



FABIANO BERARDI CALMASINI

***EFEITO DA INIBIÇÃO CRÔNICA DA SÍNTESE DE
ÓXIDO NÍTRICO EM MUSCULATURA LISA DA
PRÓSTATA DE RATOS***

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

FABIANO BERARDI CALMASINI

***EFEITO DA INIBIÇÃO CRÔNICA DA SÍNTESE DE
ÓXIDO NÍTRICO EM MUSCULATURA LISA DA
PRÓSTATA DE RATOS***

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Edson Antunes

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
FABIANO BERARDI CALMASINI, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. EDSON ANTUNES.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C135e Calmasini, Fabiano Beraldi, 1983-
Efeito da inibição crônica da síntese de óxido nítrico em musculatura lisa da próstata de ratos / Fabiano Beraldi Calmasini. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Edson Antunes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Próstata. 2. Óxido nítrico. 3. Rho-quinase. I. Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on rat prostate smooth muscle reactivity

Palavras-chave em inglês:

Prostate

Nitric oxide

Rho-kinase

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]

Carlos Renato Tirapelli

Jose Butori Lopes de Faria

Data de defesa: 14-08-2013

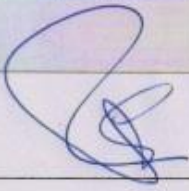
Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

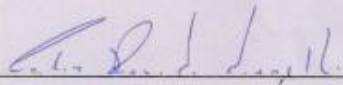
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

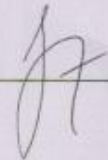
FABIANO BERARDI CALMASINI

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTUNES

MEMBROS:

1. PROF. DR. EDSON ANTUNES 

2. PROF. DR. CARLOS RENATO TIRAPELLI 

3. PROF. DR. JOSE BUTORI LOPES DE FARIA 

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 14 de agosto de 2013

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Caetano e Magali**,
que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando. Exemplos para
mim de vida e dedicação.
Sou eternamente grato a vocês!*

*A minha noiva **Juliana**, pela compreensão, amizade
e cumplicidade em todos os momentos
durante essa caminhada.*

*Aos meus avós, **Renato e Sebastiana** pelo apoio e
incentivo sempre que precisei!!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Edson Antunes,

*Agradeço imensamente pela oportunidade, confiança e
por sua orientação.*

Ao amigo,

Fabício de Faveri Faverio,

Meu agradecimento pela disponibilidade e atenção prestada

Agradecimentos

Aos meus amigos, Fábio e André Oquendo que foram muito importantes na minha vinda para Campinas. Muito obrigado!

Aos amigos da cascata, Celso Saragossa Filho, Eduardo Costa, Julio Rojas, Fernanda Dell, Renata Lopes, Tuany Cândido, Camila Estancia, Fernando Báu, Lorenzo Pissinatti, Maria Andréia, Paulo Gonzales, Rodrigo Capel, Marcy, Carmem, pela amizade, companhia e pela ajuda indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço especialmente aos amigos Fabio Henrique da Silva e Luis Osório, pelo coleguismo, ensinamentos e pela determinante contribuição que deram para a viabilização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório Lineu Baldissera, Rafael Prada, Nádia, Marina Calixto, Leticia Lintomen, Dalize Squebola, Priscila Monteiro, Gláucia Mello e Maria Elisa, agradeço por toda a amizade e pela alegria compartilhada no dia-a-dia de trabalho.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia, Dra. Sisi Marcondes, Dr. Stephen Hyslop, Dr. Gabriel Forato Anhê, Dr. André Schenka, Dr. Heitor Moreno Junior e Dra Fabíola Zakia Taufic Mônica , pela atenção dispensada durante o cumprimento dos créditos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Elaine, Rosicler, Gildo, Agnaldo, Antonio, Adílson e especialmente, agradeço ao Sr. Miguel Borges da Silva e Denise pelo competente trabalho que realizam no cuidado diário dos animais de experimentação.

Agradeço à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado Acadêmico.

SUMÁRIO

LISTA DE DROGAS	xv
LISTA DE ABREVIACOES	xvii
LISTA DE TABELAS	xx
LISTA DE FIGURAS.....	xxii
RESUMO.....	xxiv
ABSTRACT	xxvii
1. INTRODUÇÃO	30
1.1. Anatomia do sistema reprodutor	33
1.2. Controle neuronal.....	35
1.3. Rho-quinase (ROCK)	39
1.4. xido nítrico	43
1.5. xido nítrico e próstata	45
JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	47
OBJETIVOS	48
Objetivos gerais	48
Objetivos específicos	48
2. MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1. Animais de experimentação	50
2.2. Tratamento crônico com L-NAME	50
2.3. Medida da pressão arterial caudal	50
2.4. Análise funcional	51
2.4.1. Isolamento e montagem dos tecidos	51
2.4.2. Protocolos experimentais.....	52
2.5. Determinação dos níveis de AMPc e GMPc no tecido prostático.....	53
2.6. Estudo morfológico quantitativo da próstata	54
2.6.1. Histologia.....	54
2.6.2. Histomorfometria	54

2.7. Quantificação de espécies reativas de oxigênio.....	55
2.8. Análise estatística	55
3. RESULTADOS	57
3.1. Pressão arterial sistólica (PAS)	58
3.2. Peso corpóreo, peso da próstata e alterações histológicas	58
3.3. Efeito do L-NAME sobre as respostas contráteis a agonistas adrenérgico e colinérgico	60
3.4. Efeito do L-NAME sobre as respostas contráteis ao agonista purinérgico, α,β -metileno ATP	62
3.5. Efeito do L-NAME sobre a contração neurogênica	63
3.6. Efeito do L-NAME sobre as respostas relaxantes ao isoproterenol, Y27632 e nitroprussiato de sódio (SNP)	65
3.7. Papel da rho-quinase na hipercontratibilidade da musculatura lisa prostática à fenilefrina e carbacol em ratos tratados com L-NAME	67
3.8. Níveis intracelulares de AMPc e GMPc em tecido prostático.....	70
3.9. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO)	72
4. DISCUSSÃO	73
5. SUMÁRIO E CONCLUSÃO	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE DROGAS

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
CaCl ₂	Merck (Darmstadt, Alemanha)
HCl	Merck (Darmstadt, Alemanha)
KCl	Merck (Darmstadt, Alemanha)
KH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt, Alemanha)
MgSO ₄	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaCl	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaHCO ₃	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Carbacol	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
ODQ	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Nitroprussiato de Sódio	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
α,β-metileno ATP	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Y27632	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
N ^ω -nitro-L-arginina metil éster	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Isoproterenol	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Fenilefrina	Sigma (St. Louis, LO, EUA)

LISTA DE ABREVIACES

LISTA DE ABREVIações

[Ca²⁺]_i: concentração de cálcio intracelular

ACh: acetilcolina

AMPC: monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA: Análise de variância

ATP: trifosfato de adenosina

Ca²⁺: cálcio

CaCl₂: cloreto de cálcio

CaM: calmodulina

CCh: carbacol

DAG: diacilglicerol

EDRF: fator relaxante derivado do endotélio

E.P.M.: erro padrão da média

EFS: estimulação elétrica de campo

E_{max}: resposta máxima

ERO: espécies reativas de oxigênio

eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial

GCs: guanilato ciclase solúvel

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

HPB: hiperplasia prostática benigna

L-Arg: L-arginina

L-NAME: N^ω-nitro-L-arginina metil éster

LUTS: sintomas do baixo trato urinário

MLP: musculatura lisa prostática

M2: receptores muscarínicos M2

M3: receptores muscarínicos M3

MLC kinase: miosina quinase de cadeia leve

MLC: cadeia leve miosina

MLCK: quinase da cadeia leve de miosina

MLCP: fosforilação da cadeia leve miosina

mmHg: milímetros de mercúrio

NANC: não adrenérgico não colinérgico

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

PDE: fosfodiesterase

PDE5: fosfodiesterase tipo 5

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

SNP: nitroprussiato de sódio

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Histomorfometria, valores de peso corporal e peso prostático de ratos controle e tratados cronicamente com L-NAME.....59

