

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-
CIRÚRGICAS**

BRUNO LIMA LINHARES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO RELAXANTE DE INIBIDORES DE
FOSFODIESTERASES E AGONISTA BETA-ADRENÉRGICO EM BEXIGA DE
CAMUNDONGOS UTILIZANDO MODELO EXPERIMENTAL DE
HIPERATIVIDADE DETRUSORA**

FORTALEZA

2016

BRUNO LIMA LINHARES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO RELAXANTE DE INIBIDORES DE
FOSFODIESTERASES E AGONISTA BETA-ADRENÉRGICO EM BEXIGA DE
CAMUNDONGOS UTILIZANDO MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERATIVIDADE
DETRUSORA

Dissertação de Mestrado 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 Título de
Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga-
Silva

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Reges Maia
de Oliveira

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L728a Linhares, Bruno Lima.
Avaliação in vitro do efeito relaxante de inibidores de fosfodiesterases e agonista beta-adrenérgico em bexiga de camundongos utilizando modelo experimental de hiperatividade detrusora / Bruno Lima
Linhares. – 2016.
63 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga-Silva.
Coorientação: Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira .
1. Bexiga Urinária. 2. Músculo Liso . 3. Inibidores de Fosfodiesterase . 4. Adrenérgicos. I. Título.
CDD 617
-

BRUNO LIMA LINHARES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO RELAXANTE DE INIBIDORES DE
FOSFODIESTERASES E AGONISTA BETA-ADRENÉRGICO EM BEXIGA DE
CAMUNDONGOS UTILIZANDO MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERATIVIDADE
DETRUSORA

Dissertação de Mestrado 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 Título de
Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga-Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

À minha esposa, Anna Renée.

Aos meus filhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues, professor titular e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, pela incansável dedicação à pós-graduação desta instituição.

Ao Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga-Silva, professor do Departamento de Cirurgia e meu orientador, por todos os seus ensinamentos desde a época da graduação, pela sua valiosa orientação, confiança e absoluto apoio, pela sua dedicação ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira, professor do Departamento de Cirurgia e meu coorientador, pelo exemplo, pelo apoio incondicional durante esses anos de muito trabalho, pela confiança depositada em mim, pelos inúmeros ensinamentos, quer seja na pesquisa ou prática clínica, quer seja nas dificuldades que enfrentamos no dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento, professor da Universidade Estadual do Ceará, por ter me acolhido em seu laboratório e ter acreditado em mim desde o início, pela imensurável ajuda na realização dos experimentos e interpretação dos resultados.

À Profa. Dra. Cláudia Ferreira Santos, professora da Universidade Estadual do Ceará, pela valiosa ajuda na realização dos experimentos e pelos ensinamentos durante as atividades de laboratório.

Ao Prof. Dr. João Batista Gadelha de Cerqueira, pelo suporte desde a época da graduação.

Ao Prof. Dr. Rommel Prata Regadas, professor do Departamento de Cirurgia, pela contribuição nas discussões científicas.

Aos amigos Pedro Henrique Cabral Bezerra, Ana Patrícia Gonçalves Silva, bem como todos os demais colegas do Laboratório de Fisiofarmacologia Cardiovascular e Renal da Universidade Estadual do Ceará, pela essencial assistência durante os experimentos.

Aos amigos urologistas Marcos Fiúza de Carvalho, Raphael Farias de Carvalho, Samuel Luz Moreno, Alexandre Sabóia Leitão Júnior e todos os demais amigos que compõem a família da Urologia do HUWC/UFC.

Aos estudantes da graduação da FAMED/UFC, Lucas B. Marinho e Pedro Raphael R. Sousa, pelo auxílio na realização das atividades experimentais.

A Maria Luciene V. de Oliveira e Magda Maria G. Fontenele, pela prestatividade e atenção com os alunos de pós-graduação.

“Aquele que quiser adquirir um conhecimento exato da arte médica deverá possuir boa disposição para isso, frequentar uma boa escola, receber instrução desde a infância, ter vontade de trabalhar e ter tempo para se dedicar aos estudos.” (Hipócrates, 450 a.C.)

RESUMO

Tratamento da hiperatividade detrusora (HD) tem sido classicamente feito com antimuscarínicos. No entanto, seus frequentes efeitos adversos têm levado à procura por novas opções terapêuticas. Agonistas adrenérgicos beta-3 seletivos relaxam o músculo liso detrusor (MLD) através da via da adenilato ciclase, aumentando a adenosina monofosfato cíclica intracelular (AMPC). O rolipram, inibidor específico da fosfodiesterase tipo 4 (IPDE4), aumenta os níveis de AMPC, inibindo sua hidrólise. Inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (IPDE5), como a tadalafila, relaxam o MLD através da via do óxido nítrico/guanosina monofosfato cíclico (NO/GMPc). Tem-se sugerido que o uso combinado dessas drogas pode levar a uma potencialização do efeito relaxante. O principal objetivo deste estudo é avaliar *in vitro* os efeitos da associação de um agonista adrenérgico beta-3 seletivo com dois diferentes inibidores de fosfodiesterases (IPDE4 e IPDE5) em um modelo experimental de hiperatividade detrusora. Os experimentos foram divididos em duas fases e realizados em banho de órgãos com fragmentos de bexiga de camundongos. As substâncias utilizadas foram o BRL 37344 (agonista adrenérgico beta-3 seletivo), tadalafila (IPDE5) e rolipram (IPDE4). Na primeira fase, os tecidos de animais sem tratamento prévio eram submetidos à exposição de concentrações crescentes de cada uma das drogas estudadas após contração com KCL. Foram também realizados experimentos em que os tecidos eram pré-incubados com tadalafila ou rolipram para posterior adição do beta-3 adrenérgico. Em uma segunda fase, foi realizado o mesmo protocolo experimental com animais tratados com L-NAME por 30 dias. L-NAME foi usado para causar experimentalmente HD nos camundongos pela depleção de NO. Foram construídas curvas concentração-resposta para cada um dos experimentos. Na primeira fase, a pré-incubação com tadalafila aumentou o efeito relaxante do BRL 37344 apenas em duas concentrações ($p < 0,05$). A pré-incubação com rolipram não aumentou o efeito relaxante do BRL 37344. Nos animais tratados com L-NAME, o rolipram apresentou o maior efeito relaxante quando comparadas as drogas isoladamente. Neste grupo de animais, o rolipram aumentou o efeito relaxante do BRL 37344 em praticamente todas as concentrações, enquanto não foi observado efeito aditivo com a tadalafila. Os inibidores das fosfodiesterases, associados aos já comprovadamente eficazes beta-3 agonistas, podem representar uma nova abordagem dos pacientes com sintomas de armazenamento. No modelo deste estudo, o IPDE4 potencializou o efeito relaxante do agonista adrenérgico beta-3 seletivo, o que não foi observado com o IPDE5, sugerindo um importante papel da via do AMPC no relaxamento do detrusor de camundongos.

Palavras-chave: Músculo liso detrusor. Agonista β 3-adrenérgico. Inibidores de fosfodiesterases.

ABSTRACT

Overactivity bladder syndrome has classically been treated with antimuscarinics. However, frequent adverse systemic effects have led to the search for new therapeutic options. β 3-adrenoceptor (β 3-AR) agonists relax the detrusor smooth muscle (DSM) by the adenylyl cyclase pathway, increasing cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Rolipram, a selective type 4 phosphodiesterase inhibitor (IPDE4), elevates intracellular cAMP levels by suppressing hydrolysis. Phosphodiesterase type 5 inhibitors (IPDE5), such as tadalafil, relax DSM by the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway (NO/cGMP). It has been hypothesized that the inhibition of phosphodiesterases could potentiate the relaxing effect of β 3-AR agonists. The main objective of this study is to evaluate *in vitro* the effects of the combination of a β 3-AR agonist with two different phosphodiesterase inhibitors (IPDE4 and IPDE5) in an experimental model of detrusor overactivity. The experiments were performed on bladder strips of mice and divided in two phases. The following drugs were used: BRL 37344 (β 3-AR agonist), tadalafil (IPDE5) and rolipram (IPDE4). In the first phase, after potassium-induced contraction, strips isolated from naive mice were exposed to increasing concentrations of each study drug. In another series of experiments, prior to contraction, strips were incubated with either tadalafil or rolipram and then increasing concentrations of BRL 37344 were added. In the second phase, the same protocol was performed with animals treated with L-NAME for 30 days. Chronic L-NAME administration leads to detrusor overactivity by NO deprivation. Cumulative concentration-response curves were constructed. In the first phase, preincubation with tadalafil increased the relaxing response of BRL 37344 in two concentrations. Pre-treatment with rolipram had no effect on the relaxation obtained with BRL 37344. In L-NAME-treated mice, rolipram showed the best relaxation when compared to the other drugs. In these animals, rolipram increased the relaxing response of BRL 37344 in almost all concentrations, but no synergistic effect with tadalafil was observed. Phosphodiesterase inhibitors associated with the already proven effective β 3-AR agonists may represent a new approach for patients with storage symptoms. In our experimental model, the relaxing effect of the β 3-AR agonist was potentiated by IPDE4 but not by IPDE5, suggesting cAMP plays an important role in DSM relaxation.

Keywords: Detrusor smooth muscle. β 3-adrenoceptor agonist. Phosphodiesterase inhibitors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho esquemático da bexiga	14
Figura 2 - Mecanismos reflexos das fases de enchimento e esvaziamento	16
Figura 3 - Esquema da formação e hidrólise do AMPc no detrusor	19
Figura 4 - Esquema da formação e hidrólise do GMPc	21
Figura 5 - Hidrólise do AMPc/GMPc pelos subtipos de PDE	25
Figura 6 - Bexiga do camundongo	32
Figura 7 - Banho de órgãos	32
Figura 8 - Comparação entre as três drogas	36
Figura 9 - BRL 37344 em tecidos pré-incubados com IPDE	37
Figura 10 - Comparação entre as três drogas (Fase 2)	39
Figura 11 - BRL 37344 em tecidos pré-incubados com IPDE (Fase 2)	40
Figura 12 - Curva obtida em um dos experimentos com BRL 37344 isoladamente e com pré-incubação com rolipram ou tadalafila, em animais tratados com L-NAME	41
Figura 13 - Comparação entre o relaxamento obtido em animal sem tratamento com L-NAME vs animal tratado com L-NAME com as três drogas isoladamente	43
Figura 14 - Comparação entre o relaxamento obtido em animal sem tratamento com L-NAME vs animal tratado com L-NAME nos experimentos com pré-incubação	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre as três drogas	36
Tabela 2 - BRL 37344 em tecidos pré-incubados com IPDE	37
Tabela 3 - Comparação entre as três drogas (Fase 2)	38
Tabela 4 - BRL 37344 em tecidos pré-incubados com IPDE (Fase 2)	39
Tabela 5 - Comparação para cada concentração entre o relaxamento obtido em animal sem tratamento com L-NAME vs animal tratado com L-NAME.....	42
Tabela 6 - Comparação para cada concentração entre o relaxamento obtido em animal sem tratamento com L-NAME vs animal tratado com L-NAME nos experi- mentos com pré-incubação com IPDE.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
AMPC	Adenosina de monofosfato cíclico
ANOVA	Análise da variância (do inglês ANalysis of VAriance)
β 1-AR	Receptor beta adrenérgico do tipo 1
β 2-AR	Receptor beta adrenérgico do tipo 2
β 3-AR	Receptor beta adrenérgico do tipo 3
DE	Disfunção erétil
GMPc	Guanosina de monofosfato cíclico
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IPDE4	Inibidor de fosfodiesterase tipo 4
IPDE5	Inibidor de fosfodiesterase tipo 5
KCl	Cloreto de potássio
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina metil ester hidrocrolido
LUTS	Sintomas do trato urinário inferior (do inglês <i>Lower Urinary Tract Symptoms</i>)
M	Molar
M3	Receptor muscarínico do tipo 3
MTOPS	<i>Medical Therapy of Prostatic Symptoms</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE	Fosfodiesterase
PKA	Proteína quinase A
Prof.	Professor
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
sGC	Guanilato ciclase solúvel

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Anatomia do trato urinário inferior	14
1.2 Fisiologia e farmacologia do trato urinário inferior	15
1.2.1 <i>Mecanismos colinérgicos</i>	17
1.2.2 <i>Mecanismos adrenérgicos</i>	17
1.2.3 <i>Mecanismos não adrenérgicos não colinérgicos</i>	19
1.3 Associação entre STUI e disfunção erétil	22
1.4 Inibidores das fosfodiesterases	24
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Tipo de pesquisa	30
4.2 Local	30
4.3 Animais de experimentação	30
4.4 Substâncias utilizadas	30
4.5 Montagem das preparações da musculatura detrusora <i>in vitro</i>	31
4.6 Protocolo experimental	33
4.7. Análise estatística	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Fase 1: Animais sem tratamento com L-NAME	36
5.2 Fase 2: Animais com tratamento com L-NAME por 30 dias	38
5.3 Comparação entre os resultados do grupo não-exposto ao L-NAME e do grupo exposto ao L-NAME (Fase 1 vs Fase 2)	42
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXO A – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA	63

