

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Fisiología



TESIS DOCTORAL

Participación de las edotelinas en la función del cuello vesical y su implicación en la continencia urinaria

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Luis Arteaga Garrido

Directores

Medardo Hernández Rodríguez
Albino García Sacristán

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



"PARTICIPACIÓN DE LAS ENDOTELINAS EN LA
FUNCIÓN DEL CUELLO VESICAL Y SU
IMPLICACIÓN EN LA CONTINENCIA
URINARIA".

TESIS DOCTORAL

Jose Luis Arteaga Garrido

Madrid, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE FISIOLÓGÍA ANIMAL

El Dr. Medardo Hernández Rodríguez y el Prof. Dr. Albino García Sacristán, Profesor Titular y Catedrático de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, respectivamente,

CERTIFICAN:

Que D. José Luis Arteaga Garrido, Licenciado en Farmacia, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado: "Participación de las endotelinas en la función del cuello vesical y su implicación en la continencia urinaria" como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Junio de 2011

Dr. Medardo V. Hernández Rodríguez

Prof. Dr. Albino García Sacristán

*A ti mamá, lo prometí. Te dedico
más que el acabado, su proceso.*

"Si no esperas lo inesperado no
lo reconocerás cuando llegue".
Heráclito de Efeso

AGRADECIMIENTOS

Ahora, que acaba esta experiencia, no queriendo dejar sin amarrar a banco de memoria gratitudes, para anclarlas seguras, las dejo grabadas con letras.

Primero, gracias a mi director de tesis, el Dr. Medardo V. Hernández Rodríguez, por permitirme asomarme de puntillas a su nivel científico y admitirme al lujo de su equipo.

Al Prof. Albino García Sacristán, co-director de esta Tesis, por su corrección elegante y exquisita, y por la altura de su magisterio que contagia papers y pipetas.

Al Prof. Luis Rivera de los Arcos, por hacerme partícipe de sus descubrimientos, por tratarme cercano y compartir cañas y charletas.

A las Dras. Paz Recio, Ana Sánchez, Belén Climent y Dolores Prieto por ayudarme, aconsejarme y animarme cuando todo era inalcanzable, cuando el tiempo decía; “no es tu tiempo”... y al resto del Departamento, Dr. Angel Agis y Dras. Sara Benedito, Cristina Martínez, Emilia Muñoz, Eloira López y Rafaela Raposo, por aceptarme en él.

A Cristina Contreras por su comprensión cercana y compañera y a Ana Martínez Sáenz por su ayuda, sin la cual esto no hubiera sido posible y a Ana Sofi y a Vitor por ayudarme en todo.

A Macarena por su gestión y simpatía, y a Paco por su, crónico, buen humor.

A Manolo, por ese tiempo compartido a las tantas de la noche, por su paciente espera, por esas salidas con linterna, por su ayuda técnica y humana, por esa compañía que alivió angustias y por ese compartir humanas condiciones.

Al Dr. Salvador Bustamante, por su docencia fácil y sencilla, su carácter afable, sus conocimientos lisboetas, su humor franco, su doctrina.

A la Dra. María Pilar Martínez del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Facultad de Veterinaria de la UCM de Madrid, por su docto trabajo de inmunohistoquímica.

Al Dr. Luis M. Orensanz, del Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal de Madrid por sus estudios de biología molecular, sus enseñanzas, sus consejos y por compartir rutas, senderos y cimas conquistadas.

A la Dra. María Victoria Barahona del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la UCM, por su revisión profunda y meticulosa de la Memoria.

Y porque los finales, son consecuencia de inicios, por justicia, gracias:

Al Prof. D. Carlos Martínez Honduvilla, por su docencia en Bioquímica en mis años mozos y en la reciente Bioquímica clínica del Máster, por facilitarme el contacto para mi trabajo de investigación del Máster y apoyar mi esfuerzo.

A las Dras. Pilar González y Carmen Arce de Obieta, del Departamento de Bioquímica, que me adoptaron mayor en mis primeras investigaciones en enzimología, por sus inabarcables calidad humana y conocimientos científicos, por incorporarme a su grupo, desarrollando estudios sobre genisteína y aspectos tendentes a la protección del área de penumbra frente a la cascada isquémica del Ictus. Cariño intenso y gratitud.

A esta vieja, sabia, Facultad que me reacoge, me vuelve adicto al conocimiento, a la ciencia y a ese humanismo tan suyo, junto a ese único y cálido sol de escalinata; que me recibió de nuevo con la ciencia multidisciplinar y la multiculturalidad de: Jano (líquenes), Bea (suelos), Toñi (palinología), Cristina y Gabriella (edafología) , M^a Jesús (bioquímica y nutrición), con las salidas de: identificación de suelos, rastreo de flora desaparecida, etc., con los estudios de: biodiversidad, microbiología de suelos y un largo etc. en ese Departamento, entrañable, de microscopio y azada de Edafología, con sus Dres. (Concha, Miguel, Mayte, Antonio y Menchú, ..) todos ellos grabaron en mí, descubrimientos científicos y personales, inolvidables con su verde-tierra juventud y me regalaron ansiados barnices humanistas.

A D. Ignacio Lozón Urueña, Director en mi lugar de trabajo, por facilitar mi desarrollo personal, humano y científico. Colega, compañero.

A mi padre del que heredé el espíritu de recolector de retos, de rebeldía permanente frente al calendario y del que no aprehendí lo suficiente de su prudencia y paciencia.

A Carmen compañera de aulas y de vida, a nuestros hijos, Javier y Luis, nuestra, sin duda, mejor obra y a la familia, que soportó estoicamente las reacciones secundarias a este sueño.

Y guiado por León Felipe, poeta y farmacéutico, a todos los que injustamente molestara, por su perdón, y a mí mismo, por querer perdonarme.

Este trabajo de investigación ha sido financiado gracias a un proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación (PS09/00044) titulado: *“Mecanismos involucrados en la relajación independiente de óxido nítrico en el cuello de la vejiga urinaria: Implicación terapéutica en la incontinencia urinaria producida por deficiencia esfintérica intrínseca”*, cuyo investigador principal es el Dr. Medardo V. Hernández Rodríguez.

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosin 5'-difosfato
AdR	Receptor adrenérgico
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
4-AP	4-aminopiridina
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BK _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia
BR	Receptor para bradiquinina
Ca ²⁺	Ión calcio
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
ChTX	Caribdotoxina
Cl ⁻	Ión cloro
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CPR	Componente proteico del receptor
CRF	Factor liberador de corticotropina
DAG	Diacilglicerol
EFG	Factor de crecimiento epidérmico
ET-1	Endotelina-1
ET-2	Endotelina-2
ET-3	Endotelina-3
ET _A	Receptor de endotelina tipo A
ET _B	Receptor de endotelina tipo B
FE	Fenilefrina

G _i	Subunidad inhibidora de las proteínas G
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
H ⁺	Protón
5-HT	Serotonina
5-HT ₁₋₇	Receptores para serotonina de subtipo 1-7
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
IbTX	Iberiotoxina
ICS	Sociedad Internacional de Continencia
IE	Incontinencia por estrés
IK _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio de intermedia conductancia
IL-1	Interleucina -1
IP ₃	Inositol trifosfato
IP ₃ r	Receptores para inositol trifosfato
IU	Incontinencia de urgencia
K ⁺	Ión potasio
K _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio
K _{ATP}	Canales de potasio dependientes de ATP
K _v	Canales de potasio dependientes de voltaje
L-NOARG	N ^G - nitro-L-Arginina
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MLC	Cadena ligera reguladora de miosina
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MLC-P	Cadena ligera reguladora de miosina fosforilada
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Ión sodio
NANC	No adrenérgico no colinérgico
NicR	Receptor nicotínico
NK1	Receptor taquicinérgico subtipo 1

NK ₂	Receptor de taquicininas del subtipo 2
NK ₃	Receptor de taquicininas del subtipo 3
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima de síntesis de óxido nítrico
eNOS	Enzima de síntesis de óxido nítrico endotelial
iNOS	Enzima de síntesis de óxido nítrico endotelial inducible
nNOS	Enzima de síntesis de óxido nítrico neuronal
NPY	Neuropéptido Y
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a] quinoxalina-1-ona
PAC ₁	Receptor específico de PACAP
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiario
PDE ₍₁₋₅₎	Fosfodiesterasas del tipo 1 al 5
PGE ₁	Prostaglandina E ₁
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGs	Prostaglandinas
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5 difosfato
PKA	Proteína cinasa dependiente del AMPc
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa dependiente del GMPc
PLC	Fosfolipasa C
Rho	Cinasa específica
Rh \square k	Rho-cinasa asociada
ROC	Canales de calcio activados por receptor
RS	Retículo sarcoplásmico
Ryr	Receptor de rianodina
SK _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio de baja conductancia
SNA	Sistema Nervioso Autónomo

SOC	Canales de calcio operados por depósito
SP	Sustancia P
SSF	Solución salina fisiológica
SSFK	Solución salina fisiológica rica en potasio
TH	Tirosín-hidroxilasa
TKs	Taquicininas
TNF- α	factor alfa de necrosis tumoral
Trk-A	Receptor de tirosina cinasa A
TRP	Receptores vaniloides
TRPV1	Canal iónico de la familia de receptores vaniloides
TTX	Tetrodotoxina
TUI	Cuadro sintomatológico del Tracto Urinario Inferior
ω -CgTX	ω -conotoxina GVIA
VEGF	Factor de crecimiento endotelial
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VOC	Canales de calcio dependientes de voltaje
VPAC ₁	Receptor con similar afinidad por VIP y PACAP
VPAC ₂	Receptor con similar afinidad por VIP y PACAP

1.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1	ANATOMÍA DEL TRACTO URINARIO INFERIOR.....	3
1.2	FISIOLOGÍA DEL TRACTO URINARIO INFERIOR.....	6
1.3	UROTELIO Y SUBUROTELIO.....	13
1.4	ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN.....	19
1.4.1	<i>Regulación de las proteínas contráctiles.....</i>	19
1.5	EXCITACIÓN DE LA MEMBRANA.....	21
1.5.1	<i>Potencial de la membrana en reposo y potencial de acción.....</i>	21
1.5.2	<i>Papel del Ca²⁺ en la contracción.....</i>	22
1.5.3	<i>Canales de Ca²⁺.....</i>	23
1.5.3.1	<i>Canales de Ca²⁺ activados por voltaje.....</i>	24
1.5.3.2	<i>Canales de Ca²⁺ activados por agonistas.....</i>	24
1.5.3.3	<i>Canales de Ca²⁺ activados por depósito.....</i>	25
1.5.4	<i>Mecanismos de liberación de Ca²⁺ intracelular.....</i>	26
1.5.4.1	<i>Inositol trifosfato.....</i>	26
1.5.4.2	<i>Receptor de rianodina.....</i>	27
1.5.5	<i>Canales de K⁺.....</i>	28
1.5.5.1	<i>Canales de K_{ATP}.....</i>	29
1.5.5.2	<i>Canales de K_{Ca}.....</i>	29
1.5.5.3	<i>Canales de K_v.....</i>	31
1.5.6	<i>Canales activados por estiramiento.....</i>	32

1.5.7	<i>Canales activados por ligando</i>	33
1.5.8	<i>Actividad miogénica</i>	33
1.5.9	<i>Células intersticiales</i>	35
1.6	CONTROL NERVIOSO Y HORMONAL	36
1.6.1	<i>Mecanismos colinérgicos</i>	36
1.6.1.1	<i>Receptores muscarínicos</i>	36
1.6.2	<i>Mecanismos adrenérgicos</i>	38
1.6.2.1	<i>Receptores adrenérgicos α</i>	38
1.6.2.2	<i>Receptores adrenérgicos β</i>	39
1.6.3	<i>Mecanismos no adrenérgicos no colinérgicos</i>	42
1.6.3.1	<i>Adenosina 5'-trifosfato (ATP)</i>	42
1.6.3.2	<i>Óxido nítrico (NO)</i>	44
1.6.3.3	<i>Neuropéptidos</i>	45
1.6.3.3.1	<i>Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiario (PACAP) y péptido intestinal vasoactivo (VIP)</i>	45
1.6.3.3.2	<i>Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)</i>	47
1.6.3.3.3	<i>Taquicininas (TKs)</i>	47
1.6.3.3.4	<i>Angiotensinas</i>	48
1.6.3.4	<i>Prostanoides</i>	48
1.6.3.5	<i>Inhibidores de las fosfodiesterasas</i>	50
1.7	INCONTINENCIA URINARIA	50
1.8	ENDOTELINAS Y SUS RECEPTORES	55
1.8.1	<i>Estructura, síntesis y liberación de las endotelinas</i>	56
1.8.2	<i>Receptores de endotelinas ET_A y ET_B</i>	57
1.8.3	<i>Mecanismos de transducción de los receptores de endotelinas</i>	58
1.8.4	<i>Receptor dual endotelina-angiotensina (DEAR)</i>	60

1.8.5	<i>Otros receptores de endotelinas.....</i>	61
1.8.6	<i>Acciones fisiológicas y fisiopatológicas de las endotelinas.....</i>	61
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	65
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
3.1	MATERIAL.....	73
3.1.1	<i>Material biológico.....</i>	73
3.1.2	<i>Material de laboratorio.....</i>	73
3.1.2.1	<i>Instrumentación general.....</i>	73
3.1.2.2	<i>Equipamiento para el registro de la tensión isométrica de las preparaciones de músculo liso.....</i>	73
3.1.2.3	<i>Equipamiento para la identificación de proteínas por Western Blotting.....</i>	74
3.1.3	<i>Reactivos.....</i>	75
3.1.4	<i>Soluciones.....</i>	77
3.1.4.1	<i>Soluciones fisiológicas utilizadas en el estudio funcional.....</i>	77
3.1.4.2	<i>Soluciones para el estudio inmunohistoquímico.....</i>	78
3.1.4.3	<i>Tampones utilizados para Western Blotting.....</i>	78
3.2	MÉTODOS.....	79
3.2.1	<i>Western blotting.....</i>	79
3.2.2	<i>Inmunohistoquímica.....</i>	80
3.2.3	<i>Estudios funcionales.....</i>	81
3.2.3.1	<i>Procedimiento experimental.....</i>	81
3.2.3.2	<i>Cálculo y estadística.....</i>	82

4.	RESULTADOS.....	85
4.1	WESTERN BLOTTING E INMUNOHISTOQUÍMICA.....	87
4.1.1	<i>Expresión de receptores ET_A y ET_B.....</i>	87
4.2	ESTUDIOS FUNCIONALES.....	88
4.2.1	<i>Contracción inducida por los agonistas endógenos de los receptores de las endotelinas.....</i>	89
4.2.2	<i>Caracterización farmacológica de los receptores de endotelina involucrados en la contracción inducida por la ET-1.....</i>	90
4.2.3	<i>Papel del Ca²⁺ extracelular e intracelular y de mecanismos de sensibilización al Ca²⁺ en la contracción inducida por la ET-1.....</i>	92
4.2.4	<i>Modulación de la ET-1 sobre la contracción inducida por la NA</i>	94
4.2.5	<i>Implicación de mecanismos neuronales en la contracción inducida por la ET-1.....</i>	95
4.2.6	<i>Implicación de los receptores ET_A en la neurotransmisión no adrenérgica no colinérgica (NANC) inhibitoria del cuello vesical.....</i>	97
4.2.7	<i>Implicación de los receptores ET_B en la relajación del cuello vesical</i>	99
4.2.8	<i>Participación de la vía de la PKA y canales de K⁺ en la relajación inducida por BQ3020.....</i>	101
4.2.9	<i>Implicación de los receptores ET_B en la neurotransmisión no adrenérgica no colinérgica (NANC) inhibitoria del cuello vesical.....</i>	104

5.	DISCUSIÓN.....	107
5.1	CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES DE DE ENDOTELINA FUNCIONALMENTE ACTIVOS INVOLUCRADOS EN LA CONTRACCIÓN DEL CUELLO DE LA VEJIGA.....	109
5.2	CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES DE ENDOTELINAS FUNCIONALMENTE ACTIVOS INVOLUCRADOS EN LA RELAJACIÓN DEL CUELLO DE LA VEJIGA.....	113
6.	CONCLUSIONES.....	117
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	121
8.	RESUMEN.....	145

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. ANATOMÍA DEL TRACTO URINARIO INFERIOR

El Tracto Urinario Inferior está formado por la vejiga, la uretra y el músculo estriado periuretral, así como por la próstata en el varón, los cuales, constituyen una unidad anatómica y funcional, cuya integridad y correcto funcionamiento son imprescindibles para una correcta continencia y micción.

La vejiga urinaria es un órgano seromuscular hueco situado en la cavidad pélvica. Por la parte de arriba está recubierta con el peritoneo parietal que lo separa de la cavidad abdominal.

Está cubierta por el peritoneo en su cara superior a través del cual se relaciona con las asas intestinales delgadas y por abajo limita con la próstata en el hombre y con la musculatura perineal en la mujer. Por detrás se relaciona con el recto, en el hombre y con el útero y la vagina en la mujer. Recibe la orina, procedente del riñón, a través de los uréteres, la almacena y expulsa a través de la uretra. La capacidad de depósito de la vejiga es de 300 a 350 cc, pudiendo aumentar a un litro en los casos de retención aguda de orina. Cuando está llena tiene forma esférica, y cuando está vacía se asemeja a un tetraedro con:

- Vértice anterosuperior en el que se fija el uraco que es un resto alargado y fibroso del alantoides, que comunica la cápsula de la vejiga urinaria con el ombligo, por dentro de la pared abdominal.
- Vértice anteroinferior que corresponde al orificio uretral.
- Vértices superoexternos en los que desembocan los uréteres.

Consta de dos partes: el cuerpo y la base. El cuerpo es la parte superior y más amplia de la vejiga, que aumenta considerablemente de volumen cuando está llena de orina. La base, comprende el cuarto inferior del órgano, está un poco por detrás y debajo del cuerpo y en ella desembocan los uréteres. La base, después de un corto trayecto se estrecha constituyendo el cuello vesical y se continúa inmediatamente con la uretra. Observado el órgano por su superficie interna o mucosa presenta a nivel de la base un relieve transversal de unos 5 cm con un orificio en cada extremo que son las desembocaduras de los uréteres. Por debajo y delante de estos tres accidentes anatómicos se observa otro orificio que es la continuación del cuello con la uretra. Este conjunto de dos orificios superiores separados por un saliente transversal y otro

orificio inferior y posterior tiene la forma de un triángulo invertido por lo que recibe el nombre de trígono vesical.

La pared vesical tiene tres capas: la más externa adventicial, compuesta principalmente por tejido conectivo, una capa de músculo liso y la más interna que es una membrana mucosa.

La capa muscular está formada por fibras dispuestas circular y longitudinalmente en tres substratos íntimamente relacionados lo que permite que se contraigan o relajen solidariamente en conjunto y no en forma aislada asegurando su efectividad. Toda esta musculatura del cuerpo vesical se denomina detrusor. A nivel del cuello y nacimiento de la uretra las fibras circulares se condensan y constituyen el esfínter interno de la vejiga y uretra cuya contracción es cerrar este tramo de la vía urinaria y oponerse al detrusor (Figura 1.1).

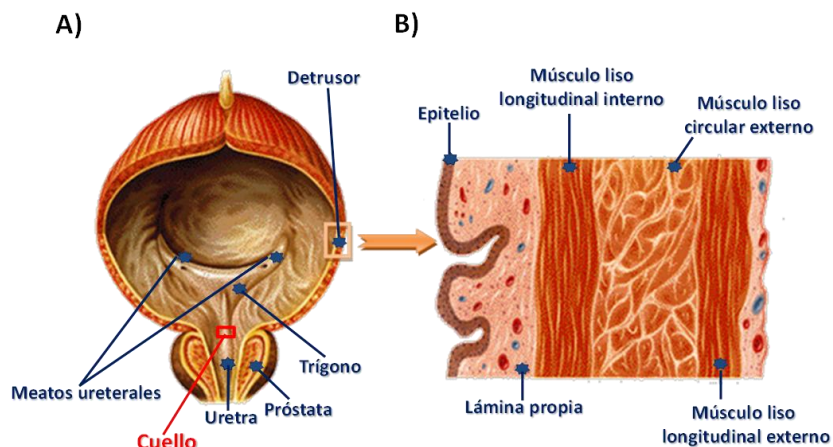


Figura 1.1 Anatomía e histología de la vejiga urinaria. (A) Esquema de la estructura de la vejiga urinaria, donde se indica el músculo detrusor, meatos ureterales que definen el trígono, el cuello y la uretra que juntos forman el esfínter uretral interno, y la próstata, solamente en varones. (B) Estructura histológica de la pared de la vejiga urinaria. La pared vesical está constituida por tres capas, la más externa o adventicia, músculo detrusor y urotelio.

La mucosa vesical tiene dos partes, el urotelio, compuesto por células transicionales que descansan sobre la lámina propia y la lámina propia como estructura de soporte. La lámina propia contiene componentes de matriz extracelular, fibroblastos y células musculares lisas. Las células transicionales, poseen una estructura que permite contraerse y aumentar su tamaño según se llena la vejiga. Estas

células son muy activas desde un punto de vista metabólico, con importante actividad enzimática. La uretra es el conducto que lleva la orina al exterior. Su anatomía difiere en el hombre y la mujer derivado del hecho de que en el primero, además de su función urinaria, cumple un rol genital al conducir el semen a nivel de su porción anterior, esponjosa o peneana, la más larga. Esto hace que sea más larga que la femenina, atraviese el espesor de la glándula prostática de la que recibe su secreción a través de pequeños conductos que desembocan por pequeños orificios en su cara inferior. Desde su nacimiento a partir del cuello, continúa la dirección de la vejiga (abajo y atrás) y se introduce en la próstata donde transcurre describiendo una ligera curva cóncava hacia delante y arriba para emerger de la glándula un poco por detrás de su vértice. Esta es la porción prostática de la uretra con una longitud entre 25 y 30 mm. A continuación, la uretra atraviesa el periné donde se rodea de un anillo de fibras musculares estriadas que constituyen el esfínter externo. Esta es la porción membranosa de la uretra que mide 10 a 12 mm. La última, y más larga porción de la uretra es la esponjosa o peneana que desciende delante del recto unos pocos mm y luego se introduce para recorrer el cuerpo esponjoso del pene ubicado por debajo de los cuerpos cavernosos, muy cerca de la superficie cutánea del periné. Termina en el glande por un orificio, el meato uretral. A diferencia de las dos anteriores que son fijas, ésta es móvil y su longitud es de unos 15 cm. La uretra femenina, que solo sirve para conducir la orina al exterior, es más corta y sencilla que la masculina. Mide alrededor de 3,5 cm. de largo y tiene un trayecto hacia abajo y un poco adelante ubicándose por detrás de la sínfisis pubiana y delante de la vagina. Desemboca en la extremidad anterior de la vulva, inmediatamente por detrás del clítoris. La uretra está formada por una capa interna o mucosa, una media (solo en el hombre) o conectiva laxa (en la mujer) y una externa o muscular lisa con fibras longitudinales y transversales. Estas últimas, en el origen del órgano se continúan con las del cuello vesical y constituyen el esfínter interno o liso. El cierre de la uretra se verifica a partir de dos esfínteres, uno involuntario (interno) y otro voluntario (externo). La vejiga y la uretra tienen una inervación somática (voluntaria) y vegetativa (involuntaria) que regulan las funciones de almacenamiento y expulsión de la orina.

1.2. FISIOLOGÍA DEL TRACTO URINARIO INFERIOR

La función del Tracto Urinario Inferior es doble, acumula y mantiene la orina durante la continencia y la expulsa al exterior durante la micción. Estas dos funciones son producto de una compleja interrelación en la que participan de forma sinérgica la vejiga, la musculatura del cuello vesical, la uretra (músculo liso y músculo estriado) y el diafragma pelviano. La vejiga y la uretra tienen una inervación somática (voluntaria) y vegetativa (involuntaria) que regulan las funciones de almacenamiento y expulsión de la orina.

La micción consiste en la expulsión de orina desde la vejiga, a través de la uretra, hasta el exterior. El reflejo normal de la micción en el adulto es mediado por una vía espinobulboespinal que coordina la actividad del centro pontino de la micción y de la sustancia gris periacueductal del tronco del encéfalo. En el feto y el neonato, la micción es básicamente un reflejo espinal, el cual durante el desarrollo se transforma en un reflejo bulboespinal bajo el control suprapontino.

La micción ocurre en respuesta a señales aferentes (en la pared de la vejiga urinaria existen unos receptores sensoriales llamados receptores de estiramiento de la pared vesical que captan la presión y el aumento del volumen de la vejiga, estando los más importantes localizados en el cuello vesical) provenientes del tracto urinario inferior; la distensión de la pared de la vejiga es considerada el estímulo primario. Estos estímulos son conducidos por los nervios pélvicos (vesicales) e hipogástricos, respectivamente. Sobre la médula espinal actúan los centros superiores del tronco cerebral y del cerebro por medio de su estimulación o inhibición. Los centros rostrales pontinos determinan el comienzo de la micción.

La vejiga y la uretra están inervadas por el Sistema Nervioso Autónomo: nervio hipogástrico y nervio pélvico, de naturaleza simpática y parasimpática respectivamente; mientras el esfínter estriado y todo el piso perineal están regulados somáticamente a través del nervio pudendo interno y sus ramas sensitivas y motoras (Figura 1.2).

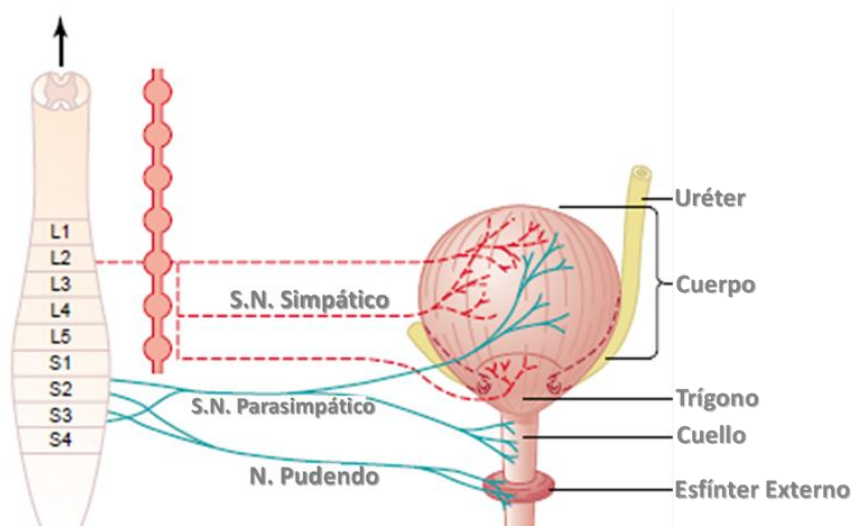


Figura 1.2 Inervación de la vejiga urinaria (Adaptación de Guyton-Hall, 2006).

La inervación vegetativa que es simpática y parasimpática gobierna la sensibilidad vesical y la contracción-relajación del detrusor y del esfínter interno de la uretra. El parasimpático se origina en las astas laterales de los mismos segmentos medulares sacros. Los nervios sacros portan las fibras parasimpáticas que confluyen para formar los nervios pélvicos que terminan en pequeños ganglios (nivel preganglionar) cerca de la vejiga y de ellos salen fibras postganglionares que terminan en receptores sensitivos y fibras musculares. La inervación simpática se origina en las astas laterales de los de los mielómeros toracolumbares T11 - L2 (de Groat y Yoshimura 2001; Yoshimura y Chancellor 2007). Las fibras que salen del raquis con los respectivos nervios raquídeos se desprenden de ellos por las ramas comunicantes que van a confluir en los ganglios de la cadena simpática lumbar (nivel preganglionar). El nivel postganglionar se inicia con los nervios esplácnicos que se originan en un plexo cuyos componentes provienen de dicha cadena. Los nervios esplácnicos emiten ramas que se anastomosan para formar el plexo hipogástrico alrededor de los vasos del mismo nombre. Sus ramas vesicales se anastomosan con las de los nervios pélvicos y penetran en la vejiga.

La médula espinal y sus nervios son los efectores que a su vez reciben influencias de niveles superiores del Sistema Nervioso Central (tronco cerebral, centros extrapiramidales, tálamo y corteza cerebral parietal y frontal). La regulación

ejercida por el SNA es modulada por centros medulares y encefálicos de forma antagonica, ya que mientras la fase de activación simpática favorece el llenado de la vejiga, el sistema nervioso parasimpático origina el vaciado de la misma.

El sistema parasimpático a través del asta lateral de la médula sacra actúa mediante la liberación de acetilcolina (ACh) a nivel de los ganglios del plexo pélvico (efecto nicotínico) donde se estimulan las fibras postganglionares que a su vez liberan ACh en el músculo detrusor e inducen su contracción vía activación de los receptores muscarínicos M_2/M_3 (Hegde, 2006). La liberación de ACh desde las terminaciones nerviosas parasimpáticas se produce conjuntamente con adenosina 5'-trifosfato (ATP), el cual, actúa como cotransmisor parasimpático responsable de la contracción resistente a la atropina a través de la activación de receptores purinérgicos P2X (preferentemente del subtipo P2X₁) cuya expresión se encuentra incrementada en la hiperactividad vesical (Burnstock, 1972; Burnstock, 2007; Yoshimura y col., 2008). Asimismo, los nervios parasimpáticos ejercen un efecto relajante en el músculo liso de la uretra a través de la liberación de óxido nítrico (NO) (Andersson, 1998, 2001; Brading, 1999; Yoshimura, 2003).

El mismo mecanismo y efecto se produce cuando estímulos provenientes de las astas anteriores de los mismos segmentos de la médula sacra llegan al esfínter estriado de la uretra a través del nervio pudendo. El centro medular (asta lateral de la médula espinal) que interviene en la contracción del cuerpo vesical (detrusor) no inerva el esfínter estriado ni el liso de modo que su efecto es netamente estimulante de la contracción vesical y por lo tanto del vaciado del órgano. A su vez, el asta anterior de la médula no envía inervación al detrusor, únicamente lo hace al esfínter externo, de modo que solo gobierna el cierre de salida de orina e induce su acumulación en la vejiga.

Los centros motores simpáticos estimulan la contracción de la musculatura del cuello vesical y de la uretra y causan relajación del detrusor. Las fibras preganglionares liberan ACh que se une a receptores nicotínicos de las fibras postganglionares, las cuales, discurren por el nervio hipogástrico liberando noradrenalina (NA) en sus terminaciones. Esta NA produce una potente relajación del detrusor vía activación de receptores adrenérgicos β_2 y β_3 y una contracción de escasa trascendencia mediada a través de una población minoritaria de receptores adrenérgicos α_1 (Nomiya y Yamaguchi, 2003).

La inervación somática es responsable de la contracción del músculo estriado del esfínter uretral externo. Dichas fibras se originan en las astas anteriores de los segmentos medulares sacros S2-S4 (núcleo de Onuf), salen por las raíces anteriores y constituyen el nervio pudendo. La estimulación de dicho nervio produce la contracción del músculo estriado del esfínter uretral externo a través de la liberación de ACh desde sus terminaciones, la cual, activa los receptores nicotínicos de la membrana de la célula muscular.

Si la vejiga está vacía o con menos de 350 ml de orina o con una presión intravesical de 15 cm de agua, el detrusor está relajado de modo que el tono normal de los esfínteres interno y externo impide la salida de orina. A medida que la llegada adicional de orina sobrepasa los valores de su volumen y de su presión dentro de la cavidad vesical, se produce el estiramiento y compresión de los receptores de la mucosa y túnica muscular con lo que se pone en actividad la médula espinal que por sus conexiones superiores induce una respuesta.

Si las condiciones son las adecuadas para que se desencadene la micción, la zona extrapiramidal del cerebro (lóbulo frontal) envía estímulos al hipotálamo (centros parasimpáticos) que son conducidos a un centro de la parte superior de la protuberancia anular y de allí a la médula sacra. Esto produce una contracción del detrusor y una relajación de los dos esfínteres.

Si no se produce la micción, el lóbulo frontal informa al hipotálamo donde se inhibe el área parasimpática y se estimula la simpática, de allí parten las órdenes hacia los tubérculos cuadrigéminos anteriores que a su vez actúan sobre la médula dorsal, lumbar y sacra. El resultado es la contracción de los esfínteres que contrarrestan la contracción del detrusor. El resultado es la retención de la orina a pesar de que exista deseo miccional que, por otra parte, dura unos pocos minutos o segundos ya que la contracción del detrusor no es sostenida sino intermitente sobreviniendo una relajación. Como la contracción es repetitiva el ciclo se reitera.

La interrelación existente entre los centros sacro y pudendo va a permitir que interactúen con perfecta sincronización durante la micción y la interrupción voluntaria del vaciado vesical. Los nervios hipogástrico, pélvico y pudendo transmiten, además, a la médula espinal lumbosacra estímulos sensoriales aferentes procedentes de la vejiga y la uretra (Andersson y Wein, 2004; Yoshimura y Chancellor, 2007). Las aferentes del nervio pélvico, monitorizan el volumen de la vejiga en la fase de llenado, así como la amplitud de las contracciones vesicales

durante la micción. Dicha inervación sensorial está integrada por fibras III A δ ligeramente mielinizadas presentes en la capa muscular y por fibras IV C amielinizadas de localización más dispersa en el músculo y por debajo y en el interior del urotelio (Andersson, 2002; Ouslander, 2004; Yoshimura y Chancellor, 2007). Las fibras C pueden ser sensibles o insensibles a la neurotoxina sensorial capsaicina, presentan un umbral más alto de generación de impulsos en respuesta al estiramiento de la pared vesical que las fibras A δ (Häbler y col., 1990; Dmietrieva y McMahon, 1996). Estas últimas, además, responden principalmente a la distensión vesical mientras que las fibras C pueden ser activadas también por una gran variedad de neurotransmisores, como el ATP, las taquicininas (TKs), bradicininas, etc., liberados desde el urotelio y el detrusor (Aizawa y col., 2011).

Durante la fase de llenado, la orina que llega a la vejiga produce una distensión de sus paredes, las cuales a diferencia de lo que ocurre en otros músculos lisos del organismo, no responde con contracción a dicho estiramiento sino con "*acomodación*" a los volúmenes crecientes sin aumento significativo de la presión en su interior por lo que no se percibe la sensación de llenado hasta alcanzar su capacidad máxima fisiológica. Esta es una característica de las propiedades de elasticidad de las miofibrillas del detrusor y de su tono (Yoshimura y Chancellor, 2007). En la distensión de la vejiga se originan los estímulos aferentes del arco reflejo de la micción. Este estímulo propioceptivo constituye la señal que es transmitida en forma de impulsos nerviosos a través de las fibras nerviosas aferentes tipo III A δ hasta los segmentos medulares sacros S2-S4, activando motoneuronas del nervio pudendo y la consecuente liberación de ACh que causa la contracción de esfínter uretral externo, produciéndose así continencia urinaria. Dichas aferentes activan, además, los centros motores simpáticos (localizados en los segmentos medulares toracolumbares T11-L2), los cuales, liberan NA desde el plexo hipogástrico, produciendo relajación del detrusor a través de receptores β_3 y β_2 y contracción del esfínter interno (integrado por la musculatura lisa del cuello vesical y de la uretra proximal) vía receptores adrenérgicos α_1 . Cuando el volumen vesical alcanza su umbral de llenado (alrededor de 150-200 ml) se hace consciente apareciendo la sensación de llenado vesical y se percibe el deseo miccional, sensación que irá en aumento hasta los 500 ml aproximadamente. Si no es el momento adecuado, por estimulación somática a través del nervio pudendo, se origina la contracción y cierre potente del esfínter estriado externo aumentando la resistencia uretral, de manera

que ésta es mayor que la presión vesical, para evitar escapes de orina. Como mencionamos anteriormente, la distensión de la pared vesical como consecuencia del llenado de orina constituye la señal mecánica responsable del inicio de la fase de evacuación (micción propiamente dicha). Dicho vaciado es producido por la activación motora del nervio pélvico y consecuente liberación de ACh, la cual, produce la contracción armónica y sostenida del detrusor por activación de los receptores muscarínicos M_3 y M_2 . Este hecho junto con la relajación involuntaria del esfínter interno y la relajación voluntaria del esfínter estriado externo uretral promueve un vaciado completo de la vejiga. De esta manera, el proceso miccional que realizamos como un acto fisiológico automatizado, es el resultado de un complejo mecanismo de coordinación entre la vejiga y la uretra (Figura 1.3).

Si el vaciado de la vejiga es incorrecto se produce la mal denominada "*retención urinaria*", con presencia o ausencia de residuo urinario, que puede ser consecuencia de:

- 1) Una contracción del detrusor insuficiente (característica en procesos como la polineuropatía diabética o en la lesión medular sacra).
- 2) Una resistencia uretral incrementada (como sucede en la hiperplasia benigna de próstata).
- 3) La coexistencia de ambas alteraciones.

REFLEJO DE LA MICCION

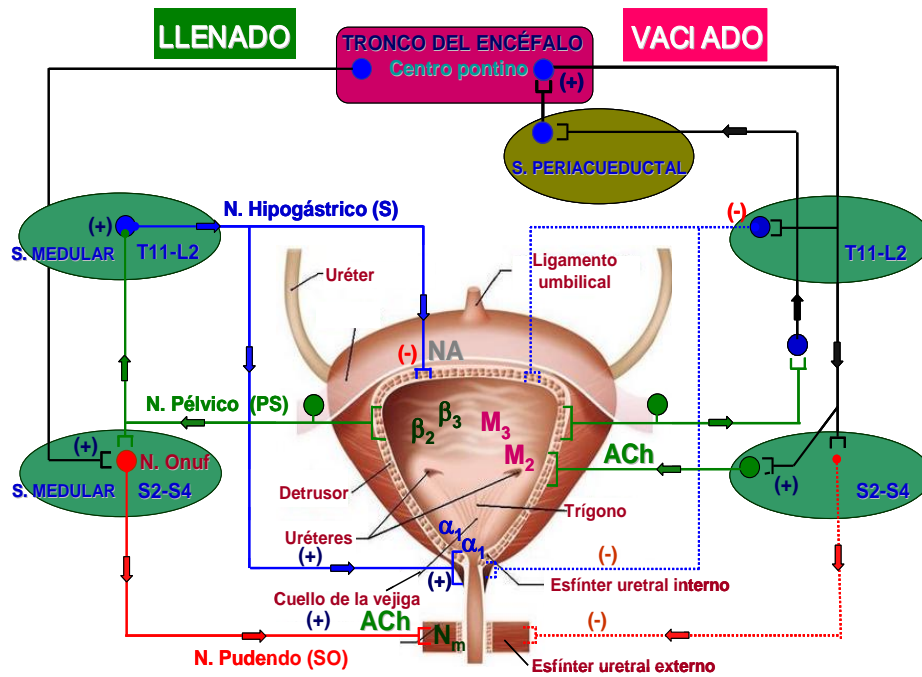


Figura 1.3 Neurofisiología de la fase de llenado y de vaciado de la vejiga urinaria. Durante la fase de llenado, la distensión de la vejiga da lugar a la activación del nervio pudendo, a través de las fibras nerviosas aferentes tipo III Aδ, con la consecuente liberación de acetilcolina (ACh), produciéndose la contracción del esfínter uretral externo. Esta aferentes también provocan que se libere noradrenalina (NA) desde el plexo hipogástrico, produciendo relajación del detrusor vía receptores β_3 y β_2 y contracción del esfínter uretral interno, vía receptores adrenérgicos α_1 . Una vez alcanzada la capacidad máxima fisiológica, se produce la activación motora del nervio pélvico y se libera ACh que produce contracción del detrusor a través de receptores muscarínicos M_3 y M_2 . Esta contracción, junto con la relajación involuntaria del esfínter interno y la voluntaria del esfínter externo da lugar a un vaciado completo de la vejiga.