Tabela 2. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) obtidos de curvas concentração-resposta a fenilefrina e carbacol em musculatura lisa prostática de ratos tratados aguda e cronicamente com L-NAME e controle.....62

Tabela 3. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) obtidos de curvas concentração-resposta ao isoproterenol, Y27632 e SNP em musculatura lisa prostática de ratos tratados cronicamente com L-NAME e controle.....67

Tabela 4. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) obtidos de curvas concentração-resposta a fenilefrina e carbacol na presença e ausência do Y27632 em musculatura lisa prostática de ratos tratados cronicamente com L-NAME e controle.....70

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do sistema urogenital.....	35
Figura 2. Inervação da próstata.....	36
Figura 3. Mecanismos envolvidos na contração da musculatura lisa (ênfase na via da rho-quinase).....	42
Figura 4. Valores da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos controle e tratados cronicamente com L-NAME.....	58
Figura 5. Curvas concentração-efeito à fenilefrina e carbacol em musculatura lisa prostática.....	61
Figura 6. Curva concentração-efeito ao α,β -metileno ATP em musculatura lisa prostática.....	63
Figura 7. Curva frequência-efeito à estimulação elétrica em musculatura lisa prostática.....	64
Figura 8. Ilustração representativa da estimulação elétrica.....	64
Figura 9. Curva concentração-efeito ao isoproterenol, Y27632 e SNP em musculatura lisa prostática de ratos.....	66
Figura 10. Curva concentração-efeito à fenilefrina e carbacol na presença do Y27621 em musculatura lisa prostática de ratos.....	69
Figura 11. Níveis de AMPc e GMPc em homogenato de próstata.....	71
Figura 12. Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio.....	72

RESUMO

A próstata é densamente inervada pelo sistema nervoso autônomo simpático, parassimpático e não-adrenérgico não-colinérgico (NANC) os quais atuam sinergicamente para o correto funcionamento deste órgão. O principal representante da inervação NANC é o óxido nítrico (NO), porém sua função na próstata ainda não está bem definida. Sendo assim, o presente trabalho utilizou o modelo de inibição crônica da NO sintase (NOS) com L-NAME para avaliar possíveis alterações funcionais, morfológicas e bioquímicas da musculatura lisa prostática (MLP) em ratos adultos Wistar (200-250 g). Os ratos foram tratados por 4 semanas com L-NAME na dose de 20 mg/kg/dia através de ingesta hídrica. Especificamente, realizamos os seguintes experimentos na próstata dos ratos controles e tratados com L-NAME: 1) curvas concentração-efeito *in vitro* à fenilefrina (agonista α_1 -adrenérgico) e ao carbacol (agonista muscarínico não seletivo), na presença e ausência do inibidor seletivo da rho-quinase Y27632 (1 μ M), e curvas concentração-efeito ao agonista purinérgico, α,β -metileno ATP, e à estimulação elétrica (contração neurogênica); 2) curvas concentração-efeito a agentes relaxantes como nitroprussiato de sódio (doador de NO), Y27632 (inibidor da rho-quinase) e isoproterenol (agonista β -adrenérgico); 3) determinação dos níveis de AMPc e GMPc; e 4) análise histomorfométrica. A próstata dos animais tratados cronicamente com L-NAME apresentou aumento em seu peso relativo, alterações histomorfométricas caracterizadas como aumento na área epitelial e na muscular lisa e diminuição no índice de contorno dos ácinos. A contração da MLP induzida pela fenilefrina, carbacol, α,β -metileno ATP e estímulo elétrico foi maior nos animais tratados cronicamente com L-NAME em relação aos animais controle.

A incubação *in vitro* com o inibidor da rho-quinase, Y27632, restaurou ao nível controle as contrações aumentadas induzidas pela fenilefrina e carbacol no grupo L-NAME. O relaxamento da MLP nos animais do grupo L-NAME produzido pelo isoproterenol foi significativamente menor comparado ao grupo controle. Não houve diferença para o relaxamento induzido pelo SNP e Y27632 entre os grupos. Os níveis de AMPc e GMPc na próstata dos animais tratados cronicamente com L-NAME foram significativamente menores em relação aos animais do grupo controle. O tratamento com L-NAME não alterou os níveis das espécies reativas de oxigênio. Em suma, nossos dados mostram que a inibição crônica de NO leva a alterações funcionais *in vitro* da MLP caracterizadas por aumento na resposta contrátil à fenilefrina, carbacol, α,β -metileno ATP e ao estímulo elétrico, além de redução no relaxamento β -adrenérgico. A inibição da via da rho-quinase *in vitro* restaurou os padrões contráteis para os agonistas adrenérgicos e colinérgicos. A deficiência crônica de NO gera alterações funcionais, bioquímicas e morfológicas em próstata de ratos com participação da via da rho-quinase nesse processo.

ABSTRACT

The prostate is densely innervated by the sympathetic and parasympathetic as well as non-adrenergic non-cholinergic (NANC) autonomic innervation that act synergistically for its correct functioning. The main NANC mediator is nitric oxide (NO), but the role of this mediator in the regulation of prostate smooth muscle (PSM) is not well established. Thus, the present study used the model of chronic NOS inhibition with L-NAME to evaluate the functional, morphological and biochemical alterations in PSM of Wistar adult male rats (200-250 g). Rats were treated with L-NAME (20 mg/kg/day) for 4 weeks in the drinking water. Specifically, we performed the following experiments in prostates from control and L-NAME-treated rats: 1) *in vitro* concentration-response curves to phenylephrine (α 1-adrenergic agonist) and carbachol (non-selective muscarinic agonist) in the presence and absence of the selective rho-kinase inhibitor Y27632 (1 μ M) and concentration-response curves to the purinergic agonist α - β -methylene-ATP, as well as electrical stimulation (neurogenic contraction); 2) *in vitro* concentration-response curves to the relaxing agents sodium nitroprusside (NO donor), Y27632 (rho-kinase inhibitor) and isoproterenol (non-selective β -adrenergic receptor agonist); 3) determination of cAMP and cGMP levels, and 4) histomorphometric analysis. The relative weight of the prostate from L-NAME-treated rats was greater than control animals. Histomorphometric changes characterized by an increase in epithelial acini and smooth muscle area, as well as by a decrease in luminal contour index were found in L-NAME treated rats. The phenylephrine and carbachol-induced prostate contractions were higher in L-NAME compared with control group. Prior incubation of PSM with the rho-kinase inhibitor Y27632 (1 μ M)

significantly inhibited the enhanced carbachol- and phenylephrine-induced PSM contractions in L-NAME group, restoring the E_{max} to control levels. The PSM contractions induced by α,β -methylene ATP and electrical field stimulation were also greater in L-NAME compared with control group. The PSM-induced relaxations in response to SNP remained unaltered, whereas isoproterenol-induced relaxations were lower in L-NAME compared with control group. The cAMP and cGMP levels in prostate homogenate were lower in L-NAME compared with control group. No difference was found in reactive oxygen species levels. In summary, our data showed that chronic NO inhibition led to *in vitro* functional changes in PSM characterized by increased contractile response to phenylephrine, carbachol, α,β -methylene-ATP and electrical-field stimulation, accompanied by reduction of β -adrenergic-induced relaxation. The *in vitro* inhibition of rho-kinase pathway restored the contractile pathway for the adrenergic and cholinergic agonists. The chronic NO-deficiency generates functional, biochemical and morphological changes in rat prostate with involvement of the rho-kinase pathway in this process.

