



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

**PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-
CIRÚRGICAS**

MARCOS FIUZA DE CARVALHO

**ANÁLISE DO EFEITO DE INIBIDORES DE FOSFODIESTERASE DO TIPO 5 E
AGONISTAS BETA ADRENERGICOS EM PARAMETROS URODINAMICOS DE
CAMUNDONGOS UTILIZANDO MODELO EXPERIMENTAL DE
HIPERATIVIDADE DETRUSORA**

FORTALEZA

2015

MARCOS FIUZA DE CARVALHO

**ANÁLISE DO EFEITO DE INIBIDORES DE FOSFODIESTERASE DO TIPO 5 E
AGONISTAS BETA ADRENERGICOS EM PARAMETROS URODINAMICOS DE
CAMUNDONGOS UTILIZANDO MODELO EXPERIMENTAL DE
HIPERATIVIDADE DETRUSORA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós -Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga- Silva

Co- orientador: Prof.Dr.Ricardo Reges Maia Oliveira

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- C325a Carvalho, Marcos Fiuza de.
Análise do efeito de inibidores de fosfodiesterase do tipo 5 e agonistas beta adrenergicos em parametros urodinamicos de camundongos utilizando modelo experimental de hiperatividade detrusora. / Marcos Fiuza de Carvalho. – 2015.
50 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico- Cirúrgica, Mestrado em Cirurgia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Metabolismo e comportamento biocelular no estresse.
Orientação: Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga- Silva.
Co-Orientação: Prof. Dr. Ricardo Reges Maia Oliveira.
1. Bexiga Urinária Hiperativa. 2. Músculo Liso. 3. Inibidores de Fosfodiesterase. I. Título.

MARCOS FIUZA DE CARVALHO

**ANÁLISE DO EFEITO DE INIBIDORES DE FOSFODIESTERASE DO TIPO 5 E
AGONISTAS BETA ADRENERGICOS EM PARAMETROS URODINAMICOS DE
CAMUNDONGOS UTILIZANDO MODELO EXPERIMENTAL DE
HIPERATIVIDADE DETRUSORA**

Dissertação submetida à
Coordenação do Programa
de Pós -Graduação Strictu
Sensu em Cirurgia da
Universidade Federal do
Ceará, como requisito
parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Médico-Cirúrgicas

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga- Silva- Orientador (UFC)

Prof. Dr. Ricardo Reges Maia Oliveira (UFC)

Prof.Dr.Rommel Prata Regadas (UECE)

A Deus

Aos meus pais ,Fred e Maria Helena

A minha esposa Sabine

A minha família

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, professor titular do Departamento de Cirurgia e coordenador do Programa de Pós- Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela incansável dedicação à Pós Graduação dessa instituição

Ao Prof. Dr. LÚCIO FLÁVIO GONZAGA-SILVA, professor do Departamento de Cirurgia e meu orientador, por sua incansável busca pela melhora na qualidade da Urologia no estado do Ceará

Ao Prof. Dr. RICARDO REGES MAIA OLIVEIRA, professor do Departamento de Cirurgia e meu co-orientador, pela confiança depositada em mim e a contribuição científica importante para o desenvolvimento desta dissertação

Ao Prof. Dr. MANOEL ODORICO DE MORAES FILHO, exemplo de competência acadêmica, por todo apoio logístico.

Ao Dr. FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU, por sua contribuição prática e apoio estatístico

Ao Prof SAID DA CRUZ FONSECA, por apoio na manipulação das drogas

Ao Dr. ROMMEL PRATA REGADAS, pela contribuição nas discussões científicas durante o mestrado

Aos urologistas LEOCÁCIO VENICÍUS DE SOUSA BARROSO e BRUNO LIMA LINHARES, pela assistência durante os experimentos

A MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, pela prestatividade e zelo com os alunos de pós-graduação

A PATRICIA LOPES, THULIERMES PAMPLONA E BRUNO MARINHO, pelo zelo com os animais e apoio durante os experimentos

A JOÃO TARCÍSIO DOS SANTOS, pelo zelo com os equipamentos para as avaliações urodinâmicas nos animais

"O Senhor é meu pastor, nada me faltará.

Em verdes prados ele me faz repousar.

Conduz-me às águas refrescantes

restaura as forças da minha alma." (**SALMO 22**)

RESUMO

Tratamento farmacológico da hiperatividade detrusora (HD) tem sido classicamente feito com antimuscarínicos. Recentemente novos agentes farmacológicos ou associação de drogas tem sido usados para tratar HD. Um deles são os beta3 agonistas. Beta3 agonistas aumentam a adenosina monofosfato cíclica intracelular (AMPC) através da via da adenilato ciclase. AMPC induz o relaxamento do músculo liso detrusor (MLD). Inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (iPDE-5) como a tadalafila também causam relaxamento do MLD através da via do óxido nítrico/guanosina monofosfato cíclico (NO/GMPc). Além dos mecanismos acima tem-se feito a hipótese que a associação dos beta 3 agonistas com iPDE pode causar relaxamento pronunciado do MLD. Como consequência, o principal objetivo deste estudo experimental *in vivo* foi avaliar o impacto da associação dos iPDE (tadalafila) e beta 3 agonista (BRL 37344) na HD. Trinta camundongos foram randomizados em cinco grupos: Controle (n=6); L-N^g-Nitroarginine methyl ester hidrocloreto (L-NAME) (n=6); L-NAME/Tadalafila (n=6); L-NAME/BRL 37344 (n=6); L-NAME/Tadalafila/BRL 37344 (n=6). L-NAME foi usado para causar experimentalmente HD nos camundongos pela depleção de NO. Todos animais foram submetidos a estudos urodinâmicos e os seguintes parâmetros foram avaliados: *non-voiding contractions* (NVC); frequência de micção (FM). Foi considerada como hiperatividade detrusora o aumento no número de NVC e FM. Comparações entre os cinco grupos de tratamento foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associados com o teste de Tukey. O Grupo L-NAME (4,33 ±2,58) aumentou o número de NVC comparado ao Grupo Controle (1,50 ±0,55). Os Grupos L-NAME/Tadalafila (2,00±1,10), L-NAME/BRL 37344 (1,50±1,52) e L-NAME/Tadalafila/BRL37344 (2,00±1,26) diminuíram o número de NVC comparado com o Grupo L-NAME (p<0,05). Porém a co-administração de Tadalafila/BRL 37344 não foi mais efetiva que a administração de Tadalafila ou BRL 37344 sozinhos. O Grupo L-NAME (2,80 ± 0,68) aumentou o número de FM comparada ao Grupo Controle (0,69 ±0,56). Os Grupos L-NAME/Tadalafila(0,97±0,71), L-NAME/BRL 37344(0,92 ±0,38) e L-NAME/Tadalafila/BRL 37344 (1,05 ±0,44) diminuíram o número de FM comparado com o Grupo L-NAME (p<0,05). Porém a co-administração da Tadalafila/ BRL 37344 não foi mais efetiva que a administração de Tadalafila e BRL 37344 sozinhos. Ambos Tadalafila e BRL 37344 melhoraram a HD. Porém, a associação de Tadalafila e BRL 37344 não teve efeito aditivo na hiperatividade detrusora.

Palavras - chave: relaxamento do músculo liso detrusor, beta 3 agonista, inibidores da fosfodiesterase tipo 5

ABSTRACT

Pharmacological treatment of detrusor overactivity (DO) has been classically done with antimuscarinics. Recently new pharmacological agents or association of drugs have been used to treat DO. One of them are the beta3 agonists. Beta 3 agonists increase intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) through adenylyl cyclase pathway. cAMP induces detrusor smooth muscle (DSM) relaxation. Phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE-5i) like tadalafil also cause DSM relaxation through nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate (NO/cGMP) pathway. Besides the above mechanisms it has been hypothesized that association of beta 3 agonists with PDEi may cause more pronounced DSM relaxation. As a consequence, the principal aim of this in vivo experimental study was to evaluate the impact of association of PDE-5i (tadalafil) and beta3 agonist (BRL 37344) on DO. Thirty mice were randomized into five groups: Control (n=6); L-N^g-Nitroarginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) (n=6); L-NAME /tadalafil (n=6); L-NAME / BRL 37344 (n=6); L-NAME/tadalafil / BRL 37344 (n=6). L-NAME was used to experimentally cause DO on mice by NO deprivation. All animals were submitted to urodynamic studies and the following parameters were evaluated: non-voiding contractions (NVC); frequency of micturition cycles (FM). It was considered as detrusor overactivity the increase in the number of NVC and FM. Comparisons between five groups of treatment were made by analysis of variance (ANOVA) associated with Tukey test. L-NAME Group (4.33 ± 2.58) increased the number of NVC compared to Control Group (1.50 ± 0.55). L-NAME/Tadalafil (2.00 ± 1.10), L-NAME/BRL 37344 (1.50 ± 1.52) and L-NAME/Tadalafil/BRL37344 (2.00 ± 1.26) Groups decreased number of NVC compared to L-NAME Group ($p < 0.05$). However, co-administration of Tadalafil/BRL 37344 was not more effective than administration of Tadalafil or BRL 37344 alone (Figure 1). L-NAME Group (2.18 ± 0.68) increased the number of FM compared to Control Group (0.69 ± 0.56). L-NAME/Tadalafil (0.97 ± 0.71), L-NAME/BRL 37344 (0.92 ± 0.38) and L-NAME/Tadalafil/BRL 37344 (1.05 ± 0.44) Groups decreased number of FM compared to L-NAME Group ($p < 0.05$). However, co-administration of Tadalafil/BRL 37344 was not more effective than administration of Tadalafil or BRL 37344 alone. Both Tadalafil and BRL 37344 improved DO. Nonetheless, association of tadalafil and BRL 37344 has not an additive effect on DO.

Key words: detrusor smooth muscle relaxation, beta 3 agonist, phosphodiesterase type 5 inhibitors

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Um camundongo sendo submetido a cistometria.....	28
Figura 2: <i>Non-voiding contractions</i>	30
Figura 3: Frequência de micção.....	32
Figura 4: Cistometrias dos cinco grupos analisados.....	34

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Tabela 1: <i>Non-voiding contractions</i> : Comparações pelo teste deTukey.....	31
Tabela 2: Frequência de micção: Comparações pelo Teste de Tukey.....	33
Tabela 3: Média±Desvios padrão dos parâmetros analisados.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina de monofosfato cíclico
ANOVA	Análise da variância(do inglês ANalysis of VAriance)
β 3-AR	Receptor beta adrenergico do tipo 3
DE	Disfunção erétil
Dr.	Doutor
FM	Frequência de micção
GMPC	Guanosina de monofosfato cíclico
IPED-5	Inibidor de fosfodiesterase tipo 5
LUTS	<i>Lower Urinary Tract Symptoms</i>
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina metil ester hidrocrolido
M3	Receptor muscarínico do tipo 3
MTOPS	<i>Medical Therapy of Prostatic Symptoms</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NVC	<i>Non-voiding contractions</i>
PDE	Fosfodiesterase
Prof.	Professor
STUI	Sintomas do trato urinário inferior

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	13
1.1:	Anatomia do trato urinário inferior.....	14
1.2:	Fisiologia da micção.....	15
1.2.1:	<i>Mecanismos colinérgicos</i>	16
1.2.2:	<i>Mecanismos adrenérgicos</i>	17
1.2.3:	<i>Mecanismos não adrenérgicos não colinérgicos</i>	18
1.3:	Fisiologia da ereção.....	20
1.4:	Fisiopatologia da STUI e disfunção erétil.....	21
2.	Objetivos.....	25
3.	Material e Métodos.....	26
3.1:	Aspectos éticos.....	26
3.2:	Animais.....	26
3.3:	Drogas.....	26
3.4:	Método experimental.....	28
3.4:	Análise estatística.....	29
4.	Resultados.....	30
4.1:	<i>Non Voiding Contractions</i>	30
4.2:	Frequência de micção.....	32
5.	Discussão.....	36
6.	Conclusões.....	41
	Referências bibliográficas.....	42
	Anexo.....	50

1.INTRODUÇÃO

Os sintomas do trato urinário inferior (STUI) em homens aumentam comumente com a idade, alcançando uma prevalência de mais de 45% dos homens com mais de 70 anos (ROSEN *et al*,2003). A presença de STUI em homens têm tradicionalmente sido relacionada ao crescimento da próstata, com subsequente compressão uretral e obstrução, e irritabilidade vesical secundária, sendo com isso comumente referidos como STUI secundários a hiperplasia benigna da próstata (HPB). Porém dados recentes sugerem fortemente que a etiologia dos STUI é bastante complexa e multifatorial (ANDERSSON *et al*,2011).

