

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA**

**Sección Departamental de Fisiología (Fisiología Animal)**



**PAPEL DEL PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA  
CALCITONINA (CGRP) EN LA NEUROTRANSMISIÓN  
INHIBIDORA DEL CUELLO DE LA VEJIGA URINARIA Y SU  
IMPLICACIÓN EN LA FISIOLOGÍA VESICAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Ana Martínez Sáenz**

Bajo la dirección de los doctores

Medardo Hernández Rodríguez  
Albino García Sacristán

**Madrid, 2012**

**ISBN:**

**©Ana Martínez Sáenz, 2011**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



PAPEL DEL PÉPTIDO RELACIONADO CON  
EL GEN DE LA CALCITONINA EN LA  
NEUROTRANSMISIÓN INHIBIDORA DEL  
CUELLO DE LA VEJIGA URINARIA Y SU  
IMPLICACIÓN EN LA FISIOLÓGÍA VESICAL

TESIS DOCTORAL

ANA MARTÍNEZ SÁENZ

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 del Departamento Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, respectivamente,

CERTIFICAN:

Que D<sup>a</sup> Ana Martínez Sáenz, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación titulado “Papel del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en la neurotransmisión inhibitoria del cuello de la vejiga urinaria y su implicación en la fisiología vesical” como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Mayo de 2011

Dr. Medardo Hernández Rodríguez

Prof.Dr. Albino García Sacristán



A mis padres y a mis hermanas,



Si no te ha sorprendido nada extraño durante el día,  
es que no ha habido día.

John Archibald



## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que debo agradecer su aportación, de forma tanto directa o indirecta, a mi tesis, tanto por su apoyo científico como por el personal. Durante el periodo en el que he realizado este trabajo, he estado rodeada de personas estupendas a las que me gustaría dar las gracias.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi director de tesis, el Dr. Medardo Vicente Hernández Rodríguez, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con él, de haberme introducido en este mundo de la investigación y haberme sabido transmitido su pasión por él, y, sobre todo, por haberme guiado, con el rigor científico que le caracteriza, muy de cerca, en este trabajo día a día, apoyarme, darme consejos cuando los he necesitado y, en fin, por su dedicación y paciencia.

Al Profesor Albino García Sacristán, co-director de esta Tesis, por la acogida recibida en el departamento de Fisiología Animal. Gracias por aceptarme en un grupo de trabajo tan profesional y brillante y por los consejos recibidos.

Me gustaría también agradecer a la Dra. Paz Recio, a la Dra. Ana Sánchez y a la Dra. Belén Climent por enseñarme, ayudarme, escucharme, aconsejarme..... en definitiva, por hacer este camino muchísimo más fácil y llevadero.

Al resto del profesorado del departamento de Fisiología, por su disposición y ayuda. Gracias al Prof. Luis Rivera de los Arcos, Dra. Dolores Prieto Ocejo, Dra. Sara Benedito, Dra. Cristina Martínez, Dra. Emilia Muñoz, Dra. Elvira López-Oliva, Dr. Ángel Agis y Dra. Rafaela Raposo.

A Cristífu, Vitor y AnaSofi, por compartir mis agobios, por escucharme, por la compañía en el zulito y sobre todo por ayudarme en todo lo que les ha sido posible y más. Suerte en todos vuestros proyectos de futuro.

A Maca, Paquito y Manolo por su apoyo técnico y administrativo, pero sobre todo, por su capacidad de hacer el día a día mucho más ameno y divertido.

A la Dra. María Pilar Martínez del Departamento de Anatomía de la Facultad de Veterinaria de la UCM por su gran trabajo realizado con la inmunocitoquímica. Gracias por su colaboración en todo momento.

Al Dr. Luis Orensanz del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal, por su colaboración con la técnica del Western Blotting, sus enseñanzas, sus consejos y estar siempre tan dispuesto a ayudar.

Al Dr. Salvador Bustamante, Facultativo Especialista del Servicio de Urología del Hospital Universitario Puerta del Hierro, por ser un apoyo los primeros días de esta “inmersión” en el mundo de la ciencia y estar siempre dispuesto a resolver mis dudas.

A la Dra. María Victoria Barahona del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la UCM, por sus correcciones, consejos y por todo el tiempo que ha dedicado a ello, me ha sido de gran ayuda.

A todas mis amigas y amigos, tanto a los de aquí, como del “poblar” como los dispersos por el mundo. Por darme ánimos, aguantar mis “chapas” tanto en persona como por teléfono, por el skype, por esas visitas... aunque no supieran de lo que estaba hablando y porque, sin darse cuenta, me han ayudado mucho.

Por supuesto me gustaría dar un millón de gracias a mi familia. Mis padres y mis hermanas han sido el pilar fundamental que me ha permitido realizar esta Tesis y todo lo que me ha traído hasta aquí. Me han motivado, me han apoyado en todas las decisiones, han sabido enterderme y ayudarme, han compartido mis alegrías y por eso no tengo palabras para agradecerse. También dar las gracias a Chicho y Luigi y por supuesto a mi yaya Antonia por sus “rezos” a lo largo de todos estos años de estudio.

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	Adenosina 5'-difosfato
AMP <sub>c</sub>	Adenosina monofosfato cíclico
4-AP	4-aminopiridina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BK <sub>Ca</sub>	Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia
BR	Receptor de bradicinina
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio intracelular
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CGRP <sub>1</sub>	Receptor de CGRP tipo 1
CGRP <sub>2</sub>	Receptor de CGRP tipo 2
ChTX	Caribdotoxina
Cl <sup>-</sup>	Ión cloro
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CPR	Componente proteico del receptor
CRF	Factor liberador de corticotropina
DG	Diacilglicerol
ET-1	Endotelina-1
ET-2	Endotelina-2
ET-3	Endotelina-3
ET <sub>A</sub>	Receptor de endotelina tipo A
ET <sub>B</sub>	Receptor de endotelina tipo B
FE	Fenilefrina
G <sub>i</sub>	Subunidad inhibidora de las proteínas G
GMP <sub>c</sub>	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
H <sup>+</sup>	Protón
5-HT	Serotonina

HBP	Hiperplasia benigna de próstata
IbTX	Iberiotoxina
ICS	Sociedad Internacional de Continencia
IE	Incontinencia por estrés
IK <sub>Ca</sub>	Canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia
IL-1	Interleucina -1
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
IP <sub>3</sub> r	Receptores de inositol trifosfato
IU	Incontinencia de urgencia
K <sup>+</sup>	Ión potasio
K <sub>Ca</sub>	Canales de potasio activados por calcio
K <sub>ATP</sub>	Canales de potasio dependientes de ATP
K <sub>v</sub>	Canales de potasio dependientes de voltaje
L-NOARG	N <sup>G</sup> - 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 <sup>+</sup>	Ión sodio
NANC	No adrenérgico no colinérgico
NK <sub>1</sub>	Receptor de taquicinninas del subtipo 1
NK <sub>2</sub>	Receptor de taquicinninas del subtipo 2
NK <sub>3</sub>	Receptor de taquicinninas 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 inducible
nNOS	Enzima de síntesis de óxido nítrico neuronal
NPY	Neuropéptido Y
NS398	N-[2-ciclohexiloxil-4-nitrofenil] metanosulfonamida

ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a] quinoxalina-1-ona
PAC <sub>1</sub>	Receptor específico de PACAP
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiario
PDE	Fosfodiesterasa
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandina E <sub>1</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
PGs	Prostaglandinas
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5 difosfato
PKA	Proteína cinasa dependiente del AMPc
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
PLC	Fosfolipasa C
RAMP	Proteína modificadora de la actividad del receptor de CGRP
Rho	Cinasa específica
Rhok	Rho-cinasa asociada
ROC	Canales de calcio activados por receptor
RS	Reticulo sarcoplásmico
SC560	5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol
SK <sub>Ca</sub>	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
TRP	Receptores vaniloides
TRPV1	Canal iónico de la familia de receptores vaniloides
TTX	Tetrodotoxina
TUI	Cuadro sintomatológico del Tracto Urinario Inferior
ω-CgTX	Omega-conotoxina GVIA
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

VOC	Canales de calcio dependientes de voltaje
VPAC <sub>1</sub>	Receptor con similar afinidad por VIP y PACAP tipo 1
VPAC <sub>2</sub>	Receptor con similar afinidad por VIP y PACAP tipo 2

# ÍNDICE



1.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1	ANATOMÍA DEL TRACTO URINARIO INFERIOR.....	3
1.2	FUNCIÓN DE LA VEJIGA URINARIA.....	5
1.3	UROTELIO Y SUBUROTELIO.....	11
1.4	ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN.....	16
	1.4.1 Regulación de las proteínas contráctiles.....	16
1.5	EXCITACIÓN DE LA MEMBRANA.....	19
	1.5.1 Potencial de la membrana en reposo y potencial de acción.....	19
	1.5.2 Papel del Ca <sup>2+</sup> en la contracción.....	20
	1.5.3 Canales de Ca <sup>2+</sup> .....	21
	1.5.3.1 Canales de Ca <sup>2+</sup> activados por voltaje.....	21
	1.5.3.2 Canales de Ca <sup>2+</sup> activados por agonistas.....	22
	1.5.3.3 Canales de Ca <sup>2+</sup> activados por depósito.....	23
	1.5.4 Mecanismos de liberación de Ca <sup>2+</sup> intracelular.....	23
	1.5.4.1 Inositol trifosfato.....	24
	1.5.4.2 Receptor de rianodina.....	25
	1.5.5 Canales de K <sup>+</sup> .....	27
	1.5.5.1 Canales de K <sub>ATP</sub> .....	27
	1.5.5.2 Canales de K <sub>Ca</sub> .....	28
	1.5.5.3 Canales de K <sub>v</sub> .....	29
	1.5.6 Canales activados por estiramiento.....	30
	1.5.7 Canales activados por ligando.....	31
	1.5.8 Actividad miogénica.....	31
	1.5.9 Células intersticiales.....	33

1.6	CONTROL NERVIOSO Y HORMONAL.....	34
1.6.1	Mecanismos colinérgicos.....	34
1.6.1.1	Receptores muscarínicos.....	34
1.6.2	Mecanismos adrenérgicos.....	36
1.6.2.1	Receptores adrenérgicos $\alpha$ .....	36
1.6.2.2	Receptores adrenérgicos $\beta$ .....	37
1.6.3	Mecanismos no adrenérgicos no colinérgicos.....	39
1.6.3.1	ATP.....	40
1.6.3.2	Óxido nítrico.....	41
1.6.3.3	Neuropéptidos.....	43
1.6.3.3.1	PACAP Y VIP.....	43
1.6.3.3.2	Endotelinas.....	44
1.6.3.3.3	Taquicininas.....	45
1.6.3.3.4	Angiotensinas.....	46
1.6.3.4	Prostanoides.....	47
1.6.3.5	Inhibidores de las fosfodiesterasas.....	48
1.7	FISIOPATOLOGÍA DEL TRACTO URINARIO INFERIOR.....	48
1.8	PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP).....	53
1.8.1	Estructura, síntesis, liberación y mecanismo de acción.....	53
1.8.2	Actividad biológica.....	56
1.8.3	Tracto Urinario.....	59
1.8.3.1	Uréter.....	60
1.8.3.2	Detrusor.....	60
1.8.3.3	Uretra.....	61
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	63
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	69

3.1	MATERIAL.....	71
3.1.1	Material biológico.....	71
3.1.2	Material de laboratorio.....	71
3.1.2.1	Instrumentación general.....	71
3.1.2.2	Equipamiento para el registro de la tensión isométrica de las preparaciones de músculo liso.....	71
3.1.2.3	Equipamiento para la identificación de proteínas por Western Blotting.....	72
3.1.3	Reactivos.....	72
3.1.4	Soluciones.....	74
3.1.4.1	Soluciones fisiológicas.....	74
3.1.4.2	Soluciones para el estudio Inmunohistoquímico.....	75
3.1.4.3	Tampones utilizados para Western Blotting.....	76
3.2	MÉTODOS.....	76
3.2.1	Western blotting.....	77
3.2.2	Inmunohistoquímica.....	78
3.2.3	Estudios funcionales.....	78
3.2.3.1	Procedimiento experimental.....	79
3.2.3.2	Cálculo y estadística.....	80
4.	RESULTADOS.....	81
4.1	EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE CGRP E INMUNOREACTIVIDAD A CGRP EN EL CUELLO VESICAL.....	83
4.2	ESTUDIOS FUNCIONALES.....	85

4.2.1	Papel delCGRP en la neurotransmisión inhibidora del cuello vesical.....	85
4.2.2	Relajación inducida por el CGRP liberado desde los nervios intramurales.....	85
4.2.3	Relajación inducida por el CGRP añadido exógenamente.....	87
4.2.4	Neurotransmisión inhibidora NANC independiente de NO.....	89
4.2.5	Implicación de la vía de la ciclooxigenasa (COX) en la neurotransmisión inhibidora NANC independiente de NO.....	90
4.2.6	Papel de la guanilato ciclasa soluble, PKG y PKA sobre la relajación nerviosa independiente de NO.....	93
4.2.7	Papel de los canales de K <sup>+</sup> y de la ATPasa de la bomba Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> sobre la relajación nerviosa independiente de NO.....	94
5.	DISCUSIÓN.....	97
5.1	IMPLICACIÓN DEL CGRP EN LA NEUROTRANSMISIÓN INHIBIDORA DEL CUELLO VESICAL.....	99
5.2	MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA NEUROTRANSMISIÓN INHIBIDORA NANC.....	103
6.	CONCLUSIONES.....	109
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	113
8.	RESUMEN.....	147

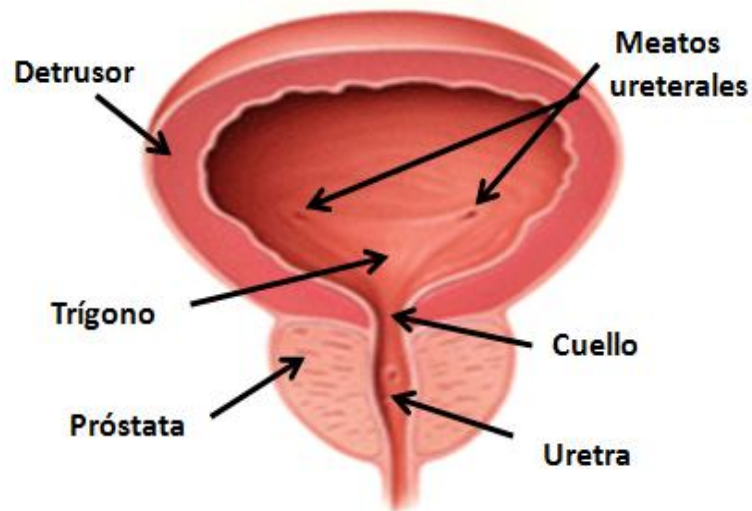
## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## 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 es un saco musculoso membranoso situado en la parte anterior de la pelvis, inmediatamente detrás del pubis que recibe la orina procedente del riñón a través de los uréteres, la almacena y la expulsa a través de la uretra (Figura 1.1). En ella podemos distinguir la cúpula, el cuerpo y el cuello vesical. La cúpula vesical es la parte superior y más amplia de la vejiga, que aumenta considerablemente de volumen cuando está llena de orina. La capa muscular de la vejiga corresponde al músculo detrusor y su acción fundamental es la de provocar la evacuación del contenido vesical. El cuello vesical o parte inferior de la vejiga se continúa con la uretra y su capa muscular se engruesa para formar el esfínter uretral interno de control involuntario. La uretra es el último segmento de las vías urinarias, difiriendo considerablemente en el hombre y en la mujer. La uretra masculina se extiende desde el cuello vesical hasta la extremidad libre del pene o meato uretral (con una longitud aproximada de 16 cm), en la que se distinguen tres regiones: prostática, membranosa y esponjosa o peneana. La uretra prostática se continúa con la porción membranosa, la cual, está rodeada del esfínter uretral externo (músculo estriado) de control voluntario y situado entre las fascias del diafragma urogenital. La uretra femenina es mucho más corta que la del varón (unos 4 cm) y se extiende desde el cuello vesical hasta el meato externo y sus esfínteres tienen la misma localización que en el varón. La capacidad fisiológica de depósito de la vejiga es variable oscilando entre 300 a 500 cc. La vejiga recibe la orina a través de los uréteres, los cuales, penetran en la misma diagonalmente a través de la pared dorsolateral, en una región llamada trigono, que tiene forma triangular y que ocupa el área correspondiente a la pared posteroinferior de la vejiga. La uretra define el punto inferior del triángulo que dibuja el trigono.



**Figura 1.1. Esquema de la estructura de la vejiga urinaria.** Formada por músculo detrusor, meatos ureterales que definen el trigono, el cuello y la uretra que juntos forman el esfínter uretral interno, y la próstata, solamente en varones.

La pared de la vejiga está formada por cuatro capas (Figura 1.2):

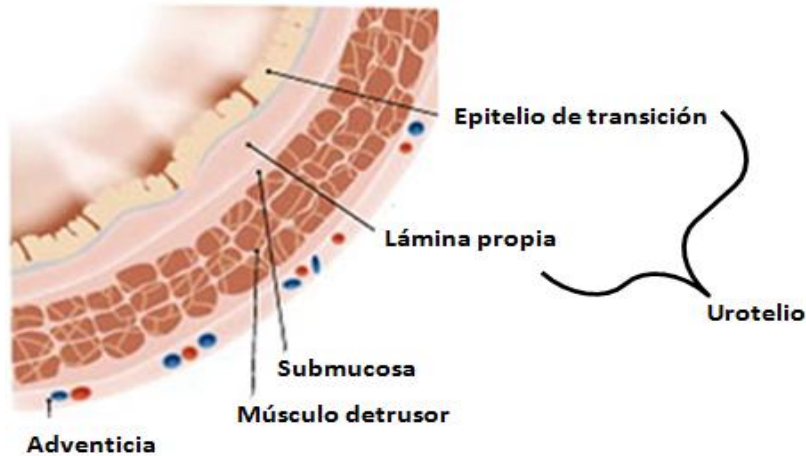
(1) Externa o serosa: El peritoneo parietal recubre la vejiga en su cara superior, parte posterior y laterales.

(2) Media o muscular: Está integrada por músculo liso que forma el músculo detrusor que cuando se contrae expulsa la orina y tiene como antagonistas los esfínteres de la uretra. El músculo liso está integrado por 3 capas:

- Capa externa o superficial formada por fibras musculares longitudinales.
- Capa media formada por fibras musculares circulares.
- Capa interna o profunda formada por fibras longitudinales.

(3) Interna o mucosa (urotelio): Tapiza la vejiga interiormente y está formada por una membrana basal, una capa intermedia y un epitelio apical superficial que es un epitelio estratificado de hasta 8 capas de células umbrales impermeable en contacto con la orina.

(4) Submucosa (suburotelio): Es densa y se compone de tejido vascular, nervios y tejido conectivo.



**Figura 1.2.** Esquema representativo de las capas de la pared vesical. Integrada por adventicia, músculo detrusor, suburotelio y urotelio.

## 1.2 FUNCIÓN DE LA VEJIGA URINARIA

La función de la vejiga urinaria consiste en el almacenamiento y la eliminación periódica de orina formada en el riñón. Es un contenedor elástico y distensible que se va acomodando a su contenido hasta alcanzar su capacidad fisiológica.

La micción viene definida como el acto de vaciar la vejiga cuando se ha alcanzado su dintel de llenado. Dicha actividad es producida por un acto reflejo, producido a través de una vía espinobulboespinal que coordina la actividad del centro pontino de la micción y de la sustancia gris periacueductal del tronco del encéfalo. La actividad de la vejiga urinaria y la uretra está controlada por el Sistema Nervioso Autónomo (SNA), en su doble división simpática y parasimpática, y por regulación nerviosa somática a través del nervio pudendo. De la correcta coordinación entre dichos sistemas depende la existencia de un flujo miccional adecuado y la ausencia de residuo urinario una vez producido el vaciado de la

vejiga, evitando así, pérdidas de orina durante el llenado vesical y/o dificultades en su vaciamiento (Figura 1.3).

La regulación ejercida por el SNA es modulada por centros medulares y encefálicos de forma antagónica, ya que mientras la fase de activación simpática favorece el llenado de la vejiga, el sistema parasimpático origina el vaciado de la misma. Las fibras parasimpáticas medulares proporcionan la principal inervación excitadora del detrusor a través de los nervios pélvicos que conectan con la médula espinal a través de los segmentos sacros S2-S4 (Núcleo de Onuf). En los nervios pélvicos discurren tanto fibras nerviosas sensitivas como motoras. Las fibras sensitivas detectan el grado de distensión de la pared de la vejiga, siendo dicha señal mecánica la responsable del inicio de los reflejos que provocan el vaciado de la vejiga. Estas fibras parasimpáticas hacen sinapsis con células ganglionares localizadas en la pared de la vejiga, liberando acetilcolina (ACh), la cual, se une a receptores nicotínicos presentes en las células postganglionares. La estimulación de las terminaciones de las fibras postganglionares induce la liberación de ACh produciendo contracción del detrusor a través de su conjugación a receptores muscarínicos M<sub>2</sub>/M<sub>3</sub> (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 P2X<sub>1</sub>) 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; O'Reilly y col., 2001; Yoshimura, 2003).

Los centros motores simpáticos estimulan la contracción de la musculatura del cuello vesical y de la uretra y causan relajación del detrusor. Las neuronas preganglionares simpáticas se localizan en el asta intermediolateral de los mielómeros toracolumbares T11 - L2 (de Groat y Yoshimura 2001; Yoshimura y Chancellor 2007). 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  $\beta_2$  y  $\beta_3$  y una contracción de escasa trascendencia mediada a través de una población minoritaria de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  (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, se une a receptores nicotínicos presentes en la membrana de la célula muscular.

Existen, asimismo, conexiones entre los centros sacro y pudendo, lo que permite la coordinación entre ambos centros durante la micción y la interrupción voluntaria del vaciado vesical. Los nervios hipogástrico, pélvico y pudendo llevan, además, señales sensoriales a través de aferentes que se proyectan desde la vejiga y la uretra a la médula espinal lumbosacra (Morgan y col., 1981, 1986; Thor y col., 1989; Andersson y Wein, 2004; Yoshimura y Chancellor, 2007). Las aferentes del nervio pélvico, monitorizan el volumen de la vejiga en la fase de almacenaje, así como la amplitud de las contracciones vesicales durante la micción. Dicha inervación sensorial está integrada por fibras III A $\delta$  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). Estas fibras C pueden ser sensibles o insensibles a la neurotoxina sensorial capsaicina, tienen un umbral más alto de generación de impulsos en respuesta al estiramiento de la pared vesical que las fibras A $\delta$  (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 ATP, taquicininas, bradicininas, etc., liberados desde el urotelio y detrusor (Aizawa y col., 2011).

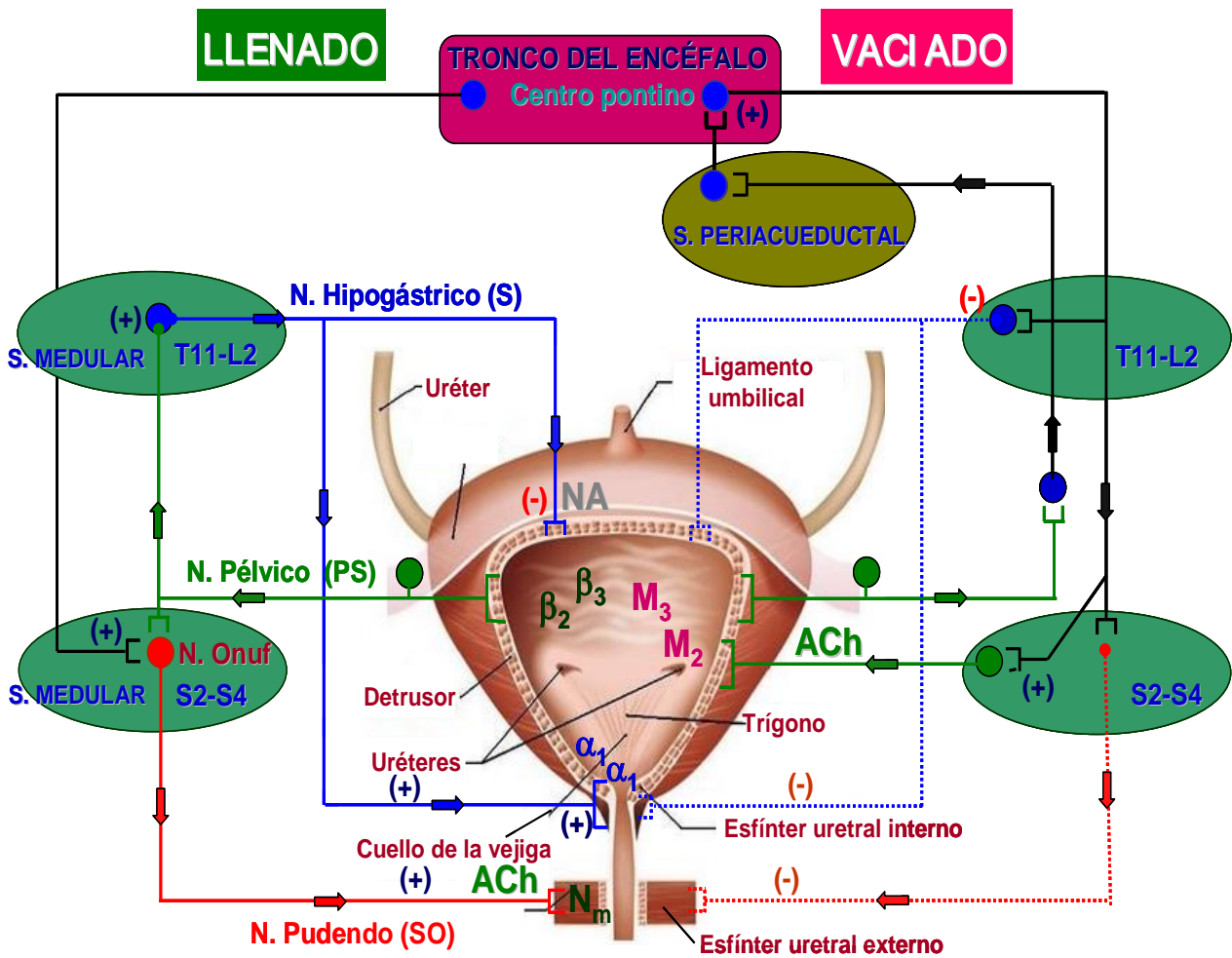
Durante la fase de llenado, la vejiga actúa como un receptáculo donde, gracias al detrusor, va acomodándose al incremento de volumen, debido a la elasticidad de sus fibras musculares y a su tono, sin que por ello se produzca un aumento significativo de la presión intravesical por lo que no se percibe la sensación de llenado hasta alcanzar su capacidad máxima fisiológica (Yoshimura y Chancellor, 2007). La distensión de la vejiga constituye la señal mecánica, la cual, es transmitida en forma de impulsos nerviosos a través de las fibras nerviosas aferentes tipo III A $\delta$  hasta los segmentos medulares sacros S2-S4, activando motoneuronas del nervio pudendo y la consecuente liberación de ACh que causa la contracción del esfínter uretral externo, produciéndose así la 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  $\beta_3$  y  $\beta_2$  y contracción del esfínter interno (integrado por la musculatura lisa del cuello vesical y de la uretra proximal) vía receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ .

Cuando la vejiga alcanza su dintel de llenado aparece la sensación de llenado vesical y el deseo miccional, pero 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, siendo ésta mayor que la presión vesical, con objeto de impedir 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 micción. Dicho vaciado es producido por la activación motora del nervio pélvico y consecuente liberación de ACh, la cual, produce la contracción del detrusor a través de 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.

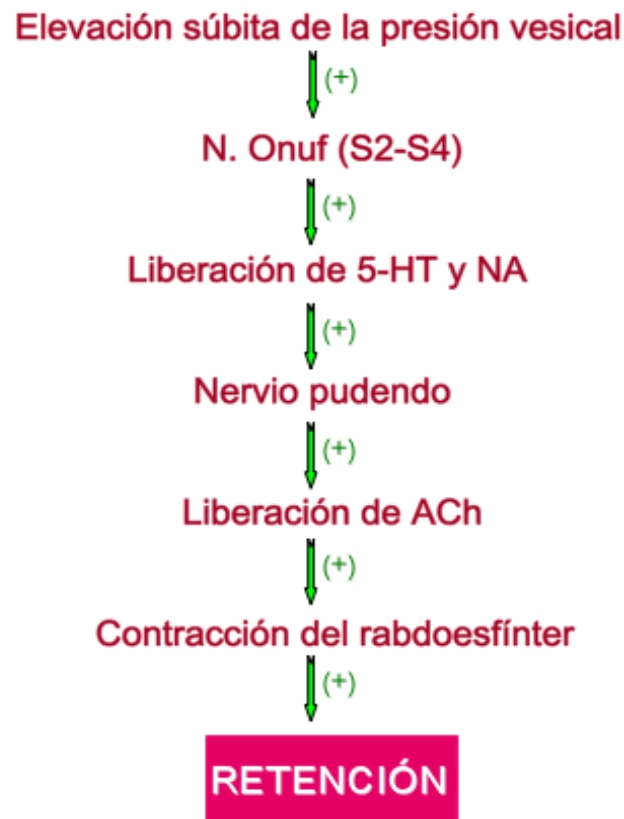
Si el vaciado de la vejiga es incorrecto se produce la mal denominada “retención urinaria”, con presencia o ausencia de residuo urinario, que puede ser debida a:

- 1) Una contracción detrusoriana 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 presencia de ambas alteraciones.

En situaciones en las que se produce una elevación súbita de la presión intravesical, como ocurre en la tos o el estornudo, se desarrolla el denominado “efecto guardián” o reflejo de almacenaje adicional (Figura 1.4). Así, el incremento repentino de la presión intravesical produce 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 pudiendo 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).