1. INTRODUÇÃO

A próstata é um órgão pertencente ao sistema reprodutor masculino. É composta em sua maioria por tecido glandular, o qual tem a função de produzir e secretar substâncias importantes na composição do líquido seminal. Localiza-se logo abaixo da bexiga urinária, envolvendo a uretra. Seu crescimento e desenvolvimento está diretamente relacionado a alterações nos níveis hormonais. Os andrógenos, principalmente a testosterona, controlam positivamente o crescimento da próstata, e sua ausência prolongada resulta em atrofia glandular.¹

Além do tecido glandular, a próstata contém tecido muscular liso, o qual encontra-se ao redor do tecido glandular, em uma região conhecida como estroma prostático. Tem como função auxiliar a secreção de substâncias presentes no interior do tecido glandular no momento da ejaculação, além de contribuir para a manutenção do tônus basal da próstata.²

A principal via de contração da musculatura lisa prostática (MLP) em várias espécies, incluindo humanos, é a adrenérgica. A liberação neuronal de noradrenalina promove a ativação dos receptores adrenérgicos do subtipo α_1 , exercendo seu papel excitatório.³ Os receptores muscarínicos também participam na resposta contrátil prostática, variando o subtipo entre as espécies. Nos humanos, há evidências da presença dos subtipos M_1 e M_2 no epitélio e estroma, respectivamente.⁴ O ATP, advindo de inervação simpática e liberado concomitantemente à noradrenalina, vêm sendo relacionado como mais um agente atuante na fase contrátil da próstata em espécies como rato⁵ e cobaia.⁶ Em humanos, receptores para ATP do tipo P2X1 estão expressos na próstata⁷, além da presença da enzima 5'-nucleotidase, responsável pelo catabolismo do

ATP.⁸ Isso é sugestivo da real participação da via purinérgica na contração prostática; porém, a literatura ainda é controversa sobre a inervação purinérgica neste tecido.

Por outro lado, existem vias responsáveis pelo relaxamento da musculatura lisa prostática, contrabalanceando a resposta contrátil. Estudos mostram a presença de RNAm para receptores do tipo β_2 -adrenérgico em próstata de ratos⁹ e β_3 -adrenérgico em humanos.¹⁰ Utilizando técnica de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais, outros estudos mostraram a presença de adrenoceptores β_1 e β_3 em próstata de ratos e humanos, respectivamente.^{11,12} Entretanto, a quantidade precisa e a relativa contribuição de cada um dos subtipos desses receptores para o relaxamento prostático ainda permanecem indefinidas.³

O óxido nítrico (NO) é outro agente endógeno importante que atua relaxando a musculatura lisa e está presente na próstata de várias espécies como ratos, porcos, coelhos¹³ e humanos.¹⁴ Este mediador desempenha um importante papel na regulação do tônus prostático, secreção glandular e fluxo sanguíneo, além de exercer efeito inibitório no crescimento de células da musculatura lisa.¹⁵ Em humanos, a próstata recebe uma densa inervação nitrérgica, a qual apresenta-se reduzida em pacientes com hiperplasia prostática benigna (HPB).¹⁶ Desta forma, é possível que a ausência prolongada de NO leve a um aumento na contratilidade da MLP frente aos principais agonistas contráteis, além de um aumento no volume prostático.

1.1. Anatomia do sistema reprodutor

O sistema reprodutor masculino é constituído por estruturas externas e internas. A parte externa é composta pelo pênis, o escroto e os testículos, e as estruturas internas pelo canal deferente, uretra, vesículas seminais e próstata.

A próstata é uma glândula túbulo-alveolar localizada na parte subperitoneal, posterior à sínfise púbica, anterior ao reto e inferior à bexiga urinária. Em humanos, apresenta o tamanho e o formato de uma noz, circundando a uretra proximal à bexiga. Seu formato e composição variam entre as espécies, sendo que no homem é composta por base, ápice e superfícies anterior, posterior e lateral inferior. Sua base está ligada à base da bexiga urinária e o ápice em contato com a superfície superior do diafragma urogenital.¹⁷

A próstata humana é composta por um estroma fibromuscular e uma parte glandular, ambos circundados por uma pseudocápsula. A parte interna dessa cápsula é revestida por musculatura lisa com uma camada externa formada por colágeno.¹⁸

A próstata pode ser dividida em 3 zonas, central, periférica e de transição, sendo estas diferentes morfologicamente entre si, mas de difícil identificação macroscópica.¹⁹ Na zona central é observado um epitélio complexo, de formato poligonal, além de glândulas de grandes dimensões. Em sua composição pode ser observado uma quantidade grande de ácinos com formato irregular separados por uma fina camada de tecido fibromuscular. A zona periférica e a de transição são compostas por um epitélio simples com pequenas glândulas e com formato

arredondado, sendo a zona periférica composta por pequenos ácinos com formato regular e separados também por tecido fibromuscular estreito (Figura 1).^{17,19}

A próstata possui a função de produzir e secretar substâncias que farão parte do líquido seminal. Essas substâncias incluem enzimas proteolíticas, zinco, frutose, ácido cítrico, fosfatase ácida e prostaglandinas que serão secretadas na uretra prostática durante a ejaculação através da contração da MLP.²⁰

Em roedores, a próstata é composta também por tecido fibromuscular e glandular. Pode ser dividida em 4 lóbulos distintos, sendo estes: ventral, dorsal, lateral e anterior. Esses lóbulos cercam a bexiga urinária e a uretra, e estão em contato direto com o diafragma urogenital, exceto o lobo anterior que se localiza adjacente às vesículas seminais. Ainda possui uma fina camada de tecido conectivo formando uma cápsula ao seu redor, permitindo a separação entre os diferentes lóbulos.²¹