1 INTRODUÇÃO

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

Os sintomas do trato urinário inferior são 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 (Epi LUTS), em homens e mulheres com mais de 40 anos, mostraram uma combinação destes grupos de sintomas em 24% dos homens e 26% das mulheres (SEXTON *et al.*, 2009). O mais comum tipo de LUTS 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 16,0% e 16,9%, respectivamente (STEWART *et al.*, 2003). Tem-se observado que muitos homens com HPB não desenvolvem LUTS enquanto outros homens com sintomas urinários de armazenamento não têm HPB ou obstrução infravesical (CHAPPLE; ROEHRBORN, 2006). LUTS de esvaziamento são geralmente causados por obstrução infravesical e têm sido atribuídos 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 LUTS de esvaziamento, evidência para uma direta correlação com aumento da próstata ainda não é convincente, e hoje é reconhecido que tais sintomas não são somente reflexos de uma afecção infravesical (ABDEL-AZIZ; LEMACK, 2002). Sintomas de armazenamento, por outro lado, são associados com hiperatividade detrusora, com contribuição de fatores miogênicos, neurogênicos, assim como do urotélio (ANDERSSON, 2003). 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 de que o espectro dos sintomas de esvaziamento e armazenamento reflete distúrbios em todo o trato urinário e que LUTS não são um grupo de sintomas órgão e/ou

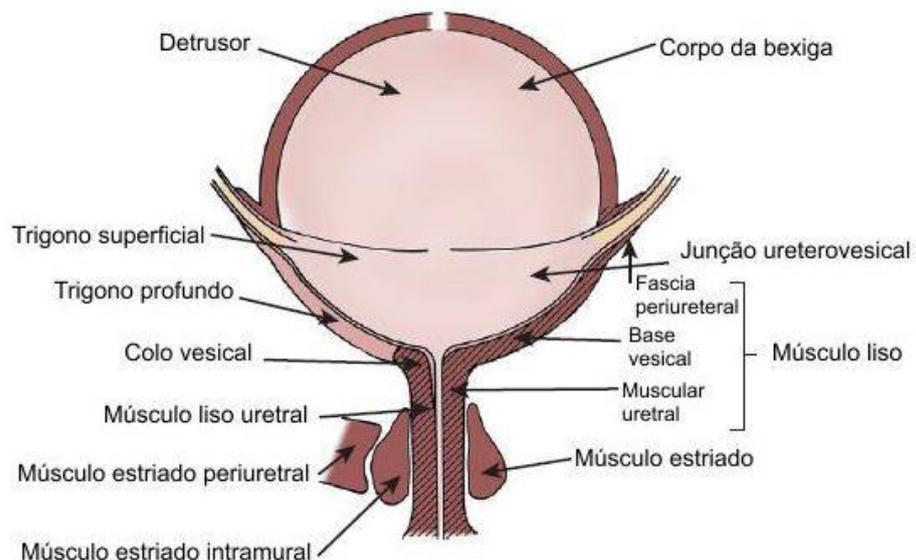
sexo específico, mas estão relacionados com a idade e são frequentemente progressivos (CHAPPLE *et al.*, 2008).

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

1.1 Anatomia do trato urinário inferior

O trato urinário inferior consiste da bexiga e uretra. A uretra contém 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 uretrovesical, detrusor profundo e parede anterior da bexiga (Figura 1). A bexiga é um órgão oco de músculo liso, composta 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 funcional e estruturalmente diferente do músculo liso uretral e do trígono vesical (ANDERSSON; ARNER, 2004).

Figura 1. Desenho esquemático da bexiga (detrusor e trígono) e do seu trato de saída (uretra, orifícios ureterais, esfíncteres interno e externo).



As duas principais funções do trato urinário inferior, armazenamento e esvaziamento de urina durante a micção, envolvem uma interação complexa entre os componentes estruturais e anatômicos do trato urinário e entre os sistemas de controle nervoso. Durante a fase de armazenamento, cada célula de músculo liso deve, após relaxamento, alongar-se e se rearranjar na parede vesical; e na fase de esvaziamento, o encurtamento das fibras precisa ser realizado de forma sincronizada e rápida. Para responder aos controles nervoso e hormonal, o músculo do trato urinário tem de possuir receptores para os transmissores/moduladores, liberados por nervos ou gerados localmente, além de mecanismos de transmissão celular para o início das fases de contração e relaxamento vesicais (ANDERSSON; ARNER, 2004).

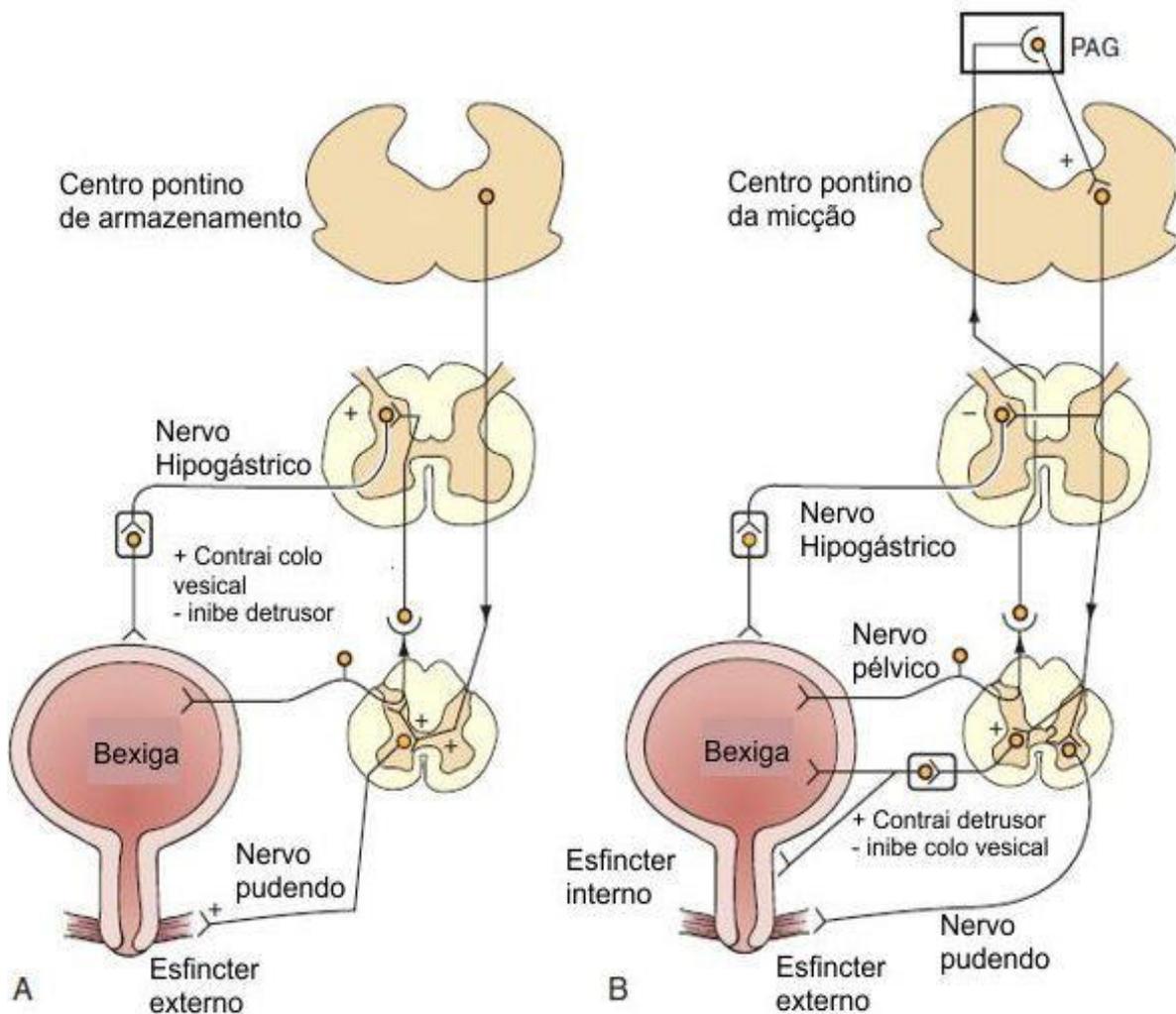
O trato urinário inferior é innervado por três tipos de nervos periféricos envolvendo os sistemas nervosos parassimpático, simpático e somático. Nervos parassimpáticos pélvicos, emergentes da porção sacral da medula espinhal, estimulam a bexiga e relaxam a uretra. Nervos simpáticos lombares inibem o corpo da bexiga e estimulam a base da bexiga e uretra. Nervos pudendos, os quais emergem da porção lateral da medula, também conhecida como 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 lombo-sacra e monitoram o volume e amplitude da contração vesical através de fibras mielinizadas (A β) e não-mielinizadas (C) (YOSHIMURA; CHANCELLOR, 2007).

1.2 Fisiologia e farmacologia do trato urinário inferior

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 (Figura 2). Nervos motores pudendos são ativados nesta fase pela estimulação aferente (reflexo de guarda). 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; CHANCELLOR, 2007).

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

Figura 2. Mecanismos reflexos das fases de enchimento e esvaziamento. (A) Reflexos da fase enchimento: durante a fase de enchimento, há a ativação de fibras nervosas simpáticas (hipogástrico) e somáticas (pudendo), que, quando ativadas, promoverão o fechamento da saída da bexiga (base e uretra) assim como do esfíncter uretral externo, respectivamente. (B) Reflexos da fase de esvaziamento: o início da micção aumenta a atividade visceral aferente, a qual ativará o centro da micção (centro pontino da micção), promovendo assim inibição das vias simpáticas e somáticas. O centro pontino estimulará as fibras nervosas eferentes parassimpáticas que inervam tanto a bexiga como a saída da bexiga. PAG: zona periaquedutal.



1.2.1 Mecanismos colinérgicos

Na maioria das espécies animais, a contração da bexiga é mediada por mecanismos colinérgicos e não adrenérgicos não colinérgicos (TAIRA, 1972). Em músculo detrusor isolado de porcos e coelhos, já foi demonstrado que a acetilcolina despolariza, aumenta a frequência dos potenciais de ação e contrai o músculo. O músculo detrusor isolado de humanos também é 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 detrusor 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 demonstrada 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 $G_{q/11}$, ativando a hidrólise do fosfatidil inositol, levando a mobilização de cálcio. Já M2 e M4 acoplam com a proteína $G_{i/o}$, 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 detrusor normal é menos claro. Em ratos com deficiência de receptor M3, receptores M2 mediaram apenas 5% da resposta ao carbacol (MATSUI *et al.*, 2002; STENGEL *et al.*, 2002). Contudo, em certos estados de doença, os receptores M2 podem contribuir para contração da bexiga. Já foi observada em ratos desnervados contração detrusora mediada por receptores M2 isoladamente ou em combinação com M3 (BRAVERMAN *et al.*, 1998).

Como indicado acima, a função receptora muscarínica pode alterar-se em diferentes desordens urológicas, como obstrução urinária, bexiga neurogênica, hiperatividade detrusora e diabetes (ANDERSSON; ARNER, 2004).

1.2.2 Mecanismos Adrenérgicos

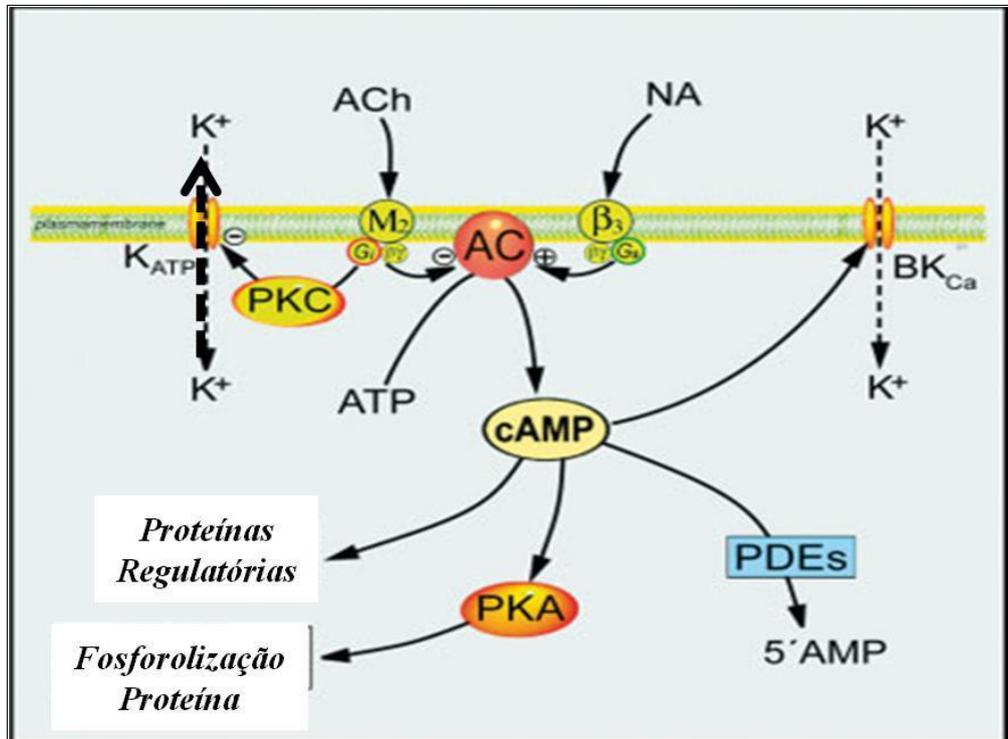
Estudos iniciais mostraram que, no detrusor da maioria das espécies, predominavam receptores adrenérgicos β_2 (ANDERSSON, 1993). Entretanto, no detrusor de

cobaia, o qual contém receptores β_1 (β_1 -ARs) e β_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, já que eram 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 da PCR, hibridização *in situ*, e contrações isométricas *in vitro*, vários pesquisadores demonstraram que o detrusor humano expressa além de β_1 -ARs e β_2 -ARs, receptores β_3 -adrenérgicos (β_3 -ARs). Como os agonistas β_3 -adrenérgicos efetivamente relaxam o músculo detrusor humano (IGAWA *et al.*, 2001; YAMAGUCHI, 2002), seus receptores podem representar o principal receptor beta adrenérgico para o relaxamento vesical na nossa espécie. Isto pode explicar porque os efeitos clínicos dos agonistas β_2 -adrenérgicos em hiperatividade detrusora 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 à isoprenalina e a 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). Agonistas β_3 -adrenérgicos têm mostrado efeito relaxante *in vitro* e em modelos animais de hiperatividade detrusora (IGAWA *et al.*, 2001; KAIDOH *et al.*, 2002; WOODS *et al.*, 2001; YAMANISHI *et al.*, 2002).

