentes com hiperactividade vesical (e.g. cistite intersticial), embora a fisiopatologia desta entidade clínica seja parcialmente desconhecida.

O objectivo deste trabalho foi o de investigar a libertação de ATP a partir do urotélio vesical e o efeito dos receptores purinérgicos no reflexo miccional num modelo de bexiga hiperactiva no rato *in vivo* produzido pela infusão intravesical de ácido acético.

As experiências foram realizadas *in vivo* em ratos machos da estirpe Wistar (300 – 450g) anestesiados com uretano (dose inicial: 1,2 g/Kg; dose de manutenção: 0,1 g/kg) em respiração espontânea. A cúpula da bexiga foi cateterizada com uma cânula de três vias para infusão de fármacos e medição contínua da pressão intravesical através de um transdutor de pressão. O reflexo miccional foi desencadeado pela distensão da bexiga causada pela infusão contínua de soro fisiológico (0,04 ml/min). O volume-minuto respiratório, o ECG e a pressão intravesical foram registados continuamente através do sistema de aquisição de dados PowerLab[®] (Chart 5, v.4.2 software; AD Instruments, USA). A indução de hiperactividade da bexiga foi efectuada através da irritação urotelial causada pela infusão intravesical de uma solução de ácido acético (0.2% v/v em soro fisiológico). Em algumas das experiências, avaliou-se a actividade eléctrica

sensitiva do nervo pélvico durante o reflexo miccional através de um eléctrodo de registo ligado ao sistema de aquisição de dados PowerLab®.

Estudos de bioluminescência (Enliten ATP kit, Promega, USA), mostraram que a concentração urinária de ATP aumentou ($52 \pm 7\%$, $n=5$) após o reflexo miccional. O teor urinário em ATP foi significativamente ($P < 0.05$) maior após a administração de AA (1%, $297 \pm 25\%$, $n=3$), enquanto a actividade da enzima intracelular, desidrogenase do lactato (DHL), se manteve inalterada. A administração intravesical de ácido acético (AA 0.2% v/v) aumentou a frequência (67%, diminuição do intervalo inter-contracções, ICI) e reduziu a pressão intravesical (58%, PTh) necessária para desencadear um reflexo miccional. O aumento da frequência miccional causado pelo AA (0,2% v/v) foi acentuado pela infusão intravesical do agonista dos receptores P2X₁ e P2X₃, alfa,beta-metilenoATP (30 μ M), e também pelo inibidor da ecto-ATPase, ARL 67156 (200 μ M). O antagonista dos receptores P2, PPADS, aplicado tanto por via intravesical (30 μ M) como por via intravenosa (17 μ mol/Kg), reduziu a hiperactividade da bexiga induzida pelo AA (0,2% v/v). Mas ao contrário do efeito causado pelo alfa,beta-metilenoATP (30 μ M), o PPADS diminuiu simultaneamente a amplitude das contracções da bexiga. O antagonista selectivo dos receptores P2X₁, NF023 (3 μ M), diminuiu a amplitude e o tempo de duração das contracções da bexiga, sem causar um efeito significativo na frequência miccional (ICI) e na pressão intravesical necessária para desencadear um reflexo miccional (PTh). O bloqueio dos receptores P2Y₁ (sensíveis ao ADP) com MRS 2179 (administrado por via intravenosa 1 μ mol/kg ou por via intravesical 0,3 μ M) aumentou a frequência miccional secundária à irritação com AA (0,2% v/v), sem no entanto alterar a amplitude das contracções da bexiga.

Embora haja muitos dados na literatura sugerindo a existência de diferentes tipos de receptores purinérgicos no trato urinário inferior, o papel fisiopatológico destes receptores na hiperactividade vesical continua por explorar. Os resultados mostram que o ATP apresenta um papel importante na hiperactividade vesical induzida pelo ácido acético e que diferentes subtipos de receptores purinérgicos P2 intervêm na regulação da actividade nervosa aferente (P2X₃ excitatórios e P2Y₁ inibitórios) e nas contracções do músculo liso, provavelmente através da activação de receptores P2X₁ sensíveis ao NF023.

Palavras-chave: bexiga hiperactiva, libertação de ATP, receptores purinérgicos P2, ATP, urotélio, detrusor, urodinâmica, rato *in vivo*

ABSTRACT

The bladder epithelium releases ATP in response to mechanical stimuli (and to chemical irritants), which may activate suburothelial sensory nerve fibers. Although the pathogenic mechanisms of bladder overactivity (OAB) are not fully understood, atropine-resistant purinergic reactivity increases in these patients (*e.g.* interstitial cystitis).

We aimed at investigating ATP release from the bladder urothelium and the effects of this purine in a *in vivo* rat model of hyperactive urinary bladder. Irritative cystometry (produced by the infusion of chemical agents such as acetic acid) has been used to investigate new therapies from OAB.

Experiments were carried out, at 37°C, in urethane-anaesthetized (initial dose: 1.0–1.2 g/kg, maintenance dose: 0.1 g/kg) spontaneously breathing male Wistar rats (300–450 g). The dome of the urinary bladder was catheterized using a three-barrel cannula for continuous measurement of intraluminal pressure. The micturition reflex was evoked by bladder distension induced by intravesical infusion of saline (0.04 ml/min). Respiratory tidal volume, ECG and bladder pressure were continuously monitored on a computer screen via a PowerLab data acquisition system (Chart 5, v.4.2 software; AD Instruments, USA). Bladder hyperactivity was induced by intravesical infusion of acetic acid (AA, 0.2-1% v/v). In some experiments, we measured the electric activity of the pelvic nerve via a bipolar electrode connected to the PowerLab data acquisition system.

Using the luciferin-luciferase luminescence assay (Enliten ATP kit, Promega, USA), we showed that urinary ATP increased ($52 \pm 7\%$, $n=5$) following the micturition reflex. The concentration of urinary ATP was significantly ($P<0.05$) enhanced in the presence of AA (1%, $297 \pm 25\%$, $n=3$), while the activity of urinary lactate dehydrogenase (LDH) remained unchanged. Intravesical AA (0.2%, for 15 min) decreased the time (ICI, 67 % of control) and the pressure threshold (PTh, 58 of control) for appearance of the micturition reflex. Increases in the voiding frequency caused by AA (0.2%) were enhanced by intravesical infusion of the P2X₁ and P2X₃ agonist, alpha,beta-methyleneATP (30 μ M), and of the ecto-ATPase inhibitor, ARL 67156 (200 μ M). The P2 receptor antagonist, PPADS, applied either by intravesical infusion (30 μ M) or by intravenous bolus (17 μ mol/Kg), reduced AA-induced bladder hyperactivity. However, in contrast to alpha,beta-methyleneATP, PPADS also decreased the contraction amplitude. Intravesical infusion of NF023 (3 μ M) (P2X₁ antagonist purinoreceptor), decreased contraction amplitude and time of contraction, but it was devoid of effect on the ICI and PTh. Blockade of ADP-sensitive P2Y₁ receptors with MRS 2179 (1 μ mol/kg i.v. or 0.3 μ M intravesical) increased

the voiding frequency secondary to AA0.2%, but it was devoid of effect on the contraction amplitude.

Although there is extensive literature indicating that many different types of purinoceptors are present in the lower urinary tract, the pathophysiological role of these receptors in OAB is still uncertain. Our results showed that ATP released from the urothelium play a role on bladder hyperactivity induced by intravesical infusion of acetic acid and that different subtypes of P2 purinoreceptors regulate afferent nerve activity (P2X_{2/3} and P2Y₁) and smooth muscle contractions. Preliminar results showed that P2X₁ receptors are located in the detrusor, which might be responsible by smooth muscle tone.

Keywords: overactive bladder; P2 purinoreceptors; ATP release; ATP; urothelium; detrusor smooth muscle; urodynamics; rat *in vivo*

I. INTRODUÇÃO

A síndrome da bexiga hiperactiva define-se por imperiosidade miccional associada a polaquiúria e noctúria, sendo por vezes acompanhada de incontinência urinária de urgência, na ausência de patologia local que justifique estes sintomas. Cerca de 17% dos indivíduos com mais de 40 anos apresentam sintomas de bexiga hiperactiva, havendo aumento da incidência com a idade. Estes sintomas estão frequentemente associados à contracção involuntária do detrusor (hiperactividade do detrusor). Enquanto a contracção do detrusor humano normal é mediada exclusivamente pela acetilcolina (ACh), em certas situações patológicas (e.g. bexigas hipertróficas e neurogénicas, cistite intersticial) existe um componente da contracção que é resistente à atropina e que é mediado pelo ATP (Bayliss *et al.*, 1999; O'Reilly *et al.*, 2001).

O mecanismo pelo qual a actividade motora do ATP é importante nas bexigas hiperactivas continua por esclarecer. Uma hipótese seria a existência de alterações na sensibilidade do detrusor patológico à ACh e/ou ao ATP (Wu *et al.*, 1999), parecendo existir uma predominância da actividade purinérgica na bexiga dos doentes com hiperactividade vesical por obstrução prostática (Faria *et al.*, 2005). Outra possibilidade seria o aumento da biodisponibilidade do ATP nas bexigas hiperactivas. Secundariamente à sua libertação pelas terminações nervosas motoras e/ou por células não-neuronais sensíveis à distensão (e.g. urotélio), o ATP é metabolizado extracelularmente em nucleótidos de adenina e adenosina, pela via das ecto-nucleotidases (Sun *et al.*, 2001). Existem evidências que mostram uma redução da actividade da ecto-ATPase em doentes com bexiga hiperactiva por obstrução infravesical (Faria *et al.*, 2005). Este facto, poderia explicar parcialmente o aumento da potência do ATP na contractilidade do detrusor. Por outro lado, existem dados preliminares mostrando que o ATP e os seus produtos de metabolismo extracelular modulam a libertação de ACh induzida por estimulação dos nervos motores da bexiga humana e que a actividade dos receptores purinérgicos que facilitam a libertação de ACh nos doentes com hiperactividade vesical por obstrução prostática (Correia-de-Sá *et al.*, 2008).