STUI seriam subdivididos em armazenamento, esvaziamento e pós miccionais a fim de refletir o estágio no ciclo de micção onde eles ocorrem. Tanto homens como mulheres podem apresentar estes grupos de sintomas, muitas vezes concomitantes (SOLER *et al*,2014). Dados de um extenso estudo epidemiológico (o Epi LUTS) em homens e mulheres com mais de 40 anos mostrou uma combinação destes grupos de sintomas em 24% dos homens e 26% das mulheres (SEXTON *et al* ,2009). O mais comum tipo de STUI em homens foi de armazenamento (51,3%) seguido de esvaziamento (25,7%) e pós miccionais (16,9%). A presença de bexiga hiperativa em homens e mulheres foi de 10,8% e 12,8% respectivamente (IRWIN *et al* ,2006). Tem-se observado que muitos homens com HPB não desenvolvem STUI enquanto outros homens com sintomas urinários irritativos não têm HPB ou obstrução infravesical (CHAPPLE;ROEHRBORN,2006). STUI de esvaziamento são geralmente causados por obstrução no trato infravesical e tem sido atribuído a dois componentes: o componente estático da próstata aumentada de tamanho, e o componente dinâmico do tônus do estroma prostático (JACOBSEN;GIRMAN;LIEBER,2001). Porém até para STUI de esvaziamento, evidência para uma direta correlação ainda não é convincente, e hoje é reconhecido que tais sintomas não são somente reflexo de uma afecção infravesical (ABDEL-AZIZ;LEMACK,2002). Sintomas de armazenamento, por outro lado, são associados com hiperatividade detrusora. Alguns fatores miogênicos, neurogênicos, assim como o urotélio, contribuem para isso (ANDERSSON,2003). A balança das evidências científicas sugerem fortemente que a bexiga deve ser considerada o órgão central na patogênese dos sintomas de armazenamento tanto no homem como na mulher. Dados recentes portanto parecem favorecer a visão que o espectro dos sintomas de esvaziamento e armazenamento refletem distúrbios em todo o trato urinário e que "STUI não são um grupo de sintomas órgão e/ou sexo específico, sendo relacionados a idade e progressivos por muitas vezes"(CHAPPLE *et al*,2008).

A síndrome da bexiga hiperativa afeta mais de 400 milhões de pessoas mundialmente (IRWIN *et al*,2011). É definida como os sintomas de frequência urinária, urgência e noctúria, com ou sem urge incontinência, na ausência de fatores patológicos (ABRAMS *et al*,2002).

Agentes antimuscarínicos são o tratamento padrão-ouro para o manejo clínico da bexiga hiperativa (CHAPPLE,2008). Porém, estes pacientes podem ter uma resposta sub-ótima aos antimuscarínicos ou apresentar efeitos adversos, como boca seca, constipação, e vista borrada (ABRAMS *et al*,2007). Intolerabilidade e eficácia inadequada contribuem para o abandono do tratamento. Uma revisão sistemática encontrou taxas de 43-83% com 30 dias de terapia, com tendência a crescimento com o tempo (SEXTON *et al*,2011).

As limitações da terapia antimuscarínica indicam a necessidade de opções de tratamento farmacológico oral efetivos e bem tolerados, e os beta 3 agonistas adrenérgicos têm emergido como uma classe de drogas promissora; uma novidade no tratamento da síndrome da bexiga hiperativa em muitos anos de pesquisa (KHULLAR *et al*,2013).

O impacto da síndrome da bexiga hiperativa na função sexual foi relatado por vários investigadores. Como parte do estudo Epi LUTS, WEIN *et al* (2009) analisaram 11834 homens, dos quais 71% eram sexualmente ativos. Eles relataram que homens com vários STUI tinham disfunção erétil (DE) mais severa e distúrbios de ejaculação. Urgência com receio de perder urina foi um dos sintomas mais significantes relatados.

No presente estudo será avaliado a administração crônica do inibidor de fosfodiesterase tipo 5 (Tadalafil) e do beta 3 adrenergico seletivo (BRL 37344) isolados ou em associação em modelo experimental de hiperatividade detrusora em camundongos.

1.1- Anatomia do trato urinário inferior

O trato urinário inferior consiste da bexiga e uretra. A uretra contém o músculo liso e estriado. A bexiga é dividida em dois componentes: o corpo vesical, o qual é localizado acima dos orifícios ureterais, e a base da bexiga que consiste no trígono, junção ureterovesical , detrusor profundo e parede anterior da bexiga. A bexiga é um órgão oco de músculo liso, composto por uma membrana mucosa na sua parede interna e coberta parcialmente por peritônio seroso ou por fáscia na sua parede externa. A parede muscular da bexiga é formada por células de músculo liso, o músculo detrusor. O detrusor é funcionalmente e

estruturalmente diferente do músculo liso uretral e do trígono vesical (ANDERSSON; ARNER,2004).

As duas principais funções do trato urinário inferior, de armazenar urina e de esvaziamento durante a micção envolvem uma interação complexa entre as partes estruturais/anatômicas do trato urinário e entre os sistemas de controle nervoso. Durante a fase de armazenamento as células do músculo liso têm que relaxar, alongar e se rearranjar na parede vesical; e na fase de esvaziamento o encurtamento das fibras têm de ser realizado de forma sincronizada e rápida. Para responder ao controle nervoso e hormonal os músculos do trato urinário têm de possuir receptores para os transmissores/moduladores, liberados de nervos ou gerados localmente, e mecanismos de transmissão celular para o início das fases de contração e relaxamento vesical (ANDERSSON;ARNER,2004).

O trato urinário inferior é inervado por três tipos de nervos periféricos envolvendo os sistemas nervosos parassimpático, simpático e somático. Nervos parassimpáticos pélvicos emergem da porção sacral da medula espinhal e estimulam a bexiga e relaxam a uretra. Nervos simpáticos lombares inibem o corpo da bexiga e estimulam a base da bexiga e uretra. Nervos pudendos, os quais emergem da porção lateral da medula também conhecida com núcleo de Onuf, estimulam o esfíncter uretral externo. Estes nervos contêm axônios aferentes e eferentes. Os axônios aferentes transmitem informações do trato urinário inferior à medula lombosacral e monitoram o volume e amplitude da contração vesical através de fibras mielinizadas (A β) e não mielinizadas (C) (YOSHIMURA N;CHANCELLOR MB,2007).

1.2 Fisiologia da micção

Na fase de armazenamento, a acomodação da bexiga para volumes crescentes de urina é primeiramente um fenômeno passivo dependente das propriedades intrínsecas do músculo liso vesical e da fase de latência do eixo parassimpático. A ativação reflexa simpática contribui com um feedback negativo ou armazenamento de urina que promove fechamento do trato de saída ou inibe contrações neurais mediadas da bexiga durante o enchimento;e também pode ser ativada após distensão da bexiga por estimulação aferente. Nervos motores pudendos são ativados pela estimulação aferente (reflexo de guarda) nesta fase. A fase de armazenamento pode ser mudada para fase de esvaziamento involuntariamente (reflexo) ou voluntariamente. Neste ponto, a descarga crescente aferente por receptores de tensão na parede da bexiga inverte o padrão eferente; para estímulo dos feixes parassimpáticos e inibição dos feixes simpáticos e somáticos (YOSHIMURA N;CHANCELLOR MB,2007).

Na fase de esvaziamento, há um relaxamento inicial do esfíncter uretral seguido em alguns segundos por uma contração da bexiga, um incremento na pressão vesical e a expulsão da urina. Relaxamento do músculo liso uretral é mediado pela porção parassimpática à uretra através da liberação de óxido nítrico, um transmissor inibitório (YOSHIMURA N;CHANCELLOR MB,2007).

1.2.1 Mecanismos colinérgicos

Na maioria das espécies animais, a contração da bexiga é mediada por ambos mecanismos colinérgicos e não adrenérgicos não colinérgicos (TAIRA,1972). Em músculo detrussor isolado de porcos e coelhos já foi demonstrado que a acetilcolina despolarizava, aumentava a frequência dos potenciais de ação, e contraía o músculo. Também no músculo detrussor isolado em humanos era contraído pela acetilcolina, sendo estimulado por inibidores de colinesterase e abolidos pela atropina, portanto mediados pela estimulação de receptores muscarínicos (CREED *et al* ,1981)..

O músculo liso detrussor de várias espécies contém receptores muscarínicos dos subtipos M2 e M3 (CHESS-WILLIAMS,2002). Na bexiga humana, a ocorrência de mRNAs de todos os subtipos de receptores muscarínicos tem sido demonstrados com a predominância dos mRNAs dos receptores M2 e M3 (SIGALA *et al*,2002). Receptores muscarínicos são acoplados a proteínas G, mas a transdução do sinal varia (CAULFIELD; BIRDSALL,1998). M1,M3 e M5 acoplam preferencialmente com Gq/11 ativando a hidrólise do fosfatidil inositol, levando a mobilização de cálcio. Já M2 e M4 acoplam com a proteína Gi/0 resultando na inibição da atividade da adenil ciclase. Existe uma concordância que os receptores M3 são os principais responsáveis pela contração detrusora na micção normal (CHESS-WILLIAMS,2002; CHOPPIN,2002). Mesmo na bexiga de rato obstruída, os receptores M3 determinaram um papel importante na contração detrusora (KRICHEVSKY *et al*,1999). O papel funcional do receptor M2 no detrussor normal é menos claro. Em ratos com deficiência de receptor M3, receptores M2 mediarão apenas 5% da resposta ao carbacol (MATSUI M *et al*,2002;STENGEL *et al*,2002). Contudo, em certos estados de doença, os receptores M2 podem contribuir para contração da bexiga. Já foi observado em ratos desnervados, contração detrussora mediada por receptores M2 isoladamente ou em combinação com M3 (BRAVERMAN *et al* ,1998).

Como indicado acima, a função receptora muscarínica pode se alterar em diferentes desordens urológicas, como obstrução urinária, bexiga neurogênica, hiperatividade

detrussora e diabetes. Porém não é claro o que as mudanças significam em termo de mudança na função detrussora (ANDERSSON; ARNER, 2004).

1.2.2 Mecanismos Adrenérgicos

Estudos iniciais mostravam que no detrusor da maioria das espécies receptores beta 2 adrenérgicos predominavam (ANDERSSON,1993), mas no detrusor do porco de guine ,o qual contém ambos receptores beta 1 (β 1-ARs) e receptores beta 2 (β 2-ARs), o efeito relaxante era mediado principalmente por β 1-ARs (LI ;YASSAY;KAU ,1992). No detrusor humano, os receptores beta adrenérgicos (β -ARs) não tinham características funcionais de β 1 ou β 2-ARs, pois eles podiam ser bloqueados por propranolol, mas não por practolol (β 1-ARs) ou butoxamine (β 2-ARs) (LARSEN,1979). Com a utilização de diferentes métodos, incluindo RT-PCR, sequenciamento do PCR, hibridização *in situ*, e contrações isométricas *in vitro* , vários pesquisadores têm demonstrado que o detrusor humano expressa β 1-ARs, β 2-ARs, assim como receptores beta 3 adrenérgicos (β 3-ARs). Devido aos agonistas β 3-ARs efetivamente relaxarem o músculo detrusor humano (IGAWA *et al*, 2001; YAMAGUCHI,2002), isto pode significar que o mais importante receptor beta adrenérgico para relaxamento vesical é o β 3-AR, pelo menos em humanos. Isto pode explicar porque os efeitos clinicos dos agonistas β 2-AR em hiperatividade detrussora são controversos e inconclusivos (ANDERSSON *et al*,2002).

