

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

**ALINE GONÇALVES MORA**

**AÇÃO DO TADALAFIL NO TRATAMENTO DAS ALTERAÇÕES  
CARDÍACAS, RENAS E DO TRATO URINÁRIO INFERIOR EM  
RATOS COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA**

BRAGANÇA PAULISTA  
2017

**ALINE GONÇALVES MORA – RA: 001201503911**

**AÇÃO DO TADALAFIL NO TRATAMENTO DAS ALTERAÇÕES  
CARDÍACAS, RENAS E DO TRATO URINÁRIO INFERIOR EM  
RATOS COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós – Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Dr. Mário Angelo Claudino

BRAGANÇA PAULISTA  
2017

WG 142 Mora, Aline Gonçalves.  
M816a Ação do Tadalafil no tratamento das alterações  
cardíacas, renais e do trato urinário inferior em ratos com  
insuficiência cardíaca / Aline Gonçalves Mora. --  
Bragança Paulista, 2017.  
93 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-  
Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da  
Universidade São Francisco.

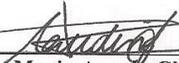
Orientação de: Mário Angelo Claudino.

1. Bexiga urinária. 2. Inibidores de PDE5. 3. LUTS.  
4. Insuficiência cardíaca. 5. Tadalafil. I. Claudino, Mário  
Angelo. II. Título.



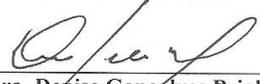
**MORA, G., Aline**, “Ação do Tadalafil no Tratamento das Alterações do Baixo Trato Urinário em Ratos com Insuficiência Cardíaca”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 10 de Fevereiro de 2017 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

---



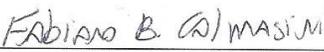
**Prof. Dr. Mario Angelo Claudino**  
Universidade São Francisco

---



**Prof. Dra. Denise Gonçalves Priolli**  
Universidade São Francisco

---



**Prof. Dr. Fabiano Beraldi Calmasini**  
Universidade Estadual de Campinas

*Dedicatória*

*A **Deus**, por me dar saúde e sabedoria para concluir minha pesquisa e quem sabe um dia, promover novas opções terapêuticas e melhores condições de vida aos pacientes.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Mário Angelo Claudino, sempre serei grata por ter me privilegiado com a oportunidade de desenvolver este projeto e por caminhar ao meu lado durante toda a jornada, por sempre me fazer acreditar que eu era capaz de vencer os obstáculos e evoluir um pouco mais.

A minha mãe Elizete, por todo o amor, companheirismo, dedicação e apoio incondicional. Ao meu irmão, Rodrigo, por sua amizade, apoio e paciência.

Ao Fernando, por todo o amor, paciência e por sempre estar ao meu lado me incentivando a evoluir.

Aos amigos que ganhei no laboratório e que levarei comigo para sempre, Douglas Andrade, Sabrina Payne, Tiago Tomazini, Márcia Messias, James Barbosa, Rodrigo Sader, Silas Furquim, Gian Lucas e Sabrina Janussi. Sou muito grata por ter vocês ao meu lado iluminando minha caminhada, seja nas brincadeiras e risadas ou nos momentos difíceis.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Bruschi Marinho Priviero, por sempre estar disposta a me ajudar com as dúvidas, contribuir para o desenvolvimento do projeto e incentivar o meu trabalho.

A Secretaria de Pós Graduação *Stricto Sensu* da Universidade São Francisco, especialmente Vilma e Tatine, pela paciência e solicitude.

Aos funcionários do biotério, Srs. Paulo, Fabiano, Walter e Lázaro pelo cuidado com os animais.

Por fim, deixo meu agradecimento aos animais que, mesmo involuntariamente, contribuíram para que este estudo fosse realizado.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas que já tem a forma do nosso corpo e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.

Fernando Pessoa, **Tempo de Travessia**.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A insuficiência cardíaca (IC) acometeu cerca de 5,1 milhões de indivíduos somente nos Estados Unidos no período de 2007-2012. Trabalhos têm demonstrado uma forte associação de IC com o desenvolvimento de sintomas do baixo trato urinário (LUTS). Estudos epidemiológicos realizados em pacientes com IC demonstraram que 34% dos homens e 62% das mulheres relataram ser portadores de LUTS. Sendo que, aproximadamente 57% desses pacientes com IC apresentam síndrome da bexiga hiperativa. Estudos recentes comprovam que o tratamento diário com Tadalafil vem sendo eficaz em diminuir os sintomas relacionados à micção e armazenamento de urina. **MÉTODOS:** Dessa forma, utilizando o modelo de fistula aortocaval (FAC) investigamos a contribuição do tratamento crônico com tadalafil nas alterações do baixo trato urinário de ratos com IC. A IC foi induzida cirurgicamente através do modelo de FAC e após 8 semanas do procedimento cirurgico os animais foram submetidos ao exame de ecocardiografia transtorácica e divididos em 4 grupos para o tratamento: Sham e IC (receberam solução salina 0,9% via intraperitoneal) e Tadalafil e IC Tadalafil (receberam tadalafil 5mg/dia por 4 semanas via intraperitoneal). Após o tratamento os animais foram submetidos novamente ao exame de ecocardiografia transtorácica e posteriormente foram realizadas curvas concentração resposta ao carbacol, KCl, alfa-beta metil ATP e EFS, análise de parâmetros cistométricos, função renal e equilíbrio celular redox. **RESULTADOS:** Após 12 semanas de protocolo experimental os animais do grupo IC apresentaram aumento da massa do VE, diminuição da fração de ejeção e aumento dos volumes sistólico e diastólico finais do VE quando comparados ao respectivo grupo Sham ( $p < 0,05$ ). O tratamento com tadalafil foi capaz de restaurar a função cardíaca no grupo IC Tadalafil, com diminuição da hipertrofia e melhora na função do VE quando comparado ao grupo IC ( $p < 0,05$ ). Além disso, na avaliação da função urinária *in vitro* observou-se aumento da resposta contrátil mediada por carbacol, KCl, alfa-beta metil ATP e EFS na musculatura detrusora do grupo IC ( $p < 0,05$ ). Em concordância com esses achados, também foram encontradas alterações nos parâmetros cistométricos *in vivo*, com aumento da pressão basal, pressão limiar, número de contrações involuntárias e diminuição da capacidade da bexiga no grupo IC quando comparado ao respectivo Sham ( $p < 0,05$ ). No entanto, após o tratamento o grupo IC Tadalafil apresentou diminuição na hiperatividade contrátil mediada por carbacol, KCl, alfa-beta metil ATP e EFS, além de restauração da função urinária avaliada por cistometria quando comparado ao grupo IC ( $p < 0,05$ ). Associado ao quadro de alteração cardíaca e urinária foi demonstrado comprometimento na função renal dos animais IC, com aumento dos níveis plasmáticos de uréia, assim como alterações no equilíbrio celular redox, com aumento da lipoperoxidação e diminuição da capacidade antioxidante total (TAC) e atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD). **CONCLUSÃO:** Portanto, o Tadalafil se mostrou uma estratégia farmacológica eficaz para o tratamento da IC e da bexiga hiperativa em ratos submetidos ao modelo de FAC, pois reverteu a hipertrofia e o comprometimento da função do VE, além de diminuir a hipercontratilidade contrátil da musculatura detrusora e restabelecer a função urinária *in vivo*. Em associação com esses resultados, o tratamento também foi capaz restaurar a função renal e o equilíbrio celular redox dos animais.

**Palavras-chave:** Bexiga Urinária, Inibidores de PDE5, Insuficiência Cardíaca, LUTS, Tadalafil.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Heart failure (HF) affected approximately 5.1 million individuals in the United States alone in the period 2007-2012. Studies have demonstrated a strong association of HF with the development of low urinary tract symptoms (LUTS). Epidemiological studies in patients with HF have shown that 34% of men and 62% of women reported having LUTS. Approximately 57% of these HF patients present with overactive bladder syndrome. Recent studies prove that daily treatment with Tadalafil has been effective in decreasing symptoms related to urination and urine storage. **METHODS:** Thus, using the aortocaval fistula model (FAC), we investigated the contribution of chronic treatment with tadalafil in the alterations of the lower urinary tract of HF rats. HF was surgically induced through the FAC model and after 8 weeks of the surgical procedure the animals underwent transthoracic echocardiography and divided into 4 treatment groups: Sham and HF (received saline 0.9%) and Tadalafil and HF Tadalafil (received tadalafil 5mg / day for 4 weeks). After treatment, the animals were again submitted to transthoracic echocardiography, and the response curves to carbachol, KCl, alpha-beta methyl ATP and EFS, analysis of cystometric parameters, renal function and redox cell balance were subsequently performed. **RESULTS:** After 12 weeks of experimental protocol, the animals of the HF group presented increased LV mass, decreased ejection fraction and increased LV end-systolic and diastolic volumes when compared to the respective Sham group ( $p < 0.05$ ). Treatment with tadalafil was able to restore cardiac function in the HF Tadalafil group, with a decrease in hypertrophy and an improvement in LV function when compared to the HF group ( $p < 0.05$ ). In addition, in the assessment of in vitro urinary function, the contractile sensitivity of carbachol, KCl, alpha-beta methyl ATP and EFS in the detrusor muscles of the HF group was observed ( $p < 0.05$ ). In agreement with these findings, changes in cystometric parameters were also found in vivo, with an increase in baseline pressure, threshold pressure, number of involuntary contractions and decreased bladder capacity in the HF group when compared to the respective Sham ( $p < 0.05$ ). However, after treatment the HF Tadalafil group showed a decrease in contractile hyperactivity mediated by carbachol, KCl, alpha-beta methyl ATP and EFS, as well as restoration of urinary function assessed by cystometry when compared to HF group ( $p < 0, 05$ ). Associated with the cardiac and urinary alterations, renal impairment of IC animals was observed, with increased urea plasma levels, as well as changes in redox cellular balance, with increased lipoperoxidation and decreased total antioxidant capacity (TAC) and enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD). **CONCLUSION:** Therefore, Tadalafil has been shown to be an effective pharmacological strategy for the treatment of HF and overactive bladder in rats submitted to the FAC model, since it reversed hypertrophy and impairment of LV function, as well as to decrease the contractile hyperactivity of the detrusor muscles and to reestablish urinary function "in vivo". In association with these results, the treatment was also able to restore renal function and the redox cellular balance of the animals.

**Keywords:** Urinary Bladder, PDE5 inhibitors, Heart Failure, LUTS, Tadalafil.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	acetilcolina
AHA	american heart association
ATP	adenosina trifosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
BB	beta-bloqueador
BRA	bloqueador do receptor de angiotensina II
CCh	carbacol
CEP	comitê de Ética e Pesquisa
cGMP	guanosina monofosfato cíclica
CIs	frequência de contrações involuntárias
CM	contração de micção
CO <sub>2</sub>	gás carbônico molecular
Cox	cicloxygenase
CP	capacidade da bexiga
DAG	diacilglicerol
DC	débito cardíaco
DE	disfunção erétil
DLP	dislipdemia
DM	diabetes mellitus
EC <sub>50</sub>	concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima
ECA	enzima conversora de angiotensina
EFS	estimulação elétrica de campo
E.P.M	erro padrão das médias

ERO's	espécies reativas de oxigênio
E <sub>max</sub>	resposta máxima produzida pelo agonista
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
FAC	fístula aortocaval
FC	frequência cardíaca
FE	fração de ejeção
FM	frequência de micção
GCs	guanilil ciclase solúvel
GTP	guanosina trifosfato
HPB	hiperplasia prostática benigna
HAS	hipertensão arterial sistêmica
Hz	hertz
IAM	infarto agudo do miocárdio
IC	insuficiência cardíaca
ICC	insuficiência cardíaca congestiva
IECA	inibidor da enzima conversora de angiotensina
IP	intraperitoneal
IP <sub>2</sub>	fosfaditilinositol
IP <sub>3</sub>	inositol trisfosfato
KCL	cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato monopotássico (também dihidrogenofosfato de potássio, KDP, ou fosfato monobásico de potássio, MKP)
LPS	Lipossacarídeo
LUTS	sintomas do baixo trato urinário
MDA	Malondialdeído

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	sulfato de magnésio
mM	milimolar
mN	milinewton
M <sub>2</sub>	receptor muscarínico tipo 2
M <sub>3</sub>	receptor muscarínico tipo 3
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sódio
NYHA	new York Heart Association
nM	nanomolar
NANC	não adrenérgico não colinérgico
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
O <sub>2</sub>	oxigênio molecular
pEC <sub>50</sub>	antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo
PDE5	fosfodiesterase tipo 5
pH	antilog da concentração de íons de hidrogênio
PI3K	fosfatidil-inositol 3-kinase
PIP <sub>2</sub>	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PL	pressão limiar
PLC	fosfolipase C
P <sub>2x</sub>	receptor purinérgico ligado ao canal iônico
P <sub>2y</sub>	receptor purinérgico associado à proteína – G
SNS	sistema nervoso simpático

SOD	superóxido dismutase
SRAA	sistema renina-angiotensina-aldosterona
UDIF	fator inibidor derivado do urotélio
VE	ventrículo esquerdo
VM	volume por micção
VUT	volume total urinado
$\Phi$	resposta observada na ausência do agonista.
$\mu\text{M}$	Micromolar

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Etiologia da Insuficiência Cardíaca.	20
Tabela 2. Tratamento Farmacológico da Insuficiência Cardíaca.	24
Tabela 3. Peso Corporal dos Animais Pré e Pós-Tratamento.	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da anatomia da bexiga urinária.	30
Figura 2. Representação das fases de enchimento e esvaziamento vesical.	32
Figura 3. Representação da cirurgia para criação da fístula aortocaval.	47
Figura 4. Representação esquemática do protocolo experimental.	48
Figura 5. Parâmetros cardíacos avaliados por ecocardiograma.	55
Figura 6. Curvas concentração efeito ao carbacol.	57
Figura 7. Curvas concentração efeito ao cloreto de potássio.	58
Figura 8. Curvas concentração efeito ao alfa-beta-metil ATP.	59
Figura 9. Curvas frequência efeito ao estímulo elétrico.	60
Figura 10. Traçado cistométrico representativo.	62
Figura 11. Parâmetros cistométricos.	63
Figura 12. Avaliação do dano oxidativo.	64
Figura 13. Avaliação da capacidade antioxidante total.	65
Figura 14. Avaliação da atividade antioxidante enzimática.	66
Figura 15. Avaliação do índice de dano oxidativo	67
Figura 16. Avaliação da função renal.	68
Figura 17. Avaliação da relação uréia/creatinina	69

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1 Insuficiência Cardíaca	18
1.1.1 Definição e Manifestações Clínicas	18
1.1.2 Etiologia e Fisiopatologia	19
1.1.3 Diagnóstico e Classificação da IC	20
1.1.4 Tratamento	22
1.1.4.1 Tratamento Não Farmacológico	23
1.1.4.2 Tratamento Farmacológico	24
1.1.4.3 Modelo Experimental de Fístula Aortocava	25
1.1.4.3.1 Mecanismos Vasoconstritores/Antinatriuréticos	25
1.1.4.3.2 Mecanismos Vasodilatadores/Natriuréticos	26
1.1.4.3.3 Manifestações Renais	26
1.1.4.3.4 Manifestações Cardíacas	27
1.2 Baixo Trato Urinário	28
1.2.1 Anatomia da Bexiga Urinária	29
1.2.2 Mecanismo de sinalização do ciclo de micção	30
1.2.3 Inervação Autonômica	32
1.2.3.1 Inervação Parassimpática	32
1.2.3.2 Inervação Simpática	33
1.2.3.3 Inervação Não Adrenérgica Não Colinérgica	34
1.2.3.3.1 Papel do NO	34
1.2.3.3.2 Papel do ATP	35
1.3 Sintomas do Baixo Trato Urinário	35
1.3.1 Definição e Epidemiologia da Bexiga Hiperativa	36
1.3.1.1 Etiologia da Bexiga Hiperativa	36
1.3.2 Diagnóstico do LUTS	38
1.3.3 Tratamento do LUTS	39
1.3.3.1 Tratamento Não Farmacológico	39
1.3.3.2 Tratamento Farmacológico	40
1.4 Insuficiência Cardíaca e LUTS	40

1.5 Inibidores de PDE5, insuficiência cardíaca e LUTS	41
1.6 Estresse oxidativo, insuficiência cardíaca e LUTS	43
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	44
<b>3 OBJETIVOS</b>	44
3.1 Objetivo Geral	44
3.2 Objetivos Específicos	45
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	46
4.1 Animais	46
4.2 Indução da IC: Modelo de Fístula Aortocaval	46
4.3 Tratamento Crônico com Tadalafil	47
4.4 Validação do Modelo de IC	48
4.4.1 Ecocardiograma Transtorácico	48
4.5 Cistometria (Avaliação <i>in vivo</i> )	49
4.6 Estudo Funcional da Musculatura Detrusora (Avaliação <i>in vitro</i> )	50
4.6.1 Preparo e Montagem dos Tecidos	50
4.6.2 Avaliação dos Mecanismos Contráteis	51
4.6.3 Avaliação da Curva de Frequência-Resposta	51
4.7 Avaliação do Sistema Antioxidante	51
4.7.1 Determinação da Capacidade Antioxidante Total (CAT)	51
4.7.2 Determinação da Atividade Antioxidante da Superóxido Dismutase (SOD)	52
4.7.3 Determinação da Atividade Antioxidante da Catalase	52
4.8 Avaliação do Dano Oxidativo	52
4.9 Avaliação da Função Renal	52
4.10 Análise Estatística	53
<b>5 RESULTADOS</b>	54
5.1 Peso Corporal dos Animais nas Fases Inicial e Final do Tratamento com Tadalafil	54
5.2 Parâmetros Cardíacos	55
5.3 Resposta Contrátil do Músculo Detrusor Induzida pelo Carbacol	57
5.4 Resposta contrátil do Músculo Detrusor Induzida pelo KCl	58

5.5 Resposta Contrátil do Músculo Detrusor Induzida pelo $\alpha$ - $\beta$ Metil ATP	59
5.6 Resposta Contrátil do Músculo Detrusor Induzida pela EFS	60
5.7 Cistometria	61
5.8 Avaliação do Dano Oxidativo	64
5.9 Capacidade Antioxidante Total	65
5.10 Atividade Antioxidante Enzimática	66
5.11 Índice de Dano Oxidativo	67
5.12 Função Renal	68
5.13 Relação Uréia/Creatinina	69
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
<b>7 CONCLUSÃO E SUMÁRIO</b>	<b>76</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>77</b>
<b>9 ANEXO</b>	<b>93</b>

Parecer do comitê de ética no uso de animal em pesquisa da  
Universidade São Francisco – Bragança Paulista.

## 1 INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) não é mais considerada uma doença cardíaca isolada, pois envolve múltiplos sistemas e mecanismos compensatórios neuro-humorais, acompanhada de altos índices de morbidade e mortalidade, sendo caracterizada por alguns sintomas clínicos como fadiga, dispneia e intolerância aos esforços físicos (LUNDE et al., 2001; CRIMI et al., 2009), os quais reduzem consideravelmente a autonomia e qualidade de vida destes pacientes (MORLEY et al., 2006).

Dados atualizados da American Heart Association (AHA) estimam que a IC acometeu cerca de 5,1 milhões de indivíduos somente nos Estados Unidos no período de 2007-2012 (HEIDENREICH et al., 2013). As projeções estimam que o número de casos aumentará 46% de 2012-2030, resultando em mais de 8 milhões de pessoas acima dos 18 anos com IC (GO et al., 2014). No Brasil, segundo o DATASUS, apenas no ano de 2012 houveram 26.694 óbitos e 238.890 casos de hospitalização por IC, gerando altos custos para o Sistema Público de Saúde (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Sabe-se que a IC está associada a fatores de risco como envelhecimento, tabagismo, sedentarismo, hipercolesterolemia, *diabetes mellitus* e hipertensão arterial (BIERMAN, 2004; FONDA et al., 2005; APOSTOLO et al., 2009). Além disso, estudos têm demonstrado uma complexa relação entre IC e o desenvolvimento de sintomas do baixo trato urinário (do acrônimo em inglês LUTS, lower urinary tract symptoms), principalmente a síndrome da bexiga hiperativa (BIERMAN, 2004; RASTOGI et al., 2005; SCHWARZ et al., 2006; APOSTOLO et al., 2009; PALMER et al., 2009). Devido às descobertas recentes, novas terapias farmacológicas vêm sendo estudadas, como por exemplo, o uso dos inibidores de fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), que demonstram ser capazes de reduzir os sintomas de urgência miccional e aumento da frequência urinária em pacientes com disfunção erétil (DE) (ANDERSSON et al., 2008; 2009). Entretanto, os mecanismos de sinalização intracelulares pelos quais a IC pode levar a essas disfunções urogenitais e a contribuição do tratamento crônico com inibidores de PDE5 ainda não foram completamente elucidados.

### 1.1 Insuficiência cardíaca

#### 1.1.1 Definição e manifestações clínicas

A insuficiência cardíaca é a via final de inúmeras patologias que acometem o coração, sendo definida como uma síndrome clínica que cursa com inadequado suprimento sanguíneo para suprir as necessidades metabólicas em pacientes com retorno venoso normal, com consequente alteração hemodinâmica que resulta em resposta inadequada do débito cardíaco e elevação das pressões pulmonar e venosa sistêmica (BOCCHI et al., 2005; MANGINI et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2014).

Inicialmente o comprometimento cardíaco se manifesta durante o exercício físico, mas com a progressão da patologia o paciente passa a apresentar sintomas durante o repouso, com piora da funcionalidade nas atividades de vida diária e aumento do risco de mortalidade (BRAUNSCHWEIG et al., 2016). Tais alterações fundamentam os sintomas clássicos da IC, como fadiga, dispneia e intolerância aos esforços físicos, que cronicamente contribuem ainda mais para o agravamento do quadro e piora no prognóstico do paciente (MEDEIROS et al., 2010).

Os mecanismos responsáveis pelos sintomas e sinais clínicos podem ser decorrentes da disfunção sistólica, diastólica ou de ambas, sendo mais frequente o acometimento sistólico ventricular esquerdo (60% dos adultos), seguido da disfunção diastólica (40%) (BOCCHI, 2009). Uma das principais terminologias utilizadas para descrever disfunções sistólicas ou diastólicas é baseada na Fração de Ejeção (FE), pois nos casos de acometimento sistólico a FE encontra-se comumente diminuída, ou seja, abaixo de 40% (IC com FE reduzida) e nos casos diastólicos, onde o comprometimento cardíaco refere-se a uma anomalia nas propriedades de enchimento ou sucção de ventrículo esquerdo, a FE encontra-se acima de 50% (IC com FE preservada) (PONIKOWSKI et al., 2016; RIET et al., 2016).

### **1.1.2 Etiologia e fisiopatologia**

A definição da etiologia da IC (Tabela 01) é um fator determinante para iniciar o diagnóstico e selecionar a abordagem terapêutica adequada para cada paciente. Porém, a etiologia da IC ainda é muito diversificada e pode apresentar grande variação dentro e entre regiões do mundo (PONIKOWSKI et al., 2016). No Brasil, a principal etiologia da IC é a cardiopatia isquêmica crônica associada à hipertensão arterial, porém, em áreas de baixas condições sócio-econômicas ainda é muito frequente os casos de IC associada à doença de Chagas, endomiocardiofibrose e a cardiopatia valvular reumática crônica (BARRETO, 2002).

**TABELA 01:** Etiologia da Insuficiência Cardíaca (Adaptada de BOCCHI, 2009).

<b>ETIOLOGIA</b>	<b>SITUAÇÃO CLÍNICA</b>
<b>Doença Isquêmica</b>	Especialmente na presença de fatores de risco, angina ou disfunção ventricular.
<b>Hipertensão arterial</b>	Frequentemente associada a hipertrofia ventricular e a fração de ejeção preservada.
<b>Doença de Chagas</b>	Especialmente na presença de dados epidemiológicos sugestivos.
<b>Cardiomiopatia</b>	Hipertrófica, dilatada, restritiva e displasia arritmogênica do ventrículo direito.
<b>Drogas</b>	Bloqueadores de canal de cálcio e agentes citotóxicos.
<b>Toxinas</b>	Álcool, cocaína e microelementos (cobalto, mercúrio e arsênio).
<b>Doenças endócrinas</b>	Diabetes, hipo/hipertireoidismo, insuficiência adrenal, hipersecreção e hormônio do crescimento.
<b>Nutricional</b>	Deficiência de selênio, tiamina, carnitina, obesidade e caquexia.
<b>Infiltrativa</b>	Sarcoidose, amiloidose e hemocromatose.
<b>Doença extracardíaca</b>	Fístula arteriovenosa, beribéri, anemia e doença de Paget.
<b>Outras</b>	Periparto, miocardiopatia do HIV e doença renal crônica.

**LEGENDA:** HIV (do inglês "Human Immunodeficiency Virus").

Nas diferentes etiologias o processo fisiopatológico da IC é semelhante, resultando em lesão miocárdica, comprometimento da função ventricular e diminuição do débito cardíaco. Como tentativa de compensar as alterações hemodinâmicas e manter a perfusão tecidual necessária para suprir a demanda do organismo, ocorre uma hiperativação do sistema nervoso simpático (SNS), do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), assim como aumento do estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias (CHATTERJEE, 2005). A hiperativação destes sistemas é benéfica nas fases iniciais da IC e desencadeia respostas compensatórias como taquicardia basal, aumento da contratilidade miocárdica e remodelamento cardíaco. No entanto, cronicamente essas respostas compensatórias tornam-se prejudiciais ao coração e ao organismo, resultando em remodelamento cardíaco, perda de função do VE e edema pulmonar (MEDEIROS et al., 2010).

### 1.1.3 Diagnóstico e classificação da IC

O diagnóstico é clínico, laboratorial e por imagem. A avaliação clínica dará conta de buscar os sinais e sintomas, antecedentes patológicos e fatores predisponentes; os dados laboratoriais irão identificar a gravidade e outras condições clínicas associadas como a insuficiência renal e os exames por imagem como radiografia do tórax e ecocardiograma trarão dados anatômicos e funcionais do coração. Os exames de eletrocardiograma e eletrocardiograma dinâmico fornecerão informações acerca de arritmias associadas que poderão agravar o quadro de insuficiência cardíaca ou ainda interferir no prognóstico (BARRETO, 2002).

Os sintomas do paciente com insuficiência cardíaca incluem principalmente a dispnéia e a fadiga, que inicialmente são desencadeadas durante o exercício físico e com a progressão da IC aparecem também no repouso. Outros sintomas possíveis são a dispnéia paroxística noturna, a ortopnéia, o edema de membros inferiores e a tosse noturna (FRANZEN et al., 2006). A limitação para o esforço é parâmetro importante na avaliação da IC e por esse motivo a New York Heart Association (NYHA) propôs a categorização da IC em 4 classes funcionais de acordo com a intensidade dos sintomas apresentados pelo paciente, sendo esta classificação importante para estratificar o grau de limitação enfrentado pelo paciente com IC (BOCCHI, 2009). As quatro classes propostas são:

- Classe I - ausência de sintomas (dispnéia) durante atividades cotidianas. A limitação para esforços é semelhante à esperada em indivíduos normais;
- Classe II - sintomas desencadeados por atividades cotidianas;
- Classe III - sintomas desencadeados em atividades menos intensas que as cotidianas ou pequenos esforços;
- Classe IV - sintomas em repouso.