**Figura 1.3. Regulación nerviosa del llenado y 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  $A\delta$ , con la consecuente liberación de ACh, produciéndose la contracción del esfínter uretral externo. Esta aferentes también provocan que se libere NA desde el plexo hipogástrico, produciendo relajación del detrusor vía receptores  $\beta_3$  y  $\beta_2$  y contracción del esfínter uretral interno, vía receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ . Una vez alcanzada la capacidad máximo 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. (Salinas Casado J y Esteban Fuertes M, 2010)



**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. (Salinas Casado J y Esteban Fuertes M, 2010)

### 1.3 UROTELIO Y SUBUROTELIO

El urotelio es una barrera física que impide que sustancias tóxicas, presentes en la orina, pasen a los tejidos subyacentes (capas musculares y nervios) (Lewis, 2000; Apodaca, 2004). Diferentes factores locales como el pH tisular, traumatismos mecánicos, químicos o infecciones bacterianas, pueden alterar esta función de barrera provocando el paso de agua, urea y sustancias tóxicas a estos tejidos subyacentes, o liberando sustancias neuroactivas desde urotelio que dan lugar a cambios en la sensibilidad neuronal produciendo urgencia y frecuencia durante el llenado y vaciado vesical por lo que la comunicación entre las células del urotelio y el sistema nervioso tiene importantes repercusiones en la disfuncionalidad vesical.

La ruptura de la integridad de la barrera urotelial, asimismo, también está relacionada con la expresión de sustancias como el factor antiproliferativo, el cual, enlentece el crecimiento de las células uroteliales. Esta función barrera la ejercen principalmente las células en paraguas del epitelio apical, las cuales, se encuentran intercomunicadas por estrechas uniones y en su superficie muestran unas proteínas cristalinas llamadas uroplaquinas, así como lípidos especializados (Lewis, 2000; Apodaca, 2004). La impermeabilidad de esta capa viene dada, en parte, por estos lípidos de membrana especializados y por las uroplaquinas, las cuales, reducen la permeabilidad de pequeñas moléculas como urea, agua y protones y por las uniones celulares, encargadas de reducir el movimiento de iones y solutos entre las células (Lewis, 2000; Apodaca, 2004).

Pero el urotelio no es sólo una barrera para sustancias tóxicas presentes en la orina, sino que 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 urotelial y la densidad de receptores presentes en el urotelio son mayores que los encontrados en el detrusor (Hypolite y col., 1993). Diversos estudios han demostrado la existencia de nervios aferentes y nervios eferentes en la proximidad del urotelio lo cual, pone de manifiesto la interacción entre el urotelio y los nervios (Jen y col., 1995; Birder y col., 2001; Birder y col., 2002; Dickson y col., 2006). De hecho, diferentes estímulos provocan la liberación por parte del urotelio de mediadores químicos que pueden, a su vez, modular la actividad de los nervios aferentes sugiriendo un papel importante desempeñado por el urotelio en las vías sensoriales del tracto urinario inferior (Birder y col., 2010). Asimismo, 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 es, además, refrendada por la existencia de una amplia variedad de receptores para neurotransmisores 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<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>) (Burnstock, 2001), adenosina (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>) (Yu y col., 2006), NA ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ) (Birder y col., 1998), ACh (nicotínicos  $\alpha_7$  y muscarínicos M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub>) (Beckel y col., 2006; Kullmann y col., 2008), receptores activados por proteasas (D'Andrea y col., 2003), canales de Na<sup>+</sup> (Du y col., 2007), receptores vaniloides (TRPV<sub>1</sub>, TRPV<sub>2</sub>, TRPV<sub>4</sub>, TRPM<sub>8</sub> y TRPA<sub>1</sub>) (Stein et al., 2004), factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Saban y col., 2008), péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiario (PACAP) (PAC<sub>1</sub> y VPAC) (Girard y col., 2008), estrógenos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) (Taylor y col., 2000), endotelinas (ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>) (Mumtaz y col., 1999) y factor liberador de corticotropina (CRF<sub>1</sub> y CRF<sub>2</sub>) (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 sustancia P (SP), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), factor liberador de corticotropina (CRF), ACh, NA, ATP y adenosina liberados desde nervios, células inflamatorias e incluso desde vasos sanguíneos (Apodaca, 2004, 2007; LeBerge y col., 2006; Birder y col., 2007; Hanna-Mitchell y col., 2007) (Figura 1.5).

Otro hecho que demuestra el papel sensorial del urotelio es la secreción por parte de las células uroteliales de transmisores, tales como ATP, ACh, NA y NO capaces de modular, activando o inhibiendo la actividad de los nervios sensoriales, células musculares y/o células del sistema inmunitario e inflamatorio (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).

La distensión vesical provoca liberación de ATP desde el urotelio, el cual, 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). Este ATP es liberado tanto desde células de la capa apical como de las de la capa basal en respuesta al estiramiento, actuando sobre receptores uroteliales P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>3</sub> estimulando la exocitosis y promoviendo un incremento de la superficie de las células umbrales durante la fase de llenado (Truschel y col., 2002; Wang y col., 2005). Asimismo, la presencia de uniones en hendidura, *gap*, en las células intersticiales hace

que las señales generadas en el urotelio lleguen hasta el músculo detrusor (Ikeda y col., 2007).

Distintas situaciones patológicas como la cistitis, el síndrome de dolor vesical o la lesión medular cursan con un incremento de la liberación de ATP desde urotelio, lo cual, provoca sensación dolorosa por la unión de este neurotransmisor a receptores purinérgicos P2X y P2Y presentes en las fibras sensoriales (Birder y col., 2003). Dichas patologías se caracterizan por urgencia e 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).

La unión de ATP a receptores de 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 TRPV<sub>1</sub>, 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 en la fisiopatología de la vejiga es mucho menos conocido.

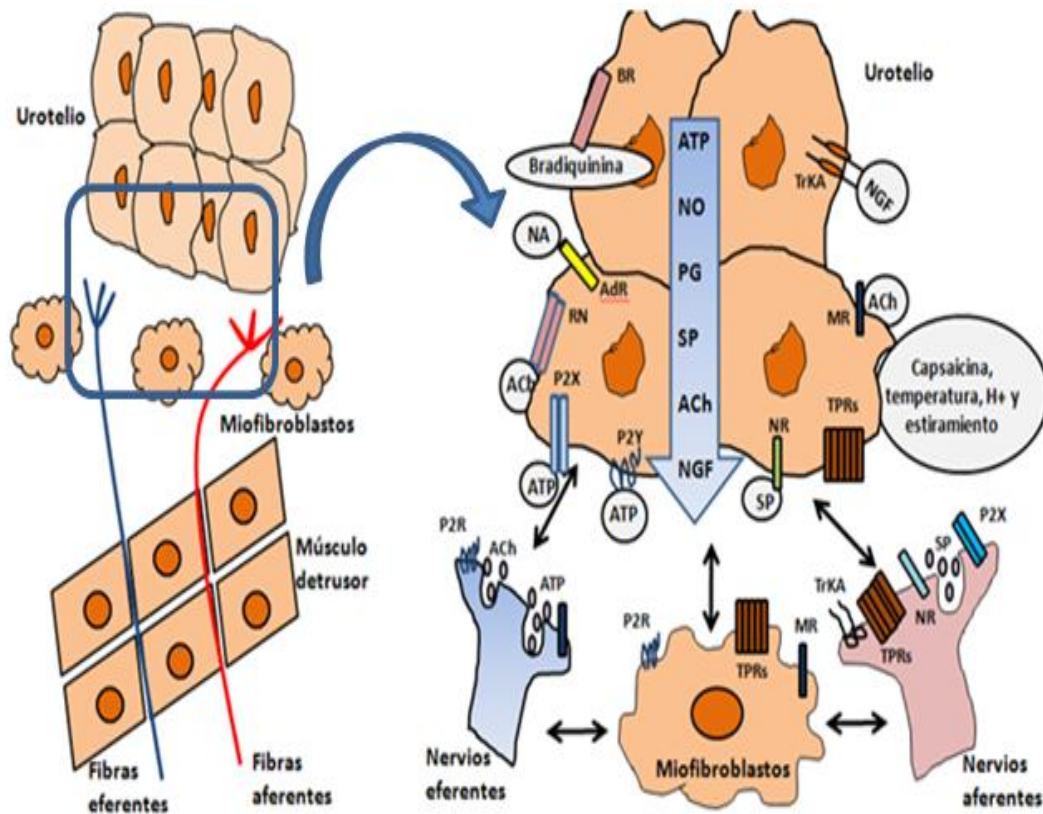
El urotelio es capaz de liberar, asimismo, ACh, NA y NO como consecuencia de la estimulación química y mecánica. La ACh ejerce su acción a través de su conjugación con receptores muscarínicos y nicotínicos localizados en el músculo liso, en nervios y en células uroteliales. Estos receptores son estimulados 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<sup>2+</sup> 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  $\alpha$  y  $\beta$ , que dan lugar a la liberación de distintos mediadores tales como ATP y NO (Birder y col., 2002). Es posible que la liberación neuronal de NA tenga efecto en el urotelio y por tanto, en la funcionalidad vesical debido a la presencia de la inervación noradrenérgica en la microcirculación vesical y en el suburotelio (Jen y col., 1995; Dickson y col., 2006).

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 presenta 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.



**Figura 1.5. Modelo hipotético de la posible interacción entre los nervios aferentes y eferentes, células uroteliales, músculo liso y miofibroblastos.** Desde el urotelio, y en respuesta a estímulos mecánicos, químicos o térmicos, se produce la liberación de una amplia variedad de mediadores como adenosina 5'-trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), sustancia P (SP), acetilcolina (ACh), etc., las cuales, pueden actuar de forma autocrina, debido a la presencia de receptores para estos agentes en la propia célula urotelial, y/o de forma paracrina en nervios aferentes, eferentes y en miofibroblastos, dotando así, al urotelio de la capacidad de interactuar con el medio extracelular y de generar una respuesta mediada a través de los nervios o del músculo liso (Adaptación de Birder y De Groat, 2007).

## 1.4 ACOPLAMIENTO CONTRACCIÓN-EXCITACIÓN

### 1.4.1 Regulación de las proteínas contráctiles

La contracción del músculo liso se inicia por un incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), como consecuencia de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular a través de los 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  $\text{Ca}^{2+}$  se produce como consecuencia de su unión a la proteína calmodulina, pudiendo unirse de forma cooperativa hasta cuatro moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$ , para formar el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -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 col., 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  $\text{Ca}^{2+}$  por el RS, producida como consecuencia de la actividad de la bomba SERCA localizada en la membrana del RS (introduce 2 moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  al RS por cada molécula de ATP hidrolizada)

- la actuación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana celular que saca  $\text{Ca}^{2+}$  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, 2000).

Cuando la contracción se produce sin una elevación proporcional de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se denomina al proceso sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  o incremento de la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de la maquinaria contráctil, en el que la regulación de MLCP tiene un papel fundamental (Somlyo y Somlyo, 1994). 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  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sino que también modificarían la sensibilidad de la maquinaria contráctil al  $\text{Ca}^{2+}$ . De

hecho, la MLCK puede ser fosforilada, lo cual disminuye su afinidad por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina disminuyendo la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (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 col., 2000). 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  $\text{Ca}^{2+}$  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 ACh en la vejiga urinaria de conejo, indicando así, la mediación de la vía de la Rho cinasa en el acoplamiento excitación-contracción de los 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  $\text{GMPc}$ , la proteína cinasa dependiente del  $\text{GMPc}$  (PKG),  $\text{AMPc}$  y la proteína cinasa dependiente del  $\text{AMPc}$  (PKA), pueden inhibir la contracción inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  y la sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  produciendo relajación muscular (Pfitzer y col., 1984). Además, PKA y PKG fosforilan Rho inhibiendo su acción sensibilizante al  $\text{Ca}^{2+}$  (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 revelante 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 DEL MÚSCULO LISO

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

El comportamiento electrofisiológico del detrusor ha sido estudiado en varias especies, incluido el hombre. Dichos estudios han puesto de manifiesto la existencia de potenciales de acción espontáneos asociados con bajas ondas de despolarización (Brading, 1992; Andersson y Arner, 2004). Generalmente los potenciales se muestran como espigas aisladas a intervalos regulares, sin embargo, ocasionalmente aparecen ráfagas de espigas que pueden ser registradas. Estas contracciones espontáneas están asociadas a un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , las cuales no disminuyen con rianodina o cafeína, sugiriendo así, que los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  no tienen un papel relevante en dichas contracciones (Hashitani y col., 2001). Sin embargo, la liberación de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares puede amplificar el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  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 (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 $\text{Ca}^{2+}$ en la contracción

El incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es el acontecimiento esencial para la contracción del músculo detrusor. Sin embargo, 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  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de canales VOC tipo L, es el acontecimiento principal que da lugar a los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica mediados por la despolarización. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , en los estadios iniciales del potencial de acción, provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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 inducida por carbacol en el detrusor del cerdo es dependiente principalmente de la despolarización de la membrana celular y del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, siendo la despolarización producida por la inactivación de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) 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  $\text{K}^+$  o por la adición de agonistas se desvanece rápidamente como consecuencia del incremento transitorio en la permeabilidad de la membrana al  $\text{Ca}^{2+}$ , hecho que provoca la inactivación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a las dihidropiridinas y por la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  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 (Westfall y col., 1996; Harvey y col., 2002). La unión de ACh a receptores muscarínicos incrementa la sensibilidad de la maquinaria contráctil al  $\text{Ca}^{2+}$  (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  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de canales VOC tipo L desempeña el papel prioritario en la contracción mientras que el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es variable (Batra y col., 1987). El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  es regulado por un mecanismo de retroalimentación, en el cual, la disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reduce la actividad de los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) 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 $\text{Ca}^{2+}$

Las células musculares lisas poseen, aparte de canales VOC, otros canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  operados por almacén (SOC), activados tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (McFadzean y Gibson, 2002).

#### 1.5.3.1 Canales de $\text{Ca}^{2+}$ activados por voltaje

Los principales canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje (VOC) son los tipo L aunque los tipo T (clasificados en distintas subfamilias en base a la similitud en las

secuencias de aminoácidos y a sus características electrofisiológicas) también parecen estar implicados pero su papel no es tan claro.

Los canales tipo L se caracterizan porque se activan a potenciales de membrana positivos alrededor de -40 mV y por sus corrientes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  amplias y de larga duración (Smirnov y Aaronson, 1992). Estos canales, aparte de mediar en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular al citoplasma, participan en los procesos en los que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares. En el detrusor humano la activación inducida por carbacol involucra canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a las dihidropiridinas (Maggi y col., 1989). Por tanto, el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  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 $\text{Ca}^{2+}$ activados por agonistas

El término ROC define a cualquier canal de membrana cuya apertura está mediada por la unión de un agonista a su receptor independientemente de cambios en el potencial de membrana (Bolton, 1979). Son canales de cationes (mono y divalentes) no selectivos, permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ . En la célula muscular lisa, tanto vascular como visceral, diversos grupos han descrito la presencia de una gran variedad de agonistas que originan la apertura de dichos canales produciendo contracción con moderada o nula despolarización (Meisheri y col., 1981). Estos canales incluyen, además, los denominados canales operados por ligando, en los cuales, el sitio de unión del ligando y el poro iónico están presentes 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. Estos canales vehiculan iones atendiendo al gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática y son operativos a valores de potencial de membrana en reposo (-60 mV) e inhibidos por la despolarización de la misma. Se ha propuesto que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales podría afectar a las corrientes de  $\text{Cl}^-$  y/o la activación de canales de  $\text{K}^+$  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 $\text{Ca}^{2+}$ operados por depósito

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por depósito (SOC) fue propuesta por Putney (1986) quien usó el término de "*entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa*" para describir el fenómeno de acoplamiento entre la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el RS y la activación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana en células no excitables. Así, el vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  activa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales localizados en la membrana plasmática para rellenar los almacenes. 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., 2009).

### 1.5.4 Mecanismos de liberación de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

En las células musculares lisas en reposo la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS es 1 mM, concentración 10.000 veces superior a la que existe en el citoplasma de la célula muscular (0.1  $\mu\text{M}$ ). Para que se pueda producir la contracción muscular, es necesario que dicha concentración se eleve a concentraciones superiores a 10-100  $\mu\text{M}$ , siendo dicho incremento resultado del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. El inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) a través de los receptores  $\text{IP}_3$  localizados en la membrana del RS produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en su interior. Asimismo, se produce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ("*liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$* ") vía activación de los receptores de rianodina presentes en la membrana del RS (Brading, 2002). El RS puede participar, asimismo, en la contracción vesical a través de la modulación de la actividad de los canales de  $\text{K}^+$  de la membrana celular responsables de la hiperpolarización de la musculatura lisa (Yoshikawa y col., 1996).

#### 1.5.4.1 Inositol trifosfato

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<sub>2</sub>) para dar lugar a inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DG). 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<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

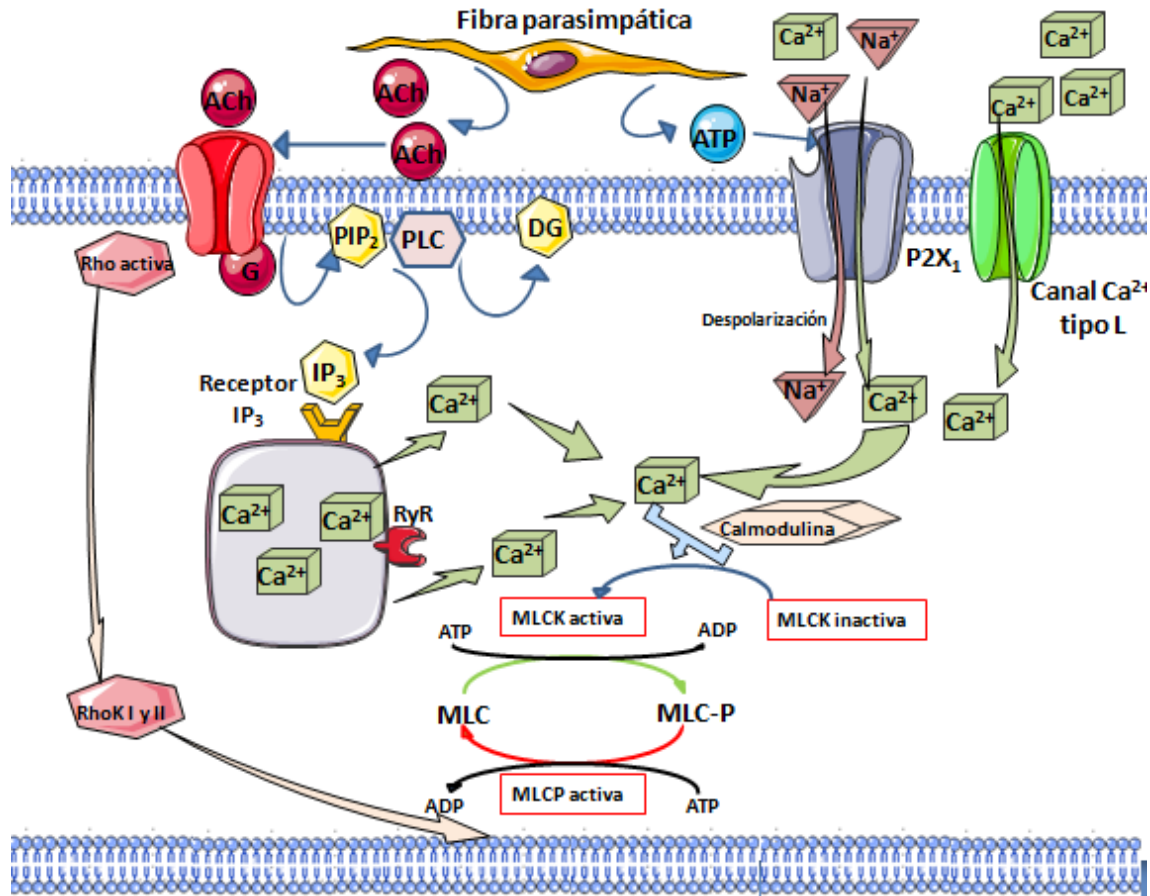
Los receptores para IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>r) están localizados en la membrana del RS y están constituidos por cuatro subunidades. Cada subunidad tiene un peso molecular aproximado de 260 kDa y 6 segmentos transmembrana, con los típicos dominios localizados en el extremo terminal C, que anclan 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<sub>3</sub> (Berridge 1993; Joseph y col., 1995). Existen tres subtipos de IP<sub>3</sub>r (IP<sub>3</sub>r<sub>1</sub>, IP<sub>3</sub>r<sub>2</sub>, IP<sub>3</sub>r<sub>3</sub>), involucrados en la señalización de Ca<sup>2+</sup> mediada a través de IP<sub>3</sub>, los cuales, difieren en su afinidad por el IP<sub>3</sub>, en su regulación y en su modulación por proteínas asociadas (Miyakawa y col., 1999). El IP<sub>3</sub>r<sub>2</sub> es el más sensible a IP<sub>3</sub> y media las oscilaciones regulares de Ca<sup>2+</sup> de larga duración. El IP<sub>3</sub>r<sub>1</sub> es muy sensible al ATP y está involucrado en las oscilaciones transitorias de Ca<sup>2+</sup>, mientras que el IP<sub>3</sub>r<sub>3</sub> es el menos sensible a IP<sub>3</sub> y a Ca<sup>2+</sup>, y tiende a generar corrientes de Ca<sup>2+</sup> monofásicas (Miyakawa y col., 1999). Para la apertura del canal se requiere tanto Ca<sup>2+</sup> como IP<sub>3</sub>, siendo numerosos los sitios de unión del Ca<sup>2+</sup> en los IP<sub>3</sub>r (Miyakawa y col., 2001). El Ca<sup>2+</sup> regula la actividad del canal de manera dual dependiendo de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> citosólica. Así, a baja [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, el ión ejerce un papel activador, mientras que altas concentraciones desempeña una acción inhibitoria, demostrando así un mecanismo de retroalimentación negativo durante la liberación de Ca<sup>2+</sup> (Mak y col., 2001). También el propio contenido de Ca<sup>2+</sup> del RS regula la apertura del canal. Así, en hepatocitos permeabilizados se ha demostrado que un incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el RS aumenta la sensibilidad de los receptores de IP<sub>3</sub> por su ligando, promoviendo así una liberación espontánea de Ca<sup>2+</sup> (Nunn y Taylor, 1992). La liberación de Ca<sup>2+</sup> del RS es detenida

cuando la  $[Ca^{2+}]$  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 (Ryr1, Ryr2 y Ryr3) 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  $[Ca^{2+}]_i$ . 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. Esquema de la contracción y relajación del músculo liso.** La entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (VOC) es esencial para que se produzca la contracción muscular. La unión de acetilcolina (ACh) al receptor muscarínico de subíndice impar (M<sub>1</sub> o M<sub>3</sub>) provoca la activación de la fosfolipasa C (PLC) que cataliza la hidrólisis del fosfatidil inositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) para dar lugar a inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DG). Este IP<sub>3</sub> se une a sus receptores presentes en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) provocando la liberación de Ca<sup>2+</sup> almacenado en su interior. Por otro lado, la adenosina 5'-trifosfato (ATP) se une a los receptores de la membrana plasmática P2X<sub>1</sub> provocando la entrada de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> produciendo despolarización. Asimismo, se produce liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por Ca<sup>2+</sup> desde el RS a través de los receptores de rianodina. El incremento de la [Ca<sup>2+</sup>] citosólica, produce la unión de este ión a la calmodulina para formar el complejo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina, el cual, activa la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), proteína que fosforila la MLC provocando la contracción muscular. El cese de la contracción se debe en parte, a la disminución de la [Ca<sup>2+</sup>] citoplasmática y a la desfosforilación de MLC por parte de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP). La regulación de esta MLCP es llevada a cabo, en parte, por la inhibición provocada por una quinasa específica, RhoK.

### 1.5.5 Canales de K<sup>+</sup>

Las técnicas electrofisiológicas junto al empleo de toxinas que bloquean potente y selectivamente los diferentes tipos de canales de K<sup>+</sup>, constituyen una valiosa herramienta para el conocimiento de los mismos, permitiéndonos una mejor comprensión acerca de su relevancia fisiofarmacológica y terapéutica en la disfuncionalidad motora del tracto urinario inferior. La actividad del músculo detrusor es modulada esencialmente por la activación de canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP (K<sub>ATP</sub>) y de canales K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> (K<sub>Ca</sub>), mientras que la contribución de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (K<sub>v</sub>) es moderada (Andersson y col., 2004).

#### 1.5.5.1 Canales K<sub>ATP</sub>

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. 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 (Ko y col., 2008). El músculo liso de la vejiga expresa canales K<sub>ATP</sub>, los cuales, están involucrados en la regulación de la contractilidad vesical (Andersson, 1992; Brading, 1992). Activadores de canales K<sub>ATP</sub> como la cromakalima, el pinacidil y el nicorandil producen hiperpolarización de la membrana de la célula muscular por la apertura de dichos canales y consecuente salida de K<sup>+</sup> reduciendo, y en algunos casos, llegando a abolir los potenciales de acción relacionados con la generación de las contracciones fásicas (Petkov y col., 2001). 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<sup>+</sup> extracelular (Andersson, 1993). No obstante, la falta de selectividad de los activadores de canales K<sub>ATP</sub> ha limitado su uso en la hiperactividad del detrusor (Andersson, 2002).

### 1.5.5.2 Canales $K_{Ca}$

Estos canales se activan por incrementos en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . 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 de  $K_{Ca}$  de alta conductancia ( $BK_{Ca}$ ). Se activan con  $[Ca^{+2}]_i$  variables (10 nM-10  $\mu$ M) y son sensibles a la despolarización de la membrana.
- Canales de  $K_{Ca}$  de baja conductancia ( $SK_{Ca}$ ). Estos canales se caracterizan por su alta sensibilidad al  $Ca^{2+}$  (activación a concentraciones entre 200-500 nM), por no ser dependientes del potencial de membrana y poseer baja conductancia iónica.
- Canales de  $K_{Ca}$  de intermedia conductancia ( $IK_{Ca}$ ). Se activan por  $[Ca^{+2}]_i$  en un rango entre 10 nM-1  $\mu$ 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 al 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 post hiperpolarización lenta consecutiva a los potenciales de acción en muchas células excitables, en estas células tras la espiga se produce una repolarización, que se desglobo en la que se denomina una fase de rápida posthiperpolarización que dura entre 50-100 ms y una posterior más lenta entre 500-1000 ms en la que participan los canales  $SK_{Ca}$  previamente descrita en neuronas de los ganglios simpáticos y en motoneuronas de la médula espinal (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, 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 col., 2001). Los canales  $BK_{Ca}$  están integrados por una subunidad  $\alpha$ , que forma el poro del canal y una subunidad accesoria  $\beta_1$  específica del músculo. Esta subunidad  $\beta_1$  es expresada en el detrusor normal y la falta de dicha subunidad reduce la actividad del canal produciendo, en última instancia, un incremento en la actividad contráctil de la vejiga (Petkov y col., 2001). En el detrusor humano, las corrientes de los canales  $BK_{Ca}$  son activadas por la penetración de  $Ca^{2+}$  extracelular y la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el RS. Asimismo, 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). El hecho que alteraciones en la expresión de canales  $BK_{Ca}$  y  $SK_{Ca}$  puedan causar disfuncionalidades motoras urinarias, tales como vejigas hiperactivas e incontinencia urinaria, sugiere su posible papel como dianas terapéuticas en dichas patologías (Herrera y col., 2005).

### 1.5.5.3 Canales $K_v$

Estos canales se abren y se cierran en respuesta a cambios en el potencial de membrana, de forma que señales de despolarización o de hiperpolarización pueden aumentar su apertura generando una corriente de rectificación de salida o de entrada respectivamente. 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. Sin embargo, el papel de dichos canales en el detrusor *in vivo* está aún por determinar.

### 1.5.6 Canales activados por estiramiento

Estos canales actúan como sensores detectando cambios en la longitud de la pared vesical. Diversos estudios sugieren que, 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 e Isenberg, 1993). Estos canales muestran similar permeabilidad al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y su activación es producida previa hiperpolarización de la membrana de la célula muscular. Si una célula en reposo es estirada un 20% de su longitud original, el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal es suficiente para alcanzar una  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  significativa, capaz de despolarizar la célula y provocar el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS y la penetración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Esta liberación no se ve afectada por los receptores de  $\text{IP}_3$  que median la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero fue completamente bloqueada por rianodina. Por otro lado, esta liberación, activa corrientes de  $\text{Cl}^-$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , 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  $\text{TRPV}_1$ ,  $\text{TRPV}_2$ ,  $\text{TRPV}_4$ ,  $\text{TRPM}_8$ , y  $\text{TRPA}_1$ , 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).  $\text{TRPV}_4$  es un canal catiónico activado por estiramiento permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  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 y col., 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<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> que conduce a la despolarización, la cual, genera la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular a través de canales VOC tipo L, dando lugar a la generación de potenciales de acción (Inoue y col., 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 están acopladas eléctricamente a través de las denominadas *uniones en hendidura* o uniones *gap*, que son orificios de la pared celular a través de los cuales se producen la propagación de los potenciales de acción sin prácticamente encontrar resistencia alguna a su paso. El acoplamiento eléctrico a través de uniones *gap* de las células musculares lisas en el detrusor y trigono humanos ha sido recientemente demostrado, indicando así, que dichas uniones *gap* podrían tener un papel importante 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 del 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 y de factores experimentales como el 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  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Montgomery y Fry, 1992). Estas contracciones son resistentes al bloqueo con tetrodotoxina (TTX) lo que demuestra su carácter miogénico (Andersson, 1993; Imai y col., 2001, 2002), pero sin embargo, son sensibles a los bloqueantes de los canales VOC tipo L y a los activadores de los canales de  $\text{K}^+$  (Andersson y Arner, 2004).