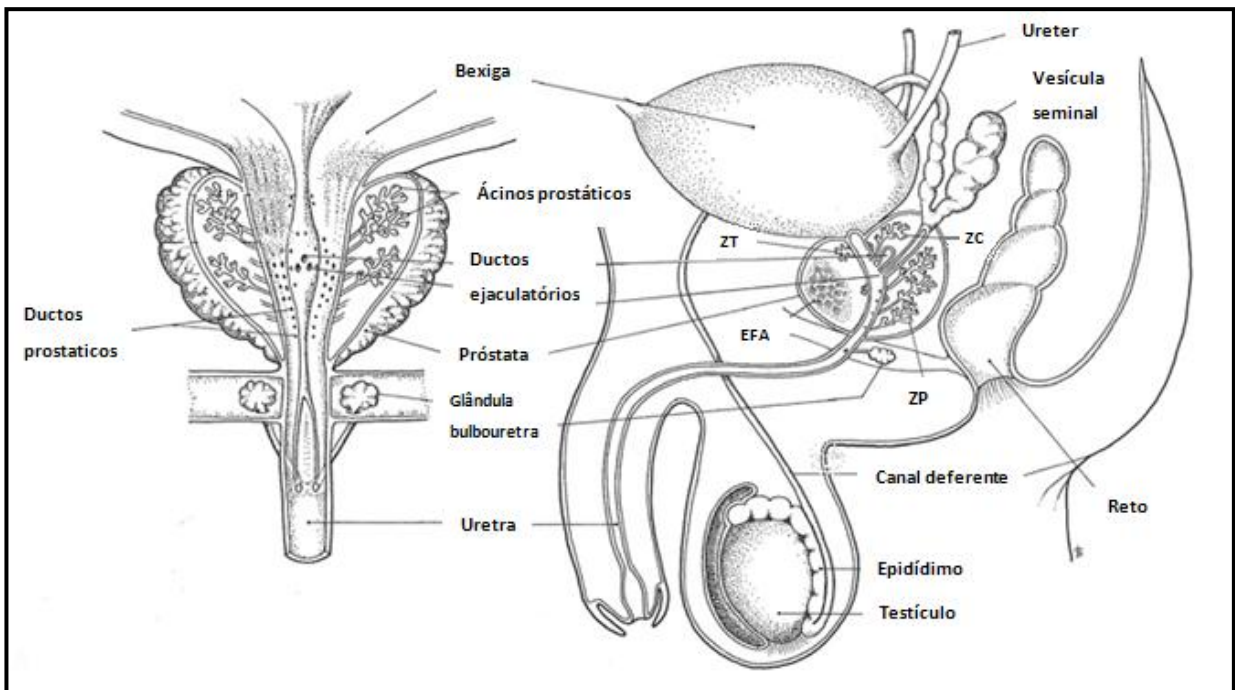


Figura 1. Cortes frontal e sagital do trato urogenital humano, ilustrando a posição anatômica da próstata e estruturas associadas. Zona central (ZC), zona periférica (ZP), estroma fibromuscular anterior (EFA) e zona de transição (ZT).²²

1.2. Controle neuronal

Na próstata humana, é conhecido três tipos distintos de inervações, sendo estas identificadas por técnica de microscopia eletrônica. A inervação adrenérgica e a colinérgica são as mais abundantes, seguidas por uma terceira inervação que se difere morfológicamente tanto da colinérgica como da adrenérgica, conhecida como não-adrenérgica não-colinérgica (NANC).²³

O trato urinário inferior humano é innervado pelos nervos parassimpáticos (pélvico), simpáticos (hipogástrico) e somáticos (pudendo), sendo que os nervos pélvicos e hipogástricos localizam-se na região sacral e lombar, respectivamente (Figura 2).²⁴ Na próstata humana, assim como em roedores, a estimulação do nervo hipogástrico, que innerva principalmente o estroma prostático, leva à

liberação de noradrenalina que poderá atuar tanto em receptores do tipo alfa (α)-adrenérgico promovendo a contração da MLP, como em receptores beta (β)-adrenérgicos favorecendo o relaxamento deste tecido.^{3,20,23,25}

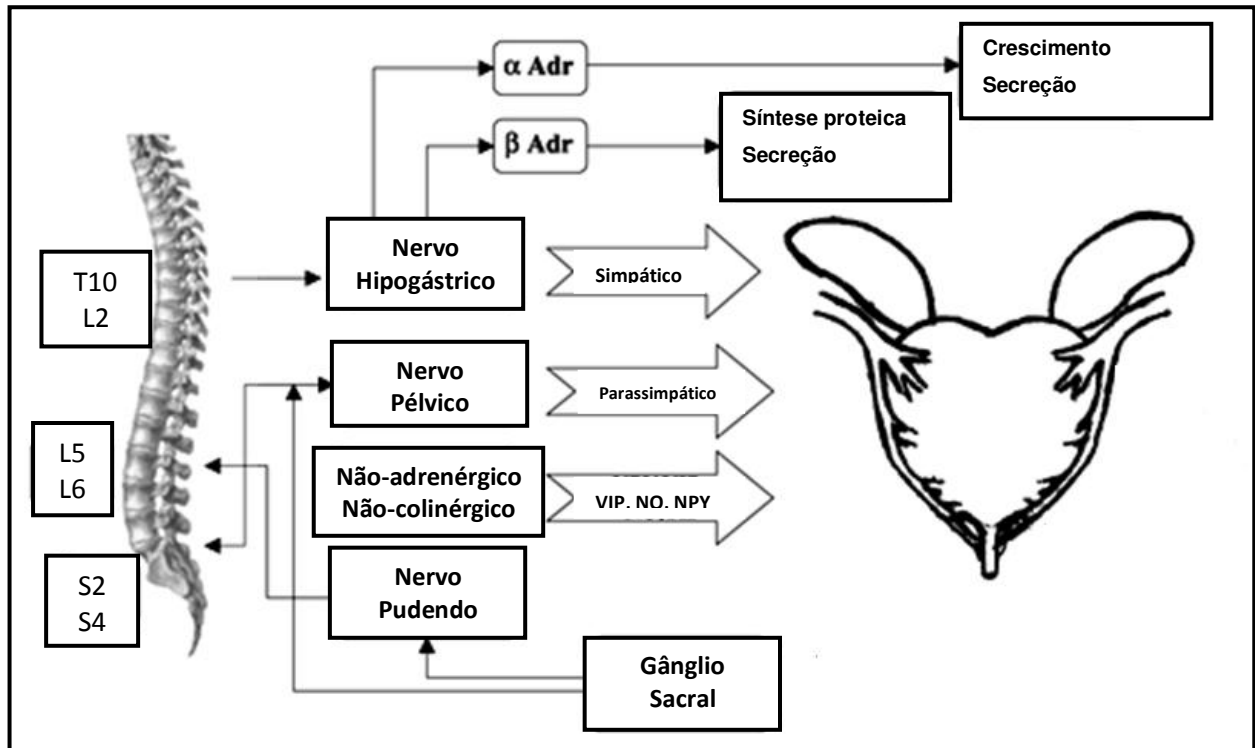


Figura 2. Inervação da próstata.²⁶

Em relação aos receptores α -adrenérgicos, estes podem ser divididos em α_1 e α_2 , presentes no órgão efector e no neurônio pré-sináptico, respectivamente. Os receptores α_2 , quando ativados, possuem um papel inibitório na liberação neuronal de noradrenalina, apresentando, portanto, um efeito negativo de feedback.²⁷ Os receptores α_1 estão acoplados à proteína G_q , e quando estimulados promovem ativação da fosfolipase C (PLC) levando à hidrólise do fosfatidilinositol (IP_2) para inositol 1,4,5 (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 atuará através da liberação de Ca^{2+} presente no retículo sarcoplasmático para o meio

intracelular, enquanto o DAG irá ativar a proteína quinase C (PKC), a qual levará a abertura de canais de cálcio com conseqüente aumento em seu influxo.²⁸

Os receptores α_1 são subdivididos em três outros subtipos denominados α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} , sendo que o α_{1A} apresenta uma variação conhecida como α_{1L} .²⁰ Tanto em humanos, quanto em ratos, é observado uma predominância de receptores α_{1A} na próstata, porém a proporção exata entre esses subtipos ainda permanece indefinida.^{29,30}

A via simpática, através da ativação principalmente dos receptores α_{1A} é a principal responsável pela contração da MLP na maioria das espécies, sendo esta uma das vias alteradas em quadros de HPB.^{31,32}