Como esta categorização toma como referência as atividades cotidianas, que tem um alto grau de variabilidade entre os indivíduos, isto confere certa subjetividade a esta medida. Por esse motivo, além da classificação funcional, também deve ser feita a estratificação do paciente de acordo com a progressão da IC. A estratificação de pacientes com IC baseia-se em dados da anamnese, permitindo que profissional de saúde avalie o momento evolutivo da doença, a qualidade de vida do paciente, o prognóstico, estabeleça prioridades e abordagens terapêuticas

adequadas (PONIKOWSKI et al., 2016). Além de oferecer maior compreensão da evolução no quadro clínico a categorização por estágios também serve como base para a identificação de pacientes com indicação de intervenções preventivas (estágios A e B), terapêuticas (estágios C) ou procedimentos especializados e cuidados paliativos (estágio D). Os estágios propostos são:

- Estágio A - Inclui pacientes sob risco de desenvolver IC, mas ainda sem doença estrutural perceptível e sem sintomas atribuíveis à IC. Dentre os pacientes que enquadram-se no estágio A podemos citar: portadores de hipertensão arterial, doença aterosclerótica, diabetes mellitus, obesidade, síndrome metabólica, ou pacientes submetidos à terapia antineoplásica com drogas de potencial cardiotoxico (BALADY et al., 2007; BARRETO, 2002);
- Estágio B - Pacientes que adquiriram lesão estrutural cardíaca, mas ainda sem sintomas atribuíveis à IC. Dentre os pacientes que enquadram-se no estágio B podemos citar: pacientes que sofrem infarto agudo do miocárdio (IAM) e que evoluem com disfunção ventricular, porém sem sintomas, que muitas vezes se manifestarão meses após o evento (ALBUQUERQUE et al., 2014; BOCCHI, 2009);
- Estágio C - Pacientes com lesão estrutural cardíaca e sintomas atuais ou progressos de IC. Para os pacientes que encontram-se neste estágio deve-se preconizar a identificação de fatores de risco agravantes e o controle dos episódios de descompensação (BOCCHI, 2009);
- Estágio D - Pacientes com sintomas refratários ao tratamento convencional e que requerem intervenções especializadas ou cuidados paliativos. Neste estágio encontram-se os pacientes com alta taxa de mortalidade, internações frequentes e com indicação de transplante cardíaco, frequentemente cursando com baixo débito, sendo muitos deles, portanto, candidatos à assistência circulatória (BOCCHI, 2009).

#### **1.1.4 Tratamento**

Os principais objetivos do tratamento da IC são inverter ou retardar a disfunção cardíaca e periférica, melhorando o prognóstico, reduzindo a mortalidade e aliviando os sintomas do paciente. Como a IC tem inúmeras etiologias, fica difícil definir abordagem e tratamento único

padronizado para todas elas. Porém, a abordagem baseada na classificação do paciente em perfis de A à D, de acordo com o estágio da doença, auxilia na escolha das terapias não farmacológicas, farmacológicas ou cirurgicas mais adequadas (BALADY et al., 2007; PONIKOWSKI et al., 2016).

#### **1.1.4.1 Tratamento não farmacológico**

A quebra de paradigma na abordagem da IC tem demonstrado que as medidas multidisciplinares não farmacológicas deixaram de ser um simples complemento da farmacoterapia, tornando-se parte integrante e indispensável na terapêutica dessa complexa síndrome, de modo que, a não adoção de tais medidas pode colocar em risco a eficácia do tratamento (BOCCHI, 2009).

Como parte inicial do tratamento não farmacológico está a correção de fatores que podem agravar o quadro clínico do paciente, como por exemplo, a modificação do estilo de vida através de orientações nutricionais, que visam a manutenção do peso ideal, diminuição da ingestão de sal e álcool, além do consumo adequado de líquidos (CHAUDHRY et al., 2007). Estudos recentes demonstram que o ganho de peso pode ser considerado importante fator de risco para hospitalização e que esse aumento pode ser observado na semana precedente ao período de hospitalização (ADAMS et al., 2005; CHAUNDRY et al., 2007).

A prática de atividade física também é um componente essencial na modificação do estilo de vida de pacientes com IC, porém a prescrição de exercícios deve ser individualizada, de acordo com o grau da IC e a idade do paciente, em nível que não produza sintomas e sob supervisão médica, particularmente nas classes III e IV (ADES et al., 2013). O treinamento físico contribui para o aumento da capacidade funcional, melhora na qualidade de vida, diminuição nos índices de depressão e internações por episódios de descompensação (BALADY et al., 2007; FLETCHER et al., 2013).

Como medida profilática, também recomenda-se a vacinação contra *Influenza* (anual) e pneumonia (a cada três anos) nos pacientes com IC avançada, pois as infecções respiratórias estão entre os fatores de risco responsáveis por desencadear descompensações e hospitalizações, piorando a qualidade de vida e aumentando a mortalidade (MARTINS et al., 2011).

### 1.1.4.2 Tratamento farmacológico

O tratamento farmacológico tem apresentado evidências consistentes na redução da morbimortalidade. Porém, a terapia deve ser permanente, os fármacos devem ser selecionados de acordo com o estágio da doença e tipo de IC, podendo as doses das medicações serem modificadas conforme as mudanças no quadro clínico (BALADY et al., 2007). As principais terapêuticas farmacológicas utilizadas no tratamento da IC estão descritas na Tabela abaixo:

**TABELA 02:** Tratamento farmacológico da IC (Adaptada de BARRETO, 2002).

CATEGORIA	FÁRMACO	EFEITOS
<b>Inibidores da ECA</b>	Captopril, Enalapril, Lisinopril, Ramipril, Fosinopril, Trandolapril, Benazepril, Perindopril, Quinapril.	Minimizam a vasoconstrição, a fibrose e a degradação da bradicinina.
<b>Digitálicos</b>	Digoxina	Modulam a ativação neuro-hormonal, reduzem a atividade simpática e estimulam a ação vagal, diminuindo a FC. Aumentam a sensibilidade dos reflexos barorreceptores e cardiopulmonares.
<b>Diuréticos</b>	Tiazídicos (Hidroclorotiazida), Diuréticos de alça (Furosemida) e Poupadores de potássio (Amilorida).	Reduzem o volume intravascular, o volume ventricular, a pré-carga, a congestão visceral e os consequentes sintomas da IC.
<b>Antagonistas de aldosterona</b>	Espironolactona e Eplerenone.	Redução da síntese e o depósito do colágeno, diminuindo o teor de fibrose miocárdica e desacelerando a progressão da IC.
<b>Betabloqueadores</b>	Carvedilol, Metoprolol E Bisoprolol.	Redução da progressão da disfunção ventricular, efeito de remodelagem reversa e redução de morte súbita.
<b>Vasodilatadores diretos</b>	Hidralazina e Nitrato.	Diminuição regurgitação mitral, da pré e pós-carga, aumento do débito cardíaco e discreto aumento da fração de ejeção.
<b>Antagonistas dos receptores de angiotensina II</b>	Losartan e Valsartan.	Provocam redução da resistência arterial periférica, redução da pressão diastólica final do VE e aumentam o DC.

**LEGENDA:** ECA (enzima conversora de angiotensina), FC (frequência cardíaca) e DC (débito cardíaco).

### **1.1.4.3 Modelo experimental de fístula aortocaval**

O modelo experimental da fístula aortocaval (FAC), é considerado um modelo de IC de alto débito que gera, ao longo do tempo, manifestações renais e cardíacas similares às observadas em pacientes com IC de baixo débito. A criação da fístula resulta em aumento do retorno venoso e sobrecarga de volume para as câmaras direitas, com consequente diminuição da pressão arterial média. Diante das alterações hemodinâmicas, o organismo ativa vários mecanismos neuro-humorais tentando compensar o déficit cardíaco, resultando em alterações estruturais adaptativas do miocárdio e do sistema vascular. Dentre os sistemas ativados em resposta encontra-se o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o sistema nervoso simpático (SNS), o hormônio antidiurético (ADH) e a endotelina – 1 (ET-1) (ABASSI et al., 1997; 2011).

#### **1.1.4.3.1 Mecanismos vasoconstritores/antinatriuréticos**

O decréscimo da pressão arterial média resultante do modelo de FAC é identificado por barorreceptores presentes na circulação arterial e estes são responsáveis por ativar mecanismos vasoconstritores. O aumento na ativação de mecanismos vasoconstritores resulta em hipoperfusão renal, funcionando como um potente estímulo para a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), um dos principais responsáveis pelo quadro de hipertrofia cardíaca e prejuízo renal em cobaias submetidas ao modelo de FAC (ABASSI et al., 2011). O SRAA é responsável por bloquear o efeito vasodilatador do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) no rim, que resulta em aumento de sódio e consequentemente formação de edema.

Outro sistema ativado precocemente na IC é o SNS, sabe-se que o SNS é responsável por mediar a vasoconstrição sistêmica e renal em alguns modelos de IC, porém, no modelo em questão a contribuição simpática ainda não foi completamente elucidada (SKORECKI et al., 2008). De acordo com o estudo de Abassi et al. (1997), o SNS pode ser responsável por atenuar a resposta dos barorreceptores aórticos, resultando no barorreflexo anormal observado na IC.

O ADH também se apresenta elevado em pacientes com IC, principalmente nos casos mais avançados e com hiponatremia, sendo secretado na circulação mediante alterações de osmolaridade, pressão arterial e de volume circulante efetivo. O ADH exerce as funções de vasoconstrição e aumento da reabsorção de água pelo rim através de receptores acoplados à

proteína G, como por exemplo, os receptores V1A e V2, que são abundantemente expressos no sistema cardiovascular e renal (BANKIR et al., 2001; BISHARA et al. 2008).

Por fim, ocorre a ativação do sistema endotelina, que consiste nos peptídeos vasoativos endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3), que são sintetizados e liberados principalmente por células endoteliais, sendo a ET-1 o mais potente vasoconstritor conhecido. Estudos recentes comprovam que tanto na clínica, quanto em modelos experimentais de FAC os níveis plasmáticos de ET-1 imunorreativa estão elevados de 2 a 3 vezes e correlacionam-se com a gravidade das alterações hemodinâmicas e dos sintomas (ABASSI et al., 2011).

#### **1.1.4.3.2 Mecanismos vasodilatadores/natriuréticos**

Em contrapartida, visando equilibrar a ativação dos mecanismos vasoconstritores também ocorre a ativação de mecanismos vasodilatadores na IC. Dentre os principais agentes que compõem os mecanismos vasodilatadores estão, o peptídeo natriurético atrial (ANP), o óxido nítrico (NO) e a prostanglandina E2 (PGE2) (ABASSI et al., 2011). O mecanismo vasodilatador mais estudado é o do peptídeo natriurético atrial (ANP), que consiste em um hormônio de origem cardíaca e que desempenha um papel muito importante na IC através de efeitos vasodilatadores, natriuréticos e antiproliferativos, além de estar envolvido na modulação de mecanismos neuro-humorais (BOERRIGTE et al., 2004). Os níveis plasmáticos de ANP são acentuadamente elevados no modelo de FAC, pois o principal estímulo para sua liberação é a distensão atrial e no modelo em questão ocorre um aumento da distensão atrial devido ao aumento do fluxo sanguíneo arterial para o sistema venoso. Estudos recentes têm demonstrado que 24h após a criação da FAC os níveis plasmáticos de ANP apresentavam-se aumentados e mantiveram padrões elevados durante todo o protocolo experimental. Tais achados entram em contradição com a tendência de retenção de sal e água pelo rim observada na clínica e em diversos modelos experimentais de IC, o que pode sugerir que os efeitos natriuréticos do ANP sejam minimizados na IC, porém, os mecanismos pelos quais isto pode ocorrer ainda não foram completamente elucidados (WINAVER et al., 1995).

#### **1.1.4.3.3 Manifestações renais**

Os desequilíbrios na função renal resultantes da sobrecarga imposta pelo modelo de FAC têm grande impacto no processo fisiopatológico da IC, dentre as causas responsáveis pelo comprometimento da função renal estão as alterações no fluxo sanguíneo renal (FSR) e

excreção de sódio e água, contribuindo para o aumento na retenção de sódio, com formação de edema e piora do prognóstico da IC, frequentemente resultando em episódios de descompensação e aumento do número de internações (ABASSI et al., 2011). Em estudo conduzido por Abassi et al. (2002) a indução cirúrgica da FAC resultou na redução de 50% do FSR mensurado através de ultrassom doppler. Acredita-se que a redução da capacidade de bombeamento do miocárdio, combinada a ativação compensatória dos mecanismos vasoconstritores seja a principal responsável pela hipoperfusão renal nos pacientes com IC (ABASSI et al., 2002). Em associação com a redução do FSR também ocorre a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), principalmente em ratos com IC descompensada. Dentre os sistemas citados anteriormente, a ativação do SRAA é uma das principais respostas compensatórias neuro-humorais para a redução do bombeamento miocárdico na IC, com ênfase para a ação da angiotensina II, que desempenha um papel importante na mediação das modificações na hemodinâmica renal através de sua ação vasoconstritora (ICHIKAWA et al., 1990).

Além do SRAA, outro potente vasoconstritor participa das alterações no FSR. O aumento experimental dos níveis plasmáticos de ET-1 em cobaias está associado à redução significativa do FSR e aumento da resistência vascular, levando-nos a acreditar que a elevação dos níveis de ET-1 esteja relacionada com as alterações de hipoperfusão renal (ABASSI et al., 2002). Alguns anos atrás, descobriu-se que o controle da perfusão renal nos modelos experimentais de IC não depende apenas da ativação dos mecanismos vasoconstritores, pois as células endoteliais também desempenham importante papel na regulação do FSR e sistêmico através da liberação de substâncias vasodilatadoras, em particular o NO (FURCHGOTT et al., 1980). Abassi et al. (1998), comprovaram que animais submetidos ao modelo de FAC apresentam deficiência no mecanismo vasodilatador dependente de endotélio quando estimulados através da ACh, sugerindo que a ação do NO tem importante participação na regulação do FSR em conjunto com os mecanismos vasoconstritores.

#### **1.1.4.3.4 Manifestações cardíacas**

No modelo de FAC as principais alterações cardíacas observadas são a hipertrofia e dilatação cardíacas, bem como a remodelação do miocárdio. A hipertrofia ventricular é observada em diferentes condições patológicas e está relacionada a adaptação cardíaca em situações de sobrecarga de pressão, de volume, exposição excessiva aos mecanismos neuro-humorais e estímulos metabólicos. Estudos recentes mostram que a indução da fístula entre a

aorta e a veia cava resulta em marcada sobrecarga de volume, gerando hipertrofia ventricular direita e esquerda após a cirurgia, com aumento de 41% na massa cardíaca em 75% dos ratos após 1 semana de cirurgia (BADER et al., 2010). Sabe-se que cada estímulo diferente pode resultar em um padrão de remodelamento ventricular, nos casos de remodelamento cardíaco por sobrecarga de volume, muito comum em patologias como anemia, bloqueio cardíaco, FAC e regurgitação mitral, observa-se alongamento dos cardiomiócitos e hipertrofia excêntrica, resultando em dilatação do ventrículo esquerdo e elevação concomitante do volume sistólico de forma a compensar o excessivo volume de sangue que permanece no ventrículo esquerdo (ABASSI et al., 2011).

Além das alterações hipertróficas e funcionais impostas pela sobrecarga cardíaca, a ativação precoce e prolongada do SRAA tem ações deletérias no miocárdio, estando diretamente relacionada com o aumento da hipertrofia cardíaca. Vale ressaltar que estudos recentes comprovam que a angiotensina II tem se mostrado capaz de desencadear hipertrofia miocárdica, fibrose e apoptose, levando ao progressivo remodelamento e deterioração do desempenho cardíaco (KATZ et al., 2003). Sendo assim, a FAC mostra-se com grande aceitabilidade como método de indução de IC em ratos, pois é um modelo acessível e com efeitos de hipertrofia e remodelamento cardíaco instalados rapidamente após a cirurgia (ABASSI et al., 2011).

## **1.2 Baixo trato urinário**

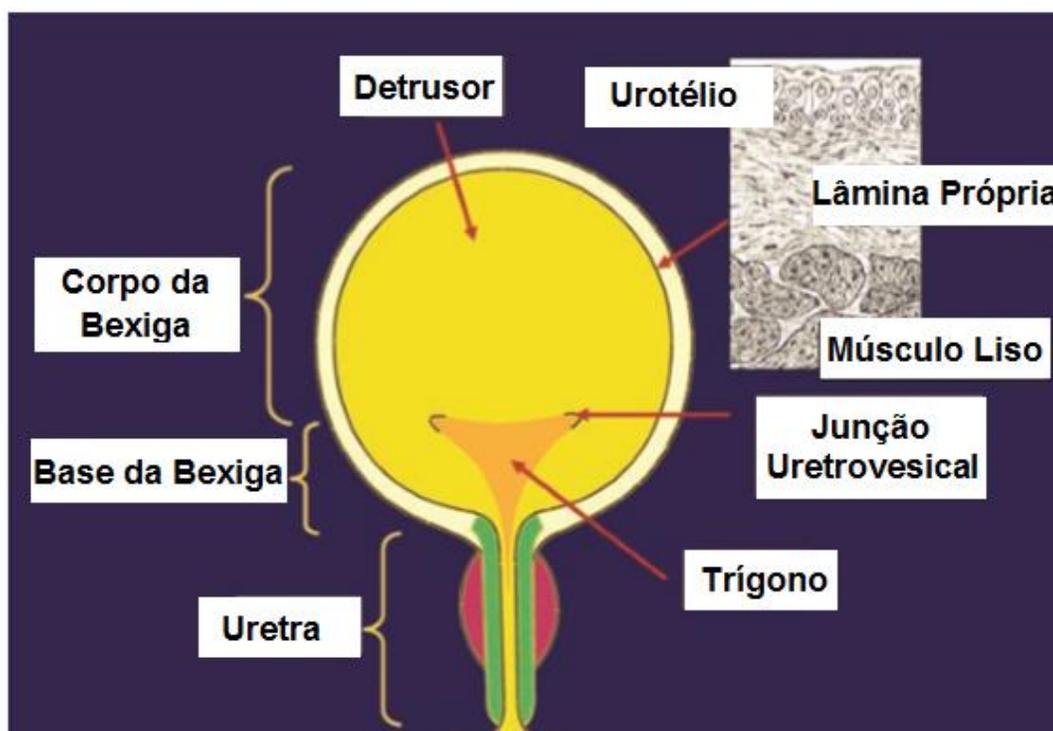
O baixo trato urinário é constituído por bexiga urinária, uretra e esfíncteres. A uretra participa do mecanismo de continência durante a fase de armazenamento e permite o esvaziamento adequado da bexiga, com resistência mínima durante a micção. A bexiga tem duas funções principais: o armazenamento, que ocorre a uma baixa pressão intravesical e a eliminação da urina, que envolve um processo de contração da bexiga e relaxamento da uretra (YEUNG e SIHOE, 2012).

A acomodação adequada da urina durante a fase de enchimento depende da capacidade intrínseca da musculatura lisa de manter uma tensão constante durante a distensão vesical e pela participação coordenada de mecanismos neurais, como a inibição da contratilidade detrusora mediada pela atividade nervosa parassimpática e aumento do relaxamento promovido pela simpática (TURNER e BRANDING, 1997). Outro fator que parece influenciar a fase de enchimento da bexiga é a liberação de óxido nítrico (NO) pelas terminações não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC), pois a exemplo do que ocorre em outros tecidos, como estômago,

onde observa-se uma forte ação relaxante para a acomodação de alimentos e fluidos mediada pelo NO, estudos comprovam que a inibição desse neurotransmissor no baixo trato urinário resulta em aumento da atividade vesical e possível hiperatividade detrusora (MULE e SERIO, 2003). Possíveis alterações na fase de enchimento resultam em sintomas do baixo trato urinário (LUTS), como urgência miccional, alterações da frequência, incontinência urinária, hiperatividade e hipertrofia da bexiga. Já na fase de esvaziamento a bexiga contrai-se para eliminar o conteúdo vesical e os esfíncteres uretrais relaxam para diminuir a resistência, permitindo a saída da urina. As alterações no processo de esvaziamento da bexiga são resultado da ineficiência do músculo liso em contrair-se, causada tanto por neuropatia periférica (como, por exemplo, na doença de Parkinson), quanto por anormalidades do músculo liso e idade.

### **1.2.1 Anatomia da bexiga urinária**

A bexiga urinária é um órgão elástico que apresenta capacidade de estocar e liberar urina. Esta capacidade depende da atividade dos músculos lisos e estriados, uretra e esfíncter uretral externo (de GROAT e YOSHIMURA, 2006). Anatomicamente a bexiga urinária pode ser dividida em duas porções: uma maior e posicionada acima dos orifícios ureterais, denominada “corpo da bexiga”, que é composta pelo músculo detrusor e outra porção menor, localizada logo abaixo dos orifícios ureterais, denominada “base da bexiga”, que é composta pelo músculo trígono e junção uretrovesical (MORRISON et al., 2005; FRY et al., 2005). As fibras musculares lisas que compõe o detrusor possuem propriedades viscoelásticas, sendo capazes de se distender sem aumento da pressão intravesical durante as variações de volume da bexiga, além de contrair-se de maneira suficiente para gerar a pressão necessária durante a fase de esvaziamento (ANDERSSON e ARNER, 2004) (Figura 01).



**FIGURA 01:** Representação esquemática da anatomia da bexiga urinária (Adaptado de ANDERSSON e ARNER, 2004).

O corpo da bexiga é subdividido em três camadas: Internamente a bexiga é revestida por um epitélio de transição denominado urotélio, que forma não apenas uma barreira impermeável, mas também é responsável por secretar substâncias com ACh e ATP mediante alterações mecânicas ou químicas, a camada intermediária é denominada músculo detrusor e a camada serosa reveste a bexiga externamente (de GROAT e YOSHIMURA, 2006).

### 1.2.2 Mecanismo de sinalização do ciclo de micção

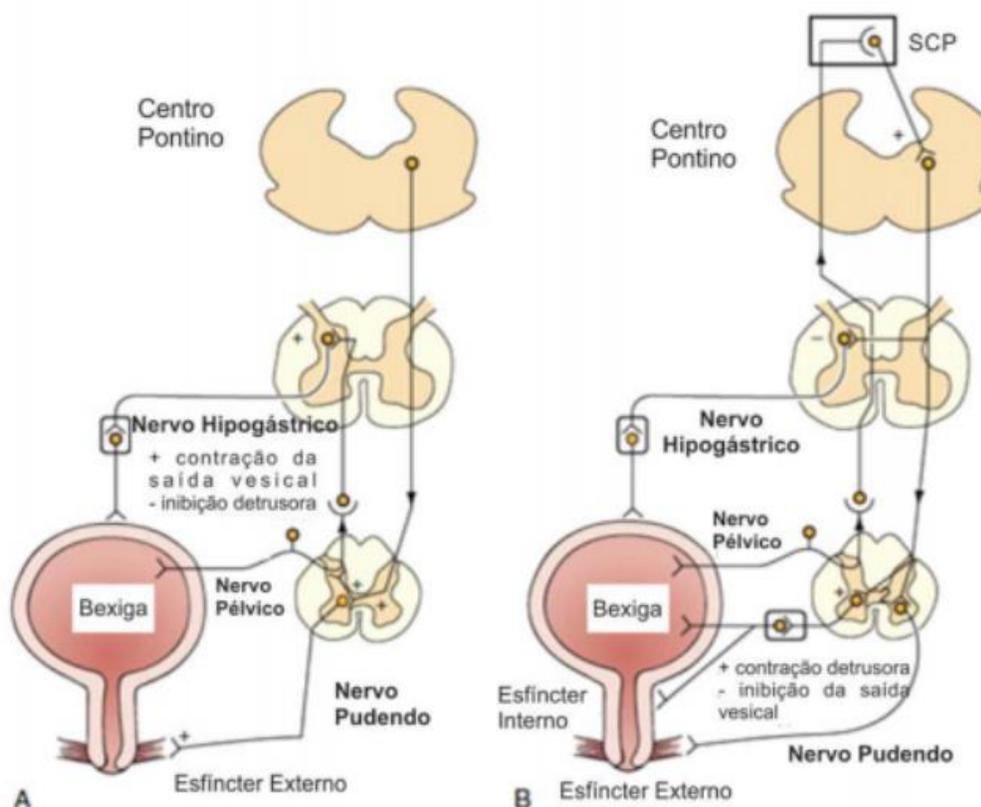
O ciclo miccional resulta da ação coordenada entre as fases de enchimento e esvaziamento, sendo que na primeira a bexiga funciona como um reservatório que acomoda quantidades crescentes de urina vinda dos ureteres sem aumentar consideravelmente a pressão intravesical e na segunda ocorre a contração da musculatura detrusora e relaxamento esfinteriano, com conseqüente eliminação do conteúdo vesical (MORRISON et al., 2005).

Sabe-se que o ciclo miccional é coordenado pela ação excitatória ou inibitória de diferentes níveis do sistema nervoso central (SNC), desde a medula até os centros pontinhos. Periféricamente, a inervação vesical é composta por fibras parassimpáticas (plexo pélvico), simpáticas (plexo hipogástrico) e somáticas (nervo pudendo). Os plexos pélvico e hipogástrico

localizam-se na região sacral (S2-S4) e lombar (T10-L2), respectivamente (MORRISON et al., 2005). A ativação do plexo pélvico consiste na contração do corpo da bexiga, com consequente aumento da pressão intravesical e relaxamento da uretra (ANDERSSON, 1993; ANDERSSON e ARNER, 2004; MORRISON et al., 2005). Já a ativação do plexo hipogástrico resulta no relaxamento do corpo da bexiga e contração da uretra e esfíncteres internos (de GROAT et al., 1993). Por fim, a ativação do nervo pudendo contrai o esfíncter uretral externo (de GROAT et al., 2001).

A acomodação da bexiga durante a fase de enchimento é reconhecida como um processo passivo, dependendo da integridade muscular lisa e inibição da atividade eferente parassimpática. Nesta fase, a pressão intravesical mantém-se baixa e constante, permitindo o aumento de volume intravesical. A alteração de volume distende as fibras musculares, que ativam as fibras simpáticas, resultando no fechamento da uretra, esfíncter interno e permitindo o armazenamento da urina. Nesta fase, ocorre aumento da atividade somática, com consequente contração do esfíncter uretral externo e maior resistência à saída da urina (ANDERSSON, 1993; de GROAT e YOSHIMURA, 2006).

Com o completo enchimento da bexiga e consequente aumento da pressão intravesical, ocorre o estiramento vesical e diversos receptores são ativados e sinalizam aos centros corticais para iniciar a fase de esvaziamento, com consequente contração da musculatura detrusora e relaxamento esfíncteriano. A fase de esvaziamento é iniciada quando o córtex cerebral reconhece o desejo de urinar e decide o momento de esvaziar a bexiga, fazendo com que a uretra encurte-se, diminuindo a resistência ao fluxo e, sob controle voluntário, a bexiga elimina a urina através da contração do músculo detrusor mediada pela estimulação de receptores muscarínicos e relaxamento da uretra em resposta à liberação de óxido nítrico (NO) (HOSTELGE e MOUTON, 2003; KAVIA et al., 2005; SMITH et al., 2006). Portanto, o reflexo miccional é autônomo por parte do eixo espinha-medula, porém também pode ser voluntariamente facilitado ou inibido por centros cerebrais (de GROAT et al., 1993; YOKOYAMA et al., 2000) (Figura 02).



**FIGURA 02:** **A** - Armazenamento vesical; **B** - esvaziamento vesical – legenda: SCP substancia cinzenta periaquedutal (adaptada de De GROAT e YOSHIMURA, 2001).

### 1.2.3 Inervação autonômica

#### 1.2.3.1 Inervação parassimpática

O principal neurotransmissor responsável pela atuação do sistema nervoso parassimpático no ciclo miccional é a acetilcolina (ACh), que interage com receptores muscarínicos presentes na bexiga, urotélio e nos terminais nervosos parassimpáticos e simpáticos (MANSFIELD et al., 2005). Sabe-se que os receptores muscarínicos apresentam maior densidade no corpo do que na base bexiga (MATSUI et al., 2000, 2002). Na bexiga existem pelo menos 5 tipos de receptores muscarínicos M1-M5, porém, os subtipos M2 e M3 são predominantes. Estudos demonstram que o receptor M3 corresponde a aproximadamente 20-30% do total de receptores muscarínicos em bexigas de humanos, ratos e coelhos, sendo o principal responsável por mediar as contrações da musculatura detrusora em resposta à agonistas muscarínicos, que resulta na ativação da proteína Gq/11 e da fosfolipase C (PLC),

levando à hidrólise do fosfatidilinositol (IP2) para inositol 1,4,5 (IP3) e diacilglicerol (DAG), com consequente aumento da mobilização intracelular de cálcio (YAMANISHI et al., 2000; MANSFIELD et al., 2005).