En el músculo detrusor es característica la presencia de contracciones fásicas espontáneas miogénicas, las cuales, están moduladas por la presencia de 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  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de canales VOC tipo L y a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS. En dichas contracciones está, asimismo, involucrada la vía de la Rho-cinasa y canales de  $\text{K}^+$  de membrana (Wibberley y col., 2003). De hecho, la inhibición de canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  y  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  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 canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , no altera las contracciones miogénicas, sin embargo, activadores de dichos canales suprimen la actividad miogénica espontánea. Asimismo, canales  $\text{K}_v$  pueden contribuir a la regulación de la contracción rítmica miogénica. Estos estudios sugieren que la modulación de canales de  $\text{K}^+$  puede ofrecer un mecanismo para controlar la actividad miogénica espontánea, especialmente aquella asociada con la hiperexcitabilidad existente en las vejigas hiperactivas (Andersson y Arner, 2004).

La obstrucción del 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  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  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  $\text{GMP}_c$ . 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 (Hawthorn y col., 2000).

## 1.6 CONTROL NERVIOSO Y HORMONAL DE LA VEJIGA URINARIA

### 1.6.1 Mecanismos colinérgicos

#### 1.6.1.1 Receptores muscarínicos

En la mayoría de las especies, la contracción de la vejiga urinaria está mediada por mecanismos colinérgicos y por mecanismos no adrenérgicos no colinérgicos (NANC) (Ambache y col., 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). En el detrusor humano, el neurotransmisor parasimpático promueve contracciones *in vivo* e *in vitro* a través de la activación, principalmente, de receptores muscarínicos (Bayliss y col., 1999). Estas contracciones están potenciadas por inhibidores de las colinesterasas e inhibidas parcialmente por atropina, sugiriendo así, la implicación de otros sistemas en dichas respuestas.

Se han descrito 5 subtipos de receptores muscarínicos denominados  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  y  $M_5$ . Estos receptores están acoplados funcionalmente a proteínas G, pero la señal de transducción varía dependiendo del subtipo del receptor, 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. 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  $\beta$  a través del bloqueo de la adenilato ciclasa (Hegde y col., 1997). Además, receptores muscarínicos  $M_2$  pueden modular las relajaciones producidas por las purinas (Giglio y col., 2001), activar canales catiónicos no específicos (Kotlikoff y col., 1999) o inhibir la hiperpolarización producida por PKC a través de la activación de canales  $K_{ATP}$  en la vejiga urinaria (Bonev y col., 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 y col., 2002) y obstruída (Krichevsky y col., 1999) mientras que los receptores muscarínicos  $M_2$ , que en condiciones fisiológicas median contracciones moderadas, incrementan su funcionalidad cuando la contracción muscarínica  $M_3$  está disminuída, como sucede en la denervación y en la hipertrofia de la vejiga (Ruggieri y col., 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 $\alpha$

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, agonistas de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$  contraen el detrusor (Andersson, 1993). Aunque su presencia en vejigas normales sea discutida, cambios en la densidad y en la expresión de receptores adrenérgicos del subtipo  $\alpha_1$  están relacionados con la hiperactividad del detrusor asociada a la obstrucción del flujo de salida y al daño neurogénico (Perlberg y col., 1982). De hecho, en la obstrucción del flujo de salida el balance entre la contracción mediada por receptores adrenérgicos  $\alpha$  y la relajación a través de receptores adrenérgicos  $\beta$  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  $\alpha_1$  favorece la desaparición de la hiperactividad del detrusor, sugiriendo que puede existir un incremento de la función del receptor  $\alpha_1$  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  $\alpha$  (Andersson y Arner, 2004).

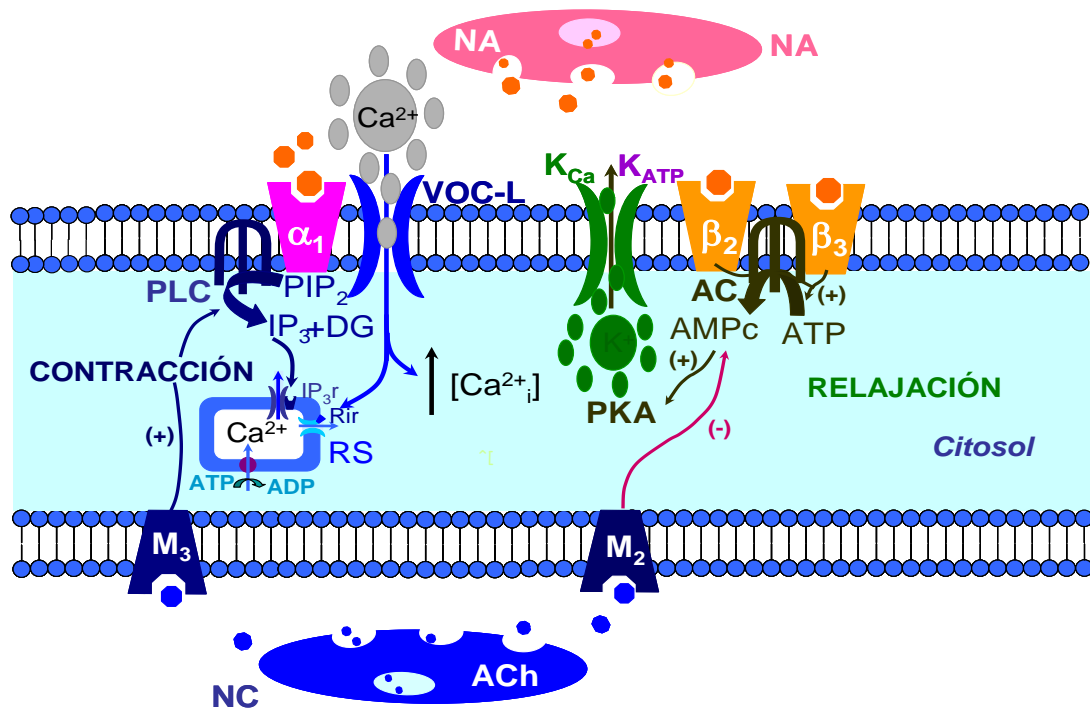
En vejigas normales, la expresión del ARNm de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , y  $\alpha_{1D}$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  está reducida mientras que la del receptor  $\beta_3$  está incrementada. En vejigas obstruidas, por el contrario, la expresión de los receptores  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$  está incrementada, mientras la expresión de los receptores  $\alpha_{1B}$  está disminuída, lo cual, podría explicar que antagonistas adrenérgicos  $\alpha_{1A}$  mejoren notablemente la obstrucción del flujo de salida (Restorick y col., 1989). Asimismo, se ha visto que existe una relación entre la expresión de RNAm del receptor  $\alpha_{1D}$  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  $\alpha$  pero no está clara la repercusión funcional de dicha elevación (Barendrecht y col., 2008).

#### 1.6.2.2 Receptores adrenérgicos $\beta$

Existe una clara evidencia de la abundante expresión de receptores  $\beta$  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  $\beta$  con respecto a los receptores  $\alpha$  explicaría la relajación producida por NA en el detrusor, responsable del llenado de la vejiga urinaria (Perlberg y Caine, 1982). El subtipo de receptor  $\beta$  que media esta relajación varía con la especie;  $\beta_2$  en conejo (Morita y col., 2000) y ratón (Wuest y col., 2009),  $\beta_2$  y  $\beta_3$  en rata (Longhurst y Levendusky, 1999) y cerdo (Yamanishi y col., 2002) y  $\beta_2$  y principalmente  $\beta_3$  en perros y hombre (Fujimura y col., 1999; Takeda y col., 1999; 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  $\beta_3$  de los miocitos del detrusor. Agonistas selectivos de los receptores  $\beta_2$

median la relajación del detrusor humano (Badawi y col., 2007) y agonistas no selectivos de los receptores  $\beta$ , como el isoproterenol, producen una relajación máxima mayor que la producida por agonistas selectivos  $\beta_3$  (Igawa y col., 2001; Kullmann y col., 2009, 2010). Esta efectividad clínica de los agonistas  $\beta_2$ , no concuerda con el supuesto efecto predominante de los receptores  $\beta_3$ , a menos que consideremos que la expresión de estos receptores esté en otros tipos celulares y no sólo en miocitos del detrusor (Limberg y col., 2010). De hecho, se ha demostrado que los tres tipos de receptores  $\beta$ , 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  $\beta_1$  y  $\beta_2$  está reducida mientras que la del receptor  $\beta_3$  está incrementada. En vejigas obstruidas, por el contrario, la expresión de los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  está incrementada, mientras la expresión de los receptores  $\beta_3$  está disminuída (Restorick y col., 1989). Además, la relajación inducida por agonistas selectivos de los receptores  $\beta_3$  es efectiva en diferentes modelos animales con hiperactividad vesical (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 del detrusor es consecuencia de la ausencia de relajación mediada por receptores adrenérgicos  $\beta$ , sin embargo, no hay diferencias significativas en la densidad de dichos receptores entre vejigas normales y con hiperactividad detrusoriana (Restorick y Mundy, 1989).

Los agonistas adrenérgicos  $\beta$  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  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  y  $\text{K}_{\text{ATP}}$  están involucrados en la relajación producida por la estimulación de los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  en la vejiga urinaria de cobaya (Kobayashi y col., 2000; Hudman y col., 2000). Sin embargo, el papel de los receptores adrenérgicos  $\beta$  es cuestionado ya que su bloqueo no tiene efecto sobre la función del detrusor humano normal (Andersson, 1993).



**Figura 1.7. Transducción de los receptores adrenérgicos y muscarínicos.** La relajación adrenérgica  $\beta$  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  $Ca^{2+}$  de alta conductancia ( $BK_{Ca}$ ) y canales de  $K^+$  dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ). La contracción mediada por receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  es producida vía hidrólisis del fosfatidil inositol difosfato ( $PIP_2$ ) para dar lugar a inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DG), este último implicado en la sensibilización de la maquinaria contráctil. El  $IP_3$  se une a su receptor ( $IP_3r$ ) en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) produciendo la liberación de  $Ca^{2+}$  almacenado y el influjo de  $Ca^{2+}$  extracelular a través de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje (VOC) tipo L originando la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  intracelular y la contracción muscular. Los receptores  $M_3$ , al igual que los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , están acoplados a la hidrólisis de los fosfatidilinosoles, produciendo así, una contracción directa del músculo. Sin embargo, los receptores muscarínicos  $M_2$  originan una contracción indirecta ya que están acoplados a la inhibición de la AC impidiendo la relajación mediada a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. (Salinas Casado J y Esteban Fuertes M, 2010)

### 1.6.3 Mecanismos no adrenérgicos no colinérgicos

En la mayoría de los especies parte de la contracción neurogénica de la vejiga es resistente a la atropina (Andersson, 1993). Así, en la vejiga de la rata, el componente fásico de la contracción en respuesta a la estimulación eléctrica transmural, 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 atropina (Cowan y Daniel, 1983; Bayliss y col., 1999). En pacientes con hiperactividad de detrusor o hipertrofia de vejiga, el componente resistente a la atropina se incrementa en gran medida. Por tanto, 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 (Andersson y Arner, 2004).

#### 1.6.3.1 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 postulado que el ATP actúa en los receptores P2X<sub>3</sub> presentes en neuronas aferentes de la capa suburotelial modulando la respuesta aferente del sistema nervioso central, 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 ATP es producida vía activación de canal catiónico acoplado a ligando (receptor P2X) que promueve el influjo de Ca<sup>2+</sup> extracelular. En la vejiga del conejo, la respuesta al ATP es bifásica, pero después de la desensibilización con  $\alpha,\beta$  met-ATP, agonista de los receptores purinérgicos P2X<sub>1</sub>, dicha respuesta es monofásica sugiriendo, así, la implicación de dos subtipos de

receptores purinérgicos (Cheng y Brading, 1991). La contracción de ATP en el detrusor del hombre es producida principalmente vía activación de receptores P2X<sub>1</sub> (O'Reilly y col., 2001). No obstante, receptores P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> están presentes en el detrusor aunque su funcionalidad es limitada (O'Reilly y col., 2001). En la hiperactividad de detrusor existe una sobreexpresión 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 obstruídas e hiperactivas que en vejigas normales (O'Reilly y col., 2001; Harvey y col., 2002). Estos autores confirmaron que el receptor purinérgico P2X<sub>1</sub> 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 disminuída (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<sub>2A</sub> tras su hidrólisis a adenosina y de receptores P2Y<sub>1</sub> después de su metabolización a adenosina 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, es decir, el vaciado completo de la vejiga urinaria.

#### 1.6.3.2 Óxido nítrico

El óxido nítrico (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 (NOS<sub>n</sub>) y NOS endotelial (NOS<sub>e</sub>) y una isoforma inducible (NOS<sub>i</sub>) 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). Sin embargo, no hay evidencia de que la

NOS<sub>n</sub> sea producida en células musculares lisas de detrusor y además, diversos estudios funcionales no han logrado demostrar una relajación nerviosa consistente producida por liberación de NO (Elliott y Castleden, 1993). James y col. (1993) sugirieron que el NO generado en el detrusor podría tener una función en la relajación de la vejiga durante el llenado. 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 revelante 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 de la uretra, la actividad de la NOS y de la guanilato ciclasa era detectada en la mucosa y 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<sup>2+</sup> y de la activación de canales BK<sub>Ca</sub>, produce relajación muscular (Hofmann, 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 NOS<sub>i</sub> 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 NOS<sub>i</sub> y disminuye la de la NOS<sub>n</sub> (Felsen y col., 2003). El NO derivado de la NOS<sub>i</sub> 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<sub>i</sub> 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  $\alpha_2$  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., 2011).

### 1.6.3.3 Neuropéptidos

#### 1.6.3.3.1 PACAP y VIP

Tanto el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiario (PACAP), del cual existen dos isoformas (PACAP 27 y PACAP 38), como el péptido intestinal vasoactivo (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  $PAC_1$  (específico de PACAP),  $VPAC_1$  y  $VPAC_2$  (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 de 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  $PAC_1$  están presentes en el músculo liso y en el urotelio, mientras que los receptores  $VPAC_2$  sólo se expresan en la capa muscular (Braas y col., 2006). Los receptores  $VPAC_1$  están presentes en el epitelio de la uretra del ratón (Harmar y col., 2004).

Mientras que el VIP relaja el detrusor, el cuello vesical y la uretra de diferentes especies incluido el hombre cerdo (Reubi, 2000; Hernández y col., 2006a,b; Yoshiyama y de Groat, 2008), el PACAP relaja la vejiga y 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, el 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) (Herrera y col., 2006; 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 (Chapple y col., 2010) o neurogénica (Kinder y col., 1985) del detrusor presentan niveles reducidos de dicho péptido. Además, ratones *Knockout* para 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 col., 2010).

Tanto el PACAP como el VIP participan en la neurotransmisión inhibitoria del cuello de la vejiga urinaria del cerdo produciendo relajación del mismo a través de receptores musculares VPAC<sub>2</sub>. Además, los receptores facilitadores PAC<sub>1</sub> localizados en aferentes primarias sensibles a la capsaicina y acoplados a la liberación de NO y los receptores VPAC inhibitorios presentes en terminaciones motoras están, asimismo, involucrados en las relajaciones a PACAP 38 y VIP, respectivamente (Hernández y col., 2006a,b). En resumen, el VIP y el 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 *Endotelinas*

La presencia de endotelinas en el detrusor de varias especies incluido el hombre está ampliamente documentada (Andersson y Arner, 2004; Andersson, 2007, 2010). Tres isoformas de endotelinas han sido descritas (ET-1, ET-2 y ET-3), las cuales, actúan

a través de dos subtipos de receptores ( $ET_A$  y  $ET_B$ ) (Arai y col., 1990; Sakurai y col., 1990). Los receptores  $ET_A$  están presentes en la vaina muscular longitudinal externa, en los vasos sanguíneos y en la submucosa del detrusor y son responsables de la contracción muscular (Traish y col., 1992). La isoforma ET-1, y en menor medida, la ET-3 producen contracciones lentas en desarrollo del detrusor humano mediadas por receptores de endotelinas  $ET_A$ , los cuales, están acoplados al influjo de  $Ca^{2+}$  extracelular vía apertura de canales VOC tipo L y a la activación de la PLC con la consecuente liberación de  $Ca^{2+}$  desde el RS (Okamoto-Koizumi y col., 1999; Andersson y Arner, 2004). Aunque el papel de las endotelinas en la función vesical no ha sido totalmente esclarecido, la lenta contracción producida por las mismas parece descartar su implicación en el vaciado de la vejiga. Donoso y col. (1994) demostraron que la ET-1 potenciaba las contracciones inducidas por estimulación eléctrica transmural y por ATP, sugiriendo, así, un papel modulador de la neurotransmisión. No obstante, falta por establecer si antagonistas de receptores  $ET_A$  reducen la actividad espontánea del detrusor, así como su papel en la terapéutica de la vejiga hiperactiva (Andersson, 2010). En la obstrucción del flujo de salida, existe un marcado incremento de la expresión de los receptores  $ET_A$ , indicando así, la posible implicación de dichos receptores de endotelinas en la hiperplasia e hipertrofia del detrusor asociada al cuadro obstructivo (Khan y col., 1999).

#### 1.6.3.3.3 *Taquicininas*

Las taquicininas (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 APSC de la vejiga urinaria de varias especies incluido el hombre (Lecci y Maggi, 2001, 2003). Tres subtipos de receptores taquicinérgicos han sido caracterizados genómica y farmacológicamente siendo denominados como receptores  $NK_1$ ,  $NK_2$  y  $NK_3$ , 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, la SP tiene mayor afinidad de conjugación a los receptores  $NK_1$ , la NKA a los receptores  $NK_2$  y la NKB a los receptores  $NK_3$  (Lecci y Maggi, 2003). En el Tracto Urinario, las TKs coexisten con el CGRP el PACAP y aminoácidos excitadores como glutamato y aspartato en las APSC (Keast y Stephensen, 2000; 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, en adición a 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 NK<sub>2</sub> el receptor funcionalmente activo que produce contracción dependiente de la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular a través de canales VOC tipo L y, en menor medida, por movilización de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos intracelulares (Martin y col., 1997; Burcher y col., 2000; Cárdenas y col., 2005).

#### 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 AT<sub>1</sub>. Dicha contracción es dependiente de la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular a través de canales VOC tipo L (Andersson y Arner, 2004). Aunque la funcionalidad de la angiotensina 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 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 prostanoides es producida en respuesta a estímulos fisiológicos, tales como el estiramiento de la pared de la vejiga urinaria (Gilmore y col., 1971). Asimismo lesiones de la mucosa vesical y mediadores de la inflamación como la bradicinina favorecen la síntesis y liberación de prostaglandinas (Andersson, 1993). La COX-1 y la COX-2 están expresadas en células intersticiales de Cajal en la vejiga urinaria y así, prostanoides liberados desde dichas células y desde el urotelio están involucrados en la contracción de la pared vesical (de Jongh y col., 1997). Las prostaglandinas como la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGE}_1$  y  $\text{PGE}_2$  producen contracción del detrusor humano por acción directa sobre el músculo liso y/o indirectamente por modulación de la neurotransmisión (Andersson, 1993). En la vejiga de cobaya, los prostanoides son liberados por estimulación nerviosa y son capaces de facilitar el acoplamiento excitación/contracción por movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares (Creed y Callahan, 1989). Ya que los prostanoides 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 la liberación local de prostaglandinas. Dichas contracciones espontáneas son capaces de generar actividad en nervios aferentes que pueden contribuir a la hiperactividad del detrusor (Andersson y col., 2010; Yokoyama, 2010). Elevaciones en los niveles de la  $\text{PGE}_2$  y la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en la vejiga urinaria están asociadas con el desarrollo de la hiperactividad vesical (Yamauchi 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 prostanoides

derivados de la COX están involucrados en el control neural del tono del músculo liso de la vejiga, los 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. Cinco tipos de PDE (PDE<sub>1</sub>, PDE<sub>2</sub>, PDE<sub>3</sub>, PDE<sub>4</sub> y PDE<sub>5</sub>) han sido identificadas. Estas enzimas favorecen la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), por lo que el uso de inhibidores de las PDE, que 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 PDE<sub>4</sub> hidroliza el AMPc e inhibidores de dicho enzima reducen la hipercontractilidad característica de la vejiga de cobaya (Longhurst y col., 1997) y rata (Nishiguchi y col., 2007; Kaiho y col., 2008) con obstrucción del flujo de salida. 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 y col., 2005; Andersson, 2010). Por otra parte, el tratamiento con sildenafil, un inhibidor de la PDE<sub>5</sub> 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 FISIOPATOLOGÍA DEL TRACTO URINARIO INFERIOR

La Sociedad Internacional de Continencia (ICS) define la Incontinencia Urinaria como: *“la pérdida involuntaria de orina a través de la uretra, objetivamente demostrable y que constituye, para la persona que lo sufre, un problema higiénico y social”*. Este proceso afecta a todos los grupos de población, edad y sexo. Se han descrito 4 tipos de incontinencias urinarias: 1) incontinencia de urgencia, 2) incontinencia por rebosamiento; 3) incontinencia de estrés y 4) cuadros mixtos de urgencia y estrés.

**1) Incontinencia de urgencia (IU).** Es producida por inestabilidad vesical producida como consecuencia de la 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 (Abrams, 2003). 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 los receptores muscarínicos  $M_3/M_2$  para disminuir la hiperactividad del detrusor. La etiología de este incremento de la actividad colinérgica es multifactorial incluyendo alteraciones de la estructura y de la inervación sensorial y motora del detrusor (Brading, 1997). De hecho, una función deficitaria del detrusor junto con la 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 la 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 con fármacos antimuscarínicos  $M_2/M_3$  como oxibutinina, darifenacina, fesoterodina, tolterodina, propiverina, cloruro de trospium y solifenacina son altamente resolutivos (con una eficacia superior al 80% de los casos) aunque no exentos de efectos colaterales como sequedad de boca y diarrea (Cardozo y col., 2000; Kelleher y col., 2008). El uso de antidiuréticos, como la desmopresina, debe considerarse para tratar la nocturia, aunque con cierta cautela ya que puede producir hiponatremia (Robinson y col., 2002).

En la actualidad, diferentes estrategias terapéuticas para el tratamiento de la hiperactividad vesical son objeto de estudio. Entre ellas cabe destacar, el uso de agonistas adrenérgicos  $\beta_3$ , como el mirabegron, para inhibir la contracción del detrusor (Michel y col., 2011; Tyagi y col., 2011). Asimismo, los 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, al 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 (Chang y col., 2010; Oger y col., 2010a; Kita y col., 2010). No obstante, debido a que dichos fármacos tienen un marcado efecto hipotensor, su uso debe estar restringido (Streng y col., 2004). La inhibición de las fofodiesterasas PDE<sub>1</sub> y PDE<sub>4</sub>, es otra posible opción terapéutica en la hiperactividad vesical (Andersson y col., 2007). Asimismo, el hecho que los inhibidores de la PDE<sub>5</sub>, como el sildenafil, produzcan relajación del detrusor del hombre a través de mecanismos dependientes del GMPc, AMPc y canales de K<sup>+</sup> con una escasa contribución del NO, sugiere que también los inhibidores de la PDE<sub>5</sub> 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 (Ray y col., 2003; Cockayne y col., 2005; Ford y col., 2006). De hecho, una liberación incrementada de ATP y prostaglandinas desde el urotelio puede alterar también la actividad del detrusor (Birder y col., 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 de humano, lo cual, sugiere la posible implicación de estas células en la urgencia miccional (Biers y col., 2006; Kubota 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 por rebosamiento o por vaciado incompleto.** Caracterizada por la existencia de retención y residuo urinario de forma permanente como

consecuencia de la hipoactividad del detrusor. En este tipo de incontinencia son característicos los escapes constantes de orina de escasa cantidad y una disminución del calibre del chorro miccional. 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 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 en hombres en cirugías 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 (Smith y col., 1989; Cannon et al., 2003).

En las IE tipo III, las terapias farmacológicas utilizadas son de escasa eficacia utilizándose fundamentalmente agonistas de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  e inhibidores de la recaptación de serotonina (duloxetina) para favorecer la contracción de la base de la vejiga urinaria (Norton y col., 2002; 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 resolutive 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 estornudo (Haylen y col., 2010). Los factores predisponentes de este proceso son la edad, raza caucásica, índice de masa corporal, problemas de tiroides y cirugías retropúbicas (histerectomías) (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 (Danforth y col., 2006; Waetjen y col., 2007). La segunda opción es un tratamiento farmacológico donde principalmente se trata al paciente con antimuscarínicos (oxibutinina) y 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 (Dmochowski y col., 2002; 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 (Debodinance y col., 2002; Holmgren y col., 2005).

El denominado *Cuadro Sintomológico 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, fundamentalmente, con el desarrollo de la hiperplasia benigna de próstata (HBP) característica en hombres de avanzada edad, lo cual, condiciona en gran medida su calidad de vida (Van Moorselaar, 2003). El

tratamiento farmacológico con antagonistas adrenérgicos  $\alpha_1$  e inhibidores de la 5 $\alpha$ -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 PDE<sub>5</sub>, 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 PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP)

### 1.8.1 Estructura, síntesis, liberación y mecanismo de acción

El CGRP es un neuropéptido formado por una cadena de 37 aminoácidos con grupos amino y carboxilo en los extremos (Rosenfeld y col., 1983). Se han encontrado fibras inmunorreactivas a CGRP en aferentes primarias sensibles a la capsaicina (APSC) y en fibras sensoriales tipo III A $\delta$  a niveles centrales y periféricos en una amplia gama de especies animales incluido el hombre (Mulder y col., 1988). Dos isoformas de CGRP, con un 90% de homología en su secuencia peptídica para el CGRP, han sido identificadas y denominadas CGRP $_{\alpha}$  y CGRP $_{\beta}$ , siendo el CGRP $_{\alpha}$  la isoforma predominante en dichas fibras (Morris y col., 1984; Gibson y col., 1988). CGRP está colocalizado con otros péptidos, como SP, NKA y NKB (Lundberg y col., 1985) y es altamente hidrolizable por la acción de la endopeptidasas neutras presentes en el espacio intersináptico. Inhibidores de las mismas, como el fosforamidón, incrementan la respuesta relajante endógena y exógena inducida por el CGRP (Katayama y col., 1991).

La presencia de una proteína modificadora de la actividad del receptor denominada RAMP<sub>1</sub> es indispensable para la activación del receptor de CGRP. Este receptor constituye una potencial diana terapéutica para una amplia variedad de

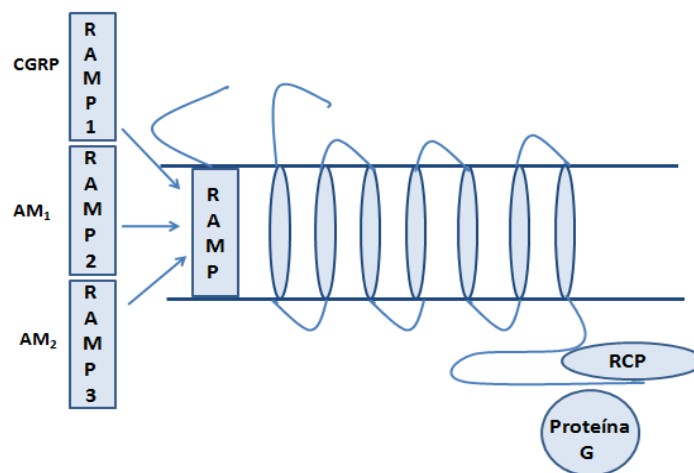
patologías como la migraña (Doods y col., 2007) y la enfermedad cardiovascular (Brain y Grant, 2004). El CGRP ejerce su acción a través de dos receptores CGRP<sub>1</sub> y CGRP<sub>2</sub>. Estos receptores poseen 7 dominios transmembrana y están asociados a proteínas G (Quirion y col., 1992), (Figura 1.8). La caracterización de los subtipos de receptor de CGRP se ha realizado sobre la afinidad mostrada por CGRP (8-37), antagonista que muestra alta ( $pA_2/pK_B > 7$ ) y baja ( $pA_2/pK_B = 6$ ) para los receptores CGRP<sub>1</sub> y CGRP<sub>2</sub>, respectivamente (Dennis y col., 1990). No obstante, este antagonista también bloquea receptores de péptidos relacionados con el CGRP como la adrenomedulina (AM) y amilina (AMY) (Hay y col., 2008), por lo que actualmente se están sintetizando compuestos no peptídicos con objeto de poder diferenciar sus receptores de los receptores de AM y AMY, aunque de momento con resultados muy limitados (Millar y col., 2010).

El término “receptor de CGRP” es actualmente usado para la combinación de receptor de calcitonina (RC) y RAMP<sub>1</sub>. Para su funcionalidad es necesaria una proteína adicional denominada componente proteico del receptor (CPR) (Walker y col., 2010). La expresión conjunta de RC con RAMP<sub>2</sub> y RAMP<sub>3</sub> corresponde a los receptores AM<sub>1</sub> y AM<sub>2</sub>, respectivamente, los cuales, desarrollan afinidad similar por el CGRP (Hay y col., 2008, Bailey y Hay, 2009). El CGRP tiene mayor afinidad para el receptor de amilina 1 (AMY<sub>1</sub>) (Hay y col., 2007). De forma similar a lo que sucede en otros receptores acoplados a proteínas G, la conjugación del CGRP a sus receptores promueve cambios conformacionales en dichos receptores dando lugar a la cascada de acontecimientos intracelulares. Así, la activación de los receptores de CGRP es producida esencialmente por la activación de la subunidad G<sub>s</sub> de las proteínas G produciendo activación de la adenilato ciclasa con el consecuente incremento en la concentración intracelular del AMPc y activación de la proteína cinasa A (PKA) (Hay y col., 2003). De hecho, la PKA está implicada en numerosos efectos biológicos del CGRP, como la vasodilatación (Brain y Grant, 2004) y la neurotransmisión (Han y col., 2010). Asimismo, la PKA está involucrada en la señalización intracelular de los receptores de CGRP a través de la regulación de la actividad de canales de K<sup>+</sup> (Wellman y col., 1998) y canales VOC tipo L (Hosokawa y col., 2010) de la membrana celular. Asimismo, la PKA puede activar la sintasa del NO endotelial

(NOSe), incrementando así, la síntesis del NO para producir vasodilatación (Brain y Grant, 2004)

Otras vías de señalización menos frecuentes para los receptores del CGRP han sido también descritas. De hecho, los receptores de CGRP, a través de su acoplamiento a la subunidad  $G_{\alpha_i/o}$  de las proteínas G, producen la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular en las neuronas nodosas de la rata (Wiley y col., 1992). Asimismo, los receptores de CGRP asociados a la subunidad  $G_{\alpha_q/11}$  provocan la activación de la fosfolipasa C (PLC), proteína cinasa C (PKC) y proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), lo cual, explicaría muchas acciones del CGRP producidas sin incremento en la  $[AMPc]_i$  (Drissi y col., 1998, 1999).