O relaxamento induzido por agonista β -adrenérgico é mediado pela estimulação da via da adenilato ciclase e do acúmulo da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (YOSHIMURA; CHANCELLOR, 2007). A ativação dos β_3 -AR relaxa o detrusor, melhorando a complacência vesical e aumentando a capacidade vesical, sem mudança na pressão de micção e no resíduo pós-miccional. Portanto, o agonista β_3 -adrenérgico seletivo atua na atividade de contratilidade espontânea, que ocorre durante o enchimento vesical, enquanto que a contração de micção, que depende da descarga parassimpática da medula sacral, não é afetada (ANDERSSON, 2013).

Figura 3. Esquema da formação e hidrólise do AMPc no detrusor. A estimulação do receptor do subtipo β_3 pela NA ativa a AC com consequente aumento do AMPc, o qual é degradado pela PDE a 5'-AMP. NA: noradrenalina, AC: adenilato ciclase, PKA: proteína quinase A, PDEs: fosfodiesterases, K_{ATP} : canal potássio ativado por ATP, β_3 : receptor beta-3 adrenérgico, PKC: proteína quinase C, ATP: trifosfato de adenosina, cAMP: monofosfato de adenosina cíclico, BK_{Ca} : canal de potássio ativado por cálcio.



Fonte: Monica (2009).

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 (O_2) 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).

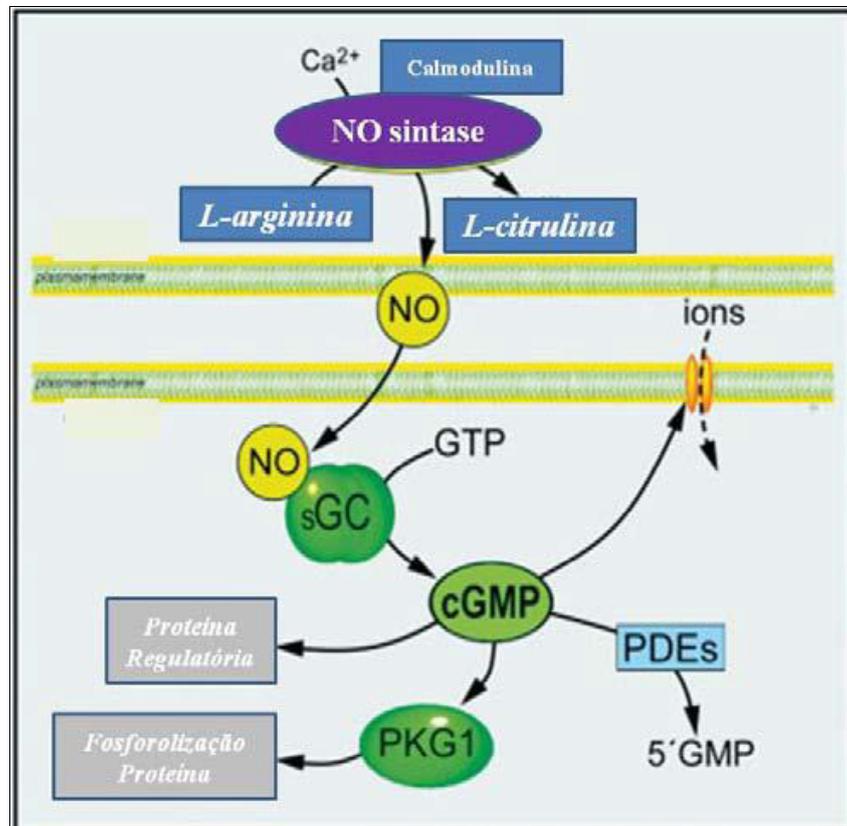
Existem três isoformas de NOS, denominadas de endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS), cada qual codificada por diferentes genes (STUEHR *et al.*, 2004). Tanto a eNOS como a nNOS são denominadas de NOS constitutivas (cNOS), pois estão normalmente expressas nas células e atuam de modo dependente 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 central 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 (Figura 4) envolve a sua ligação à 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 inferior (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). Até o presente momento, não há evidência que nNOS seja produzida por células do músculo detrusor. A isoforma iNOS não foi detectada em células do detrusor não estimuladas (JOHANSSON *et al.*, 2002).

O papel funcional do óxido nítrico no detrusor 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 tetradoxina (TTX) (bloqueador de canais de sódio). Elliot e Castleden (1993) não conseguiram demonstrar um relaxamento nervo-mediado em músculo detrusor humano.

Figura 4. Esquema da formação e hidrólise do GMPc. O NO ativa a sGC, aumentando a concentração de GMPc, o qual é degradado a 5'-GMP pela PDE. NO: óxido nítrico, PDE: fosfodiesterase, sGC: guanilato ciclase solúvel, GTP: trifosfato guanosina, PKG: proteína quinase G.



Fonte: Monica (2009).

A bexiga normal responde à fase de enchimento de forma fisiológica com relaxamento e acomodação de grandes volumes de urina com um mínimo aumento na pressão intravesical (COOLSAET, 1985). Há muitas sugestões para explicar este mecanismo (ANDERSSON, 1999). O fenômeno tem sido atribuído não somente às propriedades físicas da bexiga, mas também à existência de um mecanismo neural inibitório durante a fase de 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 este músculo 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 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 sGC 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 (FELSSEN *et al.*, 2003; JOHANSSON *et al.*, 2002; LEMACK *et al.*, 2000).

1.3 Associação entre LUTS 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 incapacidade de obter ou manter uma ereção suficiente para permitir um desempenho sexual satisfatório. 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 LUTS/HPB e disfunção sexual em homens mais velhos independente dos efeitos da idade, outras comorbidades ou estilo de vida (SEFTEL *et al.*, 2013).

A fisiopatologia de LUTS e disfunção erétil (DE) é complexa e multifatorial. Envolve os seguintes aspectos:

a. 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 guanosina trifosfato (GTP). O GMPc atua como segundo mensageiro em proteína quinases, causando diminuição do cálcio intracelular e dissociação de fibras de actina e miosina, levando ao relaxamento da musculatura lisa. Desse modo, sua deleção pode estar

relacionada à presença de LUTS (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).

b. Aumento da atividade Rho-Kinase: O relaxamento prejudicado da musculatura lisa em bexiga, colo vesical, próstata, uretra e pênis, com consequente 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).

c. Hiperatividade do sistema nervoso autônomo: A hiperatividade simpática pode contribuir para piora de LUTS em homens com HPB. McVary *et al.* (2005) demonstraram que a atividade do sistema nervoso autônomo, medida por testes fisiológicos, em plasma e catecolaminas urinárias, correlaciona-se positivamente com o escore de sintomas e outras mensurações em HPB.

d. Aterosclerose e isquemia do trato urinário inferior: Existe uma forte associação entre HPB, LUTS 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 má perfusão sanguínea crônica para o trato urinário baixo, contribuindo para LUTS (REGES *et al.*, 2014). Tratamento crônico com tadalafila nesse modelo foi capaz de contrapor todas as alterações de LUTS, principalmente por maior perfusão e oxigenação do trato urinário inferior (GACCI *et al.*, 2012; MORELLI *et al.*, 2010, 2011). A aterosclerose é fortemente associada à DE (MONTORSI *et al.*, 2006), e já foi demonstrado associação entre hipoperfusão de próstata e bexiga com LUTS em homens (BERGER *et al.*, 2005).

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 sintomas do trato urinário inferior tinham disfunção erétil (DE) mais grave e distúrbios de ejaculação. Urgência com receio de perder urina foi um dos sintomas significativos mais relatados.

1.4 Inibidores das fosfodiesterases

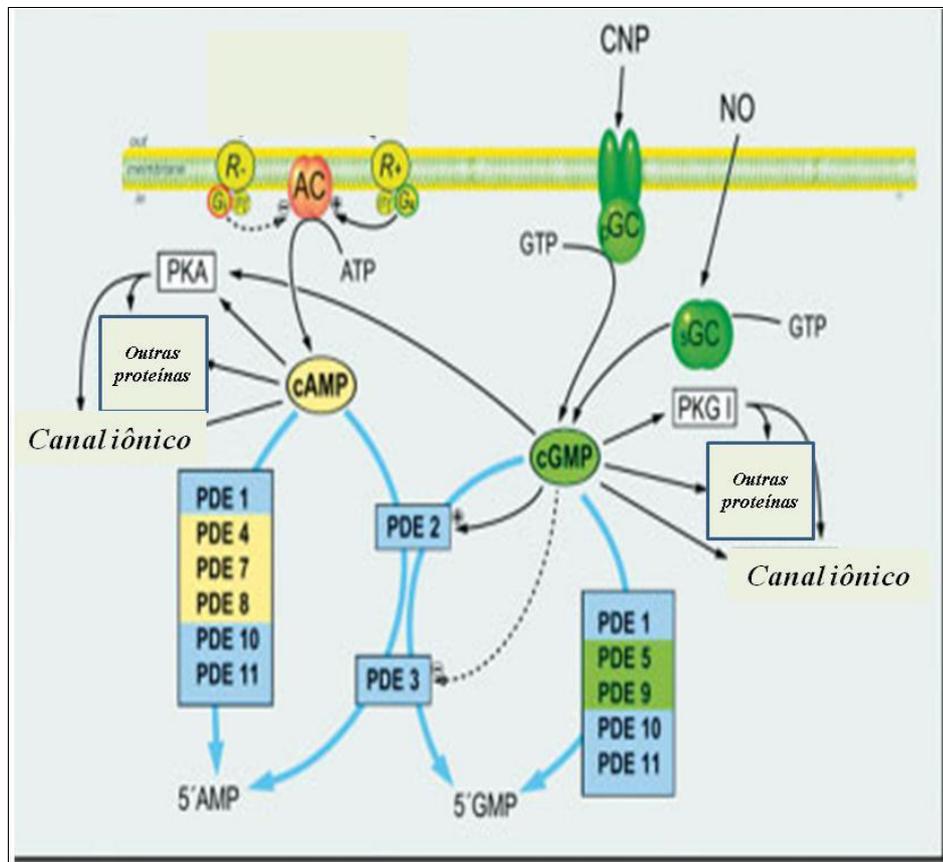
Fosfodiesterases são enzimas que metabolizam as moléculas do segundo mensageiro AMPc e GMPc. São geradas a partir de 21 genes em mamíferos e divididos em 11 famílias baseados nas suas sequências proteicas, catalíticas e sensibilidade a inibidores, tal como sua afinidade ao AMPc e GMPc. Atualmente, existem inibidores para cada família; no entanto, muitos dos inibidores atuam em mais de uma isoenzima, podendo apresentar diferente sensibilidade para cada uma delas (ANDERSSON, 2011). Das 11 isoenzimas, seis apresentam importância farmacológica (PDE 1, 2, 3, 4, 5 e 11) (ÜCKERT *et al.*, 2006).

Fosfodiesterases tipos 1, 2, 3, 10 e 11 hidrolisam ambos AMPc e GMPc. Fosfodiesterases tipos 4, 7, e 8 hidrolisam AMPc. Fosfodiesterases tipos 5, 6 e 9 são específicos para GMPc. Entretanto existe ampla evidência que a PDE5 é a principal fosfodiesterase na finalização da via GMPc, sendo sua inibição considerada altamente efetiva no tratamento da disfunção erétil (LUE, 2007).

A tadalafila é um inibidor seletivo da PDE5, com muito pouca atividade sobre as outras fosfodiesterases: o IC_{50} para PDE1, PDE4, PDE7 e PDE10 é maior que 10.000 e estimado em 780 para PDE6. Entretanto, para PDE11A, a tadalafila apresentou uma seletividade cinco vezes maior (IC_{50} 7,1) que a sildenafil (IC_{50} 203). O papel fisiológico da PDE11A, que está predominantemente presente na próstata, testículos e músculo esquelético, e da sua inibição ainda não foram totalmente elucidados (EARDLY *et al.*, 2002).

O AMPc e o GMPc são os segundos mensageiros envolvidos no relaxamento do músculo liso. Eles ativam proteína quinases, que, por sua vez, 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 consequência é a queda do cálcio livre citosólico e relaxamento do músculo liso (LUE, 2007).

Figura 5. Esquema ilustrando a hidrólise do AMPc/GMPc pelos subtipos de PDE e uma possível interação entre os nucleotídeos cíclicos. R+ e R- significam receptores que estão ou não acoplados à AC. PDE, fosfodiesterase, AC, adenilato ciclase, NO, óxido nítrico, PKG1, proteína quinase G1, sGC, guanilato ciclase solúvel, PKA, proteína quinase A.



Fonte: Monica (2009).

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 a adenilato ciclase (AC) a produzir AMPc. A proteína quinase A (PKA) é o principal receptor do AMPc e media a grande maioria dos seus efeitos na célula, fosforilando alvos nos compartimentos citoplasmáticos e nucleares (LUE, 2007).