O receptor M2 corresponde a 70-80% do total, no entanto, sua atuação na musculatura detrusora ainda não está completamente esclarecida, estudos apontam uma possível inibição da adenilato ciclase, ativação de canais iônicos não específicos e inativação de canais iônicos para o potássio mediada por esse subtipo de receptor (ANDERSSON e HEDLUNG, 2002). De acordo com estudos recentes, os receptores M2 participam da resposta contrátil da musculatura detrusora de cobaias e humanos em situações patológicas, pois em ratos com disfunção do nervo pélvico ou transecção medular a resposta contrátil é mediada pelos receptores M2, além disso, essa população de receptores esta aumentada em cobaias com hipertrofia detrusora e obstrução parcial da bexiga (PONTARI et al., 2004; YAMANISHI et al., 2015)

### **1.2.3.2 Inervação simpática**

O principal neurotransmissor responsável pela atuação do sistema nervoso simpático no durante a fase de enchimento é a noradrenalina, que irá atuar em receptores adrenérgicos do tipo  $\alpha$  e  $\beta$  presentes na uretra, na base e no corpo da bexiga, assim como nos terminais nervosos parassimpáticos e simpáticos. Estudos relataram que a base da bexiga e a uretra contém  $\alpha$ -adrenoceptor, que participam dos mecanismos de continência induzindo a contração e fechamento da uretra durante a fase de enchimento da bexiga. A musculatura detrusora apresenta três subtipos de  $\alpha$ -adrenoceptores:  $\alpha$ -1A,  $\alpha$ -1B e  $\alpha$ -1D, sendo todos acoplados à proteína Gq11 e exercendo seus efeitos através da ativação do mecanismo de sinalização mediado pela fosfolipase C (FRAZIER et al., 2006). Os receptores  $\alpha$ -1A são o subtipo mais expresso na uretra, onde promovem a contração durante a fase de enchimento, além de estarem presentes nos terminais colinérgicos pré-sinápticos facilitando a liberação de ACh, ao passo que os subtipos  $\alpha$ -1B e  $\alpha$ -1D são responsáveis pela contração da musculatura lisa (CLEMENS, 2010).

Foram identificados três subtipos de  $\beta$  adrenoceptores na musculatura detrusora, sendo estes os receptores  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3. As três isoformas de  $\beta$  adrenoceptores estão acoplados à proteína Gs, mediando o relaxamento do detrusor e diminuição da pressão intravesical através da ativação da adenilato ciclase, com consequente aumento do AMPc durante a fase de enchimento da bexiga (LONGHRUST e LEVENDUSKY, 1999). Acredita-se que o subtipo  $\beta$ 2 seja predominantemente em ratos, coelhos e humanos, porém, verificou-se que o subtipo  $\beta$ 3

quando estimulado por agonistas produz diminuição da pressão da bexiga sem, entretanto, afetar a pressão uretral, além de ser apontado como o principal envolvido no mecanismo de relaxamento do detrusor durante a fase de armazenamento (FRAZIER et al., 2006; SVALO et al., 2013).

### **1.2.3.3 Inervação não adrenérgica não colinérgica (NANC)**

#### **1.2.3.3.1 Papel do NO**

O NO é um neurotransmissor altamente permeável e produzido através da hidroxilação da L-arginina pela Citrulina, sendo esta reação catalisada por enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS), que se subdividem em três isoformas, endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) (MONCADA et al., 1991). As isoformas eNos e nNos atuam de maneira dependente do complexo cálcio-calmodulina e são denominadas de constitutivas, pois são constituintes normais das células em condições fisiológicas, sendo a eNOS responsável por regular o tônus vascular através da liberação do NO e a nNos funcionando com neurotransmissor do sistema nervoso. No entanto, a isoforma iNOS ou indutível, não atua de maneira dependente do cálcio, possui uma atividade sustentada e não está presente nas células em repouso, sendo estimulada por substâncias pró-inflamatórias e citocinas (STUEHR et al., 2004).

Por meio de técnica imunohistoquímica as três isoformas de NOS foram identificadas no trato urinário inferior de cobaias e seres humanos, sendo expressas no urotélio, músculo liso e principalmente nos nervos e vasos sanguíneos (BURNETT et al., 1997). Em bexigas urinárias de ratos verificou-se a expressão de NOS nas fibras nervosas simpáticas e parassimpáticas, apoiando a teoria de que o NO exerce um papel importante como componente inibitório do BTU (PERSSON et al., 1999). Além disso, cobaias deficientes de nNOS apresentam hipertrofia e aumento da atividade vesical, sugerindo que o NO está envolvido no relaxamento muscular durante a fase de enchimento e que alterações nesta via de sinalização podem resultar em BH (BURNETT et al., 1997; FATHIAN-SABET et al., 2001). Em estudo conduzido por Wheeler et al. (2005), observou-se que o aumento intracelular de GMPc foi responsável por relaxar o BTU, reduzindo a hiperatividade detrusora. Por esse motivo, a utilização de fármacos que inibem a degradação do GMPc mediada por enzimas denominadas fosfodiesterase (PDE), em especial a PDE5, vem despertando grande interesse no tratamento do LUTS. Diversos estudos comprovaram a expressão da PDE-5 na próstata (UCKERT et al., 2001), bexiga (QIU et al.,

2001) e uretra de rato (KUHN et al., 2000), comprovando que a via o NO-GMPc atua na regulação do tônus da musculatura lisa do BTU.

#### **1.2.3.3.2 Papel do ATP**

Diferentes estudos comprovam a presença de receptores purinérgicos na bexiga de ratos e coelhos (BURNSTOCK, 2000). Mais recentemente, estudos em cobaias e seres humanos demonstraram que o ATP pode ser liberado pelo urotélio em resposta ao estiramento dos miofibroblastos, sinalizando ao SNC a plenitude da bexiga (CHENG et al., 2011). Sabe-se que as contrações induzidas por ATP na musculatura detrusora são mediadas por dois subtipos de receptores purinérgicos, um deles é o receptor P2X, que está ligado à canais iônicos e promove o influxo de cálcio extracelular, e o outro P2Y está acoplado à proteína G, envolvendo a sinalização via fosfolipase C/IP3 e liberação de cálcio extracelular (BURNSTOCK e WILLIAMS, 2000). No estudo de Burnstock. (2001), demonstrou-se que as contrações induzidas por estimulação elétrica também eram reproduzidas pela administração exógena de ATP, sendo assim, acredita-se que o ATP seja um importante mediador responsável pelo componente NANC excitatório no baixo trato urinário. Em estudo conduzido por O'Reilly et al. (2001) foi comprovado que a expressão do receptor purinérgico P2X1 é predominante na bexiga humana e esta relacionada com a ação excitatória da musculatura detrusora, sendo que em situações patológicas este subtipo de receptor encontra-se aumentado, o que pode estar relacionado com o desenvolvimento da bexiga hiperativa.

### **1.3 Sintomas do baixo trato urinário (LUTS)**

As alterações na capacidade de estocar a urina podem gerar alguns sintomas do baixo trato urinário (LUTS) como, urgência miccional, alterações da frequência, incontinência urinária, hiperatividade e hipertrofia da bexiga. O mecanismo da hiperatividade ainda não está completamente elucidado, mas o aumento da atividade dos nervos aferentes, que deve ser decorrente da ausência de uma substância inibitória na região do músculo detrusor (ou fora dela), deve ser um dos mecanismos envolvidos para iniciar as contrações (MILSOM et al., 2001). Em virtude de o baixo trato urinário receber inervação nitrérgica, o NO produzido pelos nervos ou por outras regiões (urotélio, célula muscular) deve ter forte influência sobre a atividade nervosa aferente. Assim, modificações da via L-arginina/NO/cGMP devem gerar prejuízos para o efluxo urinário, hipertrofia, aumento da atividade eferente, hiperatividade da

bexiga urinária e LUTS (HO et al., 2004). Pacientes portadores de LUTS constituem população ampla e crescente. Os dados epidemiológicos revelam que a incidência da hiperatividade da bexiga urinária aumenta com a idade, sendo a prevalência de 53% em homens asiáticos com idade superior a 70 anos (MOORTHY et al., 2004). Estudo realizado com 16.776 pacientes, com idade igual ou superior a 40 anos, demonstrou que a prevalência do sintoma de hiperatividade da bexiga urinária é de 16.6%. Os sintomas mais comumente relatados foram: aumento da frequência urinária (85%), urgência miccional (54%) e incontinência (36%); (MILSOM et al., 2001).

### **1.3.1 Definição e epidemiologia da bexiga hiperativa**

A bexiga hiperativa (BH) é caracterizada pela International Continence Society (ICS) como uma síndrome que cursa com urgência miccional acompanhada ou não de incontinência, frequentemente associada ao aumento da frequência urinária e noctúria, na ausência de fatores infecciosos, metabólicos ou locais (ABRAMS et al., 2000). Estudos epidemiológicos conduzidos pela sociedade portuguesa apontam que a prevalência da BH em idosos não institucionalizados chega a 35% em homens e 29% nas mulheres. Nos Estados Unidos a prevalência alcança 16% em homens e 16,9% nas mulheres, sendo menores os episódios de urge-incontinência nos homens (2,6%) quando comparados às mulheres (9,3%) (STEWART et al., 2003). De acordo com Steers e Lee, (2001), a BH está fortemente associada com a depressão e o isolamento social nos pacientes com urge-incontinência; além disso, Milsom et al. (2001) ressaltam que mesmo nos casos de BH sem perda urinária os pacientes têm a qualidade de vida bastante comprometida. Mesmo com a alta prevalência, o processo fisiopatológico que resulta na BH ainda não é completamente esclarecido. Estudos apontam o possível envolvimento de mecanismos de origem periférica, central e miogênica (BRADING, 1997; DRAKE et al., 2000; 2001; de GROAT, 1997 e 1998), subdividindo a etiologia da BH em causas neurogênicas e não neurogênicas.

#### **1.3.1.1 Etiologia da bexiga hiperativa**

A etiologia da BH ainda não foi completamente elucidada, porém, sua compreensão pode auxiliar na escolha da modalidade terapêutica adequada. A função urinária normal depende do equilíbrio e interação entre cérebro, substância reticular da ponte, cerebelo, medula e gânglios periféricos, com a participação de diversos neurotransmissores e componentes anatômicos do

BTU (CHANCELLOR et al., 2004; OUSLANDER, 2004). Portanto, qualquer alteração morfológica ou nos mecanismos que sinalizam o ciclo de micção podem contribuir para o comprometimento da função urinária. Usualmente, a BH pode resultar de causas neurogênicas, não neurogênicas ou miogênicas, porém, independente da etiologia, o conjunto de sinais permanece o mesmo e cursa com elevação da pressão intravesical durante a fase de armazenamento, mudanças estruturais na musculatura lisa e resposta alterada mediante estímulos (SEMINS et al., 2004).

A forma neurogênica de BH esta relacionada a afecções que envolvam a inervação de qualquer uma das estruturas do SNC envolvidas na sinalização do ciclo miccional. Dentre as principais causas de bexiga hiperativa neurogênica podemos citar as lesões supra-pontinas e medulares. Acredita-se que o córtex cerebral, particularmente a região do lobo frontal, tenha efeitos inibitórios sobre o sistema autônomo durante o enchimento vesical e que a deficiência desse mecanismo, muito comum em doenças neurológicas como AVC, tumores, traumatismos cranianos e doenças demenciais, possa ser umas das causas de bexiga hiperativa (GRIFFITHS et al., 2004). No caso de lesões medulares, é frequente a interrupção das fibras eferentes provenientes da formação reticular pontomesencefálica, sendo que a altura e a extensão da lesão determinam a intensidade da bexiga hiperativa e a coordenação ou não entre o detrusor e o esfíncter uretral (WISE, 1997).

Dentre as causas miogênicas, estudos sugerem que alterações estruturais primárias relacionadas ao acoplamento dos feixes de musculatura lisa possam resultar em aumento da inervação vesical para responder adequadamente aos estímulos autonômicos ou em respostas inadequadas da musculatura aos estímulos elétricos, permitindo que contrações locais, que normalmente se extinguem, se propaguem, podendo gerar contrações clinicamente detectáveis (GOLDBERG e SAND, 2002). Estudos em cobaias demonstraram que a presença da excitação assíncrona da musculatura lisa vesical segue padrões de denervação e reinervação. Mills et al. (2000), estudaram feixes musculares de pacientes com BH e observaram que 35% dos destes tinham evidências de denervação, com comprometimento das fibras musculares lisas quando comparados aos controles. Além disso, estudos morfológicos demonstraram comprometimento estrutural da musculatura detrusora associado ao quadro de BH, o que pode refletir a sintomatologia dos pacientes. Tais achados incluem especialmente hipertrofia e aumento de elastina e colágeno (GOLDBERG e SAND, 2002).

Por fim, a causa não neurogênica de BH está relacionada ao quadro de obstrução vesical e hipersensibilidade aferente (THOMAS e ABRAMS, 2000; PATEL e CHAPPLE, 2008). O quadro clínico mais comum de BH por obstrução vesical são os pacientes com hiperplasia

prostática benigna (HPB), porém, existem inúmeros fatores que podem resultar em obstrução vesical, como por exemplo, hipertrofia e hiperplasia dos miócitos, aumento na deposição do colágeno e diminuição da inervação parassimpática, o que ocorre em consequência à lesões isquêmicas provocadas pela redução do fluxo sanguíneo ao detrusor hipertrofiado (TURNER e BRADING, 1997; GOSLING et al., 2000). Além disso, possíveis alterações nos impulsos aferentes que controlam a micção também podem resultar na BH. As fibras aferentes do tipo C, localizadas principalmente na região sub-urotelial, são ativadas por estímulos químicos, irritativos e térmicos, porém, ainda não se sabe ao certo qual a sua real participação na fisiopatologia da BH, estudos apontam que mecanismos excitatórios secundários podem ser predominantes e as fibras C ficarem mais ativas (de GROAT e YOSHIMURA, 2006; BIRDER e de GROAT, 2007).

### **1.3.2 Diagnóstico**

O ideal para iniciar o diagnóstico é a coleta de anamnese e exame físico detalhados. Durante este passo, é fundamental determinar o tempo de aparecimento dos sintomas, sua natureza abrupta ou não, tratamentos anteriores bem sucedidos, períodos de remissão, impacto dos sintomas na qualidade de vida e presença de fatores agravantes, como por exemplo, diabetes mellitus, o uso de medicamentos, ingestão hídrica inadequada, doenças neurológicas, patologias cardíacas e cirurgias prévias (TRUZZI et al., 2016). Durante o exame físico é possível a identificação de massas pélvicas, distensão vesical ou intestinal, prolapso genital e aumento de volume da próstata, os quais são úteis para o diagnóstico diferencial de outras patologias que mostram uma sintomatologia semelhante à da bexiga hiperativa, além disso também é importante a realização de um breve exame neurológico para excluir a possibilidade de bexiga hiperativa neurogênica (TRUZZI et al., 2016).

O diagnóstico complementar para as alterações urinárias pode ser praticado através do diário miccional, uroanálise e do estudo urodinâmico. O diário miccional é um bom aliado no diagnóstico, na avaliação inicial e final de um tratamento específico. Permite trabalhar de forma “reeducacional”, conscientizando a paciente sobre seus “vícios” urinários e sobre o funcionamento do seu trato urinário (MESQUITA et al., 2010). Os parâmetros avaliados pelo diário miccional incluem frequência miccional (diurna e noturna), volume líquido ingerido, volume urinado, número de perda urinária, episódios de enurese noturna, urgência miccional ou perda durante relação sexual, bem como a quantidade de absorventes utilizados diariamente (TINCELLO et al., 2007).

Devido ao baixo custo e para eliminar a possibilidade de infecções urinárias e hematúria, os exames de uroanálise são solicitados com frequência. A presença de hematúria pode sugerir a existência de um neoplasma do trato urinário ou outras patologias e merece investigação adicional (ROVNER et al., 2002). O estudo urodinâmico realizado por meio da cistometria é considerado um exame padrão ouro para avaliar a presença de contrações involuntárias do músculo detrusor e caso ocorra a presença desse tipo de contração a terminologia utilizada é hiperatividade do detrusor, podendo ser de origem idiopática e neurogênica, sendo que mais de 90% dos casos a hiperatividade do detrusor é idiopática (ABRAMS e WEIN, 2000; NORTON e BRUBAKER, 2006; PETER et al., 2009).

### **1.3.3 Tratamento do LUTS**

#### **1.3.3.1 Tratamento não farmacológico**

O tratamento baseia-se em medidas farmacológicas e não farmacológicas. A abordagem não farmacológica consiste inicialmente em orientar o paciente sobre a natureza da patologia, como gerir os sintomas e mudanças no estilo de vida. É importante salientar que as intervenções no estilo de vida desempenham um papel importante no tratamento da bexiga hiperativa, educando o paciente sobre sua condição e certos aspectos que a influenciam, como por exemplo, o volume de ingestão de líquidos, evitar tabaco, cafeína e bebidas alcólicas, além de estar atento aos medicamentos utilizados e fazer algumas alterações dietéticas (BURGIO, 2013).

O tratamento fisioterapêutico também é um componente importante na abordagem conservadora da bexiga hiperativa e baseia-se em eletroestimulação do nervo tibial posterior, treinamento vesical e treinamento muscular do assoalho pélvico. Os treinamentos vesical e muscular buscam trabalhar a consciência corporal e fortalecer o assoalho pélvico através de exercícios perineais que estimulam a contração voluntária, fazendo com que o paciente readquira o controle sobre o reflexo da micção (MORAIS et al., 2007; WANG et al., 2004). A contração voluntária dos músculos do assoalho pélvico inibe reflexamente a excitação parassimpática sobre o detrusor, resultando na melhora da urgência miccional e prevenindo a urge-incontinência (BURGIO, 2013). A eletroestimulação do nervo tibial posterior resulta na ativação de fibras simpáticas pélvicas e detrusoras, além da inibição central de eferentes motores para a bexiga e de aferentes pélvicos provenientes da bexiga, restabelecendo os mecanismos inibitórios (MORAIS et al., 2007).

### 1.3.3.2 Tratamento farmacológico

No tratamento farmacológico são utilizados agentes anti-muscarínicos, agonistas beta 3 adrenérgicos e toxina botulínica. Os anti-muscarínicos são a principal classe de fármacos utilizada no tratamento da bexiga hiperativa, dentre eles podemos citar: Solifenacin, Tolterodine, Propiverine, Darifenacin e Fesoterodine. Esses fármacos atuam impedindo a ativação dos receptores muscarínicos pela acetilcolina, bloqueando o principal estímulo nervoso para a contração do detrusor e aliviando os sintomas da bexiga hiperativa (WU et al., 2014). Entretanto, a adesão ao tratamento tem sido um problema, pois o uso de anti-muscarínicos resulta em inúmeros efeitos colaterais indesejáveis, como boca seca, tontura, constipação, sonolência, taquicardia e turvação visual (FREEMAN e ADEKANMI, 2005).

Uma opção aos pacientes que não respondem bem aos anti-muscarínicos é a utilização de agonistas beta 3 adrenérgicos, como o Mirabegron, que foi aprovado nos Estados Unidos para o tratamento da bexiga hiperativa em 2012 e atua promovendo o relaxamento da musculatura lisa do detrusor através da adenilato ciclase solúvel e pela liberação do fator inibidor derivado do urotélio (WU et al., 2014, TUDOR et al., 2016). Terapias que combinam agentes anti-muscarínicos e agonistas beta 3 adrenérgicos já vem sendo estudadas visando diminuir os efeitos colaterais da terapia à longo prazo e aumentar a aderência ao tratamento (TUDOR et al., 2016).

Para os pacientes que não respondem ao tratamento conservador e apresentam alto grau de intolerância aos fármacos, outra opção é a aplicação de toxina botulínica do tipo A na musculatura detrusora, provocando bloqueio seletivo da liberação de acetilcolina nas terminações nervosas e reduzindo a contratilidade do músculo detrusor. Geralmente os efeitos de cada aplicação duram entre 9 e 13 meses, com melhorias significativas nos sintomas de armazenamento e na qualidade de vida (WALLACE e DRAKE, 2015).

## 1.4 Insuficiência cardíaca e LUTS

A incontinência urinária e a síndrome da bexiga hiperativa são classificadas como alguns dos sintomas do baixo trato urinário (LUTS), e são prevalentes em pacientes com IC causando um impacto significativo na qualidade de vida (RICH, 2006). Além disso, as terapias farmacológicas para IC, tais como diuréticos podem agravar a incontinência urinária existente ou contribuir para o desenvolvimento de um quadro clínico de incontinência urinária (BIERMAN, 2004). Estudos realizados em pacientes com IC demonstram que aproximadamente 32% a 34%

dos homens e 41% a 62% das mulheres relataram ser portadoras de LUTS (BIERMAN, 2004; PALMER et al., 2009). Além disso, recentemente, demonstrou-se que aproximadamente 57% dos pacientes com IC apresentaram síndrome da bexiga hiperativa (PALMER et al., 2009). Existem evidências de que alterações do LUTS e IC apresentam fatores de risco semelhantes como, idade avançada, hipercolesterolemia, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (SANDFELD e HAHN, 2003; BIERMAN, 2004; FONDA et al., 2005). Sabe-se que esses fatores de riscos estão associados à disfunção do sistema nervoso autônomo e redução da disponibilidade de NO, no qual, tem sido implicado no desenvolvimento da síndrome da bexiga hiperativa (HALL et al., 2001; LINDMARK et al., 2003; HO et al., 2004; HUBEAUX et al., 2007). Assim, o entendimento dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento do LUTS em pacientes com IC pode significar melhoria na qualidade de vida e obtenção de novas possibilidades terapêuticas.

### **1.5 Inibidores de PDE5, insuficiência cardíaca e LUTS**

Com a descoberta de que o sistema NO-GCs-GMPc era o mais expressivo e efetivo no mecanismo de ereção peniana, foram identificadas várias substâncias com potencial terapêutico no tratamento da DE. Tais agentes estão divididos em dois grupos: os que atuam de maneira dependente de NO e os que atuam de maneira independente. Os inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) atuam de forma dependente do NO, inibindo a degradação do GMPc. A PDE5 é a enzima responsável por controlar a via de sinalização do GMPc/PKG, especialmente em baixas concentrações de cálcio. A importância fisiológica de PDE5 na regulação do músculo liso vascular e não vascular foi demonstrada pelo uso clínico de um inibidor específico, o sildenafil (CORBIN e FRANCIS, 2002). O sildenafil causa relaxamento em diferentes preparações vasculares, incluindo aorta e artéria mesentérica de coelhos, ratos e camundongos (TOQUE et al., 2008; TURGUT et al., 2008) e não vasculares como corpo cavernoso humano, de coelho, de rato e de camundongos e detrusor isolado de ratos e coelhos (CLAUDINO et al., 2011; TOQUE et al., 2009; BÁU et al., 2010;). Além disso, diversos estudos têm demonstrado a presença da PDE-5 em corpo cavernoso (TAHER et al., 1997; MORELAND et al., 1999; GOPAL et al., 2001), próstata (UCKERT et al., 2001), bexiga (QIU et al., 2001) e uretra (KUHN et al., 2000), sugerindo que a via o NO-GMPc contribui também para a manutenção do tônus do trato urogenital. No trato urinário inferior, trabalhos foram realizados com o intuito de se identificar o alvo do NO (FATHIAN-SABET et al., 2001; MASUDA et al., 2002). Entretanto, alguns trabalhos divergem sobre a identificação da GCs no detrusor. Smet et

al. (1996) demonstraram que somente células da camada mucosa apresentam marcação para GMPc, não havendo nenhuma marcação em células musculares lisas em bexigas de cobaias. De maneira similar, Masuda et al. (2002) verificaram um aumento da atividade da GCs após estimulação com nitroprussiato de sódio (SNP) em bexigas de coelho, sendo este efeito significativamente maior na mucosa comparado à musculatura lisa. Por outro lado, em bexigas urinárias humanas identificou-se marcação para GCs nas células da musculatura lisa, e secundariamente nas células uroteliais (FATHIAN-SABET et al., 2001). Apesar das divergências sobre a relevância da via de sinalização NO-GMPc no baixo trato urinário, estudos epidemiológicos e clínicos em pacientes com DE tratados com inibidores de PDE5 relataram melhorias das complicações do LUTS, despertando o interesse dessa classe de medicamentos para o tratamento da síndrome da bexiga hiperativa e LUTS (ANDERSSON et al., 2008; 2009). Adicionalmente, os inibidores da PDE5 (sildenafil, vardenafil e tadalafil), tem sido utilizado para o tratamento da hipertensão pulmonar associadas à IC (GUAZZI et al., 2011), e na terapia de diversos processos fisiopatológicos como doenças cardiovasculares (KASS et al., 2007; CHRYSANT, 2013; DAS et al., 2015). Além disso, o tadalafil tem sido utilizado no tratamento de LUTS associado a hiperplasia prostática benigna (BROCK et al., 2013; SORSABURU, 2014; ZHANG e PARK, 2015). Entretanto, a redução da síntese/disponibilidade de NO, comum nessas desordens, pode comprometer o efeito benéfico dos inibidores de PDE5, uma vez que o tratamento crônico com o sildenafil não reverteu à DE em ratos deficientes de NO (GUR et al., 2010).

Devido ao uso crescente dos inibidores de PDE5 na disfunção erétil, seus efeitos no tratamento de patologias cardíacas foram deixados em segundo plano por alguns anos. Porém, estudos recentes in vitro e in vivo demonstraram respostas cardíacas benéficas nos parâmetros hemodinâmicos e clínicos de pacientes com IC submetidos a tratamentos de curto e longo prazo com inibidores de PDE5 (KASS et al., 2012; SALLOUM et al., 2014; Kim et al., 2015). Em pacientes com IC por cardiomiopatia dilatada e doença isquêmica estudos tem apontado que o tratamento de 6 meses com Sildenafil foi responsável pela melhora na sintomatologia e no desempenho durante o exercício (GUAZZI et al., 2007). Para os casos de IC sistólica e hipertensão pulmonar, o tratamento de 4 semanas com Sildenafil em pacientes estáveis melhorou a função cardíaca, respiratória e o desempenho funcional (LEWIS et al., 2007). Além dos benefícios já citados, também se observou em modelos animais diminuição da hipertrofia cardíaca e do edema pulmonar (KIM et al., 2012; SALLOUM et al., 2014). Assim, o tratamento com os inibidores de PDE5 pode ter um efeito benéfico tanto no retardo do desenvolvimento da IC como na melhora dos sinais e sintomas associados a esta patologia.

## 1.6 Estresse oxidativo, insuficiência cardíaca e LUTS

O estresse oxidativo tem sido apontado como uma das principais causas implicadas em complicações vasculares decorrentes da progressão de doenças cardiovasculares, resultando do desequilíbrio na produção de ERO's e da atuação do sistema antioxidante (DIMMELER et al., 2007). Em condições normais o sistema celular redox, composto por substâncias enzimáticas e não enzimáticas, é responsável por manter o constante equilíbrio celular entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO's) produzidas durante a respiração celular e a atuação do sistema antioxidante contra o acúmulo de ERO's (RAMIRO et al., 2016). O sistema de formação de ERO's consta com uma vasta gama de enzimas que atuam na formação de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), sendo a NADPH oxidase a principal precursora para a formação de ERO's na parede vascular. Dentre os componentes do sistema antioxidante estão as enzimas intracelulares como a catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase (SOD) e os antioxidantes não enzimáticos como as vitaminas E, C, beta caroteno e ácido lipóico (YABLUCHANSKIY et al., 2013).