Las proteínas cinasas son conocidas por desempeñar un papel esencial en la desensibilización de muchos receptores acoplados a proteínas G, como ocurre con los receptores del CGRP (Vause y Dirham, 2009). Dicha desensibilización se produce por la fosforilación de los residuos serina/treonina en el receptor activado. Esto facilita la conjugación con la proteína  $\beta$ -arrestina, reduciendo así la señalización mediada a través de proteínas G pero potencialmente reclutando otras moléculas señalizadoras (Ritter y Hall, 2009). Un vez activado el receptor del CGRP forma un complejo con  $\beta$ -arrestina, el cual, es esencial para la internalización del receptor (Heroux y col., 2007). No obstante, es indispensable profundizar en el conocimiento de la señalización del receptor del CGRP y su regulación para la comprensión de sus acciones biológicas y su posible utilización terapéutica.



**Figura 1.8. Modelo del receptor para el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y adrenomedulina (AM<sub>1</sub> y AM<sub>2</sub>).** Son receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G (RC). A estas proteínas se une otra denominada RAMP. Existen 3 tipos de proteínas RAMP y la unión a cada una de ellas da lugar a un tipo de receptor diferente: RAMP<sub>1</sub> al receptor para CGRP, RAMP<sub>2</sub> al receptor para AM<sub>1</sub> y RAMP<sub>3</sub> al receptor para AM<sub>2</sub> (Adaptación de Brain S y Grant A, 2011).

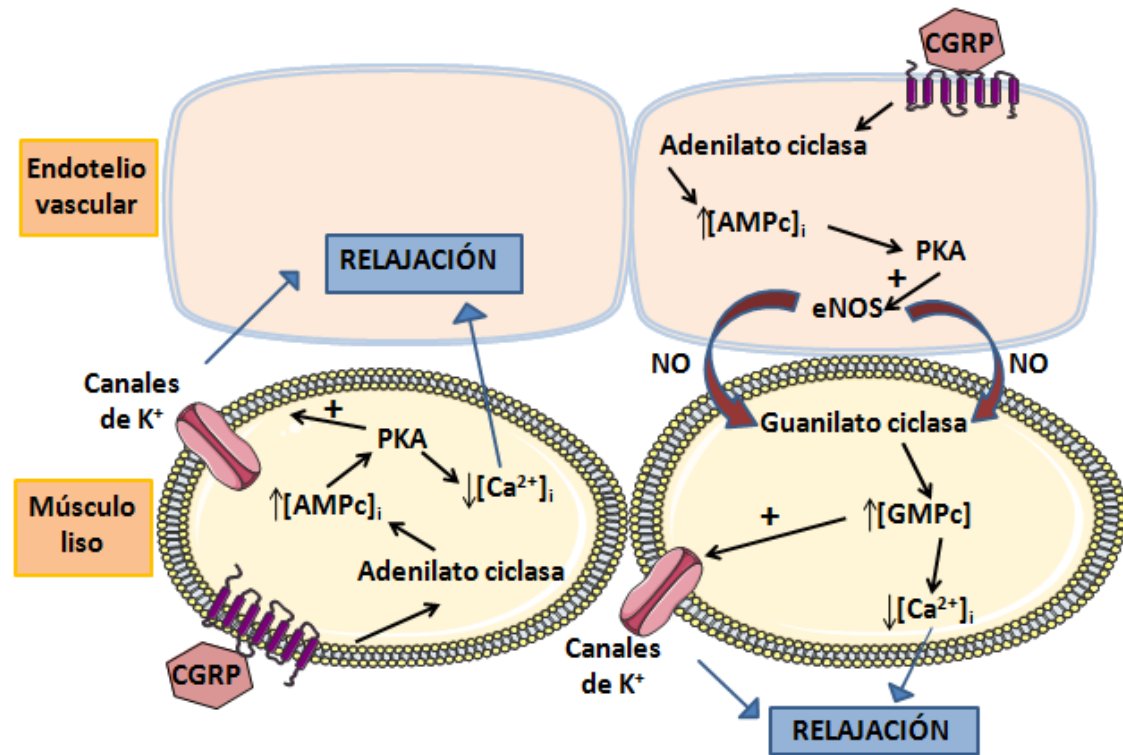
### 1.8.2 Actividad biológica

El CGRP ejerce una amplia gama de efectos fisiológicos, entre los que cabe destacar la inhibición de la síntesis de glucógeno mediado por insulina (Leighton y Foot, 1995), la estimulación de la formación ósea por acción directa sobre los osteoclastos (Owan e Ibaraki, 1994; Hoff y col., 2002) y la relajación del músculo liso tanto visceral como vascular, desempeñando así, un papel esencial en la vasodilatación neurogénica y en el mantenimiento de la integridad funcional de tejidos periféricos (Brain y col., 1985; Tam y Brain, 2004, 2006).

Dicho péptido produce una potente acción vasodilatadora a través de la activación de los receptores CGRP<sub>1</sub> en las arterias coronarias del hombre (Hasbak y col., 2003). En la aorta y en las arterias mamaria y pulmonar de la rata, el CGRP produce vasorrelajación dependiente del NO liberado desde el endotelio (Gray y Marshall, 1992; Raddino y col., 1997; Wisskirchen y col., 1998). Asimismo, el CGRP produce elevación en la concentración de AMPc en la célula endotelial estimulando, a través de la PKA, la sintasa del NO endotelial dando lugar a una liberación

incrementada de NO desde el endotelio (Ferro y col., 1999; Queen y col., 2000; Butt y col., 2000). Existe, además, evidencia que el CGRP posee un mecanismo de relajación independiente de NO y de endotelio, en donde la administración de CGRP se correlaciona con el incremento en la concentración intracelular de AMPc indicando así, la estimulación directa de la adenilato ciclasa de la célula muscular (Edvinsson y col., 1985; Han y col., 1990; Crossman y col., 1990). El incremento de AMPc da lugar a la activación de la PKA, que fosforila y abre los canales de K<sup>+</sup> produciendo relajación (Nelson y col., 1990; Reslerova y Loutzenhiser, 1998; Sakai y Saito, 1998) (Figura 1.9)

Por otra parte, el CGRP desempeña un papel cardioprotector esencial en episodios isquémicos breves y en la hipertermia, como consecuencia de la acción vasodilatadora y de la inhibición de la producción del factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa) cardiaco (Lechleitner y col., 1992; Li y Peng, 2002). Asimismo, está implicado en el mantenimiento, a la baja, de la resistencia vascular pulmonar. De hecho, la hipertensión pulmonar se correlaciona con un declive en los niveles plasmáticos del CGRP y además, el vaciamiento de contenido de CGRP de las APSC producido por capsaicina exacerba la hipoxia característica en dicha patología (Tjen y col., 1998; Keith y col., 2000).



**Figura 1.9. Mecanismos implicados en la vasodilatación inducida por el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP).** La parte izquierda de la imagen muestra el mecanismo de relajación independiente de endotelio donde la activación de los receptores de CGRP en los miocitos da lugar al incremento citosólico de AMPc por activación de la adenilato ciclasa. Este incremento de  $[AMPc]_i$  estimula la proteína cinasa A (PKA) que origina la apertura de los canales de  $K^+$  de la membrana plasmática dando lugar a la relajación muscular. La parte derecha de la imagen muestra los mecanismos implicados en la relajación del CGRP dependiente de urotelio donde, la unión de este neuropéptido a sus receptores situados en células endoteliales provoca la síntesis y liberación del NO. Este proceso está mediado por el incremento de AMPc que activando la PKA estimula la eNOS. El NO liberado del endotelio produce el incremento de GMPc en la célula muscular produciendo relajación (Adaptación de Brain y Grant 2004).

El CGRP desempeña un papel más importante en situaciones fisiopatológicas a nivel vascular como consecuencia de la elevación de sus niveles plasmáticos en patologías como la hipertensión, diabetes y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Girgis y col., 1985; Tang y col., 1997; Brain y col., 2004; Vega y Ávila, 2010). El CGRP ejerce, asimismo, efectos proinflamatorios, regulando la actividad de los macrófagos, a través de su potente acción vasodilatadora, incrementando la acumulación y extravasación local de neutrófilos y linfocitos y la liberación de

factores quimiotácticos como la interleucina-1 (IL-1) estando involucrado en la percepción dolorosa durante la inflamación (Buckley y col., 1991; McGillis y col., 1991; Ahluwalia y Perretti, 1994; Sun y col., 2003). Asimismo, existe una sobreexpresión de CGRP en respuesta al bloqueo farmacológico o quirúrgico de la transmisión neuromuscular (Vega y Ávila, 2010). El CGRP es un mediador esencial en la migraña, en donde los niveles de CGRP se encuentran incrementados durante las fases dolorosas de estas dolencias. El uso de antagonistas no peptídicos del CGRP es sumamente efectivo en el tratamiento de dicha patología sin producir efectos colaterales reseñables (Goadsby y Edvinsson 1994; Edvinsson, 2003; Tam y Brain, 2006; Edvinsson y Ho, 2010; Ho y col., 2010).

### 1.8.3 Tracto Urinario

El Tracto Urinario de los mamíferos está densamente innervado por APSC, que representa la principal fuente de liberación de CGRP y TKs (Lecci, A y Maggi, 2001; Bartho y col., 2004). Las APSC liberan CGRP en respuesta a factores locales entre los que se incluyen el factor de crecimiento (Lindsay y col., 1989), bradicininas y/o prostaglandinas (Vasko y col., 1994; Supowit y col., 1995), endotelinas (Dymshitz y Vasko, 1994), el incremento en la tensión de la pared vascular (Holze, 1988) y la activación del Sistema Nervioso Parasimpático (Kawasaki y col., 1990). El CGRP coexiste con el PACAP en APSC del uréter, trigono y uretra de la rata (Fahrenkrug y Hannibal, 1998). Las APSC poseen en su superficie el receptor TRPV<sub>1</sub>, canal iónico no selectivo que se activa por calor (temperaturas superiores a 43°C), protones y capsaicina (Wardle y col., 1997). Este receptor está ampliamente expresado en todo el Tracto Urinario Inferior, y su activación está relacionada con la sensibilidad dolorosa y la contracción de la pared vesical, bien por su efecto directo sobre las fibras sensoriales o de forma indirecta a través la liberación de neurotransmisores desde el urotelio (Avelino y Cruz, 2006). Así, la activación del receptor TRPV<sub>1</sub> produce la liberación de CGRP, SP, NKA y NKB desde las APSC (Sasamura y Kuraishi, 1999) y la desensibilización del mismo con capsaicina o su análogo resiniferatoxina es sumamente eficaz en el síndrome de dolor vesical y en la vejiga hiperactiva (Avelino y Cruz, 2006).

### 1.8.3.1 Uréter

El uréter de los mamíferos recibe una rica inervación sensorial peptidérgica. Un 91% de las fibras aferentes que recibe el uréter de cobaya, son neuronas sensoriales sensibles a capsaicina (Cervero y Sann, 1989), procedente de las raíces dorsales lumbosacras y del ganglio mesentérico posterior desde donde el CGRP es liberado tanto por estímulos eléctricos como químicos (Semenenko y col., 1992; Maggi y col., 1995). Dichas fibras participan en la modulación local de la motilidad ureteral a través de la liberación del CGRP y TKs (Hua ,1986). El CGRP actúa como neurotransmisor inhibitorio en el uréter de la rata y de cobaya a través de un mecanismo dependiente de AMPc, el cual, involucra la activación de canales de K<sup>+</sup> (Santicioli y Maggi, 1994). El periodo refractario en el uréter de cobaya es reducido considerablemente por capsaicina y antagonistas de los receptores de CGRP (Maggi y col., 1995).

El CGRP regula el peristaltismo ureteral por lo que la acción inhibitoria del CGRP sobre la musculatura lisa ureteral podría ser, por tanto, un factor esencial regulador de la excitabilidad ureteral, pudiendo impedir la presencia de ondas antiperistálticas características de obstrucciones ureterales (Maggi y Giuliani, 1991; Maggi y col., 1995).

### 1.8.3.2 Detrusor

En el detrusor es característica la presencia de una rica inervación de APSC conteniendo CGRP. Estudios funcionales han demostrado que la capsaicina, la cual, produce la liberación de CGRP, produce relajación del detrusor de cordero (Tucci y col., 1991). Asimismo, una potente acción inhibitoria del CGRP y la capsaicina ha sido demostrada en el detrusor de cobaya, indicando así, la presencia de reflejos locales en la actividad de la vejiga, donde axones colaterales de fibras sensoriales modulan el mecanismo marcapasos de la pared vesical responsable de las contracciones fásicas del detrusor (Gillespie, 2005). Sin embargo, el CGRP tiene escasa repercusión funcional en el detrusor del cerdo (Persson y col., 1991) y del hombre (Uckert y col., 2002).

### 1.8.3.3 Uretra

Diversos estudios muestran una acción relajante de la capsaicina sobre la musculatura lisa y estriada uretral (Maggi, 1990). De hecho, receptores vaniloides sensibles a dicha neurotoxina están presentes en el esfínter uretral externo, cuya activación da lugar a la liberación de CGRP, produciéndose así la relajación de la uretra (Parlani y col., 1993). Asimismo, el CGRP y la SP disminuyen la presión intrauretral in vivo, confirmando el papel esencial desempeñado por estos péptidos en la regulación motora del esfínter uretral externo durante la micción (Radziszewski y col., 2003). Más recientemente, se ha descrito la existencia de receptores TRPV<sub>1</sub> y CGRP en nervios, urotelio y células intersticiales de la uretra del hombre, indicando así, su implicación en la regulación de la tensión de la musculatura lisa de la región de salida del flujo de orina (Gratzke y col., 2009).



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



La *Sociedad Internacional de Continencia (ICS)* define a la Incontinencia Urinaria como: *“la pérdida involuntaria de orina a través de la uretra, objetivamente demostrable y que constituye, para la persona que lo sufre, un problema higiénico y social”*. Este proceso afecta a todos los grupos de población, edad y sexo. Así, estudios epidemiológicos llevados a cabo en Estados Unidos en el año 2000 revelaban que el 55 % de mujeres y el 34 % de hombres mayores de 60 años, así como, un 42 % de mujeres y un 5 % de hombres menores de 60 años padecían diferentes grados de incontinencia urinaria con un tratamiento de elevado coste económico (presupuesto anual de 19 billones de dólares) (Hu y col., 2004).

En España, el gasto en absorbentes en 2001 fue de 197 millones de euros, lo que representa un 3.2 % del importe total de la prestación farmacéutica del Sistema Nacional de Salud. A pesar del considerable 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, solamente un 20 % de los individuos afectados solicitan consulta médica.

Las incontinencias de estrés Tipo III se producen por disfuncionalidad del mecanismo esfintérico intrínseco que origina un cuello de vejiga urinaria abierto de forma permanente (McGuire y Woodside, 1981). Dicha patología afecta primordialmente 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 también en varones tras cirugías prostáticas, con terapias farmacológicas de escasa eficacia en las que se utilizan esencialmente agonistas de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  e inhibidores de la recaptación de 5-HT (duloxetina) para producir contracción de la base de la vejiga urinaria.

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 en aras a desarrollar un correcto manejo terapéutico en los cuadros de incontinencia urinaria. Así, la existencia de un cuello abierto correlaciona

positivamente con la presencia de incontinencia urinaria producida por deficiencia esfintérica intrínseca (English y col., 1999).

El esfínter interno está constituido por la musculatura lisa del cuello de la vejiga urinaria y la uretra proximal, formando ambas estructuras la zona de salida vesical, 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). Además, existe un control somático sobre el esfínter estriado externo vía 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).

Con relación a la regulación nerviosa, diferentes mediadores inhibidores no adrenérgicos no colinérgicos, como NO, VIP y 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 nervios intramurales es modulada por canales Kv y receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  de localización presináptica, está involucrado en la neurotransmisión inhibitoria produciendo relajación de la musculatura lisa a través de mecanismos neuronales y no neuronales (Hernández y col., 2007, 2008). El ATP, la 5-HT y los péptidos como VIP y PACAP, desempeñan, asimismo, un papel crucial en la transmisión inhibitoria del cuello vesical. El ATP produce relajación del cuello vesical a través de receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> después de la hidrólisis del ATP a ADP y adenosina, respectivamente (Hernández y col., 2009), mientras que la 5-HT, cuyo efecto es modulado por receptores 5-HT<sub>1A</sub> presinápticos, produce relajación vía receptores musculares 5-HT<sub>7</sub> acoplados a la vía de la PKA sin involucrar activación de canales de K<sup>+</sup> de localización postsináptica (Recio y col., 2009). El PACAP y el VIP producen relajación del cuello de la vejiga urinaria del cerdo a través de receptores musculares del subtipo VPAC<sub>2</sub> acoplados a la vía de la PKA, en cambio los que receptores PAC<sub>1</sub> localizados en APSC y acoplados a la liberación del NO y receptores VPAC inhibitorios situados en terminaciones nerviosas motoras están involucrados en las relajaciones producidas por PACAP 38 y VIP, respectivamente (Hernández y col., 2006a,b).

En nuestro laboratorio se ha demostrado la existencia de un componente inhibitor independiente de NO que representa más del 50 % de la relajación del cuello vesical (Hernández y col., 2008).

Por todo lo expuesto, el presente estudio tiene como objetivo general desvelar la naturaleza de los neurotransmisores y/o neuromoduladores independientes del NO involucrados en la transmisión inhibitora en el cuello de la vejiga urinaria en aras de proporcionar terapias farmacológicas efectivas en las incontinencias urinarias de estrés producidas por deficiencia esfintérica intrínseca. De forma específica, investigaremos la posible implicación del CGRP en la neurotransmisión inhibitora NANC del cuello vesical, así como, los mecanismos de señalización intracelular involucrados en dicho proceso. Para ello, mediante diferentes abordajes experimentales (inmunohistoquímica, *Western Blot* y registro de fuerza isométrica), se estudiarán:

**1º. El papel del CGRP en la neurotransmisión inhibitora del cuello de la vejiga urinaria.** Para ello se investigará la distribución de fibras inmunorreactivas para el CGRP y la expresión de receptores de CGRP en las diferentes capas de la pared del cuello vesical, la liberación endógena de CGRP desde nervios intramurales en respuesta a estimulación eléctrica transmural y la señal de transducción acoplada.

**2º. Los mecanismos implicados en la neurotransmisión inhibitora NANC independiente del NO.** En el que se investigará el papel de la vía ciclooxygenasa (COX), ATPasa de la bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>, vías de la PKA y PKG y canales de K<sup>+</sup> involucrados.



### 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*
- Agitadores magnéticos *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 *NuPAGE 4-12 % Bis-Tris- Gel* (*Invitrogen*, 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:

- Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (*Tocris*, Reino Unido).

- Fenilefrina (Fe), agonista de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  (*Sigma*, Estados Unidos).
- Indometacina, inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa (*Sigma*, Estados Unidos).
- Atropina, antagonista de los receptores muscarínicos (*Sigma*, Estados Unidos).
- Guanetidina, bloqueante de la neurotransmisión noradrenérgica (*Sigma*, Estados Unidos).
- NG- nitro-L-Arginina (L-NOARG), inhibidor de la sintasa del óxido nítrico. (*Sigma*, Estados Unidos).
- 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a] quinoxalina-1-ona (ODQ), bloqueante selectivo de guanilato ciclasa soluble (*Tocris*, Reino Unido).
- $\omega$ -conotoxina GVIA ( $\omega$ -CgTX), bloqueante de los canales de  $Ca^{2+}$  neuronales sensibles a voltaje (*Sigma*, Estados Unidos).
- Tetrodotoxina (TTX), bloqueante de los canales de  $Na^+$  neuronales sensibles a voltaje (*Sigma*, Estados Unidos).
- CGRP (8-37) antagonista de receptores CGRP<sub>1</sub> y CGRP<sub>2</sub> (*Tocris*, Reino Unido).
- Fosforamidón, bloqueante de las endopeptidasas (*Sigma*, Estados Unidos).
- Capsaicina, neurotoxina sensorial (*Sigma*, Estados Unidos).
- 4-aminopiridina (4-AP), bloqueante de los canales Kv (*Sigma*, Estados Unidos).
- Apamina, bloqueante de los canales SK<sub>Ca</sub> (*Sigma*, Estados Unidos).
- Caribdotoxina (ChTX), bloqueante de los canales BK<sub>Ca</sub> y SK<sub>Ca</sub> (*Sigma*, Estados Unidos).
- Iberiotoxina (IbTX), bloqueante de los canales BK<sub>Ca</sub> (*Tocris*, Reino Unido).
- ([Ala32]H2B(29-35), péptido inhibidor de la quinasa dependiente de GMPc (*Tocris*, Reino Unido).
- Glibenclamida, bloqueante de los canales K<sub>ATP</sub> (*Tocris*, Reino Unido).
- N-[2-ciclohexiloxil-4-nitrofenil] metanosulfonamida (NS-398), bloqueante selectivo de la COX-2 (*Tocris*, Reino Unido).

- Fragmento (6-22) amida de la PKA, inhibidor de la PKA (*Tocris*, Reino Unido).
- 5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol (SC-560), bloqueante selectivo de la COX-1 (*Tocris*, Reino Unido).

La capsaicina y la indometacina fueron disueltas en etanol. 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. El [Ala32]H2B(29-35), el fosforamidón, la glibenclamida, el NS 398, el ODQ, el inhibidor de la PKA y el SC 560 fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO).

### 3.1.4 Soluciones

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

#### 3.1.4.1 Soluciones fisiológicas

##### Solución salina fisiológica (SSF)

La composición de esta solución en mM es:

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

Dicha solución fue preparada a diario diluyendo los reactivos en agua destilada y en continua agitación. Previamente a la adición de CaCl<sub>2</sub> se oxigenó la solución

durante 20 minutos con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) 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 CaCl<sub>2</sub> con las siguientes sales (en mM):

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

#### 3.1.4.2 Soluciones para el estudio inmunohistoquímico

Las soluciones utilizadas en el estudio inmunohistoquímico fueron la solución ABC, DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DAB-Ni/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contiene:

- 40 ml de tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4.
- 20 mg de DAB.
- 40 µl de solución al 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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	1 nM
- Ácido etilendiaminotetraacético	
- Etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)	5 nM
- N,N,N',N'-ácido tetraacético	
- Ácido okadaico	1 µM
- Aprotinina	30 U/ml

Todos estos compuestos son de *Sigma* (Estados Unidos).

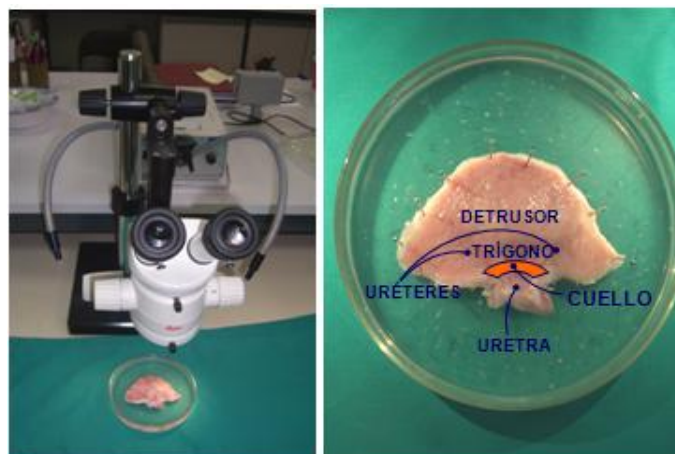
#### Tampón salino fosfato (PBS) (pH 7.4)

- Tween 20	0.1%
------------	------

*Bio-Rad* (Estados Unidos)

## 3.2 MÉTODOS

En nuestro laboratorio, las vejigas fueron colocadas 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 trígono (a 8-9 mm de los orificios ureterales) y a 4-5 mm por encima de la uretra proximal, que es la región uretral adyacente al cuello vesical delimitada por la musculatura estriada del esfínter uretral externo (Hernández y col. 2006a).



- **Figura 3.1.** Disección de la vejiga en placas con SSF realizado con un microscopio *Leica Diaplan* y una fuente de luz fría *Leica*

### 3.2.1 Western blotting

El urotelio y el músculo del cuello vesical fueron homogeneizadas 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), etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetiléter) (5 mM), N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA), ácido okadaico (1  $\mu$ M) y aprotinina (30 U/ml), todos ellos de Sigma (Estados Unidos). Después de la centrifugación a 12000xg durante 5 min, el sobrenadante fue recogido y utilizado para la determinación de proteína (BCA Kit de proteína, *Rockford*, Estados Unidos). Muestras proteicas de 30  $\mu$ g fueron entonces separadas por SDS-PAGE en un gel de acrilamida discontinuo (7.5 y 12%), y transferido a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (*Amersham, GE Healthcare*, Reino Unido). Las marcas fueron bloqueadas con leche en polvo (al 10%) en tampón salino fosfato (PBS), pH 7.4, conteniendo 0.1% Tween 20 (PBST, *Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos*), durante 3 h. Las marcas fueron incubadas con un anticuerpo anti CALCRL (*Aviva Systems*, Estados Unidos), el cual, reconoce CGRP junto con RAMP<sub>1</sub> y adrenomedulina junto con RAMP<sub>2</sub> y RAMP<sub>3</sub>, a 4° C, durante toda la noche. Las marcas fueron entonces lavadas durante 10 min con leche en polvo en PBST e incubadas con peroxidasa marcada con anticuerpo anticonejo (a una 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 de *Western blot ECL* (*Amersham, GE Healthcare*, Reino Unido) de acuerdo a las instrucciones

del fabricante. Las marcas fueron expuestas a *Hyperfilm ECL* (Amersham, GE Healthcare, Reino Unido), durante 10 min. La determinación del peso molecular se realizó mediante un set standard *SDS-PAGE* (Amersham, GE Healthcare, Reino Unido).

### 3.2.2 Inmunohistoquímica

Preparaciones de cuello vesical fueron fijadas en tampón fosfato 0.1 M de paraformaldehído al 4 %, pH 7.4 (PB), durante 24 a 48 h a 4° C, y a continuación colocadas en tampón fosfato 0.1 M con sacarosa al 30 % para crioprotección. El tejido fue congelado en CO<sub>2</sub> 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 el anticuerpo anti-CGRP de conejo (*Chemicon International Inc*, a una dilución de 1:3000) en PB conteniendo 0.3 % Triton-X-100 con 2% de NGS, a 4°C durante 48 h. Las secciones fueron reactivas con un suero secundario anticonejo de cabra biotilado (*Chemicon International Inc*, a una dilución 1:400), durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron entonces incubadas 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) obteniendo un pH final en el baño de 7.4. La señal eléctrica fue continuamente registrada en un polígrafo (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). En los experimentos de estimulación eléctrica transmural (EET), las muestras fueron incubadas con guanetidina (10  $\mu$ M), atropina (0.1  $\mu$ M) y N-G-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100  $\mu$ M) durante 1 h, reemplazando la solución cada 20 min, estando presentes dichos tratamientos durante el desarrollo del experimento. En tiras precontraídas con fenilefrina (FE, 1  $\mu$ M), la EET fue llevada a cabo mediante pulsos rectangulares (de un 1 ms de duración, rango de frecuencias entre 1 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 (Barcelona, Spain). Se realizó una primera curva frecuencia respuesta o dosis respuesta de relajación inducida por EET o CGRP respectivamente. 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 (antagonista de los receptores de CGRP e inhibidores de los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje neuronales, ciclooxigenasas, guanilato ciclasa soluble, protein cinasa dependiente del AMPc, protein cinasa dependiente del GMPc, canales de  $K^+$  y ATPasa de la bomba  $Na^+-K^+$ ) durante un periodo de 30 min y a continuación se realizó la segunda curva de relajación de EET y CGRP. Para la desensibilización de las aferentes primarias sensibles a capsaicina (APSC), las preparaciones fueron preincubadas con capsaicina (10  $\mu$ M) durante 1 h, reemplazando la solución cada 20 min y manteniendo dicho tratamiento durante el desarrollo del experimento.



**Figura 3.2** Baños de órganos



**Figura 3.3.** Polígrafos y estimulador eléctrico.

### 3.2.3.2 Cálculo y estadística

La sensibilidad al CGRP es expresada en términos de  $pD_2$ , el cual, es el logaritmo negativo de la  $EC_{50}$  ( $pD_2 = -\log EC_{50}$ ), siendo la  $EC_{50}$  la concentración necesaria 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 tiras por animal). Las diferencias fueron analizadas por medio de un test de la  $t$  de Student para observaciones pareadas. 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.