1.1. Sinalização purinérgica no tracto urinário inferior

Os receptores P2 são subdivididos em duas famílias estrutural e funcionalmente distintas, receptores ionotrópicos P2X e metabotrópicos P2Y. De acordo com os objectivos do presente trabalho, os receptores P2X₁, P2X₃ e P2X_{2/3} são os que merecem uma nota especial, por se saber que são estes que são maioritariamente expressos na bexiga. Existem oito subtipos de receptores

P2Y, sendo de maior relevância para a interpretação deste trabalho o subtipo P2Y₁, que se trata de um receptor inibitório sensível ao ADP (metabolito do catabolismo extracelular do ATP libertado). Na tabela I estão resumidas as características dos receptores purinérgicos, assim como informações acerca de agonistas e antagonistas usados na investigação destes receptores.

Tabela I: Características de alguns receptores purinérgicos (adaptada de Burnstock 2006).

Receptor purinérgico	Localização nos tecidos	Agonistas	Antagonistas
P2X			
P2X₁	Músculo liso, plaquetas, cerebelo, cornos dorsais da espinal medula	α, β -meATP = ATP = e2-me-SATP	TNP-ATP, IP5I, NF023, NF449
P2X₂	Músculo liso, SNC, retina, células cromatafins, gânglios sensoriais e autonómicos.	ATP >= 2-me-SATP >> α, β -meATP	Suramina, iso-PPADS, RB2, NF770
P2X₃	Neurónios sensoriais, alguns neurónios simpáticos	2-Me-SATP >= ATP >= α, β -meATP >= Ap ₄ A	TNP-ATP, PPADS, A 317491, NF 110
P2Y			
P2Y₁	Células endoteliais e epiteliais, plaquetas, células imunes, osteoclastos	2-meSADP > 2-meSATP = ADP > ATP > MRS2365	MRS 2179, MRS2500

A libertação de ATP e a presença de receptores P2X e P2Y nas células uroteliais, miofibroblastos e células nervosas sugerem um papel importante desta purina na comunicação intercelular na bexiga. A activação de receptores P2X e P2Y pelo ATP libertado durante a distensão da bexiga, estimula a sua própria libertação bem como a libertação de outros mediadores uroteliais, actuando de forma autócrina. Em situações patológicas, a activação continuada da população de nervos suburoteliais que expressam receptores P2X₃ ou P2X₂, pelo ATP libertado induz sensações de dor e de limitação de volume, sendo este o principal responsável pelas alterações na actividade da bexiga (Birder & de Groat, 2007).

Em ratinhos KO para receptores P2X₁, as contracções neurogénicas da bexiga estão reduzidas em, aproximadamente, 70% comparativamente com os animais controlo, demonstrando assim o envolvimento destes receptores nas contracções do detrusor não patológico.

Os reflexos da bexiga em resposta ao preenchimento estão reduzidos nos ratinhos que não expressam os receptores P2X₃, P2X₂ e P2X_{2/3} (Cockayne *et al.*, 2000; 2005), apesar dos níveis de ATP libertados por distensão da bexiga serem idênticos (Vlaskovska *et al.*, 2001).

1.2. Cistometria em condição de irritação vesical

Uma das variações de uma cistometria normal tem por base a utilização de uma solução de infusão diferente do soro fisiológico, de forma a desencadear uma resposta irritante ou dolorosa veiculada através da activação de fibras do tipo C.

Utiliza-se frequentemente a infusão intravesical de ácido acético (0,2-1% v/v) que leva ao aumento da actividade da bexiga, diminuição da sua capacidade, enquanto a pressão de micção se mantém ou aumenta. Este efeito parece estar relacionado com a estimulação das fibras aferentes na parede da bexiga, aumentando a actividade sensitiva, como é característica de algumas patologias do tracto urinário inferior (e.g. cistite intersticial) (Hiragata *et al*; 2007).

1.3. Objectivos

O objectivo principal do presente trabalho prende-se com a investigação da libertação de ATP pelo urotélio vesical e do seu efeito sobre receptores purinérgicos P2 num modelo de hiperactividade vesical *in vivo* no rato. Os parâmetros urodinâmicos, avaliados numa situação de hiperactividade vesical e a sua manipulação farmacológica com agonistas/antagonistas de receptores purinérgicos presentes no tecido vesical serão usados na investigação de novos alvos terapêuticos a médio prazo para o tratamento desta patologia.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparação cirúrgica e monitorização dos animais de experiência

O maneo animal e os procedimentos experimentais seguiram as recomendações do *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS). Foram tomadas todas as precauções com o intuito de minimizar o sofrimento animal e de reduzir o número de animais utilizados.

Foram utilizados ratos machos Wistar com peso de 300–450g. Os animais foram anestesiados com uretano por via intraperitoneal numa dose 1,2g/Kg. A anestesia foi mantida ao longo da experiência através da administração de doses de 0,1 g/Kg (King *et al.*, 2004), quando o plano anestésico assim o exigia. O procedimento cirúrgico consistiu, primeiramente, na execução de uma traqueostomia para inserção de uma cânula traqueal que permitiu controlar a via aérea e monitorizar o volume-minuto e a frequência respiratória ao longo da experiência.

Seguidamente procedeu-se à cateterização da veia jugular, através da qual foi infundido soro fisiológico (à taxa de 0,04 mL/min por intermédio de uma seringa infusora automática) por

forma garantir a hidratação do animal durante o procedimento experimental. Este cateter foi também usado para injectar os fármacos usados por via endovenosa.

Posteriormente procedeu-se a uma laparotomia suprapúbica para se identificar a bexiga e, através de uma incisão na cúpula, inseriu-se uma cânula de três vias fixada com fio de seda 3/0. Uma das vias foi conectada a um transdutor de pressão com vista à determinação das pressões intravesicais; a segunda via era utilizada para influxo e a terceira para efluxo de soluções na bexiga (Kullmann *et al.*, 2008).

Durante toda a experiência o animal permaneceu sobre uma placa de aquecimento, que permitiu a manutenção da temperatura corporal perto dos 37°C.

O volume-minuto e frequência respiratória, a pressão intravesical e o electrocardiograma (derivação DII) foram registados continuamente através de um sistema informatizado de aquisição de dados PowerLab (Chart 5, v.4.2 software; AD Instruments, USA), para posterior análise e quantificação.

2.2. Estudos urodinâmicos e administração de fármacos

Através da cânula introduzida na bexiga foi infundido soro fisiológico (0,04ml/min), por intermédio de um seringa infusora automática, de forma a provocar reflexos miccionais espontâneos repetidos com características estáveis ao longo do período experimental. Do perfil de variação da pressão intravesical foram obtidos os seguintes parâmetros cistométricos: o intervalo entre contracções (*intercontraction interval*, ICI), a variação de pressão até ser induzido um reflexo miccional (*pressure threshold*, PTh), a amplitude das contracções (A) e a duração de cada contracção (Δt). Os dois primeiros parâmetros (ICI, PTh) relacionam-se com a actividade nervosa sensitiva e os dois últimos (A e Δt) com a actividade motora (nervosa eferente e muscular) da bexiga.

Foram usadas duas vias para a administração de fármacos: a via endovenosa e a via intravesical. Para a via endovenosa utilizou-se o cateter colocado na veia jugular. Os fármacos administrados por esta via distribuíram-se à bexiga e estruturas adjacentes (e.g. nervos periféricos, SNC) por via sistémica; a administração intravesical teve como principal objectivo observar os efeitos dos fármacos sobre o urotélio vesical e estruturas subjacentes (e.g. nervos sensitivos suburoteliais, miofibroblastos), caso a sua estrutura química permita a passagem da “barreira” urotelial. A dose dos fármacos administrados por via endovenosa é expressa em g/Kg peso vivo e a sua preparação foi realizada em soro fisiológico. A concentração dos fármacos administrados por via intravesical é expressa em molaridade (M) e estes foram preparados em

soro fisiológico ou numa solução de ácido acético a 0,2% (v/v), dependendo do objectivo pretendido, i.e. a investigação do efeito numa situação controlo (preparação em soro fisiológico) ou numa situação de hiperactividade vesical (preparação em ácido acético a 0,2%).

Após a preparação cirúrgica, seguiu-se um período de estabilização de cerca de 60 minutos, no qual o sistema de três vias se encontrava aberto permitindo perfusão contínua da bexiga com soro fisiológico sem promover variações de pressão ou de volume. Seguidamente a via de saída era encerrada e o reflexo miccional era provocado pelo preenchimento da bexiga. Ao atingir-se uma determinada pressão intravesical (*pressure threshold*, PTh) produzia-se uma contracção mais intensa que conduzia ao esvaziamento da bexiga – reflexo miccional. Este procedimento manteve-se ao longo de um período de cerca de 60 minutos, no qual diversos reflexos miccionais eram produzidos, cujo perfil correspondia a uma situação controlo. Após a obtenção dos parâmetros urodinâmicos na situação controlo, procedia-se à infusão dos fármacos por via intravesical ou endovenosa (em *bolus* durante 20 seg). O envolvimento dos nervos sensitivos no reflexo miccional foi confirmado através (1) da avaliação da actividade eléctrica do nervo pélvico, e (2) da eliminação do reflexo após secção bilateral dos nervos pélvicos ou da infusão intravesical de tetrodotoxina (TTX, 1 μ M), um composto capaz de impedir a geração de potenciais de acção nervosos.