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

Truss *et al.* (1996) demonstraram pela primeira vez a presença de fosfodiesterases de tipos 1 a 5 em detrusor humano. Na próstata, foi demonstrada a expressão de PDE4 no estroma fibromuscular e nas estruturas glandulares da zona de transição, enquanto expressão de PDE5 foi demonstrada na região glandular (ÜCKERT *et al.*, 2006).

Baseado em sugestões anteriores de que o relaxamento vesical estaria mais relacionado à via do AMPc do que à via do GMPc, foram realizados estudos com o inibidor da fosfodiesterase do tipo 4 (específica para AMPc), demonstrando sua ação no relaxamento do detrusor em humanos (OGER *et al.*, 2007) e cobaias (GILLESPIE *et al.*, 2004). Nishiguchi *et al.* (2007) demonstraram *in vivo* que o inibidor da fosfodiesterase 4 poderia suprimir a hiperatividade detrusora em ratos com obstrução infra-vesical.

Existem mais de 20 variantes diferentes de PDE4, relacionadas com quatro genes (PDE4A-PDE4D). Estudos anteriores revelaram que os níveis de mRNA de PDE4D na bexiga foram os mais altos em 24 diferentes tipos de tecidos humanos, incluindo tecidos do sistema nervoso central e coração (LAKICS *et al.*, 2010)

Andersson (1999) sugeriu que, durante a fase de enchimento, a estimulação de β -AR por noradrenalina liberada por terminais nervosos simpáticos causava uma elevação do AMPc e relaxamento do detrusor. Portanto, a inibição da PDE4 poderia suprimir contrações espontâneas através da potencialização do estímulo simpático no músculo liso da bexiga. Todos esses estudos anteriores sugerem que a PDE4 está envolvida na regulação da via do AMPc (GILLESPIE *et al.*, 2004; NISHIGUCHI *et al.*, 2007; OGER *et al.*, 2007).

A inibição seletiva de PDE4 não afeta a contratilidade do miocárdio de humanos. Portanto, não causam efeitos cardíacos colaterais (JOHNSON *et al.*, 2012). Drogas com ação nas isoformas de PDE4 específicas da bexiga poderiam apresentar alta especificidade para o detrusor com poucos efeitos colaterais na função cardíaca, podendo representar possíveis alvos terapêuticos para bexiga hiperativa (XIN *et al.*, 2014).

Outra abordagem inovadora no tratamento dos homens com LUTS pode ser o aumento da atividade da via NO/GMPc/PKG pelo inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (IPDE5), que pode influenciar vários mecanismos patológicos que contribuem para LUTS.

Adicionalmente, a via do NO/GMPc tem mostrado um efeito antiproliferativo nas células do músculo liso da próstata e bexiga de humanos, o que sugere que o IPDE5, 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 vardenafila por 2 semanas, com diminuição de intervalos de contração e capacidade vesical, observaram

reversão dos parâmetros urodinâmicos, prevenção da ativação da via Rho-quinase, e aumento dos níveis de GMPc *in vivo* (rato) e *in vitro* (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 LUTS causados por hiperatividade do sistema nervoso autônomo parecem reduzir com o tratamento com IPDE5 (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 IPDE5 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 em pacientes com LUTS. Uma possibilidade seria o fato de a melhor função endotelial global aprimorar a perfusão do trato urinário inferior (BERGER *et al.*, 2005).

Embora o mecanismo que justifique a associação entre LUTS e DE não seja totalmente compreendido, as características em comum já citadas, somadas à comprovada presença das enzimas fosfodiesterases no trato urinário inferior (FIBBI *et al.*, 2010), podem justificar a utilização de IPDE5, que é a terapia de primeira linha para DE, para o tratamento de LUTS (ANDERSSON *et al.*, 2011).

O fato de a utilização do tratamento com IPDE5 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) reforçam que a bexiga pode ser um importante alvo terapêutico nos indivíduos com LUTS por HPB tratados com IPDE5 (GACCI *et al.*, 2012).

Em 2002, foi publicado o primeiro relato de que os IPDE5 poderiam estar relacionados à melhora do padrão miccional em homens tratados para DE (SAIRAM *et al.*, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

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

As limitações da terapia antimuscarínica indicam a necessidade de opções de tratamento farmacológico oral efetivo e bem tolerado. O desenvolvimento de novas drogas com diferentes mecanismos de ação para o tratamento da bexiga hiperativa é fundamental. Os agonistas adrenérgicos beta-3 seletivos têm emergido como uma classe de drogas promissora (KHULLAR *et al.*, 2013).

Os nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) são importantes segundos mensageiros, já que regulam a contratilidade do músculo liso. A modulação dos seus níveis através dos inibidores de fosfodiesterases, portanto, deve influenciar a hiperatividade do detrusor, o que fomenta a necessidade de estudos com essas drogas.

O agonista adrenérgico beta-3 seletivo estimula a produção de AMPc e os inibidores de fosfodiesterase inibem a degradação do AMPc (IPDE4) e do GMPc (IPDE5), levando ao relaxamento do detrusor de acordo com estudos anteriormente citados. A associação dessas drogas poderia levar a uma potencialização desse efeito.

Na revisão bibliográfica realizada, não foi encontrado estudo experimental relacionando os IPDE e os agonistas β 3-adrenérgicos em modelos de hiperatividade detrusora *in vitro*. Desse modo, serão avaliados neste estudo os efeitos de relaxamento de dois diferentes IPDE (tadalafila e rolipram) e de um agonista adrenérgico beta-3 seletivo (BRL 37344), isolada ou associadamente, em camundongos normais e com hiperatividade detrusora induzida por administração crônica de L-NAME (N-nitro-L-arginina metil ester hidróclorido).

3 OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar *in vitro* os efeitos da associação de um agonista adrenérgico beta-3 seletivo com dois diferentes inibidores de fosfodiesterases (IPDE4 e IPDE5) em um modelo experimental de hiperatividade detrusora. Verificar se há sinergismo entre essas classes de drogas.

3.2. Específicos

- a. Avaliar o efeito relaxante *in vitro* do agonista adrenérgico beta-3 seletivo (BRL 37344) em um modelo de hiperatividade detrusora por administração crônica de L-NAME.
- b. Avaliar o efeito relaxante *in vitro* do inibidor de fosfodiesterase tipo 5 (tadalafila) em um modelo de hiperatividade detrusora por administração crônica de L-NAME.
- c. Avaliar o efeito relaxante *in vitro* do inibidor de fosfodiesterase tipo 4 (rolipram) em um modelo de hiperatividade detrusora por administração crônica de L-NAME.
- d. Comparar o efeito relaxante das três drogas em animais normais e animais submetidos à exposição crônica de L-NAME.
- e. Comparar o efeito relaxante da associação entre um agonista adrenérgico beta-3 seletivo (BRL 37344) com dois diferentes inibidores de fosfodiesterases (tadalafila e rolipram) em animais submetidos à exposição crônica de L-NAME com o efeito relaxante da mesma combinação de drogas em animais normais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 Tipo de pesquisa:

Este é um estudo laboratorial-experimental de natureza descritiva com análise quantitativa de dados.

4.2 Local:

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fisiofarmacologia Cardiovascular e Renal do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará em conjunto com o biotério da Universidade Federal do Ceará / Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) no período de maio a dezembro de 2015.

4.3 Animais de experimentação:

Foram utilizados camundongos adultos (*Mus Musculus*) machos, com peso entre 35-40g. Os animais ficaram alojados no biotério da Universidade Federal do Ceará, onde foram mantidos em ciclo claro-escuro (12/12h) e tinham à disposição água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (protocolo 29/2015).

4.4 Substâncias utilizadas:

a. N-Nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME)

Potente inibidor da NOS. Obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

b. BRL 37344

Feniletalonamina [(RR + SS) - (F) -4- [2-(2- (3-clorofenil) -2-hidroxietil) amino) propil] fenoxiacetato]. Beta-3 adrenérgico seletivo. Obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

c. Tadalafila

Inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 5. Obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

d. Rolipram

Inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 4. Obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

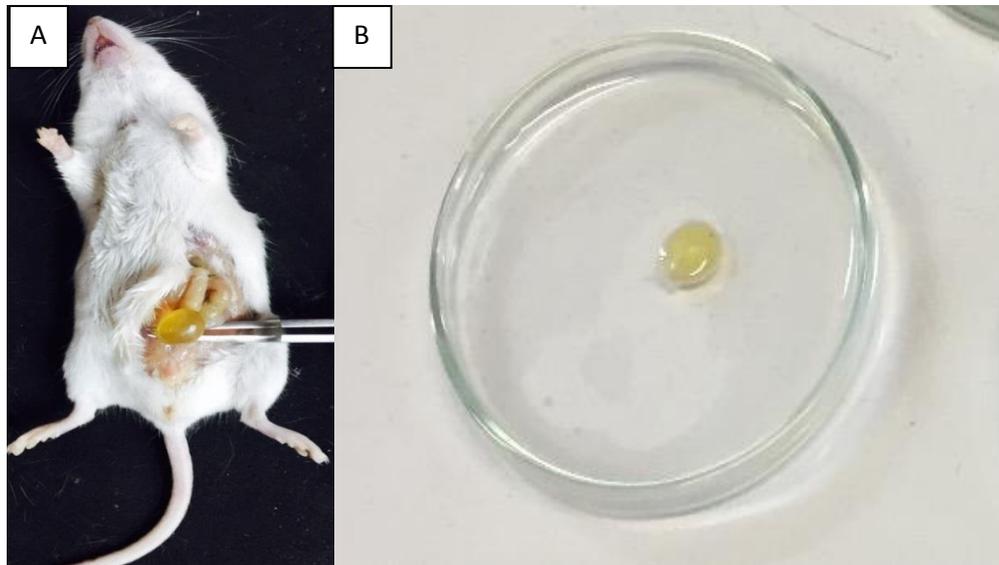
e. DMSO (Dimetilsulfóxido)

Diluyente utilizado para BRL 37344. A máxima concentração de DMSO na solução do banho foi menor que 0,1%. Obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Experimentos-controlados mostraram que as concentrações de DMSO utilizadas não apresentam efeito significativo (relaxamento ou contração) nos fragmentos de bexiga de camundongo.

4.5 Montagem das preparações da musculatura detrusora *in vitro*

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. Após incisão na parede abdominal, as bexigas foram removidas através de uma secção horizontal ao nível dos ureteres. O isolamento do músculo detrusor foi obtido retirando-se a porção da base da bexiga. Em seguida, os tecidos foram transferidos para placas de Petri, contendo solução nutritiva de Krebs (composição mmol/L: NaCl 119,0; KCl 4,7; MgSO₄ 1,5; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25,0; KHPO₄ 1,2 e glicose 11,0; pH 7,4). Cada bexiga foi dividida em dois segmentos de aproximadamente 1,0 x 0,2 cm. Dado o pequeno tamanho das estruturas, foi necessária utilização de lupa para magnificação e material microcirúrgico. As preparações foram montadas em hastes, colocadas em banhos de órgãos de 5 mL de capacidade, contendo solução de Krebs, ajustada para pH 7,4, aerada com uma mistura carbogênica (95% O₂; 5% CO₂) e mantida a 37° C, onde era suspenso através de dois fios de algodão, um em cada extremidade do tecido. Um dos fios ficava conectado a uma base fixa e outro conectado verticalmente a um transdutor de força apropriado para registro isométrico das contrações, conectado a um amplificador (Octal bridge, ADInstruments, Sidney, Austrália). Os sinais elétricos gerados pelo transdutor de força foram decodificados e digitalizados por um sistema de aquisição de dados (PowerLab/400, ADInstruments, Austrália) acoplado a um computador. Os dados foram registrados através do *software* (LabChart) para análise posterior. As preparações foram submetidas a uma tensão basal de 0,5g e as mudanças de tensão foram registradas. Após a colocação dos tecidos nos banhos, ocorria o período de estabilização das preparações, que era de 30 minutos. Neste período, a solução de Krebs-Henseleit era renovada a cada 10 minutos. Em seguida foi iniciado o período de adição das substâncias estudadas.

Figura 6. A – Identificação da bexiga do camundongo. B – Bexiga isolada em Placa de Petri com solução nutritiva.



Fonte: autoria própria.

Figura 7. Sistema para aquisição de dados *in vitro* (banho de órgãos).



Fonte: autoria própria.

4.6 Protocolo experimental

FASE 1

Na primeira fase do protocolo experimental, foram utilizados animais sem tratamento prévio com L-NAME. A contração do tecido era realizada com a adição de KCl na concentração de 40mM. Após a colocação de KCl nos banhos, era esperado um período até obtenção de um platô. Para cada grupo, foram realizados seis a sete experimentos (n = 6-7). Foi investigada a ação de cada uma das substâncias estudadas no relaxamento da musculatura detrusora.

Grupo 1:

Após o período de contração com KCl, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de tadalafila (100pM a 100µM). O efeito de cada concentração foi registrado por 6 minutos.

Grupo 2:

Após o período de contração com KCl, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de rolipram (100pM a 100µM). O efeito de cada concentração foi registrado por 6 minutos.

Grupo 3:

Após o período de contração com KCl, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de BRL 37344 (100pM a 100µM). O efeito de cada concentração foi registrado por 6 minutos.

Grupo 4:

Foi realizada a pré-incubação com tadalafila na concentração de 10µM, com período de estabilização de 30 minutos, seguido por contração com KCl 40mM. Após obtenção do platô, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de BRL 37344 (100pM a 100µM). O efeito de cada concentração foi registrado por 6 minutos.