No tecido cardíaco, o estresse oxidativo encontra-se aumentado em resposta a hipertrofia e insuficiência cardíaca. O aumento de EROs em miocárdio de corações com IC também está relacionado ao sistema antixodante prejudicado, assim como a atividade reduzida das enzimas superóxido desmutase (SOD) e catalase (YABLUCHANSKIY et al., 2013) ou estimulação de complexos enzimáticos como a xantina oxidase, ciclooxigenase, óxido nítrico sintetase e NADPH oxidase, principais enzimas relacionadas a produção de  $O_2^-$  (SUMIMOTO et al., 2008).

Em modelos de hipertrofia ventricular esquerda progressiva em cobaias a expressão das subunidades da NADPH oxidase, principais enzimas envolvidas no sistema catalítico de ERO's, encontravam-se em regulação positiva durante o processo de desenvolvimento da IC. Tais achados também foram evidenciados na membrana sarcoplasmática de corações humanos insuficientes (LI et al., 2002). Sendo assim, o acúmulo de ERO's no coração doente, mostrou-se com papel fundamental na fisiopatologia da IC, uma vez que está envolvido nas alterações de hipertrofia, fibrose, viabilidade celular, metabolismo energético, balanço do cálcio intracelular e o desenvolvimento de doenças arrítmicas (HEYMES et al., 2003).

Além disso, sabe-se que as alterações de isquemia/reperfusão durante o ciclo miccional e a isquemia crônica imposta sobre o tecido vesical pela IC e outros fatores de risco associados, podem resultar na geração de ERO's e contribuir para o desenvolvimento de LUTS (SHIN et al., 2015). Em estudo recente, foi evidenciado um aumento significativo da

concentração do malondialdeído (MDA), subproduto da lipoperoxidação, e da Guanilato ciclase solúvel (GCs) na musculatura detrusora de ratos com hiperplasia prostática benigna (HPB), indicando que a alta concentração de ERO's no tecido aumentou a degradação de membranas celulares e contribuiu para o surgimento de disfunções urodinâmicas como o aumento do volume urinário total (VUT) e do volume por micção (VM) (MATSUI et.al., 2012).

## **2 JUSTIFICATIVA**

A IC é o desfecho final da maioria das doenças cardiovasculares e pode atuar de maneira sinérgica aumentando a predisposição para o desenvolvimento de LUTS. A disfunção do sistema nervoso autônomo e alterações na via de sinalização NO-GCs-GMPc têm sido apontadas como possíveis mediadores das complicações urogenitais causadas pela IC. Entretanto, os mecanismos de sinalização intracelulares pelo qual a IC pode levar a alterações no baixo trato urinário ainda não foram elucidados. Sabe-se que o sistema NO-GCs-GMPc possui influência no controle das funções do baixo trato urinário, assim, diversas drogas têm sido sintetizadas para potencializar o efeito exercido pelo NO, como o tadalafil, que atua de forma dependente de NO e inibe a degradação de GMPc.

Assim, visto que praticamente não existem informações dos mecanismos envolvidos nas alterações do LUTS causados pela IC, a avaliação das alterações bioquímicas e funcionais é de grande importância para a busca de um melhor entendimento destas disfunções urogenitais na IC. Além disso, pode-se avaliar se o tratamento crônico com o Tadalafil pode modular a via de sinalização NO-GCs-GMPc e prevenir as possíveis alterações urogenitais em animais com IC. Portanto, este estudo é relevante para a área de saúde pública e qualidade de vida de indivíduos portadores de IC que apresentam disfunções urogenitais.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar a contribuição do tratamento crônico com tadalafil nas alterações do baixo trato urinário de ratos Sprague Dawley com insuficiência cardíaca (modelo de fístula-aortocaval), procurando explorar as alterações na função cardíaca, nos mecanismos contráteis da musculatura detrusora, na função urinária *in vivo*, no equilíbrio oxidante e antioxidante e na

função renal dos animais. Para atingir tais metas, seguiremos as seguintes estratégias experimentais:

### 3.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliar através de ecocardiografia transtorácica as alterações cardíacas promovidas pelo modelo de FAC e a contribuição do tratamento crônico com tadalafil no comprometimento cardíaco;
- II. Avaliar a função urinária “*in vivo*” em modelo de ratos com IC (modelo de fístula-aortocaval) submetidos ao tratamento crônico com tadalafil, determinando-se os parâmetros cistométricos em animais anestesiados;
- III. Avaliar os componentes neurogênicos envolvidos no controle da reatividade do músculo detrusor, através da contração neurogênica (*ex vivo*), e frente a estímulos dependentes (carbacol e alfa-beta metileno ATP) e independentes (cloreto de potássio) de receptores;
- IV. Investigar a contribuição do estresse oxidativo para LUTS em ratos com IC submetidos ao tratamento crônico com tadalafil, realizando-se medidas bioquímicas (ELISA) para avaliar a lipoperoxidação, atividade antioxidante total e atividade de enzimas antioxidantes (Cu/Zn SOD-1, catalase);
- V. Avaliar possíveis alterações renais realizando-se medidas bioquímicas (ELISA) para quantificar os níveis plasmáticos de creatinina e uréia em ratos com IC submetidos ao tratamento crônico com tadalafil.

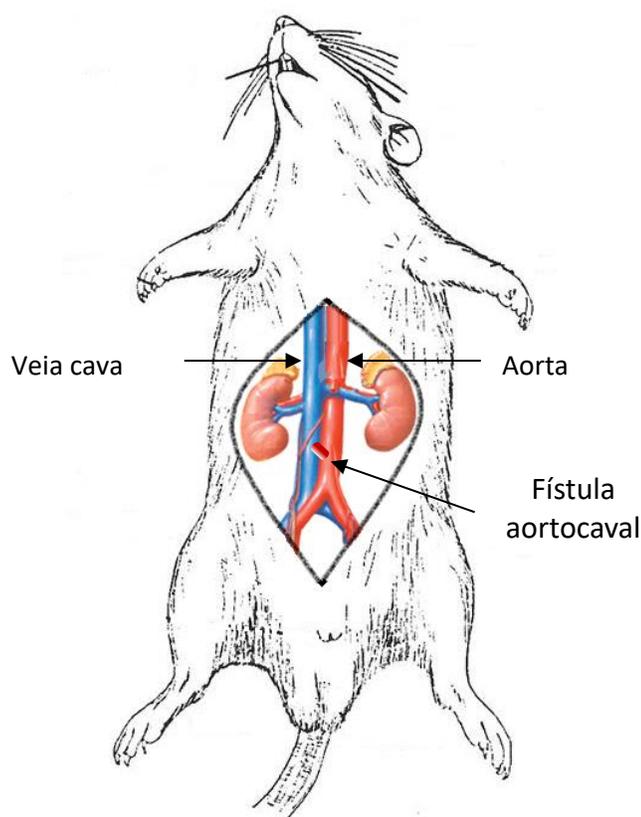
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 62 ratos machos da linhagem Sprague Dawley, pesando entre 250 e 280 gramas. Dos quais, 4 foram a óbito durante o procedimento cirúrgico e 2 após o ecocardiograma, 25 foram utilizados nos experimentos “*ex vivo*” e avaliação da função renal, 31 foram utilizados no experimento “*in vivo*” e avaliação do equilíbrio redox e 33 foram submetidos ao ecocardiograma transtorácico. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos à 24° C em ciclos de claro/escuro (12/12 h), com ração e água *ad libitum* no Biotério Central da Universidade São Francisco/Bragança Paulista. Os protocolos experimentais encontram-se aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade São Francisco (protocolo nº 001.06.11).

### 4.2 Indução da insuficiência cardíaca: Modelo de fístula aortocaval

Os ratos foram anestesiados com xilazina (7mg/kg) e ketamina (62 mg/kg) administradas via intraperitoneal (IP) e submetidos à tricotomia, seguida de laparotomia ventral abdominal para expor a aorta e veia cava abdominal. Em seguida, uma agulha de calibre 19G com o bisel curto, foi inserida na aorta abdominal exposta abaixo das artérias renais, avançado até a veia cava para criar uma fístula aortocaval, aumentando o retorno venoso (Figura 03). Em seguida, a agulha foi retirada e o local da punção da aorta abdominal selado com cianoacrilato. As suturas com fios absorvíveis primeiro foram realizadas na musculatura lisa abdominal e em seguida suturada a pele do animal (BROWER e JANICKI, 2001).

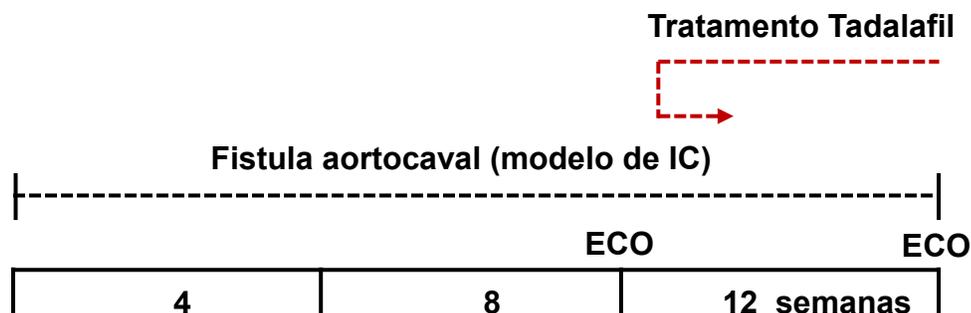


**FIGURA 03:** Representação de cirurgia para criação da fístula entre a aorta abdominal e a veia cava inferior.

### 4.3 Tratamento crônico com Tadalafil

O tratamento crônico com o inibidor da PDE5 tadalafil, utilizado como um agente dependente de NO, foi realizado por via intraperitoneal, sendo administrada a dose de 5 mg/rato/dia; assim, o tadalafil foi diluído em solução de NaCl 0,9% e a solução homogeneizada 3 minutos no Vórtex. Os animais controle foram submetidos às mesmas condições experimentais, porém receberam apenas a solução NaCl 0,9%. Após 8 semanas da indução da fístula iniciamos o tratamento crônico com o tadalafil por 4 semanas, totalizando 12 semanas de protocolo experimental (CHOI et al., 2015; SALLOUM et., 2014; GACCI et al., 2016) (Figura 04).

## Protocolo Experimental



**FIGURA 04:** Protocolo experimental para o tratamento com tadalafil.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

- (1) Sham: os animais deste grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico, porém, não foi realizada a indução da fístula; e receberam somente solução de NaCl 0,9%;
- (2) Insuficiência cardíaca (IC): os animais deste grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico com a indução da fístula; e receberam somente solução de NaCl 0,9%;
- (3) Tadalafil: os animais deste grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico, porém, não foi realizada a indução da fístula; e receberam tadalafil na dose de 5 mg/rato/dia;
- (4) IC + Tadalafil: os animais deste grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico com a indução da fístula; e receberam tadalafil na dose de 5 mg/rato/dia.

### 4.4 Validação do modelo de insuficiência cardíaca

#### 4.4.1 Ecocardiograma transtorácico

Para a validação do modelo de IC e melhor avaliação da contribuição do tratamento com tadalafil nos parâmetros cardíacos, os animais foram submetidos ao exame de ecocardiografia transtorácica nas fases pré e pós-tratamento. Os animais foram anestesiados com xilazina (7mg/kg) e ketamina (62 mg/kg) administradas via intraperitoneal, posteriormente foi realizada a tricotomia da região torácica e os animais foram submetidos ao procedimento de ecocardiografia. Para a Ecocardiografia Transtorácica foi utilizado o equipamento (Sono Site – M Turbo, Washington, USA). Os parâmetros mensurados foram: massa do VE, fração de

ejeção, fração de ejeção do VE e volumes sistólico e diastólico finais do VE (RODRIGUES et al., 2016).

#### **4.5 Cistometria (avaliação “*in vivo*”)**

Após o período do protocolo experimental (12 sem.), os ratos foram anestesiados com xilazina (7mg/kg) e ketamina (62 mg/kg) administradas via intraperitoneal. Após laparotomia mediana, a bexiga foi exposta e um escalpe (19G), conectado a um cateter (PE50) foi introduzido no ápice da bexiga. O catéter foi conectado simultaneamente a um transdutor de pressão e a uma bomba de infusão. Antes do início da cistometria, a bexiga foi completamente esvaziada. O cistometrograma foi conduzido através da infusão contínua de solução salina na bexiga a um fluxo de 4 mL/h (CLAUDINO et al., 2015). Os seguintes parâmetros urodinâmicos foram avaliados:

- (1) Capacidade (CP) da bexiga, calculada pelo tempo necessário para desencadear a primeira micção x 4 (mL) / 60 minutos;
- (2) Pressão limiar (PL), que é a pressão imediatamente anterior ao início da contração de micção, e representa a variação de pressão intravesical durante a fase de enchimento;
- (3) Contração de micção (CM), que é a amplitude do pico da contração que resulta em micção;
- (4) Frequência de micção (FM) que é o número de contrações de micção por minuto;
- (5) Frequência de contrações involuntárias (CIs), calculada como número de CIs por minuto, sendo considerada como CI aquela contração com amplitude superior a 4 mmHg que não resulta em micção;
- (6) Pressão basal (PB), que é a pressão após iniciada a cistometria e estabilizado o sistema.

## 4.6 Estudo funcional do músculo detrusor (avaliação “*ex vivo*”)

### 4.6.1 Preparo e montagem dos tecidos

Após 12 semanas, os animais foram anestesiados com isoflurano e em seguida, exsanguinados por secção dos vasos cervicais e eutanasiados. Para remoção da bexiga urinária primeiramente foi realizada uma incisão na parede abdominal, expondo-se a bexiga e removendo-a através de uma secção horizontal ao nível dos ureteres. Após esse procedimento os tecidos foram colocados em solução de Krebs-Ringer com a seguinte composição em mM: NaCl, 118; NaHCO<sub>3</sub>, 25; glicose, 5,6; KCl, 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,17 e CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 2,5. O isolamento do músculo detrusor foi obtido retirando-se a base da bexiga; a porção remanescente foi aberta de modo a formar um retângulo, para posterior obtenção de “strips” (tiras) longitudinais. No miógrafo, os tecidos foram montados em câmaras para órgão isolado (volume de 5 mL), preenchidas com solução de Krebs-Henseleit e continuamente gaseificadas com O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5 %), à temperatura de 37° C (pH 7,4). A tensão aplicada ao detrusor (10 mN) foi periodicamente ajustada até obter-se a estabilização dos mesmos (60 min). As alterações de tensão foram medidas usando transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistemas PowerLab 4/30 de aquisição de dados (Software versão 7.3, AD Instruments, Austrália).

As curvas concentração-efeito foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações do agonista em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas. Os dados obtidos das curvas concentração-efeito em detrusor foram avaliados segundo a equação:

$$E = E_{max}/[(1+(10c/10X)^N + \Phi)]$$

A letra E representa o efeito do agonista na resposta tecidual; E<sub>max</sub> representa a resposta máxima que o agonista pode produzir; c representa o logaritmo da EC<sub>50</sub>, definida como a concentração do agonista que produz metade da resposta máxima; x representa o logaritmo das concentrações do agonista; o exponencial n é o coeficiente angular ou inclinação, o qual define o tipo de curva concentração-efeito obtida e, finalmente, o símbolo Φ representa a resposta observada na ausência do agonista.

A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros: E<sub>max</sub>, log EC<sub>50</sub> e n foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

### 4.6.2 Avaliação dos mecanismos contráteis

As respostas contráteis do músculo liso detrusor foram avaliadas através da construção de curvas concentração-efeito ao agonista pleno carbacol (1nM - 100µM) e ao agente hiperpolarizante KCl (1 – 300 mM) em detrusor de ratos IC submetidos ao tratamento com tadalafil. A resposta contrátil mediada por receptores purinérgicos foi avaliada através da adição de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (10µM). As respostas contráteis foram expressas em mN/mg de peso úmido do “strip”.

#### **4.6.3 Avaliação da curva de frequência-resposta**

Os tecidos foram montados entre dois eletrodos de platina dispostos paralelamente. Os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 80 V, com duração dos pulsos de 1 milissegundo, intervalo entre os pulsos de 0,2 ms, duração da estimulação de 10 segundos nas frequências de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 Hz com intervalo de 3 minutos entre os estímulos. A estimulação elétrica foi realizada através de estimulador elétrico DMT (Current stimulator CS200, Ann Arbor, MI, EUA). As respostas contráteis foram expressas em mN/mg de peso úmido do tecido.

#### **4.7 Avaliação do sistema antioxidante**

##### **4.7.1 Determinação da capacidade antioxidante total (CAT)**

O sistema antioxidante é composto por enzimas como superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase, além de macro e micro moléculas como albumina, ácido ascórbico, beta caroteno, ácido úrico e bilirrubina. A soma entre as substâncias antioxidantes endógenas e as derivadas da alimentação corresponde a capacidade antioxidante total (CAT). O kit antioxidante Cayman pode ser utilizado para mensurar a CAT em amostras de plasma, urina e saliva, baseando-se na habilidade dos antioxidantes presentes na amostra de inibir a oxidação do ABTS para o radical ABTS<sup>+</sup> através da metamioglobina. A supressão da absorvância é proporcional à quantidade de antioxidantes presentes na amostra e pode ser mensurada no espectrofotômetro em 750 ou 405nm. A capacidade da amostra em evitar a oxidação do ABTS é comparada ao Trolox, um antioxidante comercial análogo do tocoferol e solúvel em água.

##### **4.7.2 Determinação da atividade antioxidante da superóxido dismutase (SOD)**

As superóxido dismutases (SOD) são metaloenzimas que catalisam a dismutação do ânion superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, sendo cruciais para a defesa antioxidante do organismo. O kit SOD da Cayman pode ser utilizado para mensurar a atividade da SOD em amostras de plasma, homogenatos de tecido e soro. A técnica utiliza um sal de tetrazólio para detectar radicais superóxido gerados através da xantina oxidase. A unidade da SOD é definida pela quantidade de enzima necessária para inibir 50% da dismutação do radical superóxido, sendo monitorada no espectrofotômetro em 440-460nm.

#### **4.7.3 Determinação da atividade antioxidante da Catalase**

A catalase é uma enzima intracelular encontrada na maioria das células aeróbicas, sendo responsável por catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), um subproduto tóxico do metabolismo celular, para oxigênio molecular e água. O método utiliza amostras de plasma, soro ou homogenatos de tecido para promover a reação entre catalase e metanol na presença de  $H_2O_2$ , tendo como produto final um formaldeído mensurado colorimetricamente no espectrofotômetro em 540nm.

#### **4.8 Avaliação do dano oxidativo**

Para avaliação do dano oxidativo foi utilizada a dosagem do Malondialdeído (MDA), um subproduto da lipoperoxidação, reconhecido mecanismo de lesão celular em animais e utilizado como marcador de estresse oxidativo. O método utiliza amostras de plasma, soro ou homogenatos de tecido para promover uma reação entre o malondialdeído e duas moléculas de ácido tiobarbitúrico em alta temperatura (90-100°C) e ambiente ácido, produzindo um complexo de coloração rosa mensurado no espectrofotômetro a 532 nm.

#### **4.9 Avaliação da função renal**

A função renal foi avaliada através da dosagem dos níveis plasmáticos de uréia e creatinina em ratos submetidos ao tratamento crônico com Tadalafil. Após a coleta em tubos pré-carregados com heparina, o sangue será centrifugado e armazenado em freezer -80° C até o momento dos testes. Todos os métodos foram realizados utilizando-se kits comerciais, seguindo-se as instruções do fabricante (Labtest diagnóstica S.A, Vista Alegre, Brasil).

#### 4.10 Análise estatística

Valores experimentais de contração foram calculados em relação à contração máxima produzida pelo agonista dividido pelo peso úmido de cada strip (mN.mg<sup>-1</sup>). Valores de EC50 foram apresentados como o logaritmo negativo (pEC50) calculados pelo programa GraphPad Prism. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão das médias (E.P.M.) de n experimentos indicados em cada caso. Para comparações múltiplas de variáveis independentes foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo post hoc teste de Tukey. O teste t não pareado de Student foi utilizado para as análises estatísticas dos dados de ecocardiograma nos grupos pré-tratamento. O programa InStat (GraphPad, version 3,00 Software, EUA) foi usado para as análises. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Peso corporal

A Tabela 03 mostra que, tanto na fase pré-tratamento (8<sup>o</sup> semana) quanto pós-tratamento crônico com tadalafil (12<sup>o</sup> semana) o peso corporal dos animais não apresenta diferenças significativas entre os grupos. Além disso, o tratamento com tadalafil não causou variações significativas de peso em nenhum dos grupos analisados.

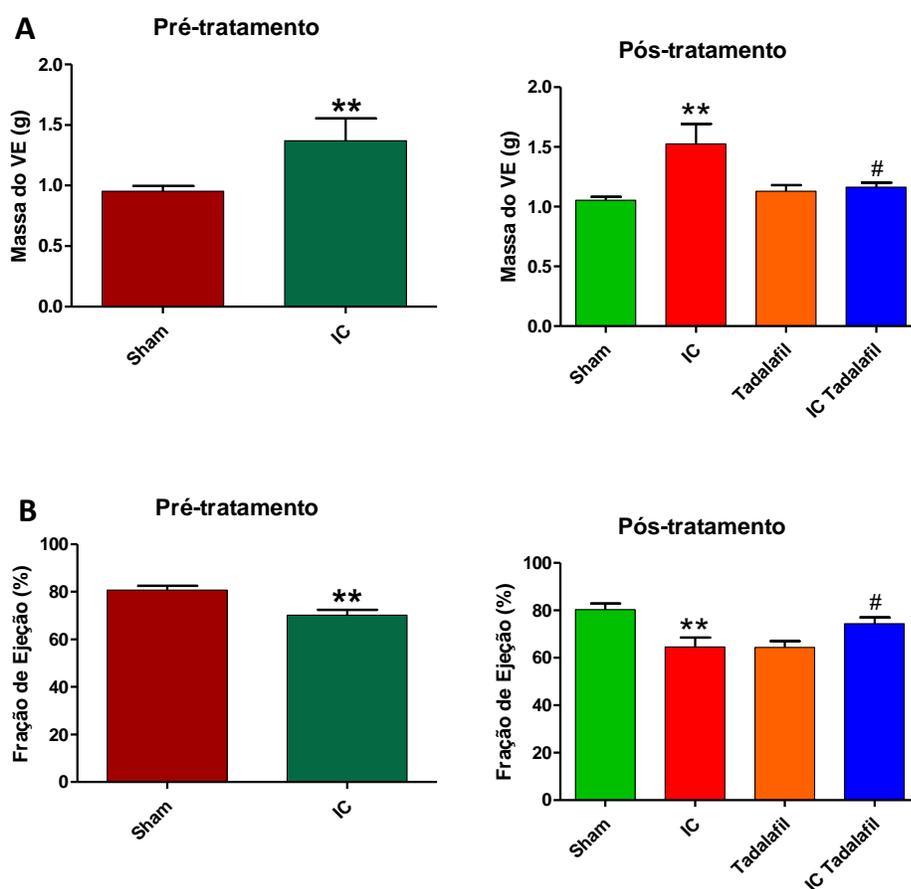
**Tabela 03:** Peso corporal dos grupos Sham, IC, Tadalafil e IC Tadalafil nas fases pré e pós-tratamento crônico com tadalafil.

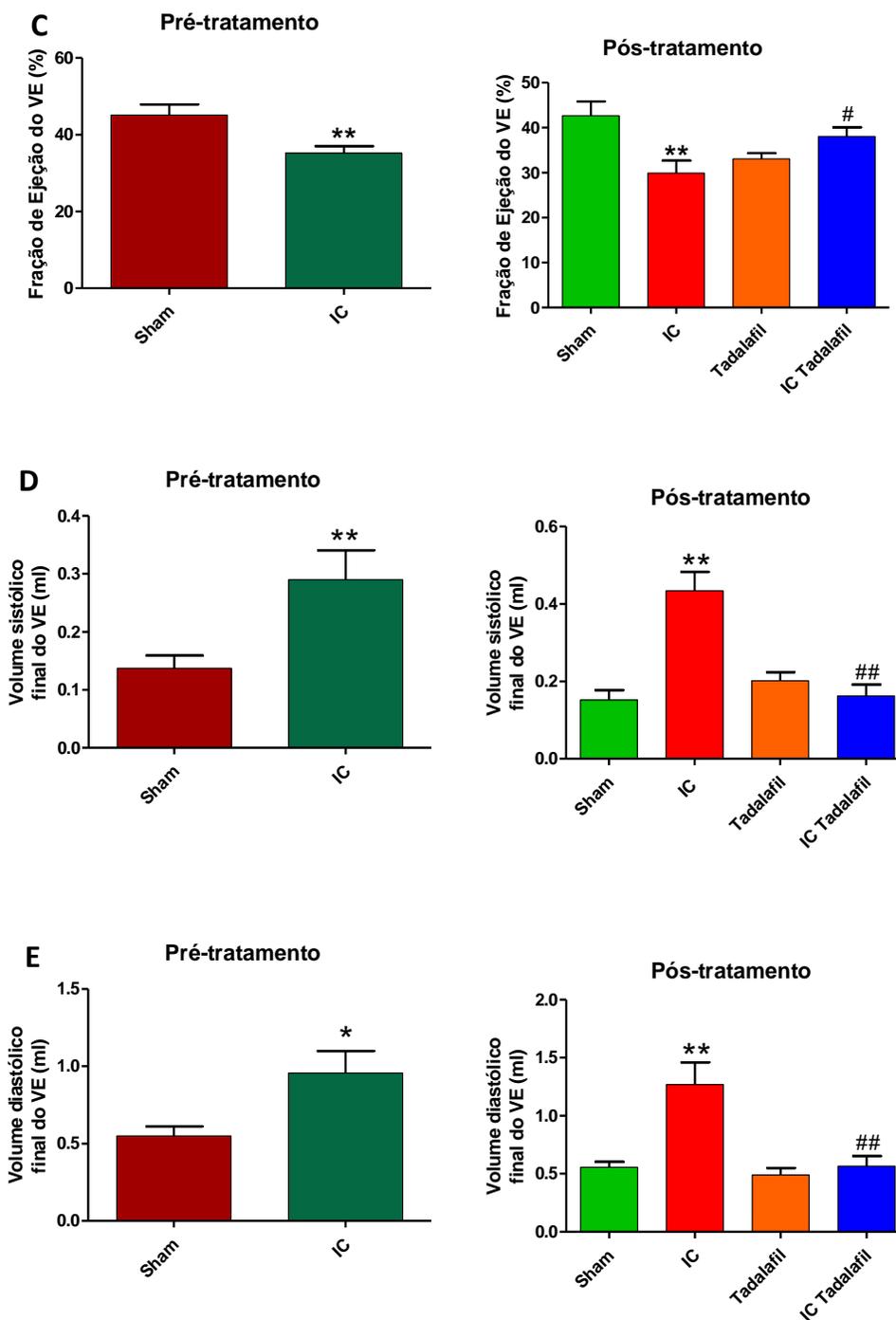
Grupos	Peso Corporal (g)	
	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Sham	468 ± 30	460 ± 23
IC	451 ± 19	459 ± 28
Tadalafil	448 ± 31	448 ± 27
IC Tadalafil	471 ± 35	443 ± 31

Peso corporal dos grupos Sham (N=13), IC (N=12), Tadalafil (N=14) e IC Tadalafil (N=17). Os dados representam as médias ± erro padrão da média dos experimentos.