β 3-ARs têm sido demonstrados também no detrusor de várias espécies animais (TAKEDA *et al* ,2000;YAMANISHI *et al* ,2002;YAMAZAKI *et al*,1998). Em vários estudos a resposta relaxante de bexiga de ratos a isoprenalina e outros agonistas β -AR é mediada por ambos β 2 e β 3-ARs (TAKEDA *et al*,2000;WOODS *et al*,2001; YAMAZAKI *et al*,1998). Além disso, mRNAs de β 1, β 2 e β 3-ARs têm sido detectados em bexiga de ratos utilizando RT-PCR (SEGUCHI *et al*,1998). β 3-ARs tem mostrado efeito relaxante *in vitro* e em modelos animais de hiperatividade detrussora (IGAWA *et al*, 2001;WOODS *et al*,2001;KAIDOH *et al*,2002; YAMANISHI *et al*,2002).

O relaxamento induzido por beta agonista é mediado pela estimulação da via da adenilato ciclase e do acúmulo da adenosina monofosfato cíclico(AMPC) (YOSHIMURA N;CHANCELLOR MB,2007). A ativação dos β 3- AR relaxa o detrusor, melhorando a complacência vesical e portanto aumentando a capacidade vesical, sem mudança na pressão de micção e no resíduo pós miccional, portanto o agonista beta 3 adrenérgico seletivo atua na

atividade de contratilidade espontânea a qual ocorre durante o enchimento vesical, enquanto a contração de micção que depende da descarga parassimpática da medula sacral não é afetada (ANDERSSON,2013).

1.2.3 Mecanismos não adrenérgicos não colinérgicos

O óxido nítrico é um neurotransmissor formado a partir da L-arginina, através de uma reação catalisada por uma família de enzimas denominadas sintase óxido nítrico (NOS). A NOS utiliza como substrato o NADPH e o oxigênio molecular (O₂) e oxida o grupo guanidina da L-arginina, em processo que consome cinco elétrons e resulta na formação do NO com quantidade estequiométrica de L-citrulina (MONCADA *et al.*, 1991).

Existem três isoformas de NOS, denominadas de endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) cada qual codificada por diferentes genes (STUEHR *et al.*, 2004). Tanto a eNOS como a nNOS são denominadas de NOS constitutivas (cNOS), pois estão normalmente expressas nas células e atuam de modo dependente de cálcio e calmodulina para sua ação. O NO formado através da eNOS regula o tônus vascular, previne a adesão dos leucócitos e das plaquetas, enquanto que o NO formado a partir da nNOS atua como neurotransmissor e/ou neuromodulador no sistema nervoso e periférico. A isoforma iNOS é expressa em diferentes tipos celulares como macrófagos, hepatócitos e músculo liso vascular; é estimulada por substâncias pró-inflamatórias, como o lipopolissacarídeo (LPS) e citocinas. Esta isoforma não é dependente de cálcio e, uma vez expressa, produz grandes quantidades de NO por longos períodos de tempo (MONCADA *et al.*, 1991). O mecanismo de ação do NO, de modo geral, envolve a sua ligação na porção heme da guanilato ciclase solúvel (sGC), induzindo uma mudança conformacional que leva a enzima a sintetizar 3',5' monofosfato guanosina cíclico (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (MONICA *et al.*, 2008).

O NO parece ser responsável pela maior parte das respostas não adrenérgicas não colinérgicas no trato urinário baixo (ANDERSSON *et al.*,1993,1995). Ambas as cNOS e a iNOS podem ser demonstradas no músculo liso do trato urinário inferior de animais e humanos (FELSEN *et al.*,2003;JOHANSSON *et al.* ,2002; LEMACK *et al.*,2000). No momento não há evidência que nNOS seja produzida por células do músculo detrussor, e em células do detrussor não estimuladas a iNOS não foi detectada (JOHANSSON *et al.*,2002).

O papel funcional do óxido nítrico no detrussor não está estabelecido. KLARSKOV (1987) reportou um relaxamento não adrenérgico não colinérgico (NANC) em

preparações de porco e músculo detrusor humano em resposta ao estímulo elétrico. Em detrusor de porcos, este relaxamento foi precedido por contração e era possível de ser bloqueado por tetrodotoxina (TTX) (bloqueador de canais de sódio). ELLIOT e CASTLEDEN (1993) não conseguiram demonstrar um relaxamento nervo-mediado em músculo detrusor humano.

A bexiga normal responde a fase de enchimento de forma fisiológica com relaxamento e acomodação de grandes volumes de urina com um mínimo aumento na pressão intravesical (COOLSAET, 1985). Têm havido muitas sugestões para explicar este mecanismo (ANDERSSON,1999). O fenômeno têm sido atribuído não somente às propriedades físicas da bexiga, mas também à existência de um mecanismo neural inibitório durante a fase de enchimento/armazenamento. Inibição da atividade nervosa parassimpática, ou um aumento da atividade nervosa simpática têm sido sugeridos, mas também envolvimento do óxido nítrico gerado na bexiga (THEOBALD, 1996). Se o óxido nítrico tem um importante papel no relaxamento detrusor, espera-se que o músculo detrusor tenha uma alta sensibilidade a agentes atuando para aumentar as concentrações de GMPc. Nitroprussiato doador de óxido nítrico (SIN-1) e óxido nítrico foram apenas moderadamente efetivos no relaxamento do músculo detrusor isolado de rato, porco e coelho, comparados aos seus efeitos no músculo uretral (PERSSON *et al*, 1992). Estes resultados concordam com o de MORITA *et al* (1992) que constataram que em coelhos o GMPc é principalmente relacionado ao relaxamento uretral e que o AMPc ao relaxamento vesical. Eles também concordam com os achados de MASUDA *et al* (2002) que demonstraram que no detrusor, em contraste com a uretra, a NOS e a sGS eram predominantemente encontradas na mucosa e não no músculo detrusor. Na bexiga humana, MOON (2002) constatou que os doadores de NO e dibutyryl GMPc induziam contração, relaxamento ou ambos. Ela sugeriu que provavelmente há uma via de sinalização NO/GMPc no detrusor humano. Isto pode envolver as células intersticiais que expressam o GMPc, as quais foram achadas no corpo da bexiga (SMET *et al*,1996).

Em conjunto, esses resultados sugerem que o NO não possui um papel direto no relaxamento da musculatura detrusora. Isto não exclui que o NO possa modular os efeitos de outros transmissores, ou que haja um papel na neurotransmissão aferente (FELSSSEN *et al*,2003;JOHANSSON *et al*,2002;LEMACK *et al*,2000).

1.3 Fisiologia da ereção

A contração e relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso são reguladas pela taxa de cálcio livre no citoplasma da célula muscular lisa. Norepinefrina dos terminais nervosos e endotelinas e prostaglandina $F2\alpha$ ($PF2\alpha$) do endotélio ativam receptores nas células musculares lisas para aumentar fosfatidil inositol e diacilglicerol, resultando na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, ou abertura dos canais de cálcio na membrana plasmática da célula muscular lisa, aumentando o influxo de cálcio o qual se acopla a calmodulina e permite a interação com cadeia leve de miosina quinase, acoplamento às cadeias de actina com conseqüente contração da célula muscular lisa. No relaxamento do músculo, há um decréscimo de cálcio livre no citoplasma, dissociação da calmodulina da miosina quinase e desfosforilação da miosina, promovendo o desacoplamento com os filamentos de actina. O AMPc e o GMPc são os segundos mensageiros envolvidos no relaxamento do músculo liso. Eles ativam as proteino quinases dependentes de AMPc e GMPc, as quais fosforilam certas proteínas e canais iônicos, resultando em (1) abertura de canais de potássio e hiperpolarização, (2) sequestro do cálcio intracelular para o retículo endoplasmático e (3) inibição dos canais de cálcio voltagem dependentes, bloqueando o influxo de cálcio. A conseqüência é a queda do cálcio livre citosólico e relaxamento do músculo liso (LUE,2007).

Moléculas de sinalização na via do AMPc (adenosina, peptídeo ligado ao gene da calcitonina, prostaglandinas e peptídeo vasoativo intestinal)ligam-se e ativam receptores de membrana citoplasmática específicos, os quais acoplados às proteínas G, ativam adenil ciclases a produzir AMPc. A proteino quinase A (PKA) é o principal receptor do AMPc e ele media a grande maioria dos efeitos celulares do AMPc, fosforilando alvos nos compartimentos citoplasmáticos e nucleares (LUE,2007).

O óxido nítrico é gerado pelas enzimas de sintase endotelial, através da conversão de L-arginine e oxigênio em L-citruline e NO; e neuronal. A liberação de óxido nítrico estimula a guanilato ciclase a produzir GMPc o qual regula a fosforilação de proteínas, notavelmente a dependente proteino quinase G(PK-G), condutividade dos canais iônicos, e atividade das fosfodiesterases. A sinalização é modulada em parte pela inativação do GMPc pelas fosfodiesterases(ANDERSSON *et al*,2007).

Fosfodiesterases são enzimas que metabolizam as moléculas do segundo mensageiro AMPc e GMPc. São geradas a partir de 21 genes em mamíferos e divididos em

11 famílias baseados nas suas seqüências proteicas, catalíticas e sensibilidade a inibidores, tal como sua afinidade ao AMPc e GMPc (ANDERSSON,2011).

Fosfodiesterases tipo 1, 2, 3, 10 e 11 hidrolisam ambos AMPc e GMPc. Fosfodiesterases tipo 4, 7, e 8 hidrolisam AMPc. Fosfodiesterases tipo 5, 6 e 9 são específicos para GMPc. Entretanto existe ampla evidência que a fosfodiesterase tipo 5 é de longe a principal fosfodiesterase na finalização da via GMPc, sendo a inibição da fosfodiesterase tipo 5 evidenciada como altamente efetivo no tratamento da disfunção erétil (LUE,2007).

1.4 Fisiopatologia dos STUI e disfunção erétil

Ereção é um fenômeno neurovascular e tecidual sob controle hormonal. Isto inclui dilatação arterial, relaxamento do músculo liso trabecular, e ativação do mecanismo veno-oclusivo do corpo cavernoso (GRATZKE *et al* ,2010).

Disfunção erétil (DE) é definida como a inability de obter ou manter uma ereção suficiente de permitir uma performance sexual satisfatória. Embora considerada um distúrbio benigno, ela pode afetar a saúde física e psicossocial e ter um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes e de seus parceiros (FELDMAN; GOLDSTEIN; HATZICHRISTOU,1994).

Dados de estudos epidemiológicos têm mostrado uma evidência consistente da associação entre STUI/HPB e disfunção sexual em homens mais velhos independente dos efeitos da idade, outras comorbidades, estilo de vida (SEFTEL *et al* ,2013).

A fisiopatologia dos STUI e disfunção erétil (DE) é complexa e multifatorial, e envolve os seguintes aspectos:

- 1. Redução da atividade da via óxido nítrico-guanosina de monofosfato cíclico (NO-GMPc):** O NO ativa a enzima guanilato ciclase, a qual induz a produção de GMPc a partir de guanosino trifosfato(GTP). O GMPc atua como segundo mensageiro em proteino kinases, causando diminuição do cálcio intracelular e dissociação de fibras de actina e miosina, levando ao relaxamento da musculatura lisa e a sua deleção pode estar relacionada aos STUI (ANDERSSON *et al*,2011). Na musculatura detrusora, sua função ainda não está estabelecida, mas estudos experimentais com inibição da síntese de NO resultaram em aumento da atividade vesical *in vivo* (GACCI *et al*,2010).