Grupo 5:

Foi realizada a pré-incubação com rolipram na concentração de 10 μ M, com período de estabilização de 30 minutos, seguido por contração com KCl 40mM. Após obtenção do platô, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de BRL 37344 (100pM a 100 μ M). O efeito de cada concentração foi registrado por 6 minutos.

FASE 2

Na segunda fase do experimento, era realizado o tratamento dos camundongos com L-NAME diluído em água de beber na concentração de 60mg/kg/dia durante 30 dias. A contração do tecido era realizada com a adição de KCl na concentração de 40mM. Após a colocação de KCl nos banhos, era esperado um período até obtenção de um platô. Para cada grupo, foram realizados seis experimentos (n = 6). Foi investigada a ação de cada uma das substâncias estudadas no relaxamento da musculatura detrusora.

Grupo 1:

Após o período de contração com KCl, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de tadalafila (100pM a 100 μ M). O efeito de cada concentração foi registrado por 6 minutos.

Grupo 2:

Após o período de contração com KCl, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de rolipram (100pM a 100 μ M). O efeito de cada concentração foi registrado por 6 minutos.

Grupo 3:

Após o período de contração com KCl, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de BRL 37344 (100pM a 100 μ M). O efeito de cada concentração foi registrado por 6 minutos.

Grupo 4:

Foi realizada a pré-incubação com tadalafila na concentração de 10 μ M, com período de estabilização de 30 minutos, seguido por contração com KCl 40mM. Após obtenção do platô, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de BRL 37344 (100pM a 100 μ M). O efeito de cada concentração foi registrado por 6 minutos.

Grupo 5:

Foi realizada a pré-incubação com rolipram na concentração de 10 μ M, com período de estabilização de 30 minutos, seguido por contração com KCl 40mM. Após obtenção do platô, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de BRL 37344 (100pM a 100 μ M). O efeito de cada concentração foi registrado por 6 minutos.

4.7 Análise estatística

A resposta relaxante foi calculada como porcentagem da contração máxima obtida com KCl (40mM) em cada tecido. Os dados foram expressos em média e erro padrão. O logaritmo das concentrações molares das drogas foi colocado em abscissas e a porcentagem do efeito em ordenadas. Para análise estatística e confecção dos gráficos, foi utilizado o *software* GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, 2007). As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste de variância ANOVA com *post-hoc* SNK (Student-Newman-Keuls) para as comparações entre três médias e pelo teste t de Student para as comparações entre duas médias. Estabeleceu-se o nível de significância em 0,05 (5%), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor P menor que 0,05.

5 RESULTADOS

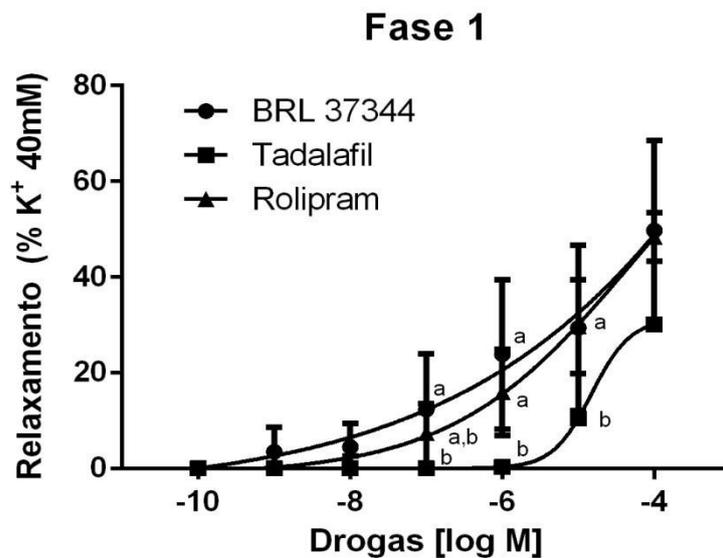
5.1. Fase 1: Animais sem tratamento com L-NAME.

5.1.1. Experimentos sem pré-incubação: comparação do efeito relaxante entre as drogas isoladamente.

Tabela 1. Comparação entre as três drogas (BRL 37344, tadalafila e rolipram). Utilizou-se teste ANOVA *post-hoc* SNK (Student-Newman-Keuls). Considerou-se significativo $p < 0,05$. Valores expressos em média e erro padrão. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tratamento	BRL %REL	TAD %REL	ROL %REL	p*
100 pM	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1,000
1 nM	3,5 (2,0)	0 (0)	0,2 (0,2)	0,116
10 nM	4,5 (1,9)	0 (0)	0,9 (0,7)	0,050
100 nM	12,3 (4,4) ^a	0 (0) ^b	7,4 (2,5) ^{a,b}	0,041
1 μM	23,9 (5,9) ^a	0,3 (0,3) ^b	15,9 (3,7) ^a	0,004
10 μM	29,4 (6,5) ^a	10,4 (0,1) ^b	29,7 (4,0) ^a	0,021
100 μM	49,7 (7,1)	30,1 (0,1)	48,4 (2,0)	0,054

Figura 8. Comparação entre as três drogas (BRL 37344, Tadalafila e Rolipram). Dados obtidos da Tabela 1. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).



Constatou-se que, nas concentrações de 100nM a 10μM, o BRL 37344 apresentou maior efeito relaxante que a tadalafila ($p < 0,05$). Apenas nas concentrações de 1μM e 10μM, o rolipram apresentou maior efeito relaxante que a tadalafila ($p < 0,05$). Os efeitos do BRL

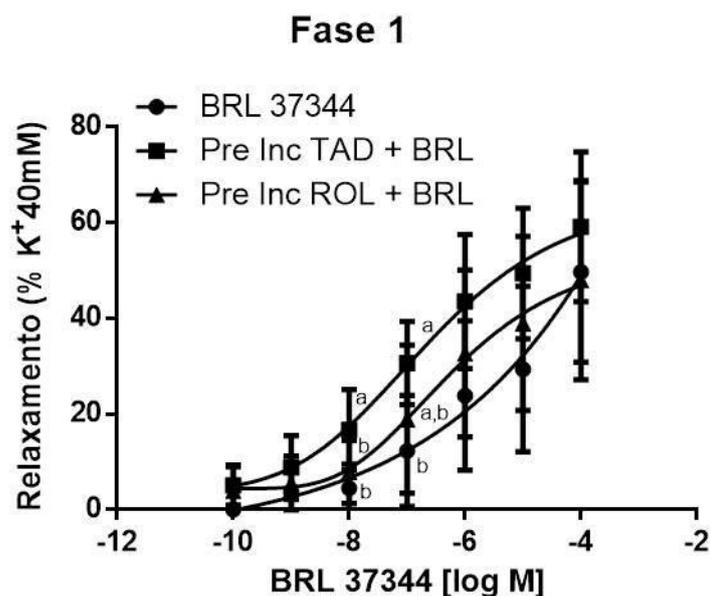
37344 e do rolipram foram iguais em todas as doses. Nas demais concentrações, não houve diferença estatisticamente significativa entre as drogas.

5.1.2. Experimentos com pré-incubação com IPDE

Tabela 2. Comparação entre o efeito relaxante do BRL 37344 em tecidos pré-incubados com tadalafila ou rolipram e tecidos expostos somente ao β_3 -agonista. Utilizou-se teste ANOVA *post-hoc* SNK (Student-Newman-Keuls). Considerou-se significativo $p < 0,05$. Valores expressos em média e erro padrão. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tratamento	BRL	Pre Inc TAD + BRL	Pre Inc ROL + BRL	p*
	%REL	%REL	%REL	
100 pM	0 (0)	5,1 (1,6)	4,0 (1,9)	0,050
1 nM	3,5 (2,0)	8,9 (2,5)	5,5 (2,1)	0,254
10 nM	4,5 (1,9) ^b	16,7 (3,2) ^a	7,9 (2,5) ^b	0,010
100 nM	12,3 (4,4) ^b	30,6 (3,3) ^a	18,9 (5,9) ^{a,b}	0,036
1 μM	23,9 (5,9)	43,5 (5,3)	32,6 (6,6)	0,092
10 μM	29,4 (6,5)	49,4 (5,2)	39,0 (6,9)	0,103
100 μM	49,7 (7,1)	59,2 (5,9)	48,0 (7,9)	0,494

Figura 9. Comparação entre o efeito relaxante do BRL 37344 em tecidos pré-incubados com tadalafila ou rolipram e tecidos expostos somente ao β_3 -agonista. Dados obtidos da Tabela 2. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).



Constatou-se que a pré-incubação com tadalafila aumentou o efeito relaxante do BRL 37344 apenas nas concentrações de 10nM e 100nM ($p < 0,05$). A pré-incubação com rolipram não aumentou o efeito relaxante do BRL 37344 em nenhuma das concentrações. Quando comparamos os dois grupos com pré-incubação (Pre Inc TAD + BRL vs Pre Inc ROL + BRL), obtivemos um relaxamento superior dos tecidos pré-incubados com tadalafila em apenas uma concentração (10nM) ($p < 0,05$). Nas demais doses, não houve diferença estatisticamente significativa entre as comparações.

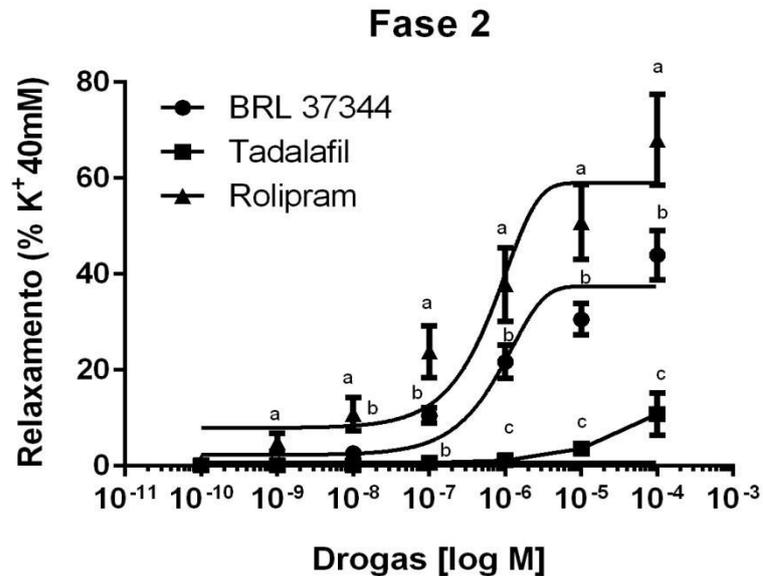
5.2. Fase 2: Animais com tratamento com L-NAME por 30 dias.

5.2.1. Experimentos sem pré-incubação: comparação do efeito relaxante entre as drogas isoladamente.

Tabela 3. Comparação entre as três drogas (BRL 373444, tadalafila e rolipram). Utilizou-se teste ANOVA *post-hoc* SNK (Student-Newman-Keuls). Considerou-se significativo $p < 0,05$. Valores expressos em média e erro padrão. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tratamento	BRL	TAD	ROL	p*
	%REL	%REL	%REL	
100 pM	0 (0)	0 (0)	0,8 (0,5)	0,116
1 nM	0 (0) ^b	0 (0) ^b	4,9 (1,9) ^a	0,010
10 nM	2,6 (1,0) ^b	0 (0) ^b	10,7 (3,4) ^a	0,006
100 nM	10,4 (1,6) ^b	0,6 (0,6) ^b	23,8 (5,4) ^a	0,001
1 μM	21,6 (3,5) ^b	1,1 (0,7) ^c	37,8 (7,8) ^a	<0,001
10 μM	30,5 (3,3) ^b	3,6 (1,2) ^c	50,8 (7,9) ^a	<0,001
100 μM	43,9 (5,2) ^b	10,8 (4,5) ^c	67,0 (9,5) ^a	<0,001

Figura 10. Comparação entre as três drogas (BRL 373444, Tadalafila e Rolipram). Dados obtidos da Tabela 3. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).



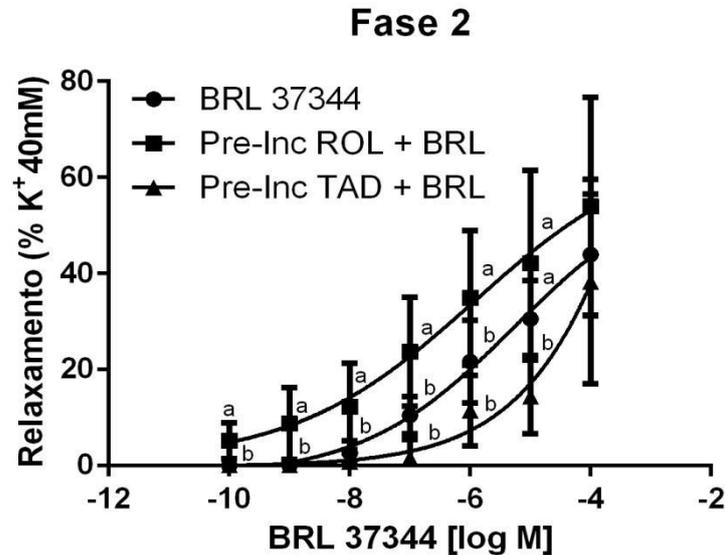
No grupo de animais tratados com L-NAME durante 30 dias, constatou-se que o efeito relaxante do rolipram superou aquele da tadalafila e do BRL 37344 em todas as concentrações excetuando-se a primeira ($p < 0,05$). Por sua vez, o BRL 37344 mostrou-se capaz de produzir relaxamento superior ao da tadalafila nas concentrações de $1\mu\text{M}$ a $100\mu\text{M}$ ($p < 0,05$).