En situaciones en las que acontece una elevación súbita de la presión intravesical, como ocurre en la tos o el estornudo, se genera el denominado "efecto guardián" o reflejo de almacenaje adicional (Figura 1.4). Así, el incremento repentino de la presión intravesical induce la activación de los nervios hipogástrico y pélvico provocando la liberación de serotonina (5-HT) y NA desde el núcleo de Onuf, produciendo así, la activación somática del nervio pudendo con la consecuente liberación de ACh que produce la contracción de la musculatura estriada del esfínter uretral externo originando un cierre uretral rápido y potente con objeto de impedir posibles escapes de orina (Park y col., 1997)



Figura 1.4 Reflejo de almacenaje adicional. La elevación súbita de la presión intravesical estimula la liberación desde el núcleo de Onuf de serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA), las cuales, originan la activación somática del nervio pudendo con liberación de acetilcolina (ACh) produciendo la contracción del esfínter uretral externo (rabdoesfínter), a través de la activación de receptores nicotínicos de la musculatura estriada, y consecuente retención urinaria.

1.3. UROTELIO Y SUBUROTELIO

El urotelio ha sido considerado históricamente como una simple barrera física frente a la mayoría de las sustancias presentes en la orina, protegiendo así a los tejidos subyacentes (Apodaca, 2004). Cuando esta función barrera del urotelio está comprometida por agresiones de diferente tipo o por procesos inflamatorios, se puede producir el paso de sustancias tóxicas a los tejidos subyacentes (tejido neural/muscular) provocando urgencia, frecuencia y dolor en la micción. En consecuencia, la comunicación entre las células del urotelio y el Sistema Nervioso tiene importantes repercusiones en la disfuncionalidad vesical.

La pérdida de la integridad de la barrera urotelial también está relacionada con la expresión de sustancias como el factor antiproliferativo, el cual, enlentece el crecimiento de las células uroteliales.

El urotelio está constituido al menos por tres capas: basal, intermedia y apical superficial. La capa superficial, también denominada "*células en paraguas*", tiene un papel prominente en el mantenimiento de la función barrera del urotelio. Estas células se encuentran intercomunicadas por estrechas uniones encargadas de reducir el movimiento de iones y solutos entre las células (Apodaca, 2004). En su superficie muestran unas proteínas cristalinas llamadas uroplaquinas que reducen la permeabilidad de pequeñas moléculas como urea, agua y protones, así como lípidos especializados (Apodaca, 2004).

El urotelio es un tejido metabólicamente muy activo que ejerce su función en las fase de llenado y vaciado vesical (Andersson y Arner, 2004). De hecho, el grado metabólico y la densidad de receptores presentes en el urotelio son superiores a los del detrusor (Hypolite y col., 1993). Diversos estudios han demostrado la existencia de nervios tanto aferentes como autonómicos adyacentes a la membrana basolateral que presentan proyecciones al urotelio (Birder y col., 2001, 2002; Dickson y col., 2006). De hecho, se ha demostrado que el urotelio es una estructura altamente especializada, capaz de detectar y responder tanto a estímulos fisiológicos como térmicos, mecánicos y químicos, así como liberar moléculas neuroactivas que pueden modificar la excitabilidad aferente, sugiriendo por tanto, un papel relevante en las vías sensoriales del Tracto Urinario Inferior (Birder y col., 2010). Es por ello, que el urotelio juega un papel trascendental en la sensación visceral, ya que dichas células funcionan como transductores primarios de estímulos físicos y químicos y son capaces de comunicar con células subyacentes como nervios, células musculares, miofibroblastos y células inflamatorias (Birder y col., 2010).

La funcionalidad del urotelio está, refrendada por la presencia de una amplia variedad de receptores y canales iónicos en la membrana plasmática de la célula urotelial. Así, se ha descrito la presencia de receptores para bradicininas (B_1 y B_2) (Chopra y col., 2005), neurotrofinas (trkA y p75) (Murray y col., 2004), ATP ($P2X_1$, $P2X_2$, $P2X_3$, $P2X_4$, $P2X_5$, $P2X_6$, $P2X_7$, $P2Y_1$, $P2Y_2$ y $P2Y_4$) (Burnstock, 2001), adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3) (Yu y col., 2006), NA (β_1 y β_2) (Birder y col., 1998), ACh (nicotínicos α_7 y muscarínicos M_1 , M_2 y M_3) (Beckel y col., 2006; Kullmann y col., 2008), receptores activados por proteasas (D'Andrea y col., 2003), canales de Na^+ (Du y col., 2007),

receptores vaniloides (TRPV₁, TRPV₂, TRPV₄, TRPM₈ y TRPA₁) (Stein et al., 2004), factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Saban y col., 2008), péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiario (PACAP) (PAC₁ y VPAC) (Girard y col., 2008), estrógenos (ER_α y ER_β) (Taylor y Al-Azzawi, 2000), endotelinas (ET_A y ET_B) (Mumtaz y col., 1999) y factor liberador de corticotropina (CRF₁ y CRF₂) (LaBerge y col., 2006). La expresión de estos receptores en las membranas celulares, dota a estas células de la capacidad para responder a distintos estímulos, tales como, la distensión de la pared vesical durante la fase de llenado, factores solubles encontrados en orina, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), o mediadores químicos, tales como la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), el factor liberador de corticotropina (CRF), la ACh, la NA, el ATP y la adenosina liberados desde nervios, células inflamatorias e incluso desde vasos sanguíneos (Apodaca, 2004, 2007; LeBerge y col., 2006; Birder y De Groat, 2007; Hanna-Mitchell y col., 2007).

Otro hecho que demuestra el papel sensorial del urotelio es la liberación por parte de las células uroteliales de transmisores/moduladores, como el ATP, el NO, la ACh, la NA, la SP y las prostaglandinas (PGs) por un mecanismo excitósico dependiente de calcio (Ca²⁺), similar a la liberación de transmisores desde las terminaciones nerviosas. La liberación de estos mediadores químicos desde las células uroteliales sugiere que estas células presentan propiedades sensoriales y de señalización especializadas que permiten la comunicación recíproca con células uroteliales vecinas, nervios y con otros tipos de células (inmunitarias, inflamatorias y miofibroblastos) (Apodaca y col., 2007; Birder y De Groat, 2007). Sin embargo, el mecanismo por el cual se liberan estos mediadores químicos es desconocido (Birder, 2010). Este tipo de comunicación sugiere que estas células pueden ser dianas de transmisores liberados desde nervios vesicales u otras células o que los transmisores liberados por las células uroteliales pueden también alterar la excitabilidad de los nervios vesicales. Así, el ATP (liberado desde células uroteliales durante la distensión vesical) actúa de manera autocrina, en células del propio urotelio, y de forma paracrina, en células intersticiales y nervios del Tracto Urinario Inferior (Fry y col., 2007; Sui y col., 2006). El ATP liberado tanto desde células de la capa apical como de la capa basal en respuesta al estiramiento, activa los receptores uroteliales P2X₂ y P2X₃ estimulando la exocitosis y promoviendo un incremento de la superficie de la células umbrales durante la fase de llenado (Truschel y col., 2002). Asimismo, la presencia de

uniones en hendidura entre las células intersticiales determina que las señales generadas en el urotelio se transmitan hasta el músculo detrusor (Ikeda y col., 2007).

Distintas patologías como la cistitis, el síndrome de dolor vesical o la lesión medular cursan con un incremento de la liberación de ATP provocando sensación dolorosa por la activación de receptores purinérgicos P2X y P2Y de las fibras sensoriales (Birder y col., 2003). Estas patologías se caracterizan por presentar urgencia, incremento de la frecuencia miccional y dolor durante el llenado de la vejiga (Parsons, 2007). Además este incremento en la liberación de ATP también puede, actuar de forma autocrina, incrementando su propia liberación desde células uroteliales en situaciones patológicas (Parsons, 2007). Recientemente, se ha demostrado en neuronas sensoriales que el ATP puede potenciar la respuesta de vaniloides al disminuir el umbral para protones, capsaicina y calor. Esto representa un nuevo mecanismo por el que grandes cantidades de ATP liberadas desde células dañadas o sensibilizadas en respuesta a una agresión o inflamación puede desencadenar la sensación de dolor. Estos hallazgos tienen relevancia clínica ya que sugieren que alteraciones en las células aferentes o epiteliales de los órganos pélvicos podrían contribuir a las alteraciones sensoriales de un gran número de desórdenes pélvicos, como la cistitis intersticial, enfermedad crónica que cursa con urgencia, frecuencia y dolor vesical durante el llenado.

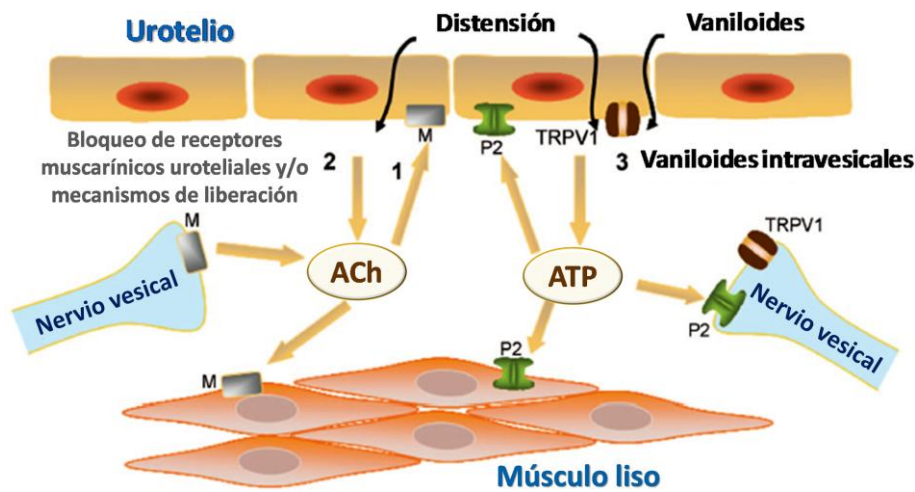


Figura 1.5 Representación esquemática de la posible implicación de “moléculas sensorias” uroteliales y/o mecanismos de liberación en la función vesical. Durante el llenado de la vejiga, el incremento de la presión induce la liberación de acetilcolina (ACh) desde el urotelio y desde neuronas que activa receptores muscarínicos del músculo liso. La ACh liberada puede estimular los receptores muscarínicos presentes tanto en el urotelio como en nervios vesicales. La estimulación de los receptores muscarínicos como diana de la ACh liberada desde el urotelio (1) o por otros mecanismos de liberación urotelial (2) puede ser relevante en situaciones crónicas y en el envejecimiento vesical. Las células uroteliales también expresan receptores TRPV₁ que se pueden activar durante la distensión vesical y por compuestos vaniloides. La activación de TRPV₁ urotelial puede conducir a la liberación de neurotransmisores como la adenosina 5´ trifosfato (ATP) que activa receptores purinérgicos (P2X₃) de aferentes próximas de la vejiga, las cuales también contienen TRPV₁ que se activan por los compuestos vaniloides. El ATP liberado por el urotelio puede activar otros receptores purinérgicos presentes en el músculo liso y en el urotelio. El tratamiento intravesical con vaniloides puede provocar la activación/desensibilización de TRPV₁ uroteliales o la depleción de mediadores derivados del urotelio (3) (Adaptación de Birder, 2005).

La unión del ATP a receptores de las fibras sensoriales, inicia una cascada de segundos mensajeros que modulan la actividad de diversos canales iónicos. Un ejemplo de dicha regulación viene representado por el hecho que el incremento en la liberación de ATP desde el urotelio en situaciones fisiopatológicas, tales como cistitis intersticiales provocan sensación dolorosa como consecuencia del incremento de las corrientes iónicas del receptor TRPV₁, canal específico de la neurona sensorial (Tominaga y col., 2001). Este canal iónico está presente en las células del urotelio, en las fibras sensoriales y en células intersticiales (Birder y col., 2001) y es activado por

capsaicina, calor, protones y por metabolitos lipídicos como la anandamida (Caterina y col., 1997). En las fibras aferentes, dichos canales integran y/o amplifican la respuesta a diferentes estímulos irritantes responsables de la inflamación y se encuentran sobreexpresados en el urotelio y en los nervios en la hiperactividad del detrusor (Andersson y col., 2010; Li y col., 2011). Dichos receptores, además de transmitir la sensación de dolor están involucrados en el llenado de la vejiga a través de la liberación de NO (Birder, 2006). El papel que juegan otros canales TRP en la fisiología y fisiopatología de la vejiga es prácticamente desconocida (Figura 1.5).

El urotelio es capaz de liberar ACh, NA y NO en respuesta a una estimulación química y mecánica. La ACh ejerce su acción a través de su conjugación con receptores muscarínicos y nicotínicos localizados en el músculo liso, en nervios y en células uroteliales. Estos receptores son estimulados por la ACh liberada desde urotelio y desde nervios colinérgicos localizados cerca de estas células uroteliales, dando lugar a un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} y provocando la liberación de NO, ATP y de un factor urotelial relajante del músculo liso (Hawthorn y col., 2000; Beckel y col., 2006; Hanna-Mitchell y col., 2007). En el urotelio se expresan, además, receptores adrenérgicos α y β , que dan lugar a la liberación de distintos mediadores como el ATP y el NO (Birder y col., 2002). Es posible que la liberación neuronal de la NA tenga efecto en el urotelio y por tanto, en la funcionalidad vesical por la inervación noradrenérgica existente en la microcirculación vesical y en el suburotelio (Dickson y col., 2006; Jen y col., 1995).

El NO está involucrado en diversas funciones del Tracto Urinario Inferior, tales como su participación en la neurotransmisión inhibitoria del cuello de la vejiga (Hernández y col., 2008) y uretra (Andersson, 2007), la modulación nerviosa aferente vesical y la modulación del reflejo miccional a niveles centrales (Andersson y Persson, 1995). Una disminución de los niveles de NO en las proximidades del urotelio, da lugar a la hiperactividad vesical, indicando así, un papel modulador del NO sobre la actividad contráctil del detrusor (Pandita y col., 2000).

El urotelio interacciona íntimamente con la capa suburotelial subyacente, en particular con la red celular intersticial contenida en su interior, así la estructura conjunta urotelio-suburotelio actúa como una unidad funcional (Andersson, 2002). Tres tipos de tejido urotelial han sido definidos (uréter/pelvis; detrusor/trígono; cuello/uretra proximal), pero la importancia en cuanto a la funcionalidad de cada uno de ellos está aún por determinar (Birder, 2010).

En resumen, se puede concluir que el urotelio desempeña un papel esencial como sensor (ya que presentan receptores y canales iónicos capaces de responder a estímulos mecánicos, químicos o térmicos) y transductor (capacidad para liberar mensajeros químicos). Así, las células uroteliales tienen la capacidad de captar cambios en su medio extracelular y de responder a estímulos mecánicos, químicos o térmicos trasladando dicha información a los sistemas muscular y nervioso adyacentes.

1.4. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN

1.4.1. Regulación de las proteínas contráctiles

La contracción del músculo liso se inicia por un incremento de la concentración Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), como consecuencia de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} dependientes (tipo L) e independientes de voltaje y por su liberación desde depósitos intracelulares representado por el retículo sarcoplásmico (RS). La activación de las proteínas contráctiles producida por Ca^{2+} se produce como consecuencia de su unión a la proteína calmodulina, pudiendo unir de forma cooperativa hasta cuatro moléculas de Ca^{2+} , para formar el complejo Ca^{2+} -calmodulina. Dicha interacción induce un cambio conformacional en la calmodulina que conlleva la exposición de sitios de interacción con proteínas diana, una de las cuales es la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). Esta unión provoca la activación de MLCK, la cual, fosforila la cadena ligera reguladora de miosina (MLC) en el residuo serina-19 (Ser-19). Esta fosforilación desencadena la formación de puentes cruzados actina-miosina provocando la contracción muscular (Arner y Pfitzer, 1999).

El cese de la contracción es debido, en parte, al descenso en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con el consecuente descenso de la actividad de la MLCK, y en parte, a que la MLC es desfosforilada por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP). La reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles basales es producida por:

- la recaptación de Ca^{2+} por el RS, producida como consecuencia de la actividad de la bomba SERCA localizada en la membrana del RS (introduce 2 Ca^{2+} al RS por molécula de ATP hidrolizada)
- la actuación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana celular que saca Ca^{2+} al exterior en contra de su gradiente de concentración.

De esta manera, la fosforilación reversible de la MLC tiene un papel importante en la contracción del músculo liso (Somlyo y Somlyo, 2003).

Cuando la contracción se produce sin una elevación proporcional de la $[Ca^{2+}]_i$ se denomina al proceso "*sensibilización al Ca^{2+}* " o "*incremento de la sensibilidad al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil*", en el que la regulación de MLCP tiene un papel fundamental (Somlyo y Somlyo, 2003). Por tanto, la MLCK y la MLCP son las dos vías principales reguladoras de la contracción y relajación muscular, respectivamente. Así, diferentes agonistas fisiológicos no sólo modificarían la $[Ca^{2+}]_i$ sino que también modificarían la sensibilidad de la maquinaria contráctil al Ca^{2+} . De hecho, la MLCK puede ser fosforilada, lo cual disminuye su afinidad por el complejo Ca^{2+} /calmodulina disminuyendo la sensibilidad al Ca^{2+} (Stull y col., 1990).

La MLCP también se inhibe por fosforilación. Una de las principales vías de inhibición involucra a una cinasa específica (Rho-cinasa asociada) (Somlyo y Somlyo, 2003). Esta Rho presenta tres isoformas: RhoA, RhoB y RhoC. Estas proteínas, como otras proteínas G pequeñas, son activadas por el paso de GDP a GTP. Este paso es controlado por otras proteínas como GDI, GAP y GEF. En el músculo liso relajado, Rho se encuentra en el citosol en forma de complejo Rho-GDP-GDI, y su activación, en presencia de GTP, está catalizada por Rho-GEF, lo cual produce la translocación de Rho a la membrana celular (Gong y col., 1997). Rho activa la Rho-cinasa asociada (RhoK). La activación de esta RhoK da lugar a una fosforilación de la miosina conjugada de la MLCP, inhibiéndola, sugiriendo así, el papel determinante que desempeña Rho en la sensibilización al Ca^{2+} en la contracción del músculo liso (Kimura y col., 1996). En la vejiga urinaria están presentes las dos isoformas de RhoK (RhoK I y RhoK II) y bloqueantes de estas dos isoformas inhiben la contracción de la ACh en la vejiga urinaria de conejo, indicando así, la mediación de la vía de la Rho cinasa en el acoplamiento excitación-contracción de receptores colinérgicos muscarínicos en la vejiga urinaria (Jezior y col., 2001). La vía de la Rho cinasa puede ser alterada en desórdenes urológicos, tales como, la obstrucción del flujo de salida, en la que la RhoK I está sobreexpresada, lo cual, favorece una relajación lenta y un tono muscular alterado (Aydin y col., 2010).

El GMPc, la proteína cinasa dependiente del GMPc (PKG), el AMPc y la proteína cinasa dependiente del AMPc (PKA) pueden inhibir la contracción inducida por Ca^{2+} y la sensibilización al Ca^{2+} produciendo relajación muscular

(Pfitzer y col., 1984). Además, la PKA y la PKG fosforilan Rho inhibiendo su acción sensibilizante al Ca^{2+} (Sauzeau y col., 2000).

El caldesmón es una proteína conjugada a calmodulina y actina que se ha encontrado en la maquinaria contráctil del músculo liso (Furst y col., 1986). El caldesmón podría ser de importancia para la regulación cooperativa de la formación de puentes cruzados entre la actina y miosina, pero su papel en la contracción de la vejiga urinaria está aún por determinar.

La calponina es una proteína asociada a los filamentos de actina y está localizada en el citoesqueleto y en los dominios contráctiles de las células musculares lisas (North y col., 1994). La eliminación del gen de calponina h1 está asociada con un desarrollo más rápido de la tensión de la musculatura lisa de la vejiga urinaria (Fujishige y col., 2002).

1.5. EXCITACIÓN DE LA MEMBRANA

1.5.1. *Potencial de la membrana en reposo y potencial de acción*

El estudio electrofisiológico del detrusor ha revelado una gran variabilidad en los valores de potencial de membrana en reposo según la especie estudiada (conejo: -37mV , rata: -47mV , hombre: de -47 a -55mV) (Brading, 1992). Dichos estudios han puesto de manifiesto la existencia de actividad eléctrica espontánea que usualmente se caracteriza por espigas aisladas que se producen asociadas con pequeñas ondas de despolarización (Andersson y Arner, 2004). Generalmente los potenciales se muestran como espigas aisladas a intervalos regulares y ocasionalmente ráfagas de espigas. La frecuencia de los potenciales de acción espontáneos es dependiente del voltaje, de manera que la despolarización incrementa la frecuencia de disparo y la hiperpolarización la disminuye. Los potenciales de acción espontáneos están asociados a un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Hashitani y col., 2001). Sin embargo, la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares puede amplificar el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ asociado con los potenciales de acción. Dichas elevaciones se producen en los haces musculares propagándose a otras fibras musculares a través de comunicaciones intercelulares conocidas como "uniones gap" o "uniones en hendidura", que son orificios de la pared

celular a través de los cuales se produce la propagación de los potenciales de acción sin prácticamente encontrar resistencia alguna a su paso (Hashitani y col., 2001).

En el detrusor humano, la fase ascendente o de activación del potencial de acción (despolarización), es generada por una corriente de entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOC) tipo L (Andersson y col., 2010). La fase descendente o de inactivación del potencial de acción (repolarización) involucra la inactivación de la corriente de Ca^{2+} y la activación de una corriente de salida de K^{+} que es dependiente, parcialmente, de la concentración de Ca^{2+} citosólico (Imaizumi y col., 1998).

1.5.2. *Papel del Ca^{2+} en la contracción*

El proceso imprescindible para que se produzca la activación de la contracción del músculo detrusor es el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, aunque si dicho incremento es debido a su entrada desde el exterior y/o a su liberación desde depósitos intracelulares (RS) es aún objeto de estudio (Kajioka y col., 2002). El influjo de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC tipo L, es el acontecimiento principal que da lugar a los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólica mediados por la despolarización. La entrada de Ca^{2+} , en los estadios iniciales del potencial de acción, provoca la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} desde el RS, por debajo de la membrana celular generando las denominadas “zonas calientes” próximas a la membrana celular, que favorecen el inicio de la contracción (Imaizumi y col., 1998). Esta liberación de Ca^{2+} desde RS es un paso esencial en la activación del detrusor. De hecho, tanto para la contracción producida por estimulación nerviosa como para la inducida por agonistas es necesario un RS funcionalmente activo (Damaser y col., 1997).

En el detrusor de cerdo y de hombre, la estimulación de los receptores muscarínicos con carbacol, bloquea los canales VOC tipo L, sin embargo, no se conoce el mecanismo responsable involucrado en dicha inhibición (Kajioka y col., 2002). La contracción tónica de carbacol en el detrusor de cerdo es dependiente principalmente de la despolarización de la membrana celular y del influjo de Ca^{2+} extracelular, siendo la despolarización producida por la inactivación de canales de K^{+} dependientes de ATP (K_{ATP}) a través de los receptores muscarínicos ligados a la proteína cinasa C (PKC) (Uchida y col., 1994). La contracción del detrusor producida

por soluciones enriquecidas en K^+ o por la adición de agonistas se desvanece rápidamente como consecuencia del incremento transitorio en la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} , hecho que provoca la inactivación del canal de Ca^{2+} de membrana. Dicha inactivación, por tanto, es responsable de la naturaleza fásica de la contracción del detrusor y de su incapacidad para mantener un tono sostenido (Brading, 1992). Diversos estudios han demostrado que la contracción producida por ACh y ATP en este músculo, es producida por la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} sensibles a las dihidropiridinas y por la movilización de Ca^{2+} intracelular (Andersson, 1993). Existen fibras parasimpáticas en las proximidades de la base de la vejiga y en toda la pared vesical. La contracción del detrusor está controlada por una densa red de fibras parasimpáticas siendo la ACh y el ATP los neurotransmisores que inician dicha contracción (Fry y col., 2010). Mientras que la ACh es el principal neurotransmisor en vejigas sanas, la existencia de ectoATPasas extracelulares hace que el ATP se degrade en la unión neuromuscular siendo más importante en situaciones patológicas, como vejigas hiperactivas, ya que o bien estas hidrolasas son menos efectivas o se libera más ATP (Harvey y col., 2002). La unión de la ACh a receptores muscarínicos incrementa la sensibilidad de la maquinaria contráctil al Ca^{2+} (Kishii y col., 1992) y aunque la contribución específica de esos mecanismos en la contracción del detrusor no ha sido establecida, parece ser que la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC tipo L desempeña el papel prioritario en la contracción mientras que el papel del Ca^{2+} intracelular es variable (Kishii y col., 1992). El influjo de Ca^{2+} es regulado por un mecanismo de retroalimentación, en el cual, la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ reduce la actividad de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}) produciendo así, la despolarización de la membrana celular y el incremento en la conductancia de los canales VOC tipo L (Wu y col., 2002).

1.5.3. *Canales de Ca^{2+}*

Las células musculares lisas poseen, aparte de canales VOC, otros canales permeables al Ca^{2+} que no son dependientes de cambios en el voltaje, como son los canales activados por agonistas que se unen a receptores acoplados a proteínas G (canales ROC) y los canales de Ca^{2+} operados por depósito (SOC), activados tras el

vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} del RS (McFadzean y Gibson, 2002).

1.5.3.1. *Canales de Ca^{2+} activados por voltaje*

Atendiendo al grado de despolarización necesaria para su apertura se dividen en dos grupos, los denominados de alto umbral de activación por activarse por grandes despolarizaciones (> -30 mV), y los de bajo umbral de activación por requerir sólo ligeras despolarizaciones sobre el potencial de membrana en reposo de la célula (> -60 mV) para abrirse. Los canales de alto umbral de excitación comprenden varios tipos conocidos como L, N, P/Q y R, que se diferencian tanto por sus características biofísicas (tiempo medio de apertura, cinética y mecanismo de inactivación) como por su sensibilidad a fármacos. Los canales conocidos como de tipo no-L tienen en común la insensibilidad a las dihidropiridinas, e incluyen a los N, los P/Q y los R. Bajo la denominación de canales de bajo umbral de activación se encuentran exclusivamente los canales T.

La implicación de otros tipos de canales VOC, además de los tipo L, en la activación del detrusor está por determinar. Se ha sugerido que la entrada de Ca^{2+} se produce a través de los canales de tipo L y de tipo T, si bien la actividad de los canales tipo T sería más relevante a potenciales de membrana próximos al de reposo.

Los canales tipo L son activados a potenciales de membrana positivos alrededor de -40 mV y generan corrientes de entrada de Ca^{2+} que son amplias y de larga duración (Smirnov y Aaronson, 1992). Los canales de tipo L intervienen en los procesos en los que la entrada de Ca^{2+} estimula la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y en la entrada de Ca^{2+} extracelular al citoplasma. En el detrusor humano, la activación inducida por carbacol involucra canales de Ca^{2+} sensibles a las dihidropiridinas (Maggi y col., 1989). Por tanto, el influjo de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo L parece ser el mecanismo determinante en la contracción del músculo detrusor (Chow y col., 2003).

1.5.3.2. *Canales de Ca^{2+} activados por agonistas*

La denominación de ROC hace referencia a los canales de membrana independientes de voltaje que son activados por la unión al receptor de un agonista

(Bolton, 1979). Son canales de cationes (mono y divalentes) no selectivos, permeables al Ca^{2+} . En el músculo liso se han descrito diferentes agonistas que originan la apertura de dichos canales, induciendo contracciones que se caracterizan por presentar una moderada o nula despolarización (Bolton, 1979). Dentro de los ROC se encuentran los canales operados por ligando en los que el sitio de unión del ligando y el poro iónico se encuentran en la misma proteína. En el caso en que el canal iónico y el receptor estén separados, existen diferentes rutas intracelulares que comprenden tanto la activación del receptor como la apertura de un canal de cationes no selectivo de acuerdo al tipo de receptor, tejido y especie animal. El flujo de iones a través de estos canales iónicos se produce atendiendo al gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática y son operativos a valores de potencial de membrana en reposo (-60 mV) inhibiéndose por la despolarización de la misma. Se ha propuesto que la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales podría afectar a las corrientes de Cl^- y/o la activación de canales de K^+ alterando el potencial de membrana y provocando la posterior activación de los canales VOC, aceptando así que el flujo de iones a través de los canales ROC participa en los cambios del potencial de membrana (Large, 2002).

1.5.3.3. *Canales de Ca^{2+} operados por depósito*

La entrada de Ca^{2+} operada por depósito (SOC) fue propuesta por Putney (1986) quien usó el término de "*entrada de Ca^{2+} capacitativa*" para describir el fenómeno de acoplamiento entre la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el RS y la activación de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana en células no excitables. Así, el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} activa la entrada de Ca^{2+} a través de canales localizados en la membrana plasmática para rellenar los depósitos. Aunque la existencia de estos canales ha sido puesta de manifiesto en distintos tejidos, su mecanismo de actuación es aún objeto de estudio. En el urotelio de la vejiga del hombre, canales SOC están involucrados en la diferenciación y proliferación celular epitelial inducida por agonistas de los receptores de peroxisomas (Chopra y col., 2005)

1.5.4. Mecanismos de liberación de Ca^{2+} intracelular

En las células musculares lisas en reposo la concentración de Ca^{2+} en el RS es 1 mM, concentración 10.000 veces superior a la que existe en el citoplasma de la célula muscular (0.1 μ M). Para que se pueda producir la contracción muscular, es necesario que dicha concentración se eleve a concentraciones superiores a 10-100 μ M, siendo dicho incremento el resultado del influjo de Ca^{2+} extracelular y de la liberación de Ca^{2+} del RS. El inositol tri-fosfato (IP_3) a través de los receptores IP_3 localizados en la membrana del RS produce la liberación de Ca^{2+} almacenado en su interior. Asimismo, se produce liberación de Ca^{2+} por la presencia de Ca^{2+} citosólico ("*liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}* ") vía activación de los receptores de rianodina presentes en la membrana del RS (Brading, 1992). El RS puede participar, asimismo, en la contracción vesical a través de la modulación de la actividad de los canales de K^+ de la membrana celular responsables de la hiperpolarización de la musculatura lisa (Brading, 1992).

1.5.4.1. Inositol trifosfato (IP_3)

En respuesta a una amplia variedad de estímulos (neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento) las diferentes isoformas de la enzima fosfolipasa C (PLC) catalizan la hidrólisis de un precursor localizado en la membrana plasmática, el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) para dar lugar a inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Esta vía de señalización puede ser activada a través de receptores acoplados a proteínas G, receptores acoplados a la activación de tirosina cinasa o incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$.

Los receptores para IP_3 (IP_{3r}) están localizados en la membrana del RS y están constituidos por cuatro subunidades. Cada subunidad tiene un peso molecular aproximado de 260 kDa y 6 segmentos transmembrana, con los típicos dominios localizados en el extremo terminal C, que anclan la proteína a la membrana y albergan el poro y un dominio terminal N que queda libre en el citoplasma y que posee en su parte final la zona de unión para el IP_3 (Berridge 1993). Existen tres subtipos de IP_{3r} (IP_{3r1} , IP_{3r2} , IP_{3r3}), involucrados en la señalización de Ca^{2+} mediada a través de IP_3 , los cuales, difieren en su afinidad por el IP_3 , en su regulación y en su modulación por proteínas asociadas (Miyakawa y col., 2001). El IP_{3r2} es el más sensible a IP_3 y media las

oscilaciones regulares de Ca^{2+} de larga duración. EL $\text{IP}_{3\text{r}1}$ es muy sensible al ATP y está involucrado en las oscilaciones transitorias de Ca^{2+} , mientras que el $\text{IP}_{3\text{r}3}$ es el menos sensible a IP_3 y a Ca^{2+} , y tiende a generar corrientes de Ca^{2+} monofásicas (Miyakawa y col., 2001). Para la apertura del canal se requiere tanto Ca^{2+} como IP_3 , siendo numerosos los sitios de unión del Ca^{2+} en los $\text{IP}_{3\text{r}}$ (Miyakawa y col., 2001). El Ca^{2+} regula la actividad del canal de manera dual dependiendo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólica. Así, a baja $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el ión ejerce un papel activador, mientras que a altas concentraciones desempeña una acción inhibitoria, demostrando así un mecanismo de retroalimentación negativo durante la liberación de Ca^{2+} (Mak y col., 2001). También el propio contenido de Ca^{2+} del RS regula la apertura del canal. Así, en hepatocitos permeabilizados se ha demostrado que un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el RS aumenta la sensibilidad de los receptores de IP_3 por su ligando, promoviendo así una liberación espontánea de Ca^{2+} (Nunn y Taylor, 1992). La liberación de Ca^{2+} del RS es detenida cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ en su interior está por debajo del 80% de sus niveles normales (1 mM) con la célula muscular en reposo (Shmygol y Wray, 2005).

1.5.4.2. Receptor de rianodina

Otra vía de liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares es a través de la unión del alcaloide rianodina a sus receptores (Ryr) localizados en el RS, siendo, por tanto, dicho mecanismo un proceso de "liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} ". El Ryr presenta una forma de tetrámero, con el extremo terminal C formando el poro y un extremo largo terminal N que se proyecta hacia el citosol (Coussin y col., 2000). Tres subtipos de Ryr (Ryr_1 , Ryr_2 y Ryr_3) han sido descritos en el músculo liso (Coussin y col., 2000). Bajas concentraciones de Ca^{2+} (en el rango nanomolar) son el principal activador de los Ryr en el músculo liso durante el proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} mientras que altas concentraciones (en el rango micromolar) provocan su inactivación (Zahradnik y col., 2005).

De manera general se acepta que la estimulación de receptores acoplados a proteínas G por parte de diferentes agonistas, la formación de IP_3 y la activación de los receptores de IP_3 causan la liberación de Ca^{2+} del RS (Berridge, 1993). Esta señal de Ca^{2+} se amplifica por la activación de los Ryr debido a la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Estos receptores están también involucrados en la liberación de Ca^{2+} desde el RS producida por el estiramiento del detrusor (Ji y col., 2002).

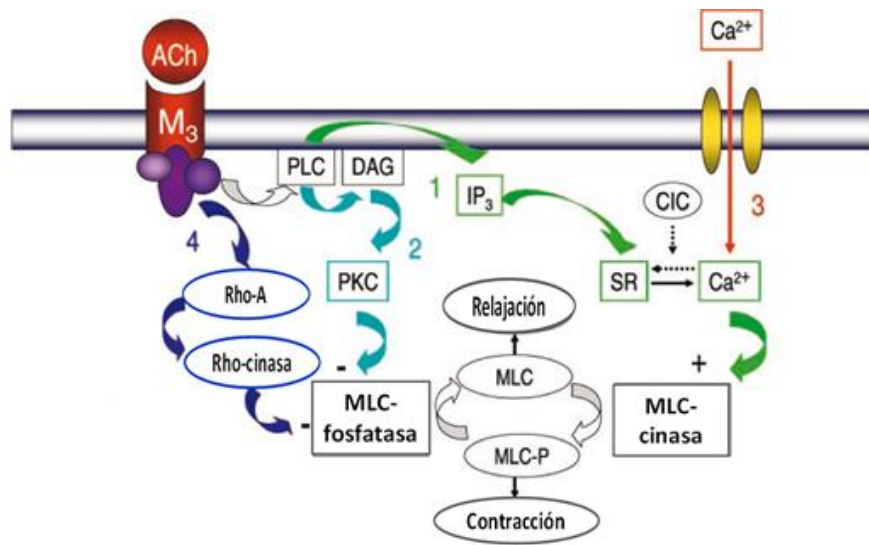


Figura 1.6 Vías de señalización implicadas en la contracción del detrusor a través de receptores muscarínicos M_3 . ACh: Acetilcolina; PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglicerol, PKC, proteína cinasa C; MLC, cadena ligera de miosina; SR, retículo sarcoplásmico; CIC liberación de calcio inducida por calcio. Existen diferencias entre las especies en la contribución de las distintas vías en la contracción. En el detrusor humano, el influjo de Ca^{2+} es la de mayor relevancia. (Adaptación de Andersson y Arner, 2004).

1.5.5. Canales de K^+

Las técnicas electrofisiológicas de *patch-clamp* junto al empleo de toxinas que pueden interaccionar selectivamente con los diferentes tipos de canales de K^+ , han permitido un conocimiento más profundo de los mismos, permitiéndonos una mejor comprensión acerca de su relevancia fisiofarmacológica y terapéutica en la disfuncionalidad motora del Tracto Urinario Inferior. Entre todos los canales de K^+ descritos, por su implicación en la funcionalidad del músculo detrusor tienen relevancia los canales K_{ATP} y los canales K_{Ca} , mientras que la información sobre la contribución de los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v) es escasa (Andersson y col., 2004).

1.5.5.1. Canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP})

La expresión de canales K_{ATP} en el músculo liso vesical sugiere que están involucrados en la regulación de la contractilidad vesical (Brading, 1992). Estos canales deben su nombre a la regulación inhibitoria conferida por el ATP intracelular, por lo que un descenso en la concentración de este nucleótido favorece la activación del canal. Estudios funcionales han evidenciado que activadores de los canales K_{ATP} como la cromakalima, el pinacidil y el nicorandil producen hiperpolarización de la membrana de la célula muscular por la apertura de dichos canales y consiguiente salida de K^+ , reduciendo, y en algunos casos, llegando a abolir los potenciales de acción relacionados con la generación de las contracciones fásicas (Petkov y col., 2001). Estos canales, además de participar en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo modulan el potencial de acción desempeñando así, un papel fundamental en la regulación de la contractilidad de la musculatura lisa (Andersson y Wein, 2004). En el detrusor humano, estos agentes no sólo reducen las contracciones espontáneas sino que también disminuyen las respuestas producidas por estimulación eléctrica transmural, carbacol y altas concentraciones de K^+ extracelular (Andersson y Wein, 2004). Los activadores de los canales K_{ATP} a pesar de ser particularmente efectivos *in vitro* en músculo hipertrófico, han mostrado mayor potencia como inhibidores de las contracciones espontáneas de la vena porta de rata que sobre las contracciones del detrusor; esta falta de selectividad ha limitado su utilidad en la hiperactividad del detrusor (Andersson, 2002).

1.5.5.2. Canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca})

Los canales de K^+ activados por el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular están estructuralmente relacionados con los canales K_v . Estos canales poseen una distribución ubicua en el organismo, produciendo la hiperpolarización celular que sigue al potencial de acción y posibilitando la adaptación de la frecuencia de disparo de potenciales de acción así como la generación de algunos ritmos eléctricos endógenos. En células no excitables, estos canales contribuyen a mantener el potencial de membrana y participan la regulación del transporte de electrolitos en algunos epitelios.

Estos canales se activan por incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$. Existen 3 tipos fundamentales de K_{Ca} que difieren en sus conductancias iónicas y en su sensibilidad a la activación por Ca^{2+} o al voltaje (Berkefeld y col., 2010):

- Canales K_{Ca} de alta conductancia (BK_{Ca}). Se activan con $[Ca^{2+}]_i$ variables (10 nM-10 μ M). Estos canales manifiestan dependencia de voltaje de forma que su probabilidad de apertura aumenta con la despolarización.
- Canales K_{Ca} de baja conductancia (SK_{Ca}). Estos canales se caracterizan por su alta sensibilidad al Ca^{2+} (activación a concentraciones entre 200-500 nM), mínima sensibilidad a los cambios de voltaje y poseer baja conductancia iónica.
- Canales K_{Ca} de intermedia conductancia (IK_{Ca}). Se activan por $[Ca^{2+}]_i$ en un rango entre 10 nM-1 μ M y ocasionalmente, son sensibles a modificaciones en el potencial de membrana.

Los canales BK_{Ca} desempeñan un importante papel en la fase de repolarización del potencial de acción en muchos tipos de células. Podrían, por ello, contribuir a modular la duración del potencial de acción y el influjo de Ca^{2+} extracelular (Berkefeld y col., 2010). Los canales SK_{Ca} están involucrados en el aumento de la permeabilidad al K^+ inducido por neurotransmisores y hormonas en muchos tipos celulares (músculo liso visceral, células glomerulares de la corteza adrenal y hepatocitos). Están, asimismo, involucrados en la fase de posthiperpolarización lenta consecutiva a los potenciales de acción en muchas células excitables, en estas células tras la espiga se origina la repolarización de la membrana, integrada por una fase de posthiperpolarización rápida que dura entre 50-100 ms y una posterior más lenta entre 500-1000 ms en la que participan los canales SK_{Ca} . La consecuencia inmediata de la activación de los canales SK_{Ca} es una disminución de la frecuencia de disparo de potenciales de acción (acomodación) (Hille, 1992). Esta fase de lenta posthiperpolarización depende del Ca^{2+} extracelular, anulándose si este no está presente, o si se bloquea su entrada (Hille, 1992). La entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC activa canales BK_{Ca} y SK_{Ca} , pero la liberación de Ca^{2+} a través de receptores de rianodina de la membrana del RS únicamente activa a los canales BK_{Ca} (Berkefeld y col., 2010).