2. **Aumento da atividade Rho-Kinase:** O relaxamento prejudicado da musculatura lisa em bexiga, colo vesical, próstata, uretra e pênis, com conseqüente obstrução infra-vesical e ereção prejudicada, tem sido atribuídos, em parte, ao aumento da atividade do complexo Rho-Kinase, que promove a contração muscular ao modular a atividade da enzima miosina fosfatase (MORELLI *et al*,2009).
3. **Hiperatividade do sistema nervoso autônomo:** A hiperatividade simpática pode contribuir para piora dos STUI em homens com HPB. MCVARY *et al* (2005) demonstraram que a atividade do sistema nervoso autônomo, medido por testes fisiológicos, em plasma e catecolaminas urinárias, correlaciona-se positivamente com o escore de sintomas e outras mensurações em HPB.
4. **Aterosclerose e isquemia do trato urinário inferior:** Existe uma forte associação entre HPB, STUI e fatores de risco para aterosclerose, como hipertensão, diabetes e doença cardiovascular (MEIGS *et al*,2001). Isquemia crônica pélvica foi um dos principais determinantes de mudanças funcionais e morfológicas na bexiga e próstata de modelos de ratos hipertensos. A hipótese de isquemia seria baseada na perfusão sanguínea para o trato urinário baixo sendo afetada pela contração da célula muscular lisa, diminuição da oxigenação levando a isquemia crônica do tecido do trato urinário baixo e contribuindo para os STUI (REGES *et al*,2014). Tratamento crônico com tadalafil nesse modelo foi capaz de contrapor todas alterações dos STUI, principalmente por maior perfusão e oxigenação do trato urinário inferior (MORELLI *et al*,2010,2011;GACCI *et al*,2012). A aterosclerose é fortemente associada a DE (MONTORSI *et al*,2006), e já foi demonstrado associação entre hipoperfusão de próstata e bexiga com STUI em homens (BERGER *et al* ,2005).

Enquanto a fisiopatologia dos STUI e DE é complexa e influenciada por múltiplos fatores, o aumento da atividade da via NO/GMPc/PKG pelo inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (iPDE-5) pode influenciar vários mecanismos patológicos que contribuem para os STUI, e portanto transformar-se numa abordagem inovadora no tratamento dos homens com STUI.

Adicionalmente a via do NO/GMPc tem mostrado um efeito antiproliferativo nas células do músculo liso da próstata e bexiga humanos, o que sugere que o iPDE-5, através do aumento intracelular do GMPc, pode atenuar a proliferação celular associada ao aumento da próstata e hipertrofia vesical (FILIPPI *et al*,2007).

MORELLI *et al* (2009) ao tratarem ratos hipertensos, com diminuição de intervalos de contração e capacidade vesical, com vardenafil por 2 semanas, observaram reversão dos parâmetros urodinâmicos e prevenção da ativação da via Rho-quinase, e aumento dos níveis de GMPc *in vivo* (rato) e *in vitro* de células de detrusor humano.

Não é completamente claro o papel das isoenzimas da fosfodiesterase tipo 5 na hiperatividade do sistema nervoso autônomo no trato urinário inferior, porém STUI causados por hiperatividade do sistema nervoso autônomo parecem reduzir com o tratamento com iPDE-5 (MCVARY *et al*,2005). O NO tem um efeito inibitório nos canais iônicos dos neurônios aferentes e na atividade nervosa aferente possivelmente mediado pelo GMPc (YOSHIMURA; SEKI; DE GROAT,2001). Portanto, é possível que a redução dos sintomas de armazenamento urinário por iPDE-5 sejam devidos em parte a uma maior inibição do NO na atividade nervosa aferente (ANDERSSON,2011).

Vários estudos têm sugerido que uma maior perfusão vascular no trato urinário inferior pode ter um efeito terapêutico nos STUI. Uma possibilidade seria a melhor função endotelial global aprimorar a perfusão do trato urinário inferior (BERGER *et al*,2005).

Embora o mecanismo que justifique a associação entre STUI e DE não seja totalmente compreendido, as características em comum já citadas, somadas ao fato de haver comprovação da presença das enzimas fosfodiesterases no trato urinário inferior (FIBBI *et al*,2010), podem justificar a utilização de iPDE-5, que são a terapia de primeira linha para DE, para o tratamento de STUI (ANDERSSON *et al*,2011).

O fato de a utilização do tratamento com iPDE-5 resultar em melhora significativa em parâmetros urodinâmicos de pacientes com trauma medular e hiperatividade detrusora (GACCI *et al*,2007), bem como a observação de melhora da continência em pacientes pós-prostatectomia radical (GACCI *et al*,2010) (ou seja, em pacientes sem próstata) reforçam que a bexiga pode ser um importante alvo terapêutico nos indivíduos com STUI por HPB tratados com iPDE-5 (GACCI *et al*,2012).

Em 2002, foi publicado o primeiro relato de que os iPDE-5 poderiam estar relacionados a melhora do padrão miccional em homens tratados para DE (SAIRAM *et al*,2002).

O beta 3 agonista adrenérgico estimula a produção de AMPc e os inibidores de fosfodiesterase inibem a degradação do AMPc e do GMPc, levando ao relaxamento do detrusor. Com a associação das drogas poderia haver uma potencialização deste efeito.

Como até o momento, não há um estudo experimental relacionando os iPDE-5 e beta 3 agonistas adrenérgicos em modelos de hiperatividade detrusora *in vivo*, serão avaliados neste estudo, os parâmetros urodinâmicos de camundongos com hiperatividade detrusora induzida por administração de L-NAME (N-nitro-L-arginina metil ester hidrocloreto), quando tratados com os iPDE-5 (tadalafila) e beta agonista 3 seletivo (BRL-37344).

2.OBJETIVOS

Avaliar o efeito da administração crônica do iPDE-5 Tadalafila e do beta 3 adrenergico seletivo BRL 37344 isolados em parâmetros urodinâmicos de camundongos com hiperatividade detrussora.

Analisar o efeito da associação entre o iPDE-5 Tadalafila e o beta 3 adrenergico seletivo BRL 37344 em parâmetros urodinâmicos de camundongos com hiperatividade detrussora.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos:

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará(protocolo 05/14).

3.2 Animais:

Foram randomizados 30 camundongos machos da raça *Mus Musculus* com peso entre 40-50g, distribuídos da seguinte maneira:

- Grupo Controle: 6 camundongos alimentados com ração padrão e água potável por 30 dias
- Grupo L-NAME:6 camundongos alimentados com ração padrão e L-NAME diluído na água de beber(60mg/kg) por 30 dias.
- Grupo L-NAME/Tadalafila: 6 camundongos alimentados com ração padrão e L-NAME diluído na água de beber(60mg/kg) por 30dias com administração de Tadalafil (4mg/kg) por dieta orogástrica.
- Grupo L-NAME/BRL-37344: 6 camundongos alimentados com ração padrão e L-NAME diluído na água de beber(60mg/kg)por 30dias com administração de BRL-37344(5mg/kg) por via intraperitoneal 30minutos antes do estudo urodinâmico.
- Grupo L-NAME/Tadalafila/BRL 37344: 6 camundongos alimentados com ração padrão e L-NAME diluído na água de beber(60mg/kg) por 30dias com administração de Tadalafil(4mg/kg)por dieta orogástrica; e BRL-37344(5mg/kg) por via intraperitoneal 30 minutos antes do estudo urodinâmico.

3.3 Drogas:

L-NAME

O L-NAME, por ser um potente inibidor da enzima NOS, a qual é responsável pela síntese de óxido nítrico, pela conversão de L-arginina em citrulina, é uma ferramenta farmacológica utilizada para avaliar a função do NO em diferentes sistemas do organismo. A dose administrada de L-NAME em estudo experimental na literatura, nos quais os animais ingeriam L-NAME dissolvido em água, variava de altas doses (60-250mg/kg/dia) a moderada (40-50 mg/kg/dia), por um período de tempo variando de uma a oito semanas. A partir deste

estudo, verificou-se que a dose de 60 mg/kg/dia de L-NAME diminuía acentuadamente os níveis de nitrito/nitrato (NO_x) no plasma dos animais e inibia significativamente a enzima NOS no cérebro, íleo e bexiga(MONICA *et al*,2008).

Na bexiga foi demonstrada inibição superior a 80% da NOS, significando, portanto, que a inibição da atividade da NOS e conseqüentemente da síntese de NO é quase completa (MONICA *et al*,2008). A função do L-NAME neste estudo é promover hiperatividade do detrusor nos camundongos.

Tadalafila

É um inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 5. Age provocando relaxamento do músculo liso detrusor ao inibir a degradação do GMPc e potencializar a ação do óxido nítrico. A dosagem de Tadalafil(4mg/kg) seguiu a de estudos bem desenhados na literatura(GULATI *et al*,2013) .

BRL 37344

É uma feniletalonamina [(RR + SS) - (F) -4- [2-(2- (3-clorofenil) -2-hidroxietil) amino) propil] fenoxiacetato] da família dos compostos beta3 adrenérgicos de primeira geração (WILSON *et al*, 1996). Ativa a adenil ciclase com a subseqüente formação de AMPc a qual ativa a proteína kinase A resultando em ativação dos canais de potássio ativados por cálcio, efluxo de potássio, hiperpolarização e relaxamento do músculo liso (HRISTOV *et al*,2008).

A dosagem do beta 3 adrenergico BRL-37344 (5mg/kg) seguiu a de estudos prévios na literatura(KULLMANN *et al*,2009).

MORENO *et al*(2014), em estudo prévio *in vivo* de camundongos submetidos a depleção crônica de NO, não evidenciou diferença significativa nos parâmetros urodinâmicos entre o grupo controle com diluente de tadalafila(goma xantana+ manitol) e grupo com tadalafila, portanto não houve necessidade de inclusão de um grupo controle para tadalafila no presente estudo.

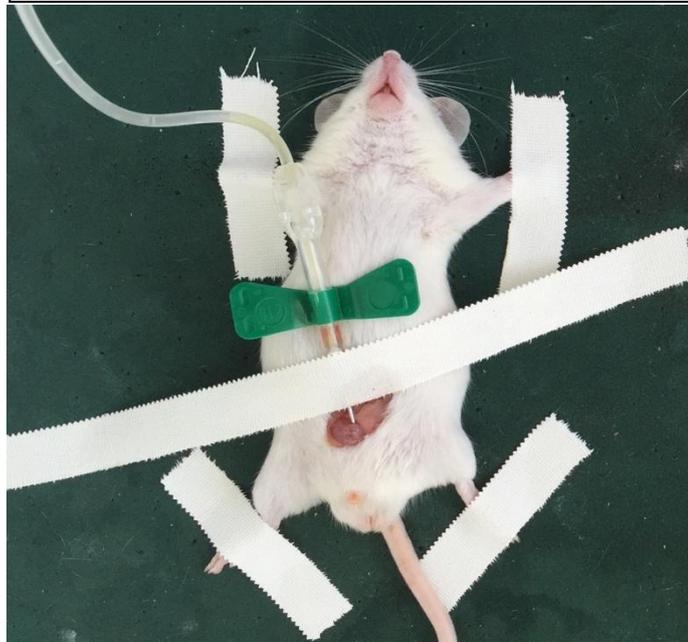
KULMANN *et al* (2009) , em estudos preliminares, havia testado BRL 37344 nas doses de 0.1,0.5,1,2,e 5mg/kg por via intraperitoneal e estabeleceu que 5mg/kg tinha um consistente e significativo efeito na frequência de micção, claramente distinto do efeito do veículo(dados analisados por um observador cego ao tratamento). Em geral, o efeito era

detectável logo após as injeções da droga e tinha duração de 4-6horas. Devido a essas particularidades, optamos pela injeção intraperitoneal de 5mg/kg BRL 37344 30minutos antes do estudo urodinâmico para 2 grupos de animais, e não houve necessidade de inclusão de um grupo controle com injeção de salina intraperitoneal.

3.4 Método Experimental:

Todos os animais foram submetidos a cistometria ao final do experimento. Para a cistometria, os animais foram anestesiados com Uretana (1,2mg/kg) e submetidos a laparotomia para exposição da bexiga e punção com butterfly 19G, que era conectado a uma bomba de infusão com salina e a um transdutor de pressão.