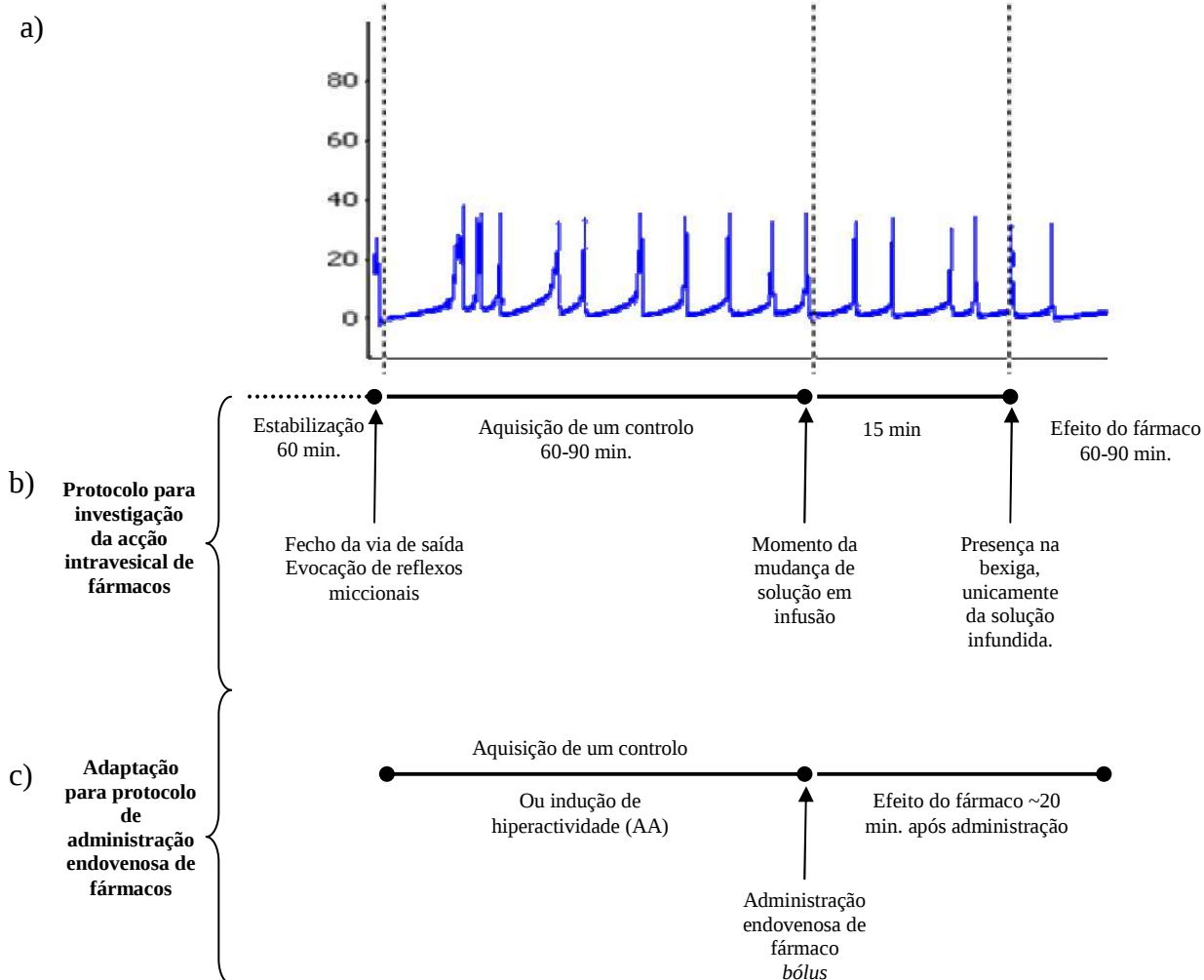


Figura 1. Planificação do protocolo experimental

Quando se pretendia causar a irritação química do urotélio vesical, a mesma era induzida através da infusão intravesical de uma solução de ácido acético 0,2% (v/v). Este procedimento conduzia invariavelmente a uma alteração dos parâmetros miccionais representando, então, uma situação de hiperactividade vesical. Após a observação de um padrão miccional consistente na presença de ácido acético a 0,2% (v/v), que foi obtido após o contacto durante cerca de 60 minutos com esta solução, testaram-se os fármacos em estudo conforme descrito anteriormente, por via intravesical (dissolvidos na solução de ácido acético a 0,2% (v/v), ou por via endovenosa (dissolvidos em solução de soro fisiológico). O efeito era quantificado após um período de cerca de 60 minutos quando o fármaco era aplicado por via intravesical, ou, aproximadamente 20min. após administração endovenosa (Figura 1 b 1 c).

A quantificação dos resultados obtidos em cada um dos protocolos foi efectuada directamente no programa de aquisição de dados PowerLab (Chart 5, v.4.2 software; AD Instruments, USA) (Figura 2), seguida da importação desses valores para um ficheiro de Excel (MS) onde foram tratados matematicamente.

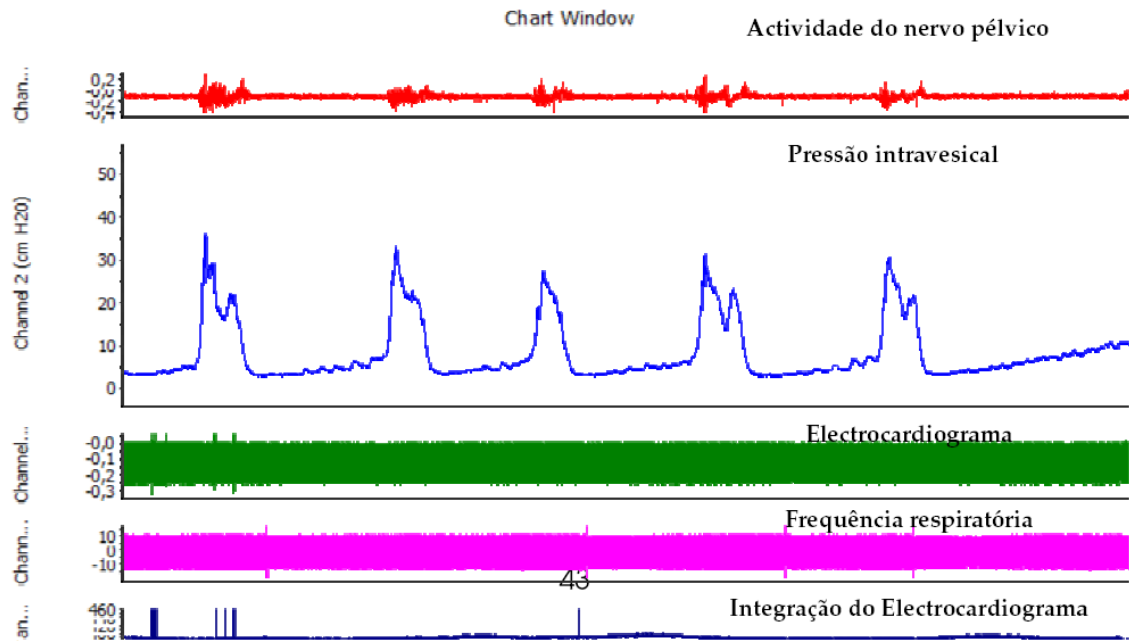


Figura 2. Janela de registo dos parâmetros seguidos ao longo de uma experiência

Foram quantificados os seguintes parâmetros: variação da pressão até ser desencadeado o reflexo miccional (PTh), amplitude das contracções miccionais (A), intervalo de tempo de cada contracção (Δt) e o intervalo de tempo entre contracções (ICI) (Figura 3).

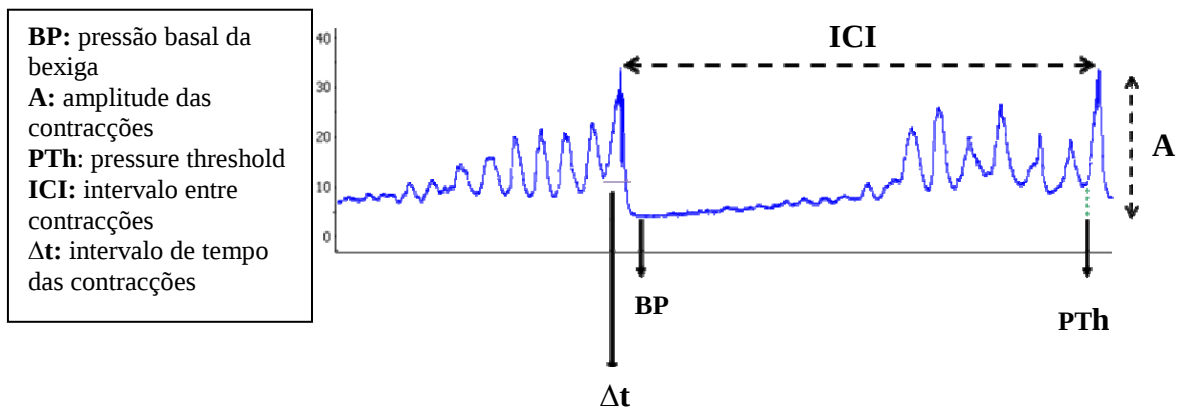


Figura 3. Esquema identificativo dos dados considerados para quantificação num exemplo de uma experiência

2.3. Ensaios de luminescência

As amostras de urina foram colhidas directamente a partir da uretra para um tubo Eppendorf esterilizado, antes e após irritação da bexiga com ácido acético 0,2%, em tempos previamente determinados. A quantificação de ATP foi realizada por bioluminescência, através da reacção luciferina-luciferase (Enliten ATP kit, Promega, USA).