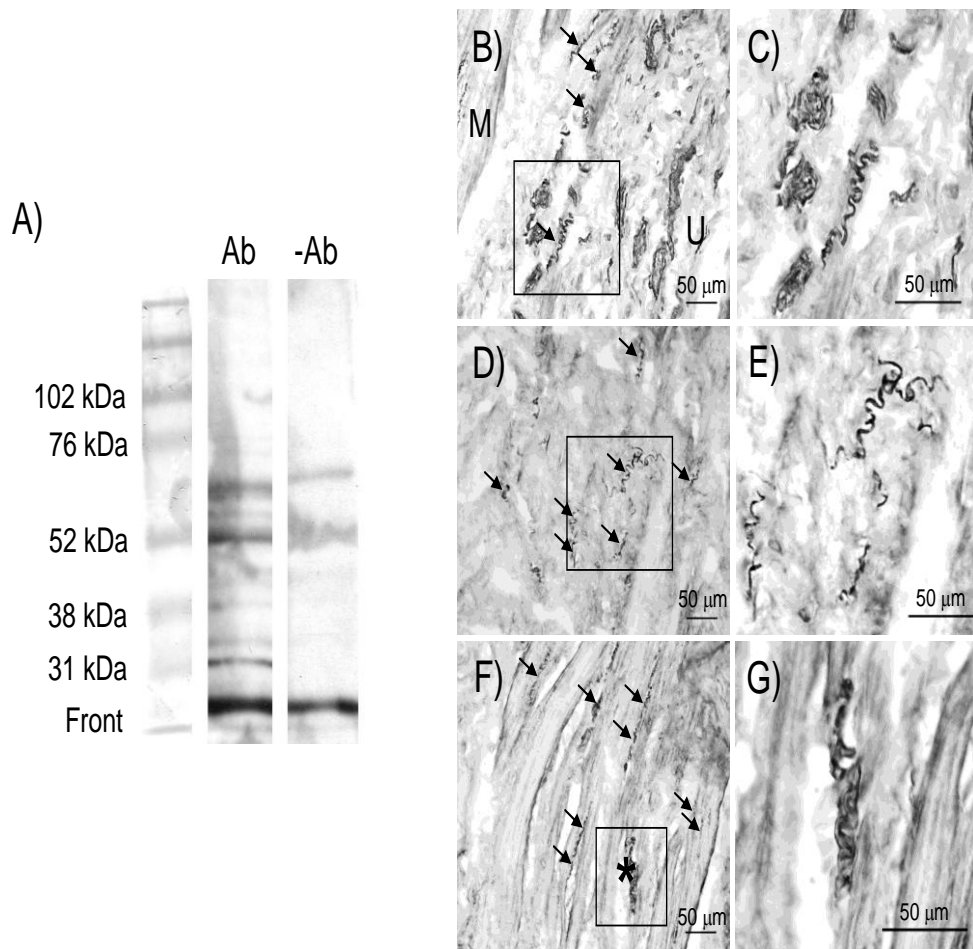
## 4. RESULTADOS



#### 4.1. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE CGRP E INMUNORREACTIVIDAD A CGRP EN EL CUELLO VESICAL

Para el marcaje del receptor del CGRP, utilizamos un anticuerpo CALCRL (*Aviva Systems*, San Diego, USA), el cual, reconoce al CGRP junto con RAMP<sub>1</sub> y a la adrenomedulina junto con RAMP<sub>2</sub> y RAMP<sub>3</sub>. Se obtuvo una banda en 52 kDa, muy próxima al peso molecular de CALCRL (53 kDa) compatible con la expresión del receptor CGRP<sub>2</sub> (Figura 4.1A).

Una rica densidad de fibras nerviosas, conteniendo elementos inmunorreactivos al CGRP en el interior de densas varicosidades, fue identificada penetrando a través de la serosa del cuello de la vejiga urinaria. Dichas fibras, de tamaño variable que oscilaba desde gruesos troncos nerviosos a finas fibras individuales, se distribuyeron fundamentalmente en la capa muscular y en el urotelio (Figuras 4.1B-4.1G). Asimismo, dichas fibras se observaron alrededor de las arterias pequeñas que irrigan el cuello vesical.



**Figura 4.1. Western blot e inmunoreactividad a CGRP en el cuello de la vejiga del cerdo.** (A) Western blot utilizando un anticuerpo CALCRL, en el cual, se aprecian varias bandas (carril Ab). Como consecuencia de la múltiple reactividad del anticuerpo y para la consecución de especificidad en el marcaje, incubamos también en ausencia del anticuerpo (carril -Ab). Una banda en 52 kDa, muy próxima al peso molecular de CALCRL (53 kDa), es observada después de comparar los carriles Ab y -Ab. (B-G) Tinción inmunohistoquímica del cuello de la vejiga del cerdo mostrando una rica inervación inmunorreactiva al CGRP. Numerosas terminaciones inmunopositivas al CGRP de tamaño variable (B, flechas y C aumento) son localizadas por debajo del urotelio. En la capa muscular, las terminaciones inmunopositivas generalmente aparecen como troncos varicosos de tamaño variable que a menudo recorren la fibra muscular (D y F. Flechas. E y G aumento). Además, un número moderado de troncos nerviosos pueden ser observados en la profundidad de la fibra varicosa arriba descrita (F, asterisco. G, aumento) (U: urotelio; M: músculo).

## 4.2. ESTUDIOS FUNCIONALES

Tiras longitudinales pertenecientes al cuello de la vejiga urinaria del cerdo fueron normalizadas bajo una tensión pasiva de  $1.7 \pm 0.2$  g (n= 104). En dichas condiciones, SSFK (124 mM) produjo una contracción de  $1.9 \pm 0.2$  g (n= 104). Las preparaciones fueron precontraídas con FE (1  $\mu$ M), la cual, indujo un tono sostenido de  $1.8 \pm 0.2$  g (n= 104).

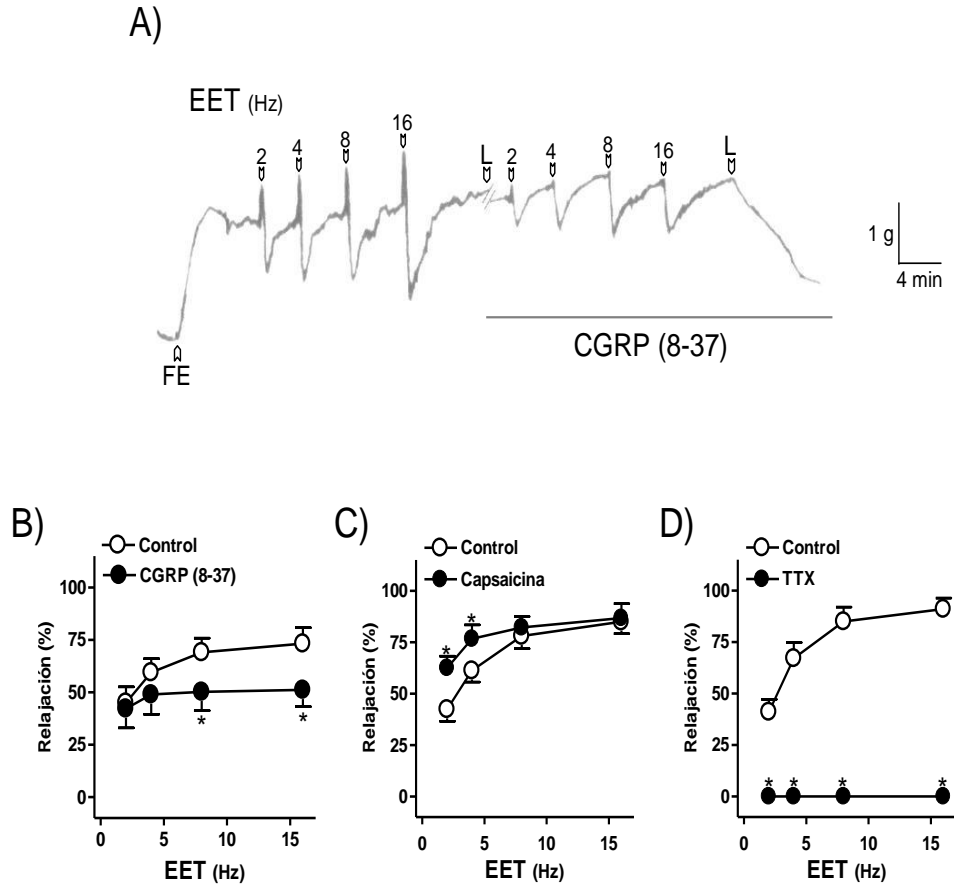
### 4.2.1. Papel del CGRP en la neurotransmisión inhibitoria del cuello vesical.

Con la finalidad de desvelar la posible implicación del CGRP en la neurotransmisión NANC inhibitoria, se procedió a investigar la relajación producida por dicho péptido liberado endógenamente, desde nervios intramurales en respuesta a la estimulación eléctrica transmural (EET), y añadido exógenamente. Así, en preparaciones tratadas con guanetidina (10  $\mu$ M), atropina (0.1  $\mu$ M) y L-NOARG (100  $\mu$ M), bloqueantes de la neurotransmisión noradrenérgica, de los receptores muscarínicos y de la sintasa del NO, respectivamente, y precontraídas con FE (1  $\mu$ M), la EET (2-16 Hz) produjo relajaciones dependientes de la frecuencia (relajación máxima obtenida a una frecuencia de 16 Hz del  $82.7 \pm 5.7\%$  de inhibición de la precontracción inducida por FE, n=11). La adición del CGRP (0.1 nM-0.3  $\mu$ M) originó relajaciones dependientes de la concentración (valores de  $pD_2$  y  $E_{max}$  de  $8.5 \pm 0.2$  y  $48.8 \pm 4.7\%$ , n=19). Estos resultados sugieren la implicación del CGRP como neurotransmisor inhibitorio del cuello vesical.

### 4.2.2 Relajación inducida por el CGRP liberado desde los nervios intramurales.

El CGRP (8-37) (10  $\mu$ M), un antagonista de los receptores del CGRP, redujo las relajaciones inducidas por EET (Figuras 4.2A, 4.2B, Tabla 1). Asimismo, dichas relajaciones fueron potenciadas por la capsaicina (10  $\mu$ M) (Figura 4.2C, Tabla 1) y abolidas por el TTX (1  $\mu$ M) (Figura 4.2D, Tabla 1), bloqueantes de las aferentes primarias y de los canales de  $Na^+$  neuronales dependientes de voltaje, respectivamente.

Estos resultados, en conjunto, sugieren que el CGRP, liberado desde aferentes primarias sensibles a la capsaicina, produce relajación a través de los receptores del subtipo CGRP<sub>2</sub>.



**Figura 4.2. Implicación del CGRP en la neurotransmisión inhibitoria del cuello vesical.**

(A) Registro de fuerza isométrica mostrando las relajaciones inducidas por estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, rango de frecuencias de 2-16 Hz, trenes de 20s y corriente de salida constante ajustada a 75 mA) en ausencia y presencia del antagonista de los receptores de CGRP, el CGRP (8-37) (10  $\mu$ M), en preparaciones precontraídas con fenilefrina (FE, 1  $\mu$ M) y tratadas con guanetidina (10  $\mu$ M), atropina (0.1  $\mu$ M) y N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100  $\mu$ M). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). L: lavado. (B, C, D) Curvas de relajación dependientes de la frecuencia de EET en ausencia (control, círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) del CGRP (8-37) (10  $\mu$ M) (B), de la capsaicina (10  $\mu$ M) (C) y de la tetrodotoxina (TTX, 1  $\mu$ M) (D). Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE y representa la media  $\pm$  e.s.m. de 6-8 reparaciones. \* $P$ <0.05, con respecto al control (test de la  $t$  de Student para observaciones pareadas).

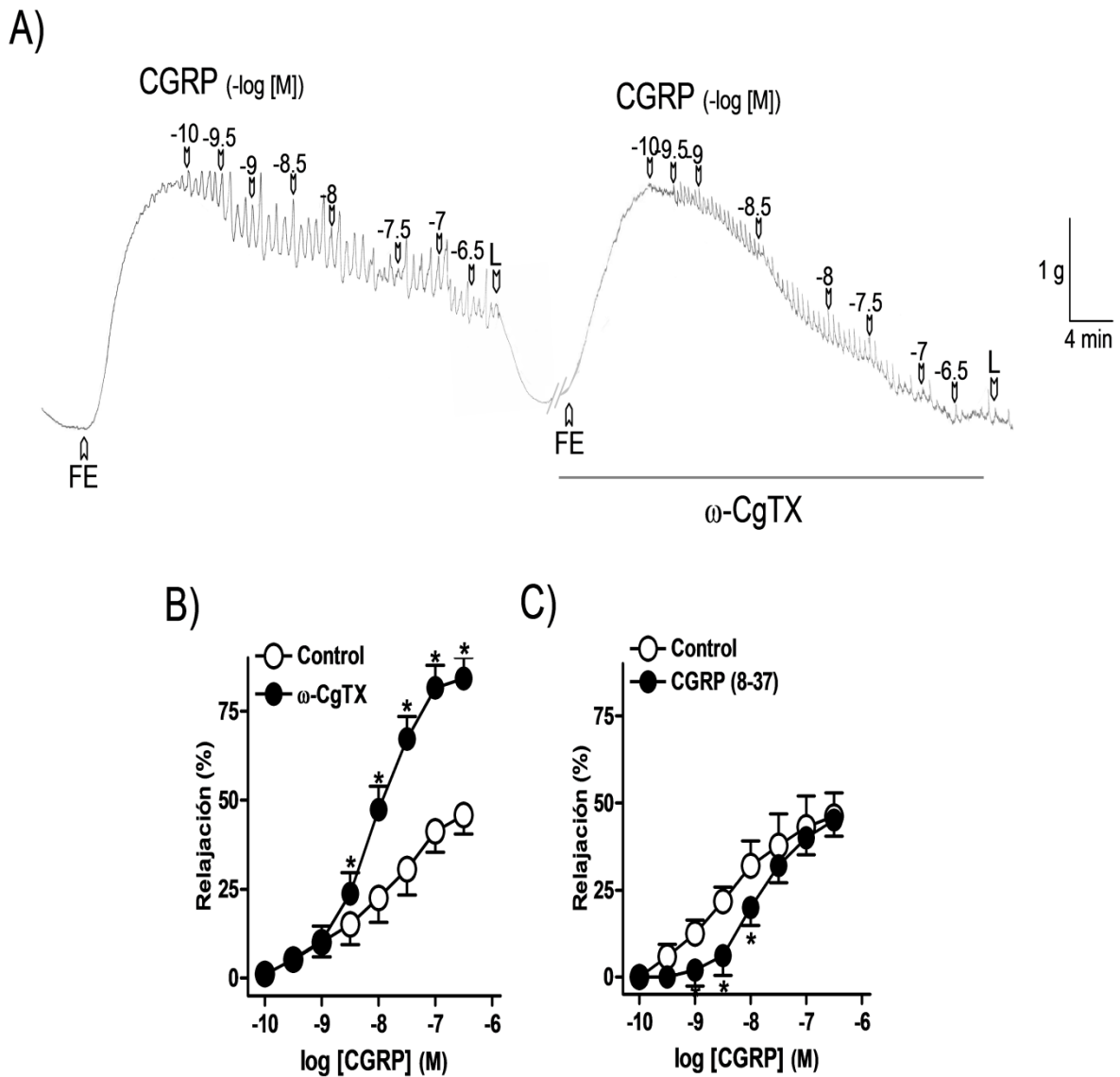
**Tabla 1.** Efecto de los inhibidores de los canales de Na<sup>+</sup> neuronales dependientes de voltaje, de las aferentes primarias sensibles a la capsaicina y de los receptores de CGRP sobre las relajaciones inducidas por estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, 2-16 Hz, trenes de 20 s) en preparaciones de cuello de vejiga urinaria del cerdo tratadas con guanetidina (10 μM), atropina (0.1 μM) y N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100 μM), para bloquear la neurotransmisión noradrenérgica, los receptores muscarínicos y la sintasa de óxido nítrico, respectivamente.

	EET(Hz)				
	<i>n</i>	2	4	8	16
<b>Control</b>	6	41±6	67±8	85±7	91±7
<b>TTX(1 μM)</b>	6	0±0*	0±0*	0±0*	0±0*
<b>Control</b>	8	42±5	61±6	78±6	83±6
<b>Capsaicina (10 μM )</b>	8	63±6*	76±7*	82±5	87±6
<b>Control</b>	8	45±8	60±7	69±7	74±8
<b>CGRP8-37(10 μM)</b>	8	42±9	49±9	50±9*	51±8*

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 con respecto al control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas).

#### 4.2.3 Relajación inducida por CGRP añadido exógenamente

Con objeto de desvelar la posible implicación de mecanismos neuronales en la respuesta del CGRP, las preparaciones fueron incubadas con ω-CgTX (1 μM), un inhibidor de los canales VOC neuronales. Dicho agente potenció, en gran medida las relajaciones producidas por la estimulación exógena con el CGRP (Figuras 4.3A, 4.3B, Tabla 2). Dichas relajaciones fueron además reducidas por el antagonista de los receptores del CGRP, el CGRP (8-37) (10 μM) (Figura 4.3C, Tabla 2). Sin embargo, el fosforamidón (10 μM), el L-NOARG (100 μM), el ODQ (5 μM) y la indometacina (3 μM), bloqueantes de las endopeptidasas, de la sintasa del NO, de la guanilato ciclasa soluble y de la COX, respectivamente, no modificaron las relajaciones del CGRP (Tabla 2). Estos resultados sugieren que, mecanismos no-neuronales están involucrados en la relajación inducida por el CGRP, la cual, es producida vía activación de receptores musculares CGRP<sub>2</sub> a través de mecanismos independientes del NO y la COX.



**Figura 4.3. Mecanismos neuronales y no neuronales están involucrados en la relajación inducida por el CGRP.** (A) Registro de fuerza isométrica mostrando las relajaciones inducidas por el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, 0.1-300 nM) en ausencia y presencia de  $\omega$ -conotoxina GVIA ( $\omega$ -CgTX, 1  $\mu$ M) en preparaciones de cuello vesical precontraídas con fenilefrina (FE, 1  $\mu$ 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 del CGRP en ausencia (control, círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de la  $\omega$ -CgTX (B) y del CGRP (8-37) (10  $\mu$ M) (C). Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE y representa la media  $\pm$  e.s.m. de 6-8 preparaciones. \* $P$ <0.05, con respecto al control (test de la  $t$  de Student para observaciones pareadas).

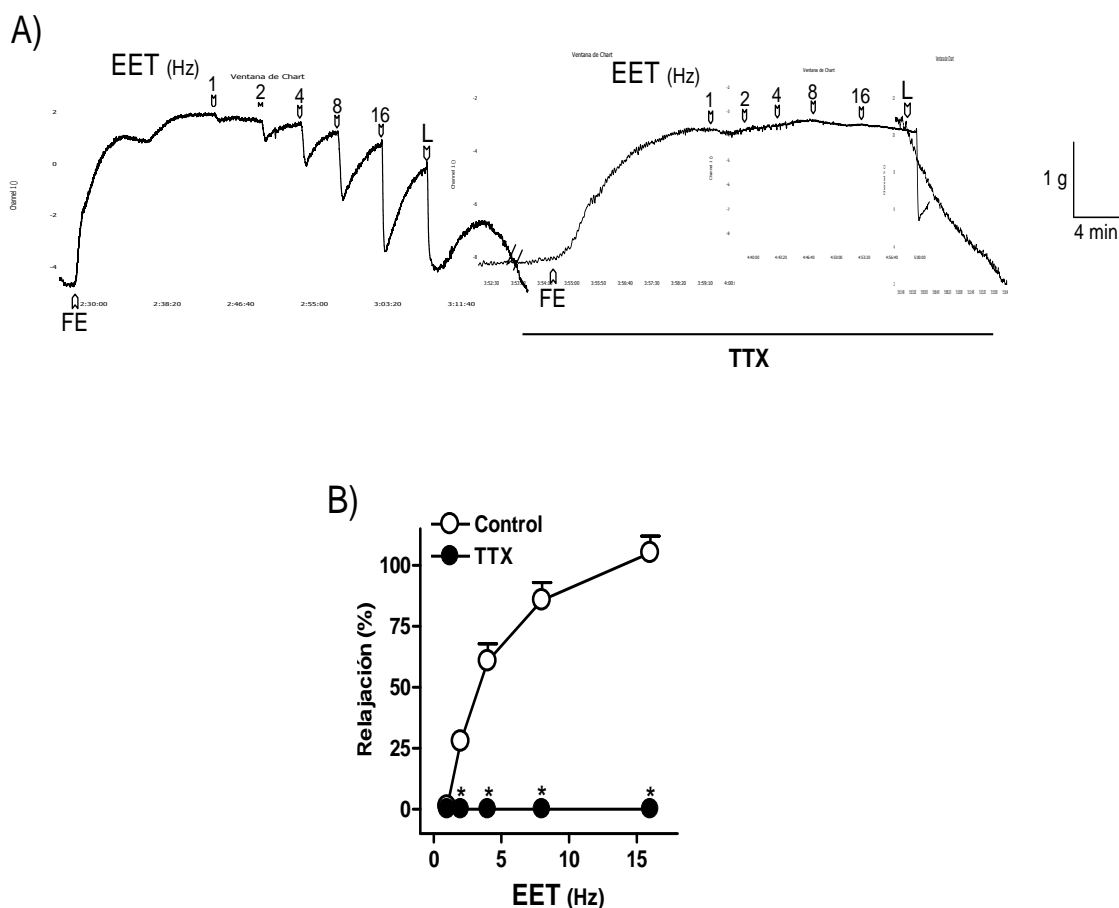
**Tabla 2.** Efecto de los inhibidores de los canales de Ca<sup>2+</sup> neuronales dependientes de voltaje, de las endopeptidasas, de la sintasa de óxido nítrico, de la guanilato ciclasa soluble, de la ciclooxigenasa y de los receptores del CGRP sobre las relajaciones inducidas por el CGRP (0.1-300 nM) en el cuello de la vejiga del cerdo.

	CGRP		
	<i>n</i>	<i>pD</i> <sub>2</sub>	<i>E</i> <sub>max</sub> (%)
Control	6	7.8±0.1	46±5
ω-CgTX (1 μM)	6	8.2±0.1*	84±6*
Control	6	8.0±0.1	45±5
Fosforamidón(10 μM)	6	8.0±0.1	47±5
Control	6	8.2±0.2	51±8
L-NOARG (100 μM)	6	8.2±0.1	49±7
Control	6	7.9±0.1	53±5
ODQ (5 μM)	6	7.9±0.1	50±5
Control	6	8.0±0.1	48±8
Indometacina (3 μM)	6	8.1±0.1	54±9
Control	8	8.4±0.2	46±7
CGRP (8-37) (10 μM)	8	7.8±0.1*	45±5

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

#### 4.2.4 Neurotransmisión inhibitoria NANC independiente de NO.

En condiciones NANC no nitrérgicas, la EET (1-16 Hz) produjo relajaciones dependientes de la frecuencia (relajación máxima obtenida a una frecuencia de 16 Hz del 105±8 % de inhibición de la precontracción inducida por FE, *n*= 67). El TTX (1 μM), un inhibidor de los canales de Na<sup>+</sup> neuronales dependientes de voltaje, abolió las relajaciones inducidas por EET, indicando así su carácter neurogénico (Figura 4, Tabla 3).

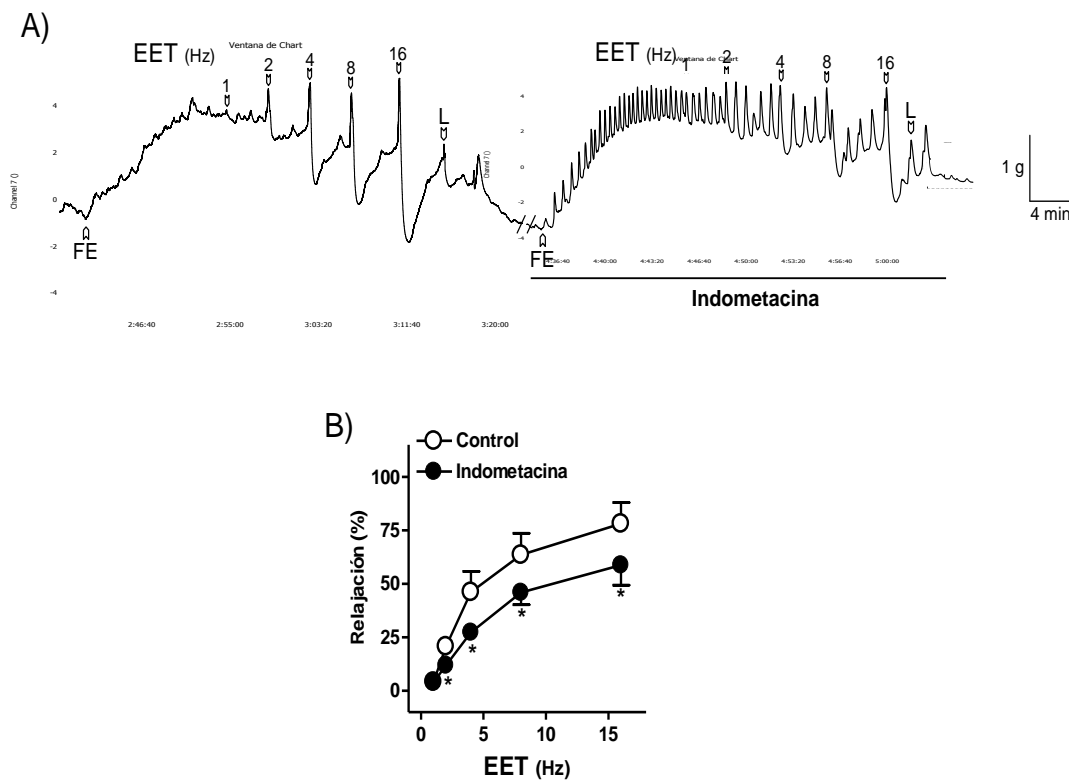


**Figura 4.4. Neurotransmisión inhibitoria NANC independiente de NO en el cuello vesical.** (A) Registro de fuerza isométrica mostrando las relajaciones inducidas por estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, en un rango de frecuencias entre 1-16 Hz, trenes de 20s y corriente de salida constante ajustada a 75 mA) en ausencia y presencia de tetrodotoxina (TTX, 1  $\mu$ M), un inhibidor de los canales de Na<sup>+</sup> neuronales dependientes de voltaje, en preparaciones de cuello de la vejiga precontraídas con fenilefrina (FE, 1  $\mu$ M) tratadas con guanetidina (10  $\mu$ M), atropina (0.1  $\mu$ M) y N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100  $\mu$ M). La barra vertical muestra la tensión en gramos (g) y la horizontal, el tiempo en minutos (min). L: lavado. (B, C, D) Curvas de relajación dependientes de la frecuencia de EET en ausencia (control, círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de TTX. Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE y representa la media  $\pm$  e.s.m. de 6 preparaciones. \* $P$ <0.05, con respecto al control (test de la  $t$  de Student para observaciones pareadas).

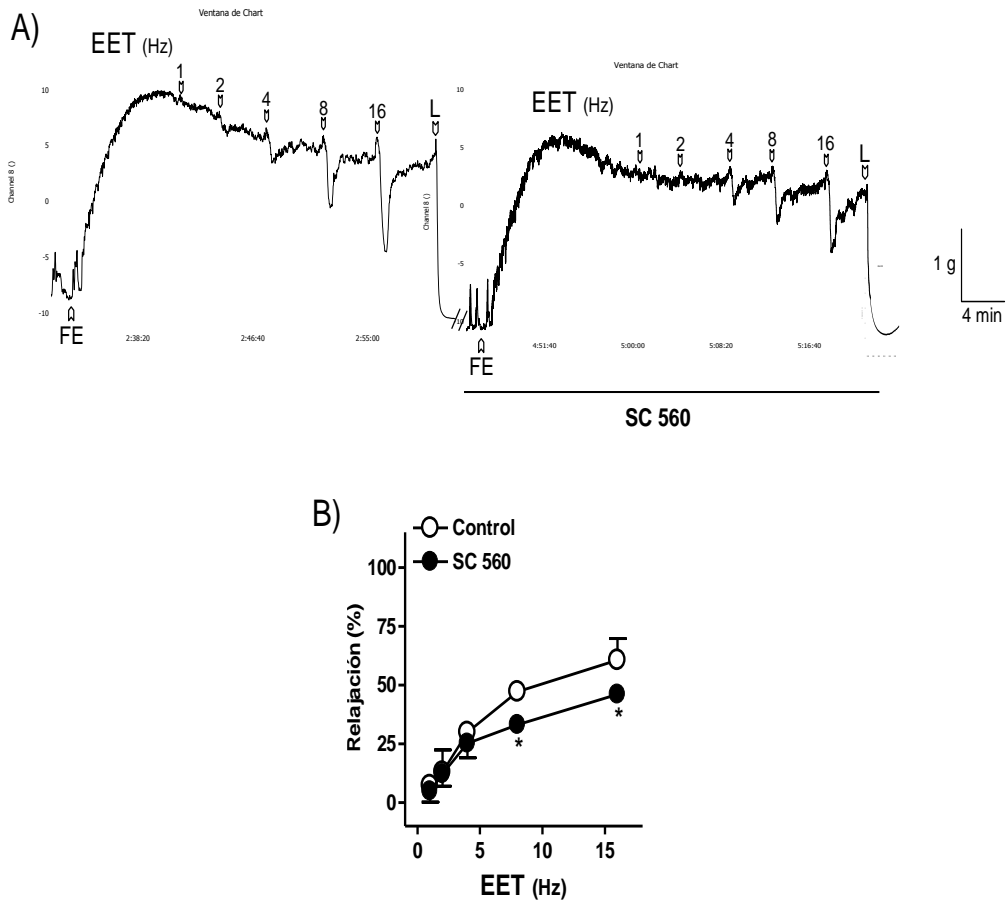
#### 4.2.5 Implicación de la vía de la ciclooxigenasa (COX) en la neurotransmisión inhibitoria NANC independiente de NO.