Figura 1-Camundongo sendo submetido a cistometria



Fonte: Autoria propria

Após punção, a bexiga foi esvaziada, e após um período de 30 minutos para equilíbrio da musculatura detrusora, iniciou-se a infusão de salina (4ml/h) e o registro da pressão vesical (Power Lab v. 5.0 System - ADInstruments, Australia) por 40 minutos. Após esse período, os animais foram sacrificados. Foi definida como hiperatividade detrusora o aumento das *Non- voiding contractions* e o aumento da frequência de micção. Portanto, no presente estudo foram avaliadas as variáveis definidas abaixo:

- *Non-voiding contractions*(NVC): número de contrações detrusoras que não resultaram em micção antes da primeira eliminação de urina

-Frequência de micção(FM): o número de ciclos de micção observados no estudo dividido pelo tempo.

A metodologia e os parâmetros utilizados seguiram modelos já descritos na literatura (ANDERSSON *et al*,2011)

3.5 Análise Estatística:

As variáveis quantitativas, contínuas e discretas, foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Como tal requisito foi observado em todos os casos, então, para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão, assim como foram empregados testes paramétricos para a análise dos dados. Comparações entre os cinco grupos de tratamento (Controle, L-NAME, L-NAME/Tadalafila, L-NAME/BRL37344 e L-NAME/Tadalafila/BRL37344) foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares.

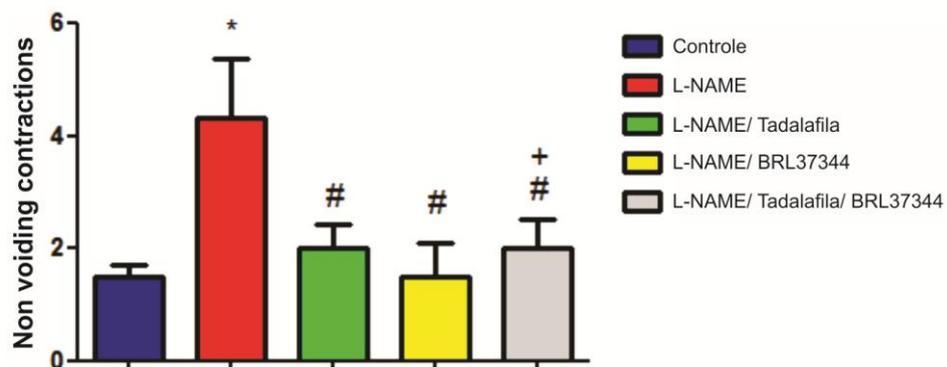
Em todas as análises, estabeleceu-se o nível de significância em 0,05 (5%), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor *P* menor que 0,05. O *software* GraphPad Prism[®] versão 5.00 para Windows[®] (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

4.RESULTADOS

4.1 *Non voiding contractions*

Constatou-se que, o número de NVC verificado no grupo L-NAME ($4,33 \pm 2,58$) foi significativamente maior que o mensurado no Grupo Controle ($1,50 \pm 0,55$) (* $P < 0,05$). Verificou-se, ainda, que o número de NVC referente aos Grupos L-NAME/Tadalafila ($2,00 \pm 1,10$), L-NAME/BRL 37344 ($1,50 \pm 1,52$) e L-NAME/Tadalafila/BRL37344 ($2,00 \pm 1,26$) foi significativamente menor que o relativo ao Grupo L-NAME ($4,33 \pm 2,58$) (# $P < 0,05$).

Figura 2 – *Non- voiding contractions* (NVC) verificado nos grupos Controle, L-NAME, L-NAME/Tadalafila, L-NAME/BRL37344 e L-NAME/Tadalafila/BRL37344. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 ratos de cada grupo. Comparações entre os cinco grupos de tratamento foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares.



* Referente à diferença significativa entre Grupo L-NAME e Grupo Controle. # Referente à diferença significativa entre os grupos L-NAME/Tadalafila, L-NAME/BRL 37344 e L-NAME/Tadalafila/BRL 37344 com o Grupo L-NAME. +Os Grupos L-NAME/Tadalafila e L-NAME/BRL 37344 são semelhantes ao Grupo L-NAME/Tadalafila/BRL 37344; $p=0,03$

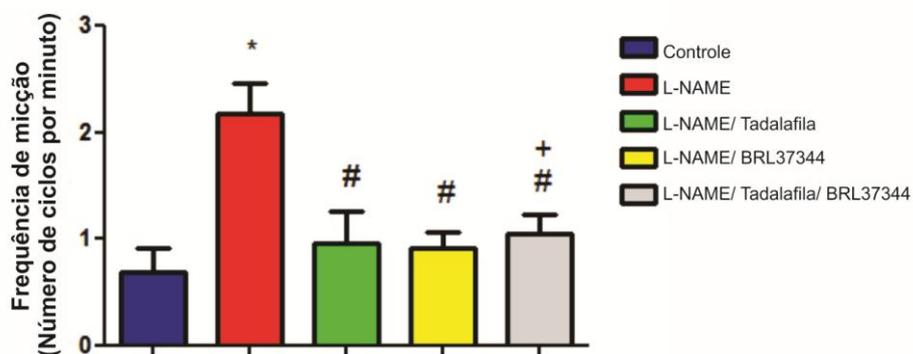
Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos L-NAME /Tadalafila ($2,00 \pm 1,10$) e L-NAME /BRL 373344 ($1,50 \pm 1,52$) ($P > 0,05$), e destes grupos com o grupo L-NAME/Tadalafila/BRL 37344 ($2,00 \pm 1,26$) ($+ P > 0,05$).

Tabela 1- <i>Non-voiding contractions</i> : Comparações dos grupos aos pares pelo Teste de Tukey			
<i>Non-voiding contractions</i>			
ANOVA: F = 3,4738; P = 0,0218			
Teste de comparações múltiplas de Tukey			
Comparação	Diferença de médias	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significância
Controle vs L-NAME	-2,83	-5,47 a -0,20	P < 0,05
Controle vs L-NAME/Tadalafila	-0,50	-3,14 a 2,14	P > 0,05
Controle vs L-NAME/BRL37344	0,00	-2,64 a 2,64	P > 0,05
Controle vs L-NAME+Tadalafila/BRL37344	-0,50	-3,14 a 2,14	P > 0,05
L-NAME vs L-NAME/Tadalafila	2,33	-0,30 a 4,97	P < 0,05
L-NAME vs L-NAME/BRL37344	2,83	0,20 a 5,47	P < 0,05
L-NAME vs L-NAME/Tadalafila/BRL37344	2,33	-0,30 a 4,97	P < 0,05
L-NAME/Tadalafila vs L-NAME/BRL37344	L- 0,50	-1,456 a 2,456	P > 0,05
L-NAME/Tadalafila vs L-NAME/Tadalafila/BRL37344	L- 0,00	-1,956 a 1,956	P > 0,05
L-NAME/BRL37344 vs L-NAME/Tadalafila/BRL37344	L- -0,50	-2,456 a 1,456	P > 0,05

4.2 Freqüência de micção

Constatou-se que, a freqüência de micção verificada no Grupo L-NAME ($2,18 \pm 0,68$) foi significativamente maior que a mensurada no Grupo Controle ($0,69 \pm 0,56$) (* $P < 0,001$). Verificou-se, ainda, que a freqüência de micção referente aos Grupos L-NAME/Tadalafila ($0,97 \pm 0,61$) (# $P < 0,01$), L-NAME/BRL37344 ($0,92 \pm 0,38$) (# $P < 0,01$) e L-NAME/Tadalafila/BRL37344 ($1,05 \pm 0,44$) (# $P < 0,05$) foi significativamente menor que a relativa ao Grupo L-NAME ($2,18 \pm 0,68$).

Figura 3 – Freqüência de micção, expressa como o número de ciclos de micção por minuto, verificada nos grupos Controle, L-NAME, L-NAME/Tadalafila, L-NAME/BRL37344 e L-NAME/Tadalafila/BRL37344. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 ratos de cada grupo. Comparações entre os cinco grupos de tratamento foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares



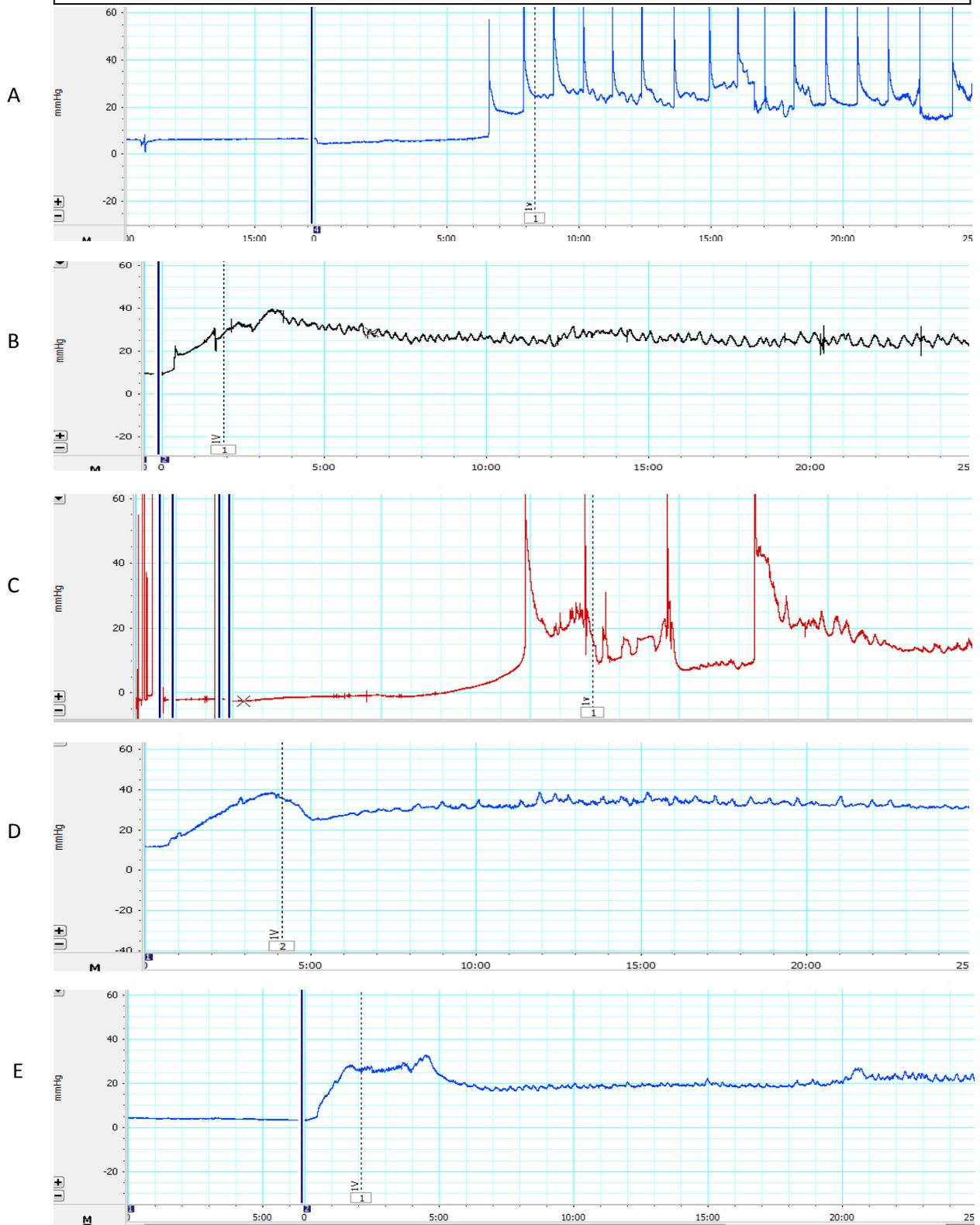
* Referente à diferença significativa entre Grupo L-NAME e Grupo Controle. # Referente à diferença significativa entre os grupos L-NAME/Tadalafila, L-NAME/BRL 37344 e L-NAME/Tadalafila/BRL 37344 com o Grupo L-NAME. + Os Grupos L-NAME/Tadalafila e L-NAME/BRL 37344 são semelhantes ao Grupo L-NAME/Tadalafila/BRL 37344; $p=0,001$

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos L-NAME + Tadalafila ($0,97 \pm 0,61$) e L-NAME +BRL 373344 ($0,92 \pm 0,38$) ($P > 0,05$), e destes grupos com o grupo L-NAME+Tadalafila+ BRL 37344 ($1,05 \pm 0,44$) ($+ P > 0,05$).