## 5.2 Parâmetros cardíacos

O controle dos parâmetros cardíacos foi realizado através de ecocardiograma transtorácico, sendo mensuradas a massa do VE, fração de ejeção, fração de ejeção do VE, volume sistólico final do VE e volume diastólico final do VE em animais pré e pós-tratamento crônico com tadalafil. No grupo IC pré-tratamento observa-se aumento da massa do VE (43%) e diminuição da fração de ejeção (13%) e fração de ejeção do VE (21%), além de aumento nos volumes sistólico (107%) e diastólico (72%) finais do VE quando comparado ao respectivo grupo sham, assim comprovando que o modelo de fístula aortocava foi eficiente na indução da IC. Uma vez estabelecida a IC iniciou-se o tratamento crônico com tadalafil 5mg/dia por 4 semanas. Após o tratamento observa-se a restauração e reversão dos parâmetros cardíacos pré-avaliados, com diminuição da massa do VE (23%), aumento da fração de ejeção (16%), aumento da fração de ejeção do VE (30%) e diminuição dos volumes sistólico (45%) e diastólico (55%) do VE no grupo IC tadalafil quando comparado ao grupo IC pós-tratamento (Figura 05). O tratamento com tadalafil não alterou os parâmetros cardíacos no grupo Tadalafil.

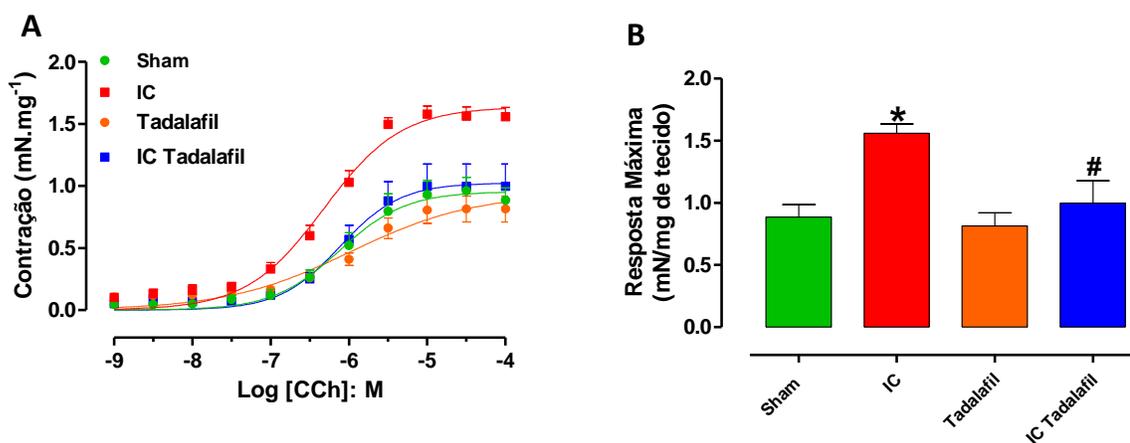




**FIGURA 05:** Medidas da massa do ventrículo esquerdo (VE) (painel A), fração de ejeção (painel B), fração de ejeção do VE (painel C), volume sistólico final do VE (painel D) e volume diastólico final do VE (painel E) de ratos pré e pós-tratamento crônico com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média dos 7-9 experimentos. \* $p < 0,05$  comparado com o respectivo grupo sham; \*\* $p < 0,01$  comparado com o respectivo grupo sham; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo IC pós-tratamento.

### 5.3 Resposta contrátil do músculo detrusor induzida pelo carbacol

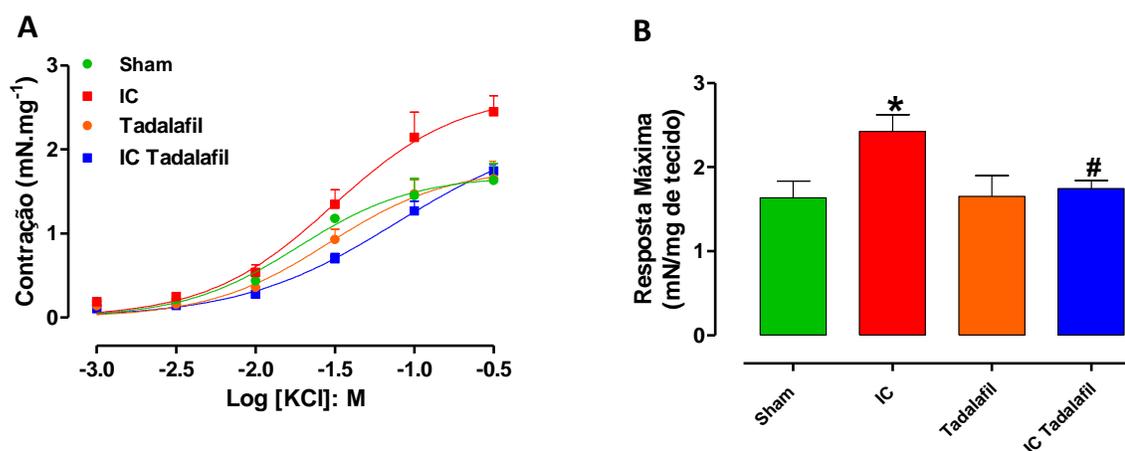
A resposta contrátil dependente dos receptores muscarínicos foi avaliada através da construção de curvas concentração-resposta ao agonista muscarínico não seletivo carbacol (CCh) no músculo liso detrusor em tônus basal. A potência ( $pEC_{50}$ ) do carbacol apresenta-se elevada no grupo IC ( $6,31 \pm 0,87$ ) quando comparada ao respectivo grupo Sham ( $6,12 \pm 0,12$ ). O tratamento crônico com tadalafil restaurou a potência do carbacol no grupo IC Tadalafil ( $6,11 \pm 1,12$ ), além disso, o tratamento não alterou a potência do carbacol no grupo Tadalafil ( $5,99 \pm 0,54$ ) (Figura 6A). A resposta máxima ao carbacol apresenta aumento significativo nos animais IC ( $1,55 \pm 0,07 \text{ mN.mg}^{-1}$ ) quando comparados ao respectivo grupo Sham ( $0,88 \pm 0,1 \text{ mN.mg}^{-1}$ ), porém, após o tratamento observa-se diminuição significativa da resposta máxima no grupo IC Tadalafil ( $0,99 \pm 0,18 \text{ mN.mg}^{-1}$ ) (Figura 6A e B). O tratamento não alterou a resposta máxima ao CCh no grupo Tadalafil (Figura 6A e B).



**FIGURA 06:** Curvas concentração-efeito ao carbacol (CCh 1 nM–100  $\mu$ M) (painel A) em detrusor de ratos submetidos ou não ao tratamento com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas (Sham n=4; IC n=5; Tadalafil n=5; IC Tadalafil n=4). A contração foi calculada como valor absoluto em mN dividido pelo peso individual de cada “strip” ( $\text{mN.mg}^{-1}$ ). Os valores de respostas máximas estão apresentados no painel B. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos. \* $p < 0,05$  comparado com o respectivo grupo Sham; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo IC.

#### 5.4 Resposta contrátil do músculo detrusor induzida pelo cloreto de potássio

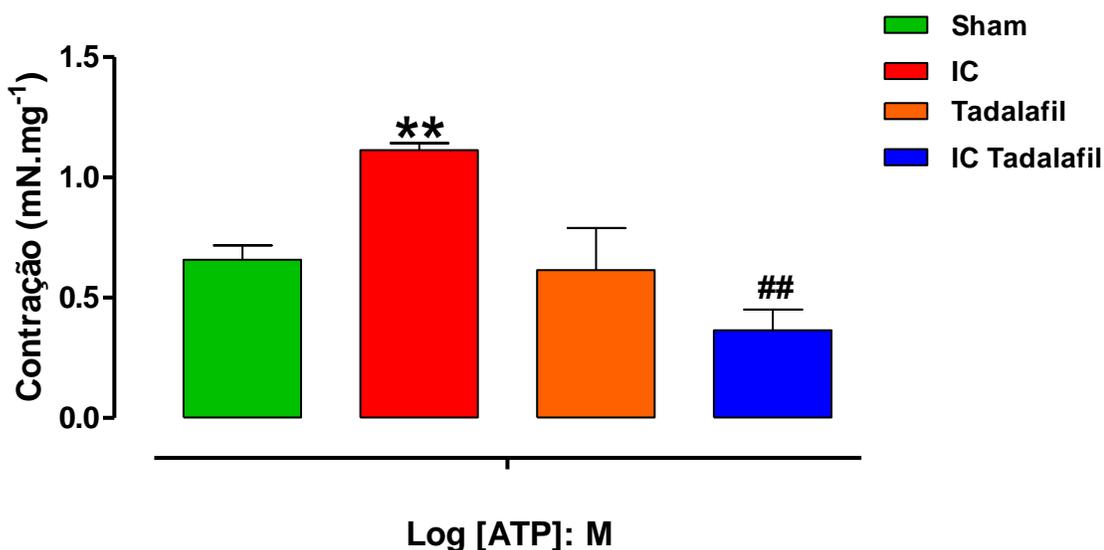
O efeito contrátil independente de receptores foi avaliado através da construção de curvas concentração-resposta ao agente despolarizante cloreto de potássio (KCl) no músculo liso detrusor de ratos em tônus basal. A potência ( $pEC_{50}$ ) do KCl não foi alterada em nenhum dos grupos analisados (Figura 7A). Entretanto, a resposta máxima ao KCl apresentou aumento significativo nos animais IC ( $2,42 \pm 0,20 \text{ mN.mg}^{-1}$ ) quando comparados ao respectivo grupo Sham ( $1,63 \pm 0,19 \text{ mN.mg}^{-1}$ ), porém, após o tratamento observa-se significativa diminuição da resposta máxima no grupo IC Tadalafil ( $1,74 \pm 0,09 \text{ mN.mg}^{-1}$ ) (Figura 7B). O tratamento não alterou a resposta máxima ao KCl no grupo Tadalafil (Figura 7B).



**FIGURA 07:** Curvas concentração-efeito ao cloreto de potássio (KCl 1–300 mM) (painel A) em detrusor de ratos submetidos ou não ao tratamento com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas (Sham n=5; IC n=6; Tadalafil n=7; IC Tadalafil n=6). A contração foi calculada como valor absoluto em mN dividido pelo peso individual de cada “strip” ( $\text{mN.mg}^{-1}$ ). Os valores de respostas máximas estão apresentados no painel B. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos. \* $p < 0,05$  comparado com o respectivo grupo Sham; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo IC.

### 5.5 Resposta contrátil do músculo liso detrusor induzida pelo $\alpha,\beta$ -metil ATP

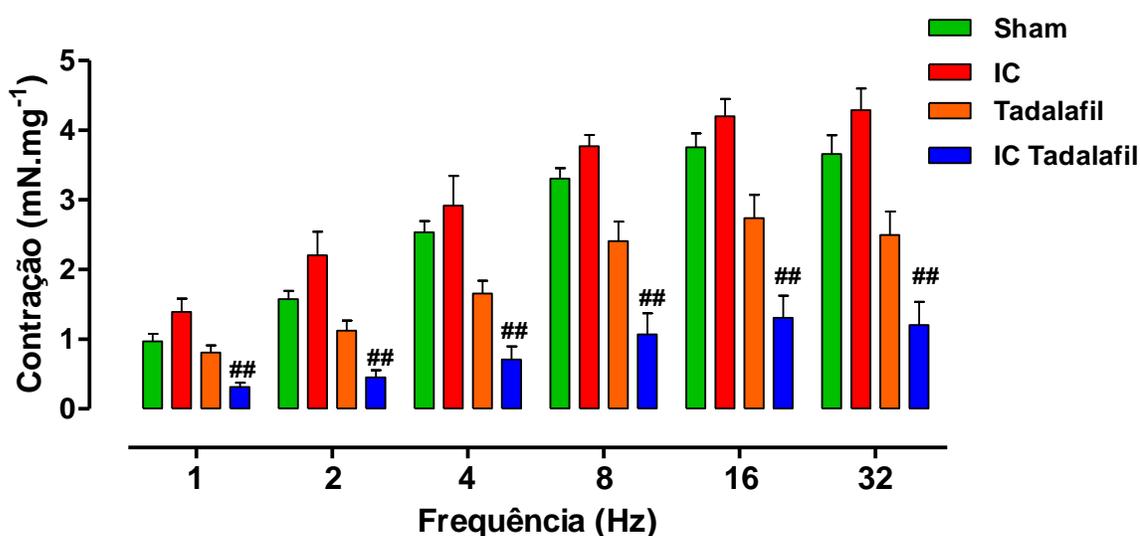
A contração dependente do sistema purinérgico foi avaliada através da adição não cumulativa de  $\alpha,\beta$ -metil ATP ( $10 \mu\text{M}$ ) no músculo liso detrusor em tônus basal. No grupo IC ( $1,11 \pm 0,02 \text{ mN.mg}^{-1}$ ) verificou-se aumento significativo na resposta contrátil quando comparado ao respectivo grupo Sham ( $0,65 \pm 0,06 \text{ mN.mg}^{-1}$ ). Após o tratamento os animais do grupo IC Tadalafil ( $0,36 \pm 0,08 \text{ mN.mg}^{-1}$ ) apresentaram redução significativa na contratilidade mediada por estímulo purinérgico quando comparados ao grupo IC, além disso, o tratamento não provocou alterações de resposta contrátil no grupo Tadalafil ( $0,61 \pm 0,17 \text{ mN.mg}^{-1}$ ) (Figura 8).



**FIGURA 08:** Curva não cumulativa ao  $\alpha,\beta$ -metil ATP ( $10 \mu\text{M}$ ) em detrusor de ratos submetidos ou não ao tratamento com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas (Sham n=4; IC n=5; Tadalafil n=5; IC Tadalafil n=5). A contração foi calculada como valor absoluto em mN dividido pelo peso individual de cada “strip” ( $\text{mN.mg}^{-1}$ ). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos. \*\*p<0,01 comparado com o respectivo grupo Sham; ## p<0,01 comparado ao grupo IC.

### 5.6 Resposta contrátil do músculo liso detrusor induzida pela estimulação elétrica

A contração induzida pela estimulação elétrica (EFS) foi avaliada através da construção de curvas frequência-resposta a EFS no músculo liso detrusor em tônus basal. O aumento gradativo da frequência da EFS promoveu uma resposta contrátil dependente da frequência. Entretanto, apesar do aumento da resposta contrátil mediada pelo EFS no detrusor de animais com IC este não foi estatisticamente diferente quando comparado ao seu respectivo controle (Sham). No entanto, após o tratamento com tadalafil foi observado uma redução significativa da resposta neurogênica do músculo detrusor do grupo IC tadalafil, em todas as frequências analisadas, quando comparado ao grupo IC, mostrando o benefício do tratamento com tadalafil na reversão da contratilidade neurogênica. Além disso, o tratamento promoveu diminuição da contratilidade neurogênica mediada por EFS no grupo Tadalafil (Figura 9).

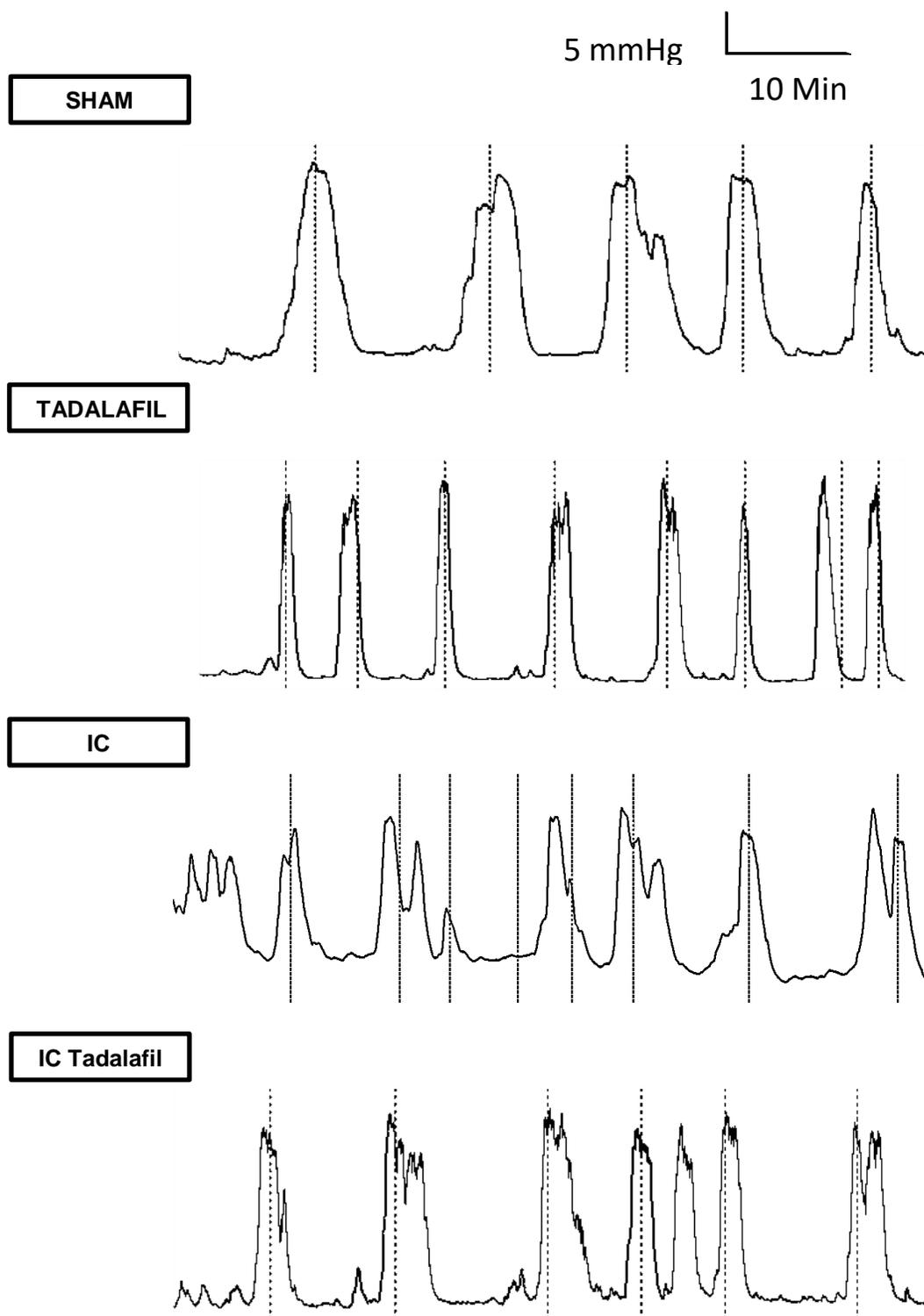


**FIGURA 09:** Curvas frequência-efeito ao estímulo elétrico (1–32 Hz) em detrusor de ratos submetidos ou não ao tratamento com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas (Sham n=4; IC n=5; Tadalafil n=4; IC Tadalafil n=4). A contração foi calculada como valor absoluto em mN dividido pelo peso individual de cada “strip” (mN.mg<sup>-1</sup>). Os dados representam as médias ± erro padrão da média dos experimentos. ## P <0.01 comparado ao grupo IC.

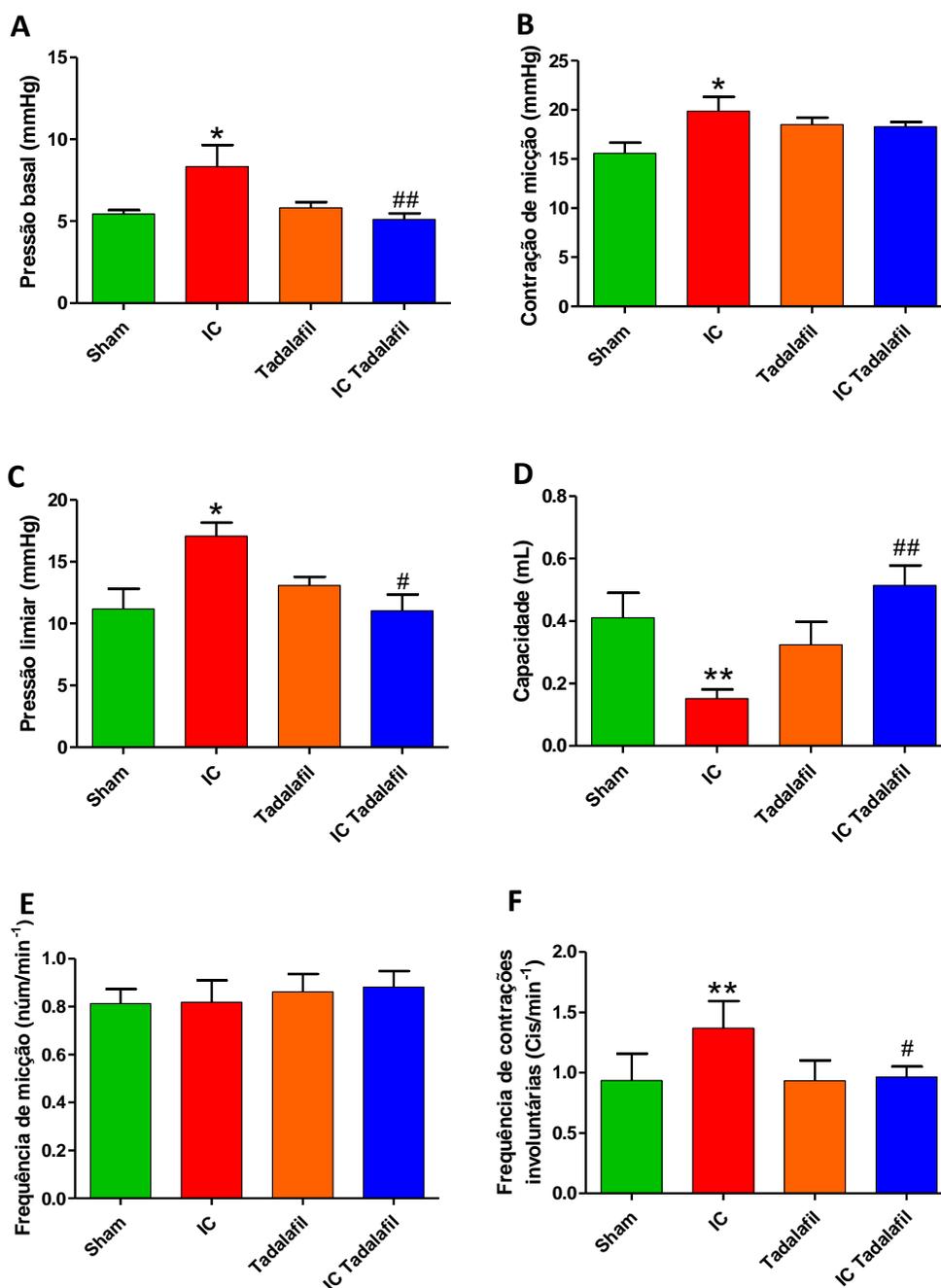
## 5.7 Cistometria

A função urinária *in vivo* foi avaliada através dos parâmetros mensurados por cistometria. Na Figura 10 podemos observar traçados representativos da cistometria em ratos tratados e não tratados com tadalafil, mostrando que no grupo Sham os animais raramente apresentam contrações involuntárias, porém o grupo IC exibe um padrão irregular de micção, com presença de contrações desinibidas ao longo do traçado. Após o tratamento o grupo IC Tadalafil apresenta padrão regular de micção e ausência de contrações desinibidas, além disso, o tratamento não afetou o traçado cistométrico do grupo Tadalafil.

A análise dos parâmetros cistométricos mostra que o grupo IC apresenta um aumento significativo da pressão basal (Figura 11A), contração de micção (Figura 11B), pressão limiar (Figura 11C) e das contrações involuntárias (Figura 11F), associada a uma diminuição significativa da capacidade (Figura 11D) quando comparado ao respectivo grupo Sham. O tratamento com tadalafil foi capaz de reverter as alterações cistométricas no grupo IC Tadalafil, restaurando a pressão basal, pressão limiar, capacidade e frequência de contrações involuntárias, além de não causar prejuízos aos parâmetros cistométricos do grupo Tadalafil (Figura 11).



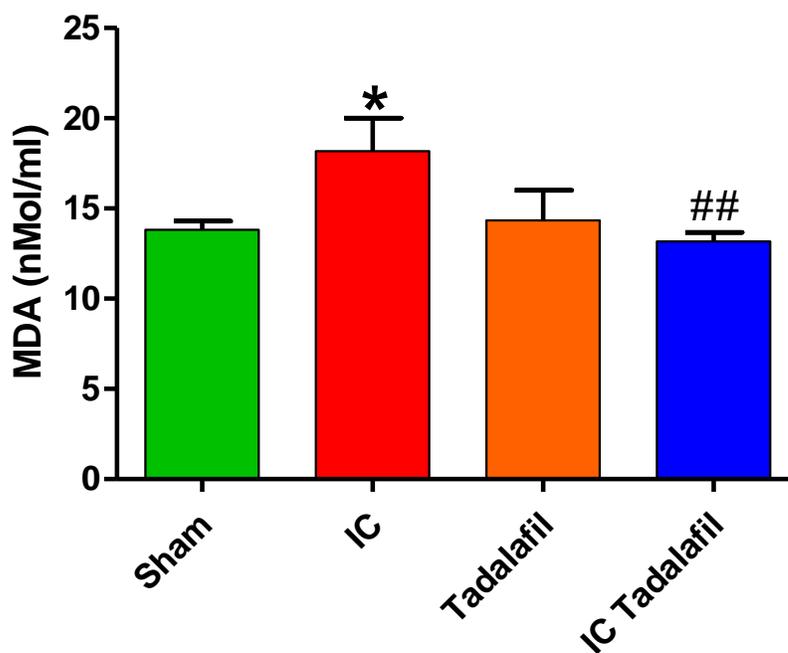
**FIGURA 10:** Traçado representativo da cistometria de animais Sham, Tadalafil, IC e IC Tadalafil. Os traçados representam 10 minutos de procedimento experimental e as linhas tracejadas indicam a presença de micção.



**FIGURA 11:** Parâmetros cistométricos dos animais de ratos submetidos ou não ao tratamento com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas (Sham  $n=8$ ; IC  $n=7$ ; Tadalafil  $n=7$ ; IC Tadalafil  $n=9$ ). Foram avaliados a pressão basal (PB; Painel A) contração de micção (CM; Painel B), pressão limiar (PL; Painel C), capacidade (CP; Painel D), frequência de micção (FM; Painel E), frequência de contrações involuntárias (CIs; Painel F). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos. \*  $p<0,05$  comparado com grupo Sham; \*\*  $p<0,01$  comparado ao grupo sham; #  $p<0,05$  comparado ao grupo Sham; ##  $p<0,01$  comparado IC.

## 5.8 Avaliação do dano oxidativo

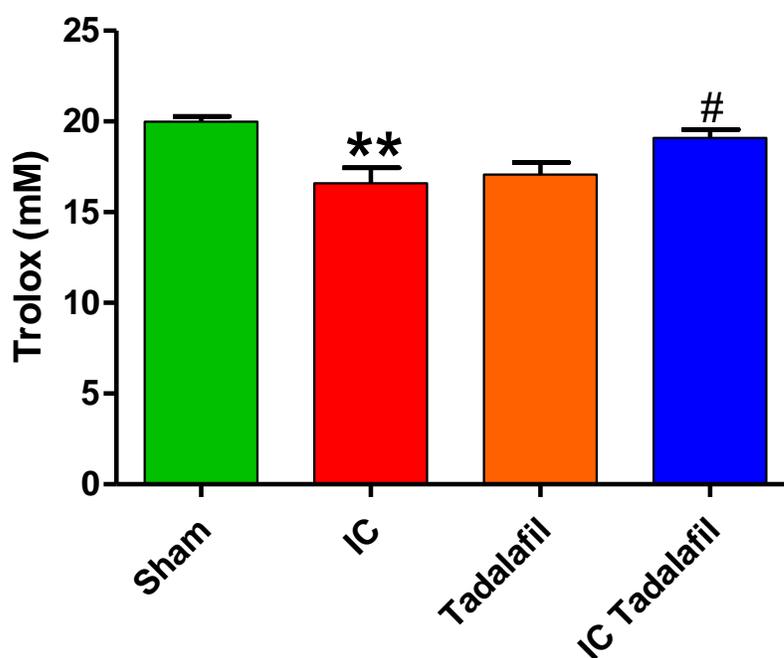
O dano oxidativo foi avaliado através da quantificação do malondialdeído (MDA), subproduto da lipoperoxidação, no plasma de ratos submetidos ao tratamento crônico com tadalafil. No grupo IC ( $18,17 \pm 3,08$  nmol/ml) verifica-se um aumento significativo do MDA quando comparado ao respectivo grupo Sham ( $13,81 \pm 1,44$  nmol/ml). O tratamento com tadalafil reduziu significativamente os níveis plasmáticos de MDA no grupo IC Tadalafil ( $13,17 \pm 1,6$  nmol/ml), além disso, não alterou os níveis de MDA no grupo Tadalafil ( $14,34 \pm 3,7$  nmol/ml) (Figura 12).