2.4. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM), correspondendo a um número n de experiências. A significância das diferenças foi avaliada pelo teste t de Student. * $P < 0,05$ representa diferenças significativas.

2.5. Fármacos e soluções usadas

As soluções de soro fisiológico (NaCl 0,9% em água destilada e desionizada) foram preparadas em volumes (1L) e armazenadas no frigorífico até serem utilizadas.

As soluções de uretano (2,8 M), em soro fisiológico, foram preparadas diariamente.

O ácido acético glacial foi diluído em soro fisiológico de forma a obter-se uma concentração final de 0,2% (v/v), e foi armazenado no frigorífico até ser utilizado.

As soluções dos fármacos (Tabela II) foram feitas em soro fisiológico (para administração intravesical ou endovenosa) ou em ácido acético a 0,2% (para administração intravesical).

Tabela II: Fármacos / sais usados

Fármacos/ Sais	Marca
Uretano	Sigma-Aldrich
NaCl	Merck
PPADS	Sigma-Aldrich
α, β -meATP	Sigma-Aldrich
Apirase	Sigma-Aldrich
ARL 67156	Tocris
MRS 2179	Tocris
NF 023	Tocris

III. RESULTADOS

Durante as experiências avaliou-se sistematicamente os seguintes parâmetros urodinâmicos: a variação da pressão intravesical até ser desencadeado o reflexo miccional (PTh), a amplitude das contracções capazes de produzir o esvaziamento da bexiga (A), a duração média das contracções (Δt) e o intervalo de tempo entre contracções (ICI). A tabela III resume os resultados obtidos numa situação controlo e após a infusão intravesical com ácido acético a 0,2% (v/v).

Tabela III: Resultados obtidos dos quatro parâmetros analisados nos estudos urodinâmicos numa situação controlo e após a infusão intravesical com ácido acético a 0,2% (v/v) (*, $P < 0,05$ em relação ao controlo).

Parâmetros	Controlo	n	Ác. Acético 0,2%	n
A (cmH ₂ O)	26,87±0,75	37	28,29±1,08	23
Δt Contracção (Seg)	39,50 ±2,07	38	43,94±3,51	22
ICI (Seg)	227,68±15,26*	33	144,23±8,96*	12
PTh (cmH ₂ O)	4,83±0,29	32	4,23±0,35	22

3.1. Caracterização do modelo animal de hiperactividade da bexiga induzido através da administração intravesical de ácido acético 0,2% (v/v).

Conforme demonstrado na Tabela III, a infusão intravesical com ácido acético a 0.2% (v/v) causa uma redução do intervalo entre as contracções que produzem esvaziamento da bexiga (ICI) e uma redução do limiar da pressão necessária para desencadear um reflexo miccional (PTh), ou seja, observou-se um aumento da excitabilidade e da frequência miccional. Nenhum outro parâmetro apresenta relevância estatística. Nas condições experimentais do presente trabalho, o contacto da bexiga com a solução de ácido chegou a durar mais de 60 minutos, o que determinou a utilização de uma solução de ácido acético mais diluída (0.2%) que noutros estudos (Mitobe *et al.*, 2008) para prevenir possíveis alterações histológicas da bexiga (infiltrados inflamatórios com neutrófilos e/ou macrófagos e hemorragias) e o aparecimento macroscópico de sangue na urina. Neste trabalho, não foi efectuada qualquer avaliação histológica da bexiga após a infusão de ácido acético, mas não se observou macroscopicamente a presença de sangue na urina quando a bexiga foi perfundida prolongadamente com uma solução de ácido acético a 0.2% (v/v), ao contrário dos estudos que usaram soluções mais concentradas. Também não se observou qualquer aumento da actividade da enzima intracelular, desidrogenase do lactato (DHL), após a infusão com o ácido acético a 0.2% (v/v), facto que sugere a manutenção da

integridade celular da bexiga nestas condições experimentais. Este modelo experimental caracteriza-se, ainda, pelo aumento da concentração de ATP na urina observado após irritação da bexiga com o ácido (Tabela IV).

Tabela IV – Dados relativos à análise do teor em ATP determinado por bioluminescência em três amostras de urina (A, B e C) recolhidas na ausência e após a administração intravesical da solução de ácido acético (0.2 % v/v).

Recolha	Controlo		Após infusão intravesical com AA (0.2%)	
	t (min)	ATP (nM)	t (min)	ATP (nM)
A	43	4,135	44	11,697
B	49	5,889	50	8,901
C	52	4,177	56	4,606

3.2. Efeito da inibição da ecto-ATPase pelo ARL 67156 aplicado por via intravesical.

A inibição da ecto-ATPase, ARL 67156 (200 μ M, aplicado por via intravesical), que favorece a acumulação de ATP na urina, aumentou significativamente ($P < 0,05$) a frequência dos reflexos miccionais (ICI: 134 ± 17 seg ($n=3$) vs 228 ± 15 seg) nos animais controlo, isto é, na ausência de ácido acético a 0,2% (v/v). Também se observou uma redução do limiar de pressão necessário para se desencadear um reflexo miccional (PTh: $3,73 \pm 0,35$ cm H₂O ($n=3$) vs $4,83 \pm 0,29$ cm H₂O no controlo). Estes resultados apresentam um padrão semelhante ao verificado numa situação de hiperactividade vesical após irritação da bexiga com ácido acético (0,2% v/v), reflectindo a importância dos níveis intravesicais de ATP sobre a actividade da bexiga.

3.3. Efeito da Apirase (ATP difosfohidrolase ou NTPDase 1) aplicada por via intravesical no modelo de bexiga hiperactiva

Seguidamente, investigou-se de que modo a aplicação intravesical de apirase (ATP difosfohidrolase ou NTPDase 1, 2 U/mL) poderia alterar a hiperactividade da bexiga neste modelo animal *in vivo*. A apirase é uma ecto-enzima que catalisa a remoção (hidrólise) do fosfato do ATP e o fosfato β do ADP, sendo o produto final o AMP e o ortofosfato (Traverso-Cori *et al.*, 1965).

A administração intravesical de apirase (2 U/mL), reduziu significativamente ($P < 0.05$) a amplitude das contracções responsáveis pelo esvaziamento da bexiga no modelo de hiperactividade vesical (A: $24,53 \pm 0,70$ cm H₂O ($n=3$) vs $28,29 \pm 2,15$ cm H₂O após ácido acético

a 0,2%). Contudo, não se observou a esperada redução da frequência miccional (aumento do intervalo ICI) após a infusão de apirase (2 U/mL). Esta aparente discrepância relativamente aos resultados esperados, pode ser explicada se considerarmos que a metabolização do ATP libertado directamente em AMP pela apirase ultrapassa a formação de ADP, que pode desempenhar um efeito contrário (inibitório) ao do ATP de forma a garantir um balanço harmonioso entre os efeitos excitatórios do ATP e os efeitos inibitórios do seu metabolito ADP na actividade da bexiga. Um resultado semelhante foi observado no plexo mioentérico do íleo de rato (Duarte-Araújo *et al.*, 2009; ver resultados do PPADS e do MRS2179 neste trabalho).

3.4. Efeito dos receptores P2X na hiperactividade da bexiga: Administração intravesical do agonista, α,β -meATP.

O agonista dos receptores P2X₁, P2X₃ e P2X_{2/3}, α,β -meATP (30 μ M), aplicado por via intravesical, aumentou a excitabilidade da bexiga causada pelo ácido acético (0,2% v/v) na bexiga. Isto é, o α,β -meATP (30 μ M), reduziu a PTh necessária para se desencadear um reflexo miccional (PTh: $2,57 \pm 0,69$ cm H₂O ($n=3$) vs $4,23 \pm 0,35$ cm H₂O na presença de ácido acético a 0,2%). Observou-se, ainda, uma tendência para o aumento da frequência do reflexo miccional (diminuição do valor de ICI), embora não se tenha obtido neste caso significado estatístico quando comparado com a aplicação de ácido acético (0,2% v/v).

3.5. Efeito tónico dos receptores P2 sobre o reflexo miccional

Para avaliação do envolvimento tónico dos receptores purinérgicos no modelo de hiperactividade vesical, considerou-se a possibilidade de testar o efeito de diversos antagonistas dos receptores P2 e comparar a sua actividade com os efeitos observados na presença de apirase, uma enzima capaz de remover o ATP do meio extracelular, convertendo-o rapidamente em AMP que é um metabolito do ATP desprovido de efeitos P2.

Efeito da administração intravesical de PPADS: Controlo vs modelo de bexiga hiperactiva

A infusão intravesical do antagonista não-selectivo dos receptores P2, PPADS (30 μ M), reduziu de forma estatisticamente significativa ($P < 0,05$) a amplitude das contracções que provocam esvaziamento da bexiga (A: $21,01 \pm 2,77$ cm H₂O ($n=4$) vs $26,87 \pm 0,75$ cm H₂O no controlo). Observou-se, ainda, uma tendência para o aumento da frequência do reflexo miccional

(diminuição do valor de ICI), embora não se tenha obtido neste caso significado estatístico ($P>0,05$) quando comparado com a situação controlo na ausência do fármaco.