Tabela 2- Frequência de micção: Comparações dos grupos aos pares pelo Teste de Tukey

Frequência de micção			
ANOVA: F = 6,3183; P = 0,0012			
Teste de comparações múltiplas de Tukey			
Comparação	Diferença de médias	Intervalo de confiança de 95% da diferença	Significância
Controle vs L-NAME	-1,49	-2,45 a -0,52	P < 0,01
Controle vs L-NAME+Tadalafila	-0,27	-1,24 a 0,69	P > 0,05
Controle vs L-NAME+BRL37344	-0,22	-1,19 a 0,74	P > 0,05
Controle vs L-NAME+Tadalafila+BRL37344	-0,35	-1,32 a 0,61	P > 0,05
L-NAME vs L-NAME+Tadalafila	1,21	0,25 a 2,18	P < 0,01
L-NAME vs L-NAME+BRL37344	1,26	0,30 a 2,23	P < 0,01
L-NAME vs L-NAME+Tadalafila+BRL37344	1,13	0,17 a 2,10	P < 0,05
L-NAME+Tadalafila vs L-NAME+BRL37344	0,05	-0,92 a 1,02	P > 0,05
L-NAME+Tadalafila vs L-NAME+Tadalafila+BRL37344	-0,08	-1,05 a 0,89	P > 0,05
L-NAME+BRL37344 vs L-NAME+Tadalafila+BRL37344	-0,13	-1,10 a 0,84	P > 0,05

Figura 4- Cistometrias dos 5 grupos analisados. Em ordem, grupo Controle(A), L-NAME(B), L-NAME/Tadalafila(C), L-NAME/BRL 37344(D), L-NAME/Tadalafila/ BRL 37344(E). Setas indicam picos de pressão



Fonte: A autoria própria

Comparações múltiplas pelo teste de Tukey demonstram a diferença estatística entre os grupos nas variáveis analisadas.

Tabela 3 – Parâmetros cistométricos avaliados nos grupos Controle, L-NAME, L-NAME+Tadalafila, L-NAME+BRL37344 e L-NAME+Tadalafila+BRL37344. Dados correspondem às medições efetuadas em 6 ratos em cada grupo. Comparações entre os cinco grupos foram feitas por meio da análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares.

Parâmetro	Número de contrações não inibidas	Frequência de micção (micções/min)
Controle Média ± DP	1,50 ± 0,55	0,69 ± 0,56
L-NAME Média ± DP	4,33 ± 2,58 ^a	2,18 ± 0,68 ^b
L-NAME+ Tadalafila Média ± DP	2,00 ± 1,10	0,97 ± 0,71 ^d
L-NAME+ BRL37344 Média ± DP	1,50 ± 1,52 ^c	0,92 ± 0,38 ^d
L-NAME+ Tadalafila+ BRL37344 Média ± DP	2,00 ± 1,26	1,05 ± 0,44 ^c
Significância (ANOVA)	P = 0,0218	P = 0,0012

DP: desvio padrão. ANOVA: Análise de variância. As letras ^a(P < 0,05) e ^b(P < 0,01) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Controle enquanto as letras ^c(P<0,05) e ^d(P<0,01) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo L-NAME (teste de Tukey).

5.DISCUSSÃO

Nesse estudo, houve aumento das *non voiding contractions* e frequência de micção no grupo L-NAME em relação ao grupo Controle. A concentração do GMPc, segundo mensageiro envolvido no relaxamento do músculo liso detrusor, é diminuída após administração de L-NAME devido à depleção do NO. Este seria o principal mecanismo para explicar a hiperatividade detrusora causada por L-NAME no presente estudo.

Em estudo anterior, já havia sido demonstrado que a inibição crônica de NO secundária a administração de L-NAME levou à redução da resposta relaxante mediada por agonista beta 3 adrenergico e aumento da sensibilidade a agonistas muscarínicos, culminando com um quadro de hiperatividade detrusora (MONICA *et al*, 2008).

Num estudo experimental *in vivo*, a administração de L-NAME causou hiperatividade detrusora na cistometria (REGES *et al*, 2013)

Houve menor número de *non voiding contractions* e frequência de micção no Grupo Tadalafila em relação ao grupo L-NAME isolado. O balanço da formação do GMPc se dá pela estimulação do NO e inibição da degradação pela fosfodiesterase. Apesar do L-NAME depletar o NO, a Tadalafila inibindo a fosfodiesterase, contrabalança a formação de GMPc, resultando em relaxamento do músculo liso detrusor.

REGES *et al* (2013) constatou que a sildenafil promovia a diminuição do número dos ciclos de micção e da amplitude das contrações em modelo experimental de ratos com restrição de NO após administração de L-NAME, assemelhando-se com os resultados observados pela tadalafila no estudo *in vivo*.

Em ratos com obstrução infravesical induzida por deficiência crônica de óxido nítrico, a tadalafila não causou dano ao músculo detrusor e pareceu ter um efeito aditivo à tansulosina (REGADAS *et al*, 2014).

MORENO *et al* (2014) analisou parâmetros cistométricos de camundongos em modelo experimental de hiperatividade detrusora secundária a depleção crônica de óxido nítrico, não encontrando diferença significativa entre os grupos tratados com Sildenafil, Vardenafil e Tadalafil, mas demonstrando eficácia das drogas na proteção dos animais à ação deletéria vesical decorrente da exposição a L-NAME, evidenciando que os resultados observados aqui eram independentes da droga.

CARVALHO *et al* (2015) em estudo com camundongos em castração hormonal e administração diária de tadalafila, num modelo experimental de hiperatividade detrusora secundária a depleção crônica de óxido nítrico, constatou a mesma eficácia da Tadalafila e castração em reduzir a hiperatividade detrusora e relaxar a uretra além de sugerir uma via alternativa andrógeno-dependente relacionada com contração e relaxamento do músculo liso.

O BRL 37344, administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes do estudo urodinâmico na dose de 5mg/kg associado a L-NAME na água de beber para camundongos, demonstrou melhora significativa nas *non voiding contractions* e na frequência de micção em relação ao grupo L-NAME isolado. Isto poderia ser explicado pela estimulação da formação de AMPc pelos beta agonistas via adenilato ciclase.

Os efeitos *in vivo* dos β 3-AR têm sido estudados em diversos modelos animais .FUJIMURA *et al* (1999), utilizando modelo de ratos conscientes com hiperatividade detrusora induzida por injeção de ácido ibutérico, testou a administração oral de agonista β 3 adrenérgico FK-175 na dose de 10mg/kg e observou capacidade vesical significativamente aumentada ,sem aumento na pressão de micção ou limiar de pressão. Da mesma forma a cistometria em ratos após administração intravenosa de CL316243, um outro agonista β 3 adrenérgico, aumentou a capacidade vesical , sem aumento no volume residual (TAKEDA *et al*,2000). No presente estudo, definimos outros parâmetros a serem estudados: a frequência de micção e as *non voiding contractions*.

Como Kullmann *et al* (2009) já havia evidenciado que BRL 37344 (5mg/kg) injetado por via intraperitoneal em ratos acordados ovariectomizados diminuía a frequência de micção em 40-70%, permitiu a utilização desta via para coleta dos dados e confirmação dos resultados no presente estudo.

WOODS *et al* (2001) demonstrou que o CL316243, um agonista beta 3 adrenérgico inibia a contratilidade de células musculares lisas em tiras isoladas de detrusor de ratos despolarizados

KAIDOH *et al* (2002) evidenciou que o CL316243 suprimia a hiperatividade detrusora, sem aumento do resíduo pós miccional e efeitos adversos cardiovasculares significantes em ratos com infarto cerebral.

IGAWA *et al* (2001) demonstrou o efeito relaxante dos agonistas beta adrenérgicos em estudos *in vitro* de detrusor humano de pacientes com ou sem bexiga neurogênica.

Em 3 ensaios clínicos de Fase III , a administração de Mirabegron (agonista beta 3 adrenergico) nas doses de 25, 50 e 100mg demonstrou eficácia significativa no tratamento dos sintomas de pacientes com bexiga hiperativa, incluindo frequência miccional, urge-incontinência, e urgência(LUCAS *et al*,2012)

KHULLAR *et al* (2013) comprovou melhora semelhante do Mirabegron nos episódios de incontinência e frequência de micção em pacientes com ou sem terapia antimuscarínica prévia para bexiga hiperativa, a partir de uma análise *post-hoc* dos ensaios clínicos de Fase III conduzidos na Europa e Austrália.

Houve melhora significativa das *non voiding contractions* e da frequência de micção com a associação de BRL 37344 e tadalafila em relação ao grupo LNAME isolado.

Não há estudos em modelo experimental ou clínicos de hiperatividade detrusora analisando o efeito da associação destas duas drogas nos parâmetros urodinâmicos.

No presente estudo não foi observado melhora dos parâmetros urodinâmicos com a associação de BRL 37344 e Tadalafil, em relação ao grupo com BRL 37344 ou grupo com Tadalafil isolados. A hipótese inicial do estudo seria que a estimulação da formação do AMPc induzida pelo beta agonista teria um efeito aditivo na inibição da degradação do GMPc pela tadalafila, o que surpreendentemente não aconteceu neste estudo.

Recentemente, combinações de drogas para o tratamento de STUI/HPB têm sido estabelecidas como padrão para um subtipo de pacientes. Esta estratégia tem sido usada na prática clínica após a publicação dos estudos MTOPS e COMBAT, em que a combinação de alfa bloqueadores e inibidores da 5 alfa redutase tornou-se a terapia padrão para homens com risco de progressão clínica da HPB(MCCONNELL *et al*,2003;ROEHRBORN *et al*,2010).

Seguindo a mesma estratégia, a combinação de drogas pode ser benéfica para homens com STUI misto. A terapia com alfa bloqueador e antimuscarínico poderia ser utilizada para homens com STUI de armazenamento, apesar do tratamento com alfa bloqueador,ou como tratamento inicial para homens com STUI misto com sintomas moderados a severos de armazenamento(OELKE *et al*,2013;FULLHASE *et al*,2013).

Em estudo randomizado de fase II a combinação de solifenacina e tamsulosina mostrou-se mais eficaz em homens com sintomas moderados a severos de armazenamento. Aumento do resíduo pós miccional não foi clinicamente relevante e não foi acompanhado de incidência de retenção urinária aguda (VAN KERREBROECK *et al*, 2013)

Em ratos com obstrução infravesical induzida por deficiência crônica de óxido nítrico, a tadalafila não causou dano ao músculo detrusor e pareceu ter um efeito aditivo à tamsulosina (REGADAS *et al*, 2014).

REGADAS *et al* (2013) pela primeira vez avaliou os efeitos urodinâmicos no tratamento de pacientes com STUI/HPB por 30 dias com tamsulosina 0,4 mg com ou sem tadalafila 5mg. Foi o primeiro ensaio clínico baseado num estudo urodinâmico a demonstrar que a tadalafila reduzia a pressão detrusora no fluxo máximo e melhorava os STUI sem alterar significativamente o fluxo máximo.

Em estudos em bexiga de porcos, a frequência da atividade fásica é diminuída após estímulo para a formação de AMPc por beta agonistas, e a degradação do AMPc intracelular parece envolver primariamente a fosfodiesterase tipo 4. Portanto, um β -agonista seletivo e um inibidor de fosfodiesterase seletivo parecem formar uma excelente combinação para o relaxamento do detrusor no futuro (YOSHIMURA N; CHANCELLOR MB, 2007).