En el músculo detrusor, los canales BK_{Ca} y SK_{Ca} están involucrados en la regulación del potencial de membrana y en la modulación de las contracciones

espontáneas (Heppner y col., 1997, Herrera y col., 2000; Karicheti y Christ, 2001). Los canales BK_{Ca} están integrados por una subunidad α , que forma el poro del canal y una subunidad accesoria β_1 específica del músculo liso. El estudio con ratones KO para esta subunidad ha contribuido a determinar el papel funcional de la subunidad β_1 , evidenciándose que la falta de dicha subunidad reduce la actividad del canal y desplaza su sensibilidad al voltaje y al Ca^{2+} produciendo un incremento de la amplitud en las contracciones fásicas y una disminución de la frecuencia (Petkov y col., 2001). Asimismo, los canales SK_{Ca} regulan la excitabilidad de la musculatura lisa de la vejiga urinaria ya que el bloqueo de dichos canales, incrementa la amplitud de las contracciones fásicas del detrusor (Heppner y col., 1997; Herrera y Nelson, 2002). En el detrusor humano, la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC activa canales BK_{Ca} y SK_{Ca} , sin embargo la liberación de Ca^{2+} desde el RS activa únicamente canales BK_{Ca} . El hecho que alteraciones en la expresión de los canales BK_{Ca} y SK_{Ca} puedan causar disfuncionalidades motoras urinarias, tales como vejiga hiperactiva e incontinencia urinaria, sugiere el posible papel de dichos canales como dianas terapéuticas en dichas patologías (Herrera y col., 2005).

1.5.5.3. Canales de K^+ activados por voltaje (K_v)

Constituyen el grupo más numeroso de canales dependientes de voltaje. Se han descrito doce tipos de canales K_v (K_{v1} - K_{v12}) con sus diferentes isoformas, que se agrupan en cuatro familias en función de la homología existente entre sus secuencias de aminoácidos: K_{v1} - K_{v6} , K_{v8} - K_{v9} , K_{v7} y K_{v10} - K_{v12} . Las propiedades del canal dependerán de la combinación de subunidades que lo formen, pudiendo estar constituidos por cuatro subunidades idénticas (homotetrámeros) o distintas (heterotetrámeros), pero siempre pertenecientes a la misma familia.

Los canales K_v incluyen a los denominados canales de K^+ rectificadores tardíos, cuya función fisiológica es la de repolarizar la célula y devolverla al potencial de reposo tras la fase despolarizante del potencial de acción. Entre los canales K_v también se encuentran los canales K_A , responsables de la generación de corrientes salida de K^+ inactivantes. Estos canales se activan transitoriamente al hiperpolarizar la membrana celular permitiendo a la célula codificar la frecuencia de disparo de potenciales de acción en función del nivel de despolarización de la membrana.

Estos canales generan corrientes de K^+ independientes de Ca^{2+} y se activan por despolarización en un rango de voltaje cercano al potencial de reposo del músculo detrusor. Thorneloe y Nelson (2003) caracterizaron las propiedades biofísicas, farmacológicas y moleculares de los canales K_v sugiriendo su posible acción como dianas potenciales para la modulación de la actividad del detrusor. Específicamente, en el detrusor humano se expresan las subunidades funcionalmente activas $K_{v1.3}$ y $K_{v1.6}$ de los canales $K_{v\alpha 1}$ (Davies y col., 2002). Así, el bloqueo de las corrientes $K_{v\alpha 1}$ incrementan la amplitud de las contracciones fásicas espontáneas del músculo detrusor sin afectar a la frecuencia de las mismas ni la tensión basal en reposo. Sin embargo, el papel de dichos canales en el detrusor in vivo está aún por determinar.

1.5.6. *Canales activados por estiramiento*

En las células del músculo detrusor, el estiramiento mecánico de la pared de la vejiga durante la fase de llenado produce la activación de canales iónicos no específicos (Wellner y col., 1993). Estos canales muestran similar permeabilidad al Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y su activación es producida previa hiperpolarización de la membrana de la célula muscular. Estos canales actúan como sensores detectando cambios en la longitud de la pared vesical. Si una célula en reposo es estirada un 20% de su longitud original, el influjo de Ca^{2+} a través del canal es suficiente para alcanzar una $[Ca^{2+}]_i$ significativa, capaz de despolarizar la célula y provocar el influjo de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} tipo L (Fry y col., 1998).

En el detrusor de ratón y conejo, el incremento en la longitud de la célula resulta de la sincronización de la activación de receptores de rianodina, la liberación de Ca^{2+} desde el RS y la penetración de Ca^{2+} extracelular. Esta liberación no se ve afectada por los receptores de IP_3 que median la liberación de Ca^{2+} , pero fue completamente bloqueada por rianodina. Por otro lado, esta liberación, activa corrientes de Cl^- dependientes de Ca^{2+} , sugiriendo así el papel de estos canales como reguladores del mecanismo de contracción espontánea (Ji y col., 2002). Dichos mecanismos ejercen, así, un papel esencial en la regulación miogénica de la contractilidad del detrusor durante la fase de llenado de la vejiga pudiendo la inhibición de dichos canales mejorar la acomodación vesical (Tertyshnikova y col., 2003).

La superfamilia de canales iónicos TRP está involucrada en la transducción mecanosensorial en distintos órganos, y diversos estudios indican que varios de estos canales, entre los que se encuentran los canales TRPV₁, TRPV₂, TRPV₄, TRPM₈ y TRPA₁ están expresados en vejiga y son sensores tanto para los estímulos químicos como para los cambios en la longitud de la pared vesical (Andersson y col., 2010). TRPV₄ es un canal catiónico activado por estiramiento permeable al Ca²⁺ involucrado en la liberación inducida por estiramiento del ATP. La activación de diferentes canales de esta superfamilia está en estrecha relación con la aparición de vejiga hiperactiva y síntomas del Tracto Urinario Inferior. Sin embargo, el papel fisiológico y fisiopatológico de los mismos está por determinar (Andersson, 2010).

1.5.7. *Canales activados por ligando*

En el detrusor se ha demostrado la existencia de canales iónicos activados por ligando teniendo especial importancia la ACh y el ATP. Así, receptores purinérgicos P2X están involucrados en la contracción inducida por ATP. La activación de estos canales genera una corriente de entrada principalmente de Na⁺ y Ca²⁺ conduciendo a una despolarización suficiente para activar canales de Ca²⁺ tipo L que generará potenciales de acción (Inoue y Brading, 1991).

1.5.8. *Actividad miogénica*

La actividad miogénica se define como la capacidad que tiene la célula muscular lisa de generar contracciones independientes de estimulación externa. Dicha actividad es una de las características principales de la musculatura de la pared de la vejiga urinaria. De hecho, las células del detrusor y trigono del hombre están acopladas eléctricamente a través de *uniones gap*, indicando así, que dicha intercomunicación celular desempeña un papel esencial en la iniciación, mantenimiento y modulación del tono de la vejiga urinaria (John y col., 2001). La presencia de *uniones gap* junto con el SNA y los mecanismos de transducción intracelular miogénica constituyen la denominada "*triada de tejido sincitial*", responsable, en gran manera, de la modulación local del tono de la musculatura lisa (Karicheti y Christ, 2001). De hecho, se ha sugerido que el músculo detrusor está

ordenado en módulos que limitan zonas musculares durante el ciclo miccional, los cuales, estarían controlados por plexos miovesicales periféricos compuestos por ganglios intramurales, células intersticiales y conexiones intracelulares (Drake y col., 2001, 2003).

El músculo detrusor exhibe actividad rítmica espontánea *in vivo* e *in vitro* de naturaleza miogénica. La frecuencia de estas contracciones espontáneas es dependiente de la especie, (más frecuente en el conejo que en el cerdo y en el hombre) y de condiciones experimentales (tiempo de estabilización de la muestra, la temperatura, el pH, etc.) (Brading, 1992; Herrera y col., 2000; Drake y col., 2003). Dicha actividad está relacionada con la generación de potenciales de acción espontáneos o la alteración en la capacidad de las organelas celulares para regular el Ca^{2+} intracelular (Montgomery y Fry, 1992). Estas contracciones son resistentes al bloqueo con tetrodotoxina (TTX) y no son bloqueadas por hexametonio, atropina, bloqueantes α - o β -adrenérgicos o suramina lo que demuestra su origen miogénico (Andersson, 1993; Imai y col., 2001a,b, 2002), pero sin embargo, son sensibles a los bloqueantes de los canales VOC tipo L y a los activadores de los canales de K^+ (Andersson y Arner, 2004).

En el músculo detrusor es característica la presencia de contracciones fásicas espontáneas miogénicas, las cuales, están moduladas por la presencia del urotelio. Así, preparaciones desprovistas de urotelio muestran actividad espontánea incrementada con respecto a las preparaciones intactas (Buckner y col., 2002). La amplitud de las contracciones espontáneas es dependiente de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC tipo L y a la liberación de Ca^{2+} desde el RS. En dichas contracciones está, asimismo, involucrada la vía de la Rho-cinasa y canales de K^+ de membrana (Wibberley y col., 2003). De hecho, la inhibición de canales BK_{Ca} y SK_{Ca} incrementa la amplitud y la frecuencia de las contracciones espontáneas, demostrando que dichos mecanismos son críticos en la regulación de la actividad fásica espontánea. La inhibición de los canales K_{ATP} , no altera las contracciones miogénicas, sin embargo, activadores de dichos canales suprimen la actividad miogénica espontánea. Asimismo, canales K_v pueden contribuir a la regulación de la contracción rítmica miogénica. Estos estudios sugieren que la modulación de canales de K^+ puede ser de utilidad terapéutica en el control la actividad miogénica espontánea, especialmente aquella asociada con la hiperexcitabilidad característica de la vejiga hiperactiva (Andersson y Arner, 2004).

La obstrucción de flujo vesical está asociada con la hiperactividad detrusoriana. Dicha obstrucción se caracteriza por cambios morfológicos vesicales incluyendo una denervación progresiva e hipertrofia de la pared vesical (Gosling y col., 2000). Un incremento en la tensión de la vejiga, como sucede en la obstrucción, se ha asociado con alteraciones celulares y moleculares (función mitocondrial, enzimas musculares, etc.). Turner y Brading (1997) sugirieron que la hiperactividad del detrusor podría ser consecuencia de una denervación irregular del detrusor que puede alterar la transmisión de la excitación célula a célula. De hecho, en los cuadros obstructivos se producen cambios en las propiedades eléctricas de la membrana consistentes en la reducción en los valores del potencial de membrana y en la actividad eléctrica producida espontáneamente. Además, la actividad miogénica puede estar incrementada en situaciones en las cuales la actividad aferente se encuentre exacerbada, contribuyendo así a la hiperactividad del detrusor (Kinder y Mundy, 1987). Cambios en la morfología del detrusor, característicos en la obstrucción del flujo de salida y en la hipertrofia de la pared vesical, pueden alterar la comunicación intercelular durante la neurotransmisión como consecuencia de la alteración en la propagación de la señal eléctrica y en la activación de la bomba Na⁺-K⁺ presente en la membrana celular (Andersson y Arner, 2004).

1.5.9. *Células intersticiales*

En la vejiga urinaria de cobaya y de hombre se ha descrito la existencia de células fusiformes inmunoreactivas a GMP_c. Estas células se localizan en grandes cantidades en los haces musculares, en el interior del intersticio de la pared vesical, estando especialmente concentradas en la vaina fibromuscular externa, donde constituyen una densa red interconectada (Smet y col., 1996). Asimismo, células reactivas a la proteína *c-kit*, similares a las células intersticiales de Cajal del intestino, están localizadas en paralelo con las células musculares lisas, pudiendo actuar como marcapasos y/o como intermediarios en la transmisión de señales nerviosas a las células musculares lisas (McCloskey y Gurney, 2002). Así, esta red de células intersticiales suburoteliales de la vejiga humana desempeñan un papel fundamental en la comunicación intercelular al actuar como un sinticio funcional a través de la integración de una amplia variedad de señales sensoriales y motoras de la pared de la vejiga (Sui y col., 2002). La extensa red de células fibroblásticas estrelladas en el

detrusor humano están localizadas periféricamente en haces musculares en íntimo contacto con nervios aferentes y eferentes desempeñando un importante papel en la secreción y el mantenimiento del material extracelular, pudiendo además actuar como receptores para el estiramiento de la pared vesical (Drake y col., 2003). No obstante, no se conoce si dichas células representan una o varias poblaciones celulares, así como, la funcionalidad específica de las mismas.

Las señales del urotelio son importantes tanto para el desarrollo como para la funcionalidad del detrusor (Baskin y col., 2001). De hecho, la liberación de un factor relajante desde el urotelio, el cual, desempeña un papel importante en la relajación de la vejiga durante la fase de llenado, sugiere la posibilidad que las células intersticiales representen una vía de comunicación directa entre el urotelio y el músculo detrusor (Baskin y col., 2001).

1.6. CONTROL NERVIOSO Y HORMONAL

1.6.1. *Mecanismos colinérgicos*

1.6.1.1. *Receptores muscarínicos*

En la mayoría de las especies la contracción de la vejiga urinaria es mediada por mecanismos colinérgicos y por mecanismos no adrenérgicos no colinérgicos (NANC) (Ambache y Zar, 1970). Así, en el detrusor aislado de cobaya y conejo, la ACh produce una ligera despolarización, inicia la generación de espigas e incrementa la frecuencia de los potenciales de acción produciendo, finalmente, la contracción muscular (Andersson y col., 1991). Estas contracciones son incrementadas por inhibidores de la colinesterasa y abolidas con la atropina indicando que están mediadas por receptores muscarínicos. En el detrusor humano, la contracción de vaciado así como la inducida por estimulación eléctrica de los nervios sugiere que está mediada principalmente, si no exclusivamente, a través de la estimulación de receptores muscarínicos ya que son prácticamente abolidas por la atropina (Bayliss y col., 1999).

Se han descrito 5 subtipos de receptores muscarínicos denominados M₁, M₂, M₃, M₄ y M₅. Estos receptores están acoplados funcionalmente a proteínas G, pero la

señal de transducción varía dependiendo si la subunidad del receptor es par o impar. Así, los receptores muscarínicos de subíndice impar (M_1 , M_3 y M_5) están acoplados a la subunidad $G_{q/11}$ de las proteínas G, asociada a la hidrólisis de los fosfatidilinositoles produciendo, en última instancia, la movilización de Ca^{2+} desde el RS. Sin embargo, los receptores muscarínicos M_2 y M_4 están acoplados a la subunidad $G_{i/o}$ de las proteínas G sensible a la toxina pertusis, que produce la inhibición de la adenilato ciclasa (Figura 1.7). En la vejiga humana se ha demostrado la existencia de ARNm para todos los subtipos de receptores muscarínicos siendo predominantes los ARNm de los receptores M_2 y M_3 (Yamaguchi y col., 1996; Sigala y col., 2002). En el detrusor de rata y conejo, además de los mecanismos anteriormente mencionados, se ha demostrado la implicación de canales catiónicos no selectivos y de las dos isoformas de la Rho-cinasa (I y II) en la estimulación colinérgica muscarínica (Jezior y col., 2001; Wibberley y col., 2003). En el detrusor humano, la contracción colinérgica muscarínica es producida a través la hidrólisis de los fosfatidilinositoles de la membrana celular (Andersson y col., 1991). Sin embargo, en diversos estudios realizados con agonistas muscarínicos, fueron necesarias altas concentraciones de dichos agonistas para producir la hidrólisis de los fosfoinositoles, sugiriendo, así que la concentración de ACh liberada desde nervios, no es suficiente para provocar la formación de IP_3 (Iacovou y col., 1990). De hecho, receptores de subíndice impar, los cuales estimulan la producción de IP_3 , necesitan altas concentraciones de agonista para ejercer su funcionalidad, mientras que los receptores muscarínicos de subíndice par, que no producen IP_3 , operan a bajas concentraciones (Hashitani y col., 2000). El mecanismo de señalización de estos últimos está relacionado con la inhibición de la relajación simpática producida por receptores adrenérgicos β a través del bloqueo de la adenilato ciclasa (Hegde, 2006). Además, receptores muscarínicos M_2 pueden modular las relajaciones producidas por las purinas (Giglio y col., y col., 2001), activar canales catiónicos no específicos o inhibir la hiperpolarización producida por la PKC a través de la activación de canales K_{ATP} en la vejiga urinaria (Bonev y Nelson, 1993). En la vejiga humana normal, el receptor muscarínico M_2 es el mayoritario, sin embargo, el receptor funcionalmente activo es el receptor muscarínico M_3 (Chess-Williams, 2002). De hecho, el agonista de los receptores muscarínicos carbacol induce una corriente transitoria de salida de Ca^{2+} desde el RS mediada por activación de los receptores muscarínicos M_3 y la hidrólisis de los fosfoinositoles. Esto provoca la activación de

canales BK_{Ca} , los cuales, son entonces inhibidos por receptores muscarínicos M_2 acoplados a la subunidad inhibidora de las proteínas G (G_i) (Nakamura y col., 2002). Esto explicaría que la vía de señalización intracelular acoplada a la activación del receptor muscarínico M_2 , potencie la contracción colinérgica mediada a través de receptores M_3 . Por tanto, receptores muscarínicos M_3 son los principales responsables de la contracción de la vejiga normal (Chess-Williams, 2002) y obstruída (Krichevsky y col., 1999) mientras que los receptores muscarínicos M_2 , que en condiciones normales median contracciones moderadas, incrementan su funcionalidad cuando la contracción muscarínica M_3 estas disminuída, como sucede en la denervación y en la hipertrofia de la vejiga (Ruggieri y Braverman 2006). Así, la funcionalidad de los receptores muscarínicos está alterada en diferentes desórdenes neurológicos, tales como, la obstrucción del flujo de salida, vejigas neurogénicas o la hiperactividad del detrusor, sin embargo, no se conoce la repercusión fisiopatológica que dichos cambios tienen sobre la actividad del detrusor.

1.6.2. Mecanismos adrenérgicos

1.6.2.1. Receptores adrenérgicos α

El papel del Sistema Nervioso Simpático en la función de la vejiga humana ha sido bastante discutido debido a la escasa inervación adrenérgica existente en el detrusor humano (Gosling y col., 1999). En la mayoría de las especies, los agonistas de los receptores adrenérgicos α_{1A} contraen el detrusor pero son necesarias altas concentraciones (Andersson, 1993). Los receptores α adquieren importancia funcional cuando existe obstrucción del flujo de salida, descentralización parasimpática y vejigas hiperactivas (Perlberg y Caine, 1982). De hecho, en la obstrucción del flujo de salida el balance entre la contracción mediada por receptores adrenérgicos α y la relajación a través de receptores adrenérgicos β puede ser modificada por la baja regulación de estos últimos (Rohner y col., 1978). En pacientes con hiperplasia benigna de próstata, el uso de antagonistas adrenérgicos α_1 favorece la desaparición de la hiperactividad del detrusor, sugiriendo que puede existir un incremento de la función del receptor α_1 asociada con cambios morfológicos ocurridos durante la hipertrofia. Por tanto, el grado y la duración de la

obstrucción tienen un papel importante en las respuestas mediadas por receptores adrenérgicos α (Andersson y Arner, 2004).

En vejigas normales, el 70% del ARNm de los receptores α_1 adrenérgicos es del subtipo α_{1A} , el 5% del α_{1B} , y el 25% del α_{1D} . En vejigas obstruidas, por el contrario, la expresión de los receptores α_{1D} está incrementada, mientras que la expresión de los receptores α_{1A} y α_{1B} está disminuída, lo cual es relevante teniendo presente que el receptor del subtipo α_{1D} tiene de 10 a 100 veces mayor afinidad por la NA endógena que los otros dos subtipos. Asimismo, se ha visto que existe una relación entre la expresión de ARNm del receptor α_{1D} en la mucosa vesical y las alteraciones urodinámicas características de pacientes con hipertrofia benigna de próstata (Kurizaki y col., 2011). En la hiperactividad de detrusor asociada con desórdenes neurológicos se ha observado un incremento en la densidad de receptores adrenérgicos α pero no está clara la repercusión funcional de dicha elevación. Se ha propuesto que el balance entre la contracción mediada por receptores α y la relajación mediada por los receptores β puede modificarse en la obstrucción del flujo de salida, de manera que el detrusor responde con contracción a la NA en lugar de relajación como ocurre con el detrusor normal. Esta alteración de la respuesta es consecuencia de una disminución de la función β adrenérgica más que por un incremento de la funcionalidad de los receptores α .

1.6.2.2. *Receptores adrenérgicos β*

Existe una clara evidencia de la abundante expresión de receptores β adrenérgicos en el músculo detrusor de varias especies animales, los cuales, juegan un papel importante en la relajación vesical durante la fase de llenado (Michel y Vrydag 2006). El predominio de los receptores adrenérgicos β con respecto a los receptores α explicaría la relajación producida por NA en el detrusor, responsable del llenado de la vejiga urinaria (Perlberg y Caine, 1982). El subtipo de receptor β que media esta relajación varía con la especie; β_2 en ratón (Wuest y col., 2009), β_2 y β_3 en rata (Longhurst y Levendusky 1999) y cerdo (Yamanishi y col., 2002) y β_2 y principalmente β_3 en perros y hombre (Igawa y col., 1999, 2001; Wuest y col., 2009). Los agonistas de estos receptores producen relajación del músculo liso de la vejiga a través de su efecto directo sobre los receptores β_3 de los miocitos del detrusor. Distintos estudios han demostrado la habilidad de los agonistas selectivos de los receptores β_2 en la relajación

del detrusor humano (Badawi y col., 2007) y agonistas no-selectivos de los receptores β , como el isoproterenol, producen una relajación maximal mayor que la obtenida con agonistas selectivos β_3 (Igawa y col., 2001; Kullmann y col., 2009, 2010). Esta efectividad clínica de los agonistas β_2 , no concuerda con el supuesto efecto predominante de los receptores β_3 a menos que consideremos que la expresión de estos receptores esté en otros tipos celulares que no sólo en miocitos del detrusor (Limberg y col., 2010). De hecho, se ha demostrado que los tres tipos de receptores β , además de estar expresados en las células del músculo liso, están presentes en el urotelio, en células miofibroblásticas del suburotelio, en células ganglionares intramurales y en células de Schwann de nervios de la vejiga de diferentes especies, como la rata (Kullmann y col., 2009, 2010), el cerdo (Masunaga y col., 2010) y el hombre (Otsuka y col., 2008). En vejigas normales, la expresión del ARNm de los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 está reducida mientras que la del receptor β_3 está incrementada. En vejigas obstruidas, por el contrario, la expresión de los receptores β_1 y β_2 está incrementada, mientras la expresión de los receptores β_3 está disminuída. Además, la relajación inducida por agonistas selectivos de los receptores β_3 es efectiva en diferentes modelos animales con hiperactividad del detrusor (Igawa y col., 1999). Sin embargo, la efectividad de dichos agonistas en la hiperactividad del detrusor en el hombre es limitada. Podría, por tanto, especularse que la hiperactividad detrusor es debida a una falta de relajación mediada por receptores adrenérgicos β , sin embargo, no hay diferencias significativas en la densidad de dichos receptores en vejigas normales y con hiperactividad de detrusor (Restorick y Mundy, 1989).

Los agonistas adrenérgicos β estimulan la adenilato ciclasa incrementando el AMPc intracelular, y éste a su vez activa la PKA para mediar sus efectos biológicos. En dicha relajación parece desempeñar un papel importante la hiperpolarización producida por la activación de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de la membrana celular (Nakahira y col., 2001). Canales BK_{Ca} y K_{ATP} están involucrados en la relajación producida por la estimulación de los receptores adrenérgicos β_2 en la vejiga urinaria de cobaya (Kobayashi y col., 2000; Hudman y col., 2000). Sin embargo, el papel de los receptores adrenérgicos β es cuestionado ya que su bloqueo no tiene efecto sobre la función del detrusor humano normal (Andersson, 1993).

TRANSDUCCIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENERGICOS Y MUSCARINICOS

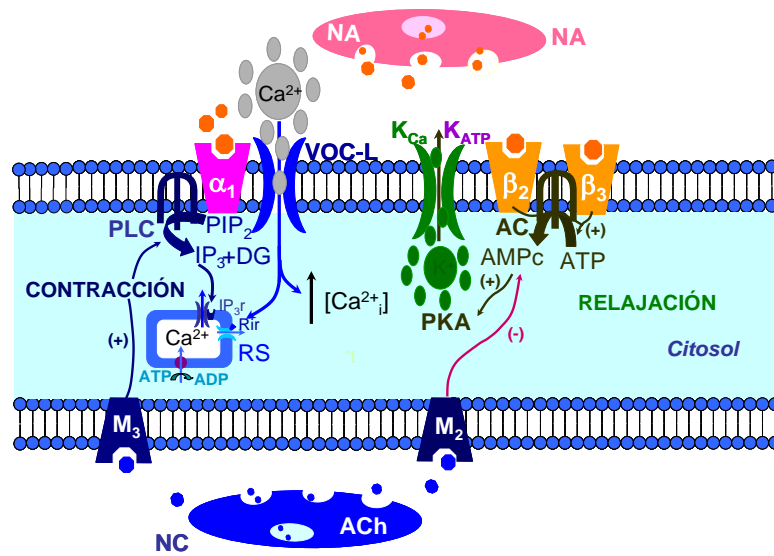


Figura 1.7 Transducción de los receptores adrenérgicos y muscarínicos. La relajación adrenérgica β es mediada por la activación de la adenilato ciclasa (AC) y su consecuente incremento de la [AMPc] citosólica que produce fosforilación de la proteína cinasa A (PKA) e hiperpolarización por la activación de canales de K⁺ activados por Ca²⁺ de alta conductancia (BK_{Ca}) y canales de K⁺ dependientes de ATP (K_{ATP}). La contracción mediada por receptores adrenérgicos α_1 es producida vía hidrólisis del fosfatidil inositol difosfato (PIP₂) para dar lugar a inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), este último implicado en la sensibilización de la maquinaria contráctil. El IP₃ se une a su receptor (IP₃r) en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) produciendo la liberación de Ca²⁺ almacenado y el influjo de Ca²⁺ extracelular a través de canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje (VOC) tipo L originando la elevación de [Ca²⁺]_i intracelular y la contracción muscular. Los receptores M₃, al igual que los receptores adrenérgicos α_1 , están acoplados a la hidrólisis de los fosfatidilinositoles, produciendo así, una contracción directa del músculo. Sin embargo, los receptores muscarínicos M₂ originan una contracción indirecta ya que están acoplados a la inhibición de la AC impidiendo la relajación mediada a través de receptores β -adrenérgicos.

1.6.3. *Mecanismos no adrenérgicos no colinérgicos*

En la mayoría de los especies mamíferas parte de la contracción vesical neuronalmente inducida es resistente a la atropina (Andersson, 1993). Así, en la vejiga de la rata, donde la respuesta contráctil a la estimulación eléctrica presenta dos componentes diferentes, se ha identificado que la respuesta fásica es producida por la liberación de un neurotransmisor no adrenérgico no colinérgico (NANC) (Andersson y Arner, 2004). La proporción de la respuesta NANC sobre el total de la contracción varía con la especie y la frecuencia de estimulación, sin embargo, la contribución de dichos mecanismos en la contracción de la vejiga humana es controvertida (Andersson, 1993). La ACh es responsable del 50% de la contracción en detrusor humano en el que se ha demostrado la existencia de contracciones neurogénicas resistentes a la atropina (Bayliss y col., 1999).

El componente NANC de las respuestas neuroinducidas se incrementa en las contracciones vesicales en diferentes condiciones asociadas con la hiperactividad del detrusor. En el detrusor de pacientes con hiperplasia benigna de próstata e hiperactividad del detrusor, particularmente aquellos con hipertrofia vesical, se demostró la existencia de un componente resistente a la atropina, responsable del 50% de la contracción inducida eléctricamente. En vejigas con hiperactividad del detrusor existe una transmisión purinérgica anómala, acontecimiento que puede explicar la sintomatología de los pacientes y la falta de respuesta a los agentes antimuscarínicos convencionales. Por todo ello se puede establecer que hay un componente NANC que contribuye a la transmisión motora en el detrusor humano que en vejigas normales es un componente minoritario pero que es de gran trascendencia en la disfuncionalidad vesical. Por otra parte, es interesante destacar que existe una significativa correlación positiva entre la edad y la respuesta NANC y una correlación negativa entre la edad y la neurotransmisión colinérgica en el músculo detrusor (Andersson y Arner, 2004).

1.6.3.1. *Adenosin 5'-trifosfato (ATP)*

El ATP participa junto con la ACh en la neurotransmisión excitadora de la vejiga urinaria responsable de la micción (Burnstock, 1972). De hecho, se ha sugerido que durante la fase de activación parasimpática, el componente contráctil inicial

sería debido a liberación de ATP desde los nervios mientras que la fase sostenida sería debida a liberación de ACh. El ATP actúa sobre dos familias de receptores purinérgicos: una familia de canales iónicos (receptores P2X con 7 subtipos) y una familia de receptores unidos a proteínas G (receptores P2Y con 8 subtipos) (Burnstock, 2007). La administración intravesical de ATP produce la activación aferente de la vejiga mediada esencialmente a través de fibras C insensibles a capsaicina (Aizawa y col., 2011). Se ha sugerido que el ATP actúa en los receptores P2X₃ presentes en neuronas aferentes de la capa suburotelial modulando la respuesta aferente del SNC, modificando así, el volumen vesical (Burnstock, 2008). Asimismo, otros estímulos como pH ácidos, producen la liberación de ATP, sugiriendo así que la acidez de la orina desempeña un papel importante en la contractilidad de la pared vesical (Sadananda y col., 2009). La activación del detrusor por el ATP es producida vía activación de un canal catiónico acoplado a ligando (receptor P2X) que promueve el influjo de Ca²⁺ extracelular. En la vejiga del conejo, la respuesta al ATP es bifásica, pero después de la desensibilización con α,β -metilen-ATP, agonista de los receptores purinérgicos P2X₁, dicha respuesta es monofásica sugiriendo, así, la implicación de dos subtipos de receptores purinérgicos (Cheng y Brading, 1991). En la hiperactividad de detrusor existe una sobrerregulación en la expresión de los receptores purinérgicos P2X (Moore y col., 2001). De hecho, O'Reilly y col. fueron incapaces de desvelar un componente nervioso purinérgico en vejigas normales pero, sin embargo, sí lo observaron en vejigas hiperactivas. La transmisión purinérgica anómala podría explicar el cuadro sintomatológico de dichos pacientes, sugiriendo así, un papel más determinante del ATP en vejigas obstruidas e hiperactivas que en vejigas normales (O'Reilly y col., 2001; Harvey y col., 2002). Estos autores confirmaron que el receptor purinérgico P2X₁ era el receptor predominante en el detrusor humano, incrementando su densidad en cuadros obstructivos. De hecho, en los primeros estadios de la obstrucción, la contracción purinérgica está aumentada mientras que la colinérgica está disminuida (Calvert y col., 2001).

En el cuello de la vejiga urinaria, el ATP está involucrado en la neurotransmisión inhibitoria NANC produciendo relajación a través de la activación de receptores purinérgicos A_{2A} después de su hidrólisis a adenosina y de receptores P2Y₁ después de su metabolización a adenosin 5'-difosfato (ADP) (Hernández y col., 2009). Esto explica que durante la fase de activación parasimpática, el ATP provoque

contracción del detrusor y relajación de la base de la vejiga facilitando, así, el vaciado completo de la vejiga urinaria.

1.6.3.2. Óxido nítrico (NO)

El NO es el principal neurotransmisor inhibitorio NANC en el Tracto Urinario Inferior (Andersson, 1993). La expresión de las tres isoformas del enzima de síntesis de NO (NOS), dos constitutivas: la NOS neuronal (nNOS) y NOS endotelial (eNOS) y una isoforma inducible (iNOS) en el interior del urotelio, parecen indicar un papel importante del NO en diferentes especies incluido el hombre en el control de la actividad vesical, a través de la inhibición de la actividad nerviosa aferente (Dokita y col., 1994). En el músculo liso del Tracto Urinario Inferior de diferentes especies incluido el hombre se ha identificado no sólo la presencia de la sintasa de NO constitutiva (nNOS y eNOS), sino también la iNOS. Hasta el momento, no hay evidencia de la existencia de la nNOS en las células musculares lisas del detrusor y en las células no estimuladas no se ha detectado la iNOS. Sin embargo, estas células expresan la enzima cuando son expuestas a los lipopolisacáridos y citoquinas producidas durante las infecciones del Tracto Urinario (Elliott y Castleden, 1993). Se ha sugerido que el NO puede generarse en el detrusor y ser un factor importante de la relajación vesical durante la fase de llenado (James y col., 1993). La vejiga normal responde al llenado con relajación de su pared que le permite acomodarse a grandes volúmenes de orina con un incremento mínimo en la presión intravesical. Este fenómeno no solo se ha atribuido a propiedades físicas de la vejiga, sino también a la existencia de un mecanismo neural operativo durante el llenado en el que no solo existe inhibición de la actividad nerviosa parasimpática o incremento en la actividad simpática, sino que también implica al NO generado en la vejiga, el cual, favorece dicho proceso de acomodación (Theobald, 1996).

Si el NO juega un papel importante en la relajación de la vejiga, cabría esperar un papel importante del GMPc, sin embargo, Morita y col. (1992) observaron que el GMPc únicamente está relacionado con la relajación de la uretra, mientras que el AMPc sería el nucleótido responsable de la relajación del detrusor. En esta línea, Masuda y col. (2002) demostraron que en el detrusor, a diferencia del uréter (Hernández y col., 1997), la actividad de la NOS y de la guanilato ciclasa fueron detectadas en la mucosa pero no en el músculo liso. Los donantes de NO, en el

detrusor del hombre, producen contracción o relajación o ambos efectos, sugiriendo, así, que la implicación de la vía de la PKG proceda de células intersticiales expresando GMPc (Moon, 2002). La PKG, a través de la desensibilización de la maquinaria contráctil al Ca^{2+} y de la activación de canales BK_{Ca} , produce relajación muscular (Hofmann y col., 2000). Por tanto, no parece probable que el NO actúe como sustancia neurotransmisora produciendo relajación del detrusor, sin embargo, esto no impide que pueda modular el efecto de otros neurotransmisores o que tenga un papel en la transmisión aferente, ya que cambios en la actividad de la iNOS pueden favorecer el desarrollo de la hipertrofia de la pared de la vejiga. De hecho, en la obstrucción del flujo de salida se incrementa la actividad de la iNOS y disminuye la de la nNOS (Felsen y col., 2003). El NO derivado de la iNOS producido en la obstrucción, a través de la formación de especies reactivas de nitrógeno, favorece la generación de contracciones espontáneas de la vejiga y produce fibrosis de la pared vesical, lo cual, sugiere que inhibidores de la NOS_i puedan tener una posible utilidad terapéutica.

A diferencia del detrusor, en el cuello de la vejiga urinaria del hombre y del cerdo, el NO, cuya liberación es modulada por canales K_v y por receptores adrenérgicos α_2 de localización presináptica, está involucrado en la neurotransmisión inhibitoria NANC, produciendo relajación muscular a través de mecanismos dependientes de la guanilato ciclasa sin involucrar activación de canales de K^+ de localización postsináptica (Hernández y col., 2007, 2008; Bustamante y col., 2010). Así, el NO actuaría durante la fase de activación parasimpática produciendo relajación de la base de la vejiga facilitando, así, su vaciado completo. Además de NO, un componente independiente de NO también participa en la neurotransmisión inhibitoria del cuello vesical (Martínez-Sáenz y col., 2011a,b).

1.6.3.3. *Neuropéptidos*

1.6.3.3.1. *Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiario (PACAP) y péptido intestinal vasoactivo (VIP)*

Tanto el PACAP, del cual existen dos isoformas (PACAP 27 y PACAP 38), como el VIP están expresados en las vías neurales que regulan el Tracto Urinario Inferior.

Así, inmunorreactividad para VIP ha sido demostrada en neuronas aferentes y eferentes que inervan la vejiga y la uretra, mientras que inmunorreactividad para PACAP está presente únicamente en neuronas aferentes (Yoshiyama y De Groat, 2008). PACAP y VIP conjugan con tres subtipos de receptores denominados PAC₁ (específico de PACAP), VPAC₁ y VPAC₂ (que muestran similar afinidad por VIP y PACAP), los cuales, están acoplados a la subunidad G_s de las proteínas G y que han sido identificados en la musculatura lisa del uréter y la vejiga urinaria de varias especies incluido el hombre (Reubi, 2000). La activación de los tres subtipos de receptores estimula a la adenilato ciclasa con un incremento en la producción de AMPc (Sherwood y col., 2000; Laburthe y col., 2002). En la vejiga de la rata, los receptores PAC₁ están presentes en el músculo liso y en el urotelio, mientras que los receptores VPAC₂ sólo se expresan en la capa muscular (Braas y col., 2006). Los receptores VPAC₁ están presentes en el epitelio de la uretra del ratón (Harmar y col., 2004).

Mientras que el VIP relaja el uréter, el detrusor, el cuello vesical y la uretra de diferentes especies incluido el hombre cerdo (Reubi 2000; Hernández y col., 2004, 2006a,b; Yoshiyama y De Groat, 2008), PACAP relaja la vejiga y la uretra de especies como el cerdo, pero produce contracción del músculo liso de otras como el ratón debido a que este péptido produce acciones facilitadoras presinápticas y efectos excitadores sobre neuronas preganglionares parasimpáticas lumbosacras. De hecho, PACAP desempeña un papel importante en la contracción del detrusor por facilitar la liberación de ATP desde el urotelio, contribuyendo, así, a la hipersensibilidad e hiperactividad del detrusor característica del síndrome inflamatorio crónico vesical (cistitis intersticial) (Girard y col., 2008; Yoshiyama y de Groat, 2008). Niveles plasmáticos bajos de VIP y/o PACAP pueden provocar disfuncionalidad motora de la vejiga urinaria. De hecho, la falta de VIP puede estar relacionada con algunas formas de hiperactividad del detrusor ya que pacientes con hiperactividad idiopática del detrusor presentan niveles reducidos de dicho péptido (Chapple, 2010). Además, ratones *Knockout* para el PACAP presentan una capacidad vesical, un volumen de vaciado y un intervalo de contracción incrementados, así como una estimulación somática disminuida. Por tanto, la falta de PACAP provoca disfuncionalidad vesical y alteraciones somáticas y viscerales (May y Vizzard, 2010).

Tanto PACAP como VIP participan en la neurotransmisión inhibitoria del cuello de la vejiga urinaria del cerdo produciendo relajación del mismo a través de receptores musculares VPAC₂. Además, receptores facilitadores PAC₁ localizados en

aferentes primarias sensibles a la capsaicina y acoplados a la liberación de NO y receptores VPAC inhibidores presentes en terminaciones motoras están, asimismo, involucrados en las relajaciones a PACAP 38 y VIP, respectivamente (Hernández y col., 2006a,b). En resumen, VIP y PACAP desempeñan un papel importante en el control del vaciado de la vejiga normal y patológica (Yoshiyama y de Groat, 2008).