A inervação adrenérgica libera, além da noradrenalina, outro neurotransmissor que participa do processo contrátil da MLP em várias espécies. Esse neurotransmissor conhecido como ATP pode agir em receptores purinérgicos distintos conhecidos como P2X e P2Y. Os receptores P2X são ligados ao canal iônico e promovem influxo de cálcio extracelular. Os receptores P2Y são acoplados à proteína G e sua ativação leva a estimulação da via PLC/IP3 e liberação de cálcio extracelular.³³ Até o momento, já foram identificados sete diferentes tipos de receptores P2X (P2X1-7) e oito P2Y (P2Y1,2,4,6,11-14).³⁴ Em próstata de cobaias e ratos foi visto que o subtipo P2X1 é o responsável pela contração residual não adrenérgica, enquanto em camundongos essa via parece não participar no processo contrátil.^{5,6,35}

O sistema parassimpático também atua no funcionamento da próstata em diversas espécies. A estimulação do nervo pélvico, o qual inerva tanto o estroma quanto o epitélio prostático, leva à liberação da acetilcolina, que agindo via receptores muscarínicos desempenha diversas funções como regulação da contração da musculatura lisa, crescimento prostático e alterações nos níveis intracelulares de cálcio e AMPc.³⁶

Em humanos, foram identificadas fibras colinérgicas em diversas regiões, incluindo cápsula anterior, zona periférica e central.³⁷ Além disso, há grande expressão de receptores muscarínicos na próstata como um todo, sendo esta quantidade até superior à quantidade de receptores alfa-adrenérgicos.³⁶ Entretanto, devido à maior expressão de receptores muscarínicos no tecido epitelial em relação ao estroma prostático, há discordância na literatura sobre o real papel da via colinérgica para as respostas contráteis na próstata.^{3,38,39}

Existe ainda a inervação NANC, sendo que os principais representantes são peptídeos como o neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo vasoativo intestinal (VIP), neuropeptídeos (taquicininas) e o NO. Muitas dessas substâncias exercem atividade na regulação do crescimento prostático, contratilidade, secreção e controle do fluxo sanguíneo local.²⁰ O NO desempenha um papel importante no correto funcionamento prostático e sua biodisponibilidade apresenta-se reduzida em quadros de câncer prostático e HPB.^{16,40}

1.3. Rho-quinase (ROCK)

Já é bem estabelecido que o aumento nos níveis citosólicos de cálcio da célula muscular lisa é um pré-requisito para a ativação de proteínas contráteis com consequente aumento no tônus muscular. Essa alteração nos níveis de Ca^{2+} é bifásica. Inicialmente ocorre um aumento marcante dos níveis intracelulares (cerca de 3 a 10 vezes o nível basal de Ca^{2+}), por meio do aumento na formação de IP₃, e/ou influxo extracelular de Ca^{2+} pelos canais do tipo L ligados ou não a receptores ionotrópicos. Esses níveis voltam ao basal gradativamente poucos minutos após o estímulo pelo agonista. Com os níveis de cálcio próximo do basal, a célula muscular lisa consegue manter uma resposta contrátil sustentada através de mecanismos importantes de sensibilização celular ao Ca^{2+} .^{41,42} Essa sensibilização pode ocorrer por meio da modulação na atividade da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) por processos envolvendo a transmissão de força via citoesqueleto, ou da modulação na atividade da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP).^{43,44}

A MLCP é uma enzima responsável pela desfosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) resultando em relaxamento da musculatura lisa. É composta por três subunidades, sendo uma regulatória com peso entre 110 e 130 kDa denominada MYPT1; uma subunidade catalítica de 37 a 38 kDa denominada PP1c; e uma terceira de 20 kDa. Existem diversas isoformas da MYPT, porém a MYPT1 é a subunidade mais presente na musculatura lisa e que regula a atividade enzimática da MLCP.⁴⁵

Enzimas que tenham como alvo as subunidades da MLCP podem regular positiva ou negativamente a atividade dessa enzima. A proteína quinase C (PKC) e a rho-quinase vêm sendo classificadas como as principais via reguladoras da MLP.

A via da rho-quinase contribui na contração da musculatura lisa em diversas espécies. Pode ser ativada por meio de agonistas atuando em receptores acoplados à proteína G (GPCR) ou de uma maneira independente de receptores, através da despolarização da membrana celular.^{46,47} Pertence a essa via, enzimas da família das GTPases conhecidas como RhoA, RhoB e RhoC, sendo a primeira a mais conhecida em relação aos seus mecanismos intracelulares devido à sua maior participação na contração da musculatura lisa. A RhoA possui alta afinidade tanto por guanosina difosfato (GDP) quanto para guanosina trifosfato (GTP), porém essa afinidade depende do estado ativado ou não dessa GTPase.^{48,49}

Em sua forma inativa, a RhoA apresenta-se ligada ao GDP no citoplasma da célula. Ao ser ativada, ocorre sua migração para a membrana celular e a troca do GDP pelo GTP (Figura 3). Essa troca é mediada por fatores de troca conhecidos como GEFs, proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) e inibidores da dissociação (GDIs). As GEFs facilitam a ligação RhoA/GTP enquanto as GAPs facilitam a ligação RhoA/GDP. As GDIs controlam a difusão da RhoA entre a membrana e o citosol formando então um complexo com o GTP.⁴⁵

Uma vez ativada, o complexo RhoA-GTP estimula uma quinase citoplasmática específica conhecida como ROCK. Existem dois diferentes tipos de ROCK, denominadas tipo I e II. Apesar de possuírem uma similaridade de 65% em

relação à suas sequências de aminoácidos, são codificadas por diferentes genes e possuem uma variação em sua expressão de acordo com o tecido analisado.^{50,51} Em ambas as enzimas, o domínio quinase está presente na região amino-terminal da molécula, seguida de uma região helicoidal onde está localizado o domínio de ligação da RhoA denominado RDB. Em sua outra extremidade está a região carboxi-terminal onde se localiza o domínio de homologia à proteína Pleckstrin (PH) e está envolvida na localização da ROCK.⁵²

Com sua ativação, diversos são os substratos em que a ROCK pode agir, incluindo proteínas relacionadas à regulação do citoesqueleto, sinalização intracelular e contratilidade.⁵³⁻⁵⁶ Um dos mais importantes substratos que está diretamente relacionado à contratilidade da musculatura lisa é a MYPT1, uma subunidade da MLCP. Essa subunidade pode ser fosforilada em diferentes resíduos (treonina 696, serina 854 e/ou treonina 853), todos resultando em inibição da atividade da MLCP, levando conseqüentemente a um aumento na contratilidade da musculatura lisa.⁵⁷ Estudos mostram que a ROCK também pode fosforilar uma proteína regulatória denominada CPI-17, a qual, quando fosforilada, inibe uma região denominada PP1c da MLCP.⁵⁴