Para investigar la posible implicación de la COX en la neurotransmisión inhibitoria independiente del NO, las preparaciones fueron incubadas con

indometacina (3  $\mu\text{M}$ ) (Figura 4.5), un inhibidor no selectivo de la COX. Dicho tratamiento favoreció el desarrollo de actividad fásica contráctil del cuello vesical y redujo junto con SC 560 (1  $\mu\text{M}$ ) (Figura 4.6), un inhibidor selectivo de la COX-1, las relajaciones inducidas por EET. Sin embargo, NS 398 (1  $\mu\text{M}$ ), un bloqueante selectivo de la COX-2, no modificó dichas respuestas nerviosas (Tabla 3). Estos resultados sugieren la existencia de una liberación basal de prostaglandinas modulando la actividad contráctil del músculo liso del cuello vesical. Asimismo, la neurotransmisión NANC no nitrérgica es mediada, en parte, a través de la COX-1.



**Figura 4.5. Implicación de la ciclooxigenasa (COX) en la neurotransmisión inhibitoria del cuello vesical.** (A) Registro de fuerza isométrica mostrando las relajaciones inducidas por estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, en un rango de frecuencias entre 1-16 Hz, trenes de 20s y corriente de salida constante ajustada a 75 mA) en ausencia y presencia de indometacina (3  $\mu\text{M}$ ), bloqueante no selectivo de la COX, en preparaciones precontraídas con fenilefrina (FE, 1  $\mu\text{M}$ ) tratadas con guanetidina (10  $\mu\text{M}$ ), atropina (0.1  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginina (L-NOARG, 100  $\mu\text{M}$ ). 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 frecuencia de EET en ausencia (control, círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de indometacina (3  $\mu\text{M}$ ). Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE y representa la media  $\pm$  e.s.m. de 6 preparaciones. \* $P < 0.05$ , con respecto al control (test de la  $t$  de Student para observaciones pareadas).



**Figura 4.6. Implicación de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) en la neurotransmisión inhibitoria del cuello vesical** (A) Registro de fuerza isométrica mostrando las relajaciones inducidas por estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, en un rango de frecuencias entre 1-16 Hz, trenes de 20s y corriente de salida constante ajustada a 75 mA) en ausencia y presencia del SC 560 (1  $\mu$ M), un bloqueante selectivo de la COX-1, en preparaciones precontraídas con fenilefrina (FE, 1  $\mu$ M) tratadas con guanetidina (10  $\mu$ M), atropina (0.1  $\mu$ M) y N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100  $\mu$ 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 frecuencia de EET en ausencia (control, círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de SC 560 (1  $\mu$ M). Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE y representa la media $\pm$ e.s.m. de 6 preparaciones. \*P<0.05, con respecto al control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas).

#### 4.2.6 Papel de la guanilato ciclasa soluble, PKG y PKA sobre la relajación nerviosa independiente de NO.

El tratamiento de nuestras preparaciones con el ODQ (5  $\mu$ M), [Ala<sup>32</sup>]H2B(29-35) (100  $\mu$ M) y el fragmento (6-22) de la PKA, bloqueantes de la guanilato ciclasa soluble, PKG y PKA, respectivamente, no modificó la relajación nerviosa NANC no nitrérgica inducida por EET (Tabla 3).

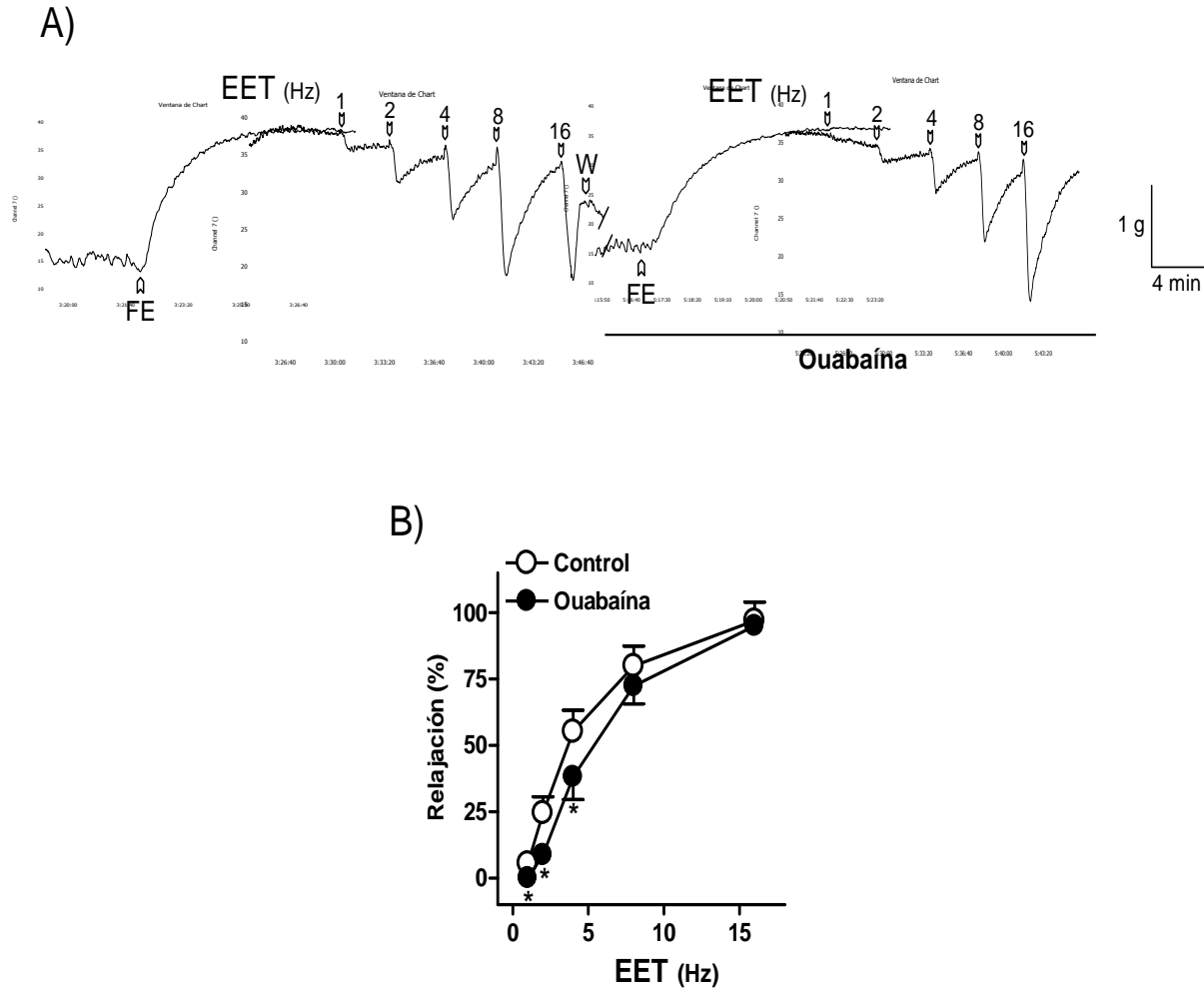
**Tabla 3.** Efecto de los inhibidores de los canales de Na<sup>+</sup> neuronales dependientes de voltaje, de las ciclooxigenasas, de la ciclooxigenasa-1, de la ciclooxigenasa-2, de la guanilato ciclasa soluble, de la protein cinasa dependiente del GMPc y de la protein cinasa dependiente del AMPc, sobre las relajaciones inducidas por estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, rango de frecuencias entre 1 y 16 Hz, trenes de 20 s, con la corriente de salida constante ajustada a 75 mA) en preparaciones de cuello de vejiga urinaria del cerdo tratadas con guanetidina (10  $\mu$ M), atropina(0.1  $\mu$ M) y N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100  $\mu$ M) para bloquear la neurotransmisión noradrenérgica, los receptores muscarínicos y la sintasa de óxido nítrico, respectivamente.

	EET (Hz)					
	<i>n</i>	1	2	4	8	16
Control	6	4±3	28±4	61±7	86±7	105±7
TTX (1 $\mu$ M)	6	0±0*	0±0*	0±0*	0±0*	0±0*
Control	6	4±2	21±4	46±10	64±10	78±9
Indometacina (3 $\mu$ M)	6	4±0	12±3*	27±3*	46±6*	59±9*
Control	6	7±4	13±9	30±4	47±3	61±9
SC 560 (1 $\mu$ M)	6	5±5	12±5	25±6	33±4*	46±4*
Control	6	5±1	33±7	69±10	89±11	110±9
NS 398 (1 $\mu$ M)	6	5±2	35±8	66±9	84±10	104±9
Control	8	5±2	39±9	91±12	123±14	153±7
ODQ (5 $\mu$ M)	8	4±2	45±12	105±14	131±12	145±8
Control	7	1±1	23±6	73±9	113±12	135±12
[Ala <sup>32</sup> ]H2B(29-35) (100 $\mu$ M)	7	0±0	18±7	64±9	108±11	130±11
Control	6	3±1	20±7	72±13	112±15	122±11
PKA (6-22) amida (100 $\mu$ M)	6	3±1	18±9	78±14	104±10	119±11

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

#### 4.2.7 Papel de los canales de K<sup>+</sup> y de la ATPasa de la bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> sobre las relajación nerviosa independiente de NO.

Para el estudio de la posible implicación de los canales de K<sup>+</sup> en la relajación nerviosa independiente del NO inducida por EET, las preparaciones fueron incubadas con IbTX (0.1 μM), ChTX (0.1 μM), apamina (0.5 μM), glibenclamida (1 μM) y 4-AP (100 μM), que son inhibidores de los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de alta (BK<sub>Ca</sub>)-, intermedia (IK<sub>Ca</sub>)- y baja (SK<sub>Ca</sub>)-conductancia, canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP (K<sub>ATP</sub>) y canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (K<sub>v</sub>), respectivamente. Dichos bloqueantes no modificaron, en modo alguno, las relajaciones inducidas por EET (Tabla 4). Asimismo, el tratamiento conjunto de ChTX y apamina tampoco redujo dichas respuestas (Tabla 4). La ouabaína (10 μM), un inhibidor selectivo de la ATPasa de la bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>, redujo las relajaciones producidas por bajas frecuencias de EET (Figura 4.7, Tabla 4). Estos resultados en conjunto indican que la neurotransmisión inhibitoria NANC independiente de NO es producida a través de la activación de la ATPasa de la bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>. Sin embargo, tanto las vías de la PKA y/o PKG como los canales de K<sup>+</sup> postsinápticos no parecen estar involucrados en las relajaciones nerviosas independientes de NO.



**Figura 4.7 Implicación de la ATPasa de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  en la neurotransmisión inhibitoria NANC independiente de NO.** (A) Registro de fuerza isométrica mostrando las relajaciones inducidas por estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, en un rango de frecuencias entre 1-16 Hz, trenes de 20s y corriente de salida constante ajustada a 75 mA) en ausencia y presencia de ouabaína (10  $\mu\text{M}$ ), un bloqueante de la ATPasa de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , en preparaciones precontraídas con fenilefrina (FE, 1  $\mu\text{M}$ ) tratadas con guanetidina (10  $\mu\text{M}$ ), atropina (0.1  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginina (L-NOARG, 100  $\mu\text{M}$ ). 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 frecuencia de EET en ausencia (control, círculos vacíos) y presencia (círculos llenos) de ouabaína (10  $\mu\text{M}$ ). Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición de la precontracción inducida por FE y representa la media  $\pm$  e.s.m. de 8 preparaciones. \* $P < 0.05$ , con respecto al control (test de la  $t$  de Student para observaciones pareadas).

**Tabla 4.** Efecto de los inhibidores de los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de alta, intermedia y baja conductancia, de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP, de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje y de la ATPasa de la bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> sobre las relajaciones inducidas por estimulación eléctrica transmural (EET, 1 ms de duración, rango de frecuencias entre 1 y 16 Hz, trenes de 20 s, con la corriente de salida constante ajustada a 75 mA) en preparaciones de cuello de vejiga urinaria del cerdo tratadas con guanetidina (10 µM), atropina (0.1 µM) y N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100 µM) para bloquear la neurotransmisión noradrenérgica, los receptores muscarínicos y la sintasa de óxido nítrico, respectivamente.

	EFS (Hz)					
	<i>n</i>	1	2	4	8	16
Control	7	3±1	16±9	84±11	125±8	145±5
IbTX (0.1 µM)	7	2±2	21±6	93±9	129±11	143±9
Control	6	2±2	23±7	62±9	85±11	93±9
ChTX (0.1 µM)	6	1±1	19±8	55±11	79±10	84±7
Control	7	0±0	8±6	54±11	78±9	83±8
Apamina (0.5 µM)	7	0±0	5±4	46±10	70±11	79±10
Control	7	3±1	18±5	59±9	91±8	108±7
ChTX + Apamina	7	3±0	19±5	55±10	87±8	101±8
Control	6	3±1	19±5	55±9	78±11	81±10
Glibenclamida (1 µM)	6	2±2	14±8	50±11	77±13	86±11
Control	6	3±3	24±9	59±11	92±9	95±3
4-AP (100 µM)	6	5±4	29±10	65±10	93±9	96±5
Control	8	5±2	25±6	55±8	80±8	97±7
Ouabaína (10 µM)	8	0±0*	9±3*	38±9*	72±7	95±4

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 con respecto al control (test de la *t* de Student para observaciones pareadas).

## 5. DISCUSIÓN



## 5.1. IMPLICACIÓN DEL CGRP EN LA NEUROTRANSMISIÓN INHIBIDORA DEL CUELLO VESICAL

En lo concerniente al primer objetivo de nuestra investigación, los resultados obtenidos proveen evidencia morfológica y funcional de que el CGRP, liberado desde nervios intramurales, está involucrado en la neurotransmisión NANC inhibidora del cuello vesical, produciendo relajación de la musculatura lisa a través de la activación de receptores neuronales y musculares del CGRP vía mecanismos independientes del NO y de la COX. Esta conclusión se basa en los siguientes hallazgos: (1) La expresión del receptor CGRP<sub>2</sub> (Figura 4.1), así como la presencia de una alta densidad de inervación inmunorreactiva a CGRP distribuída en el suburotelio y en la capa muscular de la pared del cuello de la vejiga urinaria (Figura 4.1B-G). (2) En condiciones NANC, la EET produjo relajaciones dependientes de la frecuencia, las cuales, fueron potenciadas por capsaicina (Figura 4.2 C, Tabla 2), reducidas por el CGRP (8-37) (Figura 4.2 A-B, Tabla 1) y abolidas por la TTX (Figura 4.2 D, Tabla 2). (3) Las relajaciones inducidas por la adición exógena del CGRP fueron potenciadas por la  $\omega$ -CgTX (Figura 4.3 A-B, Tabla 2) y reducidas por el CGRP (8-37) (Figura 4.3-C, Tabla 2). (4) Dichas respuestas no fueron modificadas por L-NOARG, ODQ e indometacina (Tabla 2).

En la vejiga urinaria, nervios sensoriales conteniendo elementos inmunorreactivos al CGRP, con sus cuerpos celulares localizados en los ganglios de las raíces dorsales de los segmentos medulares lumbosacros, están involucrados en la mediación del dolor, en la regulación de la tensión de la musculatura lisa vesical y en la vasodilatación de las arterias que irrigan la vejiga urinaria (Mohammed y Santer, 2002). El hecho que fibras inmunorreactivas al CGRP hayan sido identificadas en células ganglionares indica que esta compleja red neuronal desempeña un papel esencial en la generación y modulación de las respuestas sensitivas de la vejiga urinaria. Así, dicha inervación está involucrada en la inhibición de los mecanismos marcapasos responsables de la generación de la actividad fásica de la vejiga urinaria, sugiriendo, de esta manera, que colaterales de fibras sensoriales contribuyen a respuestas reflejas locales de la pared vesical (Gillespie, 2005; Gillespie y col., 2006).

Una rica inervación inmunorreactiva al CGRP ha sido descrita en el cuello de la vejiga urinaria del hombre, en donde el CGRP fue identificado en el 54% de las neuronas inmunorreactivas a tirosina-hidroxilasa (TH) y en un 65% de las neuronas sin inmunorreactividad a TH, presuntamente colinérgicas, coexistiendo con otros neurotransmisores, tales como el NO, el NPY y el VIP (Dixon y col., 1997). En el cuello de la vejiga urinaria del cerdo, la presencia de fibras inmunorreactivas al CGRP en las capas suburotelial y muscular (Figura 4.1 B-G) sugiere que el CGRP está involucrado en la relajación de la musculatura lisa del cuello vesical. La elevada densidad de inervación inmunorreactiva al CGRP, así como la distribución de nervios inmunorreactivos al CGRP observada en nuestro estudio está en consonancia con la observada en el cuello de la vejiga del hombre, en donde dicha inervación está localizada en el urotelio y en la capa muscular (Dixon y col., 1997). En nuestro estudio, además, la existencia de elementos nerviosos inmunorreactivos al CGRP alrededor de las arterias que irrigan el cuello vesical indica un posible papel del CGRP en la regulación del flujo sanguíneo local.

En el cuello de la vejiga del cerdo, bajas frecuencias de estimulación promueven la liberación de NO desde los nervios intramurales (Hernández y col., 2008). Debido a ello y con la finalidad de producir relajaciones inducidas por el CGRP liberado endógenamente en respuesta a EET, usamos altas frecuencias (2-16 Hz) y periodos prolongados (20 s) de estimulación, ya que dichas condiciones son determinantes para producir la liberación endógena de péptidos sensoriales (Hernández y col., 2006a). De hecho, frecuencias entre 10 y 16 Hz, promueven la liberación de PACAP 38, péptido sintetizado y liberado desde APSC, el cual, produce relajación del cuello de la vejiga del cerdo a través de la activación de receptores neuronales del subtipo PAC<sub>1</sub> y receptores musculares VPAC<sub>2</sub>, estos últimos acoplados a la vía de señalización de la PKA involucrando la activación de canales K<sub>v</sub> postsinápticos (Hernández y col., 2006a, b). En el presente estudio, en preparaciones desprovistas de urotelio y precontraídas con FE, la EET y el CGRP, produjeron relajaciones dependientes de la frecuencia y de la concentración respectivamente. Las relajaciones producidas por EET fueron abolidas por la TTX (Figura 4.2 D, Tabla 1), un inhibidor de los canales de Na<sup>+</sup> neuronales dependientes de voltaje, indicando así su carácter neurogénico. Dichas respuestas fueron, además, potenciadas por la neurotoxina sensorial capsaicina (Figura 4.2 C,

Tabla 1), la cual, produce desensibilización de las APSC (Bustamante y col., 2000). Así, la potenciación producida por la capsaicina sobre las relajaciones nerviosas NANC no nitrérgicas, indicaba que dichas respuestas nerviosas son moduladas por péptidos liberados desde las APSC produciendo contracción de la musculatura lisa. De hecho, la NKA un péptido perteneciente a la familia de las TKs, las cuales son sintetizadas y liberadas desde las APSC, produce contracción del cuello de la vejiga del cerdo (Templeman y col., 2003). Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos en el uréter de cobaya, en donde el CGRP está involucrado en la neurotransmisión inhibitoria, produciendo la abolición de los marcapasos del músculo liso, regulando, de esta forma, la peristalsis ureteral (Maggi y col., 1995).

La existencia de receptores neuronales en el cuello vesical es sugerida por la potenciación producida por la  $\omega$ -CgTX (Figura 4.3 A-B, Tabla 2), bloqueante selectivo de los canales VOC neuronales, sobre las relajaciones del CGRP. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en el uréter intravesical (Hernández y col., 2004) y en el cuello de la vejiga (Hernández y col., 2006) del cerdo, en donde una población heterogénea de receptores neuronales y musculares está involucrada en la relajación producida por péptidos sensoriales como el PACAP 38.

En diversas estructuras del tracto urinario, tales como la pelvis renal del cobaya (Maggi y col., 1992) o el uréter intravesical del cerdo (Bustamante y col., 2001), se han descrito una potente inhibición de las endopeptidasas, presentes en la hendidura sináptica, sobre la acción biológica de péptidos liberados desde nervios sensoriales. En el cuello de la vejiga del cerdo, la falta de efecto de fosforamidón (Tabla 2), un inhibidor de las endopeptidasas, sobre la relajación de CGRP parece descartar una degradación enzimática significativa sobre dicho péptido.

En el presente estudio, el hecho que el CGRP produzca relajación en preparaciones desprovistas de urotelio sugiere que dichas respuestas son mediadas a través de receptores localizados en el músculo liso. Dos subtipos de receptores de CGRP han sido caracterizados genómica y farmacológicamente siendo denominados como receptores CGRP<sub>1</sub> y CGRP<sub>2</sub> (Quirion y col., 1992). Sin embargo, la caracterización de receptores de CGRP funcionalmente activos es muy limitada, debido

a la falta de agonistas y antagonistas selectivos para los subtipos de receptores del CGRP. De hecho, dicha caracterización está basada fundamentalmente en la afinidad al fragmento terminal C del CGRP (CGRP 8-37), el cual, presenta mayor afinidad para los receptores del subtipo CGRP<sub>1</sub> ( $pA_2 / pK_B > 7$ ) con respecto a la que presenta para los receptores CGRP<sub>2</sub> ( $pA_2 / pK_B = 6$ ) (Wisskirchen y col., 1998). En nuestro estudio, la alta concentración (10  $\mu$ M) necesaria del CGRP (8-37) necesaria para reducir la relajación inducida por EET (Figura 4.2 A-B, Tabla 1) y el CGRP (Figura 4.3 C, Tabla 2) indica la mediación de un receptor del CGRP de baja afinidad, lo cual, es consistente con la implicación del subtipo CGRP<sub>2</sub>. Estos resultados son coincidentes con los valores de baja afinidad obtenidos ( $pK_B = 6$ ) para CGRP (8-37) en el conducto deferente de la rata involucrando receptores del subtipo CGRP<sub>2</sub> (Wisskirchen y col., 1998).

En el útero de la rata, los inhibidores de la sintasa del NO producen abolición de las relajaciones del CGRP (Anouar y col., 1998). La vasodilatación dependiente de endotelio del CGRP en la aorta de la rata es producida a través de mecanismos dependientes de la inhibición de la PDE<sub>3</sub> y la consecuente elevación de AMPc en las células de la musculatura lisa vascular (Lu y Fiscus, 1999). En el cuello de la vejiga urinaria del cerdo, aproximadamente un 40 % de la relajación nerviosa NANC es producida a través de la vía del NO/GMPc (Hernández y col., 2008). Debido a ello, investigamos si dichos mecanismos están implicados en la relajación inducida por el CGRP. Nuestros resultados, sin embargo, muestran que las relajaciones de CGRP no eran modificadas por L-NOARG u ODQ (Tabla 2), inhibidores de la sintasa de NO y de la guanilato ciclasa soluble, respectivamente, descartando así una posible interacción funcional entre el CGRP y la vía del NO/GMPc en el cuello de la vejiga del cerdo.

La vía de la COX está involucrada en la fisiopatología de la vejiga urinaria. Así, diversos estudios muestran un papel de prostanoides derivados de la COX en el control neuronal del tono de la musculatura lisa de la vejiga urinaria (De Jongh y col., 2007). Durante la fase de llenado, la vejiga urinaria, muestra contracciones y relajaciones locales producidas por la actividad mecánica miogénica basal, la cual, puede ser incrementada por la liberación local de prostaglandinas. Estas contracciones espontáneas dan lugar a un incremento en la actividad de nervios sensoriales de la pared de la vejiga responsable de la hiperactividad del detrusor (Andersson, 2010;

Yokoyama, 2010). Prostanoides liberados a través de la vía de la COX-1 están involucrados en la modulación de la actividad espontánea del cuello de la vejiga urinaria del cerdo (Martínez-Sáenz y col., 2011). En nuestro estudio, sin embargo, la falta de efecto mostrado por la indometacina (Tabla 2), inhibidor de la COX-1 y COX-2, sobre las relajaciones del CGRP, descartan la posible implicación de la vía de la COX en dichas respuestas (Martínez-Sáenz y col., aceptado).

## 5.2 MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA NEUROTRANSMISIÓN INHIBIDORA NO ADRENÉRGICA NO COLINÉRGICA (NANC) NO NITRÉRGICA DEL CUELLO DE LA VEJIGA URINARIA

En lo referente al segundo y último objetivo de nuestro estudio, nuestros resultados sugieren que la neurotransmisión NANC inhibidora de naturaleza no nitrérgica en el cuello de la vejiga urinaria es producida, en parte, a través de mecanismos dependientes de la ciclooxigenasa COX-1 y de la activación de la ATPasa de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ . Tanto las vías de la PKA o PKG como los canales de  $\text{K}^+$  postsinápticos no parecen estar involucrados en las relajaciones nerviosas independientes de NO. Esta conclusión es mantenida por las siguientes observaciones: (1) En preparaciones tratadas con guanetidina, atropina y L-NOARG y precontraídas con FE, la EET (1-16 Hz) produjo relajaciones dependientes de la frecuencia, las cuales, fueron abolidas por TTX (Figura 4.4, Tabla 3), evidenciando así su carácter neurogénico. (2) Las relajaciones inducidas por EET fueron, además, reducidas por indometacina (Figura 4.5, Tabla 3) y ouabaína (Figura 4.7, Tabla 4), inhibidores de la COX y de la ATPasa de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , respectivamente. (3) El bloqueo de las vías de la PKA y PKG, así como de los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{K}_{\text{ATP}}$  o  $\text{K}_{\text{V}}$  no modificaron dichas respuestas (Tabla 3).

El conocimiento de los neurotransmisores y/o neuromoduladores, así como de las vías intracelulares involucradas en el control del tono de la musculatura lisa del cuello vesical es esencial para el tratamiento de la incontinencia urinaria de estrés tipo III (English y col., 1999). Diversos estudios han mostrado un control nervioso autónomo NANC en la región de salida de orina de la vejiga urinaria, la cual, está

integrada por el cuello de la vejiga y la uretra proximal (Hills y col., 1984; Crowe y Burnstock, 1989; Hedlund, 2005; De Groat, 2006). No obstante, existen grandes diferencias en lo referente a la contribución del NO en la neurotransmisión inhibitoria en dichas estructuras. Así, el NO es el principal neurotransmisor inhibitorio NANC de la uretra de varias especies incluido el hombre (Andersson y Wein, 2004). Sin embargo, en el cuello de la vejiga urinaria, junto con el componente nervioso nitrérgico, el cual, es responsable aproximadamente del 40 % de la neurotransmisión NANC inhibitoria, un componente nervioso mayoritario independiente de NO ha sido, asimismo, identificado (Hernández y col. 2006a, 2008). Debido a la existencia de dicho componente, el presente estudio fue diseñado para investigar los mecanismos responsables de dicha relajación. Con objeto de establecer condiciones NANC independientes de NO, utilizamos un rango alto (1-16 Hz) de frecuencias de estimulación eléctrica, ya que en el cuello de la vejiga urinaria, frecuencias por debajo de 1 Hz son específicas para la liberación de NO (Hernández y col., 2008). Esto junto con el pretratamiento de las muestras con L-NOARG, bloqueante de la sintasa de NO, garantizó que las relajaciones obtenidas fueran de naturaleza no nitrérgica.

La vía de la COX está involucrada en la fisiopatología de la vejiga. De hecho, estudios recientes han revelado un importante papel de prostanoideos derivados de la COX en la regulación nerviosa del tono de la musculatura lisa vesical (De Jongh y col., 2007). La COX-1 y la COX-2 son expresadas en las células intersticiales de Cajal en la vejiga urinaria del cobaya y las prostaglandinas liberadas desde esas células y desde el urotelio modulan la actividad contráctil vesical (De Jongh y col., 2007). De hecho, durante la fase de llenado, la vejiga urinaria muestra modificaciones en la tensión de su pared como consecuencia de actividad mecánica miogénica basal, la cual, está incrementada por la liberación local de prostaglandinas. Dichas contracciones espontáneas son capaces de generar actividad en nervios aferentes que pueden contribuir a la generación de hiperactividad del músculo detrusor (Andersson, 2010; Yokoyama, 2010). En nuestro estudio, la indometacina (Figura 4.5, Tabla 3), un inhibidor no-selectivo de la COX, dio lugar a la aparición de actividad fásica contráctil, lo cual, sugiere la posibilidad de una liberación basal de prostanoideos relajantes del músculo liso. Además, la indometacina redujo las relajaciones inducidas por la estimulación nerviosa transmural, indicando, así, la implicación en dichas respuestas

de prostanoïdes derivados de la COX. Asimismo, SC-560 (Figura 4.6, Tabla 3), un inhibidor selectivo de la COX-1, redujo las relajaciones producidas por altas frecuencias de estimulación (8 y 16 Hz). Sin embargo, el bloqueo selectivo de la COX-2 con NS-398 (Tabla 3) no modificó las relajaciones mediadas por nervio. Estos resultados sugieren que las prostaglandinas derivadas de la vía COX-1 median la relajación de la musculatura lisa y/o la liberación de mediadores relajantes desde las terminaciones nerviosas. El hecho que el bloqueo sea producido a frecuencias altas de estimulación nerviosa está en consonancia con la posibilidad de que el mediador liberado desde los nervios intramurales sea un péptido (Martínez-Sáenz y col., 2011).

El GMPc está considerado segundo mensajero más importante responsable de la relajación del músculo liso del tracto urinario (Hedlund, 2005). El NO produce relajación de la musculatura lisa por activación de la guanilato ciclasa soluble produciendo, en última instancia, un incremento de la concentración intracelular de GMPc (Ignarro y col., 1990). La fosforilación y activación de la PKG es el principal mecanismo molecular involucrado en la regulación, mediada por NO, de los canales  $BK_{Ca}$ , resaltando así, la importancia de la vía NO/GMPc/PKG en la actividad vesical (Schubert y Nelson, 2001; Hernández y col., 2008). En el cuello de la vejiga del cerdo, el bloqueo de la guanilato ciclasa soluble y de la PKG no modificó las relajaciones inducidas por estimulación nerviosa, lo cual, sugiere una implicación de mecanismos independientes de la activación de la guanilato ciclasa en las relajaciones promovidas por el/los neurotransmisor/es independiente/s de NO. Estos resultados están en clara contraposición con la vía de señalización involucrada en la relajación dependiente de NO en el uréter intravesical (Hernández y col., 1997), trígono (Persson y Andersson, 1992) y cuello vesical (Hernández y col., 2008) del cerdo, así como en la uretra de varias especies (Andersson y Wein, 2004), en donde el NO produce relajación de la musculatura lisa a través de mecanismos dependientes de la activación de la guanilato ciclasa soluble.