1.6.3.3.2. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)

El Tracto Urinario de los mamíferos está densamente innervado por aferentes primarias sensibles a la capsaicina (APSC), las cuales, son la principal fuente de liberación del CGRP y las taquicininas (TKs) (Lecci y Maggi, 2001; Bartho y col., 2004). Las APSC liberan CGRP en respuesta a factores locales entre los que se incluyen bradicininas y/o prostaglandinas (Vasko y col., 1994) y endotelinas (Dymshitz y Vasko, 1994). El CGRP coexiste con el PACAP en APSC del uréter, trigono y uretra de la rata (Fahrenkrug y Hannibal, 1998). El CGRP regula el peristaltismo ureteral impidiendo la existencia de ondas antiperistálticas características de obstrucciones ureterales (Maggi y col., 1995). En el detrusor también es característica la presencia de una rica innervación de APSC conteniendo CGRP, el cual, relaja el detrusor, modulando así, la actividad refleja local, donde axones colaterales de fibras sensoriales modulan el mecanismo marcapasos de la pared vesical responsable de las contracciones fásicas del detrusor (Gillespie, 2005).

1.6.3.3.3. Taquicininas (TKs)

Las TKs, constituyen una familia de péptidos integrada por la sustancia P (SP), la neurocinina A (NKA) y la neurocinina B (NKB), las cuales, están presentes en las aferentes primarias sensibles a la capsaicina (APSC) de la vejiga urinaria de varias especies incluido el hombre (Lecci y Maggi, 2001, 2003). Tres subtipos de receptores taquicinérgicos han sido caracterizados genómicamente y farmacológicamente y denominados como receptores NK₁, NK₂ y NK₃, los cuales, están acoplados a proteínas G. La SP, la NKA y la NKB actúan sobre los tres subtipos de receptores pero con actividad preferencial sobre cada uno de ellos. Así, SP tiene mayor afinidad de conjugación a receptores NK₁, NKA a receptores NK₂ y NKB a receptores NK₃ (Lecci y Maggi, 2003). En el Tracto Urinario, las TKs coexisten con CGRP y PACAP y

aminoácidos excitadores como glutamato y aspartato en las APSC (Keast y Stephensen, 2000; Bustamante y col., 2000, 2001; Avelino y col., 2002). Esta colocalización es importante a nivel del miélomero lumbar L6, zona desde donde se proyecta la inervación aferente de la vejiga lo cual, da una idea de la importancia de la regulación central de los receptores de TKs en la regulación de la micción (Hwang y Valtschanoff, 2003). Además, la expresión de TKs en otro tipo de neuronas resistentes a capsaicina puede ocurrir en condiciones fisiopatológicas, tales como la cistitis ya que, junto con su función aferente, la liberación periférica de estos péptidos estimula la contractilidad del detrusor por inducir la denominada “*inflamación neurogénica*” (Lecci y Maggi, 2003).

Todos los subtipos de receptores han sido identificados en vejigas urinarias de varias especies *in vitro* e *in vivo*, siendo el receptor NK₂ el receptor funcionalmente activo que produce contracción dependiente de la entrada de Ca²⁺ extracelular a través de canales VOC tipo L y, en menor medida, por movilización de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares (Martin y col., 1997; Burcher y col., 2000).

1.6.3.3.4. *Angiotensinas*

Un sistema renina-angiotensina autocrino/paracrino ha sido identificado en la vejiga humana (Weaver-Osterholtz y col., 1996). La angiotensina II produce contracción del detrusor de varias especies incluido el hombre a través del receptor de angiotensina AT₁. Dicha contracción es dependiente de la entrada de Ca²⁺ extracelular a través de canales VOC tipo L (Andersson y Arner, 2004). Aunque la funcionalidad de la ANG II no está totalmente esclarecida, posiblemente actúe como sustancia neuromoduladora.

La obstrucción del flujo de salida favorece la liberación de angiotensina II, la cual, afecta al tono de la vejiga actuando como factor trófico en la pared vesical, al producir hipertrofia e hiperplasia de la misma, así como, un incremento en la producción de colágeno de la pared vesical (Andersson y Arner, 2004).

1.6.3.4. *Prostanoides*

La vía de la ciclooxigenasa (COX), responsable de la síntesis de prostanoides (prostaglandinas y tromboxano), está involucrada en la Fisiología y Fisiopatología

de la vejiga urinaria (Andersson, 1993). Dos isoformas de COX (la constitutiva COX-1 y la inducible COX-2) han sido identificadas en la vejiga humana. La COX-1 es producida en condiciones fisiológicas mientras que la COX-2 es activada en la inflamación (Tramontana y col., 2000). La síntesis de prostanooides es producida localmente en músculo detrusor y mucosa, en respuesta a estímulos fisiológicos, tales como el estiramiento de la pared de la vejiga urinaria (Gilmore y Vane, 1971). Asimismo, lesiones de la mucosa vesical y mediadores de la inflamación como la bradicinina favorecen la síntesis y liberación de prostaglandinas (Andersson, 1993). COX-1 y COX-2 están expresadas en células intersticiales de Cajal en la vejiga urinaria y así, prostanooides liberados desde dichas células y desde el urotelio están involucrados en la contracción de la pared vesical (De Jongh y col., 2007). Prostaglandinas como la $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_1 y PGE_2 producen contracción del detrusor humano por acción directa sobre el músculo liso y/o indirectamente por modulación de la neurotransmisión y contribuyen al mantenimiento del tono del detrusor (Andersson, 1993). En la vejiga de cobaya, los prostanooides son liberados por estimulación nerviosa y son capaces de facilitar el acoplamiento excitación/contracción por movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Creed y Callahan, 1989). Ya que los prostanooides producen una contracción lenta del detrusor no parece probable una implicación directa de las prostaglandinas en el vaciado de la vejiga, sino que más bien podrían desempeñar un papel modulador de la neurotransmisión aferente y eferente vesical (Andersson y Arner, 2004).

Durante la fase de llenado, la vejiga muestra contracciones y relajaciones locales producidas por actividad mecánica miogénica local que puede estar incrementada por liberación local de prostaglandinas. Dichas contracciones espontáneas son capaces de generar actividad en nervios aferentes que pueden contribuir a la hiperactividad del detrusor (Yokoyama, 2010; Andersson y col., 2010). De hecho, inhibidores de la COX disminuyen la frecuencia miccional en modelos animales de cistitis, pero no obstante, su papel en dicha disfuncionalidad está aún por determinar. Ya que prostanooides derivados de la COX están involucrados en el control neural del tono del músculo liso de la vejiga, inhibidores de dicho enzima son eficaces en el tratamiento de la vejiga hiperactiva al mejorar el cuadro irritativo característico y los parámetros urodinámicos. Sin embargo, la elevada incidencia de efectos secundarios cuestiona su utilización terapéutica (Andersson, 2010).

1.6.3.5. *Inhibidores de las fosfodiesterasas*

Las fosfodiesterasas (PDE) son enzimas que permiten la regulación de la concentración intracelular de AMPc y GMPc. Estas enzimas favorecen la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), por lo que el uso de inhibidores de las PDE, los cuales, incrementan la formación de dichos mensajeros químicos responsables de la relajación del detrusor, parece ser un enfoque lógico para tratar la vejiga hiperactiva (Andersson y Arner, 2004; Andersson, 2007). La PDE₄ hidroliza el AMPc e inhibidores de dicha enzima reducen la hipercontractilidad característica de la vejiga de rata con obstrucción del flujo de salida (Nishiguchi y col., 2007). El uso de estos inhibidores en el tratamiento de la vejiga hiperactiva se ha visto restringido por los efectos colaterales que producen (esencialmente vómitos) (Giembycz, 2005; Andersson, 2010). Por otra parte, el tratamiento con sildenafil, un inhibidor de la PDE₅ que previene la ruptura de GMPc, mejora los síntomas urinarios en pacientes con disfunción eréctil, por lo que estos fármacos pueden ser de utilidad terapéutica, al menos en hombres, con vejigas hiperactivas (Sairam y col., 2002; Andersson, 2010).

1.7. INCONTINENCIA URINARIA

La definición de incontinencia urinaria de la *Sociedad Internacional de Continencia (ICS)* del año 2002 es: “*Toda queja de pérdida involuntaria de orina*” simplificando anteriores definiciones. En el *Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española* definen dicha disfuncionalidad como: “*Patología que consiste en la expulsión involuntaria de orina*”. En anteriores definiciones se aludía a que esta pérdida de orina originaba problemas médicos, higiénicos, sociales, etc. Debido a que el problema de la incontinencia es percibido por los pacientes de distinta manera, según sus actividades, trabajo, edad, etc, la definición actual parece más adecuada. Si la incontinencia urinaria produce alteraciones de la vida cotidiana en cualquiera de sus aspectos debe tenerse en cuenta, y esto no siempre se correlaciona con la cantidad de orina perdida.

Se han descrito 4 tipos de incontinencias urinarias: 1) incontinencia de urgencia, 2) incontinencia paradójica o por rebosamiento; 3) incontinencia de estrés o de esfuerzo y 4) cuadros mixtos de urgencia y estrés:

1) *Incontinencia de urgencia (IU)*. Es producida por inestabilidad vesical producida por hiperactivación colinérgica del detrusor, la cual, produce contracción de la pared vesical durante la fase de llenado, provocando así, escapes repentinos de orina, urgencia y aumento de la frecuencia miccional, y en ocasiones nocturia. También puede deberse a una urgencia sensorial, como se produce cuando hay alguna irritación vesical que disminuye el umbral de la sensación de llenado, es decir, se siente grandes deseos de orinar a pequeños volúmenes. Es una patología frecuente en pacientes geriátricos con obstrucción urinaria y alteraciones neurológicas como la esclerosis múltiple (Abrams, 2003). La prevalencia de esta afección es del 12% incrementándose con la edad, afecta mayoritariamente a los varones (3 de cada 4 casos), siendo su terapia farmacológica bastante resolutiva mediante la administración de antagonistas de receptores muscarínicos M_3/M_2 para relajar la hiperactividad del detrusor. La etiología de este incremento de la actividad colinérgica es multifactorial incluyendo alteraciones de la estructura y de la innervación sensorial y motora del detrusor (Brading, 1997). De hecho, una función deficitaria del detrusor junto con la sobreexpresión y una liberación incrementada de una amplia variedad de mediadores químicos (ATP, NO, bradicininas, endotelinas, etc.) desde el urotelio, generan una exacerbación de la actividad aferente que da lugar, en última instancia, a inestabilidad de la pared vesical con contracciones involuntarias y a urgencia miccional, características de la vejiga hiperactiva (Yoshimura, 2008). El tratamiento de estos cuadros de incontinencia comprende el uso de agentes antimuscarínicos M_2/M_3 como oxibutinina, darifenacina y fesoterodina, tolterodina, propiverina, cloruro de trospium y solifenacina altamente resolutivos (con una eficacia superior al 80% de los casos) pero que, no obstante, producen efectos colaterales como sequedad de boca y diarrea (Kelleher y col., 2008).

En la actualidad, diferentes estrategias terapéuticas para la hiperactividad vesical son objeto de estudio. Entre ellas cabe destacar, el uso de agonistas adrenérgicos β_3 , como el mirabegron, para inhibir la contracción del detrusor (Michel y col., 2011; Tyagi y col., 2011). Asimismo, canales de K^+ representan excelentes dianas terapéuticas para dicha patología. De hecho, la baja regulación de los canales BK_{Ca} , SK_{Ca} y K_{ATP} contribuyen a la hiperactividad de la pared de la vejiga, por incrementar el nivel basal de la fosforilación de la MLC, por lo que activadores de dichos canales pueden ser de utilidad en el tratamiento de la vejiga hiperactiva

(Oger y col., 2010a; Kita y col., 2010). No obstante, debido a que dichos compuestos tienen un marcado efecto hipotensor, su uso debe estar restringido (Streng y col., 2004). La inhibición de las fofodiesterasas PDE₁ y PDE₄ es otra posible opción terapéutica en la hiperactividad vesical (Andersson y col., 2007). Asimismo, el hecho que inhibidores de la PDE₅, como el sildenafil, produzcan relajación del detrusor del hombre a través de mecanismos dependientes del GMPc, AMPc y canales de K⁺ con escasa contribución del NO, sugiere que también inhibidores de la PDE₅ pueden constituir una herramienta valiosa para la inhibición de la irritabilidad de la pared vesical durante el llenado (Oger y col., 2010b). La expresión de los receptores purinérgicos está alterada en vejigas hiperactivas por lo que pueden representar una opción terapéutica valiosa tanto para controlar la excitabilidad del detrusor como la actividad neuronal aferente (Ford y col. 2006). De hecho, una liberación incrementada de ATP y prostaglandinas del urotelio puede alterar también la actividad del detrusor (Birder, 2007). La proteína Rho cinasa influye en la contracción del detrusor por lo que es otro objetivo de estudio para los nuevos tratamientos de vejiga hiperactiva (Wibberley y col., 2003). Por otra parte, células intersticiales, han sido caracterizadas por ejercer un papel importante en las contracciones espontáneas del detrusor (Andersson y Arner, 2004; Yoshimura y Chancellor, 2007). El número de células intersticiales está incrementado en la obstrucción vesical, e inhibidores de la actividad de las mismas (inhibidores de la tirosina cinasa), disminuyen la amplitud de las contracciones espontáneas en la vejiga de cobaya y del hombre, lo cual, sugiere la posible implicación de estas células en la urgencia miccional (Biers y col., 2006). En resumen, el conocimiento de la compleja fisiología celular y de los mecanismos de control de la función vesical son claves para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. No obstante, la naturaleza multifactorial de la urgencia miccional complica, en gran medida el tratamiento de la vejiga hiperactiva (Gulur y Drake, 2010).

2) *Incontinencia paradójica o por rebosamiento*. En este tipo de incontinencia son característicos los escapes continuos de orina de escasa cantidad (polaquiuria) y una disminución del calibre del chorro miccional. Caracterizada por la existencia de retención y residuo urinario de forma permanente al no poderse vaciar la vejiga correctamente como consecuencia de la hipoactividad del detrusor, y cuando se sobrepasan las presiones que pueden soportar los mecanismos de cierre

del Tracto Urinario Inferior se producen pérdidas, es decir cuando rebosa por lo que también se llama por *incontinencia por rebosamiento*. Esta circunstancia suele darse en casos de obstrucción del flujo de salida por HBP, cáncer de próstata, etc. de larga evolución. Su tratamiento contempla la presión de la musculatura inguinal (*maniobra de Crede*) y el autosondaje para favorecer el vaciamiento total de la vejiga (Yang y Huang, 2004).

3) Incontinencia de esfuerzo o de estrés (IE). Se origina cuando la presión intravesical supera la resistencia uretral como resultado de una presión abdominal incrementada en ausencia de contracción del detrusor. En estos cuadros son característicos escapes de orina producidos en circunstancias donde se produce la elevación súbita de la presión intravesical, como es el caso de la tos y el estornudo. Tres cuadros de IE han sido descritos siendo denominados IE Tipo I, II y III:

- IE Tipo I y II. Producidas por alteraciones anatómicas en la base de la vejiga, concretamente por la pérdida del ángulo uretrovesical posterior, siendo característica, además, en el Tipo II la caída de la vejiga y de la uretra.

- IE Tipo III. Producidas por disfuncionalidad del mecanismo esfintérico intrínseco que origina un cuello de vejiga urinaria abierto de forma permanente. Afecta primordialmente a población femenina constituyendo la forma más grave de incontinencia urinaria y la de mayor frecuencia de presentación en postoperatorios de intervenciones quirúrgicas retropúbicas (cirugías ginecológicas y prostáticas) (McGuire y Woodside, 1981). Aunque la etiología de esta incontinencia es multifactorial incluyendo obesidad, diabetes y determinadas prácticas deportivas, como el baloncesto y voleivol, cabe destacar el parto como principal factor predisponente en el que es característica la existencia de una contracción uretral insuficiente para producir el cierre uretral como consecuencia de la alteración en la regulación nerviosa motora y somática de la base de la vejiga y la uretra (Cannon y col., 2003).

En las IE tipo III, las terapias farmacológicas utilizadas son de escasa eficacia utilizándose fundamentalmente agonistas de los receptores adrenérgicos α_1 e inhibidores de la recaptación de serotonina (duloxetina) para favorecer la contracción de la base de la vejiga urinaria (Chancellor y Yoshimura 2004). Recientemente, se ha visto que la terapia combinada de ejercicios de fortalecimiento

del suelo pélvico junto con la administración de duloxetina es más resolutiva que la terapia farmacológica aislada (Robinson y Cardozo, 2010).

4) Incontinencia mixta de urgencia y estrés. Se caracteriza por la pérdida involuntaria de orina que cursa con urgencia miccional y esfuerzo asociada a la tos y/o el estornudo (Haylen y col., 2010). Los factores predisponentes de este proceso son la edad, la raza caucásica, el índice de masa corporal, la alteración tiroidea y la cirugía retropúbica (como la histerectomía) (Minassian y col., 2008). Una primera elección es el tratamiento conservador que incluye cambios en el comportamiento (cambio de dieta e ingesta moderada de líquidos), pérdida de peso ya que se ha visto que la obesidad es un factor de riesgo para la incontinencia y ejercicios para fortalecer la musculatura pélvica. La segunda opción es un tratamiento farmacológico donde principalmente se trata al paciente con antagonistas muscarínicos M_2/M_3 (como la oxibutinina) e inhibidores de la recaptación neuronal de 5-HT (duloxetina). Se han estudiado otros fármacos, tales como antidepresivos tricíclicos pero su papel aún no está bien definido (Hashim y Abrams, 2006). Mientras que los antimuscarínicos son preferentemente usados en incontinencias mixtas donde lo que predomina es la urgencia, la duloxetina, se usa cuando predominan los síntomas de estrés (Bent y col., 2008). Como último recurso se recurre a la cirugía pero existe escasa literatura referida a los resultados obtenidos con los distintos tipos de cirugía para estos cuadros mixtos (Holmgren y col., 2005).

El denominado *Cuadro Síntomalógico del Tracto Urinario Inferior (STUI)* está integrado por un proceso irritativo y uno obstructivo producidos durante el llenado y el vaciado de la vejiga, respectivamente. El cuadro irritativo incluye frecuencia y urgencia miccional, disuria y nocturia, mientras que el obstructivo comprende chorro miccional intermitente de escasa cuantía y potencia, indecisión, goteo terminal, vaciado incompleto e incontinencia por desbordamiento. Estos síntomas son comunes y no específicos y no se ha podido demostrar una correlación entre estos síntomas y un diagnóstico específico. El STUI está asociado con fundamentalmente con el desarrollo de la HBP característica en hombres de avanzada edad, lo cual, condiciona en gran medida su calidad de vida. El tratamiento farmacológico con antagonistas adrenérgicos α_1 e inhibidores de la 5α -reductasa, enzima que favorece el paso de testosterona a su metabolito activo $4,5\alpha$ -dihidrotestosterona, es sumamente resolutivo por producir relajación de la musculatura lisa del cuello de la vejiga y la uretra y reducir el volumen

de la próstata, respectivamente (Chapple, 2004). Además, dicho tratamiento es la terapia farmacológica de elección en la HBP asociada con hiperactividad vesical (Chung y Kaplan, 2010). El uso de inhibidores de la PDE₅, frecuentemente utilizados para el tratamiento de la disfunción eréctil, son también de gran eficacia en el tratamiento del STUI por producir relajación del músculo liso de la región de salida de orina (McVary y col., 2007).

1.8. ENDOTELINAS Y SUS RECEPTORES

En 1985, Kickey y colaboradores (1985) describieron la existencia de un factor vasoconstrictor derivado del endotelio sensible a la tripsina en cultivos de células endoteliales bovinas. Tres años después, Yanagisawa y col. aislaron, purificaron, clonaron y secuenciaron un péptido vasoconstrictor de 21 aminoácidos, denominándolo endotelina-1 (ET-1). Posteriormente fueron identificadas otras dos isoformas de ET-1, conocidas como endotelina-2 (ET-2) y endotelina-3 (ET-3) (Inoue y col., 1989), y todas ellas actuando sobre dos subtipos de receptores denominados receptores de endotelinas ET_A (Arai y col., 1990) y ET_B (Sakurai y col., 1990). Un tercer receptor denominado ET_C específico de ET-3, fue clonado en la rana *Xenopus laevis* (Karne y col., 1993), pero su homólogo en mamíferos no ha sido todavía identificado, considerándose así, que este receptor no desempeña un papel relevante en la Fisiología Humana (Braasch y col., 2009).

Actualmente, la familia de las endotelinas comprende 3 isoformas endógenas de 21 aminoácidos (ET-1, ET-2 y ET-3) y 3 isoformas de 31 aminoácidos (ET-1₁₋₃₁, ET-2₁₋₃₁ y ET-3₁₋₃₁). La ET-1 es la principal isoforma del Sistema Cardiovascular del hombre y es el más potente vasoconstrictor conocido (Yanagisawa y col., 1988). La ET-2, la cual, difiere únicamente por dos aminoácidos de la ET-1, ejerce también una potente acción vasoconstrictora. La ET-3, sin embargo, a concentraciones fisiológicas tiene una escasa afinidad de conjugación con el receptor ET_A y se ha identificado en el plasma, corazón, cerebro y glándulas adrenales, pero no en células endoteliales (Davenport y Maguire, 2006, Granger y col., 2006). Asimismo, las sarafotoxinas (S6a, S6b, S6c y S6d) y una familia de péptidos de 21 aminoácidos aislados del veneno de la serpiente *Atractaspis engadensis* presentan una gran similitud con la ET-1 (Takasaki y col., 1988).

1.8.1. Estructura, síntesis y liberación de las endotelinas

En la estructura molecular de la ET-1 es característica la presencia de dos conjugados disulfuro intramoleculares entre residuos de cisteína cruzados en las posiciones 1 y 15 y 3 y 11 (Davenport y Maguire, 2006). Dicho agonista endógeno es liberado continuamente desde las células endoteliales por una vía constitutiva, produciendo una intensa vasoconstricción del músculo liso vascular subyacente contribuyendo, así, al mantenimiento del tono miogénico vascular. La ET-1 es también liberada desde unos gránulos de almacenamiento específicos de las células endoteliales denominados *Corpúsculos de Weibel-Palade* en respuesta a estimulación externa produciendo vasoconstricción (Russell y col., 1998) y es, asimismo, producida por otros tipos celulares en los Sistemas Cardiovascular y Renal, tales como células musculares lisas, cardiomiocitos, leucocitos, macrófagos y células mesangiales y tubulares renales (Davenport y Maguire, 2006; Granger y col., 2006).

Las endotelinas bioactivas son el resultado del procesamiento postranslacional del pre-propéptido de endotelina, cuya transcripción y translación da lugar a la formación de un péptido de 203 aminoácidos, el cual, más tarde es transformado por una convertasa a un péptido de 38 aminoácidos grande, la ET₁₋₃₈, el cual, es convertido a ET₁₋₂₁ por diferentes isoformas de los enzimas de síntesis (ECEs), un grupo de proteasas que pertenecen a la familia de las metaloproteasas con estructura y funcionalidad similar a las endopeptidasa neutras y a las proteínas del grupo sanguíneo *Kell* (Turner y Tanzawa, 1997; Turner y col., 1998). En los mamíferos existen cuatro isoformas de la ECE-1 (ECE-1a ECE-1b, ECE-1c y ECE-1d) derivadas de un único gen. Están localizadas en la membrana plasmática o en el interior de los compartimentos intracelulares y difieren solo en la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal N. Los niveles de ARNm que codifica la ECE-1 son relativamente bajos en tejidos en donde las células endoteliales representen una población celular minoritaria. Así, los niveles de ECE-1 son más altos en el pulmón y en el riñón que en el corazón y el cerebro. La ECE-2 es una metaloproteasa conjugada a la membrana con un 59 % de homología con la ECE-1 bovina, pero con diferentes propiedades bioquímicas (mayor actividad a pH ácidos y más sensible a la inhibición por el fosforamidón). Cuatro isoformas de la ECE-2 (ECE-2_{a-1}, ECE-2_{a-2}, ECE-2_{b-1} y ECE-2_{b-2}) han sido identificadas, las cuales también difieren en su extremo terminal N y están asociadas con vesículas secretoras (Turner y col., 1998; Davenport y Maguire,

2006). Las endotelinas bioactivas de 31 aminoácidos ET_{1-31s} son sintetizadas por quimasas (proteasas serinas similares a la quimotripsina presentes en grandes cantidades en células musculares lisas y mastoideas) que selectivamente fijan la ET-1, la ET-2 y la ET-3 a su conjugado Tyr₃₁-Gly₃₂ (Turner y Tanzawa, 1997). Asimismo, metaloproteasas diferentes de las ECEs, tales como MMP-2 (matriz de la metaloproteína-2) están involucradas en el metabolismo de la ET-1, dando lugar a la formación de ET-1₁₋₃₂, un péptido que también muestra un potente efecto vasoconstrictor.

1.8.2. Receptores de endotelinas ET_A y ET_B

La ET-1 y ET-2 poseen una afinidad similar de conjugación al receptor ET_A , el cual, es prácticamente insensible a la estimulación con la ET-3. Mientras que prácticamente no existen agonistas selectivos para el receptor ET_A (Rossi y col., 2002), una amplia gama de antagonistas selectivos para dicho receptor como el BMS182874, darusentán, ambrisentán y sitaxsentán han sido sintetizados (Watts, 2010). La falta de agonistas selectivos para el receptor ET_A limita, en gran medida, el conocimiento de los fenómenos de desensibilización, resensibilización y señal de transducción de dicho receptor, utilizándose la ET-1 como agonista selectivo del mismo. El receptor ET_A es el receptor predominante en los miocitos cardiacos y una población mixta de receptores ET_A y ET_B ha sido descrita en fibroblastos cardiacos y en células endoteliales del endocardio (Russel y Molenaar, 2000; Modesti y col., 1999).

El receptor ET_B fue clonado inmediatamente después que el receptor ET_A (Sakurai y col., 1990). La tres isoformas de endotelinas muestran una similar afinidad de conjugación para el receptor ET_B y a diferencia del receptor ET_A , agonistas (como el BQ3020, IRL1620 o sarafotoxina 6c) y antagonistas (como el BQ788, IRL2500 o A192621) selectivos para el receptor ET_B han sido desarrollados siendo su localización mucho más restringida que la del receptor ET_A , fundamentalmente a nivel de los Sistemas Cardiovascular, Respiratorio, Renal y Nervioso.

Se ha sugerido la existencia de 2 subtipos de receptores ET_B ; un receptor ET_{B1} presente en la célula endotelial y uno ET_{B2} localizado en el músculo liso vascular (Shyamala y col., 1994; Mizuguchi y col., 1997). Sin embargo, actualmente la *Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR)* no ha admitido dicha división al no existir datos fehacientes que demuestren la existencia de 2 proteínas diferenciadas del receptor ET_B .

En el riñón, los receptores ET_B representan la principal población de receptores de endotelinas (70% de los receptores en la corteza y en la médula renal), y se encuentran localizados en células endoteliales y en conductos colectores (Schiffrin y Touyz, 1998; Schiffrin, 2005). Los receptores ET_A son localizados en el músculo liso vascular de arterias y venas, así como en las arterias de resistencia intrarrenales, y probablemente debido a alta densidad de receptores de endotelina, la vascularización renal es altamente sensible a las acciones vasoconstrictoras pre y postglomerulares de la ET-1 (Vassileva y col., 2003; Kohan, 2006; Granger y col., 2006). Los receptores ET_B presentes en las células endoteliales también eliminan ET-1 de la circulación, funcionando como receptores de aclaramiento (D'Orleans-Juste y col., 2002; Johnström y col., 2005; Bagnall y col., 2006). De hecho, el bloqueo de estos receptores origina la elevación de endotelinas circulantes, fundamentalmente ET-1 y ET-3, mientras que ratones genéticamente modificados que carecen del receptor ET_B endotelial muestran elevadas concentraciones plasmáticas de ET-1 (D'Orleans-Juste y col., 2002; Bagnall y col., 2006; Davenport, 2006).

1.8.3. Mecanismos de transducción de los receptores de endotelinas

Los receptores ET_A y ET_B son receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G, los cuales, poseen un extremo amino extracelular y uno carboxilo intracelular (Sakurai y col., 1990). La señal de transducción de los receptores de endotelina se produce de manera secuencial a través de una cascada de acontecimientos intracelulares en la que el agonista (la ET-1) activa el receptor heptahelicoidal, el cual, activa una proteína G y ésta, a su vez, activa a un efector que produce o modifica la producción de un segundo mensajero para que acción biológica sea producida.

En la célula muscular, la activación de los receptores de endotelina produce la activación de la PLC, la cual, da lugar a la generación del IP₃ y DAG, los cuales, estimulan la liberación de Ca²⁺ intracelular y activan varias isoformas de la PKC, respectivamente (Simonson y Dunn, 1990; Schiffrin y Touyz, 1998). Otras vías de señalización también son activadas e involucran la fosfolipasa D (PLD) y la generación de DAG, la estimulación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y la liberación de ácido araquidónico, la activación del intercambiador Na⁺/H⁺ y la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). La activación de estas vías de señalización está

involucrada en la regulación a corto plazo del tono muscular, así como en el control a largo plazo del crecimiento celular, la adhesión, migración y deposición de la matriz intercelular en células vasculares, renales y cardíacas (Schiffrin y Touyz, 1998; Schiffrin, 2005). La activación de los receptores ET_B de la célula endotelial estimula la liberación de NO y prostaciclina, modulando así, el efecto vasoconstrictor de la ET-1 sobre la célula de la musculatura lisa vascular (D'Orleans-Juste y col., 2002) (Figura 1.8). De hecho, el efecto global de la ET-1 sobre el tono vascular es dependiente del balance entre la acción vasoconstrictora directa vía receptores ET_A y ET_B del músculo liso y la vasodilatación inducida por prostaciclina y NO mediada por receptores endoteliales ET_B. Una característica esencial de la ET-1 es la unión irreversible a sus receptores. La persistente conjugación de las endotelinas, fundamentalmente la ET-1 y ET-3, a sus receptores pueden explicar la prolongada duración de los efectos vasoconstrictores de estos péptidos. El acoplamiento de los receptores de endotelinas a las proteínas G y la continua externalización del receptor de endotelina, explicarían la estabilidad del complejo ligando-receptor (Yanagisawa y col., 1988; Wu-Wong, 1998).

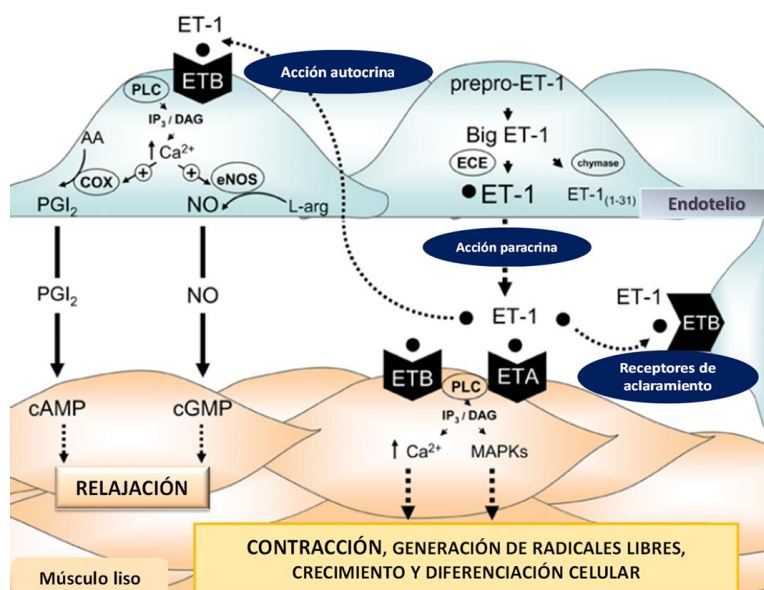


Figura 1.8 Síntesis, liberación y mecanismo de acción de la endotelina-1 (ET-1). La síntesis de la ET-1 es controlada vía regulación de la actividad ECE. La ET-1 actúa sobre receptores musculares ET_A y ET_B para producir efectos vasoconstrictores, proinflamatorios, prooxidantes y mitogénicos. La ET-1 también actúa de manera autocrina, en los receptores ET_B de la célula endotelial, estimulando la liberación de agentes vasodilatadores, tales como óxido nítrico (NO) y prostaglandina I₂ (PGI₂). Los receptores ET_B presentes en el epitelio del riñón y el pulmón además, eliminan ET-1 de la circulación, funcionando así, como receptores de aclaramiento. AA: ácido araquidónico; eNOS: sintasa de NO endotelial (Adaptación de Tostes y col., 2008).

Los receptores heptahelicoidales son monómeros funcionales, los cuales, pueden interactuar con otros receptores para formar una nueva proteína, tal y como ha sido descrito para el receptor ET_B, el cual, heterodimeriza con el receptor de dopamina D₃ en cultivos de células tubulares renales (Yu y col., 2009). Asimismo, se ha sugerido la posibilidad que la ET-1 sea un ligando bivalente, capaz de estimular ambos subtipos de receptor de endotelina vía conjugación con diferentes zonas de la molécula de la ET-1 (Hirada y col., 2002).

1.8.4. Receptor dual endotelina-angiotensina (DEAR)

El receptor DEAR es un receptor polipeptídico, el cual, a diferencia de los receptores de endotelina o angiotensina, posee únicamente una región transmembrana

(Ruiz-Opazo y col., 1998). Dicho receptor posee zonas de conjugación específicas para ANG II y ET-1, así como, la capacidad de producir la movilización de Ca^{2+} y ha sido identificado en el cerebro y el corazón, lo cual, sugiere su participación en el control cardiovascular y en patologías como la hipertensión (Kaneko y col., 2005). La interacción de la ET-1 y la ANG II es sugerida sobre la base que la ANG II puede originar la liberación de la ET-1 y ambas modificar la función de la oxidasa NADPH (Laplante y Champlain, 2006). Sin embargo, la farmacología del receptor DEAR no ha sido desarrollada por lo que cabe preguntarse si dicho receptor es una diana farmacológica de los agonistas endógenos de las endotelinas.

1.8.5. Otros receptores de endotelinas

El GPR37 es un gen localizado en el cromosoma 7 que codifica un receptor peptídico acoplado a proteínas G, el cual, fue clonado en la corteza frontal cerebral del hombre (Marazziti y col., 1997). Dicho receptor es conocido como receptor 1 proteico similar al receptor ET_B debido a su alto grado de homología con el receptor ET_B del hombre y parece actuar como un sustrato para Parkin, un polipéptido con analogía a la ligasa de la proteína ubiquitina, ahora denominada como receptor similar a endotelina asociado a Parkin (Imai y col., 2001a,b).

Finalmente se ha demostrado que la ET-1 puede interactuar con otras proteínas. No obstante, actualmente existe una escasa información sobre los receptores de las endotelinas. Futuras investigaciones en este campo deberán ir encaminadas a la identificación de agonistas selectivos del receptor ET_A , así como, al estudio de los mecanismos de heterodimerización de los receptores ET_A y ET_B , la identificación de otras posibles dianas biológicas para la ET-1 (Bkaily y col., 2008; Kockskamper y col., 2008).

1.8.6. Acciones fisiológicas y fisiopatológicas de las endotelinas

Los receptores de endotelinas están presentes en una amplia variedad de Sistemas Orgánicos, como el Sistema Cardiovascular (Russell y Molenaar, 2000; Bohm y Pernow, 2007), Renal (Granger y col., 2006), Nervioso Central (Schinelli, 2006) y Periférico (Mortensen, 1999), Gastrointestinal (Huang, 2005), Endocrino (Meiden y

Levy, 2007) y Génitourinario (Cameron y col., 1995; Ukai y col., 2008). La amplia distribución de los receptores de endotelina confiere a la ET-1 un papel clave en el desarrollo de patologías como la hipertensión (Feldstein y Romero, 2007), la insuficiencia cardíaca congestiva (Moe y col., 2003), el cáncer (Grimshaw, 2007), la diabetes (Kalani, 2008), el glaucoma (Chauhan, 2008), el vasospasmo cerebral (Armstead, 2004), la inflamación (Angerio, 2006) y la disfunción sexual (Tostes y col., 2008). Cabe destacar la acción que desempeñan las endotelinas a nivel de los Sistemas Cardiovascular y Renal. Así, la ET-1 no solo es un potente vasoconstrictor, sino que además ejerce efectos proinflamatorios, estimula la producción de factores de crecimiento, induce la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS), activa factores nucleares (factor nuclear κB) y estimula la expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales, lo cual, potencia la migración de los monocitos, activa factores de transcripción responsables del incremento coordinado en la expresión de muchas citoquinas, como la interleucina-6 (IL-6) y enzimas, como la iNOS, la COX y la oxidasa NADPH (Schiffrin y Touyz, 1998; Schiffrin, 2005). Asimismo, la ET-1 potencia la acción de otros vasoconstrictores, tales como la ANG II, la fenilefrina (FE) y la 5-HT (Schiffrin y Touyz, 1998; Schiffrin, 2005).

La regulación de la contracción cardíaca por la ET-1 es dependiente de los niveles del péptido alcanzados en la proximidad de los miocitos, así como de la modulación de otros factores vasoactivos o miocárdicos liberados desde los nervios y desde el endotelio vascular (Brunner y col., 2006). El incremento en la contractilidad miocárdica está asociado con la activación de la PLC, la PKC, el intercambiador Na^+/H^+ y la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico (Brunner y col., 2006).

En el riñón, la ET-1 ejerce una amplia variedad de acciones biológicas, tales como vasoconstricción cortical y medular, contracción de células mesangiales, estimulación de la producción de la matriz extracelular e inhibición de la reabsorción de Na^+ y agua a lo largo del conducto colector, efectos que son mediados de manera autocrina/paracrina. Los receptores ET_B , los cuales, representan la población mayoritaria de receptores de endotelinas en la corteza y en la médula, median la natriuresis por diferentes mecanismos, tales como que receptores ET_B del túbulo renal inhiben la reabsorción del Na^+ en la rama ascendente del túbulo renal y en el conducto colector, mientras que receptores ET_B medulares incrementan la excreción de sal y agua bajo condiciones de alto consumo de sal a través de la vasodilatación en la médula renal (Vassileva y col., 2003; Kohan, 2006).

Cabe destacar el papel de la ET-1 como mediador fisiopatológico como consecuencia de su potente acción vasoconstrictora, proinflamatoria y favorecedora de la liberación de factores de crecimiento celular (Schiffrin, 2005; Moreau y Schiffrin, 2003). De hecho, la elevación de los niveles plasmáticos de ET-1 es característica en la hipertensión y en la disfuncionalidad en el aclaramiento renal, razón por la cual, la vasoconstricción inducida por la ET-1 se encuentra incrementada en pacientes hipertensos (Haynes y col., 1994). En individuos sanos, bajas concentraciones de ET-1 causan vasodilatación mientras que altas dosis producen vasoconstricción, sin embargo, en pacientes con hipertensión esencial, la ET-1 causa vasoconstricción a bajas concentraciones (Kiowski y col., 1991). Junto con su potente acción vasoconstrictora, la ET-1, vía activación de los receptores ET_A y ET_B, estimula la producción de aniones superóxido a través de mecanismos dependientes e independientes de la oxidasa NADPH (Pollock y Pollock, 2005). Asimismo, es característica la sobreexpresión de pre-proET-1 en el remodelado estructural y la disfunción endotelial de las arterias de resistencia (Amiri y col., 2004). Debido al papel fisiopatológico de la ET-1 en la hipertensión esencial, antagonistas de los receptores ET_A y ET_B como el bosentán están indicados por su potente acción vasodilatadora (Tostes y col., 2008).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La incontinencia urinaria es una patología muy frecuente, que afecta a todos los grupos de población, edad y sexo, con un extraordinario impacto negativo sobre la calidad de la vida de las personas que lo padecen, como consecuencia de la relación existente entre incontinencia, ansiedad y depresión. En los Estados Unidos en el año 2000, el 55% de mujeres y el 34% de hombres mayores de 60 años y un 42% de mujeres y un 5% de hombres menores de 60 años padecían diferentes grados de incontinencia urinaria con tratamientos de elevado coste económico (presupuesto anual de 19 billones de dólares) (Hu y col., 2004). En nuestro país, el gasto en absorbentes en 2001 fue de 197 millones de euros, que representa un 3.2% del importe total de la prestación farmacéutica del Sistema Nacional de Salud.