Utilização de combinações de drogas parece ser uma tendência a fim de tratar de forma mais ampla os pacientes com LUTS/HPB (OELKE *et al*, 2013).

No presente trabalho, a principal limitação encontrada foi com o número de animais restrito pelo Comitê de ética para obtenção de uma estatística confiável, assim como uma dose única de beta-adrenérgico, sempre obedecendo um modelo ético de manipulação e sacrifício dos mesmos. Poderia ter sido mostrado diferença com um maior número de animais.

Os receptores beta 3 adrenérgicos localizados no urotélio parecem contribuir para regulação da função vesical, porém seu papel biológico molecular ainda não foi elucidado, portanto estudos futuros avaliando sua função no urotélio podem explicar mecanismos de relaxamento e contração vesical envolvendo beta adrenérgico (OTSUKA *et al*, 2008).

Espera-se despertar interesse para novos estudos com esta combinação de drogas. Estudos experimentais *in vitro*, com doses escalonadas são mais factíveis de serem realizados,

a partir do pressuposto de poderem ser utilizados mais de um fragmento de bexiga por camundongo, e assim mostrar diferença com esta associação. Posteriormente estudos clínicos *in vitro*, através da análise de fragmentos de bexiga ressecados em cirurgias prévias, podem confirmar os achados. Com isso pode-se contribuir futuramente com uma abordagem mais individualizada dos pacientes com bexiga hiperativa.

6.CONCLUSÕES

Tadalafil e BRL 37344 promoveram efeito relaxante do detrusor com melhora da hiperatividade detrusora dos camundongos

Não houve sinergismo do efeito relaxante do detrusor com a associação das drogas.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-AZIZ, K.F.;LEMACK, G.E.Overactive bladder in the male patient:bladder,outlet,or both?**Curr Urol Rep**,v.3,p.445-451,2002
- ABRAMS, P;CARDOZO, L;FALL ,M,*et al*.The standardisation of terminology of lower urinary tract function:report from the Standardisation Sub-comitee of the International Continence Society.**Neurourol Urodyn**,v.21,n.2,p.167-178,2002
- ABRAMS, P;ANDERSSON ,K.E.Muscarinic receptor antagonists for overactive bladder.**BJU Int**,v.100,p.987-1006,2007
- ANDERSSON, K.E.Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues.**Pharmacol Rev**,v.45,p.253-308,1993
- ANDERSSON, K.E.;PERSSON ,K.Nitric oxide synthase and the lower urinary tract:possible implications for physiology and pathophysiology.**Scand J Urol Nephrol Suppl**,v.175,p.43-53,1995
- ANDERSSON, K.E.Advances in the pharmacological control of the bladder.**Exp Physiol**,v.84, p.195-213, 1999
- ANDERSSON, K.E.;APPELL, R.;AWAD, S.,*et al*.Pharmacological treatment of urinary incontinence .**In:Incontinence,Second International Consultation on Incontinence**,p. 479-511,2002
- ANDERSSON, K.E.Storage and voiding symptoms: Pathophysiologic aspects.**Urology**, v.62, p.3-10, 2003.
- ANDERSSON, K.E.;ARNER, A.Urinary bladder contraction and relaxation:physiology and pathophysiology.**Physiol Rev**, v. 84, p. 935-986, 2004
- ANDERSSON, K.E.;UCKERT, S.;STIEF, C.,*et al*.Phosphodiesterases(PDES) and PDE inhibitors for treatment of LUTS.**Neurourol Urodyn**, v.26, p. 928-933, 2007
- ANDERSSON, K.E.;GROAT, W.C;MCVARY, K.T,*et al*.Tadalafil for the treatment of lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia:pathophysiology and mechanism(s) of action.**Neurourology Urodyn**, v.30, p.292-301, 2011
- ANDERSSON, K.E.New developments in the management of overactive bladder: focus on mirabegron and onabotulinumtoxinA. **Ther Clin Risk Manag**, v.9, p.161-170, 2013
- BERGER, A.P;DEIBL, M.;LEONHARTSBERGER, N.,*et al*.Vascular damage as a risk factor for benign prostatic hyperplasia and erectile dysfunction.**BJU Int**, v.96, p.1073-1078, 2005
- BRAVERMAN, A.S.;LUTHIN, G.R.;RUGGIERI, M.R.M2 muscarinic receptor contributes to contraction of the denervated rat urinary bladder.**Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 275, p. R1654-R1660, 1998

CALLAHAN, S.M.;CREED, K.E.Electrical and mechanical activity of the isolated lower urinary tract of guinea-pig.**Br J Pharmacol**, v.74, p.353-358, 1981

CARVALHO,R.F. **Efeitos cistométricos da castração hormonal e administração diária de tadalafila em camundongos com hiperatividade detrusora induzida pela deficiência crônica de óxido nítrico** .Tese de Mestrado em Ciências Médico Cirúrgicas.Universidade Federal do Ceará.Fortaleza,2015

CAULFIELD, M.P,BIRDSALL, N.J. International Union of Pharmacology.XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacol Rev** , v.50, p.203-220, 1998.

CHAPPLE, C.R;ROEHRBORN, C.G.A shifted paradigm for the further understanding,evaluation,and treatment of lower urinary tract symptoms in men:focus on the bladder.**Eur Urol**, v.49, p.651-658, 2006

CHAPPLE, C.R.;KHULLAR, V.;GABRIEL, Z,*et al*.The effects of antimuscarinic treatments in overactive bladder:an update of systematic review and meta-analysis.**Eur Urol**, v.54, p.543-562, 2008

CHESS-WILLIAMS, R.Muscarinic receptors of the urinary bladder:detrusor,urothelial and prejunctional.**Auton Autacoid Pharmacol**, v.22, p.133-145, 2002

CHOPPIN, A.Muscarinic receptors in isolated urinary bladder smooth muscle from different mouse strains.**Br J Pharmacol**, v.137, p.522-528, 2002

COOLSAET, B.L.Bladder compliance and detrusor activity during the collection phase.**Neurourol Urodyn**, v.4, p.263-273, 1985

CREED, K.E.Membrane properties of the smooth muscle membrane of the guinea-pig urinary bladder.**Pflügers Arch**, v.326, p.115-126, 1971

ELLIOT, R.A.;CASTLEDEN, C.M.Nerve mediated relaxation in human detrusor muscle.**Br J Clin Pharmacol**, v.36, p.479,1993

FELDMAN, H.A;GOLDSTEIN, I.;HATZICHRISTOU, D.G.,*et al*.Impotence and its medical and psychosocial correlates:results of the Massachussets Male Aging Study.**J Urol**, v.151, n.1, p.54-61, 1994

FELSEN, D.;DARDASHTI, K.;OSTAD, M.,*et al*.Inducible nitric oxide synthase promotes pathophysiological consequences of experimental bladder outlet obstruction.**J Urol**, v.169, p.1569-1572, 2003

FIBBI, B.; MORELLI, A.;VIGNOZZI, L., *et al*. Characterization of phosphodiesterase type 5 expression and functional activity in the human male lower urinary tract. **J Sex Med**, v.7, p.59-69,2010

FILIPPI, S.;MORELLI, A.;SANDNER, P.,*et al*.Characterization and functional role of androgen-dependent PDE5 activity in the bladder.**Endocrinology**, v.148, p.1019-1029, 2007

FULLHASE, C.;CHAPPLE, C.;CORNU, J.N.,*et al.*Systematic review of combination drug therapy for non-neurogenic male lower urinary tract symptoms.**Eur Urol**, v.64, p.228-243, 2013

FUJIMURA, T.;TAMURA, K.;TSUTSUMI, T., *et al.* Expression and possible functional role of the beta 3-adrenoceptor subtypes in human and rat detrusor muscle. **J Urol**, v.161, p.680-685, 1999

GACCI, M.; DEL POPOLO, G.; MACCHIARELLA, A., *et al.* Vardenafil improves urodynamic parameters in men with spinal cord injury: results from a single dose, pilot study. **J Urol** , v.178, p.2040-2043, 2007

GACCI, M, IERARDI, A, ROSE, A.D., *et al.* Vardenafil can improve continence recovery after bilateral nerve sparing prostatectomy: results of a randomized, double blind, placebo-controlled pilot study. **J Sex Med**, v.7, p.234-243, 2010.

GACCI, M.; GIOVANNI, C.; MATTEO, S., *et al.* A Systematic Review and Meta-analysis on the Use of Phosphodiesterase 5 Inhibitors Alone or in Combination with α -Blockers for Lower Urinary Tract Symptoms Due to Benign Prostatic Hyperplasia. **European Urology**, v.61, p.994-1003, 2012

GILLESPIE, J.L.Noradrenalin inhibits autonomous activity in isolated guinea pig bladder.**BJU Int**, v.93,n.3, p.401-409, 2004.

GULATI,P.;SINGH,N.Neuroprotective effect of tadalafil,a PDE-5 inhibitor, and its modulation by L-NAME in mouse model of ischemia-reperfusion injury.**J Sur Res**,2013(in press)

GRATZKE, C.;ANGULO, J.;CHITALEY, K.,*et al* .Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction.**J Sex Med**, v.7, p.445-475, 2010

HRISTOV, K.L.;CUI, X.;BROWN, S.M.,*et al.*Stimulation of β 3-adrenoceptors relaxes rat urinary bladder smooth muscle via activation of large-conductance calcium activated potassium channels.**Am J Physiol Cell Physiol**, v.295, p.C1344-C1353, 2008

IGAWA, Y.;YAMAZAKI, Y.; TAKEDA, H.,*et al.*Relaxant effects of isoproterenol and selective beta3-adrenoceptor agonists on normal,low,compliant and hyperreflexic human bladders.**J Urol**, v.165, p.240-244, 2001

IRWIN, D.E.;MILSOM, I.;HUNKSAAR, S., *et al.*Population-based survey of urinary incontinence,overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries:results of the EPIC study.**Eur Urol**, v.50, p.1306-1314, 2006

IRWIN, D.E.;KOPP, Z.S.;AGATEP, B.,*et al.*Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms,overactive bladder,urinary incontinence and bladder outlet obstruction.**BJU Int**, v.108, p.1132-1138, 2011

JACOBSEN, S.J.;GIRMAN, C.J.;LIEBER, M.M.Natural history of benign prostatic hyperplasia.**Urology**, V.58, P.5-16, 2001

JOHANSSON, R.;PANDITA, R.K.;POLJAKOVIC, M.,*et al.*Activity and expression of nitric oxide synthase in the hypertrophied rat bladder and the effect of nitric oxide on bladder smooth muscle growth.**J Urol**, v.168, p.2689-2694, 2002.

KAIDOH, K.;IGAWA, Y.; TAKEDA, H.,*et al.*Effects of selective beta2 and beta3-adrenoceptor agonists on detrusor hyperreflexia in conscious cerebral infarcted rats.**J Urol**, v.168, p.1247-1252, 2002

KHULLAR, V.;CAMBRONERO, J.;ANGULO, J.C.,*et al.*Efficacy of mirabegron in patients with and without prior antimuscarinic therapy for overactive bladder:a post hoc analysis of a randomized European-Australian phase 3 trial.**BMC Urology**, v.13, p.1-9, 2013

KLARSKOV, P.Non -cholinergic,non-adrenergic inhibitory nerve responses of bladder outlet smooth muscle in vitro.**Br J Urol**, v.60, p.337-342, 1987

KRICHEVSKY, V.P.;PAGALA, M.K.; VAYDOVSKY, I.,*et al.*Function of M3 muscarinic receptors in the rat urinary bladder following partial outlet obstruction.**J Urol** ,v.161, p.1644-1650, 1999

KULLMANN, F.A.;LIMBERG, J.B.;DE GROAT, W.C.,*et al.*Effects of β_3 -adrenergic receptor activation on rat urinary bladder hyperactivity induced by ovariectomy.**J Pharmacology Exp Ther**, v.330, n.3, p.704-717, 2009

LARSEN, J.J.Alpha and beta-adrenoceptors in the detrusor muscle and bladder base of the pig and beta-adrenoceptors in the detrusor muscle of man.**Br J Pharmacol**, v.65, p.215-222, 1979.