**FIGURA 12:** Avaliação do dano oxidativo através da quantificação do malondialdeído (MDA) em plasma de ratos submetidos ou não ao tratamento com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas (Sham n=9; IC n=7; Tadalafil n=9; IC Tadalafil n=10). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos. \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo Sham; \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo IC.

### 5.9 Capacidade antioxidante total

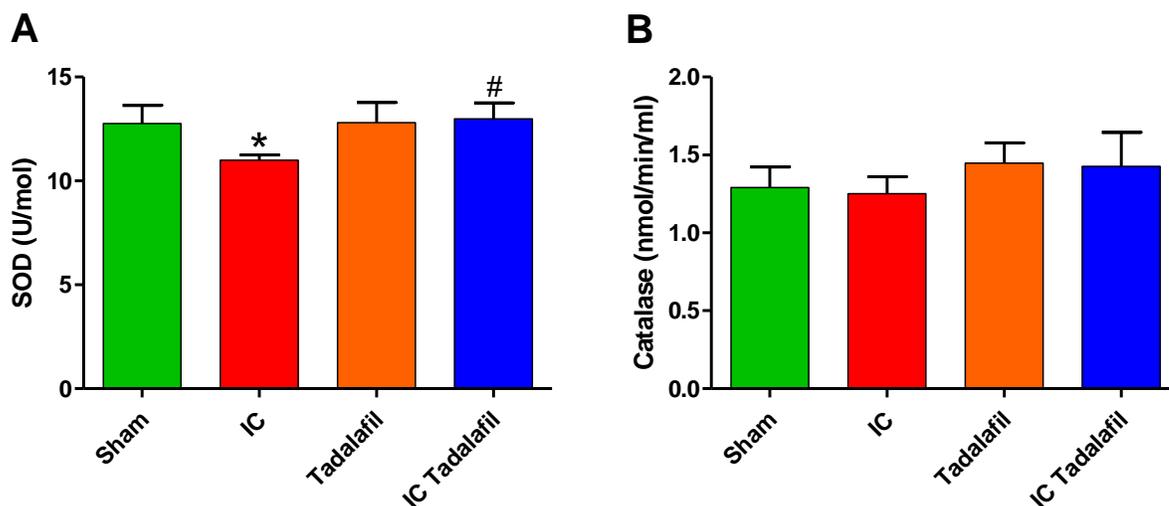
A capacidade antioxidante total foi avaliada através da quantificação dos níveis de trolox no plasma de ratos submetidos ao tratamento crônico com tadalafil. No grupo IC ( $16,60 \pm 1,6$  mM) verifica-se uma diminuição significativa do trolox quando comparado ao respectivo grupo Sham ( $20,0 \pm 0,63$  mM). O tratamento com tadalafil foi capaz de restaurar os níveis plasmáticos de trolox no grupo IC Tadalafil ( $19,09 \pm 1,02$  mM), além disso, não alterou os níveis de trolox no grupo Tadalafil ( $17,57 \pm 1,08$  mM) (Figura 13).



**FIGURA 13:** Avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) em plasma de ratos submetidos ou não ao tratamento com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas (Sham n=5; IC n=5; Tadalafil n=4; IC Tadalafil n=5). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos. \*\* $p < 0,01$  comparado ao respectivo grupo Sham; # $p < 0,05$  comparado ao grupo IC.

### 5.10 Atividade antioxidante enzimática

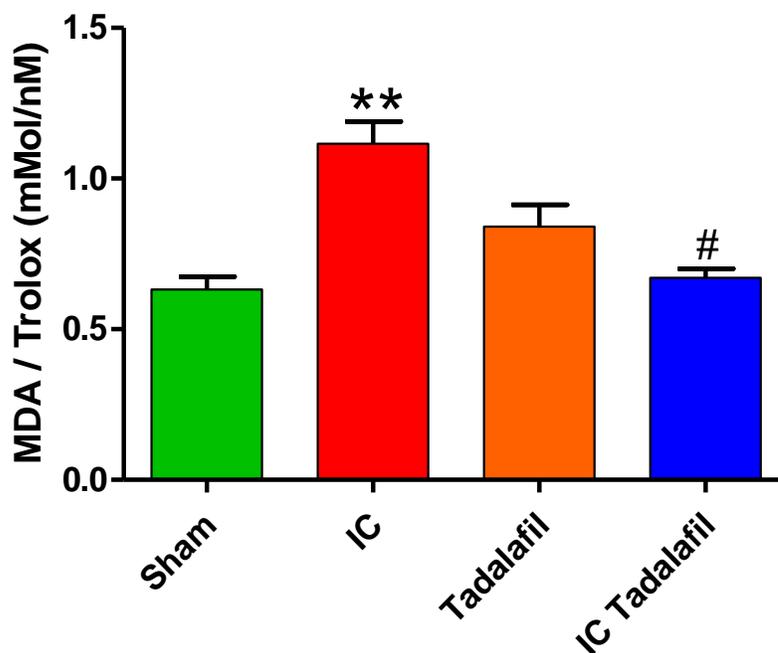
O sistema antioxidante enzimático foi avaliado através da quantificação da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase no plasma de ratos submetidos ao tratamento crônico com tadalafil. Os animais do grupo IC ( $10,98 \pm 0,54$  U/mol) apresentaram uma diminuição significativa da atividade enzimática da SOD quando comparados ao respectivo grupo Sham ( $12,75 \pm 1,84$  U/mol). O tratamento com tadalafil foi capaz de restaurar a atividade enzimática da SOD no grupo IC Tadalafil ( $12,98 \pm 1,87$  U/mol), além disso, não causou alterações significativas no grupo Tadalafil ( $12,8 \pm 1,78$  U/mol) (Figura 14A). Em contrapartida, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para a atividade enzimática da catalase (Figura 14B).



**FIGURA 14:** Avaliação da atividade plasmática das enzimas superóxido dismutase (SOD) (painel A) e Catalase (painel B) de ratos submetidos ou não ao tratamento com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas (Sham n=8; IC n=5; Tadalafil n=7; IC Tadalafil n=6). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos. \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo Sham; # $p < 0,05$  comparado ao grupo IC.

### 5.11 Índice de dano oxidativo

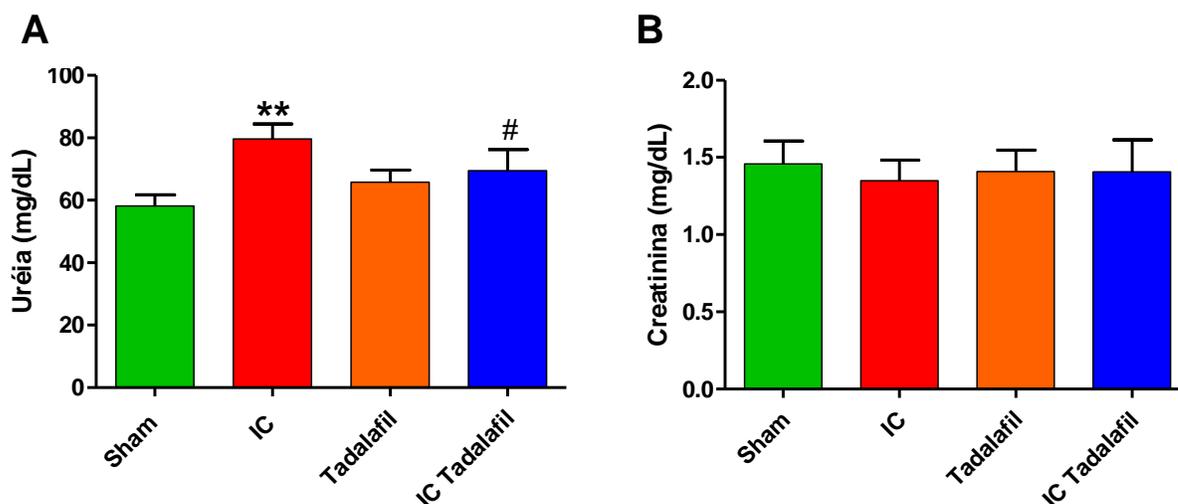
O índice de dano oxidativo foi mensurado através da relação entre os valores de malondialdeído (MDA) e a capacidade antioxidante total (CAT). No grupo IC ( $1,11 \pm 0,16$  nmol/mM) verifica-se um aumento significativo do índice de dano oxidativo quando comparado ao respectivo grupo Sham ( $0,63 \pm 0,09$  nmol/mM). O tratamento com tadalafil reduziu significativamente o índice de dano oxidativo no grupo IC Tadalafil ( $0,67 \pm 0,06$  nmol/mM), além disso, não alterou esse índice no grupo Tadalafil ( $0,84 \pm 0,14$  nmol/mM) (Figura 15).



**FIGURA 15:** Avaliação do índice de dano oxidativo (relação MDA/Tolox) de ratos submetidos ou não ao tratamento com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas (Sham n=5; IC n=5; Tadalafil n=4; IC Tadalafil n=5). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos. \*\* $p < 0,01$  comparado ao respectivo grupo Sham; # $p < 0,05$  comparado ao grupo IC.

## 5.12 Função renal

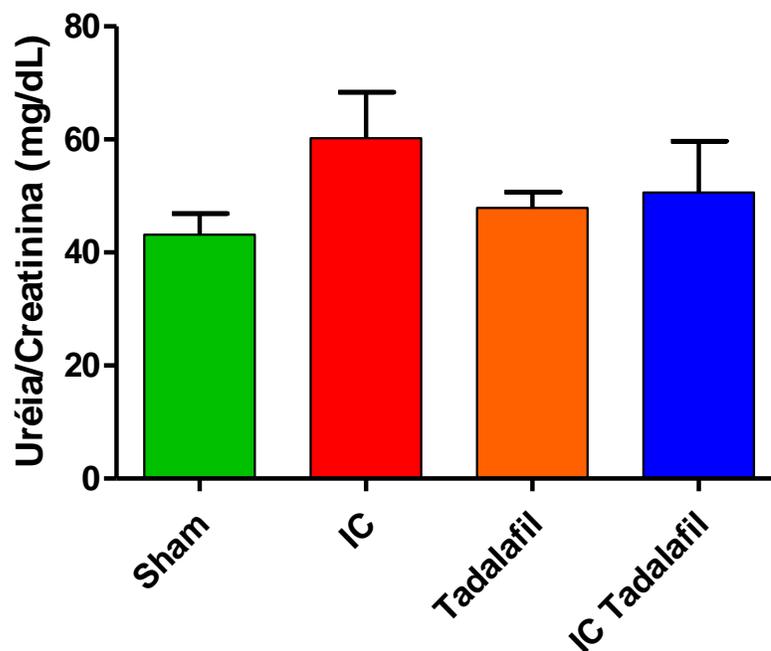
A função renal foi avaliada através da quantificação dos níveis plasmáticos de Uréia e Creatinina de ratos submetidos ao tratamento crônico com tadalafil. Os animais do grupo IC ( $79,65 \pm 11,66$  mg/dl) apresentaram um aumento significativo da Uréia quando comparados ao respectivo grupo Sham ( $58,22 \pm 7,71$  mg/dl). O tratamento com tadalafil reduziu significativamente a quantidade de Uréia no grupo IC Tadalafil ( $69,45 \pm 9,8$  mg/dl), além disso, não causou alterações significativas no grupo Tadalafil ( $65,75 \pm 9,37$  mg/dl) (Figura 16A). Em contrapartida, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para a quantificação dos níveis plasmáticos de Creatinina (Figura 16B).



**FIGURA 16:** Avaliação da concentração plasmática de Uréia (painel A) e Creatinina (painel B) em ratos submetidos ou não ao tratamento com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas (Sham n=6; IC n=7; Tadalafil n=7; IC Tadalafil n=7). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos. \*\*p<0,01 comparado ao respectivo grupo Sham; #p<0.05 comparado ao grupo IC.

### 5.13 Relação uréia/creatinina

O cálculo da relação Uréia/Creatinina foi utilizado para avaliar a função renal de ratos submetidos ao tratamento crônico com tadalafil, porém, não foram observadas alterações estatísticas significativas entre os grupos analisados (Figura 17).



**FIGURA 17:** Avaliação da relação Uréia/Creatinina em ratos submetidos ou não ao tratamento com tadalafil 5mg/dia via intraperitoneal por 4 semanas (Sham n=4; IC n=5; Tadalafil n=4; IC Tadalafil n=4). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos.

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigamos a contribuição do tratamento crônico com tadalafil no comprometimento cardíaco e do baixo trato urinário de ratos com IC submetidos ao modelo de FAC. Nossos dados demonstram que as alterações hemodinâmicas promovidas pela sobrecarga de volume resultante da FAC induziram hipertrofia cardíaca e redução da função do VE, além de hiperatividade do mecanismo contrátil detrusor, prejuízo da função renal e aumento do estresse oxidativo. No entanto, foi demonstrado que o tratamento com tadalafil foi capaz de restaurar as funções cardíaca, renal, urinária e o equilíbrio redox nos animais.

O NO é reconhecidamente uma molécula com múltiplos efeitos regulatórios no miocárdio e tecido vascular, assim como em inúmeros outros órgãos e tecidos do organismo. Em miocárdio de mamíferos o NO é responsável por aumentar a complacência do VE, atenuar a resposta beta adrenérgica e potencializar respostas parassimpáticas, além de alterar os níveis intracelulares de cálcio, impactando o desempenho cardíaco sistólico e diastólico (SIMON et al., 2014). Achados experimentais utilizando doadores de NO, inibidores de óxido nítrico sintases (NOS) e deleção genética apontam claramente que a sinalização deficiente do NO funciona como um contribuinte crítico para muitos estados de doença cardiovascular, incluindo insuficiência cardíaca, cardiomiopatia diabética, lesão isquêmica e fibrilação atrial. Sabe-se que em pacientes com IC a sinalização deficiente do NO está relacionada com aumento da produção de ERO's, remodelamento cardíaco e anormalidades diastólicas no ventrículo esquerdo (VE) (BHARDWAJ et al., 2013; LANGRISH et al., 2013).

Além dos prejuízos promovidos pela sinalização deficiente do NO, estudos apontam que a degradação da guanosina monofosfato cíclico (GMPc) por metalo-hidrolases denominadas fosfodiesterases (PDE), principalmente a PDE5, tem importância na funcionalidade dos cardiomiócitos, especialmente quando estes encontram-se expostos a sobrecarga e estresse oxidativo (ZHANG et al., 2008). Em modelo experimental de sobrecarga cardíaca por alterações de pressão, observou-se aumento dos níveis de PDE5 no miocárdio, onde a enzima antioxidante SOD foi capaz de atenuar o aumento da PDE5, protegendo contra a hipertrofia do VE e insuficiência cardíaca congestiva, sugerindo que o estresse oxidativo aumenta a expressão de PDE5, que atua na modulação da hipertrofia dos cardiomiócitos (POKREISZ et al., 2009). Resultados semelhantes foram relatados no estudo de Vandewijngaert et al. (2013), onde observou-se aumento da expressão de PDE5 no VE de pacientes com cardiopatia dilatada e isquêmica, associada a hipertrofia do VE, capacidade contrátil dos cardiomiócitos diminuída e disfunção sistólica e diastólica do VE. Tais evidências teóricas apoiam o uso dos

inibidores de PDE5 como adjuvantes no manejo farmacológico de diversas patologias cardíacas como, hipertensão arterial, pulmonar, cardiopatia isquêmica e IC.

No estudo de Salloum et al. (2014), foi avaliada a contribuição do tratamento com tadalafil 1mg/dia por 4 semanas em ratos submetidos ao modelo experimental de ligadura arterial coronariana. Os resultados apontaram redução de 70% na área de lesão isquêmica 1 semana após o início do tratamento, além de atenuar a hipertrofia cardíaca, o edema pulmonar e restaurar a fração de ejeção do VE. Os dados obtidos em nosso laboratório corroboram com os achados da literatura, pois 8 semanas após a indução da IC os animais apresentavam marcada hipertrofia de VE, diminuição da fração de ejeção e aumento do volume sistólico e diastólico finais do VE. Porém, o tratamento com 5mg/dia de tadalafil por 4 semanas foi capaz de restaurar de forma eficaz as alterações cardíacas hipertróficas e a funcionalidade do VE, comprovando o efeito cardioprotetor da inibição da PDE5 no miocárdio. Pesquisas recentes sugerem que a redução da hipertrofia e melhora na função do VE não está apenas ligada aos efeitos vasculares promovidos pelos inibidores de PDE5. De acordo com Munjal et al. (2014) foi proposto que o tratamento com tadalafil foi capaz de atenuar a ação do TGF- $\beta$  no músculo cardíaco após a administração de angiotensina II, promovendo um efeito protetor contra o aumento da deposição de colágeno e aumento da fibrose cardíaca, além dos animais do grupo tratado também apresentarem melhor função sistólica do VE e consequente ausência de edema pulmonar.

Além disso, estudos sugerem uma íntima relação entre IC e o desenvolvimento de sintomas do baixo trato urinário (LUTS) como, urgência miccional, incontinência urinária e bexiga hiperativa. Estudos realizados em pacientes com IC demonstraram que aproximadamente 34% dos homens e 62% das mulheres relataram ser portadoras de LUTS, com destaque para o desenvolvimento da bexiga hiperativa que pode afetar até 57% desses pacientes (BIERMAN, 2004; PALMER et al., 2009). Acredita-se que diversos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da IC possam contribuir para o desenvolvimento do LUTS, como por exemplo, a disfunção endotelial, insuficiência arterial, níveis aumentados de agentes vasoconstritores como ET-1 e ANG II, depressão, ansiedade e o próprio tratamento medicamentoso podem induzir a sintomatologia no baixo trato urinário. Tais fatores resultam em disfunção do sistema nervoso autônomo e alterações moleculares importantes nas vias de sinalização que controlam o tônus (relaxamento e contração) da musculatura lisa. Evidências clínicas e experimentais indicam que a redução da disponibilidade de NO e/ou da reatividade ao NO endógeno, leva à disfunção endotelial e aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, prejudicando a função urinária tanto em animais como em humanos (ANDERSON e

ARNER, 2004; BÁU et al., 2010; PROPPING et al., 2015). No estudo de Andersson et al. (2011) foram propostos 4 mecanismos relacionados com o desenvolvimento de LUTS, a redução das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) e do NO pélvico, inflamação do baixo trato urinário (BTU) com consequente aumento da atividade na via Rho-quinase, isquemia pélvica secundária à disfunção vascular e hiperatividade autonômica.

Pinggera et al. (2008) colaboradores avaliaram a associação entre a baixa perfusão da bexiga e o desenvolvimento de LUTS em idosos com hipertensão arterial, mostrando que essa relação chega a 60% em idosos acima de 79 anos. Sabe-se que a isquemia pélvica secundária à disfunção vascular pode levar ao aumento do estresse oxidativo, hipóxia tecidual e aumento do tônus vascular na próstata e bexiga. A expressão da enzima PDE5 foi identificada no corpo cavernoso, bexiga, próstata e uretra, porém a contribuição do tratamento com inibidores de PDE5 no LUTS ainda não foi completamente esclarecida. Estudos propõem que a inibição das isoenzimas PDE presentes no baixo trato urinário resulta em consequente elevação do NO intracelular, inibição da via de sinalização Rho-quinase, melhora do relaxamento no músculo liso, redução da isquemia pélvica e da hiperatividade autonômica (MORELLI et al., 2010). Em ratos espontaneamente hipertensos observou-se redução do fluxo sanguíneo na bexiga, próstata e pênis, além do aumento no tônus muscular da bexiga e redução na expressão das NOS. No entanto, após o tratamento com inibidores de PDE5 o comprometimento vascular foi restaurado (YONO et al., 2007).

Estudos apontam a presença de enzimas sintetizadoras de ACh no urotélio, comprovando que em situações de homeostase existe uma liberação basal deste neurotransmissor, no entanto, em situações patológicas que resultem em alterações químicas ou em casos de estiramento da musculatura detrusora a liberação de ACh pode estar aumentada, resultando em sensibilização dos receptores muscarínicos e ativação de receptores nicotínicos no urotélio, com consequente liberação de ATP e ativação de receptores P2X nos terminais aferentes, mecanismo que pode resultar em hiperatividade aferente, desencadeando os sintomas de bexiga hiperativa (YOSHIDA et al., 2006; CELLEK et al., 2014). Além disso, outro mecanismo que pode estar envolvido na hiperatividade detrusora é a ativação dos canais de cálcio Cav1.2. Os receptores M3 também interagem com a proteína Gq para provocar a liberação de  $Ca^{2+}$  das reservas internas, através da ativação do receptor de IP3 (ABRAMS et al., 2006), e o agonista muscarínico também induz contrações parcialmente dependentes da entrada de  $Ca^{2+}$  através dos canais Cav1.2 (FRAZIER et al., 2008). Altos níveis de  $K^+$  extracelular despolarizam a membrana celular e ativam canais Cav1.2, resultando num aumento do influxo de  $Ca^{2+}$ , o que por sua vez ativa proteínas contráteis (ANDERSSON e

ARNER, 2004). Trabalhos têm relatado a importância dos canais de Cav1.2 no desenvolvimento da hiperatividade do detrusor em modelos experimentais de doenças cardiovasculares (RAMOS-FILHO et al., 2011; LEIRIA et al., 2012).

Os dados obtidos em nossa avaliação *in vitro* dos mecanismos contráteis da musculatura detrusora apontam aumento da sensibilidade contrátil mediada pelo agonista muscarínico carbacol e pelo agonista purinérgico ATP, conseqüentemente também foi observado aumento na contratilidade mediada por estímulo elétrico, que esta relacionada com a liberação de ACh e ATP de fontes neuronais. A resposta contrátil dependente dos canais de cálcio ativados por voltagem foi avaliada através do agente hiperpolarizante KCl e também mostrou-se significativamente aumentada. Porém, após o tratamento com tadalafil as respostas contráteis dependentes e independentes de receptores mostraram-se restauradas. Dados semelhantes foram observados no estudo de Werkestrom et al. (2009), onde o tratamento com Vardenafil foi capaz de atenuar as contrações mediadas por carbacol e EFS na musculatura detrusora de ratos com obstrução parcial de bexiga, além de aumentar os níveis de GMPc no tecido avaliado.

No estudo de Minagawa et al. (2012), o tratamento com tadalafil foi capaz de reduzir a atividade aferente de ambas as fibras A $\delta$  e C produzidas pela distensão da bexiga, além de apresentar efeito inibitório nas contrações produzidas por acroleína, sugerindo que os inibidores de PDE5 reduzem o LUTS atuando também em mecanismos neurais. Além dos mecanismos citados anteriormente, os efeitos vasculares do tadalafil também parecem contribuir na melhora dos sintomas do LUTS. No estudo conduzido por Nomiya et al. (2013), o tratamento com tadalafil melhorou os parâmetros funcionais e morfológicos da bexiga e preveniu a formação neo-íntima e a oclusão luminal, eventualmente diminuindo os sinais de bexiga hiperativa em ratos submetidos ao modelo experimental de isquemia crônica da bexiga.

Em concordância com os achados *in vitro*, nossos dados *in vivo* também demonstraram o comprometimento da função urinária avaliada através de parâmetros cistométricos. Após a indução da IC os animais apresentaram aumento da contração de micção, pressão limiar e contrações involuntárias da musculatura detrusora, além de diminuição da capacidade vesical. Tais achados suportam nossa teoria de que o modelo de FAC cursa com o desenvolvimento de bexiga hiperativa, pois como os animais apresentam uma menor capacidade de armazenar urina, ficam conseqüentemente expostos a pressão intravesical maior, causa associada a bexiga hiperativa. No entanto, o tratamento com tadalafil mostrou-se eficaz em reverter as alterações cistométricas, restaurando a pressão basal, pressão limiar, capacidade e frequência de contrações involuntárias. Em estudo multicêntrico, randomizado e duplo-cego conduzido por

Gacci et al. (2012), foram avaliadas as alterações nos índices urodinâmicos de 25 pacientes após a aplicação de 20mg de vardenafil, observando-se redução de 12% na pressão máxima do detrusor e aumento de 17% na capacidade da bexiga. Uma melhora semelhante foi observada por Taie et al. (2010), após uma avaliação urodinâmica inicial todos os pacientes receberam uma dose única de 20mg de tadalafil e após 1h observou-se aumento na capacidade e diminuição no limiar de pressão da bexiga.

Sabe-se que o comprometimento da função renal também é muito frequente em pacientes com patologias cardíacas e por esse motivo é comum a utilização de biomarcadores renais como, creatinina e uréia, para avaliação da taxa de filtração glomerular (TGF) e auxílio no prognóstico desses pacientes, sendo a TGF um dos principais preditores de mortalidade em pacientes hospitalizados por IC (BOCCHI et al., 2009). A ativação de mecanismos compensatórios no processo fisiopatológico da IC, resulta no aumento da angiotensina e da estimulação adrenérgica no rim, com conseqüente vasoconstrição renal, diminuição da TGF e do fluxo sanguíneo renal, além de aumento na reabsorção de sódio e água. Estudos comprovam que a deterioração da função renal, ou mais importante, o aumento nos níveis de creatinina e uréia, com conseqüente diminuição da TGF estão associados ao aumento da mortalidade em diferentes situações patológicas (DAMMAN et al., 2014; LESOGOR et al., 2013). Em nosso estudo, o tratamento com tadalafil demonstrou ter efeitos nefroprotetores ao reverter a elevação dos níveis plasmáticos de uréia nos animais com IC, além disso o tratamento crônico não resultou em alterações negativas na função renal dos animais do grupo controle.

Apesar de estudos comprovarem que a PDE5 está amplamente expressa na parede dos vasos, glomérulos, células mesangiais e túbulos corticais do rim (SOHOTNIK et al., 2013; AFSAR et al., 2015), ainda não sabemos exatamente como a inibição dessa enzima pode contribuir para a melhora da função renal em casos patológicos. O estudo de Erol et al. (2015) avaliou os efeitos do tadalafil em ratos submetidos ao modelo experimental de lesão renal por isquemia e observaram que a administração de tadalafil 30 minutos antes da lesão foi capaz de reduzir os níveis de malondialdeído, aumentar a capacidade antioxidante total e diminuir as alterações histopatológicas e apoptose no grupo tratado. Em outro modelo de lesão renal por isquemia, tadalafil preservou a TGF, diminuiu a lesão histológica, a necrose e os sinais de congestão renal (SOHOTNIK et al., 2013). Em concordância com esses achados, tadalafil também reduziu a inflamação, estresse oxidativo e atrofia tubular nos rins (GUZELOGLU et al., 2011; FADDEGON et al., 2012).