Las incontinencias urinarias de estrés Tipo III se producen por disfuncionalidad del mecanismo esfintérico intrínseco que origina un cuello de vejiga urinaria abierto permanentemente (McGuire y Woodside, 1981). Dicha patología afecta esencialmente a la población femenina constituyendo la forma más grave de incontinencia urinaria, la de mayor frecuencia de presentación en postoperatorios de intervenciones quirúrgicas retropúbicas (cirugías ginecológicas y prostáticas) y con terapias farmacológicas de escasa eficacia en las que se utilizan esencialmente agonistas de los receptores adrenérgicos α_1 e inhibidores de la recaptación de 5-HT (como la duloxetina) para producir contracción de la base de la vejiga urinaria.

La existencia de un cuello abierto está directamente relacionado con la presencia de incontinencia urinaria producida por deficiencia esfintérica intrínseca (English y col., 1999). El conocimiento de la naturaleza de los transmisores y/o moduladores, así como de los mecanismos involucrados en la tensión del músculo liso del cuello de la vejiga urinaria es esencial para una correcta terapia en los cuadros de incontinencia urinaria. El esfínter interno está constituido por la musculatura lisa del cuello de la vejiga urinaria y la uretra proximal, formando ambas estructuras la región de salida de orina de la vejiga, unidad funcional cuya actividad está regulada por un sistema localizado en el cerebro (sustancia gris periacueductal y centro pontino de la micción) y en la médula espinal (inervación adrenérgica y colinérgica a través del nervio hipogástrico y pélvico procedentes de los segmentos medulares toracolumbares T11-L2 y sacros S2-S4, respectivamente). Asimismo, existe una regulación somática del esfínter estriado externo a cargo del nervio pudendo cuyo origen tiene lugar en el núcleo de Onuf, por lo que lesiones a nivel toracolumbar y/o lumbosacro originan la

alteración funcional del mecanismo esfintérico intrínseco (Haab y col., 1996; De Groat, 2006). Junto con la regulación nerviosa central, diferentes mediadores inhibidores no adrenérgicos no colinérgicos, como el NO, el VIP y el ATP han sido propuestos como responsables de la regulación ejercida por el SNA sobre la tensión de la musculatura lisa del cuello vesical (Hills y col., 1984; Andersson y Wein, 2004). De hecho, el NO, cuya liberación desde los nervios es modulada por receptores adrenérgicos α_2 y canales Kv de localización presináptica, está involucrado en la neurotransmisión inhibitoria NANC del cuello vesical (Hernández y col., 2007, 2008). Asimismo, el ATP, la 5-HT y péptidos como el VIP y el PACAP, están implicados en la relajación de dicha estructura. Así, el ATP produce relajación del cuello de la vejiga vía activación de receptores purinérgicos P2Y₁ y A_{2A} después de la hidrólisis del ATP a ADP y adenosina, respectivamente (Hernández y col., 2009), mientras que la 5-HT produce relajación a través de receptores musculares 5-HT₇ acoplados a la vía de la PKA (Recio y col., 2009). El PACAP y el VIP producen relajación del cuello vesical a través de receptores musculares del subtipo VPAC₂ acoplados a la vía de la PKA, mientras que receptores PAC₁ localizados en aferentes primarias sensibles a la capsaicina y acoplados a la liberación de NO y receptores VPAC inhibitorios situados en terminaciones nerviosas motoras median las relajaciones inducidas por el PACAP 38 y el VIP, respectivamente (Hernández y col., 2006a,b). Junto con los mediadores anteriormente mencionados, nuestro laboratorio ha demostrado, la existencia de un componente nervioso relajante independiente de NO de naturaleza desconocida, el cual, es responsable de más del 50% de la neurotransmisión inhibitoria del cuello de la vejiga urinaria (Hernández y col., 2008).

La rica presencia de receptores de endotelinas en la próstata del hombre (Kobayashi y col., 1994) y el hecho que la expresión y la actividad de dichos receptores sea modificada en diversas situaciones fisiopatológicas, tales como, la obstrucción uretral (Khan y col., 1999) y el envejecimiento (Wada y col., 2000), sugieren que tanto receptores de endotelinas como los mecanismos subyacentes acoplados puedan ser dianas terapéuticas en la obstrucción uretral asociada con la HBP y en la incontinencia urinaria (Mumtaz y col., 2001; Andersson, 2007; Ukai y col., 2008). Sin embargo, existe una escasa información referida a las vías de señalización involucradas en la contracción inducida por la ET-1, a la posible acción moduladora de las endotelinas sobre la transmisión nerviosa, así como a la existencia de receptores de endotelina ET_B produciendo relajación del cuello vesical. Por tanto, el presente estudio tiene como

objetivo general investigar la acción directa inducida por la ET-1 sobre la tensión de la musculatura lisa del cuello de la vejiga urinaria, así como, su posible papel modulador sobre la transmisión excitadora y/o inhibidora de dicha estructura, con la finalidad de aportar terapias farmacológicas efectivas en la incontinencia urinaria de estrés tipo III producida por deficiencia esfintérica intrínseca. Para ello y mediante diferentes abordajes experimentales (inmunohistoquímica, *Western Blotting* y registro de fuerza isométrica), se estudiará:

1º La presencia de receptores de endotelina funcionalmente activos involucrados en la contracción del cuello de la vejiga del cerdo. Para ello se investigará la distribución de fibras nerviosas con elementos inmunoreactivos a la ET_A, así como la expresión de dichos receptores mediante estudios de *Western blotting*. Además, se llevarán a cabo estudios funcionales referidos a la contracción ejercida por las diferentes isoformas de endotelinas (ET-1, ET-2 y ET-3) sobre el tono basal de las preparaciones, la señal de transducción acoplada responsable de dicho efecto (caracterización de los receptores funcionalmente activos, papel del Ca²⁺ extracelular e intracelular y mecanismos de sensibilización al Ca²⁺) y la modulación ejercida por la ET-1 sobre la contracción inducida por la NA y por los receptores ET_A sobre la neurotransmisión NANC inhibidora dependiente e independiente de NO.

2º La existencia de receptores de endotelinas funcionalmente activos involucrados en la relajación del cuello vesical. En el que se estudiará la distribución de fibras nerviosas con elementos inmunopositivos a ET_B y la expresión de dichos receptores mediante estudios de *Western blotting*. Asimismo, en preparaciones precontraídas con fenilefrina se investigará la relajación inducida por los agonistas selectivos de los receptores de endotelinas, los mecanismos involucrados en dicha respuesta (caracterización farmacológica de los receptores funcionalmente activos, papel de las vías del NO/GMPc y COX, ATPasa de la bomba Na⁺-K⁺ y canales de K⁺) y la implicación de los receptores ET_B en la neurotransmisión NANC inhibidora del cuello vesical.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. *Material biológico*

Se han utilizado vejigas urinarias de cerdos adultos sanos de ambos sexos, sin alteraciones en ninguno de los componentes del Tracto Urinario, seleccionadas en el matadero *Industrias Cárnicas Vaquero* de Madrid. Las vejigas fueron obtenidas inmediatamente después del sacrificio de los animales siendo introducidas en una solución fisiológica salina (SSF) a 4° C y transportadas inmediatamente a nuestro laboratorio.

3.1.2. *Material de laboratorio*

3.1.2.1. *Instrumentación general*

El aparataje utilizado para llevar a cabo las preparaciones de soluciones y medios fisiológicos son:

- . Balanza de precisión *Sartorius*
- . Agitador magnético *Vortek*.
- . pHmetro *Crison*
- . Sistema de filtración Mili-Q (*Millipore™*)
- . Termostato de inmersión *Thermomix 1420*.

3.1.2.2. *Equipamiento para el registro de la tensión isométrica de las preparaciones de músculo liso*

En nuestro estudio se han utilizado:

- . Microscopio *Leica Diaplan* (Alemania).
- . Fuente de luz fría *Leica* (Alemania).

- . Sistema multimiógrafo 820MS de 4 canales para registro de tensión isométrica (DMT, Dinamarca).
- . Polígrafo *Grass*, modelo 79E con 6 canales intercambiables (*Grass Instrument Co.*, Estados Unidos).
- . Polígrafo *Graphtec Multicorder MC 6621* con 4 canales intercambiables (*Hugo Sachs Elektronik*, Alemania).
- . Transductores de fuerza isométrica *Grass FT03C* (*Grass Instrument Co.*, Estados Unidos)
- . Sistema de adquisición y análisis de datos *PowerLab 8/30*. (DMT, Dinamarca)
- . Baños de órganos aislados de 5 y 6 ml de capacidad con la temperatura regulada a 37°C.
- . Estimulador eléctrico *Cibertec CS 20* (Barcelona, España).

3.1.2.3. Equipamiento para la identificación de proteínas por Western Blotting

Para la realización de estos estudios se utilizó:

- . Placas de 96 pocillos para la lectura de absorbancia.
- . Lector de absorbancia colorimétrica.
- . Centrífuga.
- . Geles de poliacrilamida discontinuo (7.5 y 12%) (*Amersham, GE Healthcare*, Reino Unido).
- . Cubetas y generador de campo para la separación proteica por electroforesis (*Invitrogen*, Reino Unido).
- . Cubetas, sandwicheras perforadas y generador de campo ortogonal, para la transferencia proteica desde el gel a una membrana (*Bio-Rad*, Reino Unido)
- . Agitadores con distintas velocidades para las cubetas de *Western Blotting*.

3.1.3. Reactivos

Se utilizaron los siguientes compuestos y reactivos:

- . [Ala32]H2B(29-35), péptido inhibidor de la quinasa dependiente de GMPc (*Tocris*, Reino Unido).
- . 4-aminopiridina (4-AP), bloqueante de los canales K_v (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Apamina, bloqueante de los canales SK_{Ca} (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Atropina, antagonista de los receptores muscarínicos (*Sigma*, Estados Unidos).
- . N-[(cis-2,6-Dimetil-1-piperidinil)carbonil]-4-metil-L-leucil-1-(metoxicarboxil)-D-triptofil-D-norleucina (BQ788) (*Tocris*, Reino Unido).
- . 5-(dimetilamino)-N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)-1-naftalenesulfonamida (BMS182874) (*Tocris*, Reino Unido).
- . N-acetyl-[Ala(11,15)]-endotelina-1 fragmento 6-21-Ac-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp (BQ3020), agonista de los receptores de endotelina ET_B (*Tocris*, Reino Unido).
- . ω-conotoxina GVIA (ω-CgTX), bloqueante de los canales de Ca²⁺ neuronales sensibles a voltaje (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Endotelina-1 (ET-1), agonista de los receptores de endotelinas (*Tocris*, Reino Unido).
- . Endotelina-2 (ET-2), agonista de los receptores de endotelinas (*Tocris*, Reino Unido).
- . Endotelina-3 (ET-3), agonista de los receptores de endotelinas (*Tocris*, Reino Unido).
- . Fenilefrina (FE), agonista de los receptores adrenérgicos α₁ (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Forscolina, activador de la adenilato ciclasa (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Glibenclamida, bloqueante de los canales K_{ATP} (*Tocris*, Reino Unido).
- . Guanetidina, bloqueante de la neurotransmisión noradrenérgica (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Iberiotoxina (IbTX), bloqueante de los canales BK_{Ca} (*Tocris*, Reino Unido).

- . Indometacina, inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa (*Sigma*, Estados Unidos).
- . 9R,10S,12S)-2,3,9,10,11,12-hexahidro-10-hidroxi-9-metil-1-oxo-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocina-10-ácido carboxílico (KT5720), inhibidor de la PKA (*Tocris*, Reino Unido).
- . N^G-nitro-L-Arginina (L-NOARG), inhibidor de la sintasa del NO (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Noradrenalina (NA), agonista de los receptores adrenérgicos α y β adrenérgicos (*Sigma*, Estados Unidos).
- . 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ), bloqueante selectivo de guanilato ciclasa soluble (*Tocris*, Reino Unido).
- . Fragmento (6-22) amida de la PKA, inhibidor de la PKA (*Tocris*, Reino Unido).
- . 1-[2-(4-metoxifenil)-2-[3-(4-metoxifenil)propoxi]etil-1H-imidazol (SKF96365), inhibidor de los canales de Ca²⁺ independientes de voltaje (*Tocris*, Reino Unido).
- . [(2-clorofenil)difenilmetil]-1H-pirazol (TRAM 34), inhibidor de los canales IK_{Ca} (*Tocris*, Reino Unido).
- . Tetrodotoxina (TTX), bloqueante de los canales de Na⁺ neuronales sensibles a voltaje (*Sigma*, Estados Unidos).
- . Trans-4-[(1R)-1-Aminoetil]-N-4-piridinilciclohexanecarboxamida (Y27 632), bloqueante de la Rho/Rho cinasa (*Tocris*, Reino Unido).

La indometacina y la nifedipina fueron disueltas en etanol (96 %). BQ3020, BQ788, BMS182874, [Ala32]H2B(29-35), forskolina, glibenclamida, KT5720, ODQ, el inhibidor de la PKA y TRAM 34 fueron disueltos en dimetil sulfóxido. Las otras sustancias fueron disueltas en agua bidestilada. Los solventes, a la concentración final usada en el baño, no tuvieron efecto sobre la contractilidad de las preparaciones del cuello vesical.

3.1.4. Soluciones

Todas las soluciones se prepararon con sales inorgánicas *Merck* de grado analítico, disueltas en agua desionizada de alta pureza (*Mili-Q*).

3.1.4.1. Soluciones fisiológicas utilizadas en el estudio funcional

. Solución salina fisiológica (SSF)

La composición de esta disolución en mM es:

· Cloruro sódico (NaCl)	119.00
· Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)	25.00
· Cloruro potásico (KCl)	4.60
· Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	1.40
· Cloruro magnésico (MgCl ₂)	1.20
· Cloruro cálcico (CaCl ₂)	1.50
· Ácido etilén diamino tetraacético (EDTA)	0.027
· Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	11.00

Dicha solución fue preparada a diario diluyendo los reactivos en agua destilada y en continua agitación. Previamente a la adición de CaCl₂ se oxigenó la solución durante 20 minutos con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) con el fin de conseguir un pH óptimo de 7.4. La adición de EDTA tiene como objetivo retrasar la oxidación e impedir el crecimiento bacteriano en la solución.

. Solución salina fisiológica rica en potasio (SSFK)

En esta solución se sustituyeron cantidades equimolares de NaCl por KCl con respecto a la solución SSF. La SSFK, al igual que en el caso de la SSF, se preparó a diario, con agua desionizada, en agitación y con oxigenación con carbógeno previa a la adición de CaCl₂ con las siguientes sales (en mM):

· Cloruro potásico (KCl)	119.00
· Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)	25.00

MATERIAL Y MÉTODOS

· Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	11.00
· Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	1.40
· Cloruro magnésico (MgCl ₂)	1.20
· Cloruro cálcico (CaCl ₂)	1.50
· Ácido etilén diamino tetraacético (EDTA)	0.027

3.1.4.2. Soluciones usadas en el estudio inmunohistoquímico

Las soluciones utilizadas en el estudio inmunohistoquímico fueron la solución ABC, DAB/H₂O₂ y DAB-Ni/ H₂O₂.

La solución de 10 ml de ABC contiene:

- 9650 µl de tampón fosfato 0.1 M pH 7.4.
- 250 µl de Tritón X-100 al 20 % en agua destilada.
- 50 µl de solución "A" de VECTASTAIN elite Kit.
- 50 µl de solución "B" de VECTASTAIN elite Kit.

La solución de 40 ml de DAB/H₂O₂ contiene:

- 40 ml de tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4.
- 20 mg de DAB.
- 40 µl de solución al 10% de H₂O₂ en agua destilada.

En el caso de la solución DAB-Ni se añaden a la solución anterior 600 µl de sulfato de níquel al 1%.

3.1.4.3. Tampones utilizados en el Western Blotting

· *Tampón de fosfato sódico (pH 7)*

· NaCl	100 nM
· Pirofosfato sódico	10 nM
· Fluoruro sódico	50 nM
· Ortovanadato sódico	
· Ácido etilendiaminotetraacético	1 nM
· Etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)	5 nM
· N,N,N',N'-ácido tetraacético	

· Ácido okadaico	1 μ M
· Aprotinina	30 U/ml

Todos estas sustancias son de *Sigma* (Estados Unidos).

· Cloruro sódico en tampón fosfato (PBS) (pH 7.4)

· Tween 20 0.1%

(*Bio-Rad*, Estados Unidos).

3.2. MÉTODOS

En nuestro laboratorio, las vejigas fueron situadas en placas con SSF procediéndose a la eliminación de grasa y tejido conectivo circundante y a la disección de tiras longitudinales pertenecientes al cuello de la vejiga urinaria, el cual, está localizado por debajo del triángulo (a 8-9 mm de los orificios uretrales) y a 4-5 mm por encima de la uretra proximal, la cual, es la región uretral adyacente al cuello vesical delimitada por la musculatura estriada del esfínter uretral externo (Hernández y col. 2006a).

3.2.1. Western blotting

El urotelio y el músculo del cuello vesical fueron homogeneizados en una solución tampón de fosfato sódico (10 mM), pH 7, conteniendo NaCl (100 mM), pirofosfato sódico (10 mM), fluoruro sódico (50 mM), ortovanadato sódico (1 mM), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 5 mM), etilenglicol-bis(β -aminoetiléter) (5 mM), N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA, 5 mM), ácido okadaico (1 μ M) y aprotinina (30 U/ml), todos ellos de *Sigma* (Estados Unidos). El homogeneizado se centrifugó a 12000xg durante 5 min, tras lo cual, el sobrenadante fue recogido y utilizado para la determinación de proteínas (*Kit BCA, Pierce*, Estados Unidos). Las muestras (30 μ g de proteína) se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida discontinuo (7.5 y 12%). Las bandas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (*Amersham, GE Healthcare*, Reino Unido). La membrana se incubó en una disolución de bloqueo (leche en polvo al 10% en PBS conteniendo 0.1% Tween 20 (*Bio-Rad, Hercules*, Estados Unidos) (PBST) durante 3 h, y posteriormente fue incubada con

un anticuerpo anti-receptor ET_A (*Thermo Scientific*, Estados Unidos) a una dilución 1/200 o un anticuerpo anti-receptor ET_B (*Affinity BioReagents*, Estados Unidos) a una dilución 1/35, ambos obtenidos de conejo, a 4° C, durante 18 h. La membrana fue luego lavada durante 10 min con leche en polvo al 10% en PBST e incubada con un anticuerpo secundario anticonejo marcado con peroxidasa (dilución 1/5000, *Amersham, GE Healthcare*, Reino Unido), durante 1 h a temperatura ambiente. La amplificación de la quimioluminiscencia (ECL) fue realizada con un *kit* de detección *Western blot ECL* (*Amersham, GE Healthcare*, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del mismo. La membrana fue expuesta a *Hyperfilm ECL* (*Amersham, GE Healthcare*, Reino Unido), durante 10 min. La determinación del peso molecular de las bandas detectadas se realizó mediante un juego estándar de patrones *SDS-PAGE* (*Amersham, GE Healthcare*, Reino Unido).

3.2.2. Inmunohistoquímica

Las preparaciones de cuello vesical fueron fijadas en paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 (PB), durante 24 a 48 h a 4° C, y a continuación dejadas en PB con sacarosa al 30 %, para crioprotección. El tejido fue congelado en CO₂ y almacenado a -80° C hasta su corte. Secciones transversales de 10 µm de espesor fueron obtenidas por medio de un criostato. Dichas muestras fueron procesadas para inmunohistoquímica de acuerdo al método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC). Las muestras fueron preincubadas con suero normal de cabra al 10% (NGS) en PB conteniendo 0.3 % de Triton-X-100 durante 2-3 h, y entonces incubadas con anticuerpos anti-ET_A o anti-ET_B de conejo (*Alomone labs Ltd*, a una dilución de 1:100) en PB conteniendo 0.3 % Triton-X-100 con 2 % de NGS, a 4° C durante 48 h. Las secciones fueron incubadas con un anticuerpo secundario anticonejo de cabra biotinilado (*Chemicon International Inc*, a una dilución 1:400), durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas luego con un complejo avidina-biotina (ABC, *Vector*), a una dilución 1:100, durante 90 min a temperatura ambiente. El inmunocomplejo fue visualizado con PB conteniendo 3,3' diaminobencidina (DAB) al 0.05 % y H₂O₂ al 0.001 %. No se detectó inmunorreactividad en secciones procesadas sin el anticuerpo primario.

3.2.3. Estudios funcionales

El urotelio y el suburotelio fueron eliminados por microdissección bajo microscopio y la ausencia de dichas capas fue confirmada por estudios histológicos. Tiras longitudinales de 4-6 mm de longitud y 2-3 mm de anchura fueron suspendidas horizontalmente, con un extremo conectado a un transductor de fuerza isométrica (Grass FT 03C) y el otro fijado a un gancho conectado a un tornillo micrométrico, en baños de órganos aislados de 5 ml de capacidad conteniendo SSF a 37° C gaseada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) obteniendo un pH final en el baño de 7.4. La señal eléctrica fue continuamente registrada en un polígrafo (*DMT 820MS* y *Graphtec Multicorder MC 6621*). Las preparaciones fueron normalizadas bajo una tensión pasiva de 2 g durante un periodo de estabilización de 60 min.

3.2.3.1. Procedimiento experimental

La capacidad contráctil de las preparaciones fue determinada por su exposición a una SSF enriquecida en K⁺ (124 mM) (SSF-K).

La contracción inducida por los agonistas de los receptores de endotelinas o por la NA fue investigada sobre la tensión basal de las preparaciones, mientras que la relajación inducida tanto por el agonista selectivo de los receptores ET_B BQ3020 como en respuesta a la estimulación eléctrica transmural (EET) fue realizada sobre el tono sostenido producido por una dosis submaximal de fenilefrina (FE, 1 μM). Debido al desarrollo de una potente actividad taquifiláctica, las curvas concentración-respuesta (CR) de los agonistas de endotelina no fueron reproducibles en dos estimulaciones consecutivas, razón, por la cual, preparaciones del mismo animal fueron utilizadas en paralelo, una de ellas como control y la otra incubada con el tratamiento específico durante 30 min.

Para investigar el papel del Ca²⁺ extracelular, las preparaciones fueron lavadas tres veces y mantenidas en una SSF libre de Ca²⁺ conteniendo 0.1 mM de EGTA, y entonces la solución fue cambiada a una SSF libre de Ca²⁺ sin EGTA (Recio y col., 2008; Sánchez y col., 2010), y bajo dichas condiciones se realizaron las curvas CR de ET-1 en ausencia y presencia de Ca²⁺ extracelular.

En los experimentos de EET, las muestras fueron incubadas con guanetidina (10 μM) y atropina (0.1 μM), bloqueantes de la neurotransmisión noradrenérgica y los

receptores muscarínicos, respectivamente, durante 1 h, reemplazando la solución cada 20 min, estando presente dicho tratamiento durante el desarrollo del experimento. En tiras precontraídas con FE (1 μ M), la EET fue llevada a cabo mediante pulsos rectangulares (de un 1 ms de duración, un rango de frecuencias entre 0.5 y 16 Hz, trenes de 20 s, con la corriente de salida constante ajustada a 75 mA), con intervalos de 4 min mediante un estimulador *Cibertec CS20* (España). Las relajaciones inducidas por la EET son de carácter neurogénico como consecuencia de la abolición producida por la TTX, bloqueante de los canales de Na⁺ neuronales dependientes de voltaje (Hernández y col., 2006a, 2008).

Una primera curva de relajación inducida por el BQ3020 o por la EET fue realizada. A continuación, la solución del baño fue cambiada cada 15 min durante un período total de 90 min. Posteriormente se procedió a la incubación con los tratamientos específicos (antagonistas de los receptores de endotelinas, inhibidores de la ciclooxigenasa, guanilato ciclasa soluble, PKA, PKG y canales de K⁺) durante un periodo de 30 min y a continuación se realizó la segunda curva de relajación de BQ3020 y de EET.

A)



B)



Figura 3.1 Miógrafo *DMT820* para el registro de la tensión isométrica (A) y estimulador eléctrico *Cibertec CS20* (B).

3.2.3.2. Cálculo y estadística

La contracción inducida por los agonistas de endotelinas o por la NA es expresada como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK (124 mM). La relajación inducida por EET o BQ3020 son expresadas como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μ M). La sensibilidad de los agonistas es expresada en valores de pD₂, el cual, es el logaritmo negativo de la EC₅₀ (pD₂= -logEC₅₀), siendo la EC₅₀ la concentración de agonista que produce el 50 % de la

respuesta máxima (E_{max}). Los valores de pD_2 fueron calculados por análisis de regresión no lineal computerizada (*GraphPad Prism*, Estados Unidos). Los resultados se expresan como media \pm e.s. de la media de n (número de preparaciones, 2 muestras por cada animal). Las diferencias fueron analizadas por medio de un test de la t de Student para observaciones pareadas y análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Las diferencias fueron consideradas significativas con un nivel de probabilidad de $P < 0.05$. Los valores de P son mostrados en las leyendas de las tablas y las figuras.

4. RESULTADOS

4.1. WESTERN BLOTTING E INMUNOHISTOQUÍMICA

4.1.1. Expresión de receptores ET_A y ET_B

Los estudios de *Western blot* con músculo y urotelio de cuello vesical con anticuerpo anti- ET_A , mostraron diversas bandas difusas y una banda principal de 52 kDa (Figura 4.1A), la cual, corresponde al peso molecular esperado. Asimismo, la utilización de un anticuerpo anti- ET_B , evidenciaba una banda de 52 kDa compatible con la presencia del receptor ET_B (Figura 4.2A). Estudios inmunohistoquímicos revelaron una alta densidad de fibras nerviosas conteniendo elementos inmunorreactivos a ET_A (Figuras 4.1B-4.1G) y una moderada presencia de fibras nerviosas conteniendo elementos inmunopositivos a ET_B penetrando a través de la adventicia de la pared del cuello vesical. Dicha inervación, con tamaño variable oscilando entre gruesos troncos nerviosos y finas fibras individuales ricas en varicosidades, se distribuía en la capa muscular y en el urotelio (Figuras 4.2B, 4.2C).

n

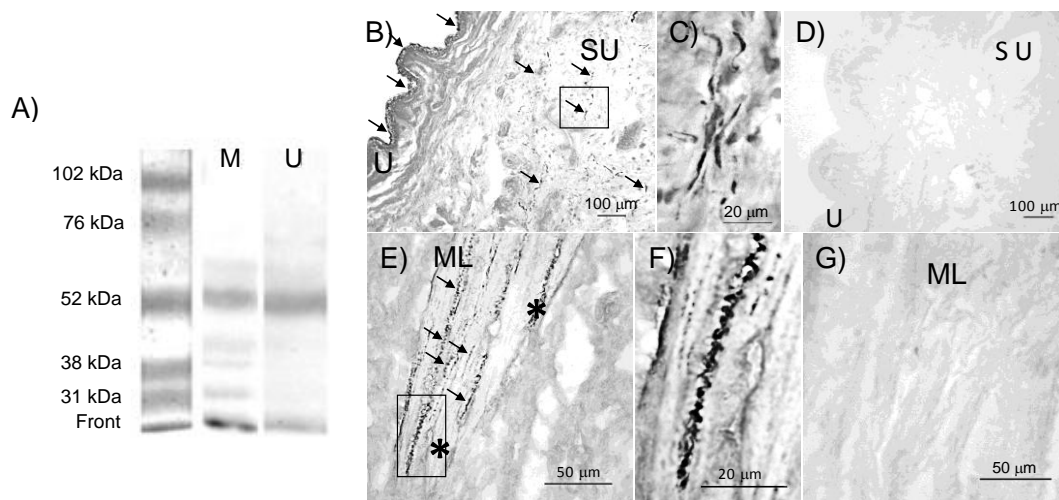


Figura 4.1 Expresión de los receptores de endotelina ET_A en el cuello de la vejiga del cerdo. (A) *Western blot* de membranas musculares (M) y uroteliales (U) incubadas con un anticuerpo anti-receptor ET_A , mostrando una banda principal a 52 kDa. (B-G) Marcaje inmunohistoquímico del cuello vesical mostrando la existencia de una alta densidad de inervación peptidérgica ET_A . Además, una moderada presencia de terminaciones inmunopositivas a ET_A son observadas en el urotelio (U) y por debajo del mismo (SU) (B, flechas). En la capa muscular (ML) (E) numerosas terminaciones inmunopositivas a ET_A de tamaño variable aparecen a lo largo de la fibra muscular (flechas). Asimismo, se visualiza una moderada presencia de troncos nerviosos inmunopositivos (asteriscos). (C, F magnificación) (D, G controles negativos).

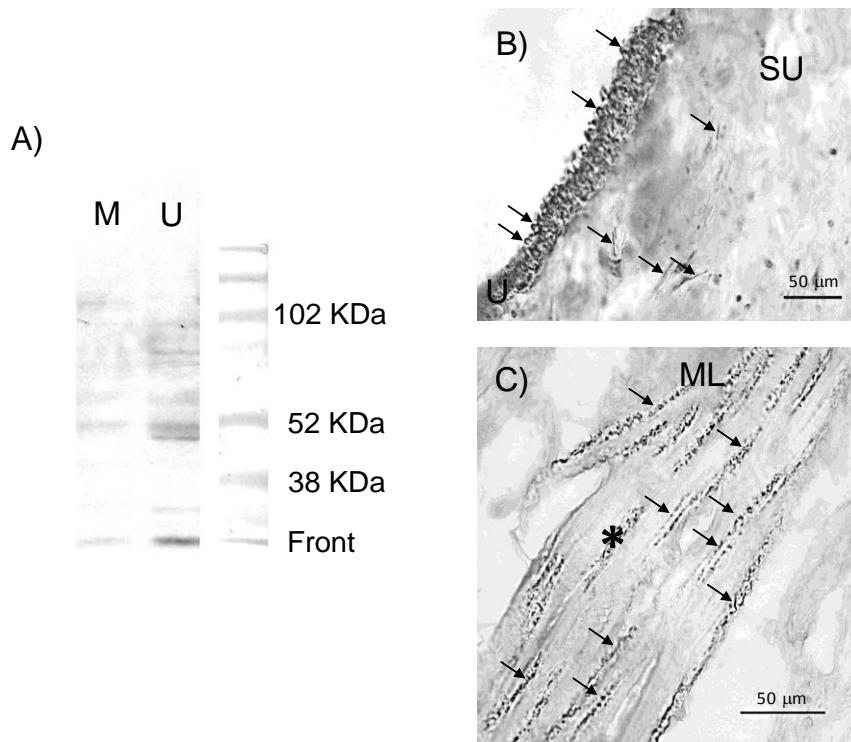


Figura 4.2 *Expresión de los receptores de endotelina ET_B en el cuello vesical.* (A) *Western blot* de membranas musculares (M) y uroteliales (U) incubadas con un anticuerpo anti-receptor ET_B, mostrando una banda principal a 52 kDa. (B, C) Marcaje inmunohistoquímico del cuello vesical mostrando la existencia de una moderada densidad de inervación peptidérgica ET_B. Las terminaciones inmunopositivas a ET_B son observadas en el urotelio y por debajo del mismo (B, flechas). En la capa muscular (C), las terminaciones inmunopositivas a ET_B de tamaño variable recorriendo la fibra muscular (C, flechas). Asimismo, un número moderado de troncos nerviosos es identificado (asterisco) (U: urotelio; SU: suburotelio; ML: capa muscular).

4.2. ESTUDIOS FUNCIONALES

Tiras desprovistas de urotelio pertenecientes al cuello de la vejiga urinaria del cerdo fueron normalizadas bajo una tensión pasiva 2.1 ± 0.2 g (n= 163 preparaciones de 95 cerdos usando 1-2 preparaciones de cada animal). En dichas condiciones una SSFK (124 mM) produjo una contracción de 2.3 ± 0.2 g (n= 163).

4.2.1. Contracción inducida por los agonistas endógenos de los receptores de las endotelinas

Sobre el tono basal de las preparaciones de cuello vesical, ET-1 y ET-2 (0.1-300 nM), agonistas de los receptores ET_A y ET_B, produjeron contracciones similares de lento inicio y larga duración (9-14 min) (Figuras 4.3A, 4.3B, Tabla 1), mientras que, sin embargo, la ET-3 indujo un pequeño incremento del tono basal únicamente a elevadas concentraciones (100 y 300 nM) (Figura 4.3B, Tabla 1). BO3020 (a una concentración de

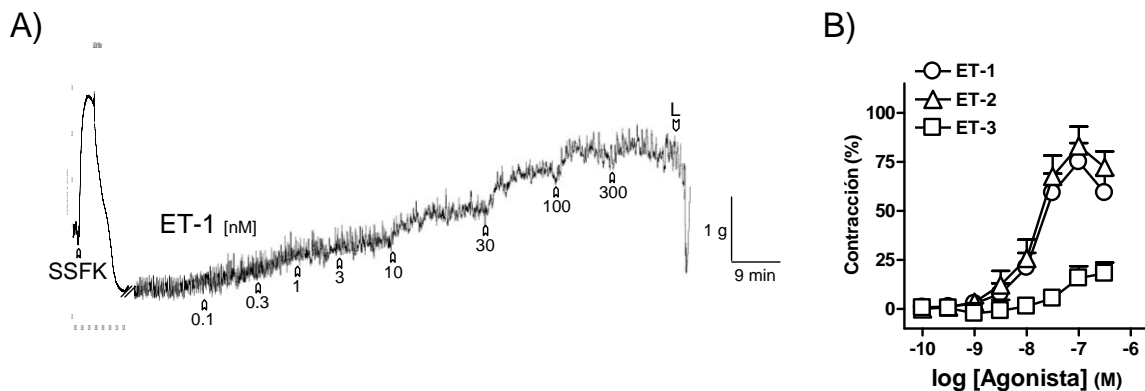


Figura 4.3 Contracción producida por las isoformas de endotelinas en el cuello de la vejiga del cerdo. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la contracción inducida por una solución enriquecida en K⁺ (124 mM) (SSFK) y endotelina-1 (ET-1, 0.1-300 nM) sobre la tensión basal de las preparaciones de cuello vesical. La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal el tiempo en minutos (min). (B) Curvas de contracción dependientes de la concentración de ET-1 (círculos vacíos), endotelina-2 (ET-2) (triángulos vacíos) y endotelina-3 (ET-3) (cuadrados vacíos). Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK (124 mM) y representan la media ± e.s.m. de 7-9 preparaciones.

RESULTADOS

Tabla 1 Contracción inducida por las isoformas de endotelina en el cuello de la vejiga urinaria del cerdo.

	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
ET-1	9	7.9±0.1	75.1±9.5
ET-2	9	7.9±0.1	83.2±9.9
ET-3	7	_____	18.2±5.5*:#

Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una solución salina fisiológica enriquecida en K⁺ (SSFK, 124 mM), y representan la media ± e.s.m. de *n* preparaciones. *:#*P*<0.05 *versus* endotelina-1 (ET-1) y endotelina-2 (ET-2), respectivamente (análisis de varianza y posterior test de Bonferroni). *E*_{max} es la contracción máxima, expresada como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK. *pD*₂ = -log EC₅₀, en donde EC₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % de la *E*_{max}.

4.2.2. Caracterización farmacológica de los receptores de endotelina involucrados en la contracción inducida por la ET-1

BMS182874 (10 nM- 1 μM) (Figura 4.4A), antagonista de los receptores de endotelina ET_A, potentemente redujo la contracción inducida por la ET-1, mientras, que sin embargo, BQ788 (1 μM) (Figura 4.4B), antagonista de los receptores ET_B no modificó dicha respuesta (Tabla 2), confirmando así, la implicación del receptor ET_A en el efecto contráctil.

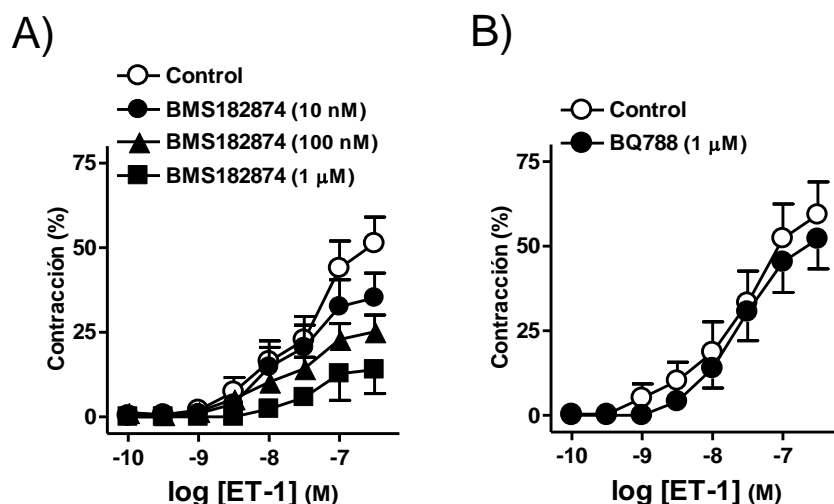


Figura 4.4 Receptores de endotelina ET_A están involucrados en la contracción inducida por la endotelina-1 (ET-1). (A, B) Curvas de contracción dependientes de la concentración de ET-1 en ausencia (círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de BMS182874 (A) y BQ788 (B), antagonistas de los receptores ET_A y ET_B , respectivamente. Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una solución salina fisiológica enriquecida en K^+ (124 mM), y representan la media \pm e.s.m. de 6-7 preparaciones.

Tabla 2 Efecto del bloqueo de los receptores de endotelina ET_A y ET_B sobre la contracción inducida por la endotelina-1 (ET-1).

		ET-1	
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>Emax</i> (%)
Control	7	8.0 \pm 0.1	71.5 \pm 8.6
BMS182874 (10 nM)	7	_____	50.0 \pm 9.5*
BMS182874 (100 nM)	7	_____	35.2 \pm 7.3*
BMS182874 (1 μ M)	7	_____	13.9 \pm 7.0*
Control	6	7.5 \pm 0.1	59.3 \pm 9.7
BQ788 (1 μ M)	6	7.6 \pm 0.1	52.1 \pm 8.8

Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una solución salina fisiológica enriquecida en K^+ (124 mM) (SSFK), y representan la media \pm e.s.m. de *n* preparaciones. * $P < 0.05$ versus control (análisis de varianza y posterior test de Bonferroni). *Emax* es la contracción máxima, expresada como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK. *pD*₂ = $-\log EC_{50}$, en donde *EC*₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % de la *Emax*.

4.2.3. Papel del Ca^{2+} extracelular e intracelular y de mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} en la contracción inducida por la ET-1

Para investigar la influencia de la entrada de Ca^{2+} extracelular y/o de la movilización de los depósitos intracelulares en la contracción de ET-1, procedimos a la exposición de las preparaciones de cuello vesical a una SSF libre de Ca^{2+} . La eliminación del Ca^{2+} del medio extracelular redujo considerablemente la respuesta de la ET-1 (la contracción de 20 nM de ET-1 fue de 45.9 ± 8.3 % y 11.3 ± 8.3 %* de la contracción inducida por una SSFK, en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular, respectivamente, * $P < 0.05$, test de la t de Student para observaciones pareadas, $n = 7$) (Figura 4.5A).

Nifedipina (1 μ M) y SKF96365 (10 μ M), inhibidores de los canales de Ca^{2+} dependientes (tipo L) e independientes de voltaje, respectivamente, redujeron poderosamente las contracciones inducidas por la ET-1 (Figura 4.5B). El pretratamiento conjunto de nifedipina y SKF96365 produjo una reducción mayor que la producida únicamente por la nifedipina (Figura 4.5B, Tabla 3). Asimismo, Y27632 (10 μ M), un inhibidor de la vía Rho/Rho cinasa, la cual, es responsable del denominado *mecanismo de sensibilización al Ca^{2+}* , también redujo la contracción de la ET-1 (Figura 4.5C, Tabla 3). Estos resultados, en conjunto, sugieren que la contracción de la ET-1 es producida esencialmente a través del influjo Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} de membrana dependientes (tipo L) e independientes de voltaje. Asimismo, la movilización de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} parecen estar involucrados en dicha respuesta.