Por outro lado, a aplicação intravesical de PPADS (30 μ M) reverteu para valores próximos do controlo (ver Tabela III) todos os parâmetros urodinâmicos alterados após a administração de ácido acético (0,2 % v/v), nomeadamente os valores de ICI (268 ± 12 seg, $n=4$), PTh ($5,17\pm1,01$ cm H₂O, $n=4$), A ($21,01\pm2,77$ cm H₂O, $n=4$) e Δt ($35,71\pm2,51$ seg, $n=4$). Também se pode constatar pela análise da Figura 4, que a redução da amplitude e duração das contracções e a redução da frequência miccional pode condicionar o aumento da tensão basal intravesical por défice de esvaziamento. Comparando os dados obtidos para o PPADS (30 μ M) numa situação controlo e após a irritação da bexiga com ácido acético (0,2% v/v), observou-se uma redução consistente dos parâmetros que caracterizam a actividade muscular (amplitude e duração das contracções) em ambas as situações. É, no entanto, de salientar a normalização da frequência miccional após a irritação da bexiga com ácido acético (0,2% v/v), isto é, numa situação de hiperexcitabilidade nervosa que é característica do modelo.

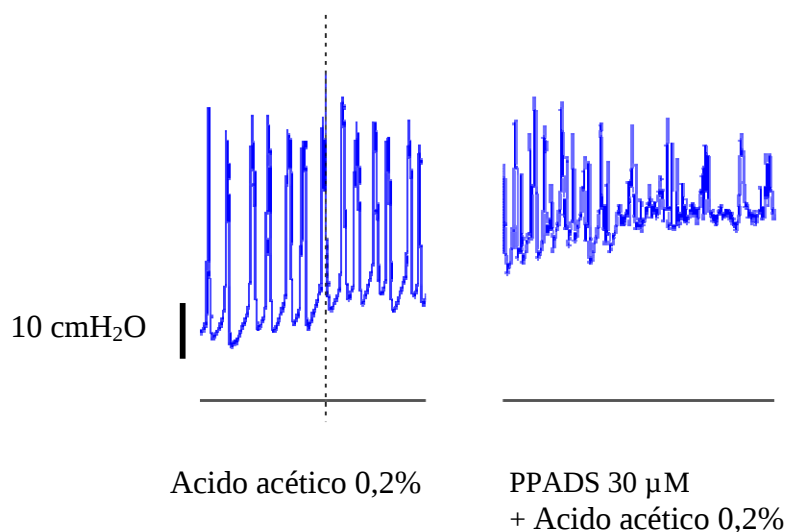


Figura 4: Efeito da administração intravesical de PPADS 30 μ M num modelo de hiperactividade da bexiga. Note-se que houve aumento da tensão basal intravesical por défice de esvaziamento.

Efeito da administração endovenosa de PPADS: Modelo de hiperactividade da bexiga

A administração de PPADS (17 μ mol/Kg) por via intravenosa (ver King *et al.*, 2004) também reverteu para valores próximos do controlo (ver Tabela III) os parâmetros urodinâmicos ICI (248 ± 48 seg, $n=3$) e PTh ($6,73\pm2,24$ cm H₂O, $n=3$) que caracterizam a hiperexcitabilidade

nervosa resultante da infusão intravesical de ácido acético (0.2 % v/v), sugerindo a sua utilidade mediante administração sistémica.

Uma das questões que se colocou relativamente a esta metodologia relacionou-se com a possibilidade da administração endovenosa do fármaco afectar a actividade de outros órgãos, nomeadamente a alteração da perfusão local devido à modificação de parâmetros cardiovasculares (frequência cardíaca ou tensão arterial). Atendendo aos parâmetros vitais monitorizados (electrocardiograma, frequência cardíaca, volume-minuto e frequência respiratória), observou-se uma ligeira depressão cardiovascular e respiratória coincidente com a administração do PPADS (i.v., 17 μ mol/Kg) (Figura 5), que foi prontamente reversível.

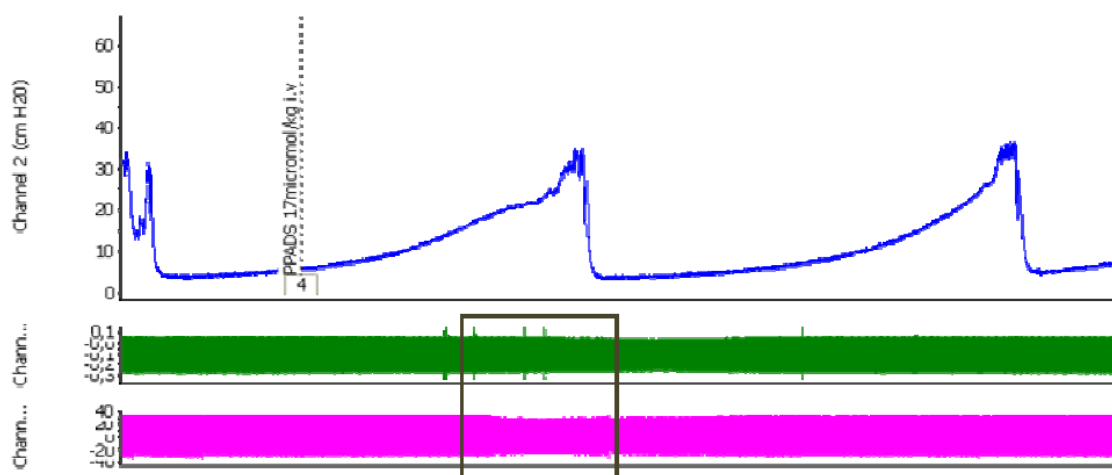


Figura 5: Representação do momento de administração endovenosa de PPADS 17 μ mol/Kg. Observa-se uma ligeira depressão das funções cardiovascular e respiratória coincidente com a administração do fármaco.

3.6. Efeito da activação dos receptores P2X₁ no padrão contráctil do modelo de bexiga hiperactiva: Administração intravesical de NF 023

Para avaliar a importância dos receptores P2X₁ sobre o reflexo miccional, testou-se o efeito do seu antagonista selectivo, NF 023 (3 μ M), aplicado por via intravesical, antes e após a infusão com ácido acético 0,2%.

O NF 023 (3 μ M) reduziu a magnitude dos parâmetros urodinâmicos que caracterizam a actividade motora do reflexo miccional, respectivamente os valores de A ($20,80 \pm 2,95$ cm H₂O, $n=3$) e de Δt ($23,78 \pm 4,82$ seg, $n=3$) (Figura 7), comparativamente com os valores observados numa situação controlo (i.e. na ausência de ácido acético a 0,2%). Estas observações foram também verificadas após a infusão intravesical de ácido acético (0,2% v/v) (Figura 7). O NF 023

(3 μ M), não alterou significativamente ($P>0,05$) o padrão urodinâmico representativo do eixo aferente do reflexo miccional (valores de ICI e PTh) em qualquer das circunstâncias testadas (presença ou ausência de ácido acético a 0,2%) (Figura 8).

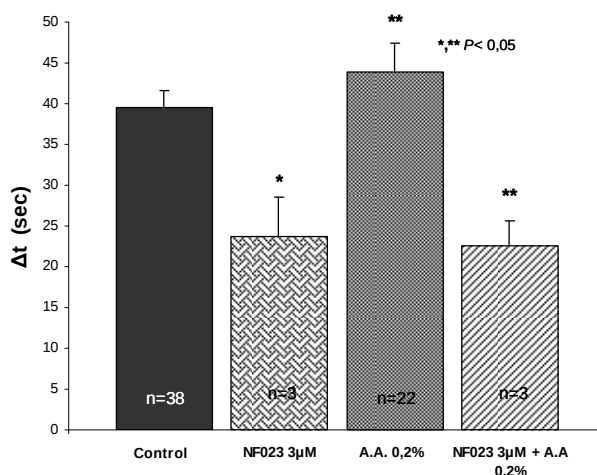


Figura 7: Efeito do NF 023 sobre o intervalo de tempo de contracção numa situação controlo e numa situação de indução de hiperactividade vesical. Note-se uma redução significativa do Δt quando se aplica NF023, tanto numa situação controlo como numa situação de hiperactividade vesical. (Valores de * $P < 0,05$ foram considerados significativos em relação ao controlo. ** $P < 0,05$ foram considerados significativos em relação ao AA0,2%. n refere-se ao número de experiências).

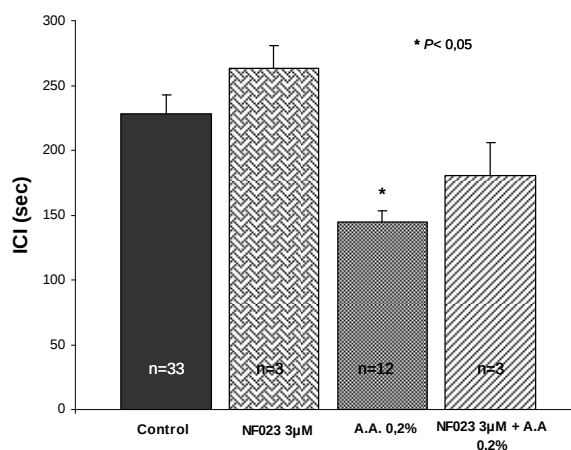


Figura 8: Efeito do NF 023 sobre a frequência miccional (ICI) numa situação controlo e numa situação de indução de hiperactividade vesical. Note-se que não existe significância estatística no que respeita a este parâmetro. (Valores de * $P < 0,05$ foram considerados significativos em relação ao controlo. n refere-se ao número de experiências).