Outro fator importante e que parece interferir no agravamento da função cardíaca e no desenvolvimento do LUTS em pacientes com IC é o desequilíbrio no sistema celular redox, com consequente acúmulo de ERO's no tecido e diminuição da atividade antioxidante. As alterações de isquemia/reperfusão durante o ciclo miccional e a isquemia crônica imposta sobre o tecido vesical pela IC e outros fatores de risco associados, podem resultar na geração de EROs, estresse oxidativo e contribuir para o desenvolvimento de LUTS (SHIN et al., 2015). Desta forma, o estresse oxidativo aumentado e sustentado nas doenças crônicas degenerativas está relacionado a alterações da biodisponibilidade de NO, ao aumento da liberação de mediadores contráteis, da fibrose e remodelamento tecidual (HAMILTON et al., 2016). Nossos achados laboratoriais confirmam a alteração no equilíbrio redox dos animais, pois após a indução da FAC observamos aumento nos níveis plasmáticos de malondialdeído, subproduto da liperoxidação e diminuição da capacidade antioxidante total e atividade enzimática da SOD. No entanto, após 4 semanas de tratamento com tadalafil o equilíbrio redox dos animais foi restaurado. Saleh et al. (2015) investigaram o efeito cardioprotetor do tadalafil sobre os danos cardíacos induzidos em ratos pela administração intraperitoneal de cisplatina e observaram que o tratamento foi capaz de diminuir a pressão arterial e frequência cardíaca, além de diminuir os níveis plasmáticos de malondialdeído e aumentar a atividade antioxidante da catalase, com consequente diminuição dos danos histopatológicos ao tecido analisado. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Wen et al. (2016), onde tratamento com tadalafil apresentou efeito cardioprotetor em animais com cardiopatia chagásica, diminuindo a hipertrofia e fibrose cardíaca, além de aumentar em 65% a capacidade antioxidante total e diminuir a geração de ERO's no miocárdio.

Desta forma, o tadalafil comprova seu efeito cardio e nefroprotetor ao restaurar as alterações cardíacas hipertróficas e a função do VE, além de potencializar a atividade antioxidante e diminuir os níveis plasmáticos de uréia. Na função urinária o tratamento foi capaz de diminuir a hiperatividade da musculatura detrusora e reverter as alterações cistométricas relacionadas ao LUTS, mostrando-se uma opção terapêutica eficaz e com benefícios significativos nas alterações cardíacas e do baixo trato urinário decorrentes do comprometimento hemodinâmico e neuro-humoral gerado pela IC.

## 7 SUMÁRIO E CONCLUSÃO

No presente estudo demonstrou-se que o tratamento com Tadalafil:

- Reverteu a hipertrofia e o comprometimento da função do VE nos animais submetidos ao modelo de FAC;
- Reverteu o aumento das contrações involuntárias da musculatura detrusora, diminuiu as pressões basal e limiar, assim como, aumentou a capacidade vesical apresentada pelos animais com IC;
- Restabeleceu os mecanismos contráteis da musculatura detrusora ao reduzir a hiperatividade contrátil mediada por CCh, KCl, EFS e alfa-beta metileno ATP;
- Reduziu o dano oxidativo através da diminuição dos níveis de malondialdeído e potencializou a capacidade antioxidante total e a atividade enzimática da SOD;
- Melhorou a função renal dos animais por meio da restauração dos níveis plasmáticos de ureia;
- Portanto, o Tadalafil mostrou-se uma estratégia farmacológica eficaz para o tratamento da IC e da bexiga hiperativa em ratos submetidos ao modelo de FAC.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASSI, Z. A.; GURBANOV, K.; MULRONEY, S. E. Impaired nitric oxide-mediated renal Vasodilation in Rats With Experimental Heart Failure Role of Angiotensin II. **Circulation**, v. 96, no. 10, pp. 3655-3664, 1997.

ABASSI, Z.; GOLTSMAN, I.; KARRAM, T.; WINAVER, J.; HOFFMAN, A. Aortocaval fistula in rat: a unique model of volume-overload congestive heart failure and cardiac hypertrophy. **BioMed Research International**, v. 9, 2011.

ABASSI, Z.; GURBANOV, K.; RUBINSTEIN, I.; BETTER, O. S.; HOFFMAN, A.; WINAVER J. Regulation of intrarenal blood flow in experimental heart failure: role of endothelin and nitric responses. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 7, no. 1, pp. 1–10, 2003.

ABRAMS, P.; ANDERSSON, K. E.; BUCCAFUSCO, J. J.; CHAPPLE, C.; GROAT, W. C.; FRYER, A. D.; WEIN, A. J. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. **British journal of pharmacology**, v. 148, no. 5, pp. 565-578, 2006.

ABRAMS, P.; CARDOZO, L.; FALL, M. The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 187, n. 1, p. 116-126, 2002.

ABRAMS, P.; KELLEHER, C. J.; KERR, L. A.; ROGERS, R. G. Overactive bladder significantly affects quality of life. **Am J Manag Care**, v. 6, no. 11, pp. 580-590, 2000.

ABRAMS, P.; WEIN, A. J. Introduction: overactive bladder and its treatments. **BJU International**, v. 85, no. 3, pp. 1-2, 2000.

ADAMS, K. F.; FONAROW, G. C.; EMERMAN, C. L.; LEJEMTEL, T. H.; COSTANZO, M. R.; ABRAHAM, W. T. Characteristics and outcomes of patients hospitalized for heart failure in the United States: rationale, design, and preliminary observations from the first 100,000 cases in the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE). **American heart journal**, v. 149, no. 2, pp. 209-216, 2005.

ADES, P. A.; KETEYIAN, S. J.; BALADY, G. J.; HOUSTON-MILLER, N.; KITZMAN, D. W.; MANCINI, D. M.; RICH, M. W. Cardiac rehabilitation exercise and self-care for chronic heart failure. **JACC: Heart failure**, v.6, pp. 540-547, 2013.

AFSAR, B.; ORTIZ, A.; COVIC, A.; GAIPOV, A.; ESEN, T.; GOLDSMITH, D.; KANBAY, M. Phosphodiesterase type 5 inhibitors and kidney disease. **International Urology and Nephrology**, v. 47, no. 9, pp. 1521-1528, 2015.

ALBUQUERQUE, D. C.; NETO, J. D. S.; BACAL, F.; ROHDE, L. E. P.; PEREIRA, S. B.; BERWANGER, O.; ALMEIDA, D. R. I Registro Brasileiro de Insuficiência Cardíaca – Aspectos Clínicos, Qualidade Assistencial e Desfechos Hospitalares. **Arq Bras Cardiol**. 2014.

ANDERSSON, K. E. How many drugs for LUTS due to BPH are too many? **J Urol**, v. 180, no. 3, pp. 811-812, 2008.

ANDERSSON, K. E. Pharmacology of the lower urinary tract smooth muscle and penile erection tissues. **Pharmacol Rev**, v. 45, pp. 253-308, 1993.

ANDERSSON, K. E. Pharmacotherapy of the overactive bladder. **Discov Med**, v. 42, no. 8, pp. 118-24, 2009.

ANDERSSON, K. E.; ARNER, A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 84, no. 3, pp. 935-986, 2004.

ANDERSSON, K. E.; DE GROAT, W. C.; MCVARY, K. T.; LUE, T. F.; MAGGI, M.; ROEHRBORN, C. G.; VIKTRUP, L. Tadalafil for the treatment of lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: pathophysiology and mechanism (s) of action. **Neurourology and urodynamics**, v. 30, no. 3, pp. 292-301, 2001.

ANDERSSON, K. E.; HEDLUND, P. Pharmacologic perspective on the physiology of the lower urinary tract. **Urology**, v. 60, no. 5, pp. 13-20, 2002.

APOSTOLO, A.; VIGNATI, .; BRUSONI, D.; CATTADORI, G.; CONTINI, M.; VEGLIA, F.; MAGRÌ, D.; PALERMO, P.; TEDESCO, C.; DORIA, E.; FIORENTINI, C.; MONTORSI, P.; AGOSTONI, P. Erectile dysfunction in heart failure: correlation with severity, exercise performance, comorbidities, and heart failure treatment. **J Sex Med**, v. 10, no. 6, pp. 2795- 805, 2009.

BADER, M. Rat models of cardiovascular diseases. **Methods in Molecular Biology**; v. 597, pp. 403-414, 2010.

BALADY, G. J.; WILLIAMS, M.A.; ADES, P. A. Components Core components of cardiac rehabilitation/secondary prevention programs. **Circulation**, v. 82, pp. 70-98, 2007.

BANKIR, L. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1 and V2 receptor mediated effects, **Cardiovascular Research**, v. 51, no. 3, pp. 372–390, 2001.

BARRETTO, A. C. P. Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, pp. 1-30, 2002.

BÁU, F. R.; MÓNICA, F. Z.; PRIVIERO, F. B. Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle. **Eur J Pharmacol**, v. 637, no. 3, pp. 171-7, 2010.

BHARDWAJ, A.; KAUR, J.; KNAUS, E. Can nitric oxide-releasing hybrid drugs alleviate adverse cardiovascular risks?. **Future medicinal chemistry**, v. 5, no. 4, p. 381-383, 2013.

BIERMAN, A. S. Coexisting illness and heart disease among elderly Medicare managed care enrollees. **Health Care Financ Ver**, v. 25, pp. 105, 2004.

BIRDER, L. A.; DE GROAT, W. C. Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. **Nat Clin Pract Urol**, v. 4, pp. 46–54, 2007.

BISHARA, B.; SHIEKH, H.; KARRAM, T. Effects of novel vasopressin receptor antagonists on renal function and cardiac hypertrophy in rats with experimental congestive heart

failure. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 326, no. 2, pp. 414-422, 2008.

BOCCHI, E. A. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 93, no. 1, pp.3-70, 2009.

BOCCHI, E. A.; VILAS-BOAS, F. I Latin American Guidelines for the Assessment and Management of Decompensated Heart Failure. **Arq Bras Cardiol**, v. 85 no. 3, pp. 49-94, 2005.

BOERRIGTER, G.; BURNETT, J. C. Recent advances in natriuretic peptides in congestive heart failure. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 13, no. 6, pp. 643-652, 2004.

BRADING, A. F. A myogenic basis for the overactive bladder. **Urology**, v. 50, no. 6, pp. 57-67, 1997.

BRAUNSCHWEIG, F.; LINDE, C.; BENSON, L.; STÅHLBERG, M.; DAHLSTRÖM, U.; LUND, L. H. New York Heart Association functional class, QRS duration, and survival in heart failure with reduced ejection fraction: implications for cardiac resynchronization therapy. **European Journal of Heart Failure**, 2016.

BROCK, G.; BRODERICK, G.; ROEHRBORN, C. G.; XU, L.; WONG, D.; VIKTRUP, L. Tadalafil once daily in the treatment of lower urinary tract symptoms (LUTS) suggestive of benign prostatic hyperplasia (BPH) in men without erectile dysfunction. **BJU international**, v. 112, no. 7, pp. 990-997, 2013.

BROWER, G. L.; JANICKI, J. S. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, no. 2, pp. 674-683, 2001.

BURGIO, K. L. Update on behavioral and physical therapies for incontinence and overactive bladder: the role of pelvic floor muscle training. **Curr Urol Rep**, v. 14, no. 5, pp. 457-64, 2013.

BURNETT, A. L.; CALVIN, D. C.; CHAMNESS, S. L.; LIU, J. X.; NELSON, R. J.; KLEIN, S. L.; SNYDER, S. H. Urinary bladder-urethral sphincter dysfunction in mice with targeted disruption of neuronal nitric oxide synthase models idiopathic voiding disorders in humans. **Nature medicine**, v. 3, no. 5, pp. 571, 1997.

BURNSTOCK, G. P2X receptors in sensory neurones. **British Journal of Anaesthesia**, v. 84, no. 4, pp. 476-488, 2000.

BURNSTOCK, G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. **Trends in pharmacological sciences**, v. 22, no. 4, pp. 182-188, 2001.

BURNSTOCK, G.; WILLIAMS, M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, no. 3, pp. 862-869, 2000.

CELLEK, S.; CAMERON, N. E.; COTTER, M. A.; FRY, C. H.; ILO, D. Microvascular dysfunction and efficacy of PDE5 inhibitors in BPH-LUTS. **Nature Reviews Urology**, v. 11, no. 4, pp. 231-241, 2014.

CHANCELLOR, M. B.; YOSHIMURA, N. Neurophysiology of stress urinary incontinence. **Reviews in urology**, v. 6, pp. S19, 2004.

CHATTERJEE, K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. **Am J Cardiol**, v. 95, pp. 8-13, 2005.

CHAUDHRY, S. I.; WANG, Y.; CONCATO, J.; GILL, T. M.; KRUMHOLZ, H. M. Patterns of weight change preceding hospitalization for heart failure. **Circulation**, v. 116, no. 14, pp. 1549-1554, 2007.

CHENG, Y.; MANSFIELD, K.; SANDOW, S.; SADANANDA, P.; BURCHER, E.; MOORE, K. Porcine bladder urothelial, myofibroblast, and detrusor muscle cells: characterization and ATP release. **Frontiers in pharmacology**, v. 2, pp. 27, 2001.

CHOI, H.; KIM, J. H.; SHIM, J. S.; PARK, J. Y.; KANG, S. H.; MOON, D. G.; BAE, J. H. Comparison of the efficacy and safety of 5-mg once-daily versus 5-mg alternate-day tadalafil in men with erectile dysfunction and lower urinary tract symptoms. **International journal of impotence research**, v. 27, no. 1, pp. 33-37, 2015.

CHRYSANT, S. G. Effectiveness and safety of phosphodiesterase 5 inhibitors in patients with cardiovascular disease and hypertension. **Current hypertension reports**, v. 15, no. 5, pp. 475-483, 2013.

CLAUDINO, M. A.; DA SILVA, F. H.; MONICA, F. Z.; ROJAS-MOSCOSO, J. A.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Long-term oral treatment with BAY 41-2272 ameliorates impaired corpus cavernosum relaxations in a nitric oxide-deficient rat model. **BJU international**, v. 108, no. 1, pp. 116-122, 2011.

CLAUDINO, M. A.; FRANCO, C. F.; PRIVIERO, F. B. Upregulation of gp91phox subunit of NAD(P)H oxidase contributes to erectile dysfunction caused by long-term nitric oxide inhibition in rats: reversion by regular physical training. **Urology**, v. 75, no. 4, pp. 961-7, 2009.

CLAUDINO, M. A.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; PRIVIERO, F. B.; CAMARGO, E. A.; TEIXEIRA, S. A.; MUSCARÁ, M. N.; ANTUNES, E. Upregulation of gp91 phox Subunit of NAD (P) H Oxidase Contributes to Erectile Dysfunction Caused by Long-term Nitric Oxide Inhibition in Rats: Reversion by Regular Physical Training. **Urology**, v. 75, no. 4, pp. 961-967, 2010.

CLAUDINO, M. A.; LEIRIA, L. O. S.; DA SILVA, F. H.; ALEXANDRE, E. C.; RENNO, A.; MÓNICA, F. Z.; FRANCO-PENTEADO, C. F. Urinary Bladder Dysfunction in Transgenic Sickle Cell Disease Mice. **PloS one**, v. 10, no. 8, pp. 33-39, 2015.

CLEMENS, J. Q. Basic bladder neurophysiology. **Urologic Clinics of North America**, vol 37, no. 4, pp. 487-494, 2010.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H.; WEBB, D. J. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. **Urology**, v. 60, no. 2, pp. 4-11, 2002.

CRIMI, E.; IGNARRO, L. J.; CACCIATORE, F.; NAPOLI, C. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure, **Nat Rev Cardiol**, v. 6, no. 4, pp. 292- 300, 2009.

DAMMAN, K.; VALENTE, M. A.; VOORS, A. A.; O'CONNOR, C. M.; VAN VELDHUISEN, D. J.; HILLEGE, H. L. Renal impairment, worsening renal function, and outcome in patients with heart failure: an updated meta-analysis. **European heart journal**, v. 35, no. 7, pp. 455-469, 2014.

DAS, A.; DURRANT, D.; SALLOUM, F. N.; XI, L.; KUKREJA, R. C. PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. **Pharmacology & therapeutics**, v. 147, pp. 12-21, 2015.

DE GROAT, W. C. A neurologic basis for the overactive bladder. **Urology**, v. 50, pp. 36-52, 1997.

DE GROAT, W. C.; ARAKI, I.; VIZZARD, M. A.; YOSHIYAMA, M.; YOSHIMURA, N.; SUGAYA, K.; ROPPOLO, J. R. Developmental and injury induced plasticity in the micturition reflex pathway. **Behavioural brain research**, v. 92, no. 2, pp.127-140, 1998.

DE GROAT, W. C.; BOOTH, A. M.; YOSHIMURA, N. Neurophysiology of micturition and its modification in animal models of human disease. **Harwood Academic Publishers**, v. 3, pp. 227-290, 1993.

DE GROAT, W. C.; FRASER, M.; YOSHIYAMA, S. SMERIN.; TAI, C.; CHANCELLOR, M. B.; YOSHIMURA, N.; ROPPOLO, W. Neural control of the urethra. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v. 35, no. 207, pp. 35-43, 2001.

DE GROAT, W. C.; YOSHIMURA, N. Pharmacology of the lower urinary tract. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 41, no. 1, pp. 691-721, 2001.

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

DIMMELER, S.; ZEIHNER, A. M. A “reductionist” view of cardiomyopathy. **Cell**, v. 130, pp. 401–402, 2007.

DRAKE, M. J.; HEDLUND, P.; MILLS, I. W.; McCOY, R.; McMURRAY, G.; GARDNER, B. P.; ANDERSSON, K. E.; BRADING, A. F. Structural and functional denervation of human detrusor after spinal cord injury. **Lab Invest**, v. 80, pp. 1491-1499, 2000.

DRAKE, M. J.; MILLS, I. W.; GILLESPIE, J. I. Model of peripheral autonomous modules and a myovesical plexus in normal and overactive bladder function. **Lancet**, v. 358, pp. 401-403, 2001.

ELBADAWI, A.; YALLA, S. V.; RESNICK, N. M. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. III. Detrusor overactivity. **The Journal of urology**, v. 150, no. 5, pp. 1668-1680, 1993.

EROL, B.; TURKER, T.; TOK, A.; BEKTAS, S.; MUNGAN, G.; OZKANLI, S.; MUNGAN, A. The protective effects of tadalafil on renal damage following ischemia reperfusion injury in rats. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 31, no. 9, pp. 454-462, 2015.

FADDEGON, S.; BEST, S. L.; OLWENY, E. O.; TAN, Y. K.; PARK, S. K.; MIR, S. A.; CADEDDU, J. A. Tadalafil for prevention of renal dysfunction secondary to renal ischemia. **The Canadian journal of urology**, v. 19, no. 3, pp. 6274-6279, 2012.

FATHIAN-SABET, B.; BLOCH, W.; KLOTZ, T.; NIGGEMANN, S.; JACOBS, G.; ADDICKS, K.; ENGELMANN, U. Localization of constitutive nitric oxide synthase isoforms and the nitric oxide target enzyme soluble guanylyl cyclase in the human bladder. **The Journal of urology**, v. 165, no. 5, pp. 1724-1729, 2001.

FLETCHER, G. F., ADES, P. A., KLIGFIELD, P., ARENA, R., BALADY, G. J., BITTNER, V. A., GULATI, M. Exercise standards for testing and training a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 128, no. 8, pp. 873-934, 2013.

FONDA, D.; DUBEAU, C. E.; HARARI, D.; OUSLANDER, J. G.; PALMER, M.; ROE, B. Incontinence in the frail elderly. **United Kingdom: Health Publication Ltd**, v. 2, pp. 1165-1239, 2005.

FRANZEN, K.; BLOMQUIST, K.; SAVEMAN, B. Impact of chronic heart failure on elderly persons daily life: a validation study. **Eur J Cardiovasc Nurs**, v. 5, no. 2, pp.137-45, 2006.

FRAZIER, E. P.; PETERS, S. L.; BRAVERMAN, A. S.; RUGGIERI, M. R.; MICHEL, M.C. Signal transduction underlying the control of urinary bladder smooth muscle tone by muscarinic receptors and beta-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs*, **Arch Pharmacol**, v. 377, pp. 449-62, 2008.

FRAZIER, E. P.; SCHNEIDER, T.; MICHEL, M. C. Effects of gender, age and hypertension on  $\beta$ -adrenergic receptor function in rat urinary bladder. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 373, no.4, pp. 300-309, 2006.

FREEMAN, R. M.; ADEKANMI, O. A. Overactive bladder. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 19, no. 6, pp. 829-841, 2005.

FRY, C. H.; BRADING, A. F.; HUSSAIN, M.; LEWIS, S. A.; TAKEDA, M.; TUTTLE, J. B.; UVELIUS, B.; WOOD, D. N.; DRAKE, M. Cell biology. In: Incontinence. **Jersey: Health Publications**, pp.313-362, 2005.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, no. 5789, pp. 373-376, 1980.

GACCI, G.; DEL POPOLO, A.; MACCHIARELLA, M.; CELSO, G.; VITTORI, A. L. Vardenafil improves urodynamic parameters in men with spinal cord injury: results from a single dose, pilot study. **J Urol**, v. 178, pp. 2040–2043, 2012.

GACCI, M.; ANDERSSON, K. E.; CHAPPLE, C.; MAGGI, M.; MIRONE, V.; OELKE, M.; GIULIANO, F. Latest evidence on the use of phosphodiesterase type 5 inhibitors for the treatment of lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. **European urology**, v. 70, no. 1, pp. 124-133, 2016.

GO, A. S.; MOZAFFARIAN, D.; ROGER, V. L.; BENJAMIN, E. J.; BERRY, J. D.; BLAHA, M. J. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics. **Circulation**, v. 129, no. 3, pp.28-292, 2014.

GOLDBERG, R. P.; SAND, P. K. Pathophysiology of the overactive bladder. **Clinical Obstet and Gynecol**, v. 45, no. 01, pp. 182-192, 2002.

GOPAL, V. K.; FRANCIS, S. H.; CORBIN, J. D. Allosteric sites of phosphodiesterase-5 (PDE5). **European Journal of Biochemistry**, v. 268, no. 11, pp. 3304-3312, 2001.

GOSLING, J. A.; KING, L. S.; DIXON, J. S.; HORAN, P.; WHITBECK, C.; LEVIN, R. M. Correlation between the structure and function of the rabbit urinary bladder following partial outlet obstruction, **J Urol**, v. 163, pp. 1349-1356, 2000.

GRIFFITHS, D. J.; MCCrackEN, P. N.; HARRISON, G. M.; GORMLEY, E. A.; MOORE, K.; HOOPER, R.; TRISCOTT, J. Cerebral aetiology of urinary urge incontinence in elderly people. **Age and ageing**, v. 23, no. 3, pp. 246-250, 2004.

GROAT, W. C. Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. **British journal of pharmacology**, v. 147, no. 2, pp. 25-40, 2006.

GUAZZI, M.; SAMAJA, M.; ARENA, R.; VICENZI, M.; GUAZZI, M. D. Long-term use of sildenafil in the therapeutic management of heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, no. 22, pp. 2136-2144, 2007.

GUAZZI, M.; VICENZI, M.; ARENA, R.; GUAZZI, M. D. Pulmonary Hypertension in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction A Target of Phosphodiesterase-5 Inhibition in a 1-Year Study. **Circulation**, v. 124, no. 2, pp. 164-174, 2011.

GUR, S.; KADOWITZ, P. J.; GURKAN, L.; CHANDRA, S.; DEWITT, S. Y.; HARBIN, A.; HELLSTROM, W. J. Chronic inhibition of nitric-oxide synthase induces hypertension and erectile dysfunction in the rat that is not reversed by sildenafil. **BJU international**, v. 106, no. 1, pp. 78-83, 2010.

GUZELOGLU, M.; YALCINKAYA, F.; ATMACA, S.; BAGRIYANIK, A.; OKTAR, S.; YUKSEL, O.; HAZAN, E. The beneficial effects of tadalafil on renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Urologia internationalis**, v. 86, no. 2, pp. 197-203, 2010.

HALL, J. E.; HILDEBRANDT, D. A.; KUO, J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. **American journal of hypertension**, v. 14, no. 3, pp. 103-115, 2001.

HAMILTON, D. J.; ZHANG, A.; LI, S.; CAO, T. N.; SMITH, J. A. Combination of angiotensin II and L-NG-nitroarginine methyl ester exacerbates mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cause heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 310, no. 6, pp. 667-80. 2016.

HEIDENREICH, P. A.; ALBERT, N. M.; ALLEN, L. A.; BLUEMKE, D.A.; BUTLER, J.; FONAROW, G. C.; IKONOMIDIS, J. S.; KHAVJOU, O.; KONSTAM, M. A.; MADDOX, T. M.; NICHOL, G.; PHAM, M.; PIÑA, I. L.; TROGDON, J. G. Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association, **Circ Heart Fail**, v. 6, no. 3, pp. 606-19, 2013.

HEYMES, C.; BENDALL, J. K.; RATAJCZAK, P.; CAVE, A. C.; SAMUEL, J. L.; HASENFUSS, G.; SHAH, A. M. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, no. 12, pp. 2164-2171, 2003.

HO, M. H.; BHATIA, N. N.; KHORRAM, O. Physiologic role of nitric oxide and nitric oxide synthase in female lower urinary tract. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 16, no. 5, pp. 423-9, 2004.

HOLSTEGE, G.; MOUTON, L. J. Central nervous system control of micturition. **International review of neurobiology**, v. 56, pp. 123-147, 2003.

HUBEAUX, K.; DEFFIEUX, X.; ISMAEL, S. S.; RAIBAUT, P.; AMARENCO, G. Autonomic nervous system activity during bladder filling assessed by heart rate variability analysis in women with idiopathic overactive bladder syndrome or stress urinary incontinence. **The Journal of urology**, v. 178, no. 6, pp. 2483-2487, 2007.

ICHIKAWA, I.; YOSHIOKA, T.; FOGO, A., KON, V. Role of angiotensin II in altered glomerular hemodynamics in congestive heart failure. **Kidney International**, v. 38, no. 30, pp. S123, 1990.

ICHIKAWA, Iekuni et al. Role of angiotensin II in the altered renal function of congestive heart failure. **Circulation Research**, v. 55, n. 5, p. 669-675, 1984.

IDE, T.; TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; UTSUMI, H.; KANG, D.; HATTORI, N.; TAKESHITA, A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. **Circulation research**, v. 85, no. 4, pp. 357-363, 1999.

JOHANSSON, R.; KUMAR, P. R. K.; POLJAKOVIC, M.; GARCIA-PASCUAL, A.; DE VENTE, J.; PERSSON, K. Activity and expression of the nitric oxide synthase in the hypertrophied rat bladder and the effect of nitric oxide on bladder smooth muscle growth. **J Urol**, v. 168, pp. 2689-2694, 2002.

KASS, D. A. Cardiac role of cyclic-GMP hydrolyzing phosphodiesterase type 5: from experimental models to clinical trials. **Current heart failure reports**, v. 9, no. 3, pp. 192-199, 2012.

KASS, D. A.; CHAMPION, H. C.; BEAVO, J. A. Phosphodiesterase type 5 expanding roles in cardiovascular regulation. **Circulation research**, v. 101, no. 11, pp. 1084-1095, 2007.

KATZ, A. M. Heart failure: a hemodynamic disorder complicated by maladaptive proliferative responses. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 7, no. 1, pp. 1-10, 2003.

KAVIA, R. B. C.; DASGUPTA, R.; FOWLER, C. J. Functional imaging and the central control of the bladder. **Journal of Comparative Neurology**, v. 493, no. 1, pp. 27-32, 2005.

KIM, K. H.; KIM, H. K.; HWANG, I. C.; CHO, H. J.; JE, N.; KWON, O. M.; SOHN, D. W. PDE 5 inhibition with udenafil improves left ventricular systolic/diastolic functions and exercise capacity in patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction; A 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **American heart journal**, v. 169, no. 6, pp. 813-822, 2015.

KIM, K. H.; KIM, Y. J.; OHN, J. H.; YANG, J.; LEE, S. E.; LEE, S. W.; SOHN, D. W. Long-Term Effects of Sildenafil in a Rat Model of Chronic Mitral Regurgitation Benefits of Ventricular Remodeling and Exercise Capacity. **Circulation**, v. 125, no. 11, pp. 1390-1401, 2012.