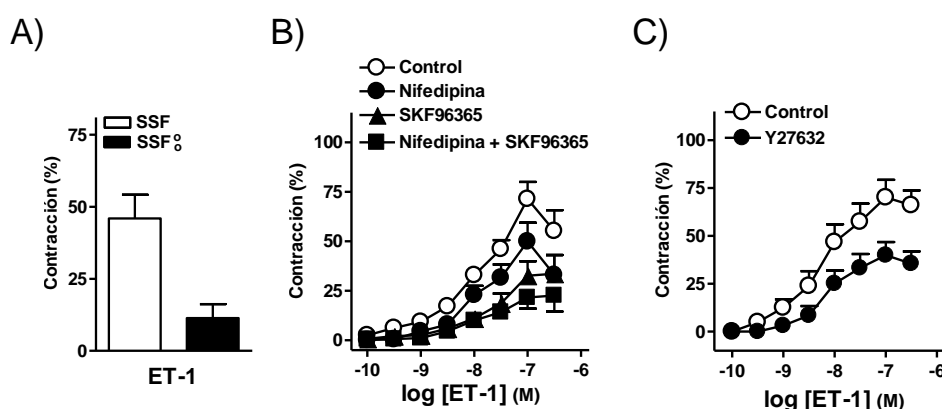


Figura 4.5 Ca^{2+} extra e intracelular y mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} están implicados en la contracción de la endotelina-1 (ET-1). (A) Histograma que muestra la contracción producida por la ET-1 (20 nM) en una solución salina fisiológica normal (SSF) (barra vacía) y en una SSF libre de Ca^{2+} (SSF^o) (barra llena). (B, C) Curvas de contracción dependientes de la concentración de ET-1 en ausencia (círculos vacíos) y presencia (símbolos llenos) de nifedipina (1 μ M) (círculos llenos), 1-[2-(4-metoxifenil)-2-[3-(4-metoxifenil)propoxi]etil-1H-imidazol (SKF96365, 10 μ M) (triángulos llenos) o nifedipina junto a SKF96365 (cuadrados llenos) (B) o de trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilciclohexanecarboxamida (Y27632, 10 μ M) (círculos llenos) (C). Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una SSF enriquecida en K^+ (124 mM), y representan la media \pm e.s.m. de 6-7 preparaciones.

Tabla 3 Efecto del bloqueo de los canales de Ca^{2+} dependientes e independientes de voltaje y de la vía Rho/Rhocinasa sobre la contracción inducida por la ET-1.

		ET-1	
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Control	7	8.0 \pm 0.1	71.5 \pm 8.6
Nifedipina (1 μ M)	7	_____	50.0 \pm 9.5*
SKF96365 (10 μ M)	7	_____	32.6 \pm 7.4* [#]
Nifedipina + SKF96365	7	_____	22.6 \pm 8.1* [#]
Control	6	8.3 \pm 0.1	70.2 \pm 9.1
Y27632 (10 μ M)	6	_____	39.9 \pm 6.9 ^δ

Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una solución salina fisiológica enriquecida en K^+ (124 mM) (SSFK), y representan la media \pm e.s.m. de *n* preparaciones. *[#]*P*<0.05 *versus* control y nifedipina, respectivamente (análisis de varianza y posterior test de Bonferroni). ^δ*P*<0.05 *versus* control (test de la *t* Student para observaciones pareadas). *E*_{max} es la contracción máxima, expresada como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK. *pD*₂ = -log *EC*₅₀, en donde *EC*₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % de la *E*_{max}.

4.2.4. Modulación de la ET-1 sobre la contracción inducida por la NA

Con objeto de investigar el posible papel modulador de la ET-1 sobre la acción inducida por el neurotransmisor simpático NA procedimos a realizar curvas de NA en ausencia y presencia de concentraciones umbrales de ET-1, las cuales, no modificaron la tensión basal de las preparaciones. La NA (0.01-10 μM) produjo una contracción dependiente de la concentración de menor sensibilidad y mayor respuesta máxima que la producida por la ET-1 (Figuras 4.6A, 4.6B, Tabla 4). La ET-1 (1 nM) produjo un

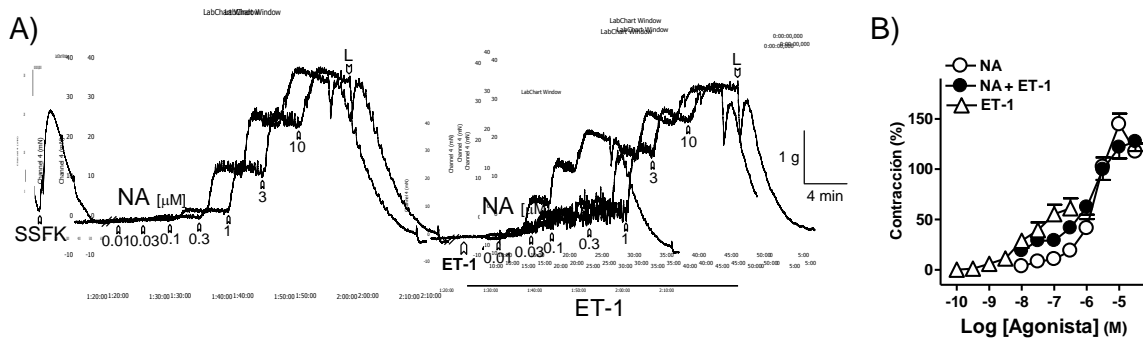


Figura 4.6 Potenciación de endotelina-1 (ET-1) sobre la contracción noradrenérgica. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la contracción inducida por una solución enriquecida en K^+ (124 mM) (SSFK) y noradrenalina (NA, 0.01-10 μM) en ausencia y presencia de concentraciones umbrales (1 nM) de ET-1 sobre la tensión basal de las preparaciones de cuello vesical. La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal el tiempo en minutos (min). (B) Curvas de contracción dependientes de la concentración de NA (círculos vacíos), ET-1 (triángulos vacíos) y NA junto con ET-1 (1 nM) (círculos llenos). Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK (124 mM) y representan la media \pm e.s.m. de 7 preparaciones.

RESULTADOS

Tabla 4 Contracción inducida por la endotelina-1 (ET-1, 0.1 nM- 0.3 μ M), noradrenalina (NA, 0.01-10 μ M) y por NA en presencia de concentraciones umbrales de ET-1.

		ET-1	
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
ET-1	7	7.8 \pm 0.1	61.1 \pm 9.8
NA	7	6.0 \pm 0.1*	144.7 \pm 10.6*
NA + ET-1 (1 nM)	7	6.5 \pm 0.1* [#]	127.3 \pm 9.3*

Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una solución salina fisiológica enriquecida en K⁺ (124 mM) (SSFK), y representan la media \pm e.s.m. de *n* preparaciones. *[#]*P*<0.05 *versus* ET-1 y NA, respectivamente (análisis de varianza y posterior test de Bonferroni). *E*_{max} es la contracción máxima, expresada como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK. *pD*₂ = -log EC₅₀, en donde EC₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % de la *E*_{max}.

4.2.5. Implicación de mecanismos neuronales en la contracción inducida por la ET-1

Con objeto de investigar la posible influencia de los nervios intramurales en la respuesta de la ET-1, procedimos al bloqueo de la transmisión nerviosa con ω -CgTX (1 μ M), un inhibidor de los canales de Ca²⁺ neuronales sensibles al voltaje, el cual, redujo sensiblemente la contracción inducida por la ET-1 (Figuras 4.7A, 4.7B, Tabla 5). Sin embargo, guanetidina (10 μ M), un bloqueante de la neurotransmisión noradrenérgica, no modificó, en modo alguno, dichas respuestas (Figura 4.7C, Tabla 5). Estos resultados indican una mediación de nervios no adrenérgicos en la contracción producida por la ET-1.

RESULTADOS

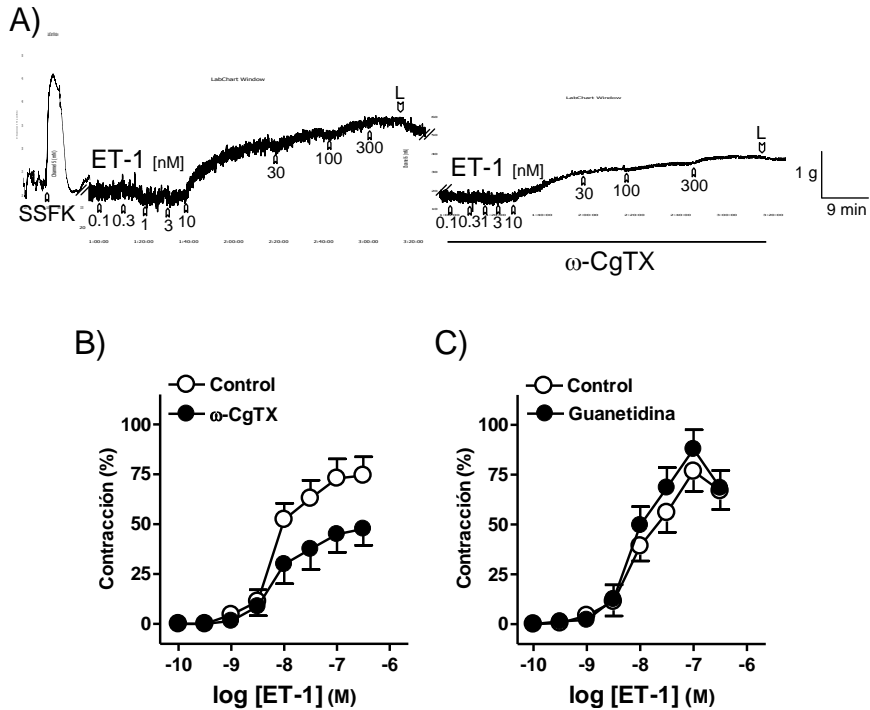


Figura 4.7 Mecanismos neuronales no adrenérgicos están involucrados en la contracción inducida por la endotelina-1 (ET-1). (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la contracción inducida por una solución enriquecida en K^+ (124 mM) (SSFK) y ET-1 (0.1-300 nM) en ausencia y presencia ω -conotoxina GVIA (ω -CgTX, 1 μ M) sobre la tensión basal de preparaciones de cuello vesical. La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal el tiempo en minutos (min). (B) Curvas de contracción dependientes de la concentración de ET-1 en ausencia (círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de ω -CgTX (1 μ M) (B) o guanetidina (10 μ M) (C). Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK (124 mM) y representan la media \pm e.s.m. de 6-7 preparaciones.

RESULTADOS

Tabla 5 Efecto del bloqueo de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje neuronales y de la transmisión noradrenérgica sobre la contracción inducida por la endotelina-1 (ET-1).

	<i>n</i>	ET-1	
		<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Control	7	8.2±0.1	74.4±9.4
ω-CgTX (1 μM)	7	_____	47.7±8.3*
Control	6	8.0±0.1	76.7±9.9
Guanetidina (10 μM)	6	8.1±0.1	87.9±9.7

Los resultados son expresados como porcentaje de la contracción inducida por una solución salina fisiológica enriquecida en K⁺ (124 mM) (SSFK), y representan la media ± e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 *versus* control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas). *E*_{max} es la contracción máxima, expresada como porcentaje de la contracción inducida por una SSFK. *pD*₂ = -log EC₅₀, en donde EC₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % de la *E*_{max}.

4.2.6. Implicación de los receptores ET_A en la neurotransmisión no adrenérgica no colinérgica (NANC) inhibidora del cuello vesical

Para el estudio de la posible influencia de los receptores ET_A sobre la neurotransmisión inhibidora NANC, las preparaciones fueron incubadas con guanetidina (10 μM) y atropina (0.1 μM), bloqueantes de la neurotransmisión noradrenérgica y los receptores muscarínicos, respectivamente, y precontraídas con FE (1 μM). En dichas condiciones, la EET (0.5-16 Hz) produjo relajaciones dependientes de la frecuencia, las cuales, fueron potenciadas por el antagonista de los receptores ET_A BMS182874 (1 μM) (Figuras 4.8A, 4.8B, Tabla 6). Sin embargo, en preparaciones en condiciones NANC tratadas con L-NOARG (100 μM), bloqueante de la sintasa de NO, BMS182874 no modificó, en modo alguno, las relajaciones producidas por la EET (Figura 4.8C, Tabla 6). Estos resultados sugieren que los receptores de endotelina ET_A están involucrados en la modulación de la neurotransmisión inhibidora nitrérgica del cuello vesical.

RESULTADOS

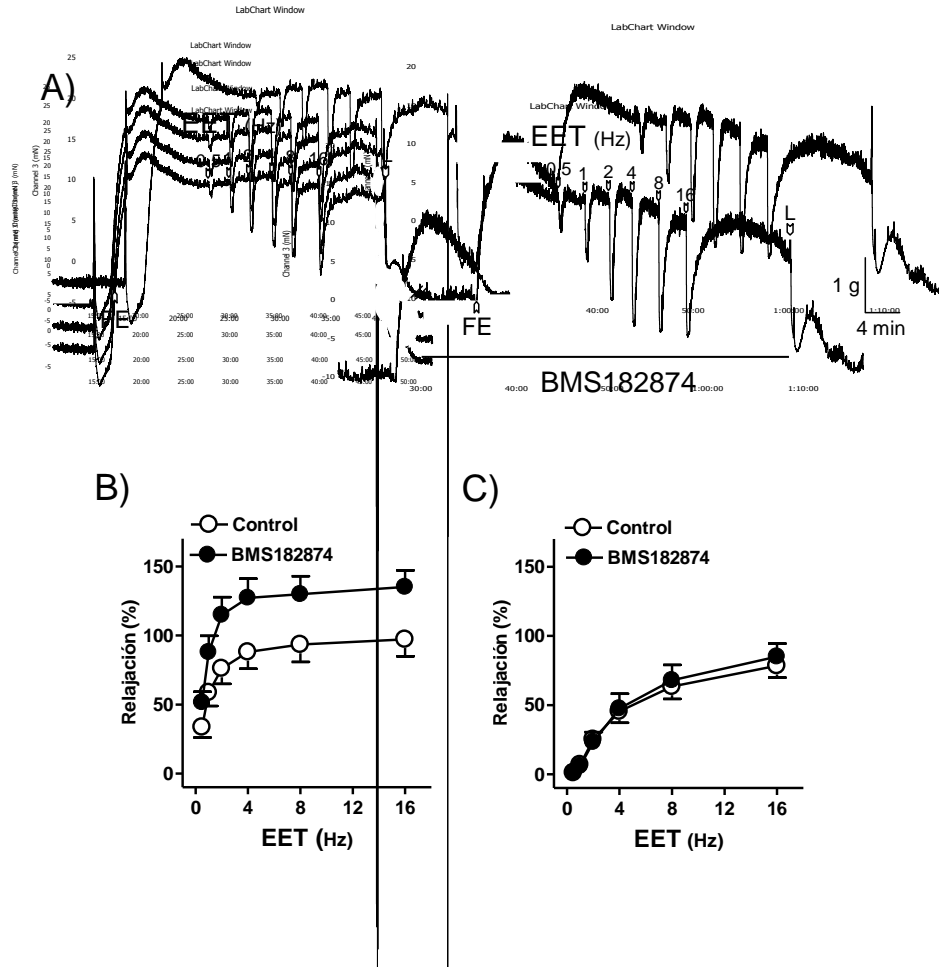


Figura 4.8 *Receptores ET_A neuronales potencian la neurotransmisión inhibitoria nitrérgica del cuello vesical.* (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, 0.5-16 Hz, trenes de 20 s) en ausencia y presencia del antagonista de los receptores de endotelina ET_A BMS182874 (1 μ M), en preparaciones de cuello vesical precontraídas con fenilefrina (FE, 1 μ M) y tratadas con guanetidina (10 μ M) y atropina (0.1 μ M). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). (B) Curvas de relajación dependientes de la frecuencia de EET en ausencia (círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de BMS182874 (1 μ M) (B) y con guanetidina (10 μ M), atropina (0.1 μ M) y N^G -nitro-L-arginina (L-NOARG, 100 μ M) (C). Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE y representan la media \pm e.s.m. de 7 preparaciones.

RESULTADOS

Tabla 6 Efecto del bloqueo de los receptores de endotelina ET_A sobre la relajación inducida por la estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, 0.5-16 Hz, trenes de 20 s, y corriente de salida constante ajustada a 75 mA) en ausencia y presencia del inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100 μM).

	<i>n</i>	EET (Hz)					
		0.5	1	2	4	8	16
<u>-L-NOARG</u>							
Control	7	33±7	59±9	76±11	88±12	93±12	97±12
BMS182874 (1 μM)	7	51±8*	88±11*	115±12*	127±13*	130±13*	135±11*
<u>+L-NOARG</u>							
Control	7	1±1	7±3	25±6	45±8	63±9	78±8
BMS182874 (1 μM)	7	1±1	6±2	23±7	47±10	68±11	85±9

Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por fenilefrina (1 μM), y representan la media ± e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 *versus* control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas).

4.2.7. Implicación de los receptores ET_B en la relajación del cuello vesical

La posible implicación de receptores ET_B en la relajación del cuello de la vejiga fue sugerida sobre la base del desplazamiento hacia la izquierda de la curva de contracción de ET-1 producido por el antagonista selectivo de los receptores de ET_B BQ788 (3 μM), (valores de pD₂ y E_{max} de 7.6±0.2 y 57±9 % y 8.4±0.1* y 60±4 %, en ausencia y presencia de BQ788, respectivamente, **P*<0.05, test de la *t* de Student para observaciones pareadas, n=7). Asimismo, en preparaciones de cuello vesical sin urotelio y precontraídas con FE, BQ3020 (0.01-300 nM), agonista de los receptores ET_B, produjo relajaciones dependientes de la concentración (Figura 4.9A), las cuales, fueron reducidas por BQ788 (Figura 4.9B, Tabla 7).

Con objeto de poder determinar la localización del receptor ET_B responsable de la relajación del cuello vesical, procedimos a la realización de curvas de relajación inducidas por BQ3020 en preparaciones en ausencia y presencia de urotelio. Dichos experimentos mostraron una relajación similar en ambos casos (Tabla 7), indicando así la presencia de receptores ET_B funcionalmente activos localizados en el músculo liso, razón por la cual, el resto del protocolo funcional fue llevado a cabo en preparaciones desprovistas de urotelio.

RESULTADOS

Para el estudio de la posible implicación de las vías NO/GMPc y ciclooxigenasa (COX) en la relajación mediada a través del receptor ET_B , las preparaciones fueron incubadas con L-NOARG (100 μ M), ODQ (5 μ M) e indometacina (3 μ M), bloqueantes de la sintasa de NO, guanilato ciclasa soluble y COX, respectivamente. Los resultados no modificaron la relajación inducida por BQ3020 (Tabla 4.1).

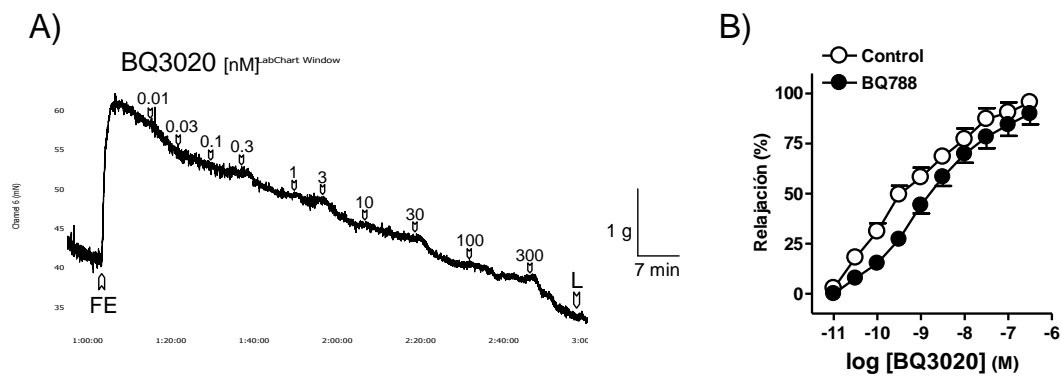


Figura 4.9 Receptores ET_B están involucrados en la relajación del cuello vesical. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por el agonista de los receptores ET_B BQ3020 (0.01-300 nM), en preparaciones precontraídas con fenilefrina (FE, 1 μ M). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). L: lavado. (B) Curvas de relajación dependientes de la concentración de BQ3020, en ausencia (control, círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) del antagonista de los receptores ET_B (3 μ M). Los resultados son expresados como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por FE y representan la media \pm e.s.m. de 8 preparaciones.

RESULTADOS

Tabla 7 Efecto de la eliminación mecánica del urotelio y de los inhibidores de la sintasa de óxido nítrico, guanilato ciclasa soluble, ciclooxigenasa y receptores ET_B sobre la relajación inducida por el agonista selectivo de los receptores ET_B BQ3020 (0.01-300 nM).

	BQ3020		
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Con urotelio	7	9.3±0.1	85±3
Sin urotelio	7	9.1±0.1	89±3
Control	6	9.3±0.1	87±5
L-NOARG (100 µM)	6	9.5±0.1	95±4
Control	6	9.2±0.1	89±7
ODQ (5 µM)	6	9.3±0.1	83±6
Control	7	9.1±0.1	92±4
Indometacina (3 µM)	7	9.0±0.1	94±3
Control	8	9.4±0.1	96±2
BQ788 (3 µM)	8	9.0±0.1*	90±5

Los resultados representan la media±e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 *versus* control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas). *E*_{max} es la máxima relajación expresada como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por fenilefrina (1 µM). *pD*₂ = -log EC₅₀, en donde la EC₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % de la *E*_{max}.

4.2.8. Participación de la vía de la PKA y canales de K⁺ en la relajación inducida por BQ3020

La implicación de la vía de la PKA en la relajación mediada a través de receptores ET_B fue demostrada sobre la base que concentraciones umbrales (30 nM) del activador de la adenilato ciclasa forskolina potenciaron la relajación inducida por BQ3020 (Figuras 4.10A, 4.10B, Tabla 8) y que KT5720 (1 µM), un inhibidor de la PKA, redujo dicha respuesta (Figura 4.10C, Tabla 8).

IbTX (100 nM) y apamina (0.5 µM), bloqueantes de los canales BK_{Ca} y SK_{Ca}, respectivamente, redujeron las relajaciones inducidas por BQ3020 (Figuras 4.11A, 4.11C, Tabla 8). TRAM 34 (20 nM) (Figura 4.11B), glibenclamida (1 µM) y 4-AP (1 mM), inhibidores de los canales IK_{Ca}, K_{ATP} y K_v, respectivamente, no modificaron dichas respuestas (Tabla 8). Estos resultados sugieren la activación de canales BK_{Ca} y SK_{Ca} en la relajación mediada a través de receptores ET_B.

RESULTADOS

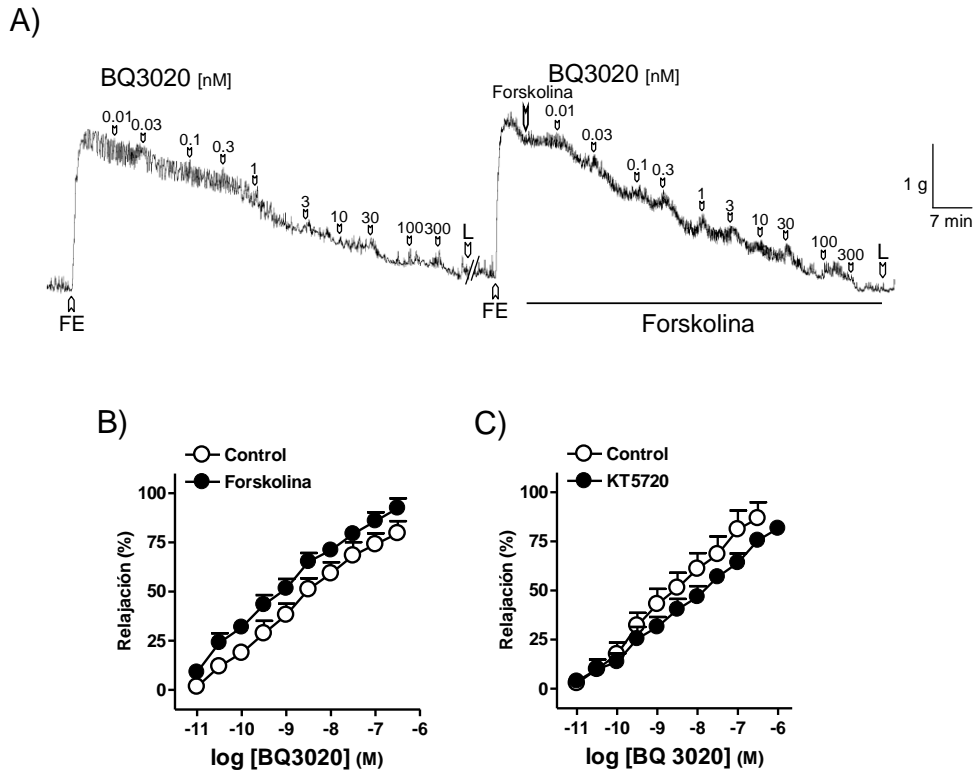


Figura 4.10 Participación de la vía de la PKA en la relajación mediada a través de receptores ET_B . (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por el agonista de los receptores ET_B BQ3020 (0.01-300 nM), en preparaciones precontraídas con fenilefrina (FE, 1 μ M). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal el tiempo en minutos (min). L: lavado. (B, C) Curvas de relajación dependientes de la concentración de BQ3020, en ausencia (control, círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) del activador de la adenilato ciclasa forskolina (30 nM) (B) y del inhibidor de la PKA KT5720 (1 μ M) (C). Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE y representan la media \pm e.s.m. de 6 preparaciones.

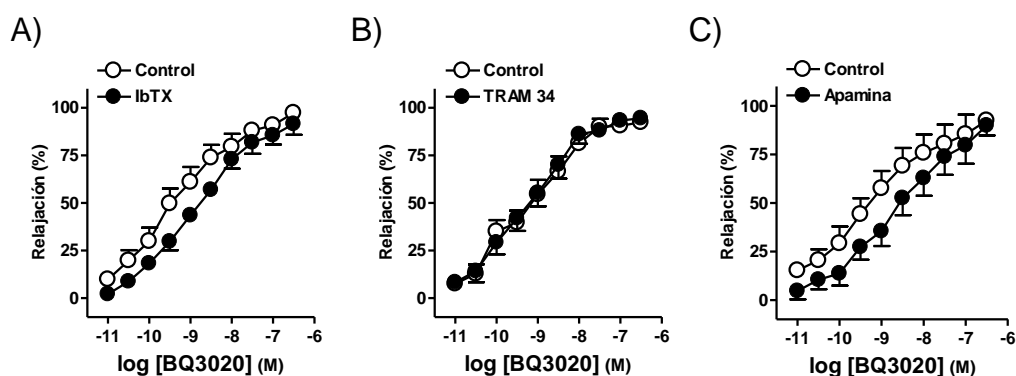


Figura 4.11 Activación de canales BK_{Ca} y SK_{Ca} en la relajación mediada a través de receptores ET_B . Curvas de relajación dependientes de la concentración de BQ3020, en ausencia (control, círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de iberiotoxina (IbTX, 100 nM) (A), TRAM 34 (20 nM) (B) y apamina (0.5 μ M) (C), bloqueantes de los canales BK_{Ca} , IK_{Ca} y SK_{Ca} , respectivamente. Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE y representan la media \pm e.s.m. de 7 preparaciones.

Tabla 8 Efecto de la activación de la adenilato ciclasa y del bloqueo de la PKA y de los canales BK_{Ca} , IK_{Ca} , SK_{Ca} , K_{ATP} y K_v sobre la relajación inducida por BQ3020 (0.01-300 nM).

		BQ3020	
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Control	6	8.8 \pm 0.1	80 \pm 6
Forskolina (30 nM)	6	9.2 \pm 0.1*	92 \pm 5
Control	6	8.7 \pm 0.1	87 \pm 8
KT5720 (1 μ M)	6	8.0 \pm 0.1*	82 \pm 3
Control	7	9.4 \pm 0.1	97 \pm 2
IbTX (100 nM)	7	8.9 \pm 0.1*	92 \pm 6
Control	7	9.3 \pm 0.1	92 \pm 3
TRAM 34 (20 nM)	7	9.3 \pm 0.1	95 \pm 3
Control	7	9.4 \pm 0.1	93 \pm 1
Apamina (0.5 μ M)	7	8.6 \pm 0.1*	90 \pm 5
Control	6	9.4 \pm 0.1	90 \pm 4
Glibenclamida (1 μ M)	6	9.5 \pm 0.1	91 \pm 2
Control	6	9.3 \pm 0.1	85 \pm 5
4-AP (1 mM)	6	9.5 \pm 0.2	89 \pm 3

Los resultados representan la media \pm e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 versus control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas). *E*_{max} es la máxima relajación expresada como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por fenilefrina (1 μ M). *pD*₂ = -log *EC*₅₀, en donde la *EC*₅₀ es la concentración de agonista que produce el 50 % de la *E*_{max}.

4.2.9. *Implicación de los receptores ET_B en la neurotransmisión no adrenérgica no colinérgica (NANC) inhibidora del cuello vesical*

Con la finalidad de investigar la posible implicación de receptores en la neurotransmisión inhibidora del cuello vesical, las preparaciones fueron incubadas con guanetidina (10 μ M) y atropina (0.1 μ M) y precontraídas con FE (1 μ M). En dichas condiciones, la EET (0.5-16 Hz) produjo relajaciones dependientes de la frecuencia, las cuales, fueron reducidas por el antagonista de los receptores ET_B BQ788 (Figuras 4.12A, 4.12B, Tabla 9). Asimismo, concentraciones umbrales (0.03 nM) del agonista ET_B BQ3020 potenciaron las relajaciones inducidas por la EET (Figura 4.12C, Tabla 9). Estos resultados, en conjunto, sugieren que receptores de endotelina ET_B están involucrados en la neurotransmisión NANC inhibidora del cuello vesical.

RESULTADOS

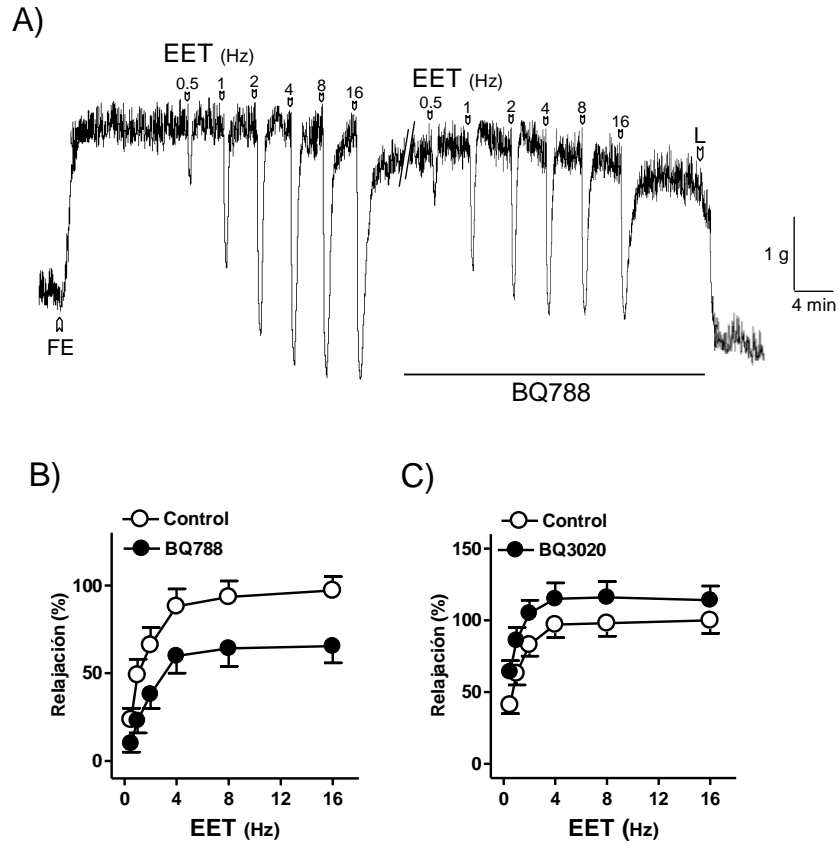


Figura 4.12 Receptores ET_B están involucrados en la neurotransmisión inhibitoria del cuello vesical (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, 0.5-16 Hz, trenes de 20 s) en ausencia y presencia del antagonista de los receptores ET_B BQ788 ($3 \mu M$), en preparaciones precontraídas con fenilefrina (FE, $1 \mu M$) y tratadas con guanetidina ($10 \mu M$) y atropina ($0.1 \mu M$). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). (B, C) Curvas de relajación dependientes de la frecuencia de EET en ausencia (círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de BQ788 ($3 \mu M$) (B) y del agonista de los receptores ET_B BQ3020 ($0.03 nM$) (C). Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE y representan la media \pm e.s.m. de 7 preparaciones.

RESULTADOS

Tabla 9 Efecto del bloqueo del receptor de endotelina ET_B y de concentraciones umbrales de BQ3020 sobre la relajación inducida por la estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, 0.5-16 Hz, trenes de 20 s, con la corriente de salida constante ajustada a 75 mA), en preparaciones de cuello de la vejiga del cerdo tratadas con guanetidina (10 µM) y atropina (0.1 µM).

	<i>n</i>	EET (Hz)					
		0.5	1	2	4	8	16
Control	6	23±6	49±9	66±10	88±10	93±9	97±8
BQ788 (3 µM)	6	10±5*	23±7*	38±8*	60±8*	64±9*	65±9*
Control	6	41±6	63±8	83±8	97±9	98±9	100±9
BQ3020 (0.03 nM)	6	64±8*	86±9*	105±9*	115±11	116±11	114±10

Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por la fenilefrina (1 µM), y representan la media ± e.s.m. de *n* preparaciones. **P*<0.05 *versus* control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas).

5. DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES DE ENDOTELINA FUNCIONALMENTE ACTIVOS INVOLUCRADOS EN LA CONTRACCIÓN DEL CUELLO DE LA VEJIGA URINARIA DEL CERDO

En lo concerniente al primer objetivo de nuestro proyecto referido al estudio de los mecanismos involucrados en la contracción inducida por la ET-1 en el cuello de la vejiga urinaria del cerdo, nuestros resultados proveen evidencia morfológica y funcional que mecanismos neuronales y no-neuronales están involucrados en la contracción inducida por la ET-1. Dicho efecto es producido de forma directa vía activación de receptores de endotelina ET_A musculares acoplados esencialmente a la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} dependientes (tipo L) e independientes de voltaje. Asimismo, la movilización de Ca^{2+} intracelular y mecanismos independientes de la $[Ca^{2+}]_i$ a través de la vía Rho/Rhocinasa parecen estar involucrados en dicha respuesta. Además, la ET-1 potencia la contracción inducida por la NA. Junto con receptores musculares de endotelina existen receptores ET_A neuronales modulando la neurotransmisión NANC inhibitoria dependiente de NO.

Los receptores de endotelina ET_A y ET_B han sido descritos en diversas estructuras de los Tractos Urinario y Genital. Así, receptores de endotelina ET_A están involucrados en la contracción de la base de la vejiga y la uretra del conejo (Ukai y col., 2008), perro (Langenstroer y col., 1997) y hombre (Hiraoka y col., 2000), así como en la elevación de la presión uretral prostática (Imajo y col., 1997). En nuestro estudio, la ET-1 produjo una potente contracción de inicio retardado y desarrollo prolongado, lo cual, puede ser explicada sobre la base de la lenta difusión de los péptidos en el interior de la célula muscular debido a su elevado peso molecular, a las vías de señalización intracelulares de los receptores de endotelinas y/o a la acción indirecta de los agonistas produciendo la liberación de otros mediadores desde las terminaciones nerviosas intramurales (Hernández y col., 2006a). Nuestro protocolo experimental se ha realizado en preparaciones desprovistas de urotelio, lo cual, indica que receptores localizados en el músculo liso están involucrados en la contracción inducida por la ET-1.

El receptor ET_A tiene mayor afinidad de conjugación para la ET-1 y la ET-2 que para ET-3, mientras que los receptores de endotelina ET_B tienen similar afinidad por las tres isoformas peptídicas (Arai y col., 1990; Sakurai y col., 1990, Simonson y Dunn, 1990). En el presente estudio, ET-1 y ET-2 mostraron similar potencia contráctil, mientras que la ET-3 producía incrementos consistentes de la tensión basal del cuello vesical únicamente en respuesta a elevadas concentraciones (Figuras 4.3A, 4.3B, Tabla 1). Estos resultados son similares a los obtenidos en la vejiga del hombre, en donde la ET-3 producía una contracción menor que la originada por la ET-1, resultados que están de acuerdo con la mediación de receptores de endotelina ET_A (Okamoto-Koizumi y col., 1999). La implicación de estos receptores en nuestro estudio es sugerida, además, por la inhibición producida por BMS182874, antagonista selectivo de los receptores ET_A , sobre la contracción inducida por la ET-1 (Figura 4.4A, Tabla 2). El hecho que dicho antagonista originara un desplazamiento hacia la derecha no competitivo de la curva CR de ET-1 puede ser explicada sobre la base de la posible presencia de receptores de endotelina ET_A en los nervios, o alternativamente por la mediación de ambos subtipos de receptores de endotelina en la contracción inducida por la ET-1. Sin embargo, BQ3020, agonista de los receptores ET_B , no produjo efecto contráctil alguno y BQ788, antagonista selectivo de dichos receptores, no modificó la curva CR de la ET-1 (Figura 4.4B, Tabla 2). Estos resultados sugieren que receptores ET_B no parecen estar involucrados en la contracción inducida por la ET-1. La mediación de receptores de endotelina ET_A en el cuello vesical del cerdo fue asimismo confirmada por estudios de expresión de dicho receptor. Así, ensayos de *Western Blot* mostraron una banda de 52 kDa, compatible con el peso molecular descrito (53 kDa) para el receptor ET_A (Figura 4.1A). Asimismo, estudios inmunohistoquímicos con un anticuerpo anti- ET_A revelaron un marcaje de proteína ET_A . De hecho, se observó una alta densidad de fibras inmunorreactivas a ET_A de tamaño variable oscilando entre gruesos troncos nerviosos a finas fibras individuales ricas en varicosidades penetrando por la adventicia, distribuyéndose en la capa muscular y alcanzando el urotelio (Figuras 4.1B-4.1G). Dicha inervación inmunopositiva fue, asimismo, identificada alrededor de las arterias pequeñas que irrigan el cuello vesical, indicando así un posible papel de los receptores de endotelina ET_A en la regulación del flujo sanguíneo local. Nuestros resultados están en consonancia con la rica densidad de inervación inmunorreactiva a ET_A observada en el epitelio, músculo liso y fibroblastos de la vejiga

del hombre, indicando así, una acción autocrina de ET-1 en la regulación de la estructura y del tono muscular de la pared vesical (Sáenz de Tejada y col., 1992).

En la vejiga urinaria de diferentes especies incluido el hombre, la contracción mediada por receptor es dependiente de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L sensibles a las dihidropiridinas (Maggi y col., 1989; Andersson y col., 1991; Uchida y col., 1994; Yoshida y col., 2003) y a la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (RS) (Masters y col., 1999; An y col., 2002). En nuestro estudio, la inhibición de la contracción inducida por la ET-1 en una SSF sin Ca^{2+} o como consecuencia del tratamiento con nifedipina, bloqueante de canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje tipo L, sugiere que la ET-1 produce contracción del cuello vesical a través de mecanismos dependientes del influjo de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L (Figuras 4.5A, 4.5B, Tabla 3). No obstante, el bloqueo parcial producido por la nifedipina así como la reducción causada por el inhibidor de la entrada de Ca^{2+} SKF96365, sugiere la implicación de otros canales en el influjo de Ca^{2+} extracelular (Figuras 4.5A, 4.5B, Tabla 3). Dichos mecanismos involucrarían canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje tipo T o P/Q y/o canales operados por receptor o por depósito independientes de voltaje. Además, el hecho que la ET-1 produzca contracción (29 % del control) en una SSF libre de Ca^{2+} indica una movilización de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares.

Una parte de la contracción de la vejiga es producida vía mecanismos independientes de cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; a través de la vía Rho/Rhocinasa e inhibición de la fosfatasa de la CLM (Somlyo y Somlyo, 2003; Wibberley y col., 2003). De hecho, el ARNm y la enzima RhoA activada han sido identificados en el detrusor y urotelio de la vejiga del cerdo (Nakanishi y col., 2009). Asimismo, la activación de los receptores adrenérgicos y muscarínicos produce un potente sinergismo en el trigono del cobaya sin cambios significativos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, indicando así, que la sensibilización al Ca^{2+} de proteínas contráctiles desempeñan un papel fundamental en dicha respuesta contráctil (Roosen y col., 2009). En nuestro estudio, Y27632, un inhibidor selectivo de la proteína cinasa asociada a Rho, redujo la contracción inducida por la ET-1, lo cual, sugiere la implicación de la vía de Rho/Rho cinasa en dicho efecto (Figura 4.5C, Tabla 3).