La relajación del músculo liso mediada a través del incremento de la concentración intracelular de AMPc es producida generalmente vía activación de la PKA (Vaudry y col., 2000). El incremento citosólico del AMPc y la intensidad y duración de sus efectos fisiológicos son dependientes de la síntesis de AMPc por la

adenilato ciclasa y de su hidrólisis por la PDE<sub>4</sub> (Ekholm y col., 1997; Murthy y col., 2001). La PDE<sub>4</sub> desempeña un papel fundamental en la modulación de la contractilidad del músculo liso regulando tanto los niveles intracelulares de los nucleótidos cíclicos como la duración de sus efectos. La implicación de la vía de la PKA en la relajación de la vejiga urinaria ha sido previamente demostrada. Así, en el detrusor de cerdo y rata la presencia de la PDE<sub>4</sub>, así como la capacidad de inhibidores de la PDE<sub>4</sub>, tales como el rolipram, de producir relajación de la musculatura lisa han sido previamente demostradas (Truss y col., 1996; Qiu y col., 2001). En el cuello de la vejiga urinaria, la vía de la PKA está involucrada en la relajación inducida por la 5-HT (Recio y col., 2009) y por péptidos, como el PACAP 38 y el VIP (Hernández y col., 2006a, b). Así, dichas respuestas son potenciadas por forskolina, un activador de la adenilato ciclasa y reducidas por el inhibidor de la PKA, Rp-8-CPT-cAMPS. Además, el rolipram produce relajación del cuello de la vejiga urinaria del cerdo, la cual, es reducida por Rp-8-CPT-cAMPS, lo cual, sugiere un papel esencial de la vía del AMPc en la relajación de la musculatura del cuello vesical. En el presente estudio, el inhibidor de la PKA no modificó, en modo alguno, las relajaciones nerviosas independientes de NO, lo cual, parece descartar la implicación de la vía de la PKA en dichas respuestas (Tabla 3).

Los canales de K<sup>+</sup> de membrana de diferente naturaleza modulan la actividad contráctil de la pared de la vejiga urinaria. Así, los canales BK<sub>Ca</sub> y SK<sub>Ca</sub> están involucrados en la repolarización del potencial de acción y en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, limitando la amplitud y duración de las respuestas contráctiles del músculo liso (Heppner y col., 1997; Herrera y col., 2000). Los canales BK<sub>Ca</sub> actúan como reguladores de la retroalimentación negativa a través de la inhibición de la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular dependiente de voltaje (Imai y col., 2001; Herrera y Nelson, 2002). Alteraciones en la expresión de dichos canales están, asimismo, relacionadas con la aparición de disfuncionalidades vesicales, tales como vejigas hiperactivas y cuadros de incontinencia urinaria (Herrera y col., 2005). En el nuestro estudio, IbTX, ChTX y apamina, inhibidores de los canales BK<sub>Ca</sub>, IK<sub>Ca</sub> y SK<sub>Ca</sub>, respectivamente, así como el tratamiento conjunto de ChTX y apamina no modificaron las relajaciones inducidas por la EET. Estos resultados sugieren que los canales K<sub>Ca</sub> no están implicados en la relajación nerviosa independiente de NO (Tabla 4).

Los canales  $K_{ATP}$  desempeñan un papel esencial en la regulación de la tensión de la musculatura lisa del tracto urinario (Brading, 1992). Así, activadores específicos de dichos canales, como la cromakalima, inhiben la actividad mecánica de la vejiga de la rata y cobaya, así como las contracciones del detrusor normal e inestable del hombre y del cerdo, ya que favorecen la hiperpolarización de la membrana de la célula muscular reduciendo, así, la probabilidad de apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje y el influjo de  $Ca^{2+}$  extracelular (Foster, 1989; Bonev y Nelson, 1993). El hecho que activadores de los canales  $K_{ATP}$  inhiban las contracciones espontáneas de la pared vesical favorece su posible utilización terapéutica en la hiperactividad detrusoriana (Buckner y col., 2002). En el presente estudio, la glibenclamida, un bloqueante selectivo de los canales  $K_{ATP}$ , no alteró las relajaciones mediadas por nervio, lo cual, indica que la activación de dichos canales no está involucrada en la neurotransmisión inhibitoria independiente de NO (Tabla 3).

Diferentes subunidades funcionales de los canales  $K_v$  están presentes en la vejiga urinaria (Thorneloe y Nelson, 2003). Dichos canales contribuyen, en gran medida, a la contracción miogénica vesical como consecuencia de su implicación en la repolarización del potencial de acción del músculo liso y en la regulación del potencial de membrana en reposo (Imai y col., 2001; Thorneloe y Nelson, 2003). En el cuello de la vejiga urinaria, los canales  $K_v$  postsinápticos están implicados en la relajación de 5-HT (Recio y col., 2009) y PACAP 38 (Hernández y col., 2006). Asimismo, los canales  $K_v$  presinápticos modulan la liberación de NO, la cual, es esencialmente dependiente del influjo de  $Ca^{2+}$  intraneuronal a través de los canales VOC. De hecho, la llegada de potenciales de acción a la terminación nerviosa además de provocar la apertura de los canales VOC activaría los canales  $K_v$  neuronales, los cuales, estarían involucrados en la inactivación de los canales VOC de membrana, modulando así la liberación de NO desde los nervios (Hernández y col., 2008). En nuestro estudio, la falta de efecto de la 4-AP, un inhibidor de los canales  $K_v$ , parece descartar la implicación de dicho canales en la relajación mediada por nervio de naturaleza no nitrérgica en el cuello de la vejiga urinaria del cerdo (Tabla 4).

La actividad de la ATPasa de la bomba  $Na^+-K^+$  está implicada en el mantenimiento del tono de la musculatura lisa vascular y visceral de los tractos

urinario y genital. Así, en el cuerpo cavernoso del hombre, la relajación inducida por el NO es producida a través de la activación de dicha enzima de forma independiente de la capacidad del NO de incrementar la concentración intracelular de GMPc (Gupta y col., 1995). En las arterias peneanas de resistencia del caballo, la relajación dependiente de endotelio es debida a la liberación de NO y de un factor independiente de NO, los cuales, hiperpolarizan el músculo liso vascular a través de la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  (Prieto y col., 1998). La ouabaína, inhibidor de dicha enzima, incrementa la tensión basal y la amplitud y la frecuencia de las contracciones del detrusor del cerdo (Bissada y Finkbeiner, 1979). En el cuello de la vejiga urinaria, la ouabaína redujo sensiblemente las relajaciones nerviosas independientes de NO, indicando así que la neurotransmisión inhibitoria no nitrérgica es producida, en parte, a través de la activación de la ATPasa de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  (Figura 4.7, Tabla 4) (Martínez-Sáenz y col., 2011).

## 6. CONCLUSIONES



Del conjunto de los resultados del presente estudio podemos concluir:

↪ 1°. Los receptores del subtipo CGRP<sub>2</sub> se expresan en el músculo liso del cuello de la vejiga urinaria. Asimismo, es característica la existencia de una rica densidad de inervación conteniendo elementos inmunorreactivos al CGRP que penetran a través de la adventicia y se distribuyen en la capa muscular y en el urotelio.

↪ 2°. El CGRP produce relajación de la musculatura lisa a través de la activación de receptores neuronales y musculares de CGRP, éstos últimos del subtipo CGRP<sub>2</sub> vía mecanismos independientes del NO y de la COX.

↪ 3°. Los resultados morfológicos y funcionales obtenidos en el presente estudio sugieren que el CGRP, liberado desde nervios intramurales, estaría involucrado en la transmisión NANC inhibitoria del cuello vesical.

↪ 4°. La neurotransmisión inhibitoria NANC no nitrérgica es producida, en parte, a través de mecanismos dependientes de la vía COX-1 y de la activación de la ATPasa de la bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>. Las vías de señalización intracelular de la PKA y de la PKG, así como los canales de K<sup>+</sup> postsinápticos, no parecen, sin embargo, estar involucrados en la relajación nerviosa independiente de NO.

Como conclusión final podemos decir que existe un componente relajante nervioso de naturaleza desconocida que representa aproximadamente un 50 % de la neurotransmisión inhibitoria NANC del cuello vesical. Debido a ello, estudios futuros deberán ir encaminados a determinar la naturaleza de los neurotransmisores y/o neuromoduladores, así como las vías de señalización involucradas en dicho proceso, en aras a proporcionar terapias efectivas en la incontinencia de estrés tipo III producida por deficiencia esfintérica intrínseca.



7. BIBLIOGRAFÍA



Abrams P (2003). Describing bladder storage function: overactive bladder syndrome and detrusor overactivity. *Urology* 62: 28-37.

Ahluwalia A, Perretti M (1994). Calcitonin gene-related peptides modulate the acute inflammatory response induced by interleukin-1 in the mouse. *Eur J Pharmacol* 264: 407-415.

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.

Amara SG, Burrin JM, Legon S, Polak JM, Bloom SR (1988). Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience* 25: 195-205.

Ambache N, Zar MA (1970). Non-cholinergic transmission by postganglionic motor neurones in the mammalian bladder. *J Physiol* 210: 761-778.

Andersson KE (1992). Clinical pharmacology of potassium channel openers. *Pharmacol Toxicol* 70: 244-254.

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 neuourology. *Eur Urol* 34: 6-9.

Andersson KE (1999). Pathways for relaxation of detrusor smooth muscle. *Adv Exp Med Biol* 462: 241-252.

Andersson KE (2001). Neurotransmission and drug effects in urethral smooth muscle. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 207: 26-34.

Andersson KE (2002). Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology* 59: 43-50.

Andersson KE (2010). Detrusor myocyte activity and afferent signaling. *Neurourol Urodynam* 29: 97-106.

Andersson KE, Appell R, Awad S, Chapple C, Drutz H, Fourcroy J, Finkbeiner AE, Haab F, Wein A (2002). Pharmacological treatment of urinary incontinence. In: *Incontinence, Second International Consultation on Incontinence*, edited by Abrams pp: 479-511.

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 Suppl.* 175: 43-53.
- Andersson KE, Uckert S, Stief C, Hedlund P (2007). Phosphodiesterases (PDEs) and PDE inhibitors for treatment of LUTS. *Neurourol Urodyn* 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.
- Anouar A, Schirar A, Germain G (1998). Relaxant effect of the calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the nonpregnant and pregnant rat uterus. Comparison with vascular tissue. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357: 446-453.
- Apodaca G (2004). The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic* 5: 1-12.
- 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.
- Arner A, Pfitzer G (1999). Regulation of cross-bridge cycling by Ca<sup>2+</sup> in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 134: 63-146.
- Avelino A, Cruz F (2006). TRPV1 (vanilloid receptor) in the urinary tract: expression, function and clinical applications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 373: 287-299.
- 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.
- Bailey RJ, Hay DL (2007). Agonist-dependent consequences of proline to alanine substitution in the transmembrane helices of the calcitonin receptor. *Br J Pharmacol* 151: 678-687.
- Barendrecht MM, Abrams P, Schumacher H, de la Rosette JJ, Michel MC (2008). Do alpha1-adrenoceptor antagonists improve lower urinary tract symptoms by reducing bladder outlet resistance? *Neurourol Urodynam* 27: 226-230.

- Barthó L, Benkó R, Patacchini R, Pethö 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, Di Sandro 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.
- Batra S, Sjogren C, Andersson KE, Fovaeus M (1987). Source of calcium for contractions induced by depolarization and muscarinic receptor stimulation in rabbit urinary bladder. *Acta Physiol Scand* 130: 545-551.
- 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: 103-110.
- 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). Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev* 90: 1437-1459.
- Berridge MJ (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 28: 315-325.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 517-529.
- 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.
- Birder L (2010). Urothelial Signaling. *Auton Neurosci* 153: 33-40
- Birder LA (2006). Urinary bladder urothelium: Molecular sensors of chemical/thermal/mechanical stimuli. *Vascular Pharmacol* 45: 221-226.
- Birder L, 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: 226-229.
- Birder LA, Barrick SR, Roppolo JR, Kanai AJ, DeGroat 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: 423-429.

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, de Groat WC (2007). Mechanisms of Disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol* 4: 46-54.

Bissada NK, Finkbeiner AE (1979). In vitro action of digitalis on guinea pig detrusor and urethra. *Invest Urol* 17: 1-2.

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* 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.

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<sup>+</sup> channels by protein kinase C in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 265: 1723-1728.

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: 951-962.

Brading A (1999). The physiology of the mammalian urinary outflow tract. *Exp Physiol* 84: 215-21.

Brading AF (1992). Ion channels and control of contractile activity in urinary bladder smooth muscle. *Jpn J Pharmacol* 58: 120-127.

Brading AF (1997). A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology* 50: 57-67.

Brading AF (2002). The sarcoplasmic reticulum in disease and smooth muscle dysfunction: therapeutic potential. *Novartis Found Symp* 246: 244-254.

Brain SD, Grant AD (2004). Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* 84: 903-934.

Brain SD, Williams TJ (1985). Inflammatory edema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol* 86: 855-860.

Buckley TL, Brain SD, Collins PD, and Williams TJ (1991). Inflammatory edema induced by interactions between IL-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. *J Immunol.* 146: 3424-3430.

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). Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* 22: 182-188.

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.

Burnstock G. Purinergic signalling in lower urinary tract. In: *Purinergic and Pyrimidinergic Signalling. I. Molecular, Nervous and Urogenitary System Function*, edited by Abbracchio MP and Williams M. Berlin: Springer Verlag pp: 423-515.

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 nitrenergic neurotransmission in the human urinary bladder neck. *Neurosci Lett* 477: 91-94.

Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Frohlich LG, Sickmann A, Meyer HE, Lohmann SM, and Schmidt HH (2000). Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 275: 5179-5187.

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.

Cannon TW, Yoshimura N, Chancellor MB (2003). Innovations in pharmacotherapy for stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 14: 367-372.

Cárdenas C, Liberona JL, Molgó J, Colasante C, Mignery GA, Jaimovich E (2005). Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptors regulate local Ca<sup>2+</sup> transients and modulate cAMP response element binding protein phosphorylation. *J Cell Sci* 118: 3131-3140.

Cardozo L, Chapple CR, Toozs-Hobson P, Grosse-Freese M, Bulitta M, Lehmacher W, Strösser W, Ballering-Brühl B, Schäfer M (2000). Efficacy of tiroprium chloride in patients with detrusor instability: a placebo-controlled, randomized, double-blind, multicentre clinical trial. *BJU Int* 85: 659-664.

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.

Cervero F, Sann H (1989). Mechanically evoked responses of afferent fibres innervating the guinea-pig's ureter: an in vitro study. *J Physiol* 412: 245-266.

Chancellor MB, Perkin H, Yoshimura N (2007). Recent advances in the neurophysiology of stress urinary incontinence. *Scand J Urol Nephrol* 39: 21-24

Chancellor MB, Yoshimura N (2004). Neurophysiology of stress urinary incontinence. *Rev Urol* 6: 19-28

Chang S, Gomes CM, Hypolite JA, Marx J, Alanzi J, Zderic SA, Malkowicz B, Wein AJ, Chacko S (2010). Detrusor overactivity is associated with downregulation of large-conductance calcium- and voltage-activated potassium channel protein. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: 1416-1423.

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.

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, Birdier LA (2005). Expression and function of bradykinin B1/B2 receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. *J Physiol* 562: 859-871.

- Chopra B, Georgopoulos NT, Nicholl A, Hinley J, Oleksiewicz MB, Southgate J (2009). Structurally diverse peroxisome proliferator-activated receptor agonists induce apoptosis in human uro-epithelial cells by a receptor-independent mechanism involving store-operated calcium channels. *Cell Prolif* 42: 688-700.
- 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: 323-32.
- Cockayne DA, Dunn PM, Zhong Y, Rong W, Hamilton SG, Knight GE, Ruan HZ, Ma B, Yip P, Nunn P, McMahon SB, Burnstock G, Ford AP (2005). P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol* 567: 621-639.
- 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: 9596-9603.
- Cowan WD, Daniel EE (1983). Human female bladder and its noncholinergic contractile function. *Can J Physiol Pharmacol* 61: 1236-1246.
- Creed KE (1971). Membrane properties of the smooth muscle membrane of the guinea-pig urinary bladder. *Pflugers Arch* 26: 115-126.
- Creed KE, Callahan SM (1989). Prostaglandins and neurotransmission at the guinea pig and rabbit urinary bladder. *Pflugers Arch* 413: 299-302.
- Crossman DC, Dashwood MR, Brain SD, McEwan J, Pearson JD (1990). Action of calcitonin gene-related peptide upon bovine vascular endothelial and smooth muscle cells grown in isolation and co-culture. *Br J Pharmacol* 99: 71-76.
- Crowe R, Burnstock G (1989). A histochemical and immunohistochemical study of the autonomic innervation of the lower urinary tract of the female pig. Is the pig a good model for the human bladder and urethra? *J Urol* 141: 414-422.
- D'Andrea MR, Saban MR, Nguyen NB, Andrade-Gordon P, Saban R (2003). Expression of protease-activated receptor-1, -2, -3 and -5 in control and experimentally inflamed mouse bladder. *Am J Pathol* 162: 907-923.
- Damaser MS, Kim KB, Longhurst PA, Wein AJ, Levin MR (1997). Calcium regulation of urinary bladder function. *J Urol* 157: 732-738.
- Danforth KN, Townsend MK, Lifford K, Curhan GC, Resnick NM, Grodstein F (2006). Risk factors for urinary incontinence among middle-aged women. *Am J Obstet Gynecol* 194: 339-345.

Davies AM, Batchelor TJ, Eardley I, Beech DJ (2002). Potassium channel K<sub>v</sub> 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: 25-40.

De Groat WC, Yoshimura N (2001). Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu 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.

Debodinance P, Delporte P, Engrand JB, Boulogne M (2002). Tension-free vaginal tape (TVT) in the treatment of urinary stress incontinence: 3 years experience involving 256 operations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 105: 49-58.

Dennis T, Fournier A, Cadieux A, Pomerleau F, Jolicoeur FB, St Pierre S, Quirion R (1990). hCGRP8-37, a calcitonin gene-related peptide antagonist revealing calcitonin gene-related peptide receptor heterogeneity in brain and periphery. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 123-128.

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.

Dixon JS, Jen PY, Gosling JA (1997). A double-label immunohistochemical study of intramural ganglia from the human male urinary bladder neck. *J Anat* 190: 125-134.

Dmietrieva N, McMahon SB (1996). Sensitization of visceral afferents by nerve growth factor in the adult rat. *Pain* 66: 87-97.

Dmochowski RR, Davila GW, Zinner NR, Gittelman MC, Saltzstein DR, Lyttle S, Sanders SW (2002). Efficacy and safety of transdermal oxybutynin in patients with urge and mixed urinary incontinence. *J Urol* 168: 580-586.

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, Sepulveda G, Lewin J, Fournier A, Huidobro-Toro JP (1994). Involvement of ET<sub>A</sub> receptors in the facilitation by endothelin-1 of non-adrenergic non-cholinergic transmission in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* 111: 473-482.

Doods H, Arndt K, Rudolf K, Just S (2007). CGRP antagonists: unravelling the role of CGRP in migraine. *Trends Pharmacol Sci* 28: 580-587.

Drake MJ, Harvey IJ, and Gillespie JI (2003). Autonomous activity in the isolated guinea pig bladder. *Exp Physiol* 88: 19-30.

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.

Drissi H, Lasmoles F, Le Mellay V, Marie PJ, Lieberherr M (1998). Activation of phospholipase C-beta1 via Galphaq/11 during calcium mobilization by calcitonin gene-related peptide. *J Biol Chem* 273: 20168-20174.

Drissi H, Lieberherr M, Hott M, Marie PJ, Lasmoles F (1999). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) increases intracellular free  $Ca^{2+}$  concentrations but not cyclic AMP formation in CGRP receptor-positive osteosarcoma cells (OHS-4). *Cytokine* 11: 200-207.

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.

Edvinsson L (2003). New therapeutic target in primary headaches: blocking the CGRP receptor. *Exp Opin Ther Targets* 7: 377-383.

Edvinsson L, Fredholm BB, Hamel E, Jansen I, and Verrecchia C (1985). Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. *Neurosci Lett* 58: 213-217.

Edvinsson L, Ho TW (2010). CGRP receptor antagonism and migraine. *Neurotherapeutics* 7(2): 164-175.

Ekholm D, Belfrage P, Manganiello V, Degerman E (1997). Protein kinase A-dependent activation of PDE4 (cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase) in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1356: 64-70.

Elliott RA, Castleden CM (1993). Nerve mediated relaxation in human detrusor muscle. *Br J Clin Pharmacol*. 36: 479-481

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.

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.

Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Poston L, Ward JP (1999). Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br J Pharmacol* 126: 1872-1880.

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: 132-143.

Foster P (1998). Behavioral treatment of urinary incontinence: a complementary approach. *Ostomy Wound Manage* 44: 62-66.

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.

Fujimura T, Tamura K, Tsutsumi T, Yamamoto T, Nakamura K, Koibuchi Y, Kobayashi M, Yamaguchi O (1999). Expression and possible functional role of the  $\beta$ 3-adrenoceptor in human and rat detrusor muscle. *J Urol* 161: 680-685.

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.

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: 1175-1178.

Gibson SJ, Polak JM, Giaid A, Hamid QA, Kar S, Jones PM, Denny P, Legon S, Amara SG, Craig RK, et al. (1988). Calcitonin gene-related peptide messenger RNA is expressed in sensory neurones of the dorsal root ganglia and also in spinal motoneurons in man and rat. *Neurosci Lett* 91: 283-288.

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.

Gillespie JI, Markerink-van Ittersum M, de Vente J (2006). Sensory collaterals, intramural ganglia and motor nerves in the guinea-pig bladder: evidence for intramural neural circuits. *Cell Tissue Res* 325: 33-45.

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.

Girgis SI, Macdonald DW, Stevenson JC, Bevis PJ, Lynch C, Wimalawansa SJ, Self CH, Morris HR, MacIntyre I (1985). Calcitonin gene-related peptide: potent vasodilator and major product of calcitonin gene. *Lancet* 2: 14-16.

Goadsby PJ, Edvinsson L (1994). Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute attacks therapies. *Brain* 117: 427-434.

Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV, Somlyo AP (1997). Translocation of rhoA associated with Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle. *J Biol Chem* 272: 10704-10709.

Gosling JA, Dixon JS, Jen PY (1999). The distribution of noradrenergic nerves in the human lower urinary tract. *Eur Urol* 36: 23-30.

Gosling JA, Kung LS, Dixon JS, Horan P, Whitbeck C, Levin RM (2000). Correlation between the structure and function of the rabbit urinary bladder following partial outlet obstruction. *J Urol* 163: 1349-1356.

Gratzke C, Weinhold P, Reich O, Seitz M, Schlenker B, Stief CG, Andersson KE, Hedlund P (2009). Transient receptor potential A1 and cannabinoid receptor activity in human normal and hyperplastic prostate: relation to nerves and interstitial cells. *Eur Urol* 57: 902-910.

Gray DW, Marshall I (1992). Human alpha-calcitonin gene-related peptide stimulates adenylyate cyclase and guanylate cyclase and relaxes rat thoracic aorta by releasing nitric oxide. *Br J Pharmacol* 107: 691-696.

Gulur DM, Drake MJ (2010). Management of overactive bladder. *Nat Rev Urol* 7: 572-582.

- Gupta S, Moreland RB, Munarriz R, Daley J, Goldstein I, Sáenz de Tejada I (1995). Possible role of Na(+)-K(+)-ATPase in the regulation of human corpus cavernosum smooth muscle contractility by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 116:2201-2206.
- Haab F, Zimmern PE, Leach GE (1996). Female stress urinary incontinence due to intrinsic sphincteric deficiency: recognition and management. *J Urol* 156: 3-17.
- 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.
- Han JS, Adwanikar H, Li Z, Ji G, Neugebauer V (2010). Facilitation of synaptic transmission and pain responses by CGRP in the amygdala of normal rats. *Mol Pain* 8: 6-10.
- Han SP, Naes L, and Westfall TC (1990). Calcitonin gene-related peptide is the endogenous mediator of nonadrenergic-noncholinergic vasodilation in rat mesentery. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 423-428.
- 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, Gugger M, Reubi JC (2004). Distribution of the VPAC<sub>2</sub> 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.
- Hasbak P, Saetrum Opgaard O, Eskesen K, Schifter S, Arendrup H, Longmore J, Edvinsson L (2003). Investigation of CGRP receptors and peptide pharmacology in human coronary arteries. Characterization with a nonpeptide antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 326-333.
- 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.

Hay DL, Christopoulos G, Christopoulos A, Sexton PM (2007). Determinants of 1-piperidinecarboxamide,N-[2-[[5-amino-1-[[4-(4-pyridinyl)-1-piperazinyl]carbonyl]pentyl]amino]-1-[(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxoethyl]-4-(1,4-dihydro-2-oxo-3(2H)-quinazoliny)] (BIBN4096BS) affinity for calcitonin gene-related peptide and amylin receptors--the role of receptor activity modifying protein 1. *Mol Pharmacol* 70: 1984-1991.

Hay DL, Poyner D, Dickerson I (2003). CGRP receptor heterogeneity: a role for receptor component protein. *Trends Endocrinol Metab.* 14: 3-4.

Hay DL, Poyner DR, Quirion R (2008). International Union of Pharmacology. LXIX. Status of the calcitonin gene-related peptide subtype 2 receptor. *Pharmacol* 60: 143-145.

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.

Hedge S (2006). Muscarinic receptors in the bladder: from basic research to therapeutics. *Br J Pharmacol* 147: 80-87

Hedlund P (2005). Nitric oxide/cGMP-mediated effects in the outflow region of the lower urinary tract is there a basis for pharmacological targeting of cGMP? *World J Urol* 23: 362-367.

Hegde SS, Choppin A, Bonhaus D, Briaud S, Loeb M, Moy TM, Loury D, Eglen RM (1997). Functional role of M2 and M3 muscarinic receptors in the urinary bladder of rats in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 120: 1409-1418.

Hegde SS, Eglen RM (1999). Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. *Life Sci* 64: 419-428.

Heppner TJ, Bonev AD, Nelson MT (1997). Ca<sup>2+</sup>-activated K channels regulate action potential repolarization in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 273: 110-117.

Hernández M, Barahona MV, Recio P, Benedito S, Martínez AC, Rivera L, García-Sacristán A, Prieto D, Orensanz LM (2006b). 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 (2006a). 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<sup>+</sup> channels in the modulation of the nitrenergic neurotransmission of the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* 153: 1251-1258.

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 nitrenergic 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 nitrenergic transmission in the pig urinary bladder neck. *NeuroUrol Urodynam* 26: 578-583.

Héroux M, Breton B, Hogue M, Bouvier M (2007). Assembly and signaling of CRLR and RAMP1 complexes assessed by BRET. *Biochemistry* 46: 7022-7033.

Herrera GM, Braas KM, May V, Vizzard MA (2006). PACAP enhances mouse urinary bladder contractility and is upregulated in micturition reflex pathways after cystitis. *Ann N Y Acad Sci* 1070: 330-336.

Herrera GM, Etherton B, Nausch B, Nelson MT (2005). Negative feedback regulation of nerve-mediated contractions by K<sub>Ca</sub> channels in mouse urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: 402-409.

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: 60-68.

Herrera GM, Nelson MT (2002). Differential regulation of SK and BK channels by Ca<sup>2+</sup> signals from Ca<sup>2+</sup> channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes. *J Physiol* 541: 483-492.

Hille, B (1992). Ionic channels of excitable membranes. *Harvey Lect* 82: 47-69.

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.

Ho TW, Edvinsson L, Goadsby PJ (2010). CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. *Nat Rev Neurol* 6: 573-582.

Hoff AO, Catala-Lehnen P, Thomas PM, Priemel M, Rueger JM, Nasonkin I, Bradley A, Hughes MR, Ordonez N, Cote GJ, Amling M, Gagel RF (2002). Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene. *J Clin Invest* 110: 1849-1857.

Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* 113: 1671-1676.

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.

Holze PR (1988). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24: 739-768.

Hosokawa S, Endoh T, Shibukawa Y, Tsumura M, Ichikawa H, Tazaki M, Furusawa M (2010). Calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin-induced facilitation of calcium current by different signal pathways in nucleus tractus solitarius. *Brain Res* 1327: 47-55.

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.

Hua XY (1986). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide in relation to peripheral functions of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol Scand Suppl* 551: 1-45.

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  $\beta$ 3-adrenoceptor agonists on normal, low compliant and hyperreflexic human bladders. *J Urol* 165: 240-244.

Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J (1990). Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 843-850.

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: 1018-1025.

Imai T, Okamoto T, Yamamoto Y, Tanaka H, Koike K, Shigenobu K, Tanaka Y (2001). Effects of different types of K<sup>+</sup> channel modulators on the spontaneous myogenic contraction of guinean pig urinary bladder smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 173: 323-333.

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<sup>2+</sup> images and K<sup>+</sup>current during depolarization in smooth muscle cells of the guinea pig vas deferens and urinary bladder. *J Physiol* 510: 705-719.

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.

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.

Jen PY, Dixon JS, Gosling JA (1995). Immunohistochemical localization of neuromarkers and neuropeptides in human fetal and neonatal urinary bladder. *Br J Pharmacol* 75: 230-235.

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.