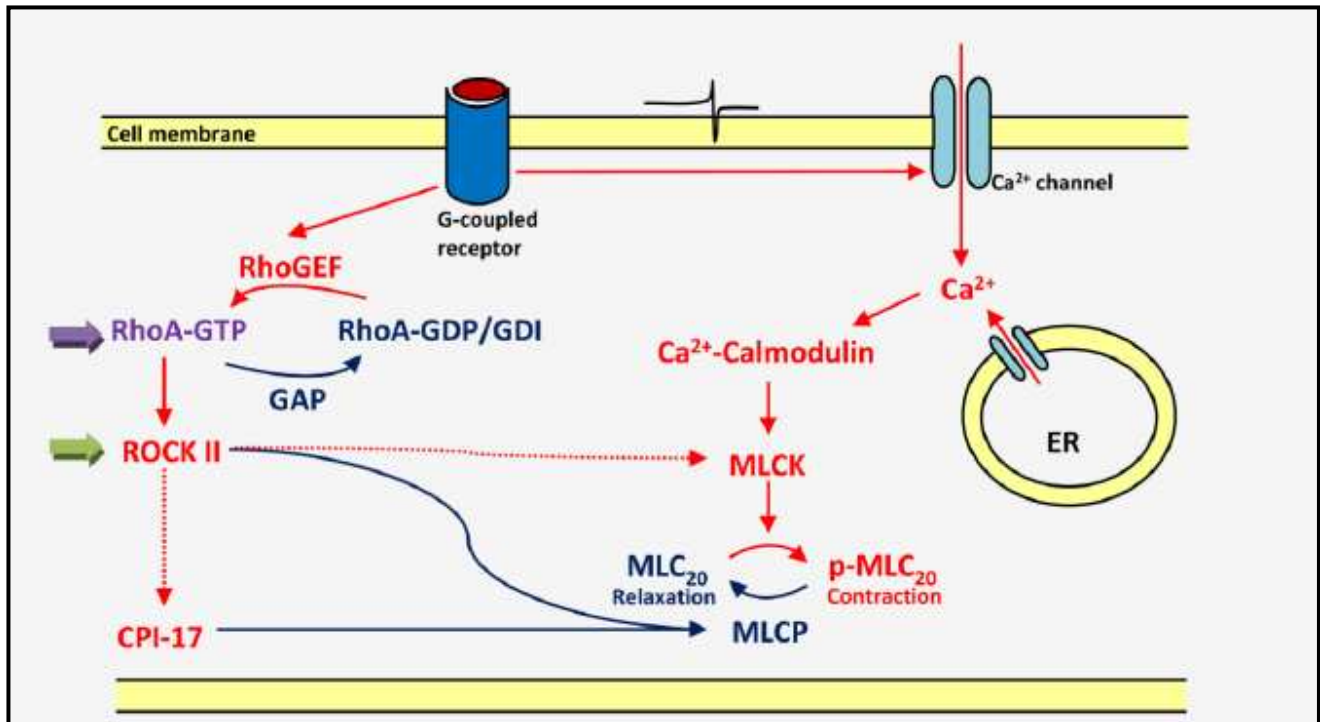


Figura 3. Mecanismos envolvidos na contração da musculatura lisa (ênfase na via da rho-quinase).⁴⁵

Alterações na atividade da via de sinalização RhoA/rho-quinase vêm sendo apontadas como responsáveis pelo aumento na resistência vascular periférica, o que contribui para o desenvolvimento e/ou piora de casos de hipertensão arterial e disfunção erétil. Em modelos animais de hipertensão, tais como hipertensão renovascular, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e animais tratados com L-NAME (inibidor não seletivo da NOS), a via RhoA/rho-quinase desempenha papel importante, uma vez que o tratamento com Y27632, um inibidor seletivo da ROCK, reduziu significativamente os valores de pressão arterial. Além disso, estudos com artéria mesentérica e artérias cerebrais de animais SHR também mostraram alterações funcionais para essa via.^{58,59}

A modulação da via da RhoA/rho-quinase pode estar relacionada ao aumento na ativação de receptores de angiotensina do tipo 1 (AT1), aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou diminuição na produção e/ou biodisponibilidade de NO. Evidências mostram que existe um antagonismo funcional entre a via da rho-quinase e a do NO/GMPc em diversos tecidos. Sendo assim, a ausência de NO poderia levar a um aumento na contribuição da via da rho-quinase no processo contrátil, além de favorecer a proliferação celular.

1.4. Óxido nítrico

O NO é um gás responsável por diversas funções incluindo controle da reatividade da musculatura lisa, neurotransmissão e proliferação celular em diversos tecidos.⁶⁰ Na década de 80 foi denominado fator relaxante derivado do endotélio (EDRF)⁶¹, sendo posteriormente identificado como NO por Palmer e colaboradores⁶² e Ignarro e colaboradores⁶³.

O NO é formado a partir do aminoácido L-arginina, pela ação de enzimas conhecidas como sintases de óxido nítrico (NOS). Estas enzimas utilizam como substrato o NADPH e o oxigênio (O₂), oxidando o grupo guanidina da L-arginina, que resulta na formação de quantidades estequiométricas de NO e L-citrulina.⁶⁴ Existem três diferentes tipos de NOS, classificadas em NOS neuronal (também conhecida como nNOS ou NOS1), NOS induzível (iNOS ou NOS2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3).⁶⁵ A nNOS e eNOS são consideradas constitutivas por estarem fisiologicamente expressas nas células, enquanto a iNOS é classificada

como induzível por ter sua expressão induzida por substâncias pró-inflamatórias como lipopolissacarídeo (LPS) e citocinas.

Após sua síntese e liberação, o NO se liga ao seu receptor fisiológico intracelular, a guanilato ciclase solúvel (GCs). Esta ligação ocorre diretamente no grupo heme formando um complexo heme-ferrosnitrosil. A ligação do NO promove a quebra da ligação entre a His105 axial e o ferro, resultando em um anel onde o NO está presente na quinta posição, criando assim uma mudança conformacional que leva à ativação da GCs.⁶⁶ A ativação desta enzima pelo NO leva à conversão de guanosina trifosfato (GTP) no segundo mensageiro, monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Este, por sua vez, ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), levando à redução da concentração de cálcio intracelular, gerando entre outros efeitos o relaxamento da musculatura lisa. Além disso, também é atribuído à PKG a ativação de canais de potássio, da miosina fosfatase, de bombas Ca^{2+} ATPase presentes no retículo sarcoplasmático e inibição da produção de IP_3 .⁶⁷

A inativação do GMPc é feita por enzimas denominadas fosfodiesterases (PDE), sendo a do tipo 5 a principal responsável pela hidrólise do GMPc. Até o presente momento foram identificadas onze diferentes famílias de PDE, as quais diferem em estrutura, regulação e especificidade para os substratos.⁶⁸ Alguns autores demonstraram a presença da PDE5 em próstata⁶⁹, bexiga⁷⁰ e uretra de rato⁷¹, sugerindo que a via do NO/GMPc contribui também para o correto funcionamento do baixo trato urinário, além da manutenção em seu tônus.

1.5. Óxido nítrico e próstata

A presença da NOS e sua atividade vem sendo caracterizada na próstata de diversas espécies através de ensaios bioquímicos, moleculares e imunohistoquímica.^{13,16} Alguns trabalhos reportam a presença das isoformas nNOS e eNOS na próstata. A nNOS é expressa principalmente em nervos e gânglios presentes na zona de transição, mas pode ser expressa também no epitélio glandular. A eNOS é expressa em células endoteliais de microvasos, além de células epiteliais.^{72,73}

Em próstata de humanos, assim como de cobaias e ratos, o NO exerce um papel importante na regulação do tônus da musculatura lisa, inervação neuronal e regulação na secreção e produção hormonal.⁷⁴⁻⁷⁷ Em estudos funcionais utilizando banho para órgão isolado, os inibidores da PDE5 mostraram-se eficazes em inibir de maneira dependente a concentração a resposta contrátil induzida pela noradrenalina em próstata humana.⁷⁸ Na clínica, inibidores da PDE5 vêm sendo utilizados com sucesso para pacientes que apresentam os sintomas do baixo trato urinário (LUTS) associados à HPB. O tadalafil, até o presente momento, é o único dos inibidores aprovado pelo FDA para o tratamento do HPB-LUTS, melhorando a sintomatologia da doença.^{79,80}

O NO também parece modular a proliferação celular de células tumorais em diversos tecidos. Seus efeitos inibitórios são dependentes de diversos fatores como expressão, atividade e localização das isoformas da NOS, concentração e duração da exposição e estado redox.⁸¹⁻⁸³ Por um lado, o aumento do NO pode inibir a proliferação de células tumorais e induzir apoptose. Em casos avançados

de câncer prostático, ocorre aumento na expressão de iNOS associada à rápida proliferação e diferenciação em células tumorais.^{40,84}

Existe, portanto, grande interesse no conhecimento da via do NO/GMPc como um alvo terapêutico em potencial para o tratamento de doenças relacionadas à próstata, como HPB e câncer prostático. Drogas que aumentem a biodisponibilidade de NO ou que funcionem como agonistas da GCs podem ser uma alternativa ao esquema terapêutico atual.