En el cuello de la vejiga del cerdo, la ET-1, junto con su acción contráctil directa mediada a través de receptores musculares de endotelina ET_A , desempeña un importante papel modulador de la contracción noradrenérgica. Así, aunque la contracción máxima producida por la ET-1 representa un 42 % de la inducida por la

NA, su potencia es mucho mayor que la exhibida por el neurotransmisor simpático (Figuras 4.6A, 4.6B, Tabla 4). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la base de la vejiga y la uretra del conejo, en donde la ET-1 producía una contracción, vía activación de receptores ET_A , mucho más potente que la inducida por la NA a través de receptores adrenérgicos α_1 (Ukai y col., 2008). El hecho que concentraciones umbrales de ET-1 potenciaran la respuesta evocada por la NA sugiere un papel modulador de dicho péptido en la contracción noradrenérgica (Figuras 4.6A, 4.6B, Tabla 4). Este resultado está en consonancia con otros descritos en el Sistema Urogenital, en donde la ET-1 desempeña un papel modulador esencial sobre la neurotransmisión noradrenérgica y NANC. Así, en la vejiga urinaria de la rata, la transmisión NANC es potenciada por la ET-1 a través de la activación de receptores ET_A (Donoso y col., 1994), mientras que en el conducto deferente, la ET-1 facilita la neurotransmisión simpática a través de la potenciación de la contracción inducida por el ATP (Lau y col., 1995).

En nuestro estudio, la presencia de receptores ET_A en nervios del cuello vesical sugiere que mecanismos neuronales están involucrados en la contracción inducida por la NA. Esta hipótesis fue confirmada por el bloqueo producido por ω -CgTX, un inhibidor de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje neuronales, sobre la contracción inducida por la ET-1 (Figuras 4.7A, 4.7B, Tabla 5). La falta de efecto de la guanetidina, bloqueante de la neurotransmisión noradrenérgica (Figura 4.7C, Tabla 5), parece descartar un posible papel de los nervios adrenérgicos en dichas respuestas y sugiere un papel modulador de la ET-1 a través de la facilitación de la liberación de un neurotransmisor excitador no-adrenérgico o alternativamente por el bloqueo de la liberación de un neurotransmisor inhibidor.

En el cuello de la vejiga urinaria del cerdo se ha demostrado la existencia de una potente neurotransmisión NANC inhibidora dependiente e independiente de NO (Hernández y col., 2006a,b, 2007, 2008). Debido a ello, investigamos el posible papel modulador del receptor de endotelina ET_A en las relajaciones nerviosas NANC. Así, en preparaciones tratadas con guanetidina y atropina, con objeto de bloquear la neurotransmisión noradrenérgica y los receptores muscarínicos, respectivamente, el antagonista de los receptores ET_A BMS182874 potenciaba las relajaciones inducidas por la EET (Figuras 4.8A, 4.8B, Tabla 6). Sin embargo, dicho antagonista no modificó las relajaciones nerviosas en preparaciones tratadas con guanetidina, atropina y el inhibidor de la sintasa de NO, L-NOARG, indicando así la presencia de receptores de

endotelina ET_A neuronales modulando la neurotransmisión inhibitoria nitrérgica del cuello vesical (Figura 4.8C, Tabla 6).

5.2. CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES DE ENDOTELINAS FUNCIONALMENTE ACTIVOS INVOLUCRADOS EN LA RELAJACIÓN DEL CUELLO DE LA VEJIGA URINARIA DEL CERDO

Con respecto al segundo objetivo de nuestro estudio dirigido a investigar la implicación de receptores de endotelina ET_B en la relajación del cuello vesical, nuestros resultados sugieren que receptores ET_B musculares están involucrados en la relajación inducida por el agonista selectivo de dichos receptores BQ3020, a través de mecanismos independientes del NO y la COX, vía activación de la PKA dependiente del AMPc e involucrando la apertura de canales BK_{Ca} y SK_{Ca}. Los receptores ET_B están, asimismo, involucrados en la neurotransmisión NANC inhibitoria del cuello vesical. Esta conclusión es mantenida por las siguientes observaciones: (1) Receptores ET_B son expresados en la capa muscular y en el urotelio. (2) Las contracciones inducidas por la ET-1 fueron potenciadas por BQ788, antagonista selectivo de los receptores ET_B. (3) BQ3020, agonista de los receptores ET_B, produjo relajaciones dependientes de la concentración en preparaciones desprovistas de urotelio, las cuales, fueron reducidas por BQ788 y por el bloqueo de la PKA y de los canales BK_{Ca} y SK_{Ca}. Las respuestas inducidas por BQ3020, sin embargo, no fueron modificadas por el bloqueo de la sintasa de NO, guanilato ciclasa soluble, COX, canales K_{ATP} o K_v. (4) BQ788 redujo las relajaciones nerviosas inducidas por la EET. Dichas respuestas fueron potenciadas por concentraciones umbrales de BQ3020.

Los receptores ET_A y/o ET_B están involucrados en la contracción del músculo liso del Tracto Urinario Inferior (Traish y col., 1992; DiSanto y col., 2000; Andersson, 2007). Junto con su respuesta contráctil, la estimulación del receptor ET_B puede también producir relajación, y el balance final de ambos fenómenos antagónicos (contracción y/o relajación) es crítico para determinar la funcionalidad de dicho receptor (Sánchez y col., 2010). Sin embargo, existe una escasa información referida a la posible implicación de receptores ET_B en la relajación del músculo liso de la región de salida de orina de la vejiga. En el presente estudio, ensayos de *Western blot* mostraron

una banda de 52 kDa compatible con el peso molecular (53 kDa) descrito para el receptor ET_B (Figura 4.2A) y estudios inmunohistoquímicos con un anticuerpo anti-ET_B revelaron un marcaje de la proteína del receptor ET_B (Figuras 4.2B, 4.2C). De hecho, una densidad moderada de fibras inmunorreactivas a ET_B de tamaño variable fueron identificadas en el urotelio y en la capa muscular. Asimismo, dicha inmunorreactividad fue observada alrededor de las arterias pequeñas que irrigan el cuello vesical, indicando así un posible papel del receptor ET_B en la regulación del flujo sanguíneo local. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en la vejiga del conejo, en donde receptores de endotelina ET_B fueron localizados por debajo y en el interior del urotelio y en el músculo (Wada y col., 2000).

En nuestro estudio, el agonista de los receptores ET_B produjo una potente relajación dependiente de la concentración de lento desarrollo. Dicha respuesta no fue modificada en preparaciones desprovistas de urotelio, lo cual, sugiere que receptores musculares están involucrados en la relajación inducida por BQ3020 (Figura 4.9A, Tabla 7). Estos resultados junto con los obtenidos en los estudios inmunohistoquímicos y en el *Western Blotting* mostrando la expresión de receptores ET_B en el músculo liso y en el urotelio, podrían indicar una escasa contribución de los receptores ET_B uroteliales en producir relajación, y/o a la presencia de receptores contráctiles uroteliales anteriormente descrita. El hecho que el antagonista de los receptores ET_B BQ788 origine un desplazamiento hacia la derecha de forma competitiva de la curva CR de BQ3020 sugiere la mediación de una única población de receptores musculares ET_B en la relajación del cuello vesical (Figuras 4.9B, Tabla 7).

Tanto las vías del NO/GMPc como de la COX están involucradas en la relajación mediada a través del receptor ET_B (Hirata y col., 1993; Ozaki y col., 1995). En nuestro estudio, sin embargo, la falta de efecto de L-NOARG, ODQ e indometacina, bloqueantes de la sintasa de NO, guanilato ciclasa soluble y COX, respectivamente, sobre las relajaciones de BQ3020, sugiere que dichas respuestas son producidas a través de mecanismos independientes del NO y la COX (Tabla 7).

La activación del receptor ET_B está, asimismo, acoplada positivamente a la adenilato ciclasa, produciendo el incremento de la [AMP]_i y la activación de la PKA, para inducir relajación del músculo liso vascular (Eguchi y col., 1993). En el cuello de la vejiga del cerdo, la vía de la PKA dependiente del AMPc está involucrada en la relajación inducida por PACAP 38 (Hernández y col., 2006b) y por 5-HT (Recio y col., 2009). En el presente estudio, la reducción de la respuesta inducida por BQ3020 por el

inhibidor de la PKA KT5720 y su potenciación por el activador de la adenilato ciclasa forskolina, sugiere que dicha relajación es producida a través de la activación de receptores ET_B acoplados a la vía de la PKA (Figuras 4.10A-4.10C, Tabla 8).

En la vejiga urinaria, los canales de K^+ desempeñan un papel esencial en la repolarización del potencial de acción y en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, limitando la amplitud y duración de la contracción del músculo liso (Herrera y col., 2000; Herrera y Nelson, 2002). La alteración en la expresión de los canales de K^+ puede originar disfuncionalidades del Tracto Urinario, tales como vejiga hiperactiva e incontinencia urinaria (Herrera y col., 2005). En el cuello de la vejiga del cerdo, canales K_v presinápticos modulan la liberación de NO desde los nervios vía inhibición de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje neuronales (Hernández y col., 2008), mientras que canales K_v postsinápticos están involucrados en las relajaciones de PACAP 38 y VIP (Hernández y col., 2006b). Asimismo, canales K_v están implicados en la relajación mediada a través del receptor de endotelina ET_B en las arterias prostáticas pequeñas del cerdo (Sánchez y col., 2010). En el presente estudio IbTX y apamina, inhibidores de los canales BK_{Ca} y SK_{Ca} , respectivamente, redujeron las relajaciones inducidas por BQ3020, las cuales, sin embargo, no fueron modificadas por el bloqueo de los canales IK_{Ca} , K_{ATP} y K_v (Figuras 4.11A-4.11C, Tabla 8). Estos resultados sugieren la activación de canales BK_{Ca} y SK_{Ca} en la relajación inducida por BQ3020.

NO y un componente nervioso independiente de NO están involucrados en la neurotransmisión inhibitoria NANC del cuello vesical. Así, el NO, cuya liberación es modulada por receptores adrenérgicos α_2 y canales K_v presinápticos, relaja el cuello vesical a través de un mecanismo dependiente de la activación de la guanilato ciclasa soluble (Hernández y col., 2007, 2008). El componente nervioso independiente de NO actúa, en parte, vía liberación de prostanoïdes a través de la COX-1, y de la activación de la ATP-asa de la bomba Na^+-K^+ (Martínez-Sáenz y col., 2011). Estudios previos han descrito un efecto facilitador de la ET-1 sobre la neurotransmisión excitadora NANC en la vejiga urinaria de la rata (Donoso y col., 1994). Debido a ello, investigamos el posible papel modulador del receptor de endotelina ET_B sobre la neurotransmisión NANC inhibitoria del cuello vesical. Así, en preparaciones pretratadas con guanetidina y atropina, para bloquear la neurotransmisión noradrenérgica y los receptores muscarínicos, respectivamente, la EET produjo relajaciones dependientes de la frecuencia, las cuales, fueron reducidas por BQ788 y potenciadas por concentraciones umbrales de BQ3020 (Figuras 4.12A-4.12C, Tabla 9). Estos resultados sugieren que

DISCUSIÓN

receptores de endotelina ET_B están involucrados en la neurotransmisión NANC inhibitoria del cuello vesical.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Del conjunto de los resultados del presente estudio podemos concluir:

- ✓ 1º La ET-1 produce contracción del cuello de la vejiga urinaria del cerdo vía activación de receptores ET_A musculares acoplados a la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} dependientes (tipo L) e independientes de voltaje. Asimismo, la movilización de Ca^{2+} intracelular y mecanismos independientes de la $[Ca^{2+}]_i$ vía Rho/Rhocinasa parecen estar también involucrados en dicha respuesta.
- ✓ 2º La ET-1 potencia la contracción inducida por la NA y receptores de endotelina ET_A neuronales modulan la neurotransmisión inhibitoria NANC dependiente de NO en el cuello vesical.
- ✓ 3º Receptores ET_B presentes en el músculo median la relajación del cuello vesical a través de mecanismos independientes del NO y la COX, vía activación de la PKA e involucrando la apertura de canales BK_{Ca} y SK_{Ca} .
- ✓ 4º Los receptores ET_B están, asimismo, involucrados en la modulación de la neurotransmisión NANC inhibitoria. Este es el primer estudio que demuestra la implicación de receptores de endotelina musculares ET_B en la relajación del músculo liso de la región de salida de orina de la vejiga.
- ✓ 5º El conjunto de nuestros resultados indica que receptores de endotelina ET_A y ET_B están implicados en la contracción y la relajación, respectivamente, de la musculatura lisa del cuello de la vejiga urinaria del cerdo. Agonistas y antagonistas de dichos receptores, así como las vías de señalización intracelular acopladas a los mismos podrían ser dianas terapéuticas en la incontinencia urinaria de estrés producida por deficiencia esfintérica intrínseca.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aizawa N, Igawa Y, Andersson KE, Iijima K, Nishizawa O, Wyndaele JJ (2011). Effects of intravesical instillation of ATP on rat bladder primary afferent activity and its relationship with capsaicin-sensitivity. *Neurourol Urodynam* 30:163-168.
- Ambache N, Zar MA (1970). Non-cholinergic transmission by postganglionic motor neurones in the mammalian bladder. *J Physiol* 210: 761-778.
- Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL. (2004). Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* 110: 2233-2240.
- An JY, Yun HS, Lee YP, Yang SJ, Shim JO, Jeong JH Shin CY, Kim JH, Kim DS, Sohn UD (2002). The intracellular pathway of the acetylcholine induced contraction in cat detrusor muscle cells. *Br J Pharmacol* 137: 1001-1010.
- Andersson KE (1993). Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev* 45: 253-308.
- Andersson KE (1998). The importance of the cholinergic system in neurourology. *Eur Urol* 34: 6-9.
- Andersson KE (2001). Neurotransmission and drug effects in urethral smooth muscle. *Scand J Urol Nephrol* 207: 26-34.
- Andersson KE (2002). Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology* 59: 43-50.
- Andersson KE (2007). LUTS treatment: future treatment options. *Neurourol Urodynam* 26: 934-947.
- Andersson KE (2010). Detrusor myocyte activity and afferent signaling. *Neurourol Urodynam* 29: 97-106.
- Andersson KE, Arner A (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 84: 935-86.
- Andersson KE, Gratzke C, Hedlund P (2010). The role of the transient receptor potential (TRP) superfamily of cation-selective channels in the management of the overactive bladder. *BJU Int* 106: 1114-1127.
- Andersson KE, Holmquist F, Fovaeus M, Hedlund H, Sundler R (1991). Muscarinic receptor stimulation of phosphoinositide hydrolysis in the human isolated urinary bladder. *J Urol* 146: 1156-1159.
- Andersson KE, Persson K (1995). Nitric oxide synthase and the lower urinary tract: possible implications for physiology and pathophysiology. *Scand J Urol Nephrol* 175: 43-53.
- Andersson KE, Uckert S, Stief C, Hedlund P (2007). Phosphodiesterases (PDEs) and PDE inhibitors for treatment of LUTS. *Neurourol Urodynam* 26: 928-933.
- Andersson KE, Wein AJ (2004). Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev* 56: 581-631.
- Angerio AD (2006). Endothelin-1-mediated inflammation in acute renal failure. *Crit Care Nurs* 29: 152-156.
- Apodaca G (2004). The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic* 5: 1-12.

BIBLIOGRAFÍA

- Apodaca G, Balestreire E, Birder LA (2007). The uroepithelial-associated sensory web. *Kidney International* 72: 1057-1064.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348: 730-732.
- Armstead WM (2004). Endothelins and the role of endothelin antagonists in the management of posttraumatic vasospasm. *Curr Pharm Des* 10: 2185-2192.
- Arner A, Pfitzer G (1999). Regulation of cross-bridge cycling by Ca²⁺ in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 134: 63-146.
- Avelino A, Cruz C, Nagy I, Cruz F (2002). Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract. *Neuroscience* 109: 787-798.
- Aydin M, Downing K, Villegas G, Zhang X, Chua R, Melman A, Disanto ME (2010). The sphingosine-1-phosphate pathway is upregulated in response to partial urethral obstruction in male rats and activates RhoA/Rho-kinase signalling. *BJU Int* 106: 562-571.
- Badawi JK, Seja T, Uecelehan H, Honeck P, Kwon ST, Bross S, Langbein S (2007). Relaxation of human detrusor muscle by selective beta-2 and beta-3 agonists and endogenous catecholamines. *Urology* 69: 785-790.
- Bagnall AJ, Kelland NF, Gulliver-Sloan F, Davenport AP, Gray GA, Yanagisawa M, Webb DJ, Kotelevtsev YV. (2006). Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt. *Hypertension* 48: 286-293.
- Barthó L, Benkó R, Patacchini R, Pethő G, Holzer-Petsche U, Holzer P, Lázár Z, Undi S, Illényi L, Antal A, Horváth OP (2004). Effects of capsaicin on visceral smooth muscle: a valuable tool for sensory neurotransmitter identification. *Eur J Pharmacol* 500: 143-157.
- Baskin L, DiSandro M, Li Y, Li W, Hayward S, Cunha G (2001). Mesenchymal-epithelial interactions in bladder smooth muscle development: effects of the local tissue environment. *J Urol* 165: 1283-1288.
- Bayliss M, Wu C, Newgreen D, Mundy AR, and Fry CH (1999). A quantitative study of atropine-resistant contractile responses in human detrusor smooth muscle, from stable, unstable and obstructed bladders. *J Urol* 162: 1833-1839.
- Beckel JM, Kanai A, Lee SJ, de Groat WC, Birder LA (2006). Expression of functional nicotinic acetylcholine receptors in rat urinary bladder epithelial cells. *Am J Physiol* 290: F103-F110.
- Bent AE, Gousse AE, Hendrix SL, Klutke CG, Monga AK, Yuen CK, Muram D, Yalcin I, Bump RC (2008). Duloxetine compared with placebo for the treatment of women with mixed urinary incontinence. *Neurourol Urodynam* 27: 212-221.
- Berkefeld H, Fakler B, Schulte U (2010). Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev* 90:1437-1459.
- Berridge MJ (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 28: 315-325.
- Biers SM, Reynard JM, Doore T, Brading AF (2006). The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor. *BJU Int* 97: 612-616.

BIBLIOGRAFÍA

- Birder LA (2005). More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: 7489-7495.
- Birder LA (2006). Urinary bladder urothelium: Molecular sensors of chemical/thermal/mechanical stimuli. *Vascular Pharmacol* 45: 221-226.
- Birder LA (2010). Urothelial Signaling. *Auton Neurosci* 16: 33-36.
- Birder LA, Apodaca G, De Groat WC, Kanai AJ (1998). Adrenergic- and capsaicin-evoked nitric oxide release from urothelium and afferent nerves in urinary bladder. *Am J Physiol* 275: F226-F229.
- Birder LA, Barrick SR, Roppolo JR, Kanai AJ, De Groat WC, Kiss S, Buffington CAT (2003). Feline interstitial cystitis results in mechanical hypersensitivity and altered ATP release from bladder urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F423-F429.
- Birder LA, De Groat WC (2007). Mechanisms of Disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol* 4: 46-54.
- Birder L, De Groat W, Mills I, Morrison J, Thor K, Drake M (2010). Neural control of the lower urinary tract: peripheral and spinal mechanisms. *Neurourol Urodynam* 29: 128-139.
- Birder LA, Kanai AJ, De Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ (2001). Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13396-13401.
- Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, Kanai AJ, Wang E, Ruiz G, De Groat WC, Apodaca G, Watkins S, Caterina MJ (2002). Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci* 5: 856-860.
- Birder LA, Nealen ML, Kiss S, De Groat WC, Caterina MJ, Wang E, Apodaca G, Kanai AJ (2002). Beta-adrenoceptor agonists stimulate endothelial nitric oxide synthase in rat urinary bladder urothelial cells. *J Neurosci* 22: 8063-8070.
- Bkaily G, Choufani S, Avedanian L, Ahmarani L, Nader M, Jacques D, D'Orleans-Juste P, Khoury J (2008). Nonpeptidic antagonists of ETA and ETB receptors reverse the ET-1-induced sustained increase of cytosolic and nuclear calcium in human aortic vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 86: 546-556.
- Bohm F, Pernow J (2007). The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 76: 8-18.
- Bolton TB (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 59: 606-718.
- Bonev AD, Nelson MT (1993). Muscarinic inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels by protein kinase C in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 265: C1723-C1728.
- Braas KM, May V, Zvara P, Nausch B, Kliment J, Dunleavy JD, Nelson MT, Vizzard MA (2006). Role for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in cystitis-induced plasticity of micturition reflexes. *Am J Physiol* 290: R951-R962.
- Braasch I, Volff JN, Schartl M (2009). The endothelin system: evolution of vertebrate-specific ligand-receptor interactions by three rounds of genome duplication. *Mol Biol Evol* 26: 783-789.

BIBLIOGRAFÍA

- Brading AF (1992). Ion channels and control of contractile activity in urinary bladder smooth muscle. *Jpn J Pharmacol* 58: 120P-127P.
- Brading AF (1997). A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology* 50: 57-67.
- Brading AF (1999). The physiology of the mammalian urinary outflow tract. *Exp Physiol* 84: 215-21.
- Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF (2006). Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 111: 508-531.
- Buckner SA, Milicic I, Daza AV, Coghlan MJ, Gopalakrishnan M (2002). Spontaneous phasic activity of the pig urinary bladder smooth muscle: characteristics and sensitivity to potassium channel modulators. *Br J Pharmacol* 135: 639-648.
- Burcher E, Zeng XP, Strigas J, Shang F, Millard RJ, Moore KH (2000). Autoradiographic localization of tachykinin and calcitonin gene-related peptide receptors in adult urinary bladder. *J Urol* 163: 331-337.
- Burnstock G (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-581.
- Burnstock G (2001). Purinergic signalling in lower urinary tract. In: *Purinergic and Pyrimidinergic Signalling. I. Molecular. Nervous and Urogenital System Function*, edited by Abbracchio MP and Williams M. Berlin: Springer. Verlag, pg: 423-515.
- Burnstock G (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87: 659-797.
- Burnstock G (2008). Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res* 42:3-8.
- Bustamante S, Orensanz LM, Barahona MV, Contreras J, García-Sacristán A, Hernández M (2000). Tachykininergic excitatory neurotransmission in the pig intravesical ureter. *J Urol* 164: 1371-1375.
- Bustamante S, Orensanz LM, Barahona MV, García-Sacristán A, Hernández M (2001). NK₂ tachykinin receptors mediate contraction of the pig intravesical ureter: tachykinin-induced enhancement of non-adrenergic non-cholinergic excitatory neurotransmission. *NeuroUrol Urodynam* 20: 297-308.
- Bustamante S, Orensanz LM, Recio P, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D, Hernández M. (2010). Functional evidence of nitrergic neurotransmission in the human urinary bladder neck. *Neurosci Lett* 477: 91-94.
- Calvert RC, Thompson CS, Khan MA, Mikhailidis DP, Morgan RJ, Burnstock G (2001). Alterations in cholinergic and purinergic signaling in a model of the obstructed bladder. *J Urol* 166: 1530-1533.
- Cameron IT, Bacon CR, Collett GP, Davenport AP (1995). Endothelin expression in the uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 209-214.
- Cannon TW, Yoshimura N, Chancellor MB (2003). Innovations in pharmacotherapy for stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 14: 367-372.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.

BIBLIOGRAFÍA

- Chancellor MB, Yoshimura N (2004). Neurophysiology of stress urinary incontinence. *Rev Urol* 6: S19-S28.
- Chapple C (2004). Pharmacological therapy of benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms: an overview for the practising clinician. *BJU Int* 94: 738-744.
- Chapple C (2010). Antimuscarinics in men with lower urinary tract symptoms suggestive of bladder outlet obstruction due to benign prostatic hyperplasia. *Curr Opin Urol* 20: 43-48.
- Chauhan BC (2008). Endothelin and its potential role in glaucoma. *Can J Ophthalmol* 43: 356-360.
- Cheng HI, Brading AF (1991). The mechanism of action of putative non-adrenergic, non-cholinergic transmitters on the urinary bladder. *J Auton Nerv Syst* 33: 178-179.
- Chess-Williams R (2002). Muscarinic receptors of the urinary bladder: detrusor, urothelial and prejunctional. *Auton Autacoid Pharmacol* 22: 133-145.
- Chopra B, Barrick SR, Meyers S, Beckel J, Zeidel ML, Ford AP, de Groat WC, Birder LA (2005). Expression and function of bradykinin B1/B2 receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. *J Physiol* 562: 859-871.
- Chow KY, Wu C, Sui GP, Fry CH (2003). Role of the T-type Ca^{2+} current on the contractile performance of guinea pig detrusor smooth muscle. *Neurourol Urodynam* 22: 77-82.
- Chung DE, Kaplan SA (2010). Current role for combination therapy in male LUTS. *Arch Esp Urol* 63: 323-332.
- Coussin F, Macrez N, Morel JL, Mironneau J (2000). Requirement of ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in vascular myocytes. *J Biol Chem* 275: 9596-603.
- Creed KE, Callahan SM (1989). Prostaglandins and neurotransmission at the guinea pig and rabbit urinary bladder. *Pflugers Arch* 413: 299-302.
- Damaser MS, Kim KB, Longhurst PA, Wein AJ, Levin MR (1997). Calcium regulation of urinary bladder function. *J Urol* 157: 732-738.
- D'Andrea MR, Saban MR, Nguyen NB, Andrade-Gordon P, Saban R (2003). Expression of protease-activated receptor-1, -2, -3, and -4 in control and experimentally inflamed mouse bladder. *Am J Pathol* 162: 907-923.
- Davenport AP, Maguire JJ (2006). Endothelin. *Handb Exp Pharmacol* 176: 295-329.
- Davies AM, Batchelor TJ, Eardley I, Beech DJ (2002). Potassium channel K_v alpha1 subunit expression and function in human detrusor muscle. *J Urol* 167: 1881-1886.
- De Groat WC (2006). Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol* 147: S25-S40.
- De Groat WC, Yoshimura N (2001). Pharmacology of the lower urinary tract. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 41: 691-721.
- De Jongh R, van Koeveringe GA, van Kerrebroeck PE, Markerink-van Ittersum M, de Vente J, Gillespie JI (2007). The effects of exogenous prostaglandins and the identification of constitutive cyclooxygenase I and II immunoreactivity in the normal guinea pig bladder. *BJU Int* 100: 419-429.

BIBLIOGRAFÍA

- Dickson A, Avelino A, Cruz F, Ribeiro-da-Silva A (2006). Peptidergic sensory and parasympathetic fiber sprouting in the mucosa of the rat urinary bladder in a chronic model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuroscience* 139: 671-685.
- DiSanto ME, Wein AJ, Chacko S (2000). Lower urinary tract physiology and pharmacology. *Curr Urol Rep* 1: 227-234.
- Dmietrieva N, McMahon SB (1996). Sensitization of visceral afferents by nerve growth factor in the adult rat. *Pain* 66: 87-97.
- Dokita S, Smith SD, Nishimoto T, Wheeler MA, Weiss RM (1994). Involvement of nitric oxide and cyclic GMP in rabbit urethral relaxation. *Eur J Pharmacol* 266: 269-275.
- Donoso MV, Salas C, Sepúlveda G, Lewin J, Fournier A, Huidobro-Toro JP (1994). Involvement of ETA receptors in the facilitation by endothelin-1 of non-adrenergic non-cholinergic transmission in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* 111: 473-482.
- D'Orleans-Juste P, Labonte J, Bkaily G, Choufani S, Plante M, Honore J (2002). Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol Ther* 95: 221-238.
- Drake MJ, Hedlund P, Andersson KE, Brading AF, Hussain I, Fowler C, Landon DN (2003). Morphology, phenotype and ultrastructure of fibroblastic cells from normal and neuropathic human detrusor: absence of myofibroblast characteristics. *J Urol* 169: 1573-1576.
- Drake MJ, Mills IW, and Gillespie JI (2001). Model of peripheral autonomous modules and a myovesical plexus in normal and overactive bladder function. *Lancet* 358: 401-403.
- Du S, Araki I, Mikami Y, Zakoji H, Beppu M, Yoshiyama M, Takeda M (2007). Amiloride-sensitive ion channels in urinary bladder epithelium involved in mechanosensory transduction by modulating stretch-evoked adenosine triphosphate release. *Urology* 69: 590-595.
- Dymshitz J y Vasko MR (1994). Endothelin-1 enhances capsaicin-induced peptide release and cGMP accumulation in cultures of rat sensory neurons. *Neurosci Lett* 167: 128-132.
- Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Marumo F (1993). Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* 132: 524-529.
- Elliott RA, Castleden CM (1993). Nerve mediated relaxation in human detrusor muscle. *Br J Clin Pharmacol* 36: 479-480.
- English SF, Amundsen CL, McGuire EJ (1999). Bladder neck competency at rest in women with incontinence. *J Urol* 161: 578-580.
- Fahrenkrug J, Hannibal J (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide immunoreactivity in capsaicin-sensitive nerve fibres supplying the rat urinary tract. *Neuroscience* 83: 1261-1272.
- Feldstein C, Romero C (2007). Role of endothelins in hypertension. *Am J Ther* 14: 147-153.
- Felsen D, Dardashti K, Ostad M, Lemer ML, Gross SS, Chen J, Vaughan ED Jr, Poppas DP (2003). Inducible nitric oxide synthase promotes pathophysiological consequences of experimental bladder outlet obstruction. *J Urol* 169: 1569-1572.

BIBLIOGRAFÍA

- Ford AP, Gever JR, Nunn PA, Zhong Y, Cefalu JS, Dillon MP, Cockayne DA (2006). Purinoceptors as therapeutic targets for lower urinary tract dysfunction. *Br J Pharmacol* 147: S132-S143.
- Fry CH, Meng E, Young JS (2010). The physiological function of lower urinary tract smooth muscle. *Auton Neurosci* 154: 3-13.
- Fry C, Sui GP, Kanai AJ, Wu C (2007). The function of suburothelial myofibroblasts in the bladder. *Neurourol Urodynam* 26: 914-919.
- Fry CH, Wu C, Sui GP (1998). Electrophysiological properties of the bladder. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 9: 291-298.
- Fujishige A, Takahashi K, and Tsuchiya T (2002). Altered mechanical properties in smooth muscle of mice with a mutated calponin locus. *Zool Sci* 19: 167-174.
- Furst DO, Cross RA, De Mey J, Small JV (1986). Caldesmon is an elongated, flexible molecule localized in the actomyosin domains of smooth muscle. *EMBO J* 5: 251-257.
- Giembycz MA (2005). Life after PDE4: Overcoming adverse events with dual-specificity phosphodiesterase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 5: 238-244.
- Giglio D, Delbro DS, Tobin G (2001). On the functional role of muscarinic M2 receptors in cholinergic and purinergic responses in the rat urinary bladder. *Eur J Pharmacol* 428: 357-364.
- Gillespie JI (2005). Inhibitory actions of calcitonin gene-related peptide and capsaicin: evidence for local axonal reflexes in the bladder wall. *BJU Int* 95: 149-156.
- Gilmore NJ, Vane JR (1971). Hormones released into the circulation when the urinary bladder of the anaesthetized dog is distended. *Clin Sci* 41: 69-83.
- Girard BM, Wolf-Johnston A, Braas KM, Birder LA, May V, Vizzard MA (2008). PACAP-mediated ATP release from rat urothelium and regulation of PACAP/VIP and receptor mRNA in micturition pathways after cyclophosphamide (CYP)-induced cystitis. *J Mol Neurosci* 36: 310-320.
- Gosling JA, Dixon JS, Jen PY (1999). The distribution of noradrenergic nerves in the human lower urinary tract. *Eur Urol* 36: 23-30.
- Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV, Somlyo AP (1997). Translocation of rhoA associated with Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *J Biol Chem* 272: 10704-10709.
- Granger JP, Abram S, Stec D, Chandler D, LaMarca B (2006). Endothelin, the kidney, and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 8: 298-303.
- Grimshaw MJ (2007). Endothelins and hypoxia inducible factor in cancer. *Endocr Relat Cancer* 14: 233-244.
- Gulur DM, Drake MJ (2010). Management of overactive bladder. *Nat Rev Urol* 7: 572-582.
- Guyton AC, Hall JE (2006). Urine formation by the kidneys: Glomerular filtration, renal, blood flow and their control. En: *Textbook of Medical Physiology* 11th Edition. Elsevier Saunders.
- Haab F, Zimmern PE, Leach GE (1996). Female stress urinary incontinence due to intrinsic sphincteric deficiency: recognition and management. *J Urol* 156: 3-17.

BIBLIOGRAFÍA

- Häbler HJ, Jänig W, Koltzenburg M (1990). Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J Physiol* 425: 545-562.
- Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Barbadora S, Kanai AJ, DeGroat WC, Birder LA (2007). Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life Sci* 80: 2298-2302.
- Harmar AJ, Sheward WJ, Morrison CF, Waser B, Guggenberger M, Reubi JC (2004). Distribution of the VPAC₂ receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology* 145: 1203-1210.
- Harvey RA, Skennerton DE, Newgreen D, Fry CH (2002). The contractile potency of adenosine triphosphate and ecto-adenosine triphosphatase activity in guinea pig detrusor and detrusor from patients with a stable, unstable or obstructed bladder. *J Urol* 168: 1235-1239.
- Hashim H, Abrams P (2006). Pharmacological management of women with mixed urinary incontinence. *Drugs* 66: 591-606.
- Hashitani H, Bramich NJ, Hirst G (2000). Mechanisms of excitatory neuromuscular transmission in the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol* 524: 565-579.
- Hashitani H, Fukuta H, Takano H, Klemm MF, Suzuki H (2001). Origin and propagation of spontaneous excitation in smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol* 530: 273-286.
- Hawthorn MH, Chapple CR, Cock M, Chess-Williams R (2000). Urothelium-derived inhibitory factor(s) influences on detrusor muscle contractility in vitro. *Br J Pharmacol* 129: 416-419.
- Haylen BT, de Ridder D, Freeman RM, Swift SE, Berghmans B, Lee J, Monga A, Petri E, Rizk DE, Sand PK, Schaer GN; International Urogynecological Association; International Continence Society (2010). An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction. *Neurourol Urodynam* 29: 4-20.
- Haynes WG, Hand M, Johnstone H, Padfield P, Webb DJ (1994). Direct and sympathetically mediated vasoconstriction in essential hypertension: enhanced response to endothelin-1. *J Clin Invest* 94: 1359-1364.
- Hedge S (2006) Muscarinic receptors in the bladder: from basic research to therapeutics. *Br J Pharmacol* 147: S80-S87.
- Heppner TJ, Bonev AD, Nelson MT (1997). Ca²⁺-activated K channels regulate action potential repolarization in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 273: C110-C117.
- Hernández M, Barahona MV, Recio P, Benedito S, Martínez AC, Rivera L, García-Sacristán A, Prieto D, Orensanz LM (2006a). Neuronal and smooth muscle receptors involved in the PACAP- and VIP-induced relaxations of the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 149: 100-109.
- Hernández M, Barahona MV, Recio P, Bustamante S, Benedito S, Rivera L, García-Sacristán A, Prieto D, Orensanz LM (2006b). PACAP 38 is involved in the non adrenergic non cholinergic inhibitory neurotransmission in the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodynam* 25: 490-497.
- Hernández M, Barahona MV, Recio P, Navarro-Dorado J, Bustamante S, Benedito S, García-Sacristán A, Prieto D, Orensanz LM (2008). Role of neuronal voltage-gated K(+) channels in the modulation of the nitrergic neurotransmission of the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 153: 1251-1258.

BIBLIOGRAFÍA

- Hernández M, Barahona MV, Recio P, Rivera L, Benedito S, Martínez AC, García-Sacristán A, Orensanz LM, Prieto D (2004). Heterogeneity of neuronal and smooth muscle receptors involved in the VIP- and PACAP-induced relaxations of the pig intravesical ureter. *Br J Pharmacol* 141: 123-131.
- Hernández M, Knight GE, Wildman SS, Burnstock G (2009). Role of ATP and related purines in inhibitory neurotransmission to the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 157: 1463-1473.
- Hernández M, Prieto D, Orensanz LM, Barahona MV, Jiménez-Cidre M, Rivera L, García-Sacristán A, Simonsen U (1997). Involvement of a glibenclamide-sensitive mechanism in the nitrergic neurotransmission of the pig intravesical ureter. *Br J Pharmacol* 120: 609-616.
- Hernández M, Recio P, Barahona MV, Bustamante S, Peña L, Martínez AC, García-Sacristán A, Prieto D, Orensanz LM (2007). Pre-junctional alpha(2)-adrenoceptors modulation of the nitrergic transmission in the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodynam* 26: 578-583.
- Herrera GM, Etherton B, Nausch B, Nelson MT (2005). Negative feedback regulation of nerve-mediated contractions by KCa channels in mouse urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R402-409.
- Herrera GM, Heppner TJ, Nelson MT (2000). Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R60-R68.
- Herrera GM, Nelson MT (2002). Differential regulation of SK and BK channels by Ca²⁺ signals from Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes. *J Physiol* 541: 483-492.
- Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF (1985). Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 248: C550-C556.
- Hille, B (1992). Ionic channels of excitable membranes. Cap. 5. Massachusetts: Sinauer Associates, Sunderland, Inc.
- Hills J, Meldrum LA, Klarskov P, Burnstock G (1984). A novel non-adrenergic non-cholinergic nerve-mediated relaxation of the pig bladder neck: an examination of possible neurotransmitter candidates. *Eur J Pharmacol* 99: 287-293.
- Hirada N, Himeno A, Shigematsu K, Sumikawa K, Niwa M (2002). Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. *Cell Mol Neurobiol* 22: 207-226.
- Hiraoka Y, Oshita M, Morikawa K, Nagata O, Hahn KJ, Hahn A, Okada K, Taniguchi T, Muramatsu I (2000). Characterization of the endothelin receptor subtypes in human prostate. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: S252-S254.
- Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F (1993). Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 91: 1367-1373.
- Holmgren C, Nilsson S, Lanner L, Hellberg D (2005). Long-term results with tension-free vaginal tape on mixed and stress urinary incontinence. *Obstet Gynecol* 106: 38-43.