5.2.2. Experimentos com pré-incubação com IPDE.

Tabela 4. Comparação entre o efeito relaxante do BRL 37344 em tecidos pré-incubados com tadalafila ou rolipram e tecidos expostos somente ao β_3 -agonista. Utilizou-se teste ANOVA *post-hoc* SNK (Student-Newman-Keuls). Considerou-se significativo $p < 0,05$. Valores expressos em média e erro padrão. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tratamento	BRL	Pre Inc TAD + BRL	Pre Inc ROL + BRL	p*
	%REL	%REL	%REL	
100 Pm	0 (0) ^b	0 (0) ^b	5,2 (1,5) ^a	0,001
1 nM	0 (0) ^b	0 (0) ^b	8,7 (3,1) ^a	0,004
10 nM	2,6 (1,0) ^b	0,8 (0,8) ^b	12,2 (3,7) ^a	0,006
100 nM	10,4 (1,6) ^b	1,6 (1,6) ^b	23,6 (4,6) ^a	<0,001
1 μM	21,6 (3,5) ^b	11,4 (3,0) ^b	34,9 (5,7) ^a	0,005
10 μM	30,5 (3,3) ^a	14,3 (3,2) ^b	42,1 (7,9) ^a	0,007
100 μM	43,9 (5,2)	38,3 (8,7)	53,9 (9,3)	0,392

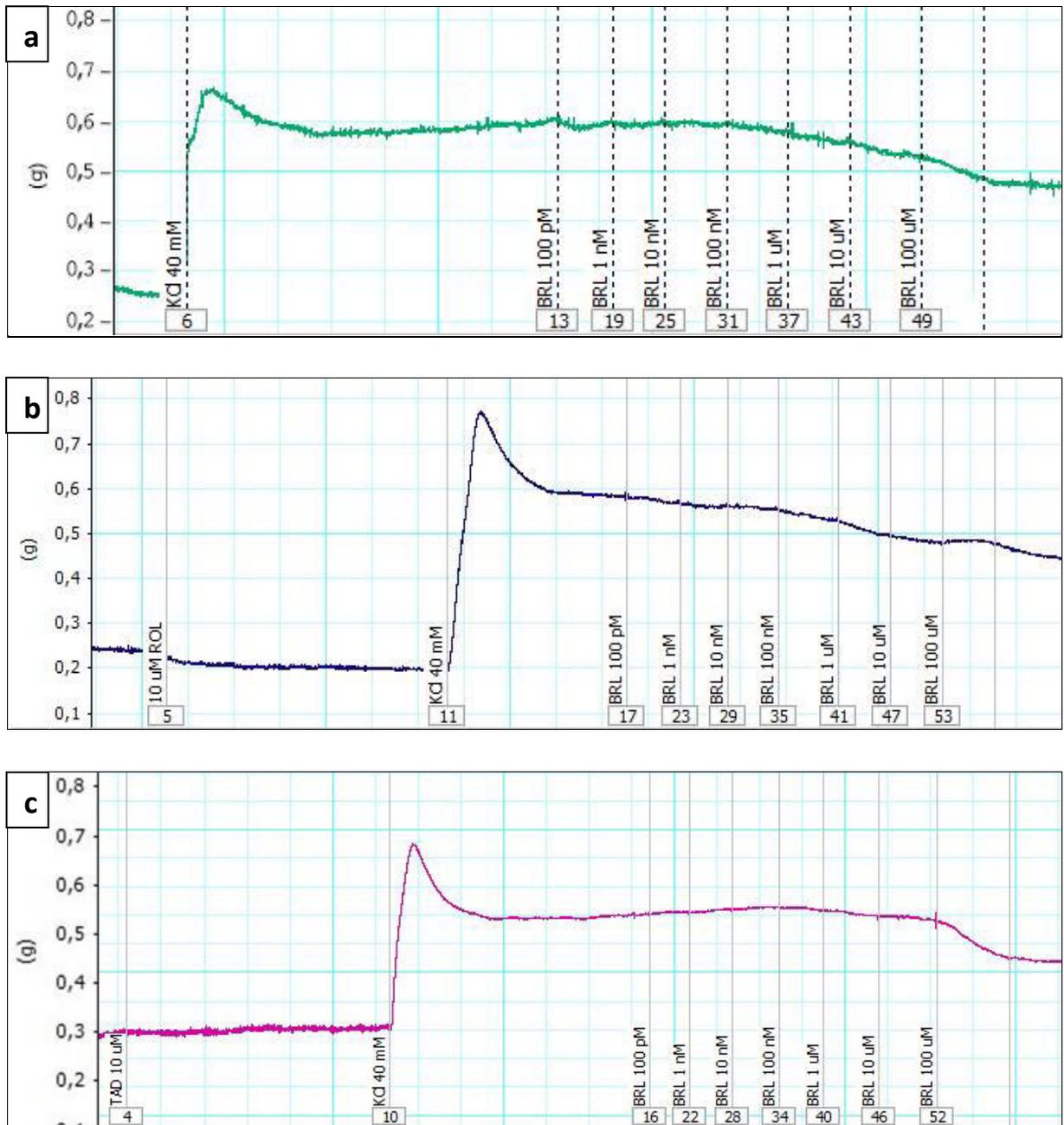
Figura 11. Comparação entre o efeito relaxante do BRL 37344 em tecidos pré-incubados com tadalafila ou rolipram e tecidos expostos somente ao β 3-agonista. Dados obtidos da Tabela 4. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).



Nos animais expostos a L-NAME por 30 dias, verificou-se que a pré-incubação com rolipram aumentou o efeito relaxante do BRL 37344 nas concentrações 100pM a 1 μ M ($p < 0,05$). A pré-incubação com tadalafila não melhorou o efeito relaxante do BRL 37344, chegando até mesmo a piorá-lo em uma das concentrações (10 μ M). Quando comparamos os dois grupos com pré-incubação (Pre Inc TAD + BRL vs Pre Inc ROL + BRL), obtivemos um relaxamento superior dos tecidos pré-incubados com rolipram em todas as doses, excetuando-se a última ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as demais comparações.

A seguir, ilustramos o relaxamento obtido com o BRL 37344 após contração com KCl em um dos experimentos sem pré-incubação (Figura 12.a) e com tecidos pré-incubados com rolipram (Figura 12.b) e com tadalafila (Figura 12.c), em animais tratados com L-NAME.

Figura 12. Curva obtida em um dos experimentos com BRL 37344 isoladamente (a) e com pré-incubação com rolipram (b) ou tadalafila (c), em animais tratados com L-NAME.



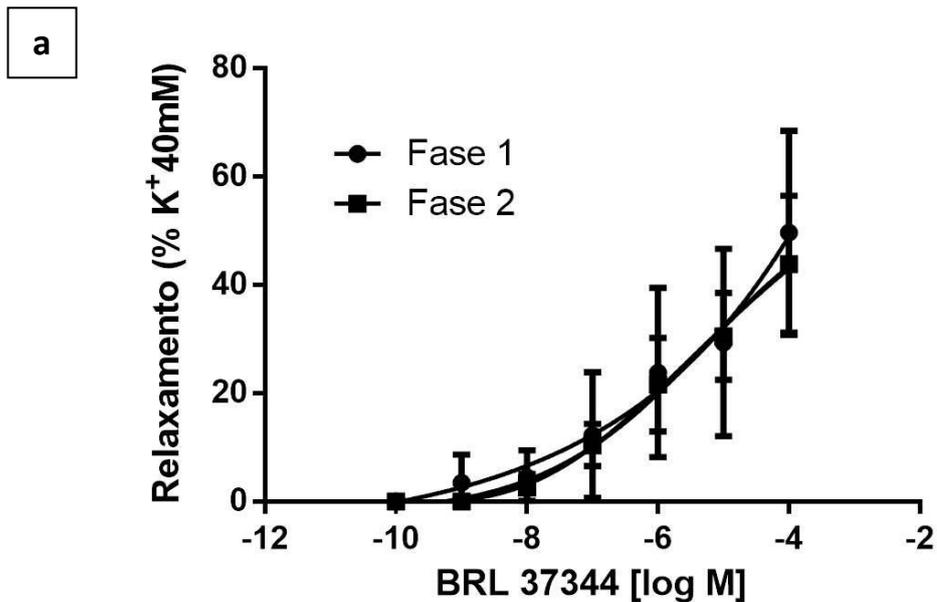
5.3. Comparação entre os resultados do grupo não-exposto a L-NAME e do grupo exposto ao L-NAME (Fase 1 vs Fase 2)

Tabela 5. Comparação para cada concentração entre o relaxamento obtido em animal sem tratamento com L-NAME vs animal tratado com L-NAME. Utilizou-se teste t de Student. Considerou-se significante $p < 0,05$. Valores expressos em média e erro padrão.

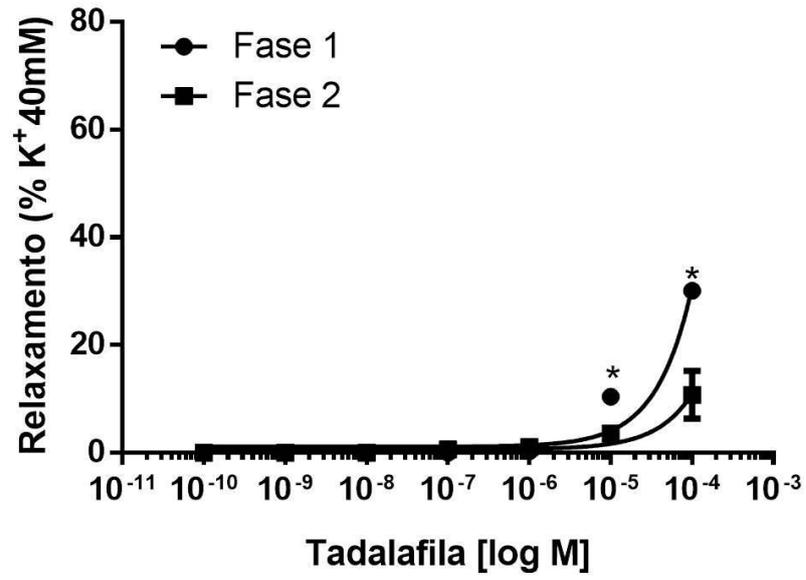
	Fase 1	Fase 2	
	BRL (%REL)	BRL (%REL)	p*
100 pM	0 (0)	0 (0)	1,000
1 nM	3,5 (2,0)	0 (0)	0,130
10 nM	4,5 (1,9)	2,6 (1,0)	0,420
100 nM	12,3 (4,4)	10,4 (1,6)	0,717
1 µM	23,9 (5,9)	21,6 (3,5)	0,759
10 µM	29,4 (6,5)	30,5 (3,3)	0,886
100 µM	49,7 (7,1)	43,9 (5,2)	0,536
	TAD (%REL)	TAD (%REL)	p*
100 pM	0 (0)	0 (0)	1,000
1 nM	0 (0)	0 (0)	1,000
10 nM	0 (0)	0 (0)	1,000
100 nM	0 (0)	0,6 (0,6)	0,341
1 µM	0,3 (0,3)	1,1 (0,7)	0,325
10 µM	10,4 (0,1)	3,6 (1,2)	0,014
100 µM	30,1 (0,1)	10,8 (4,5)	0,029
	ROL (%REL)	ROL (%REL)	p*
100 pM	0 (0)	0,8 (0,5)	1,000
1 nM	0,2 (0,2)	4,9 (1,9)	0,038
10 nM	0,9 (0,7)	10,7 (3,4)	0,018
100 nM	7,4 (2,5)	23,8 (5,4)	0,020
1 µM	15,9 (3,7)	37,8 (7,8)	0,028
10 µM	29,7 (4,0)	50,8 (7,9)	0,037
100 µM	48,4 (2,0)	67,0 (9,5)	0,071

De acordo com a tabela acima, não houve diferença entre o efeito relaxante do BRL 37344 quando comparamos cada concentração no grupo tratado com L-NAME vs grupo sem tratamento com L-NAME (Figura 13.a). Quando avaliamos o efeito da tadalafila (Figura 13.b), houve um menor efeito relaxante nas duas maiores concentrações (10 μ M e 100 μ M) na Fase 2 ($p < 0,05$). Quanto ao rolipram (Figura 13.c), seu efeito relaxante foi maior nos animais tratados com L-NAME na maioria das concentrações estudadas (1nM a 10 μ M; $p < 0,05$).