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Na próstata, o NO modula a reatividade da musculatura lisa, secreção glandular e fluxo sanguíneo.¹⁵ Entretanto, poucos estudos se dedicaram a compreender o papel modulatório do NO na reatividade da MLP frente a agonistas simpáticos, parassimpáticos e purinérgicos.^{85,86} Assim, propusemos a hipótese que a retirada crônica de NO levaria a alterações na reatividade da MLP. O modelo proposto neste presente trabalho, de inibição crônica da atividade da NOS pelo L-NAME, nos possibilitará avançar na compreensão da função do NO nas alterações funcionais e morfológicas da próstata de rato. O antagonismo funcional entre as vias NO/GMPc e rho-quinase vem sendo descrito em diversos tecidos, podendo ser uma das vias alteradas no bloqueio crônico do NO.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Investigar os efeitos da inibição crônica da síntese de NO na reatividade da musculatura lisa da próstata de ratos e os mecanismos envolvidos neste processo.

Objetivos específicos

- Realizar curvas concentração-efeito *in vitro* a agentes contráteis como fenilefrina (agonista α_1 -adrenérgico), carbacol (agonista muscarínico), α,β -metileno ATP (agonista purinérgico) e agentes relaxantes como nitroprussiato de sódio (doador de NO), Y27632 (inibidor da rho-quinase) e isoproterenol (agonista β -adrenérgico), assim como à estimulação elétrica (contração neurogênica) em próstata de ratos controle e tratados cronicamente com L-NAME;
- Quantificar os níveis de AMPc e GMPc na próstata de animais controles e tratados cronicamente com L-NAME;
- Realizar análise morfohistológica da próstata de animais controle e tratados cronicamente com L-NAME;
- Avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) na próstata de animais controle e tratados cronicamente com L-NAME.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais de experimentação

Foram utilizados ratos Wistar (8-12 semanas), pesando entre 200 e 250 g, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP, Campinas, SP). Os ratos ficaram alojados no biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia, UNICAMP, mantidos em ciclo claro/escuro (12/12h), à temperatura de 25°C, em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA-IB/UNICAMP; protocolo nº 2424-1).

2.2. Tratamento crônico com L-NAME

O tratamento crônico com L-NAME foi conduzido de acordo com Ribeiro *et al* (1992).⁸⁷ O L-NAME foi dissolvido em água a uma concentração de 400 mg/L e oferecido por ingesta hídrica em dose aproximada de 20 mg/rato/dia por 30 dias. Foi controlada semanalmente a pressão arterial em todos os grupos estudados. Os animais do grupo controle foram submetidos às mesmas condições experimentais, porém receberam apenas água de torneira.

2.3. Medida da pressão arterial caudal

Para a medida da pressão arterial sistólica, os animais foram colocados em gaiolas aquecidas à 37°C por 20 min para provocar dilatação dos vasos caudais. Após este período, os animais foram colocados em contensor, modelo 1262

(Narco Bio Systems, Texas, EUA). Na cauda do animal foi adaptado um manguito acoplado a sistema de microfones capaz de captar sinais de 0.5 mv de amplitude.

As oscilações foram registradas através do osciloscópio modelo CS 4025 (Kenwood Corporation, Japão). O manguito foi inflado até 200 mmHg de modo a não se visualizarem as pulsações. Logo após, o manguito foi desinsuflado até reiniciarem as pulsações, e o valor da pressão arterial foi lido no manômetro. As medidas foram consideradas válidas quando não houve variações significantes, isto é, acima de 2 mmHg.

2.4. Análise funcional

2.4.1. Isolamento e montagem dos tecidos

Para o isolamento da próstata, os animais foram mortos por inalação de CO₂ e em seguida exsanguinados por secção dos vasos cervicais. Realizou-se então uma incisão na parede abdominal expondo a bexiga e a próstata. A próstata ventral foi removida, isolada e cortada de forma transversal em *strips*, os quais foram montados em câmaras para órgãos isolados (volume de 4 mL), preenchidas com a solução Krebs-Henseleit, continuamente gaseificadas com O₂:CO₂ (95:5 %) e mantidas à temperatura de 36,5°C e pH entre 7,3 a 7,5. Os tecidos foram lavados com solução nutritiva Krebs-Henseleit à 37°C, com a seguinte composição (mM): NaCl (118), KCl (4,8), CaCl₂ (1,9), MgSO₄ (1,2), NaHCO₃ (25), KH₂PO₄ (1,2) e glicose (10,1). Os strips foram suspensos em miógrafo, a uma tensão de estabilização de 5 mN. As alterações de tensão foram registradas em sistema

PowerLab 8/30 de aquisição de dados (Software versão 7.0, AD Instruments, Austrália).

O logaritmo das concentrações molares dos agonistas foi colocado em abscissas e a resposta contrátil em % nas ordenadas. Os gráficos foram traçados e analisados através do programa “GraphPad PRISM” (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Os valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) foram calculados pela seguinte equação (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA): $E = E_{max} / [1 + (10^c / 10^x)^N + \Phi]$, onde E é elevação do tônus basal, E_{max} é a máxima resposta que o agonista pode produzir; “c” é o logaritmo da EC_{50} , que é a concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima; “x” é o logaritmo da concentração do agonista; “N” significa a inclinação da curva concentração-resposta e Φ é a resposta observada na ausência do agonista. As análises de regressões não lineares para determinar os parâmetros E_{max} , $\log EC_{50}$ e o “n” foram feitas utilizando-se o programa GraphPad Prism, considerando o parâmetro Φ como zero.

2.4.2. Protocolos experimentais

➤ Avaliação do efeito contrátil

Foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas ao agonista α_1 -adrenérgico (fenilefrina, 1 nM – 30 μ M), agonista muscarínico (carbacol 1 nM – 30 μ M), e não-cumulativa ao agonista purinérgico (α,β -metileno ATP; 1 μ M, 3 μ M e 10

μM). Foram determinadas a potência ($p\text{EC}_{50}$) e a resposta máxima (E_{max}) para cada agonista.

➤ *Avaliação da contração neurogênica*

Os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 50V, 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, 32 Hz com intervalo de 2 minutos entre os estímulos.

➤ *Avaliação do efeito relaxante*

Foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas ao nitroprussiato de sódio, (doador de NO; 10 nM-1 mM), Y27632 (inibidor da rho-quinase; 1 nM a 1 mM) e isoproterenol (agonista β -adrenérgico; 300 pM a 10 μM). Os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina (10 μM) ou carbacol (10 μM). Os relaxamentos obtidos foram calculados como porcentagem da contração induzida pelos agonistas fenilefrina ou carbacol. Foram determinadas as potências e a resposta máxima para cada substância.