BIBLIOGRAFÍA

- Hu TW, Wagner TH, Bentkover JD, Leblanc K, Zhou SZ, Hunt T (2004). Costs of urinary incontinence and overactive bladder in the United States: a comparative study. *Urology* 63: 461-465.
- Huang SC (2005). Endothelin receptor in gastrointestinal smooth muscle. *Curr Protein Pept Sci* 6: 547-557.
- Hudman D, Elliott RA, Norman R (2000). K_{ATP} channels mediate the beta(2)-adrenoceptor agonist-induced relaxation of rat detrusor muscle. *Eur J Pharmacol* 397: 169-176.
- Hwang SJ, Valtschanoff JG (2003). Vanilloid receptor VR1-positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci Lett* 25: 41-44.
- Hypolite JA, Longhurst PA, Gong C, Briscoe J, Wein AJ, Levin RM (1993). Metabolic studies on rabbit bladder smooth muscle and mucosa. *Mol Cell Biochem* 125: 35-42.
- Iacovou JW, Hill SJ, and Birmingham AT (1990). Agonist-induced contraction and accumulation of inositol phosphates in the guinea-pig detrusor: evidence that muscarinic and purinergic receptors raise intracellular calcium by different mechanisms. *J Urol* 144: 775-779.
- Igawa Y, Yamazaki Y, Takeda H, Hayakawa K, Akahane M, Ajisawa Y, Yoneyama T, Nishizawa O, Andersson KE (1999). Functional and molecular biological evidence for a possible beta3-adrenoceptor in the human detrusor muscle. *Br J Pharmacol* 126: 819-825.
- Igawa Y, Yamazaki Y, Takeda H, Kaidoh K, Akahane M, Ajisawa Y, Yoneyama T, Nishizawa O, Andersson KE (2001). Relaxant effects of isoproterenol and selective β_3 -adrenoceptor agonists on normal, low compliant and hyperreflexic human bladders. *J Urol* 165: 240-244.
- Ikeda Y, Fry C, Hayashi F, Stolz D, Griffiths D, Kanai AJ (2007). Role of gap junctions in spontaneous activity of the rat bladder. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1018-F1025.
- Imai T, Okamoto T, Yamamoto Y, Tanaka H, Koike K, Shigenobu K, Tanaka Y (2001a). Effects of different types of K^+ channel modulators on the spontaneous myogenic contraction of guineapig urinary bladder smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 173: 323-333.
- Imai Y, Soda M, Inoue H, Hatori N, Mizuno Y, Takahashi R (2001b). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105: 891-902.
- Imai T, Tanaka Y, Okamoto T, Yamamoto Y, Horinouchi T, Tanaka H, Koike K, Shigenobu K. (2002). Evidence that action potential generation is not the exclusive determinant to trigger spontaneous myogenic contraction of guinea-pig urinary bladder smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 176: 57-63.
- Imaizumi Y, Torii Y, Ohi Y, Nagano N, Atsuki K, Yamamura H, Muraki K, Watanabe M, Bolton TB (1998). Ca^{2+} images and K^+ current during depolarization in smooth muscle cells of the guinea pig vas deferens and urinary bladder. *J Physiol* 510: 705-719.
- Imajo C, Walden PD, Shapiro E, Doherty AM, Lepor H (1997). Evaluation of the effect of endothelin-1 and characterization of the selective endothelin a receptor antagonist PD155080 in the prostate. *J Urol* 158: 253-257.
- Inoue R, Brading AF (1991). Human, pig and guinea-pig bladder smooth muscle cells generate similar inward currents in response to purinoceptor activation. *Br J Pharmacol* 103: 1840-1841.

BIBLIOGRAFÍA

- James MJ, Birmingham AT, Hill SJ (1993). Partial mediation by nitric oxide of the relaxation of human isolated detrusor strips in response to electrical field stimulation. *Br J Clin Pharmacol* 35: 366-372.
- Jeziro JR, Brady JD, Rosenstein DI, McCammon KA, Miner AS, Ratz PH (2001). Dependency of detrusor contractions on calcium sensitization and calcium entry through LOE-908-sensitive channels. *Br J Pharmacol* 134: 78-87.
- Ji G, Barsotti RJ, Feldman ME, Kotlikoff MI (2002). Stretch-induced calcium release in smooth muscle. *J Gen Physiol* 119: 533-544.
- John H, Hauri D, Bangerter U, Elbadawi A (2001). Ultrastructure of the trigone and its functional implications. *Urol Int* 67: 264-271.
- Johnström P, Fryer TD, Richards HK, Harris NG, Barret O, Clark JC, Pickard JD, Davenport AP (2005). Positron emission tomography using 18F-labelled endothelin-1 reveals prevention of binding to cardiac receptors owing to tissue-specific clearance by ETB receptors in vivo. *Br J Pharmacol* 144: 115-122.
- Kajioka S, Nakayama S, McMurray G, Abe K, Brading AF (2002). Ca²⁺ channel properties in smooth muscle cells of the urinary bladder from pig and human. *Eur J Pharmacol* 443: 19-29.
- Kalani M (2008). The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. *Vas Health Risk Manag* 4: 1061-1068.
- Kaneko Y, Herrera VLM, Didishvili T, Ruiz-Opazo N (2005). Sex-specific effects of dual ET-1/ANG II receptor (DEAR) variants in Dahl salt-sensitive hypertension rat model. *Physiol Genomics* 20: 157-164.
- Karicheti V, Christ GJ (2001). Physiological roles for K channels and gap junctions in urogenital smooth muscle: implications for improved understanding of urogenital function, disease and therapy. *Curr Drug Targets* 2: 1-20.
- Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR (1993). Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 268: 19126-19133.
- Keast JR, Stephensen TM (2000). Glutamate and aspartate immunoreactivity in dorsal root ganglion cells supplying visceral and somatic targets and evidence for peripheral axonal transport. *J Comp Neurol* 424: 577-587.
- Kelleher CJ, Tubaro A, Wang JT, Kopp Z (2008). Impact of Fesoterodine on quality of life: pooled data from two randomised trials. *BJU Int* 102: 56-61.
- Khan MA, Dashwood MR, Thompson CS, Mumtaz FH, Mikhailidis DP, Morgan RJ (1999). Upregulation of endothelin (ETA and ETB) receptors and downregulation of nitric oxide synthase in the detrusor of a rabbit model of partial bladder outlet obstruction. *Urol Res* 27: 445-453.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273: 245-248.
- Kiowski W, Luscher TF, Linder L, Buhler FR (1991). Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans. Reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor. *Circulation* 83: 469-475.

- Kishii K, Hisayama T, Takayanagi I (1992). Comparison of contractile mechanisms by carbachol and ATP in detrusor strips of rabbit urinary bladder. *Jpn J Pharmacol* 58: 219-229.
- Kita M, Yunoki T, Takimoto K, Miyazato M, Kita K, de Groat WC, Kakizaki H, Yoshimura N (2010). Effects of bladder outlet obstruction on properties of Ca^{2+} -activated K^+ . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R1310-R1319.
- Kobayashi H, Adachi-Akahane S, Nagao T (2000). Involvement of BK_{Ca} channels in the relaxation of detrusor muscle via betaadrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 404: 231-238.
- Kobayashi S, Tang R, Wang B, Opgenorth T, Langenstroer P, Shapiro E, Lepor H (1994). Binding and functional properties of endothelin receptor subtypes in the human prostate. *Mol Pharmacol* 45: 306-311.
- Kockskamper J, Seidlmayer L, Walther S, Hellenkamp K, Maier LS, Pieske B (2008). Endothelin-1 enhances nuclear Ca^{2+} transients in atrial myocytes through $Ins(1,4,5)P_3$ -dependent Ca^{2+} release from perinuclear Ca_2 stores. *J Cell Sci* 121: 186-195.
- Kohan DE (2006). The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15: 34-40.
- Krichevsky VP, Pagala MK, Vaydovsky I, Damer V, Wise GJ (1999). Function of M_3 muscarinic receptors in the rat urinary bladder following partial outlet obstruction. *J Urol* 161: 1644-1650.
- Kullmann FA, Artim DE, Birder LA, de Groat WC (2008). Activation of muscarinic receptors in rat bladder sensory pathways alters reflex bladder activity. *J Neurosci* 28: 1977-1987.
- Kullmann FA, Downs TR, Artim D, Limberg BJ, Shah M, Contract D, de Groat WC, Rosenbaum JS (2010). Urothelial beta3 adrenergic receptors in the rat bladder. *Neurourol Urodynam* 30: 144-150.
- Kullmann FA, Limberg BJ, Artim DE, Shah M, Downs TR, Contract D, Wos J, Rosenbaum JS, de Groat WC (2009). Effects of β_3 -adrenergic receptor activation on rat urinary bladder hyperactivity induced by ovariectomy. *J Pharmacol Exp Ther* 30: 704-717.
- Kurizaki Y, Ishizuka O, Imamura T, Ichino M, Ogawa T, Igawa Y, Nishizawa O, Andersson KE (2011). Relation between expression of $\alpha(1)$ -adrenoceptor mRNAs in bladder mucosa and urodynamic findings in men with lower urinary tract symptoms. *Scand J Urol Nephrol* 45: 15-19.
- LaBerge J, Malley SE, Zvarova K, Vizzard MA (2006). Expression of corticotropin-releasing factor and CRF receptors in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis. *Am J Physiol*: R692-R703.
- Laburthe M, Couvineau A, Marie JC (2002). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrinol Rev* 21: 619-670.
- Langenstroer P, Tang R, Divish B, Opgenorth T, Shapiro E, Lepor H (1997). Endothelins in canine genitourinary tissues. *J Urol* 157: 1044-1048.
- Laplante MA, de Champlain J (2006). The interrelation of the angiotensin and endothelin systems on the modulation of NAD(P)H oxidase. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 21-28.
- Large WA (2002). Receptor-operated Ca^{2+} permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13: 493-501.

BIBLIOGRAFÍA

- Lau WA, Ventura S, Jiang Q, Pennefather JN (1995). Endothelin-induced facilitation of sympathetic neurotransmission to the rat vas deferens: effects of suramin. *Eur J Pharmacol* 272: 31-38.
- Lecci A, Maggi CA (2001). Tachykinins as modulators of the micturition reflex in the central and peripheral nervous system. *Regul Pept* 101: 1-18.
- Lecci A, Maggi CA (2003). Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. *Expert Opinion in Therapeutic Targets* 7: 343-362.
- Li M, Sun Y, Simard JM, Chai TC (2011). Increased transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) signaling in idiopathic overactive bladder urothelial cells. *Neurourol Urodynam* 30: 606-611.
- Limberg BJ, Andersson KE, Aura Kullmann F, Burmer G, de Groat WC, Rosenbaum JS (2010). β -Adrenergic receptor subtype expression in myocyte and non-myocyte cells in human female bladder. *Cell Tissue Res* 342: 295-306.
- Longhurst PA, Levensky M (1999). Pharmacological characterization of [beta]-adrenoceptors mediating relaxation of the rat urinary bladder in vitro. *Br J Pharmacol* 127: 1744-1750.
- Maggi CA, Giuliani S, Patacchini R, Turini D, Barbanti G, Giachetti A, Meli A (1989). Multiple sources of calcium for contraction of the human urinary bladder muscle. *Br J Pharmacol* 98: 1021-1031.
- Maggi CA, Giuliani S, Meini S, Santicoli P (1995). Calcitonin gene related peptide as inhibitory neurotransmitter in the ureter. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 986-990.
- Mak DO, McBride S, Foskett JK (2001). Regulation by Ca^{2+} and inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) of single recombinant type 3 InsP3 receptor channels. Ca^{2+} activation uniquely distinguishes types 1 and 3 insp3 receptors. *J Gen Physiol* 117: 435-446.
- Marazziti D, Golini E, Gallo A, Lombardi MS, Matteoni R, Tocchini-Valentini GP (1997). Cloning of GPR37, a gene located on chromosome 7 encoding a putative G protein coupled peptide receptor, from a human frontal brain EST library. *Genomics* 45: 68-77.
- Martin A, Saqib KM, Hodgkin MN, Brown FD, Pettit TR, Armstrong S, Wakelam MJ (1997). Role and regulation of phospholipase D signalling. *Biochem Soc Trans* 25: 1157-1160.
- Martínez-Sáenz A, Barahona MV, Orensanz LM, Recio P, Bustamante S, Benedito S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D, Hernández M (2011a). Mechanisms involved in the non adrenergic, non cholinergic, non nitrenergic inhibitory neurotransmission to the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodynam* 30: 151-157.
- Martínez-Sáenz A, Recio P, Orensanz LM, Fernandes VS, Martínez MP, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D, Hernández M (2011b). Role of calcitonin gene-related peptide in inhibitory neurotransmission to the pig urinary bladder neck. *J Urol (En prensa)*.
- Masters JG, Neal DE, Gillespie JI (1999). The contribution of intracellular Ca^{2+} release to contraction in human bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* 127: 996-1002.
- Masuda H, Okuno T, Suzuki M, Kihara K, Goto M, Azuma H (2002). Different distribution of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase activities in the detrusor and proximal urethra of the rabbit. *J Urol* 168: 2286-2290.

BIBLIOGRAFÍA

- Masunaga K, Chappell CR, McKay NG, Yoshida M, Sellers DJ (2010). The β 3-adrenoceptor mediates the inhibitory effects of β -adrenoceptor agonists via the urothelium in pig bladder dome. *NeuroUrol Urodynam* 29: 1320-1325.
- May V, Vizzard MA (2010). Bladder dysfunction and altered somatic sensitivity in PACAP^{-/-} mice. *J Urol* 183: 772-779.
- McCloskey KD, Gurney AM (2002). Kit positive cells in the guinea pig bladder. *J Urol* 168: 832-836.
- McFadzean I, Gibson A (2002). The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 135: 1-13.
- McGuire EJ, Woodside JR (1981). Diagnostic advantages of fluoroscopic monitoring during urodynamic evaluation. *J Urol* 125: 830-834.
- McVary KT, Roehrborn CG, Kaminetsky JC, Auerbach SM, Wachs B, Young JM, Esler A, Sides GD, Denes BS (2007). Tadalafil relieves lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 177: 1404-1407.
- Meiden R, Levy N (2007). The ovarian endothelin network: an evolving story. *Trends Endocrinol Metab* 18: 379-385.
- Michel MC, Ochodnický P, Homma Y, Igawa Y (2011). β -Adrenoceptor agonist effects in experimental models of bladder dysfunction. *Pharmacol Ther* 131: 40-49.
- Michel MC, Vrydag W (2006). Alpha(1)-, alpha(2)- and betaadrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* 147: S88-S119.
- Minassian VA, Stewart WF, Wood GC (2008). Urinary incontinence in women: variation in prevalence estimates and risk factors. *Obstet Gynecol* 111: 324-331.
- Miyakawa T, Mizushima A, Hirose K, Yamazawa T, Bezprozvanny I, Kurosaki T, Iino M. (2001). Ca²⁺-sensor region of IP3 receptor controls intracellular Ca²⁺ signaling. *EMBO J* 20: 1674-1680.
- Mizuguchi T, Nishiyama M, Moroi K, Tanaka H, Saito T, Masuda Y, Masaki T, de Wit D, Yanagisawa M, Kimura S (1997). Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse. *Br J Pharmacol* 120: 1427-1430.
- Modesti PA, Vanni S, Panizza R et al. (1999). Endothelin receptors in adult human and swine isolated ventricular cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol* 58: 369-374.
- Moe GW, Rouleau JL, Nguyen QT, Cernacek P, Stewart DJ (2003). Role of endothelins in congestive heart failure. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 588-597.
- Montgomery BS, Fry CH (1992). The action potential and net membrane currents in isolated human detrusor smooth muscle cells. *J Urol* 147: 176-184.
- Moon A (2002). Influence of nitric oxide signalling pathways on precontracted human detrusor smooth muscle in vitro. *BJU Int* 89: 942-949.
- Moore KH, Ray FR, Barden JA (2001). Loss of purinergic P2X3 and P2X5 receptor innervation in human detrusor from adults with urge incontinence. *J Neurosci* 21: RC166.

BIBLIOGRAFÍA

- Morita T, Tsujii T, Dokita S (1992). Regional difference in functional roles of cAMP and cGMP in lower urinary tract smooth muscle contractility. *Urol Int* 49: 191-195.
- Mortensen LH (1999). Endothelin and the central and peripheral nervous systems: a decade of endothelin research. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 980-984.
- Mumtaz F, Dashwood M, Thompson C, Khan M, Naylor A, Mikhailidis D, Morgan R (2001). Autoradiographic localisation and contractile properties of prostatic endothelin receptors in patients with bladder outlet obstruction. *Eur Urol* 39: 48-56.
- Mumtaz FH, Dashwood MR, Thompson CS, Sullivan ME, Mikhailidis DP, Morgan RJ (1999). Increased expression of endothelin B receptors in the diabetic rabbit urinary bladder: functional relevance. *BJU Int* 83: 113-122.
- Murray E, Malley SE, Qiao LY, Hu VY, Vizzard MA (2004). Cyclophosphamide induced cystitis alters neurotrophin and receptor tyrosine kinase expression in pelvic ganglia and bladder. *J Urol* 172: 2434-2439.
- Nakahira Y, Hashitani H, Fukuta H, Sasaki S, Kohri K, Suzuki H (2001). Effects of isoproterenol on spontaneous excitations in detrusor smooth muscle cells of the guinea pig. *J Urol* 66: 335-340.
- Nakamura T, Kimura J, Yamaguchi O (2002). Muscarinic M₂ receptors inhibit Ca²⁺ activated K⁺ channels in rat bladder smooth muscle. *Int J Urol* 9: 689-696.
- Nakanishi K, Kamai T, Mizuno T, Arai K, Yamanishi T (2009). Expression of RhoA mRNA and activated RhoA in urothelium and smooth muscle, and effects of a Rho-kinase inhibitor on contraction of the porcine urinary bladder. *Neurourol Urodynam* 28: 521-528.
- Nishiguchi J, Kwon DD, Kaiho Y, Chancellor MB, Kumon H, Snyder PB, Yoshimura N (2007). Suppression of detrusor overactivity in rats with bladder outlet obstruction by a type 4 phosphodiesterase inhibitor. *BJU Int* 99: 680-686.
- Nomiya M, Yamaguchi O (2003). A quantitative analysis of mRNA expression of alpha 1 and beta adrenoceptor subtypes and their functional roles in human normal and obstructed bladders. *J Urol* 170: 649-653.
- North AJ, Gimona M, Cross RA, Small JV (1994). Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells. *J Cell Sci* 107: 437-444.
- Nunn DL, Taylor CW (1992). Luminal Ca²⁺ increases the sensitivity of Ca²⁺ stores to inositol 1,4,5-trisphosphate. *Mol Pharmacol* 41: 115-119.
- Oger S, Behr-Roussel D, Gorny D, Bernabé J, Comperat E, Chartier-Kastler E, Denys P, Giuliano F (2010a). Effects of potassium channel modulators on myogenic spontaneous phasic contractile activity in human detrusor from neurogenic patients. *BJU Int* 16. Doi: 10.1111.
- Oger S, Behr-Roussel D, Gorny D, Leuret T, Validire P, Cathelineau X, Alexandre L, Giuliano F (2010b). Signalling pathways involved in sildenafil-induced relaxation of human bladder dome smooth muscle. *Br J Pharmacol* 160: 1135-1143.
- Okamoto-Koizumi T, Takeda M, Komeyama T, Hatano A, Tamaki M, Mizusawa T, Tsutsui T, Obara K, Tomita Y, Arai K, Takahashi K (1999). Pharmacological and molecular biological evidence for ETA endothelin receptor subtype mediating mechanical responses in the detrusor smooth muscle of the human urinary bladder. *Clin Sci (Lond)* 96: 397-402.

BIBLIOGRAFÍA

- Otsuka A, Shinbo H, Matsumoto R, Kurita Y, Ozono S (2008). Expression and functional role of beta-adrenoceptors in the human urinary bladder urothelium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377: 473-481.
- Ouslander JG (2004). Management of overactive bladder. *N Engl J Med* 350: 786-799.
- Ozaki S, Ohwaki K, Ihara M, Fukuroda T, Ishikawa K, Yano M (1995). ETB mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 483-489.
- Pandita RK, Mizusawa H, Andersson KE (2000). Intravesical oxyhemoglobin initiates bladder overactivity in conscious, normal rats. *J Urol* 164: 545-550.
- Park JM, Bloom DA, McGuire EJ (1997). The guarding reflex revisited. *Br J Urol* 80: 940-945.
- Parsons CL (2007). The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis. *Urology* 69: 9-16.
- Perlberg S, Caine M (1982). Adrenergic response of bladder muscle in prostatic obstruction. Its relation to detrusor instability. *Urology* 20: 524-527.
- Petkov GV, Bonev AD, Heppner TJ, Brenner R, Aldrich RW, Nelson MT (2001). Beta1-subunit of the Ca²⁺-activated K⁺ channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle. *J Physiol* 537: 443-452.
- Pfizer G, Hofmann F, DiSalvo J, Ruegg JC (1984). cGMP and cAMP inhibit tension development in skinned coronary arteries. *Pflugers Arch* 401: 277-280.
- Pollock DM, Pollock JS (2005). Endothelin and oxidative stress in the vascular system. *Curr Vasc Pharmacol* 3: 365-367.
- Putney JW Jr (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7: 1-12.
- Recio P, Barahona MV, Orensanz LM, Bustamante S, Martínez AC, Benedito S, García-Sacristán A, Prieto D, Hernández M (2009). 5-hydroxytryptamine induced relaxation in the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 157: 271-280.
- Recio P, Orensanz LM, Martínez MP, Navarro-Dorado J, Bustamante S, García-Sacristán A, Prieto D, Hernández M (2008). Noradrenergic vasoconstriction of pig prostatic small arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 376: 397-406.
- Restorick JM, Mundy AR (1989). The density of cholinergic and alpha and beta adrenergic receptors in the normal and hyperreflexic human detrusor. *Br J Urol* 63: 32-35.
- Reubi JC (2000). In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 921: 1-25.
- Robinson D, Cardozo L (2010). New drug treatments for urinary incontinence. *Maturitas* 65: 340-347.
- Rohner TJ, Hannigan JD, Sanford EJ (1978). Altered in vitro adrenergic responses of dog detrusor muscle after chronic bladder outlet obstruction. *Urology* 11: 357-361.
- Roosen A, Fry CH, Sui G, Wu C (2009). Adreno-muscarinic synergy in the bladder trigone: calcium-dependent and -independent mechanisms. *Cell Calcium* 45: 11-17.

BIBLIOGRAFÍA

- Rossi GP, Andreis PG, Colonna S, Albertin G, Aragona F, Belloni AS, Nussdorfer GG (2002). Endothelin-1[1-31]: a novel autocrine-paracrine regulator of human adrenal cortex secretion and growth. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 322-328.
- Ruggieri MR Sr, Braverman AS (2006). Regulation of bladder muscarinic receptor subtypes by experimental pathologies. *Auton Autacoid Pharmacol* 26: 311-325.
- Ruiz-Opazo N, Hirayam K, Akimoto K, Herrera VLM (1998). Molecular characterization of a dual endothelin-1/angiotensin II receptor. *Mol Med* 4: 96-108.
- Russel FD, Molenaar P (2000). The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. *Trends Pharmacol Sci* 21: 353-359.
- Russell FD, Skepper JN, Davenport AP (1998). Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin converting enzyme. *Circ Res* 83: 314-321.
- Saban MR, Backer J, Backer MV, Maier J, Fowler B, Davis CA, Simpson C, Wu XR, Birder L, Freeman MR, Soker S, Hurst RE, Saban R (2008). VEGF receptors and neuropilins are expressed in the urothelial and neuronal cells in normal mouse urinary bladder and are upregulated in inflammation. *Am J Physiol* 295: F60-F72.
- Sadananda P, Shang F, Liu L, Mansfield KJ, Burcher E (2009). Release of ATP from rat urinary bladder mucosa: role of acid, vanilloids and stretch. *Br J Pharmacol* 158: 1655-1662.
- Sáenz de Tejada I, Mueller JD, De las Morenas A, Machado M, Moreland RB, Krane RJ, Wolfe HJ, Traish AM (1992). Endothelin in the urinary bladder. Synthesis of endothelin-1 by epithelia, smooth muscle and fibroblasts suggests autocrine and paracrine cellular regulation. *J Urol* 148: 1290-1298.
- Sairam K, Kulinskaya E, McNicholas TA, Boustead GB, Hanbury DC (2002). Sildenafil influences lower urinary tract symptoms. *BJU Int* 90: 836-839.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348: 732-735.
- Sánchez A, Recio P, Orensanz LM, Bustamante S, Navarro-Dorado J, Climent B, Benedito S, García-Sacristán A, Prieto D, Hernández M (2010). Mechanisms involved in the effects of endothelin-1 in pig prostatic small arteries. *Eur J Pharmacol* 640: 190-196.
- Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 275: 21722-21729.
- Schinelli S (2006). Pharmacology and physiopathology of the brain endothelin system: an overview. *Curr Med Chem* 13: 627-638.
- Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev* 21: 619-670.
- Shmygol A, Wray S (2005). Modulation of agonist-induced Ca²⁺ release by SR Ca²⁺ load: direct SR and cytosolic Ca²⁺ measurements in rat uterine myocytes. *Cell Calcium* 37: 215-223.

BIBLIOGRAFÍA

- Shyamala V, Moulthrop TH, Stratto-Thomas J, Takamp-Olson P (1994). Two distinct human endothelin B receptors generated by alternative splicing from a single gene. *Cell Mol Biol Res* 40: 285-296.
- Sigala S, Mirabella G, Peroni A, Pezzotti G, Simeone C, Spano P, Cunico SC (2002). Differential gene expression of cholinergic muscarinic receptor subtypes in male and female normal human urinary bladder. *Urology* 60: 719-725.
- Simonson MS, Dunn MJ (1990). Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J* 4: 2989-3000.
- Schiffrin EL (2005). Vascular endothelin in hypertension. *Vasc Pharmacol* 43: 19-29.
- Schiffrin EL, Touyz RM (1998). Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 32: S2-S13.
- Smirnov SV, Aaronson PI (1992). Ca²⁺ currents in single myocytes from human mesenteric arteries: evidence for a physiological role of L-type channels. *J Physiol* 457: 455-475.
- Somlyo AP, Somlyo AV (2003). Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83: 1325-1358.
- Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, Xavier M, Patel AS, Nelson JB, Futrell WJ, Yoshimura N, Chancellor MB, De Miguel F (2004). Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol* 172: 1175-118.
- Streng T, Christoph T, Andersson KE (2004). Urodynamic effects of the K channel (KCNQ) opener retigabine in freely moving, conscious rats. *J Urol* 172: 2054-2058.
- Stull JT, Hsu LC, Tansey MG, Kamm KE (1990). Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 265: 16683-16690.
- Sui GP, Rothery S, Dupont E, Fry CH, Severs NJ (2002). Gap junctions and connexin expression in human suburothelial interstitial cells. *BJU Int* 90: 118-129.
- Sui GP, Wu C, Fry CH (2006). Characterization of the purinergic receptor subtype on guinea-pig suburothelial myofibroblasts. *BJU Int* 97: 1327-1331.
- Takasaki C, Tamiya N, Bdoлах A, Wollberg Z, Kochva E (1988). Sarafotoxins S6, several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. *Toxicon* 26: 543-548.
- Taylor AH, Al-Azzawi F (2000). Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrin* 24: 145-155.
- Tertyshnikova S, Matson JA, Thalody G, Lodge NJ (2003). Partially purified *Grammostola spatulata* venom inhibits stretch activated calcium signaling in bladder myocytes and improves bladder compliance in an in vitro rat whole bladder model. *J Urol* 169: 756-760.
- Theobald RJ Jr (1996). The effect of NG-monomethyl-L-arginine on bladder function. *Eur J Pharmacol* 311: 73-78.
- Thorneloe KS, Nelson MT (2003). Properties and molecular basis of the mouse urinary bladder voltage-gated K current. *J Physiol* 549: 65-74.

BIBLIOGRAFÍA

- Tominaga M, Wada M, Masu M (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *PNAS* 98: 6951-6956.
- Tostes RC, Fortes ZB, Callera GE, Montezano AC, Touyz RM, Webb RC, Carvalho MH. (2008). Endothelin, sex and hypertension. *Clin Sci (Lond)* 114: 85-97.
- Traish A, Moran E, Krane RJ, Saenz de Tejada I (1992). Endothelin in the urinary bladder. II Characterization of endothelin receptor subtypes. *J Urol* 148: 1299-1306.
- Tramontana M, Catalioto RM, Lecci A, Maggi CA (2000). Role of prostanoids in the contraction induced by a tachykinin NK2 receptor agonist in the hamster urinary bladder. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361: 452-459.
- Truschel ST, Wang E, Ruiz WG, Leung SM, Rojas R, Lavelle J, Zeidel ML, Stoffer D, Apodaca G (2002). Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell* 13: 830-846.
- Turner AJ, Barnes K, Schweizer A, Valdenaire O (1998). Isoforms of endothelin-converting enzyme: why and where? *Trends Pharmacol Sci* 19: 483-486.
- Turner AJ, Tanzawa K (1997). Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J* 11: 355-364.
- Tyagi P, Tyagi V, Chancellor M (2011). Mirabegron: a safety review. *Expert Opin Drug Saf* 10: 287-294.
- Uchida W, Masuda N, Shirai Y, Shibasaki K, Satoh N, Takenada T (1994). The role of extracellular Ca²⁺ in carbachol-induced tonic contraction of the pig detrusor smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 350: 398-402.
- Ukai M, Yuyama H, Fujimori A, Koakutsu A, Sanagi M, Ohtake A, Sato S, Sudoh K, Sasamata M, Miyata K (2008). In vitro and in vivo effects of endothelin-1 and YM598, a selective endothelin ET_A receptor antagonist, on the lower urinary tract. *Eur J Pharmacol* 580: 394-400.
- Vasko MR, Campbell WB, Waite KJ (1994). Prostaglandin E₂ enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci* 14: 4987-4997.
- Vassileva I, Mountain C, Pollock DM (2003). Functional role of ETB receptors in the renal medulla. *Hypertension* 41: 1359-1363.
- Wada Y, Latifpour J, Sanematsu H, Afiatpour P, Wang Z, Saito M, Nishi K, Weiss RM (2000). Age-related changes in contractile responses of rabbit lower urinary tract to endothelin. *J Urol* 164: 806-813.
- Watts SW (2010). Endothelin receptors: what's new and what do we need to know? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R254-R260.
- Weaver-Osterholtz D, Reams G, Wu Z, Knaus J, Campbell F, Bauer JH (1996). The urinary bladder angiotensin system: response to infusions of angiotensin I and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Kidney Dis* 28: 603-609.
- Wellner MC, Isenberg G (1993). Properties of stretch-activated channels in myocytes from the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol* 466: 213-227.

BIBLIOGRAFÍA

- Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble JP, Westfall TD (2003). Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* 138: 757-766.
- Wu C, Sui G, Fry CH (2002). The role of the L-type Ca^{2+} channel in refilling functional intracellular Ca^{2+} stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J Physiol* 538: 357-369.
- Wuest M, Eichhorn B, Grimm MO, Wirth MP, Ravens U, Kaumann AJ (2009). Catecholamines relax detrusor through beta 2-adrenoceptors in mouse and beta 3-adrenoceptors in man. *J Pharmacol Exp Ther* 328: 213-222.
- Wu-Wong JR (1998). Sticky conundrums in the endothelin system: unique binding characteristics of receptor agonists and antagonists, In: *Endothelin Receptors and Signaling Mechanisms* (Pollock, D.M. and Highsmith, R.F., eds), pp. 23-40, Springer-Verlag, Berlin.
- Yamaguchi O, Shishido K, Tamura K, Ogawa T, Fujimura T, and Ohtsuka M (1996). Evaluation of mRNAs encoding muscarinic receptor subtypes in human detrusor muscle. *J Urol* 156: 1208-1213.
- Yamanishi T, Chapple CR, Yasuda K, Yoshida K, Chess-Williams R (2002). The role of β_3 -adrenoceptors in mediating relaxation of porcine detrusor muscle. *Br J Pharmacol* 135: 129-134.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415.
- Yang JM, Huang WC (2004). The significance of urethral hyperchogenicity in female lower urinary tract symptoms. *Ultrasound Obstet Gynecol* 24: 67-71.
- Yokoyama O (2010). Pharmacological and genetic analysis of mechanisms underlying detrusor overactivity in rats. *Neurourol Urodynam* 29: 107-111.
- Yoshida A, Sakurai-Yamashita Y, Yamashita K, Tanaka N, Taniyama K (2003). Role of endothelin ETA and ETB receptors in the guinea-pig urinary bladder contraction. *Eur J Pharmacol* 470: 99-102.
- Yoshimura N (2003). New insights into neural mechanisms controlling the micturition reflex. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 121: 290-298.
- Yoshimura N, Chancellor MB (2007). Physiology and pharmacology of the bladder and urethra. Section XIV, Chapter 56). In: Wein AJ (ed) *Campbell-Walsh urology*. vol. 3. 9th edn. Saunders Philadelphia, PA, pp 1922-1972.
- Yoshimura N, Kaiho Y, Miyazato M, Yunoki T, Tai C, Chancellor MB, Tyagi P (2008). Therapeutic receptor targets for lower urinary tract dysfunction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377: 437-448.
- Yoshiyama M, de Groat WC (2008). The role of vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the neural pathways controlling the lower urinary tract. *J Mol Neurosci* 36: 227-240.
- Yu C, Yang Z, Ren H, Zhang Y, Han Y, He D, Lu Q, Wang X, Wang X, Yang C, Asico LD, Hopfer U, Eisner GM, Jose PA, Zeng C (2009). D3 dopamine receptor regulation of ETB receptors in renal proximal tubule cells from WKY and SHR. *Am J Hypertens* 22: 877-883.

BIBLIOGRAFÍA

Zahradník I, Györke S, Zahradníková A (2005). Calcium activation of ryanodine receptor channels--reconciling RyR gating models with tetrameric channel structure. *J Gen Physiol* 126: 515-527.

8. RESUMEN

La incontinencia urinaria es una patología muy frecuente, que afecta a todos los grupos de población, edad y sexo, con un extraordinario impacto negativo sobre la calidad de la vida de las personas que lo padecen, como consecuencia de la relación existente entre incontinencia, ansiedad y depresión. En los Estados Unidos en el año 2000, el 55% de mujeres y el 34% de hombres mayores de 60 años y un 42% de mujeres y un 5% de hombres menores de 60 años padecían diferentes grados de incontinencia urinaria con tratamientos de elevado coste económico (presupuesto anual de 19 billones de dólares) (Hu y col., 2004). En nuestro país, el gasto en absorbentes en 2001 fue de 197 millones de euros, que representa un 3.2% del importe total de la prestación farmacéutica del Sistema Nacional de Salud.

Las incontinencias urinarias de estrés Tipo III se producen por disfuncionalidad del mecanismo esfintérico intrínseco que origina un cuello de vejiga urinaria abierto permanentemente (McGuire y Woodside, 1981). Dicha patología afecta esencialmente a la población femenina constituyendo la forma más grave de incontinencia urinaria, la de mayor frecuencia de presentación en postoperatorios de intervenciones quirúrgicas retropúbicas (cirugías ginecológicas y prostáticas) y con terapias farmacológicas de escasa eficacia en las que se utilizan esencialmente agonistas de los receptores adrenérgicos α_1 e inhibidores de la recaptación de 5-HT (como la duloxetina) para producir contracción de la base de la vejiga urinaria.

La existencia de un cuello abierto está directamente relacionado con la presencia de incontinencia urinaria producida por deficiencia esfintérica intrínseca (English y col., 1999). El conocimiento de la naturaleza de los transmisores y/o moduladores, así como de los mecanismos involucrados en la tensión del músculo liso del cuello de la vejiga urinaria es esencial para una correcta terapia en los cuadros de incontinencia urinaria. El esfínter interno está constituido por la musculatura lisa del cuello de la vejiga urinaria y la uretra proximal, formando ambas estructuras la región de salida de orina de la vejiga, unidad funcional cuya actividad está regulada por un sistema localizado en el cerebro (sustancia gris periacueductal y centro pontino de la micción) y en la

RESUMEN

médula espinal (inervación adrenérgica y colinérgica a través del nervio hipogástrico y pélvico procedentes de los segmentos medulares toracolumbares T11-L2 y sacros S2-S4, respectivamente). Asimismo, existe una regulación somática del esfínter estriado externo a cargo del nervio pudiendo cuyo origen tiene lugar en el núcleo de Onuf, por lo que lesiones a nivel toracolumbar y/o lumbosacro originan la alteración funcional del mecanismo esfintérico intrínseco (Haab y col., 1996; De Groat, 2006). Junto con la regulación nerviosa central, diferentes mediadores inhibidores no adrenérgicos no colinérgicos, como el NO, el VIP y el ATP han sido propuestos como responsables de la regulación ejercida por el SNA sobre la tensión de la musculatura lisa del cuello vesical (Hills y col., 1984; Andersson y Wein, 2004). De hecho, el NO, cuya liberación desde los nervios es modulada por receptores adrenérgicos α_2 y canales Kv de localización presináptica, está involucrado en la neurotransmisión inhibitoria NANC del cuello vesical (Hernández y col., 2007, 2008). Asimismo, el ATP, la 5-HT y péptidos como el VIP y el PACAP, están implicados en la relajación de dicha estructura. Así, el ATP produce relajación del cuello de la vejiga vía activación de receptores purinérgicos P2Y₁ y A_{2A} después de la hidrólisis del ATP a ADP y adenosina, respectivamente (Hernández y col., 2009), mientras que la 5-HT produce relajación a través de receptores musculares 5-HT₇ acoplados a la vía de la PKA (Recio y col., 2009). El PACAP y el VIP producen relajación del cuello vesical a través de receptores musculares del subtipo VPAC₂ acoplados a la vía de la PKA, mientras que receptores PAC₁ localizados en aferentes primarias sensibles a la capsaicina y acoplados a la liberación de NO y receptores VPAC inhibidores situados en terminaciones nerviosas motoras median las relajaciones inducidas por el PACAP 38 y el VIP, respectivamente (Hernández y col., 2006a,b). Junto con los mediadores anteriormente mencionados, nuestro laboratorio ha demostrado, la existencia de un componente nervioso relajante independiente de NO de naturaleza desconocida, el cual, es responsable de más del 50% de la neurotransmisión inhibitoria del cuello de la vejiga urinaria (Hernández y col., 2008).

La rica presencia de receptores de endotelinas en la próstata del hombre (Kobayashi y col., 1994) y el hecho que la expresión y la actividad de dichos receptores sea modificada en diversas situaciones fisiopatológicas, tales como, la obstrucción uretral (Khan y col., 1999) y el envejecimiento (Wada y col., 2000), sugieren que tanto receptores de endotelinas como los mecanismos subyacentes acoplados puedan ser dianas terapéuticas en la obstrucción uretral asociada con la HBP y en la incontinencia urinaria (Mumtaz y col., 2001; Andersson, 2007; Ukai y col., 2008). Sin embargo, existe una escasa información referida a las vías de señalización involucradas en la contracción inducida por la ET-1, a la posible acción moduladora de las endotelinas sobre la transmisión nerviosa, así como a la existencia de receptores de endotelina ET_B produciendo relajación del cuello vesical. Por tanto, el presente estudio tiene como objetivo general investigar la acción directa inducida por la ET-1 sobre la tensión de la musculatura lisa del cuello de la vejiga urinaria, así como, su posible papel modulador sobre la transmisión excitadora y/o inhibidora de dicha estructura, con la finalidad de aportar terapias farmacológicas efectivas en la incontinencia urinaria de estrés tipo III producida por deficiencia esfintérica intrínseca. Para ello y mediante diferentes abordajes experimentales (inmunohistoquímica, *Western Blotting* y registro de fuerza isométrica), estudiamos la presencia de receptores de endotelina funcionalmente activos involucrados en la contracción y en la relajación del cuello de la vejiga del cerdo, así los mecanismos involucrados en dicha respuesta (caracterización farmacológica de los receptores funcionalmente activos, papel de las vías del NO/GMPc y COX, ATPasa de la bomba Na⁺-K⁺ y canales de K⁺) y la implicación de los receptores ET_B en la neurotransmisión NANC inhibidora del cuello vesical.

Mediante el análisis de los nuestros resultados podemos concluir que:

1º La ET-1 produce contracción del cuello de la vejiga urinaria del cerdo vía activación de receptores ET_A musculares acoplados a la entrada de Ca²⁺ extracelular a través de canales de Ca²⁺ dependientes (tipo L) e independientes de voltaje. Asimismo, la movilización de Ca²⁺ intracelular y mecanismos

independientes de la $[Ca^{2+}]_i$ vía Rho/Rhocinasa parecen estar también involucrados en dicha respuesta.

2º La ET-1 potencia la contracción inducida por la NA y receptores de endotelina ET_A neuronales modulan la neurotransmisión inhibitoria NANC dependiente de NO en el cuello vesical.

3º Receptores ET_B presentes en el músculo median la relajación del cuello vesical a través de mecanismos independientes del NO y la COX, vía activación de la PKA e involucrando la apertura de canales BK_{Ca} y SK_{Ca} .

4º Los receptores ET_B están, asimismo, involucrados en la modulación de la neurotransmisión NANC inhibitoria. Este es el primer estudio que demuestra la implicación de receptores de endotelina musculares ET_B en la relajación del músculo liso de la región de salida de orina de la vejiga.

5º El conjunto de nuestros resultados indica que receptores de endotelina ET_A y ET_B están implicados en la contracción y la relajación, respectivamente, de la musculatura lisa del cuello de la vejiga urinaria del cerdo. Agonistas y antagonistas de dichos receptores, así como las vías de señalización intracelular acopladas a los mismos podrían ser dianas terapéuticas en la incontinencia urinaria de estrés producida por deficiencia esfintérica intrínseca.