- Joseph SK, Pierson S, Samanta S (1995). Trypsin digestion of the inositol trisphosphate receptor: implications for the conformation and domain organization of the protein. *Biochem J* 307: 859-865.
- Kaiho Y, Nishiguchi J, Kwon DD, Chancellor MB, Arai Y, Snyder PB, Yoshimura N (2008). The effects of a type 4 phosphodiesterase inhibitor and the muscarinic cholinergic antagonist tolterodine tartrate on detrusor overactivity in female rats with bladder outlet obstruction. *BJU Int* 101: 615-620.
- Kajioka S, Nakayama S, McMurray G, Abe K, Brading AF (2002). Ca<sup>2+</sup> channel properties in smooth muscle cells of the urinary bladder from pig and human. *Eur J Pharmacol* 443: 19-29.
- 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.
- Katayama M, Nadel JA, Bunnett NW, Di Maria GU, Haxhiu M, Borson DB (1991). Catabolism of calcitonin gene-related peptide and substance P by neutral endopeptidase. *Peptides* 12: 563-567.
- Kawasaki H, Nuki C, Saito A, Takasaki K (1990). Adrenergic modulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve-mediated vasodilation in the rat mesenteric resistance vessel. *Brain Res* 506: 287-290.
- 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.
- Keith IM, Tjen AL, Kraiczi H, Ekman R (2000). Three-week neonatal hypoxia reduces blood CGRP and causes persistent pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: 1571-1578.
- 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). Up-regulation of endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors and down-regulation 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.
- Kinder RB, Mundy AR (1987). Pathophysiology of idiopathic detrusor instability and detrusor hyper-reflexia. An in vitro study of human detrusor muscle. *Br J Urol* 60: 509-515.

Kinder RB, Restorick JM, Mundy AR (1985). Vasoactive intestinal polypeptide in the hyper-reflexic neuropathic bladder. *Br J Urol* 57: 289-291.

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: 1310-1319.

Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS (2008). Physiological roles of  $K^{+}$  channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 44: 65-81.

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.

Kotlikoff MI, Dhulipala P, Wang YX (1999).  $M_2$  signaling in smooth muscle cells. *Life Sci* 64: 437-442.

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.

Kubota Y, Biers SM, Kohri K, Brading AF (2006). Effects of imatinib mesylate (Glivec) as a c-kit tyrosine kinase inhibitor in the guinea-pig urinary bladder. *Neurourol Urodynam* 25: 205-210.

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  $\beta_3$  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  $\beta_3$ -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(1): 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* 291: 692-703.

Laburthe M, Couvineau A, Marie JC (2002). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine Rev* 21: 619-670.

Large WA (2002). Receptor-operated Ca<sup>2+</sup> permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13: 493-501.

Lecci A, Maggi CA (2003). Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. *Expert Opinion in Therapeutic Targets* 7: 343-362.

Lecci A, Maggi CA (2001). Tachykinins as modulators of the micturition reflex in the central and peripheral nervous system. *Regul Pept* 101: 1-18.

Lechleitner P, Genser N, Mair J, Dienstl A, Haring C, Wiedermann CJ, Puschendorf B, Saria A, Dienstl F (1992). Calcitonin gene-related peptide in patients with and without early reperfusion after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 124: 1433-1439.

Lewis SA (2000). Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol* 278: 867-874.

Li YJ, Peng J (2002). The cardioprotection of calcitonin gene-related peptide-mediated preconditioning. *Eur J Pharmacol* 442: 173-177.

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 Urodyn* 30: 606-611.

Limberg BJ, Andersson KE, Aura Kullmann F, Burmer G, de Groat WC, Rosenbaum JS (2010).  $\beta$ -Adrenergic receptor subtype expression in myocyte and non-myocyte cells in human female bladder. *Cell Tissue Res* 342: 295-306.

Lindsay RM, Lockett C, Sternberg J, Winter J (1989). Neuropeptide expression in cultures of adult sensory neurons: modulation of substance P and calcitonin gene-related peptide levels by nerve growth factor. *Neuroscience* 33: 53-65.

Longhurst PA, Briscoe JA, Rosenberg DJ, Leggett RE (1997). The role of cyclic nucleotides in guinea-pig bladder contractility. *Br J Pharmacol* 121: 1665-1672.

Longhurst PA, Levendusky M (1999). Pharmacological characterization of [beta]-adrenoceptors mediating relaxation of the rat urinary bladder in vitro. *Br J Pharmacol* 127: 1744-1750.

Lu LF, Fiscus RR (1999). Nitric oxide donors enhance calcitonin gene-related peptide-induced elevations of cyclic AMP in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 376: 307-314.

Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Hua X, Hökfelt T, Fischer JA (1985). Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin. *Eur J Pharmacol* 108: 315-319.

Maggi CA (1990). The dual function of capsaicin-sensitive sensory nerves in the bladder and urethra. *Ciba Found Symp* 151: 77-83.

Maggi CA (1995). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol* 45: 1-98.

Maggi CA, Giuliani S, Meini S, Santicioli P (1995). Calcitonin gene related peptide as inhibitory neurotransmitter in the ureter. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 986-990.

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 (1991). The neurotransmitter role of calcitonin gene-related peptide in the rat and guinea-pig ureter: effect of a calcitonin gene-related peptide antagonist and species-related differences in the action of omega conotoxin on calcitonin gene-related peptide release from primary afferents. *Neuroscience* 43: 261-268.

Maggi CA, Patacchini R, Eglezos A, Maggi CA, Patacchini R, Eglezos A, Quartara L, Giuliani S, Giachetti A (1992). Tachykinin receptors in the guinea-pig renal pelvis: activation by exogenous and endogenous tachykinins. *Br J Pharmacol* 107: 27-33.

Maggi CA, Santicioli P, Giuliani S (1995). Role of cyclic AMP and protein kinase A in K<sup>+</sup> channel activation by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the guinea-pig ureter. *J Auton Pharmacol* 15: 403-419.

Mak DO, McBride S, Foskett JK (2001). Regulation by Ca<sup>2+</sup> and inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP<sub>3</sub>) of single recombinant type 3 InsP<sub>3</sub> receptor channels. Ca<sup>2+</sup> activation uniquely distinguishes types 1 and 3 insp<sub>3</sub> receptors. *J Gen Physiol* 117: 435-446.

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-Saénz A, Barahona MV, Orensanz LM, Recio P, Bustamante S, Benedito S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D, Hernández M (2011). Mechanisms involved in the nitric oxide independent 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 (2011). Role of calcitonin gene-related peptide in inhibitory neurotransmission to the pig urinary bladder neck. *J Urol* (Aceptado).

- 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.
- Masunaga K, Chappl CR, McKay NG, Yoshida M, Sellers DJ (2010). The  $\beta$ -adrenoceptor mediates the inhibitory effects of  $\beta$ -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.
- McGillis JP, Humphreys S, Reid S (1991). Characterization of functional calcitonin gene-related peptide receptors on rat lymphocytes. *J Immunol* 147: 3482-3489.
- 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.
- Meisheri KD, Hwang O, van Breemen C (1981). Evidence for two separated  $Ca^{2+}$  pathways in smooth muscle plasmalemma. *J Membr Biol* 59: 19-25.
- Michel MC, Ochodnický P, Homma Y, Igawa Y (2011).  $\beta$ -Adrenoceptor agonist effects in experimental models of bladder dysfunction. *Pharmacol Ther* 131(1): 40-49.
- Michel MC, Vrydag W (2006). Alpha(1)-, alpha(2)- and betaadrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* 147: 88-119.
- Millar RP, Newton CL (2010). The year in G protein-coupled receptor research. *Mol Endocrinol* 24: 261-274.
- 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, Maeda A, Yamazawa T, Hirose K, Kurosaki T, Iino M (1999). Encoding of  $Ca^{2+}$  signals by differential expression of IP<sub>3</sub> receptor subtypes. *EMBO J* 18: 1303-1308.
- Miyakawa T, Mizushima A, Hirose K, Yamazawa T, Bezprozvanny I, Kurosaki T, Iino M. (2001).  $Ca^{2+}$ -sensor region of IP<sub>3</sub> receptor controls intracellular  $Ca^{2+}$  signaling. *EMBO J* 20: 1674-1680.

Mohammed HA, Santer RM (2002). Distribution and changes with age of calcitonin gene-related peptide- and substance P-immunoreactive nerves of the rat urinary bladder and lumbosacral sensory neurons. *Eur J Morphol* 40: 293-301.

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.

Morgan C, de Groat WC, Nadelhaft I (1986). The spinal distribution sympathetic preganglionic and visceral primary afferent neurons that send axons into the hypogastric nerves of the cat. *J Comp Neurol* 243: 23-40.

Morgan C, Nadelhaft I, de Groat WC (1981). The distribution of visceral primary afferents from the pelvic nerve to Lissauer's tract and the spinal gray matter and its relationship to the sacral parasympathetic nucleus. *J Comp Neurol* 201: 415-440.

Morita T, Iizuka H, Iwata T, Kondo S (2000). Function and distribution of  $\beta_3$ -adrenoceptors in rat, rabbit and human urinary bladder and external urethral sphincter. *J Smooth Muscle Res* 36: 21-32.

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.

Morris GR, Panico M, Etienne T, Tippins J, Girgis SI, Macin-Tyre I (1984). Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. *Nature* 308: 746-774.

Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, Jones PM, Pierson AM, Hamid QA, Kanse S, Amara SG, Burrin JM, Legon S, et al. (1988). Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience* 25: 195-205.

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.

Mumtaz FH, Khan MA, Sullivan ME, Thompson CS, Mikhailidis DP, Morgan RJ, Dashwood MR (1999). Potential role of endothelin and nitric oxide in physiology and pathophysiology of the lower urinary tract. *Endothelium* 7: 1-9.

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.

- Murthy KS, Zhou H, Grider JR, Makhoul GM (2001). Sequential activation of heterotrimeric and monomeric G proteins mediates PLD activity in smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: 381-388.
- 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 M<sub>2</sub> receptors inhibit Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels in rat bladder smooth muscle. *Int J Urol* 9: 689-696.
- Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hescheler J, and Standen NB (1990). Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K<sup>+</sup> channels. *Nature* 344: 770-773.
- 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.
- Norton PA, Zinner NR, Yalcin I, Bump RC; Duloxetine Urinary Incontinence Study Group (2002). Duloxetine versus placebo in the treatment of stress urinary incontinence. *Am J Obstet Gynaecol* 187: 40-48.
- Nunn DL, Taylor CW (1992). Luminal Ca<sup>2+</sup> increases the sensitivity of Ca<sup>2+</sup> stores to inositol 1,4,5-trisphosphate. *Mol Pharmacol* 41: 115-119.
- O'Reilly BA, Kosaka AH, Chang TK, Ford AO, Popert R, McMahon SB (2001). A quantitative analysis of purinoceptor expression in the bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. *BJU Int* 87: 617-622.
- 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: 1464-410.
- 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 ET<sub>A</sub> endothelin receptor subtype mediating mechanical responses in the detrusor smooth muscle of the human urinary bladder. *Clin Sci* 96: 397-402.

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.

Owan I, Ibaraki K (1994). The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in macrophages: the presence of functional receptors and effects on proliferation and differentiation into osteoclast-like cells. *Bone Miner* 24: 151-164.

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.

Parlani M, Conte B, Goso C, Szallasi A, Manzini S (1993). Capsaicin-induced relaxation in the rat isolated external urethral sphincter: characterization of the vanilloid receptor and mediation by CGRP. *Br J Pharmacol* 110: 989-994.

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.

Persson K, Andersson KE (1992). Nitric oxide and relaxation of pig lower urinary tract. *Br J Pharmacol* 106: 416-422.

Persson K, Garcia-Pascual A, Andersson KE (1991). Difference in the actions of calcitonin gene-related peptide on pig detrusor and vesical arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 143: 45-53.

Petkov GV, Bonev AD, Heppner TJ, Brenner R, Aldrich RW, Nelson MT (2001). Beta1-subunit of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle. *J Physiol* 537: 443-452.

Petkov GV, Heppner TJ, Bonev AD, Herrera GM, and Nelson MT (2001). Low levels of K<sub>ATP</sub> channel activation decrease excitability and contractility of urinary bladder. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 280: 1427-1433.

Pfister G, Hofmann F, DiSalvo J, Ruegg JC (1984). cGMP and cAMP inhibit tension development in skinned coronary arteries. *Pflügers Arch* 401: 277-280.

- Prieto D, Simonsen U, Hernández M, García-Sacristán A (1998). Contribution of K<sup>+</sup> channels and ouabain-sensitive mechanisms to the endothelium-dependent relaxations of horse penile small arteries. *Br J Pharmacol* 123: 1609-1620.
- Putney JW Jr (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1-12.
- Qiu Y, Kraft P, Craig EC, Liu X, Haynes-Johnson D (2001). Identification and functional study of phosphodiesterases in rat urinary bladder. *Urol Res* 29: 388-392.
- Queen LR, Xu B, Horinouchi K, Fisher I, Ferro A (2000).  $\beta(2)$ -adrenoceptors activate nitric oxide synthase in human platelets. *Circ Res* 87: 39-44.
- Quirion R, Van Rossum D, Dumont Y Quirion R, Van Rossum D, Dumont Y, St-Pierre S, Fournier A (1992). Characterization of CGRP1 and CGRP2 receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 657: 88-105.
- Raddino R, Pela G, Manca C, Barbagallo M, D'Aloia A, Passeri M, and Visioli O (1997). Mechanism of action of human calcitonin gene-related peptide in rabbit heart and in human mammary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 29: 463-470.
- Radziszewski P, Soller W, Mattiasson A (2003). Calcitonin gene-related peptide and substance P induce pronounced motor effects in the female rat urethra in vivo. *Scand J Urol Nephrol* 37: 275-280.
- Ray FR, Moore KH, Hansen MA, Barden JA (2003). Loss of purinergic P2X receptor innervation in human detrusor and subepithelium from adults with sensory urgency. *Cell Tissue Res* 314: 351-359.
- 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.
- Reslerova M, Loutzenhiser R (1998). Renal microvascular actions of calcitonin gene-related peptide. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: 1078-1085.
- 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 NY Acad Sci* 921: 1-25.
- Ritter SL, Hall RA (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 819-830.
- Robinson D, Cardozo L (2010). New drug treatments for urinary incontinence. *Maturitas* 65: 340-347.

Robinson D, Cardozo L, Akeson M, Hvistendahl G, Riis A, Norgaard A (2002). Women take control; Desmopressin- a drug for daytime urinary incontinence. *Neurourol Urodynam* 21: 385-386.

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.

Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304: 129-135.

Ruggieri MR Sr, Braverman AS (2006). Regulation of bladder muscarinic receptor subtypes by experimental pathologies. *Auton Autacoid Pharmacol* 26: 311-325.

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: 60-72.

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.

Sairam K, Kulinskaya E, McNicholas TA, Boustead GB, Hanbury DC (2002). Sildenafil influences lower urinary tract symptoms. *BJU Int* 90: 836-839.

Salinas Casado J, Esteban Fuertes M (2010). Compendio de la vejiga neurog ena traum tica. Astra Tech 1  Edici n.

Sakai K, Saito K (1998). Reciprocal interactions among neuropeptides and adenosine in the cardiovascular system of rats: a role of  $K_{ATP}$  channels. *Eur J Pharmacol* 345: 279-284.

Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa 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.

Santicioli P, Maggi CA (1994). Inhibitory transmitter action of calcitonin gene-related peptide in guinea-pig ureter via activation of glibenclamide-sensitive K channels. *Br J Pharmacol* 113: 588-592.

Sasamura T y Kuraishi Y (1999). Peripheral and central actions of capsaicin and VR1 receptor. *Jpn J Pharmacol* 80: 275-280.

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  $Ca^{2+}$  sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 275: 21722-21729.

Schubert R, Nelson MT (2001). Protein kinases: tuners of the BK<sub>Ca</sub> channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci* 22: 505-512.

Semenenko FM, Cervero F (1992). Afferent fibres from the guinea-pig ureter: size and peptide content of the dorsal root ganglion cells of origin. *Neuroscience* 47: 197-201.

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 Ca<sup>2+</sup> release by SR Ca<sup>2+</sup> load: direct SR and cytosolic Ca<sup>2+</sup> measurements in rat uterine myocytes. *Cell Calcium* 37: 215-223.

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.

Smet PJ, Jonavicius J, Marshall VR, de Vente J (1996). Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience* 71: 337-348.

Smirnov SV, Aaronson PI (1992). Ca<sup>2+</sup> currents in single myocytes from human mesenteric arteries: evidence for a physiological role of L-type channels. *J Physiol* 457: 455-475.

Smith ARB, Hosker GL, Warrell DW (1989). The role of partial denervation of the pelvic floor in the aetiology of genitourinary prolapsed and stress incontinence of urine: a neurophysiological study. *Br J Obstet Gynaecol* 96: 24-28.

Somlyo AP, Somlyo AV (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372: 231-236.

Somlyo AP, Somlyo AV (2000). Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and nonmuscle myosin II. *J Physiol* 522: 177-185.

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(3): 1175-1178.

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.

Sun W, Wang L, Zhang Z, Chen M, and Wang X (2003). Intramuscular transfer of naked calcitonin gene-related peptide gene prevents autoimmune diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin in C57BL mice. *Eur J Immunol* 33: 233-242.

Supowit SC, Christensen MD, Westlund KN, Hallman DM, DiPette DJ (1995). Dexamethasone and activators of the protein kinase A and C signal transduction pathways regulate neuronal calcitonin gene-related peptide expression and release. *Brain Res* 686: 77-86.

Takeda M, Obara K, Mizusawa T, Tomita Y, Arai K, Tsutsui T, Hatano A, Takahashi K, Nomura S (1999). Evidence for beta3-adrenoceptor subtypes in relaxation of the human urinary bladder detrusor: analysis by molecular biological and pharmacological methods. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 1367-1373.

Tam C, Brain SD (2004). The assessment of vasoactive properties of CGRP and adrenomedullin in the microvasculature: a study using in vivo and in vitro assays in the mouse. *J Mol Neurosci* 22: 117-124.

Tam CW, Brain SD (2006). Calcitonin gene-related peptides. *Handbook of biologically active peptides*.

Tang Y, Han C, Fiscus RR, Wang X (1997). Increase of calcitonin gene-related peptide (CGRP) release and mRNA levels in endotoxic rats. *Shock* 7: 225-229.

Taylor AH, Al-Azzawi F (2000). Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrin* 24: 145-155.

Templeman L, Sellers DJ, Chapple CR, Rosario DJ, Hay DP, Chess-Williams R (2003). Investigation of neurokinin-2 and -3 receptors in the human and pig bladder. *BJU Int* 92: 787-792.

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.

Thor KB, Morgan C, Nadelhaft I, Houston M, de Groat WC (1989). Organization of afferent and efferent pathways in the pudendal nerve of the female cat. *J Comp Neurol* 288: 263-279.

- Thorneloe KS, Nelson MT (2003). Properties and molecular basis of the mouse urinary bladder voltage-gated K current. *J Physiol* 549: 65-74.
- Tjen AL, Kraiczi H, Ekman R, Keith IM (1998). Sensory CGRP depletion by capsaicin exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats. *Regul Pept* 74: 1-10.
- 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.
- 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-Schmiedebergs 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. *Molec Biol Cell* 13: 830-846.
- Truss MC, Uckert S, Stief CG, Forssmann WG, Jonas U (1996). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isoenzymes in the human detrusor smooth muscle. II. Effect of various PDE inhibitors on smooth muscle tone and cyclic nucleotide levels in vitro. *Urol Res* 24: 129-134.
- Tucci P, Evandri MG, Bolle P (2002). Tachykinin-independent activity of capsaicin on in-vitro lamb detrusor. *J Pharm Pharmacol* 54: 1111-1115.
- Turner WH, Brading AF (1997). Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Pharmacol Ther* 75: 77-110.
- 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 Ca<sup>2+</sup> in carbachol-induced tonic contraction of the pig detrusor smooth muscle. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350: 398-402.
- Uckert S, Stief CG, Lietz B, Burmester M, Jonas U, Machtens SA (2002). Possible role of bioactive peptides in the regulation of human detrusor smooth muscle - functional effects in vitro and immunohistochemical presence. *World J Urol* 20: 244-249.
- Van Moorselaar J (2003). LUTS and Sexual Dysfunction: Implications for Management of BPH. *Eur Urol* 2: 13-20.
- Vasko MR, Campbell WB, Waite KJ (1994). Prostaglandin E<sub>2</sub> enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci* 14: 4987-4997.

Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52: 269-324.

Vause CV, Durham PL (2009). CGRP stimulation of iNOS and NO release from trigeminal ganglion glial cells involves mitogen-activated protein kinase pathways. *J Neurochem* 110: 811-821.

Vega AV, Avila G (2010). CGRP, a vasodilator neuropeptide that stimulates neuromuscular transmission and EC coupling. *Curr Vasc Pharmacol* 8: 394-403.

Waetjen LE, Liao S, Johnson WO, Sampsel CM, Sternfield B, Harlow SD, Gold EB (2007). Factors associated with prevalent and incident urinary incontinence in a cohort of midlife women: a longitudinal analysis of data: study of women's health across the nation. *Am J Epidemiol* 165: 309-318.

Walker CS, Conner AC, Poyner DR, Hay DL (2010). Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends Pharmacol Sci* 31: 476-483.

Wang EC, Lee JM, Ruiz WG, Balestreire EM, von Bodungen M, Barrick S, Cockayne DA, Birder LA, Apodaca G (2005). ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest* 115: 2412-2422.

Wardle K.A, Ranson J, Sanger GJ (1997). Pharmacological characterization of the vanilloid receptor in the rat dorsal spinal cord. *Br J Pharmacol* 121: 1012-1016.

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.

Wellman GC, Quayle JM, Standen NB (1998). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol* 507: 117-129.

Wellner MC and Isenberg G (1993). Properties of stretch-activated channels in myocytes from the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol* 466: 213-227.

Westfall TD, Kennedy C, Sneddon P (1996). Enhancement of sympathetic purinergic neuro-transmission in the guinea-pig isolated vas deferens by the novel ecto-ATPase inhibitor ARL 67156. *Br J Pharmacol* 117: 867-872.

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.

Wiley JW, Gross RA, MacDonald RL (1992). The peptide CGRP increases a high-threshold Ca<sup>2+</sup> current in rat nodose neurones via a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Physiol* 455: 367-381.

Wisskirchen FM, Burt RP, Marshall I (1998). Pharmacological characterization of CGRP receptors mediating relaxation of the rat pulmonary artery and inhibition of twitch responses of the rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 123: 1673-1683.

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.

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  $\beta_3$ -adrenoceptors in mediating relaxation of porcine detrusor muscle. *Br J Pharmacol* 135: 129-134.

Yamauchi H, Akino H, Ito H, Aoki Y, Nomura T, Yokoyama O (2010). Urinary Prostaglandin  $E_2$  was Increased in Patients With Suprapontine Brain Diseases, and Associated With Overactive Bladder Syndrome. *Urology* 76: 1267-1279.

Yang JM, Huang WC (2004). The significance of urethral hyperechogenicity 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.

Yoshikawa A, van Breemen C, Isenberg G (1996). Buffering of plasmalemmal  $Ca^{2+}$  current by sarcoplasmic reticulum of guinea pig urinary bladder myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 271: 833-841.

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 ed. Saunders Philadelphia 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-Schmiedeberg's 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 W, Zarharia LC, Jackson EK, Apodaca G (2006). Adenosine receptor expression and function in bladder uroepithelium. *Am J Physiol* 291: 254-265.

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 *Sociedad Internacional de Continencia (ICS)* define la Incontinencia Urinaria como: *“la pérdida involuntaria de orina a través de la uretra, objetivamente demostrable y que constituye, para la persona que lo sufre, un problema higiénico y social”*. Este proceso afecta a todos los grupos de población, edad y sexo. Así, estudios epidemiológicos llevados a cabo en Estados Unidos en el año 2000 revelaron que el 55 % de mujeres y el 34 % de hombres mayores de 60 años, así como, el 42 % de mujeres y el 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 España, el gasto en absorbentes en 2001 fue de 197 millones de euros, lo que representa un 3.2 % del importe total de la prestación farmacéutica del Sistema Nacional de Salud. A pesar del considerable 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, solamente un 20 % de los individuos afectados solicitan consulta médica.

Las incontinencias de estrés Tipo III se producen por disfuncionalidad del mecanismo esfintérico intrínseco que origina un cuello de vejiga urinaria abierto de forma permanente (McGuire y Woodside, 1981). Dicha patología afecta primordialmente 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), con terapias farmacológicas escasamente resolutivas en las que se utilizan esencialmente agonistas de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  e inhibidores de la recaptación de serotonina (duloxetina) para producir contracción de la base de la vejiga urinaria. 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 en aras a desarrollar un correcto manejo terapéutico en dicha patología. Así, la existencia de un cuello abierto correlaciona positivamente con la presencia de incontinencia urinaria producida por deficiencia esfintérica intrínseca (English y col., 1999).

El esfínter interno está constituido por la musculatura lisa del cuello de la vejiga urinaria y la uretra proximal, formando ambas estructuras la zona de salida vesical, 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). Además, existe un control somático sobre el esfínter estriado externo vía 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).

Diferentes mediadores inhibidores no adrenérgicos no colinérgicos, como el óxido nítrico (NO), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la adenosina 5'-trifosfato (ATP) producen relajación de la musculatura lisa del cuello vesical (Hills y col., 1984; Andersson y Wein, 2004). De hecho, el NO, cuya liberación desde nervios intramurales es modulada por canales Kv y receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  de localización presináptica, está involucrado en la neurotransmisión inhibitoria produciendo relajación de la musculatura lisa a través de mecanismos neuronales y no neuronales (Hernández y col., 2007, 2008). El ATP, la 5-HT y péptidos, como el VIP y péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiario (PACAP), desempeñan, asimismo, un papel crucial en la transmisión inhibitoria del cuello vesical. El ATP produce relajación del cuello vesical a través de receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> después de la hidrólisis del ATP a ADP y adenosina, respectivamente (Hernández y col., 2009), mientras que la 5-HT, cuyo efecto es modulado por receptores 5-HT<sub>1A</sub> presinápticos, produce relajación vía receptores musculares 5-HT<sub>7</sub> acoplados a la vía de la PKA sin involucrar activación de canales de K<sup>+</sup> de localización postsináptica (Recio y col., 2009). El PACAP y el VIP producen relajación del cuello de la vejiga del cerdo a través de receptores musculares del subtipo VPAC<sub>2</sub> acoplados a la vía de la PKA. Asimismo, receptores PAC<sub>1</sub> localizados en APSC y acoplados a la liberación del NO y receptores VPAC situados en terminaciones nerviosas motoras están involucrados en las relajaciones producidas por PACAP 38 y VIP, respectivamente (Hernández y col., 2006a,b). En nuestro laboratorio, asimismo, se ha demostrado la existencia de un componente inhibitorio independiente de NO que representa más del 50 % de la relajación del cuello vesical (Hernández y col., 2008).

Por todo lo expuesto, el presente estudio tiene como objetivo general desvelar la naturaleza de los neurotransmisores y/o neuromoduladores independientes del NO

involucrados en la transmisión inhibitoria en el cuello de la vejiga urinaria en aras a proporcionar terapias farmacológicas efectivas en las incontinencias urinarias de estrés producidas por deficiencia esfintérica intrínseca. De forma específica, investigaremos la posible implicación del CGRP en la neurotransmisión inhibitoria NANC del cuello vesical, así como, los mecanismos de señalización intracelular involucrados en dicho proceso. Para ello estudiaremos el papel del CGRP en la neurotransmisión inhibitoria del cuello de la vejiga urinaria a través de diferentes abordajes experimentales (inmunohistoquímica, *Western Blot* y registro de fuerza isométrica) con el fin de investigar la distribución de fibras inmunorreactivas para el CGRP, la expresión de receptores para dicho péptido en las diferentes capas de la pared del cuello vesical, la liberación endógena de CGRP desde nervios intramurales en respuesta a estimulación eléctrica transmural (EET) y los mecanismos implicados en la neurotransmisión inhibitoria no adrenérgica no colinérgica (NANC) independiente del NO, en el que investigaremos el papel de la vía ciclooxigenasa (COX), la ATPasa de la bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>, las vías de la PKA y de la PKG y los canales de K<sup>+</sup> involucrados.

Mediante el análisis de los nuestros resultados podemos concluir que:

1º. Los receptores del subtipo CGRP<sub>2</sub> se expresan en el músculo liso del cuello de la vejiga urinaria. Asimismo, es característica la existencia de una rica densidad de inervación conteniendo elementos inmunorreactivos al CGRP que penetran a través de la adventicia y se distribuyen en la capa muscular y en el urotelio.

2º. El CGRP produce relajación de la musculatura lisa a través de la activación de receptores neuronales y musculares de CGRP, éstos últimos del subtipo CGRP<sub>2</sub> vía mecanismos independientes del NO y de la COX.

3º. Los resultados morfológicos y funcionales obtenidos en el presente estudio sugieren que el CGRP, liberado desde nervios intramurales, estaría involucrado en la transmisión NANC inhibitoria del cuello vesical.

4º. La neurotransmisión inhibitoria NANC no nitrérgica es producida, en parte, a través de mecanismos dependientes de la vía COX-1 y de la activación de la ATPasa de la bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>. Las vías de señalización intracelular de la PKA y de la PKG, así como

los canales de K<sup>+</sup> postsinápticos, no parecen, sin embargo, estar involucrados en la relajación nerviosa independiente de NO.

Como conclusión final podemos decir que, existe un componente relajante nervioso de naturaleza desconocida que representa aproximadamente un 50 % de la neurotransmisión inhibitoria NANC del cuello vesical. Debido a ello, estudios futuros deberán ir encaminados a determinar la naturaleza de los neurotransmisores y/o neuromoduladores, así como las vías de señalización involucradas en dicho proceso, en aras a proporcionar terapias efectivas en la incontinencia de estrés tipo III producida por deficiencia esfintérica intrínseca.