KUHN, R.; UCKERT, S.; STIEF, C. G.; TRUSS, M. C.; LIETZ, B.; BISCHOFF, E.; JONAS, U. Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide-dependent pathways. **Urological research**, v. 28, no. 2, pp. 110-115, 2000.

LANGRISH, J. P.; UNOSSON, J.; BOSSON, J.; BARATH, S.; MUALA, A.; BLACKWELL, S.; SANDSTRÖM, T. Altered nitric oxide bioavailability contributes to diesel exhaust inhalation-

induced cardiovascular dysfunction in man. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, no. 1, 2013.

LEIRIA, L. O.; MÓNICA, F. Z.; CARVALHO, F. D. Functional, morphological and molecular characterization of bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: evidence of a role for L-type voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels. **Br J Pharmacol**, v. 63, no. 6, pp. 1276-88, 2012.

LESOGOR, A.; COHN, J. N.; LATINI, R.; TOGNONI, G.; KRUM, H.; MASSIE, B.; GIMPELEWICZ, C. Interaction between baseline and early worsening of renal function and efficacy of renin–angiotensin–aldosterone system blockade in patients with heart failure: insights from the Val-HeFT study. **European journal of heart failure**, v. 15, no. 11, pp. 1236-1244, 2013.

LEWIS, G. D.; SHAH, R.; SHAHZAD, K.; CAMUSO, J. M.; PAPPAGIANOPOULOS, P. P.; HUNG, J.; SEMIGRAN, M. J. Sildenafil improves exercise capacity and quality of life in patients with systolic heart failure and secondary pulmonary hypertension. *Circulation*, 116(14), 1555-1562, 2007.

LI, J. M.; GALL, N. P.; GRIEVE, D. J.; CHE, M.; SHAH, A. M. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. **Hypertension**, v. 40, pp. 477–484, 2002.

LINDMARK, S.; WIKLUND, U.; BJERLE, P.; ERIKSSON, J. W. Does the autonomic nervous system play a role in the development of insulin resistance? A study on heart rate variability in first-degree relatives of Type 2 diabetes patients and control subjects. **Diabetic medicine**, v. 20, no. 5, pp. 399-405, 2003.

LONGHURST, P. A.; LEVENDUSKY, M. Pharmacological Characterization of B-Adrenoceptors Mediating Relaxation of the Rat Urinary Bladder in Vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, no. 7, pp. 1744-1750, 1999.

LUNDE, P.K.; SJAASTAD, I.; SCHIOTZ THORUD, H. M.; SEJERSTED, O. M. Skeletal muscle disorders in heart failure, **Acta Physiol Scand**, v. 171, no. 3, pp. 277-294, 2001.

MANGINI, S.; SILVEIRA, F. S.; SILVA, C. P.; GRATIVVOL, P. S.; SEGURO, L. F.; FERREIRA, S. M. Decompensated heart failure in the emergency department of a cardiology hospital. **Arq Bras Cardiol**, v. 90, pp. 230-400, 2009.

MANSFIELD, K. J.; LIU, L.; MITCHELSON, F. J.; MOORE, K. H.; MILLARD, R. J.; BURCHER, E. Muscarinic receptor subtypes in human bladder detrusor and mucosa, studied by radioligand binding and quantitative competitive RT–PCR: changes in ageing. **British journal of pharmacology**, v. 144, no. 8, pp. 1089-1099, 2005.

MARTINS, W. D. A.; RIBEIRO, M. D.; OLIVEIRA, L. B. D.; BARROS, L. D. S. N. D.; JORGE, A. C. D. S. M.; SANTOS, C. M. D.; FURQUIM, T. A. B. Vacinação contra influenza e pneumococo na insuficiência cardíaca: uma recomendação pouco aplicada. **Arq. bras. cardiol**, v. 96, no. 3, pp. 240-245, 2011.

MASUDA, H.; OKUNO, T.; SUZUKI, M.; KIHARA, K.; GOTO, M.; AZUMA, H. Different distribution of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase activities in the detrusor and proximal urethra of the rabbit. **The Journal of urology**, v. 168, no. 5, pp. 2286-2290, 2002.

MATSUI, M., MOTOMURA, D.; KARASAWA, H.; FUJIKAWA, T.; JIANG, J.; KOMIYA, Y.; TAKETO, M. M. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, no. 17, pp. 9579-9584, 2000.

MATSUI, M.; MOTOMURA, D.; FUJIKAWA, T.; JIANG, J.; TAKAHASHI, S. I.; MANABE, T.; TAKETO, M. M. Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. **The Journal of neuroscience**, v. 22, no. 24, pp. 10627-10632, 2002.

MATSUI, T.; OKA, M.; FUKUI, T.; TANAKA, M.; OYAMA, T.; SAGAWA, K.; YAMAGUCHI, O. Suppression of bladder overactivity and oxidative stress by the phytotherapeutic agent, Eviprost, in a rat model of atherosclerosis-induced chronic bladder ischemia. **International Journal of Urology**, v. 19, no. 7, pp. 669-675, 2012.

MEDEIROS, A.; BACURAU, A. V. N.; FERREIRA, J. C. B.; BECHARA, L. R. G.; BRUM, P. C. Adaptações moleculares ao treinamento físico aeróbio na insuficiência cardíaca: músculos cardíaco e esquelético. *Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata*. **Cardiologia do Exercício do atleta ao cardiopata**, v. 3, p. 588-615, 2010.

MESQUITA, L. A.; CÉSAR, P. M.; MONTEIRO, M. V. D. C.; FILHO, A. L. D. Terapia comportamental na abordagem primária da hiperatividade do detrusor. **Femina**, v. 38, no. 1, 2010.

MILLS, I. W.; GREENLAND, J. E.; MCMURRAY, G. Studies of the pathophysiology of idiopathic detrusor instability: the physiological properties of the detrusor smooth muscle and its pattern of innervation. **J Urol**, v. 163, pp. 646-651, 2000.

MILSON, I.; ABRAMS, P.; CARDOZO, L.; ROBERTS, R.G.; THUROFF, J.; WEIN, A. J. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. **BJU Int**, v. 87, no. 9, pp. 760-6, 2001.

MINAGAWA, T.; AIZAWA, N.; IGAWA, Y.; WYNDAELE, J. J. Inhibitory effects of phosphodiesterase 5 inhibitor, tadalafil, on mechanosensitive bladder afferent nerve activities of the rat, and on acrolein-induced hyperactivity of these nerves. **BJU international**, v. 110, no. 6, pp. E259-E266, 2012.

MONCADA, S.; REES, D. D.; SCHULZ, R.; PALMER, R. M. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, no.6, pp.2166-2170, 1991.

MOORTHY, P.; LAPITAN, M. C.; QUEK, P. L.; LIM, P. H. Prevalence of overactive bladder in Asian men: an epidemiological survey. **BJU Int**, v. 93, no. 4, pp. 528-31, 2004.

MORAIS, S. S.; GURGEL, M. S. C.; HERRMANN, V.; SIMÕES, J. A.; RETT, M. T. Qualidade de vida em mulheres após tratamento da incontinência urinária de esforço com fisioterapia. **Revista Brasileira de ginecologia e obstetrícia**, v. 29, no. 3, pp.134-140, 2007.

MORELAND, R. B.; GOLDSTEIN, I.; KIM, N. N.; TRAISH, A. Sildenafil citrate, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor:: research and clinical implications in erectile dysfunction. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 10, no. 3, pp. 97-104, 1999.

MORELLI, A.; FILIPPI, S.; COMEGLIO, P.; SARCHIELLI, E.; CHAVALMANE, A. K.; VIGNOZZI, L.; CARINI, M. Acute vardenafil administration improves bladder oxygenation in spontaneously hypertensive rats. **The journal of sexual medicine**, v. 7, no. 1, pp. 107-120, 2010.

MORLEY, J. E.; THOMAS, D. R.; WILSON, M. M. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance, **Am J Clin Nutr**, v. 83, no. 4, pp. 35-43, 2006.

MORRISON, J.; BIRDER, L.; CRAGGS, M.; DE GROAT, W. C.; DOWNIE, J.; DRAKE, M.; FOWLER, C. T. Neural control. In: Incontinence. **Jersey: Health Publications**, pp. 363-422, 2005.

MULÈ, F.; SERIO, R. Nanc Inhibitory Neurotransmission in Mouse Isolated Stomach: Involvement of Nitric Oxide, ATP and Vasoactive Intestinal Polypeptide. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, no. 2, pp. 431-437, 2003.

MUNJAL, C.; OPOKA, A. M.; OSINSKA, H.; JAMES, J. F.; BRESSAN, G. M.; HINTON, R. B. TGF- $\beta$  mediates early angiogenesis and latent fibrosis in an Emilin1-deficient mouse model of aortic valve disease. **Dis Model Mech**, v. 7, pp. 987-996, 2014.

NOMIYA, M.; BURMEISTER, D. M.; SAWADA, N.; CAMPEAU, L.; ZARIFPOUR, M.; KEYS, T.; ANDERSSON, K. E. Prophylactic effect of tadalafil on bladder function in a rat model of chronic bladder ischemia. **The Journal of urology**, v. 189, no. 2, pp. 754-761, 2013.

NORTON, P.; BRUBAKER, L. Urinary incontinence in women. **The Lancet**, v. 367, no. 95, pp. 57-67, 2006.

O'REILLY, B. A.; KOSAKA, A. H.; CHANG, T. K.; FORD, A. P. D. W.; POPERT, R.; MCMAHON, S. B. A quantitative analysis of purinoceptor expression in the bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. **BJU international**, v. 87, no. 7, pp. 617-622, 2001.

OUSLANDER, J. G. Management of overactive bladder. **New England Journal of Medicine**, v. 350, no. 8, pp. 786-799, 2004.

PALMER, M. H.; HARDIN, S. R.; BEHREND, C.; COLLINS, S. K.; MADIGAN, C. K.; CARLSON, J. R. Urinary incontinence and overactive bladder in patients with heart failure. **J Urol**, v. 182, no.1, pp.196-202, 2009.

PATEL, A. K.; CHAPPLE, C. R. Medical management of lower urinary tract symptoms in men: current treatment and future approaches. **Nat Clin Pract Urol**, v. 5, pp. 211-219, 2008.

PERSSON, K.; POLJAKOVIC, M.; JOHANSSON, K.; LARSSON, B. Morphological and biochemical investigation of nitric oxide synthase and related enzymes in the rat and pig urothelium. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 47, no. 6, pp. 739-749, 1999.

PETER, J. M.; GUIDI, H. G.; RIBEIRO, R. M.; BARACAT, E. C.; HADDAD, J. M. Aspectos atuais no tratamento da bexiga hiperativa. **Femina**, v. 37, no. 9, pp. 505-510, 2009.

PINGGERA, G. M.; MITTERBERGER, M.; PALLWEIN, L.; SCHUSTER, A.; HERWIG, R.; FRAUSCHER, F.; STRASSER, H.  $\alpha$ -blockers improve chronic ischaemia of the lower urinary tract in patients with lower urinary tract symptoms. **BJU international**, v. 101, no. 3, pp. 319-324, 2008.

POKREISZ, P.; VANDENWIJNGAERT, S.; BITO, V.; VAN DEN BERGH, A.; LENAERTS, I.; BUSCH, C.; LIU, X. Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. **Circulation**, v. 119, no. 3, pp. 408-416, 2009.

PONIKOWSKI, P.; VOORS, A. A.; ANKER, S.; BUENO, H.; CLELAND, J. G. F.; COATS, A. J. S.; FALK, V.; JUANATEY, J. R. G.; PEKKAHARJOLA, V.; JANKOWSKA, E. A.; JESSUP, M.; LINDE, C.; NIHOYANNOPOULOS, P.; PARISSIS, J. T.; PIESKE, B.; RILEY, J. P.; ROSANO, G. M. C.; RUILOPE, L. M.; RUSCHITZKA, F.; RUTTEN, F. H.; MEER, P. V. Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. **Eur Heart J**, v. 37, pp. 2129-2200, 2016.

PONTARI, M. A.; BRAVERMAN, A. S.; RUGGIERI, M. R. The M2 muscarinic receptor mediates in vitro bladder contractions from patients with neurogenic bladder dysfunction. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, no. 5, pp. R874-R880, 2004.

PROPPING, S.; ROEDEL, M.; WIRTH, M. P.; RAVENS, U. Pharmacological Modulation of Mucosa-Related Impairment of  $\beta$ -Adrenoceptor-Mediated Relaxation in Human Detrusor. **Urologia internationalis**, v. 95, no. (3), pp. 300-308, 2015.

QIU, Y.; KRAFT, P.; CRAIG, E. C.; LIU, X.; HAYNES, D. Identification and functional study of phosphodiesterases in rat urinary bladder. **Urological research**, v. 29, no. 6, pp. 388-392, 2001.

RAMOS-FILHO, A.; MÓNICA, F. Z.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; ROJAS-MOSCOSO, J. A.; BÁU, F. R.; SCHENKA, A. A.; ANTUNES, E. Characterization of the urinary bladder dysfunction in renovascular hypertensive rats. **Neurourology and urodynamics**, v. 30, no. 7, pp. 1392-1402, 2011.

RASTOGI, S.; RODRIGUEZ, J.; KAPUR, V. Why do Patients with heart failure suffer from erectile dysfunction? A critical review and suggestions on how to approach this problem. **Int J Impot Res**, v. 17, pp. 25-36, 2005.

RICH, M. W. Heart failure in older adults. **Medical Clinics of North America**, v. 90, no. 5, pp. 863-885, 2006.

RIET, E. S. V.; HOES, A. W.; WAGENAAR, K. P.; LIMBURG, A.; LANDMAN, M. A. J.; RUTTEN, F. H. Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. **European Journal of Heart Failure**, v. 18, pp. 242-252, 2016.

RODRIGUES, F. L.; LOPES, R. A. M.; FAIS, R. S.; DE OLIVEIRA, L.; PRADO, C. M.; TOSTES, R. C.; CARNEIRO, F. S. Erectile dysfunction in heart failure rats is associated with increased neurogenic contractions in cavernous tissue and internal pudendal artery. **Life sciences**, v. 145, pp. 9-18, 2016.

ROVNER, E. S.; GOMES, C. M.; TRIGO-ROCHA, F. E.; ARAP, S.; WEIN, A. J. Evaluation and treatment of the overactive bladder. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 57, no. 1, pp. 39-48, 2002.

RAMIRO, A. S.; RAMÍREZ-ORTEGA, D.; DE LA CRUZ, V. P.; HÉRNANDEZ-PEDRO, N. Y.; GONZÁLEZ-ESQUIVEL, D. F.; SOTELO, J.; PINEDA, B. Role of redox status in development of glioblastoma. **Frontiers in immunology**, v. 7, 2016.

SALEH, R. M.; AWADIN, W. F.; EL-SHAPEI, R. A.; ELSEADY, Y. Y.; WEHAISH, F. E.; ELSHAL, M. F. Cardioprotective role of tadalafil against cisplatin-induced cardiovascular damage in rats. **European journal of pharmacology**, v. 765, pp. 574-581, 2015.

SALLOUM, F. N.; CHAU, V. Q.; HOKE, N. N.; KUKREJA, R. C. Tadalafil prevents acute heart failure with reduced ejection fraction in mice. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 28, no. 6, pp. 493-500, 2014.

SANDFELDT, L.; HAHN, R. G. Cardiovascular risk factors correlate with prostate size in men with bladder outlet obstruction. **BJU Int**, v. 92, no. 1, pp. 64-8, 2003.

SCHWARZ, E. R.; RASTOGI, S.; VISHAL, K.; NASIR, S.; JENNIFER, R. Erectile Dysfunction in Heart Failure Patients. **J Am Coll Cardiol**, v. 48, no. 6, pp. 1111-1119, 2006.

SEMINS, M. J.; CHANCELLOR, M. B. Diagnosis and management of patients with overactive bladder syndrome and abnormal detrusor activity. **Nature Clinical Practice Urology**, v. 1, no. 2, pp. 78-84, 2004.

SHIN, J. H.; CHUN, K. S.; NA, Y. G.; SONG, K. H.; KIM, S. I.; LIM, J. S.; KIM, G. H. Allopurinol protects against ischemia/reperfusion-induced injury in rat urinary bladders. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 7, 2015.

SIMON, J. N.; DUGLAN, D.; CASADEI, B.; CARNICER, R. Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation-contraction coupling in health and disease. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 73, pp. 80-91, 2014.

SKORECKI, K. L.; WINAVER, J.; ABASSI, Z. A. Extracellular fluid and edema formation. **The Kidney**, p. 398-458, 2008.

SMET, P. J.; JONAVICIUS, J.; MARSHALL, V. R.; DE VENETE, J. 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, no. 2, pp. 337-348, 1996.

SMITH, P. P.; MCCRERY, R. J.; APPELL, R. A. Current trends in the evaluation and management of female urinary incontinence. **Canadian Medical Association Journal**, v. 175, no. 10, pp. 1233-1240, 2006.

SOHOTNIK, R.; NATIV, O.; ABBASI, A.; AWAD, H.; FRAJEWICKI, V.; BISHARA, B. Phosphodiesterase-5 inhibition attenuates early renal ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury: assessment by quantitative measurement of urinary NGAL and KIM-1. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 304, no. 8, pp. F1099-F1104, 2013.

SORSABURU, S. Tadalafil in the management of lower urinary tract symptoms: a review of the literature and current practices in Russia. **Cent European J Urol**, v. 67, no. 2, pp. 167–177, 2014.

STEERS, W. D.; LEE, K. S. Depression and incontinence. **World J Urol**, v. 19, pp. 351-7, 2001.

STEWART, W.; VAN ROOYEN, J.; CUNDIFF, G.; ABRAMS, P.; HERZOG, A.; COREY, R.; WEIN, A. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. **World journal of urology**, v. 20, no. (6), pp. 327-336, 2003.

STUEHR, D. J. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. **The Journal of nutrition**, v. 134, no. 10, pp. 2748-2751, 2004.

SU, X.; STEIN, R.; STANTON, M. C.; ZDERIC, S.; MORELAND, R. S. Effect of partial outlet obstruction on rabbit urinary bladder smooth muscle function. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 284, pp. 644-652, 2003.

SUMIMOTO, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. **FEBS J**, v. 275, pp. 3249–3277, 2008.

SVALO, J., NORDLING, J., BOUCHELOUCHE, K., ANDERSSON, K. E., KORSTANJE, C., & BOUCHELOUCHE, P. The novel  $\beta$  3-adrenoceptor agonist mirabegron reduces carbachol-induced contractile activity in detrusor tissue from patients with bladder outflow obstruction with or without detrusor overactivity. **European journal of pharmacology**, v. 699, no. 1, pp. 101-105, 2013.

TAHER, A.; MEYER, M.; STIEF, C. G.; JONAS, U.; FORSSMANN, W. G. Cyclic nucleotide phosphodiesterase in human cavernous smooth muscle. **World journal of urology**, v. 15, no. 1, pp. 32-35, 1997.

TAIE, K.; MOOMBEINI, H.; KHAZAELI, D.; FIROUZABADI, M. S. P. Improvement of urodynamic indices by single dose oral tadalafil in men with supra sacral spinal cord injury. **Urology journal**, v. 7, no. 4, pp. 249, 2010.

THOMAS, A. W.; ABRAMS, P. Lower urinary tract symptoms, benign prostatic obstruction and the overactive bladder. **BJU Int**, v. 85, no. 3, pp. 57-68, 2000.

TINCELLO, D. G.; WILLIAMS, K. S.; JOSHI, M.; ASSASSA, R. P.; ABRAMS, K. R. Urinary diaries: a comparison of data collected for three days versus seven days. **Obstetrics & Gynecology**, v. 109, no. 2, pp. 277-280, 2007.

TOQUE, H. A.; PRIVIERO, F. B.; TEIXEIRA, C. E.; PERISSUTTI, E.; FIORINO, F.; SEVERINO, B.; CALIENDO, G. Synthesis and pharmacological evaluations of sildenafil analogues for treatment of erectile dysfunction. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, no. 9, pp. 2807-2815, 2008.

TOQUE, H. A.; TEIXEIRA, C. E.; PRIVIERO, F. B. M.; MORGANTI, R. P.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Vardenafil, but not sildenafil or tadalafil, has calcium-channel blocking activity in rabbit isolated pulmonary artery and human washed platelets. **British journal of pharmacology**, v. 154, no. 4, pp. 787-796, 2009.

- TRUZZI, J. C.; GOMES, C. M.; BEZERRA, C. A.; PLATA, I. M.; CAMPOS, J.; GARRIDO, G. L.; DELL'ORO, A. Overactive bladder–18 years–part I. **International braz j urol**, v. 42, no. 2, pp. 188-198, 2016.
- TUDOR, K. I.; SAKAKIBARA, R.; PANICKER, J. N. Neurogenic lower urinary tract dysfunction: evaluation and management. **Journal of Neurology**, pp. 1-10, 2016.
- TURGUT, N. H.; TEMIZ, T. K.; BAGCIVAN, I. Effects of sildenafil on maternal hemodynamics and fetal growth in normal rat pregnancy. **Eur J Pharmacol**, v. 589, no. 3, pp. 180-7, 2008.
- TURNER, W. H.; BRADING, A. F. Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. **Pharmacology & therapeutics**, v. 75, no. 2, pp. 77-110, 1997.
- UCKERT, S.; KUTHE, A.; JONAS, U. D. O.; STIEF, C. G. Characterization and functional relevance of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes of the human prostate. **The Journal of urology**, v. 166, no. 6, pp. 2484-2490, 2001.
- VANDENWIJNGAERT, S.; POKREISZ, P.; HERMANS, H.; GILLIJNS, H.; PELLENS, M.; BAX, N. A.; BOUTEN, C. V. Increased cardiac myocyte pde5 levels in human and murine pressure overload hypertrophy contribute to adverse lv remodeling. **Plos One**, v. 8, no. 3, pp. E58841, 2013.
- WALLACE, K. M.; DRAKE, M. J. Overactive bladder. **F1000Research**, v. 4, pp. 12-17, 2015.
- WANG, A. C.; WANG, Y.; CHEN, M. Single-blind, randomized trial of pelvic floor muscle training, biofeedback-assisted pelvic floor muscle training, and electrical stimulation in the management of overactive bladder. **Urology**, v. 63, no. 1, pp. 61-66, 2004.
- WEN, J. J.; WAN, X.; THACKER, J.; GARG, N. J. Chemotherapeutic Efficacy of Phosphodiesterase Inhibitors in Chagasic Cardiomyopathy. **JACC: Basic to Translational Science**, 2016.
- WERKSTRÖM, V.; HEDLUND, P.; LEE, T.; ANDERSSON, K. E. Vardenafil-induced relaxation and cyclic nucleotide levels in normal and obstructed rat urinary bladder. **BJU international**, v. 104, no. 11, pp. 1740-1745, 2009.
- WHEELER, M. A.; AYYAGARI, R. R.; WHEELER, G. L.; WEISS, R. M. Regulation of cyclic nucleotides in the urinary tract. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 41, no. 1, pp. 1-21, 2005.
- WINAVER, J.; HOFFMAN, A.; ABASSI, Z.; HARAMATI, A. Does the heart's hormone, ANP, help in congestive heart failure?. **Physiology**, v. 10, no. 6, pp. 247-253, 1995.
- WISE, B. Detrusor instability and hyperreflexia. **Urogynaecology**, v. 13, pp. 287-306, 1997.
- WU, T.; DUAN, X.; CAO, C. X.; PENG, C. D.; BU, S. Y.; WANG, K. J. The Role of Mirabegron in Overactive Bladder: a systematic review and meta-analysis. **urol int**, v. 93, no. 3, pp. 326–337, 2014.

YABLUCHANSKIY, A.; MA, Y.; IYER, R. P.; HALL, M. E.; LINDSEY, M. L. Matrix metalloproteinase-9: many shades of function in cardiovascular disease. **Physiology**, v. 28, no. 6, pp. 391-403, 2013.

YAMANISHI, T.; CHAPPLE, C. R.; YASUDA, K.; CHESS-WILLIAMS, R. The role of M2-muscarinic receptors in mediating contraction of the pig urinary bladder in vitro. **British journal of pharmacology**, v. 131, no. 7, pp. 1482-1488, 2000.

YAMANISHI, T.; KAGA, K.; FUSE, M.; SHIBATA, C.; KAMAI, T.; UCHIYAMA, T. The role of muscarinic receptor subtypes on carbachol-induced contraction of normal human detrusor and overactive detrusor associated with benign prostatic hyperplasia. **Journal of pharmacological sciences**, v. 128, no. 2, pp. 65-70, 2015.

YEUNG, C. K.; SIHOE, J. D. Y. Non-neuropathic dysfunction of the lower urinary tract in children. **Philadelphia: Elsevier Saunders**, 2012.

YOKOYAMA, O.; YOSHIYAMA, M.; NAMIKI, M.; DE GROAT, W. C. Role of the forebrain in bladder overactivity following cerebral infarction in the rat. **Experimental neurology**, v. 163, no. 2, pp. 469-476, 2000.

YONO, M.; YAMAMOTO, Y.; YOSHIDA, M.; UEDA, S.; LATIFPOUR, J. Effects of doxazosin on blood flow and mRNA expression of nitric oxide synthase in the spontaneously hypertensive rat genitourinary tract. **Life sciences**, v. 81, no. 3, pp. 218-222, 2007.

YOSHIDA, M.; INADOME, A.; MAEDA, Y.; SATOJI, Y.; MASUNAGA, K.; SUGIYAMA, Y.; MURAKAMI, S. Non-neuronal cholinergic system in human bladder urothelium. **Urology**, v. 67, no. 2, pp. 425-430, 2006.

ZANFOLIN, M.; FARO, R.; ARAUJO, E. G.; GUARALDO, A. M. A.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 47, no. 3, pp. 391-395, 2006.

ZHANG, L. T.; PARK, J. K. Are phosphodiesterase type 5 inhibitors effective for the management of lower urinary symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia?. **World journal of nephrology**, v. 4, no. 1, pp. 138, 2015.

ZHANG, M.; KOITABASHI, N.; NAGAYAMA, T.; RAMBARAN, R.; FENG, N.; TAKIMOTO, E.; KASS, D. A. Expression, activity, and pro-hypertrophic effects of PDE5A in cardiac myocytes. **Cellular signalling**, v. 20, no. 12, pp. 2231-2236, 2008.

## 9 ANEXO

Parecer do comitê de ética no uso de animal em pesquisa da Universidade São Francisco – Bragança Paulista.

<p><b>Comitê de Ética em Pesquisa – CEP</b></p>	 <p><b>UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO</b> Bragança Paulista, 25 de Abril de 2013</p>
<p><b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b></p>	
<p><b>Projeto de Pesquisa:</b> Estudo morfofuncional e molecular da função erétil e do baixo trato urinário de ratos com insuficiência cardíaca crônica: Avaliação da via de sinalização NO-GC5-GMPc</p>	
<p><b>ÁREA DE CONHECIMENTO:</b> Saúde e Biológicas</p>	
<p><b>Autor(es):</b> Prof(a). Dr (a). Prof. Mario Angelo Claudino <b>Instituição:</b> UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO <b>Protocolo:</b> 001.06.11</p>	
<p>Prezado(a)s Pesquisador(a)s,</p>	
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou na reunião do dia 25/04/2013 a resolução das pendências do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.</p>	
<p>Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:</p>	
<p><b>Parecer:</b> Aprovado</p>	
	
<p><b>Alessandra Gambero</b> <b>Vice - Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa</b> <b>Universidade São Francisco</b></p>	
<p><small>CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA    Av. São Francisco de Assis, 216 - CEP 12916-900    Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1625 CÂMPUS DE CAMPINAS            Rua Waldemir César da Silva, 105 - Curitiba CEP 13045-270    (19) 3779-3300 CÂMPUS DE ITATIBA                Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900    Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933 CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO    Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040    Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036</small></p>	