LEMACK, G.E.; ZIMMERA, P.E.; VAZQUEZ, D.,*et al.*Altered response to partial bladder outlet obstruction in mice lacking inducible nitric oxide synthase.**J Urol**, v.163, p.1981-1987, 2000.

LI, J.H.;YASSAY, G.D.;KAU, S.T.Beta-adrenoceptor subtypes in the detrusor of guinea -pig urinary bladder.**Pharmacology**, v.44, p.13-18, 1992.

LUCAS, M.G.;BOSCH, J.L.H.R.; CRUZ, F.R.,*et al.*Guidelines on Urinary Incontinence.**European Association of Urology**,2012

LUE, T.F.Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction In: WEIN, A.J.,*et al.* **Campbell-Walsh Urology**.9.ed.Philadelphia:Elsevier,2007.cap.21,p.718-749.

MASUDA, H.;TSUJII, T.;OKUNO, T.,*et al.*Localization and role of nitric oxide synthase and endogenous nitric oxide synthase inhibitors in the rabbit lower urinary tract. **J Urol**, v.167, p.2235-2240, 2002.

- MATSUI, M.;MOTOMURA, D.; FUJIKAWA, T.,*et al.*Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable.**J Neurosci**, v.22, p.10627-10632, 2002
- MCCONNELL, J.D.;ROEHRBORN, C.G.;BAUTISTA, O.M.,*et al.*The long term effect of doxazosin ,finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia.**N Eng J Med**, v.349, p.2387-2398, 2003
- MCVARY, K.T.;RADEMAKER, A.;LLOYD, G.I.,*et al.*Autonomic nervous system overactivity in men with lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia.**J Urol**, v.174, p. 1327-1433, 2005
- MEIGS, J.B., MOHR, B., BARRY, M.J., *et al.* Risk factors for clinical benign prostatic hyperplasia in a community-based population of healthy aging men. **J Clin Epidemiol** , v.54, p.935-944, 2001
- MONCADA S.; REESDD; SCHULZ R.; PALMER R.M.J.Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilator after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo.**Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, p.2166-2170, 1991
- MONICA, F.Z.;BRICOLA, A.A.;BAU, F.R.,*et al.*Long -term nitric oxide deficiency causes muscarinic supersensitivity and reduces beta(3)-adrenoceptor-mediated relaxation,causing rat detrusor overactivity .**Br J Pharmacol** , v.153, p.1659-1668, 2008
- MONTORSI, P.; RVAGNANI, P.M.; GALLI, S., *et al.* Association between erectile dysfunction and coronary artery disease: Matching the right target with the right test in the right patient. **Eur Urol** , v.50, p.721-731, 2006
- MOON, A.Influence of nitric oxide signalling pathways on precontracted human detrusor smooth muscle in vitro.**BJU Int**, v.89, p.942-949, 2002
- MORELLI, A.; FILIPPI, S.; SANDNER, P., *et al.* Vardenafil modulates bladder contractility through cGMP-mediated inhibition of RhoA/Rho kinase signaling pathway in spontaneously hypertensive rats. **J Sex Med** , v.6, p.1594-1608, 2009
- MORELLI, A.;FILIPPI, S.;COMEGLIO, P.,*et al.*Acute vardenafil administration improves bladder oxygenation in spontaneously hypertensive rats.**J Sex Med**, v.7, p.107-120, 2010.
- MORELLI, A.;SARCHIELLI, E.;COMEGLIO, P.,*et al.*Phosphodiesterase type 5 expression in human and rat lower urinary tract tissues and the effect of tadalafil on prostate gland oxygenation in spontaneously hypertensive rats.**J Sex Med**, v.8, n.10,p.2746-2760, 2011
- MORENO, S.L.**Análise do efeito de inibidores de fosfodiesterase do tipo 5 em parâmetros urodinâmicos de camundongos utilizando modelo experimental de hiperatividade detrusora.**Tese de Mestrado em Ciências Médico Cirúrgicas.Universidade Federal do Ceará.Fortaleza,2014

MORITA, T.;TSUJII, T.;DOKITA, S.Regional difference in functional roles of cAMP and cGMP in lower urinary tract smooth muscle contractility.**Urol Int**, v.49, p.191-195, 1992

OELKE, M.;BACHMANN, A.;DESCAZEAUD, A.,*et al.*EAU guidelines on the treatment and follow-up of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction.**Eur Urol**, v.64, p.118-140, 2013

OTSUKA, A.;SHINBO, H.;MATSUMOTO, R.,*et al.*Expression and functional role of beta-adrenoceptors in the human urinary bladder urothelium.**Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.377, p.473-481, 2008.

PERSSON, K.;ANDERSSON, K.E.Nitric oxide and relaxation of pig lower urinary tract.**Br J Pharmacol**, v.106, p.416-422, 1992

REGADAS, R.P.**Efeito da associação da tadalafila com a tamsulosina no trato urinário inferior de ratos e de humanos.**Tese de doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas.Universidade Federal do Ceará.Fortaleza,2012

REGADAS, R.P.,REGES, R.,CERQUEIRA, J.B.,*et al.*Urodynamic effects of the combination of tamsulosin and daily tadalafil in men with lower urinary tract symptoms secondary to benign protatic hyperplasia:a randomized ,placebo-controlled clinical trial.**Int Urol Nephrol**, v.45, p.39-43, 2013

REGADAS, R.P.,REGES, R.,CERQUEIRA, J.B.,*et al.*Efeitos da administração crônica de tansulosina e tadalafila, isolados ou em combinação, em ratos com obstrução infravesical induzida por deficiência crônica de óxido nítrico.**Int Braz J Urol**, vol. 40(4), p. 546-552, 2014

REGES, R.;D'ANCONA, C.;MONICA, F.,*et al.*Effect of acute administration of sildenafil to rats with detrusor overactivity induced by chronic deficiency of nitric oxide.**Int Braz J Urol**, v.39, p.268-275, 2013

REGES,R.;REGADAS,R.P.;CERQUEIRA,J.B.;GONZAGA-SILVA, L.F.Phosphodiesterases inhibitors for treatment of voiding dysfunction:an overview of experimental and clinical evidence.**World J Clin Urol**, v.3, n.3, p.249-257, 2014

ROEHRBORN, C.G.;SIAMI, P.; BARKIN, J. ,*et al.*The effects of combination therapy with dutasteride and tamsulosin on clinical outcomes in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia:4-year results from the CombAT study.**Eur Urol**, v.57, p.123-131, 2010

ROSEN, R.;ALTWEIN, J.;BOYLE, P., *et al.*Lower urinary tract symptoms and male sexual dysfunction:The multinational survey of the aging male(MSAM-7).**Eur Urol**, v.44, p.637-649, 2003

SAIRAM, K.; KULINSKAYA, E.;MCNICHOLAS, T.A.,*et al.* Sildenafil influences lower urinary tract symptoms. **BJU Int**, v.90, p.836-839, 2002

SEGUCHI, H.;NISHIMURA, J.;ZHOU, Y.,*et al.*Expression of beta3-adrenoceptors in rat detrusor smooth muscle.**J Urol**, v.159, p.2197-2201, 1998

SEFTEL, A.D.;DE LA ROSETTE, J.; BIRT, J.,*et al.*Coexisting lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction:a systematic review of epidemiological data.**Int J Clin Pract**, v.67, n.1, p.32-45, 2013

SEXTON, C.C.;COYNE, K.S.;KOPP, Z.S.,*et al.*The overlap of storage, voiding and postmicturition symptoms and implications for treatment seeking in the USA, UK and Sweden:EpiLUTS.**BJU Int**, v.103, n.3, p.12-23, 2009

SEXTON, C.C.;NOTTE, S.M.;MAROULIS, C.,*et al.*Persistence and adherence in the treatment of overactive bladder syndrome with anticholinergic therapy:a systematic review of the literature.**Int J Clin Pract**, v.65, p.567-585, 2011

SIGALA, S.;MIRABELLA, G.;PERONI, A.,*et al.*Differential gene expression of cholinergic muscarinic receptor subtypes in male and female normal human urinary bladder.**Urology**, v.60, p.719-725, 2002

SMET, P.J.;JONAVICIUS, J.;MARSHALL, V.R.,*et al.*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** , v.71, p.337-348, 1996.

SOLER, R.;NETO, J.F.; FULLHASE, C.,*et al.*Future pharmacotherapies for male urinary tract symptoms.**Curr Bladder Dysfunct Rep**, v.9, p.134-141, 2014.

STENGEL, P.W.;YAMADA, M.; WESS, J.,*et al.*M(3)-receptor knockout mice muscarinic receptor function in atria ,stomach fundus, urinary bladder and trachea.**Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.282, p.R1443-R1449, 2002

STUEHR DJ.Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. **J Nutr**, v.134, p.2748S-2751S, 2004

TAIRA, N.The autonomic pharmacology of the bladder.**Annu Rev Pharmacol**, v.12, p.197-208, 1972.

TAKEDA, H.; YAMAZAKI, Y.; AKAHANE, M.,*et al.*Role of the beta(3)-adrenoceptor in urine storage in the rat:comparison between the selective beta(3)-adrenoceptor agonist, CL316243, and various smooth muscle relaxants.**J Pharmacol Exp Ther**, v.293, p.939-945, 2000.

THEOBALD, R.J. JR.The effect of N^g-monomethyl-L-arginine on bladder function.**Eur J Pharmacol**, v.311, p.73-78, 1996.

VAN KERREBROECK, P.;HAAB, F.;ANGULO, J.C.,*et al.*Efficacy and safety of solifenacin and tamsulosin oral controlled absorption system in a single tablet for lower urinary tract

symptoms in men: efficacy and safety results from the randomised controlled NEPTUNE trial. **Eur Urol**, 2013.

WEIN, A.J.; COYNE, K.S.; TUBARO, A., *et al.* The impact of lower urinary tract symptoms on male sexual health: EpiLUTS. **BJU Int**, v.103, p.33-41, 2009.

WILSON, S. ; CHAMBERS, J.K ; PARK, J.E, *et al.* Agonist potency at the cloned human beta-3 adrenoceptor depends on receptor expression level and nature of assay. **J Pharmacol Exp Ther** , v. 279, p. 214-221, 1996

WOODS, M.; CARSON, N.; NORTON, N.W., *et al.* Efficacy of the beta3-adrenergic receptor agonist CL-316243 on the experimental bladder hyperreflexia and detrusor instability in the rat. **J Urol**, v.166, p.1142-1147, 2001.

YAMAGUCHI, O. Beta3-adrenoceptors in human detrusor muscle. **Urology**, v.59, p.25-29, 2002.

YAMANISHI, T.; CHAPPLE, C.R.; YASUDA, K., *et al.* The role of beta(3)-adrenoceptors in mediating relaxation of porcine detrusor muscle. **Br J Pharmacol**, v.135, p.129-134, 2002

YAMAZAKI, Y.; TAKEDA, H.; ALKAHANE, M., *et al.* Species differences in the distribution of beta-adrenoceptor subtypes in bladder smooth muscle. **Br J Pharmacol**, v.124, p.593-599, 1998

YOSHIMURA, N.; SEKI, S.; DE GROAT, W.C. Nitric oxide modulates Ca(2+) channels in dorsal root ganglion neurons innervating rat urinary bladder. **J Neurophysiol**, v.86, p.304-311, 2001.

YOSHIMURA, N.; CHANCELLOR, M.B. Physiology and Pharmacology of the bladder and urethra In: WEIN, A.J. **Campbell-Walsh Urology**. 9.ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. cap.56, p.1923-1972

ANEXO



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 05/14 , sobre o projeto intitulado: “Análise do efeito de inibidores de fosfodiesterase do tip 5 e agonistas beta-adrenérgicos em parâmetros urodinâmicos de camundongos utilizando modelo experimental de hiperatividade detrusora”, de responsabilidade do Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga-Silva e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 26 de março de 2015.

Fortaleza, 28 de abril de 2015

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siapo: 1520734