3.7. Envolvimento dos receptores P2Y₁ no reflexo miccional do modelo de hiperactividade da bexiga

A administração do antagonista selectivo dos receptores P2Y₁, MRS 2179 (0.3 μ M), por via intravesical, reduziu por si só o intervalo entre as contracções que produzem o esvaziamento da bexiga (ICI: 118 $\pm$ 14 seg ($n=3$) vs 228 $\pm$ 15 seg no controlo) e o limiar de pressão necessário para se desencadear o reflexo miccional (PTh: 4,08 $\pm$ 0,56 cm H₂O ($n=3$) vs 4,83 $\pm$ 0,29 cm H₂O no controlo). A excitabilidade da bexiga verificada após a infusão intravesical de ácido acético (0,2% v/v) foi significativamente ($P<0,05$) exacerbada após a administração de MRS 2179, tanto por via intravenosa (1 μ mol/Kg) como por via intravesical (0,3 μ M). Estes resultados sugerem que os receptores P2Y₁, que são activados preferencialmente pelo ADP resultante do catabolismo extracelular do ATP libertado, desempenham um importante efeito regulador sobre a actividade nervosa aferente responsável pelo reflexo miccional. Estes dados permitem, ainda, explicar a ausência de efeito sobre o eixo aferente do reflexo miccional após a instilação de apirase na bexiga, já que a metabolização acelerada do ATP libertado não se acompanha da formação de ADP, mas sim de AMP, na mesma proporção estequiométrica.

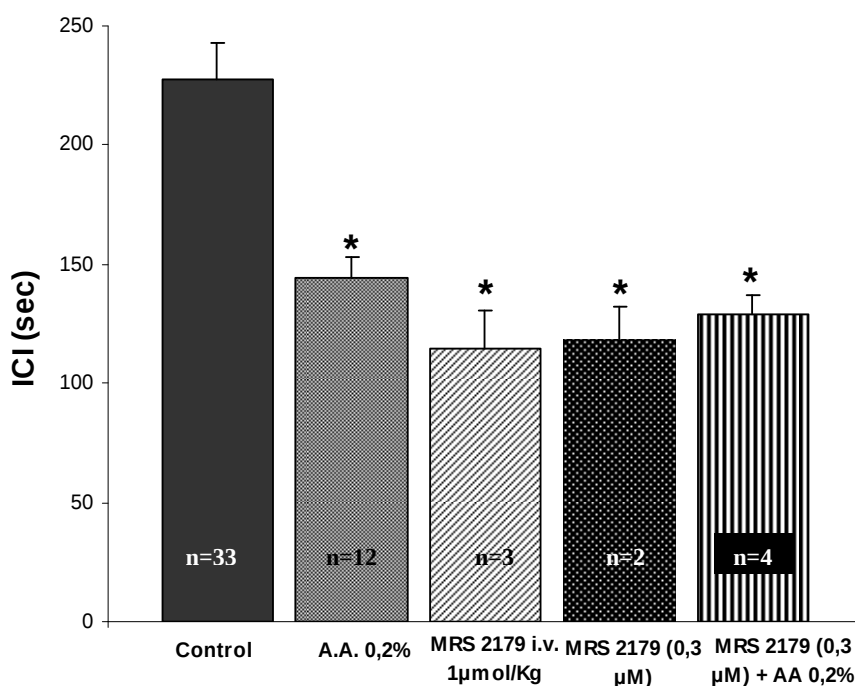


Figura 8. Representação comparativa da acção do MRS 2179, tanto por via intravesical como endovenosa sobre a frequência miccional (avaliada pelo ICI). (Valores de * $P < 0,05$ foram considerados significativos em relação ao controlo. n refere-se ao número de experiências).

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

4.1 Discussão

O modelo utilizado neste trabalho permitiu induzir uma situação aguda de hiperactividade da bexiga, fazendo variar parâmetros da actividade reflexa que estão descritos como característicos de uma situação de hiperexcitabilidade (Mitobe *et al.*, 2008).

O facto de se usar uma abordagem *in vivo* permite obter resultados mais fidedignos e integrados. A indução do modelo de hiperactividade *in vivo* garante a viabilidade de todos os sistemas envolvidos no reflexo miccional (e.g. urotélio e toda a inervação e vascularização da bexiga), nomeadamente no que respeita à integridade do envolvimento nervoso. No entanto, os resultados obtidos nem sempre são de fácil interpretação devido à complexidade dos sistemas envolvidos, razão pela qual será necessário desenvolver paralelamente ensaios *in vitro* usando células / tecidos isolados (e.g. urotélio, detrusor, etc.) para avaliar as respostas de cada um deles *per se*, isto é, avaliar a libertação de ATP e outros mediadores pelo urotélio ou pelos nervos motores da bexiga, investigar o papel desta purina na contracção do detrusor e, também, no controlo da libertação de ACh a partir das terminações nervosas, etc..

A diminuição do ICI (aumento da frequência miccional) é consistente com as situações de hiperactividade da bexiga induzidas pela administração intravesical de ácido acético a 0,2% (v/v). Neste modelo, é também evidente um aumento da pressão basal após administração intravesical de ácido acético 0,2% (v/v) e um aumento muito significativo do teor de ATP na urina. Embora os níveis de ATP não tenham sido avaliados na bexiga propriamente dita (mas tão só, na urina ou no perfusado vesical) certamente esse teor reflectirá o que se passa na região suburotelial e restante parede da bexiga.

Através da comparação da acção do ácido acético (0,2% v/v) e do efeito do inibidor da ecto-ATPase, ARL 67156, aplicado por via intravesical, constatou-se que ambos os agentes aumentavam a frequência miccional (redução do intervalo ICI) e reduziam a pressão intravesical necessária para se desencadear um reflexo miccional (PTh) comparativamente com a situação controlo. Verificou-se, ainda, uma redução da amplitude das contracções da bexiga, que foi associada ao aumento do tónus basal da bexiga, provavelmente devido ao aumento da biodisponibilidade do ATP libertado durante os reflexos. O aumento dos níveis de ATP detectado por bioluminescência nas amostras de urina colhidas após a irritação do urotélio com ácido acético (0,2% v/v) foi semelhante ao verificado em situações de hiperactividade vesical em humanos (Bayliss *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001), no coelho (Ferguson *et al.*, 1997) e, também, no

rato (Smith *et al.*, 2005). Conclui-se, então, que o modelo se adapta ao objectivo do estudo, que é o de investigar os mecanismos purinérgicos associados à hiperactividade vesical.

Outro dos resultados relevantes obtidos com a utilização deste modelo de hiperactividade vesical foi a demonstração de que os receptores purinérgicos P2X e, possivelmente, P2Y, têm um papel importante na regulação da actividade miccional. Na situação controlo (infusão intravesical com soro fisiológico), o bloqueio destes receptores (com PPADS) afecta maioritariamente a contractilidade do músculo e/ou a actividade nervosa eferente, avaliada através da redução da amplitude e do tempo das contracções. No entanto, na situação de hiperactividade da bexiga induzida pelo ácido acético, o PPADS conseguiu reverter o aumento da frequência miccional para valores considerados próximos da normalidade, sugerindo uma actuação concomitante sobre os nervos sensitivos aferentes. Relativamente à acção endovenosa do fármaco, esta tem como alvo maioritário parâmetros relativos à componente nervosa da contracção: ICI e PTh. Estes resultados sugerem que, os alvos de acção do fármaco variam de acordo com a via de administração do mesmo, e consequentemente, com a capacidade de atingirem os componentes do reflexo associadas a esses parâmetros (biodisponibilidade). Por outro lado, a reversão do efeito do ácido acético causada pelo PPADS (aumento do valor de ICI), comparativamente com a ausência de efeito deste fármaco sobre esses parâmetros numa situação controlo, sugere que o seu efeito se possa observar preferencialmente numa situação de hiperactividade da bexiga. A administração de MRS 2179 por via intravenosa, mostrou também que este composto afecta preferencialmente os parâmetros urodinâmicos relacionados com a componente nervosa aferente do reflexo.

No modelo de hiperactividade da bexiga induzido pelo ácido acético, é possível que se observe uma alteração da permeabilidade da barreira urotelial, permitindo uma melhor penetração dos fármacos na parede da bexiga tornando acessíveis os nervos suburoteliais e a camada muscular adjacente. Um estudo refere que a lesão induzida pelo sulfato de protamina (um agente químico irritante) requer um intervalo de tempo de aproximadamente cinco dias para recuperação das células uroteliais (Lavelle *et al.*, 2002), o que permite especular acerca de um efeito idêntico por parte do ácido. Por outro lado, o ácido acético pode (1) estimular a libertação de ATP a partir do urotélio (Silva, 2008, Tese de Licenciatura em Bioquímica, FCUP / ICBAS-UP), (2) sensibilizar os receptores do ATP à acção deste ligando, e/ou (3) modificar a permeabilidade da barreira urotelial, exacerbando a actividade purinérgica (Birdier & de Groat, 2007).