Figura 13. Comparação entre o relaxamento obtido em animal sem tratamento com L-NAME vs animal tratado com L-NAME para cada uma das três drogas, BRL 37344 (a), tadalafila (b) e rolipram (c). Considerou-se significativo $p < 0,05$. Dados obtidos da tabela 5. * $p < 0,05$ (teste t de Student).



b



c

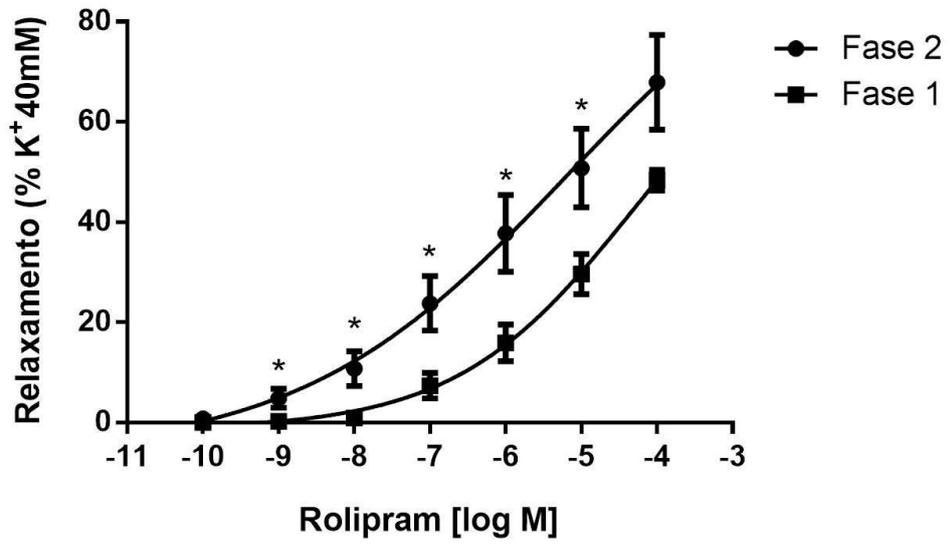


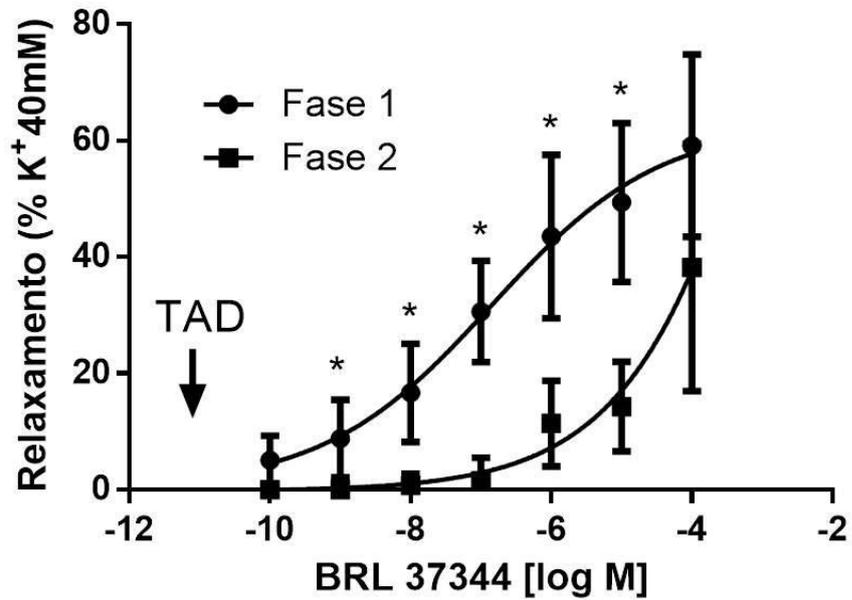
Tabela 6. Comparação para cada concentração entre o relaxamento obtido em animal sem tratamento com L-NAME vs animal tratado com L-NAME nos experimentos com pré-incubação com IPDE. Utilizou-se teste t de Student. Considerou-se significativo $p < 0,05$. Valores expressos em média e erro padrão.

	Fase 1	Fase 2	p*
	Pre Inc TAD + BRL (%REL)	Pre Inc TAD + BRL (%REL)	
100 pM	5,1 (1,6)	0 (0)	1,000
1 nM	8,9 (2,5)	0 (0)	0,008
10 nM	16,7 (3,2)	0,8 (0,8)	0,001
100 nM	30,6 (3,3)	1,6 (1,6)	<0,001
1 μM	43,5 (5,3)	11,4 (3,0)	<0,001
10 μM	49,4 (5,2)	14,3 (3,2)	<0,001
100 μM	59,2 (5,9)	38,3 (8,7)	0,066
	Pre Inc ROL + BRL (%REL)	Pre Inc ROL + BRL (%REL)	p*
100 pM	4,0 (1,9)	5,2 (1,5)	1,000
1 nM	5,5 (2,1)	8,7 (3,1)	0,406
10 nM	7,9 (2,5)	12,2 (3,7)	0,339
100 nM	18,9 (5,9)	23,6 (4,6)	0,550
1 μM	32,6 (6,6)	34,9 (5,7)	0,805
10 μM	39,0 (6,9)	42,1 (7,9)	0,770
100 μM	48,0 (7,9)	53,9 (9,3)	0,636

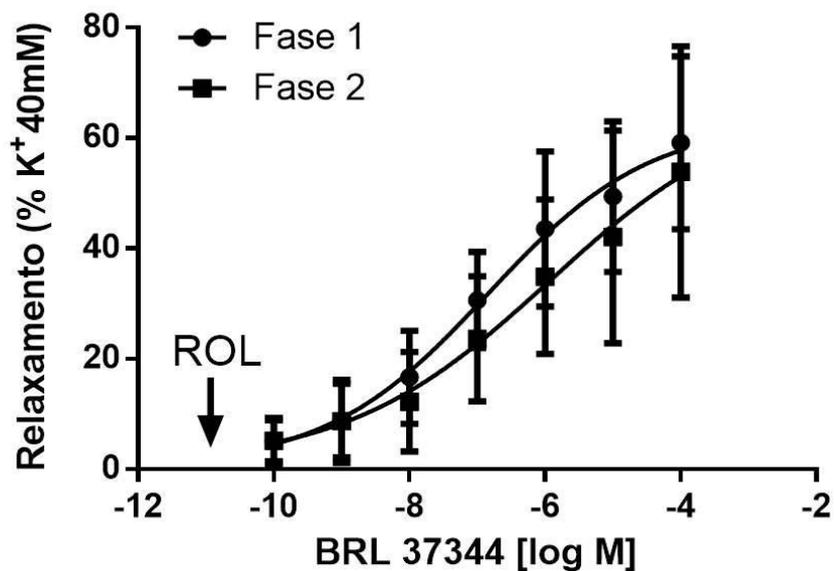
Avaliando a tabela acima, verifica-se que o relaxamento obtido com a associação entre tadalafila e BRL 37344 (Figura 14.a) é menor nos animais tratados com L-NAME, nas concentrações de 1nM a 10μM ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos o efeito da associação de rolipram com BRL 37344 nas duas fases (Figura 14.b).

Figura 14. Comparação para cada concentração entre o relaxamento obtido em animal sem tratamento com L-NAME vs animal tratado com L-NAME nos experimentos com pré-incubação com tadalafila (a) e rolipram (b). Considerou-se significativo $p < 0,05$. Dados obtidos da tabela 6. * $p < 0,05$ (teste t de Student).

a



b



6 DISCUSSÃO

Os experimentos realizados foram divididos em duas fases. Na primeira fase, utilizamos camundongos sem tratamento prévio. Em uma segunda fase, os animais foram submetidos a tratamento com L-NAME por 30 dias, para posterior sacrifício e exposição dos tecidos às drogas estudadas.

A escolha das drogas baseou-se em estudos anteriores. Badawi *et al.* (2007) compararam o efeito relaxante em músculo detrusor humano de agonistas adrenérgicos beta-3 seletivos, agonistas beta-2 seletivos e agonistas beta não-seletivos. Utilizou, como no presente estudo, o BRL 37344. Como resultado, mostrou um papel preponderante dos receptores adrenérgicos beta-3 no relaxamento detrusor humano.

Os efeitos *in vivo* dos β_3 -AR têm sido estudados em diversos modelos animais. Fujimura *et al.* (1999), utilizando modelo de ratos não-anestesiados com hiperatividade detrusora induzida por injeção de ácido ibutérico, testaram a administração oral de agonista β_3 adrenérgico FK-175 na dose de 10mg/kg e observaram capacidade vesical significativamente aumentada, sem aumento na pressão de micção ou limiar de pressão. Da mesma forma, cistometria em ratos após administração intravenosa de CL316243, outro agonista β_3 adrenérgico, mostrou aumento da capacidade vesical, sem aumento no volume residual (TAKEDA *et al.*, 2000). Kullmann *et al.* (2009) evidenciaram que BRL 37344 (5mg/kg), injetado por via intraperitoneal em ratos ooforectomizados não-anestesiados, diminuía a frequência de micção em 40-70%.

Kaidoh *et al.* (2002) evidenciaram que o CL316243, um agonista adrenérgico beta-3 seletivo, suprimia a hiperatividade detrusora, sem aumento do resíduo pós-miccional e efeitos adversos cardiovasculares significantes em ratos com infarto cerebral.

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

Em três ensaios clínicos de Fase III, a administração de Mirabegron (agonista β_3 -adrenérgico), nas doses de 25, 50 e 100mg, apresentou 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) comprovaram melhora semelhante com 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.

Moreno *et al.* (2014) analisaram 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, vardenafila e tadalafila. Demonstraram eficácia das drogas na proteção dos animais à ação deletéria vesical decorrente da exposição a L-NAME, evidenciando que os resultados observados eram independentes da droga. No presente estudo, foi utilizada a tadalafila como representante dos IPDE5.

Para representar a classe dos IPDE4, utilizou-se o rolipram. Xin *et al.* (2014) submeteram detrusor de cobaias ao rolipram em doses de 0,1nM a 10µM. Na maior concentração (10µM), houve melhor resposta na inibição da contração do detrusor. No presente estudo, utilizou-se a mesma dose para pré-incubação com IPDE4. Johnson *et al.* (2012) utilizaram rolipram na dose de 10µM para mostrar sua ação em miócitos de ventrículo humano.

Existem poucos estudos *in vitro* que utilizaram camundongo como modelo animal. A maioria das publicações utiliza animais de maior porte. Ramos-Filho *et al.* (2014) avaliaram *in vitro* o efeito do mentol na contratilidade do detrusor de camundongos. O pequeno tamanho das estruturas do modelo utilizado em nosso estudo gerou algumas dificuldades iniciais durante a manipulação dos tecidos, que foram superadas com a utilização de lupa para magnificação e material microcirúrgico.

Recentemente, combinações de drogas para o tratamento de LUTS/HPB têm sido estabelecidas como padrão para esse 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 com 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 LUTS misto. A terapia com alfa-bloqueador e antimuscarínico poderia ser utilizada para homens com sintomas de armazenamento apesar do tratamento com alfa-bloqueador, ou como tratamento inicial para homens com LUTS misto com sintomas de armazenamento moderados a graves (FULLHASE *et al.*, 2013; OELKE *et al.*, 2013).

Em estudo randomizado de fase II, a combinação de solifenacina e tansulosina mostrou-se mais eficaz em homens com sintomas moderados a graves de armazenamento.

Aumento do resíduo pós-miccional não foi clinicamente relevante e não houve maior incidência de retenção urinária aguda (VAN KERREBROECK *et al.*, 2013).

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).

Até o presente momento, não há nenhum estudo que avalia *in vitro* a associação de agonistas adrenérgicos beta-3 seletivos com IPDE5 ou IPDE4. Recentemente, Carvalho, M. F. (2015) estudou *in vivo* a associação de BRL 37344 e tadalafila em bexiga de camundongos; no entanto, apesar de isoladamente as drogas terem promovido efeito relaxante, com melhora da hiperatividade detrusora no estudo cistométrico, não foi observado sinergismo com a sua associação.

Na primeira fase dos nossos experimentos, a tadalafila foi a droga que produziu o menor relaxamento quando comparado àquele produzido pelo BRL 37344 e pelo rolipram (Tabela 1; Figura 8). Estes achados estão de acordo com estudos já citados anteriormente, que sugerem que o GMPc está principalmente relacionado ao relaxamento uretral, e o AMPc ao relaxamento vesical (MASUDA *et al.*, 2002; MORITA *et al.*, 1992; PERSSON *et al.*, 1992). Vale ressaltar que a tadalafila, diferentemente das outras substâncias, somente começou a produzir algum efeito a partir da quinta concentração estudada. Talvez, se utilizado um maior número de doses ou doses maiores da tadalafila, poder-se-iam obter resultados diferentes com este IPDE5.

Por outro lado, quando se associou tadalafila ao beta-3 agonista, houve um aumento do relaxamento em duas das concentrações estudadas (Tabela 2; Figura 9), ou seja, o IPDE5 potencializou a ação do beta-3 agonista nestas concentrações, o que sugere que a estimulação de ambas as vias (GMPc e AMPc) pode ter algum papel no relaxamento do detrusor. Este efeito aditivo pode também ser atribuído à ação moduladora do NO sobre outros transmissores, como aventado por outros autores (FELSSSEN *et al.*, 2003; JOHANSSON *et al.*, 2002; LEMACK *et al.*, 2000).

Em resumo, a função do NO na musculatura detrusora ainda não está estabelecida, apesar de estudos experimentais com inibição da síntese de NO terem resultado em aumento da atividade vesical *in vivo* (CARVALHO, M. F. *et al.*, 2015; MORENO *et al.*, 2014; REGES *et al.*, 2013).

A administração crônica de N^ω-nitro-L-arginina metil ester hidrocrolido (L-NAME) resulta em depleção de NO, que causa hiperatividade detrusora em nível vesical e aumento da resistência ao fluxo urinário em nível uretral. O tratamento de animais durante quatro semanas com L-NAME resulta em aumento da sensibilidade da musculatura detrusora

a agonistas muscarínicos e diminuição do relaxamento detrusor mediado por receptores beta-3 adrenérgicos (MONICA *et al.*, 2008). No presente estudo, não houve diferença entre o efeito relaxante do BRL 37344 quando comparamos cada concentração no grupo tratado com L-NAME vs grupo sem tratamento com L-NAME (tabela 5; figura 13.a).

Este modelo experimental de obstrução infra-vesical já foi utilizado em vários estudos anteriores. 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 (CARVALHO, M. F. *et al.*, 2015; REGES *et al.*, 2013).

Reges *et al.* (2013) demonstraram que a administração aguda de sildenafil resultou em diminuição do número de ciclos miccionais em ratos com deficiência crônica de NO.

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).