O controlo neuronal parassimpático da bexiga em humanos, em situação de patologia, mostra uma acção predominante dos receptores P2X₁ musculares (Ford *et al.*, 2006), enquanto na

inervação pélvica aferente os receptores P2X₃ funcionam como sensores de enchimento e armazenamento de urina (Vlaskovska et al., 2001; Cockayne et al., 2000). Os resultados obtidos no rato sugerem que o ATP actua consistentemente nos receptores purinérgicos P2 musculares e/ou localizados nos nervos eferentes (que afectam a amplitude e a duração da contracção muscular), enquanto a actividade sensitiva aferente foi revelada apenas na situação de hiperactividade induzida pelo ácido acético (0,2% v/v). Um importante contributo para discernir o papel dos receptores purinérgicos P2X₁ foi o uso do seu antagonista selectivo, NF023, tanto numa situação controlo como numa situação de hiperactividade vesical. O facto deste fármaco alterar preferencialmente os componentes musculares da contracção (tempo de contracção e amplitude) e não o componente sensitivo aferente (ICI e PTh), sugere que os receptores P2X₁ estão localizados no músculo detrusor da bexiga e poderão ser responsáveis pelo tónus do músculo liso. Estes dados foram corroborados por experiências de imunolocalização por microscopia confocal levadas a cabo no nosso laboratório, que demonstraram a localização dos receptores P2X₁ no detrusor do rato (Marinhas *et al.*, 2009, resumo Soc. Port. Neurociências).

Um outro facto interessante foi constatar que a administração intravesical de apirase (2U/mL) reduz significativamente a amplitude das contracções responsáveis pelo esvaziamento da bexiga neste modelo de hiperactividade vesical, tal como se observou com a aplicação intravesical de PPADS (30 µM) nas mesmas condições experimentais. Não se observou, no entanto, a esperada redução da frequência miccional (aumento do intervalo ICI) após a infusão de apirase (2 U/mL). Estes resultados sugerem que a componente motora do reflexo miccional (nervos eferentes e/ou as propriedades do músculo liso) caracterizada através das variações da amplitude ou do tempo de contracção do detrusor são afectadas preferencialmente quando se inactiva o ATP libertado directamente em AMP pela apirase. Paradoxalmente, esta enzima não parece conseguir influenciar a componente aferente do reflexo miccional, detectadas por variações dos parâmetros ICI e PTh (Kullmann *et al.*, 2008). A hidrólise de ATP directamente em AMP pela apirase conduz por um lado, à inactivação do próprio ATP libertado, e por outro lado, à redução dos níveis de ADP formados endogenamente. Esta situação leva à redução da actividade dos receptores excitatórios sensíveis ao ATP (provavelmente P2X₃ ou P2X_{2/3}) e a uma redução concomitante da activação dos receptores inibitórios P2Y₁ sensíveis ao ADP nos nervos sensitivos, razão pela qual o balanço final pode ser hipoteticamente nulo. O balanço entre a activação de receptores excitatórios P2X₃ e inibitórios P2Y₁ (Burnstock et al., 2006) foi demonstrado através do efeito do antagonista selectivo P2Y₁, MRS 2179, sobre o reflexo miccional no modelo de hiperactividade vesical induzido pelo ácido acético (0,2% v/v). A aplicação tanto endovenosa como intravesical de MRS 2179 causou um aumento significativo da

frequência miccional (diminuição do ICI). Estes resultados levam-nos a explorar a hipótese já referida por King *et al.*, (2004), da existência de um controlo inibitório sobre a contractilidade da bexiga, resultante da activação destes receptores pelo ATP/ADP, provavelmente mediado pelos receptores P2Y₁.

Interessante é, também, o facto da activação de receptores P2X₂ ter sido relacionada com situações de instabilidade contráctil do detrusor (Birder & de Groat, 2007). Uma vez que a activação de receptores P2X₂ presentes nas terminações nervosas motoras facilita a libertação de ACh, a interacção entre estes dois sistemas pode condicionar a fisiologia miccional e a sua alteração pode levar a situações de instabilidade da bexiga, como a verificada neste modelo animal de hiperactividade produzida pelo ácido acético (0,2% v/v) e mediada por valores elevados de ATP na bexiga.

Por outro lado, os receptores do subtipo P2X₃ têm sido associados a efeitos na micção e na sensação de dor em ratos e humanos (Ford *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2003; Tempest *et al.*, 2004). Também, foi já referida a alteração dos mecanismos desencadeantes do reflexo miccional quando se manipula a actividade deste subtipo de receptores (King *et al.*, 2004). Estas e outras questões relacionadas com a acção do PPADS administrado por via endovenosa no reflexo miccional terão que ser esclarecidas através da realização de experiências com este composto numa situação controlo e, também, através da utilização de antagonistas selectivos (e.g. A-317491) para se validar a relevância dos receptores P2X₃ em situações de hiperactividade vesical. A expressão de receptores P2X₃ está aumentada nos doentes portadores de cistite, e isso correlaciona-se com o aparecimento da sintomatologia dolorosa (Tempest *et al.*, 2004). Os receptores P2X₃ são os mais importantes na transmissão dolorosa numa população de fibras nervosas da bexiga que traduzem a distensão da mesma num sinal eléctrico (Vlaskovska *et al.*, 2001; Schwiebert *et al.*, 2003). Além destas funções, os receptores P2X₃ modulam a actividade das *umbrella cells* apicais em resposta à distensão da bexiga (função não-neuronal) (Wang *et al.*, 2005). Por outro lado, existem dados preliminares mostrando que o ATP e os seus produtos de metabolismo extracelular modulam a libertação de ACh induzida por estimulação dos nervos motores da bexiga humana e que a actividade dos receptores purinérgicos que facilitam a libertação de ACh está aumentada nos doentes com hiperactividade vesical por obstrução prostática (Correia-de-Sá *et al.*, 2008).

4.2 Conclusão

Como conclusão do trabalho realizado ficou demonstrada a viabilidade e reprodutibilidade deste modelo animal *in vivo* para o estudo da hiperactividade da bexiga, nomeadamente dos mecanismos purinérgicos envolvidos. Trata-se de um modelo em animal anestesiado, que é pouco invasivo e que possui excelentes características para permitir a manipulação farmacológica pré-clínica de receptores (e.g. purinérgicos) envolvidos no controlo da micção.

À semelhança do que foi observado noutros modelos de hiperactividade vesical (e.g. inflamação, cistite intersticial, irritação química com sulfato de protamina), a impermeabilidade da barreira urotelial pode estar afectada após a irritação com ácido acético (0,2 % v/v) permitindo a passagem de fármacos para as estruturas adjacentes (e.g. nervos sensitivos suburoteliais, músculo liso).

Os receptores P2 presentes nos nervos eferentes e aferentes, assim como nas células uroteliais e do músculo detrusor, estão directamente envolvidos na contractilidade e reflexo miccional, conforme se confirmou neste modelo. Este estudo mostrou que a componente nervosa aferente do reflexo miccional tem um papel muito relevante na mediação da resposta contráctil em situação de hiperactividade da bexiga. Outros componentes envolvidos na resposta contráctil da bexiga expressam receptores P2. Os resultados experimentais sugerem a existência de receptores do subtipo P2X₁ nas fibras musculares lisas do detrusor, que permitem explicar a redução da amplitude das contracções da bexiga em resposta à distensão na presença de PPADS e de NF023, aplicados tanto por via intravesical como endovenosa.

A Figura 9 mostra um modelo preliminar da via mecanossensitiva de natureza purinérgica representativa de uma situação de hiperactividade da bexiga.

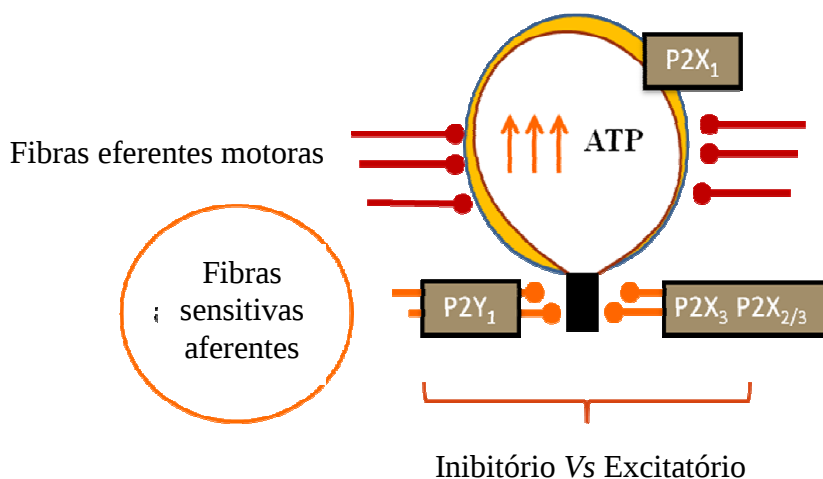


Figura 9: Possível modelo da via mecanosensitiva de natureza purinérgica, representativa de uma situação de hiperactividade da bexiga.

Os dados preliminares apresentados apontam para a localização de receptores $P2X_3$ e/ou $P2X_{2/3}$ nos nervos aferentes, cuja actividade parece estar aumentada em situações de hiperactividade vesical como a que se testou no presente trabalho. Após a identificação dos receptores $P2Y_1$ nos nervos sensitivos da bexiga e da sua actividade inibitória mediada endogenamente pelo ADP formado a partir do ATP libertado, torna-se agora importante avaliar como é que estes receptores interagem com os receptores excitatórios $P2X_3$ e/ou $P2X_{2/3}$ co-localizados nos nervos aferentes numa situação de hiperactividade da bexiga. Por outro lado, será ainda necessário avaliar qual dos componentes responsáveis pela actividade motora da bexiga (i.e. nervos parassimpáticos motores e/ou músculo liso) que possuem receptores $P2X_1$ é o mais relevante para a actividade do ATP numa situação de hiperactividade da bexiga.

Pela sua simplicidade e natureza integrativa, este modelo pode dar um contributo importante na tentativa de discernir novos alvos terapêuticos para situações patológicas de hiperactividade vesical.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBRACCHIO, M.P. & BURNSTOCK, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther*, 64, 445-75.
2. APODACA, G. (2004). The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic*, 5, 117- 28.
3. BAYLISS, M., WU, C., NEWGREEN, D., MUNDY, A.R. & FRY, C.H. (1999). A quantitative study of atropine-resistant contractile responses in human detrusor smooth muscle, from stable, unstable and obstructed bladders. *J Urol*, 162, 1833-9.
4. BENNETT, B.C., KRUSE, M.N., ROPPOLO, J.R., FLOOD, H.D., FRASER, M. & DE GROAT, W.C. (1995). Neural control of urethral outlet activity in vivo: role of nitric oxide. *J Urol*, 153, 2004-9.
5. BIRDER, L.A. & DE GROAT, W.C. (2007). Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol*, 4, 46-54.
6. BIRDER, L.A., BARRICK, S.R., ROPPOLO, J.R., KANAI, A.J., DE GROAT, W.C., KISS, S. & BUFFINGTON, C.A. (2003). Feline interstitial cystitis results in mechanical hypersensitivity and altered ATP release from bladder urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285, F423-9.
7. BIRDER, L.A., RUAN, H.Z., CHOPRA, B., XIANG, Z., BARRICK, S., BUFFINGTON, C.A., ROPPOLO, J.R., FORD, A.P., DE GROAT, W.C. & BURNSTOCK, G. (2004). Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287, F1084-91.
8. BURNSTOCK, G. & HOLMAN, M.E. (1961). The transmission of excitation from autonomic nerve to smooth muscle. *J Physiol*, 155, 115-33.
9. BURNSTOCK, G. & KENNEDY, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol*, 16, 433-40.
10. BURNSTOCK, G. (1976). Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience*, 1, 239-48.
11. BURNSTOCK, G. (1980). Purinergic nerves and receptors. *Prog Biochem Pharmacol*, 16, 141-54.
12. BURNSTOCK, G. (2001) Purinergic signalling in lower urinary tract. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Volume 151/I. Purinergic and Pyrimidinergic Signalling I -

- Molecular, Nervous and Urinogenitary System Function (Abbracchio, M.P. and Williams, M., eds), pp. 423–515, Springer Verlag
13. BURNSTOCK, G. (2004). Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol*, 4, 47-52.
 14. BURNSTOCK, G. (2006a). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci*, 27, 166-76.
 15. BURNSTOCK, G. (2006b). Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev*, 58, 58-86.
 16. BURNSTOCK, G., CAMPBELL, G., BENNETT, M. & HOLMAN, M.E. (1963). Inhibition of the Smooth Muscle on the Taenia Coli. *Nature*, 200, 581-2.
 17. BURNSTOCK, G., CAMPBELL, G., SATCHELL, D. & SMYTHE, A. (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol*, 40, 668-88.
 18. BURNSTOCK, G., DUMSDAY, B. & SMYTHE, A. (1972). Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *Br J Pharmacol*, 44, 451-61.
 19. COCKAYNE DA, HAMILTON SG, ZHU QM, et al., “Urinary bladder hyporreflexia and reduced pain-related behaviour In P2X3-deficient mice”, *Nature* (2000); 407: pp. 1011-1015.
 20. COCKAYNE, D.A., DUNN, P.M., ZHONG, Y., RONG, W., HAMILTON, S.G., KNIGHT, G.E., RUAN, H.Z., MA, B., YIP, P., NUNN, P., MCMAHON, S.B., BURNSTOCK, G. & FORD, A.P. (2005). P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol*, 567, 621-39.
 21. COCKAYNE, D.A., HAMILTON, S.G., ZHU, Q.M., DUNN, P.M., ZHONG, Y., NOVAKOVIC, S., MALMBERG, A.B., CAIN, G., BERSON, A., KASSOTAKIS, L., HEDLEY, L., LACHNIT, W.G., BURNSTOCK, G., MCMAHON, S.B. & FORD, A.P. (2000). Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature*, 407, 1011-5.
 22. CORREIA-DE-SÁ, P., SILVA-RAMOS, M., DUARTE-ARAÚJO, M., CAVADAS, V., MAGALHÃES-CARDOSO, T., LAFUENTE-DE-CARVALHO, J.-M. & FARIA, M (2008). Cholinergic nerve hyperactivity in obstructed human bladders: on the role of sustained P2X purinoceptors activation. *Purinergic Signalling*, 4, S104.
 23. DUARTE-ARAÚJO, M., NASCIMENTO, C., TIMÓTEO, M.A., MAGALHÃES-CARDOSO, T. & CORREIA-DE-SÁ, P. (2009). Relative contribution of ecto-ATPase

- and ectoATPDase pathways to the biphasic effect of ATP on acetylcholine release from myenteric motoneurons. *Br. J. Pharmacol.*, 156, 519-533.
24. FERGUNSON, D.R., KENNEDY, I., BURTON, T.J. (1997). ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes – a possible sensory mechanism? *J Physiol*, 505 (Pt2), 503 –11.
25. FORD, A.P., GEVER, J.R., NUNN, P.A., ZHONG, Y., CEFALU, J.S., DILLON, M.P. & COCKAYNE, D.A. (2006). Purinoceptors as therapeutic targets for lower urinary tract dysfunction. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 2, S132-43.
26. HIRAGATA, S., OGAWA, T., HAYASHI, Y., TYAGI, P., SEKI, S., NISHIZAWA, O., DE MIGUEL, F., CHANCELLOR, M.B. & YOSHIMURA, N. (2007). Effects of IP-751, ajulemic acid, on bladder overactivity induced by bladder irritation in rats. *Urology*, 70, 202-8.
27. KING, B.F., KNOWLES, I.D., BURNSTOCK, G. & RAMAGE, A.G. (2004). Investigation of the effects of P2 purinoceptor ligands on the micturition reflex in female urethane-anaesthetized rats. *Br J Pharmacol*, 142, 519-30.
28. KULLMANN, F.A., ARTIM, D.E., BIRDER, L.A. & DE GROAT, W.C. (2008). Activation of Muscarinic receptors in rat bladder sensory pathways alters reflex bladder activity. *J Neurosci*, 28, 1977-87.
29. MARINHAS J.G. *ET AL.* (2009). Resumo Soc. Port. Neurociências
30. O'REILLY, B.A., KOSAKA, A.H., CHANG, T.K., FORD, A.P., POPERT, R., RYMER, J.M. & MCMAHON, S.B. (2001). A quantitative analysis of purinoceptor expression in human fetal and adult bladders. *J Urol*, 165, 1730-4.
31. SCHWIEBERT, E.M. & ZSEMBERY, A. (2003). Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1615, 7-32.
32. SILVA A, SILVA C, CRUZ F, “Tratamento da bexiga hiperactiva”, *Acta Urológica* 2007, 24; 3: 81-96
33. SILVA C, RIBEIRO MJ, CRUZ F, “The effect of intravesical resiniferatoxin in patients with idiopathic detrusor instability suggests that involuntary detrusor contractions are triggered by C-fiber input”, *J Urol* (2002); 168: pp. 575-579
34. SILVA N., (2008), Tese de Licenciatura em Bioquímica, FCUP / ICBAS-UP
35. SMITH C, GANGITANO D., MUNOZ A., SALAS N., BOONE T., (2008). Botulinum toxin type A normalizes alterations in urothelial ATP and NO release by chronic spinal cord injury. *Neurochemistry International* 52, 1068 – 1075.

36. SUN, Y. & CHAI, T.C. (2004). Up-regulation of P2X3 receptor during stretch of bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. *J Urol*, 171, 448-52.
37. SUN, Y., KEAY, S., DE DEYNE, P.G. & CHAI, T.C. (2001). Augmented stretch activated adenosine triphosphate release from bladder uroepithelial cells in patients with interstitial cystitis. *J Urol*, 166, 1951-6.
38. SUN, Y., MALOSS, J., JACOBS, S.C. & CHAI, T.C. (2002). Effect of doxazosin on stretch-activated adenosine triphosphate release in bladder urothelial cells from patients with benign prostatic hyperplasia. *Urology*, 60, 351-6.
39. TEMPEST, H.V., DIXON, A.K., TURNER, W.H., ELNEIL, S., SELLERS, L.A. & FERGUSON, D.R. (2004). P2X and P2X receptor expression in human bladder urothelium and changes in interstitial cystitis. *BJU Int*, 93, 1344-8.
40. VLASKOVSKA, M., KASAKOV, L., RONG, W., BODIN, P., BARDINI, M., COCKAYNE, D.A., FORD, A.P. & BURNSTOCK, G. (2001). P2X3 knock-out mice reveal a major sensory role for urothelially released ATP. *J Neurosci*, 21, 5670-7.
41. WANG, E.C., LEE, J.M., RUIZ, W.G., BALESTREIRE, E.M., VON BODUNGEN, M., BARRICK, S., COCKAYNE, D.A., BIRDER, L.A. & APODACA, G. (2005). ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest*, 115, 2412-22.
42. WU, C., BAYLISS, M., NEWGREEN, D., MUNDY, A.R. & FRY, C.H. (1999). A comparison of the mode of action of ATP and carbachol on isolated human detrusor smooth muscle. *J Urol*, 162, 1840-7.
43. YOSHIMURA N, "Lower urinary tract symptoms and bladder afferent activity", (2007), *Neurourol. Urodynam.* 26: 908-913.
44. ZHONG, Y., BANNING, A.S., COCKAYNE, D.A., FORD, A.P., BURNSTOCK, G. & MCMAHON, S.B. (2003). Bladder and cutaneous sensory neurons of the rat express different functional P2X receptors. *Neuroscience*, 120, 667-75.