Carvalho, R. F. (2015), em estudo com camundongos submetidos à castração hormonal e administração diária de tadalafila, utilizando o mesmo modelo experimental de hiperatividade detrusora secundária à depleção crônica de óxido nítrico, constatou eficácia semelhante da tadalafila e castração em reduzir a hiperatividade detrusora e relaxar a uretra, sugerindo uma via alternativa andrógeno-dependente relacionada com contração e relaxamento do músculo liso.

De acordo com nossos resultados, a tadalafila (IPDE5) apresentou menor efeito relaxante *in vitro* em animais com hiperatividade detrusora induzida pela inibição da sintase de NO. A pré-incubação com tadalafila também não aumentou o relaxamento induzido pelo beta-3 agonista adrenérgico nesta fase de experimentos.

Por outro lado, neste grupo de animais, o rolipram apresentou o melhor efeito relaxante dentre as drogas estudadas (Tabela 3, Figura 10). Estes resultados estão de acordo com estudo anterior (NISHIGUCHI *et al.*, 2007), que demonstrou *in vivo* que o inibidor da fosfodiesterase 4 poderia suprimir a hiperatividade detrusora em ratos com obstrução infra-vesical.

Nos experimentos com os animais tratados com L-NAME, quando se associou o beta-3 agonista com o inibidor de fosfodiesterase (IPDE4 ou IPDE5), obteve-se um efeito aditivo muito maior do rolipram do que a da tadalafila (Tabela 4, Figura 11), ou seja, o IPDE4 levou a uma potencialização do estímulo simpático no músculo liso da bexiga.

Diferentemente dos animais sem tratamento com L-NAME, neste grupo de camundongos, a tadalafila não aumentou o relaxamento do BRL 37344.

Pode-se sugerir que a ausência de potencialização no efeito relaxante pelo IPDE5 talvez ocorra devido à diminuição do substrato dessa enzima, já que nesse modelo de hiperatividade, há uma inibição quase que completa da NOS. Haveria, portanto, uma diminuição importante de GMPc.

Desde 1998, a sildenafil (IPDE5) é uma droga amplamente utilizada para DE. As taxas de resposta são de 84% em pacientes com causa psicogênica para DE e de apenas 43-52% em pacientes em que a produção local ou central de NO está prejudicada (por exemplo, diabéticos e aqueles com inervação pélvica comprometida) (ÜCKERT *et al.*, 2006). Raciocínio análogo poderia explicar os nossos resultados, em que a tadalafila apresentou efeito inferior nos animais tratados com inibidor da NOS, principalmente nos experimentos em que se associou tadalafila com BRL 37344, onde tal achado ocorreu em praticamente todas as concentrações estudadas (tabela 6; figura 14.a). Nos experimentos apenas com a tadalafila, embora menos claramente, observou-se a mesma tendência, já que essa droga apresentou menor efeito relaxante nos animais tratados com L-NAME nas duas últimas concentrações (tabela 5; figura 13.b). A depleção de NO pela inibição de NOS pode justificar o menor efeito do IPDE5 nesses animais; por outro lado, também sugere a presença dessa fosfodiesterase no detrusor de camundongo, já que, nos animais com a via NO/GMPc intacta, a tadalafila parece ter melhor efeito quando comparado aos mesmos experimentos nos animais tratados com L-NAME (FASE 1 vs FASE 2; tabela 5).

O fato de tanto os IPDE4 como os antimuscarínicos relaxarem o detrusor através da via do AMPc levanta a hipótese de que os IPDE4 podem ter valor no tratamento de LUTS em humanos. Os IPDE4 aumentam os níveis intracelulares de AMPc, suprimindo sua hidrólise. Os receptores muscarínicos M2 inibem a adenilato ciclase através de $G_{i/o}$. 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 podem formar uma excelente combinação para o relaxamento do detrusor no futuro (YOSHIMURA *et al.*, 2007).

Kaiho *et al.* (2007) compararam os efeitos de um inibidor específico de PDE4 com um antimuscarínico bastante utilizado na prática clínica (tolterodina) em ratos com obstrução do trato urinário inferior. As duas drogas reduziram a hiperatividade detrusora em ratos; no entanto, somente o IPDE4 não interferiu na pressão de micção. A ausência de ação na fase de

esvaziamento do IPDE4 poderia representar uma menor possibilidade de aumento de resíduo pós-miccional em um possível uso clínico, o que ocorre algumas vezes quando antimuscarínicos são prescritos para pacientes com obstrução do trato urinário inferior.

Apesar dos resultados aqui apresentados, bem como aqueles encontrados por outros autores (GILLESPIE *et al.*, 2004; KAIHO *et al.*, 2007; NISHIGUCHI *et al.*, 2007; OGER *et al.*, 2007), sugerirem que os IPDE4 podem representar um promissor alvo terapêutico para LUTS, outros estudos apontaram limitações para seu uso devido à presença de efeitos adversos importantes, como mesenterite vascular em ratos (MECKLENBURG *et al.*, 2006) e vômitos em humanos (GIEMBYCZ *et al.*, 2005). Estudos adicionais seriam necessários para determinar se efeitos terapêuticos na hiperatividade detrusora podem ser alcançados com doses toleráveis de IPDE4.

Os resultados do presente estudo mostraram que, nos tecidos de camundongos com hiperatividade detrusora por inibição crônica de NOS, o rolipram induziu relaxamento superior àquele da tadalafila e mesmo àquele do BRL 37344 em praticamente todas as concentrações estudadas. Quando comparamos o efeito individual de cada droga, o rolipram foi o que apresentou o melhor relaxamento na Fase 2 (Figura 10). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que utilizaram outro modelo de hiperatividade detrusora (ligadura parcial da uretra) e mostraram *in vivo* que o IPDE4 reduziu hiperatividade em ratos (KAIHO *et al.*, 2007, NISHIGUCHI *et al.*, 2007).

Diferentemente da associação do IPDE5 com o agonista adrenérgico beta-3 seletivo, o rolipram aumentou o efeito relaxante do BRL 37344 de maneira significativa (Tabela 4, Figura 11). Explicação razoável para os achados seria a potencialização do IPDE4 na via do AMPc estimulada pelo agonista adrenérgico beta-3 seletivo. O beta-agonista estimula a síntese de AMPc através da ativação da adenilato ciclase, enquanto o IPDE4 impede sua hidrólise. Este aparente sinergismo reforça a hipótese de estudos anteriores de que o relaxamento vesical estaria mais relacionada à via do AMPc do que a do GMPc. Aparentemente a inibição de PDE4 pode potencializar um aumento de AMPc gerado por outro tipo de estímulo.

Baseado no conhecimento atual dos mecanismos fisiológicos do trato urinário inferior, é razoável crer que a modulação das fosfodiesterases possa exercer um papel no tratamento da hiperatividade detrusora, potencializando drogas já utilizadas, como os beta-3 agonistas. Os nossos resultados sugerem que um importante papel no tônus do músculo detrusor deve ser considerado para a via da AC/AMPc/PKA. Os achados fornecem substrato

para maiores investigações a respeito do efeito dos IPDE4, IPDE5 e de sua associação com beta-agonistas em outros modelos de hiperatividade detrusora.

Os inibidores das fosfodiesterases, associados aos já comprovadamente eficazes beta-3 agonistas, podem representar uma nova abordagem dos pacientes com sintomas de armazenamento, com maior taxa de sucesso que a monoterapia e eliminação dos efeitos adversos da terapia anticolinérgica. Novos estudos irão delinear qual(is) fosfodiesterase(s) terá(ão) papel clínico no tratamento da bexiga hiperativa.

7 CONCLUSÕES

No modelo experimental de hiperatividade detrusora induzida por depleção crônica de NO, o IPDE4 apresentou maior efeito relaxante que o IPDE5.

Neste mesmo modelo, o IPDE4 potencializou o efeito relaxante do agonista adrenérgico beta-3 seletivo, o que não foi observado com o IPDE5, sugerindo um importante papel da via do AMPc no relaxamento do detrusor de camundongos.

REFERÊNCIAS

- 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. *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. *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. *et al.* Phosphodiesterases (PDES) and PDE inhibitors for treatment of LUTS. **Neurourol Urodyn**, v. 26, p. 928-933, 2007.
- ANDERSSON, K. E. *et al.* Tadalafil for the treatment of lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: pathophysiology and mechanism(s) of action. **Neurourol 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.
- BADAWI, J. K. *et al.* Relaxation of human detrusor muscle by selective beta-2 and beta-3 agonists and endogenous catecholamines. **Urology**, v. 69, p. 785-90, 2007
- BERGER, A. P. *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, M. F. **Análise do efeito de inibidores de fosfodiesterase do tipo 5 e agonistas beta adrenérgicos em parâmetros urodinâmicos de camundongos utilizando modelo experimental de hiperatividade detrusora.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médico- Cirúrgicas) – Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2015.

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.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgicas) – Faculdade de Medicina. 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. *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.

DE GROAT, W. C.; YOSHIMURA, N. Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. **Prog Brain Res**, v. 152, p. 59–84, 2006.

ELBADAWI, A. Ultrastructure of vesicourethral innervation: II. Postganglionic axoaxonal synapses in intrinsic innervation of the vesicourethral lissosphincter: A new structural and functional concept in micturition. **J Urol.**, v. 131, p. 781-790, 1984.

EARDLEY, I; CARTLEDGE, J. Tadalafil (CIALIS) for men with erectile dysfunction. **Int J Clin Pract**, V. 56, p. 300–304, 2002.

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. *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. *et al.* Inducible nitric oxide synthase promotes pathophysiological consequences of experimental bladder outlet obstruction. **J Urol**, v. 169, p. 1569-1572, 2003.
- FIBBI, B. *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. *et al.* Characterization and functional role of androgen-dependent PDE5 activity in the bladder. **Endocrinology**, v. 148, p. 1019-1029, 2007.
- FULLHASE, C. *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. *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. *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. *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. *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.
- GIEMBYCZ, M. A. Life after PDE4: overcoming adverse events with dual-specificity phosphodiesterase inhibitors. **Curr Opin Pharmacol**, v. 5, p. 238-244, 2005.
- GILLESPIE, J. L. Noradrenalin inhibits autonomous activity in isolated guinea pig bladder. **BJU Int**, v. 93, n. 3, p. 401-409, 2004.
- GOSLING, J. A.; DIXON, J. S.; LENDON, R. G. The autonomic innervation of the human male and female bladder neck and proximal urethra. **J Urol**, v. 118, p. 302-305, 1977.
- 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. *et al.* Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. **J Sex Med**, v. 7, p. 445-475, 2010.

HRISTOV, K. L. *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. *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. *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. *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. *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.

JOHNSON, W. B. *et al.* Profiling of cAMP and cGMP phosphodiesterases in isolated ventricular cardiomyocytes from human hearts: comparison with rat and guinea pig. **Life Sci**, v. 90, p. 328-336, 2012.

KAIDOH, K. *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. *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. *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. *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.

LAKICS, V.; KARRAN, E. H.; BOESS, F. G. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. **Neuropharmacology**, v. 59, p. 367-374, 2010.

- 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. *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. *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. *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. *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. *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. *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.
- MECKLENBURG, L. *et al.* Mesenteritis precedes vasculitis in the rat mesentery after subacute administration of a phosphodiesterase type 4 inhibitor. **Toxicol Lett**, v. 163, p. 54-64, 2006.
- MEIGS, J. B. *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.; REES, D.; SCHULZ R.; PALMER, R. M. 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. **Efeitos da inibição crônica da sintase de óxido nítrico em músculo liso detrusor isolado de rato**. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.
- MONICA, F. Z. *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. *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. *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. *et al.* Acute vardenafil administration improves bladder oxygenation in spontaneously hypertensive rats. **J Sex Med**, v. 7, p. 107-120, 2010.

MORELLI, A. *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.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgicas) – Faculdade de Medicina. 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. *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. *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.

RAMOS-FILHO, A. C. *et al.* Menthol inhibits detrusor contractility independently of TRPM8 activation. **PLoS One**, v. 11, e111616, 2014.

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

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

- REGADAS, R. P. *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. *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. *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. *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. *et al.* Sildenafil influences lower urinary tract symptoms. **BJU Int**, v. 90, p. 836-839, 2002.
- SEGUCHI, H. *et al.* Expression of beta3-adrenoceptors in rat detrusor smooth muscle. **J Urol**, v. 159, p. 2197-2201, 1998.
- SEFTEL, A. D. *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. *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. *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. *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. *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. *et al.* Future pharmacotherapies for male urinary tract symptoms. **Curr Bladder Dysfunct Rep**, v. 9, p. 134-141, 2014.
- STENGEL, P. W. *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.

STEWART, W. F. *et al.* Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. **World J Urol**, v. 20, p. 327-336, 2003.

STUEHR D. J. 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. *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.

UCKERT, S. *et al.* Update on phosphodiesterase (PDE) isoenzymes as pharmacologic targets in urology: present and future. **Eur Urol**, v. 50, p. 1194-207, 2006.

VAN KERREBROECK, P. *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. *et al.* The impact of lower urinary tract symptoms on male sexual health: EpiLUTS. **BJU Int**, v. 103, p. 33-41, 2009.

WILSON, S. *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. *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. *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. *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 A – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA



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 29/2015, sobre o projeto intitulado: “Avaliação in vitro do efeito de inibidores de fosfodiesterase do tipo 5 e agonistas beta-adrenérgicos em modelo experimental de hiperatividade destrusora secundária à inibição crônica de sintase de óxido nítrico”, de responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira 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, 27 de março de 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Rodrigo', is written over the printed name of the coordinator.

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 Siapa: 1520734