2.5. Determinação dos níveis de AMPc e GMPc no tecido prostático

Para determinação dos níveis de AMPc e GMPc em próstata de ratos, os fragmentos foram equilibrados durante 30 min em solução de Krebs continuamente oxigenada à 37°C. Na determinação do AMPc, os tecidos foram estimulados por 4 minutos com isoproterenol (1 μM), na presença e ausência do

inibidor da adenilato ciclase solúvel, SQ 22536 (100 μ M). Em seguida, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, pulverizados, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA, 5%) e centrifugados à 1500 g por 10 min à 4°C. O TCA foi extraído das amostras através de três lavagens com solução de éter saturado com água. A preparação do *tracer*, amostras, padrões e incubação com anticorpo foram realizados conforme descrito no kit disponível comercialmente (Cayman Chemical Cyclic AMP EIA kit, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6. Estudo morfológico quantitativo da próstata

2.6.1. Histologia

As próstatas obtidas de animais controle e tratados cronicamente com L-NAME foram isoladas e fixadas em formalina tamponada com fosfato (10%) por 24 h. Foram então desidratadas através de imersão em álcool em concentrações crescentes de 50%, 70%, 80%, 90% e 100%. Em seguida, foram diafanizadas em xilol e posteriormente emblocadas em parafina. Secções transversais (4 μ m) foram cortadas em micrótomo e coradas com Hematoxilina e Eosina (H & E) e tricrômico de Masson (MT).

2.6.2. Histomorfometria

As imagens digitais a partir de H & E, MT e imunohistoquímica foram obtidas utilizando-se uma câmera digital (Leica DFC360 FX, Leica, Alemanha) conectada a um microscópio de campo claro (Leica DM5000 B). As imagens (H & E) de baixa

ampliação foram usadas para quantificação da área muscular e epitelial média, número e índice de contorno dos ácinos. Os parâmetros citados acima foram avaliados por meio de Software de análise de imagem NIH - ImageJ 1,42. Esse software é configurado para se detectar a intensidade da escala de cinza em imagens, permitindo assim a segmentação automática de áreas de interesse em MT ou imagens histoquímica.

2.7. Quantificação de espécies reativas de oxigênio

A próstata foi removida, colocada em meio para congelamento e em seguida congelada em gelo seco. As próstatas foram cortadas (30 μm) em criostato e colocadas em lâminas com polilisina ou silanina. As lâminas com os cortes foram colocadas em placa quente (37° C) por 20 min. Os cortes foram circulados com caneta hidrofóbica e incubados com tampão fosfato por 10 min à 37° C em câmara úmida. O tampão fosfato foi retirado, e os cortes foram incubados com hidroetidina (10 μM) diluída em tampão fosfato por 30 minutos à 37° C em câmara úmida. Os cortes foram observados em microscópio de fluorescência com filtro para rodamina.

2.8. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão das médias (E.P.M). Para comparações de até duas variáveis utilizou-se o teste t de Student. Para comparações múltiplas de variáveis independentes foi usado o teste de análise de variância (ANOVA de duas vias), seguido pelo teste de Tukey. O programa Instat

(GraphPad Software) foi usado para estas análises. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Pressão arterial sistólica (PAS)

A administração crônica de L-NAME gerou aumento significativo da pressão arterial sistólica, sendo este aumento já observado desde a primeira semana de tratamento e mantido até o final da 4ª semana de tratamento (Figura 4).

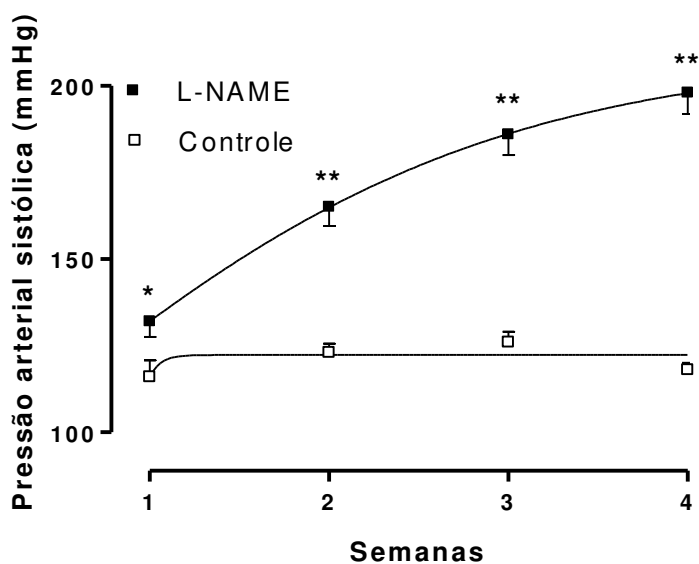


Figura 4. Valores da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos controle e tratados cronicamente com L-NAME (20 mg/rato/dia por 4 semanas). Os dados representam média \pm erro padrão da média de 20 animais. ** $P < 0,001$; * $P < 0,05$ comparado com os respectivos tempos do grupo controle.

3.2. Peso corpóreo, peso da próstata e alterações histológicas

Após 4 semanas de tratamento com L-NAME, não foram observadas diferenças significativas no peso úmido total da próstata, mas o peso úmido relativo (peso da próstata dividido pelo peso corpóreo) mostrou-se maior neste grupo experimental (Tabela 1). O peso seco da próstata foi maior no grupo L-NAME. O tratamento com L-NAME reduziu o peso corporal e promoveu alterações histomorfométricas como aumento da área epitelial diminuição no índice de

contorno dos ácinos e aumento da área de musculatura lisa (Tabela 1). O número de ácinos não foi modificado pelo tratamento com L-NAME.

Tabela 1. Histomorfometria, valores de peso corporal e peso prostático após 4 semanas de tratamento com L-NAME (20 mg/rato/dia) em ratos.

	Controle	L-NAME
Pressão arterial sistólica (mmHg)	118 ± 2	198 ± 6,11***
Peso corporal (g)	461,9 ± 5,9	430,6 ± 5,4**
Peso úmido prostático (mg)	381,4 ± 18,2	434,4 ± 27,1
Peso próstata/peso corporal (mg/g)	82,57 ± 3,76	100,8 ± 5,7*
Peso seco prostático (mg)	16,88 ± 0,44	18,93 ± 0,01*
Área epitelial dos ácinos (mm ²)	93 ± 12,8	188,2 ± 12,1***
Número de ácinos "(média de 6 CPA)"	8000 ± 0,46	8500 ± 0,47
Índice de contorno (IC)	6240 ± 0,26	4960 ± 0,18***
Área de musculatura lisa (mm ²)	136,2 ± 17,6	281,2 ± 27,6***

Os dados representam a média ± erro padrão da média de 10-11 ratos por grupo
 * $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo controle. CPA, campo de pequeno aumento

3.3. Efeito do L-NAME sobre as respostas contráteis a agonistas adrenérgico e colinérgico

Neste protocolo experimental, buscamos investigar o efeito da inibição crônica da NOS sobre a contratilidade da musculatura lisa prostática em resposta aos agentes contráteis fenilefrina e carbacol.

Os resultados mostraram um aumento significativo na resposta máxima para a fenilefrina e carbacol no grupo que recebeu L-NAME cronicamente por 30 dias em comparação ao grupo controle (Figura 5A e C, respectivamente). Além disso, a administração crônica de L-NAME causou um deslocamento significativo de 2,6 vezes para a esquerda na curva concentração-efeito ao carbacol, que não foi observado para a fenilefrina (Tabela 2).

Em experimentos separados, a adição *in vitro* do L-NAME em próstata de ratos controles (100 μ M, 30 min) não alterou nem a E_{max} nem a pEC_{50} da fenilefrina e carbacol (Figura 5, B e D; Tabela 2)

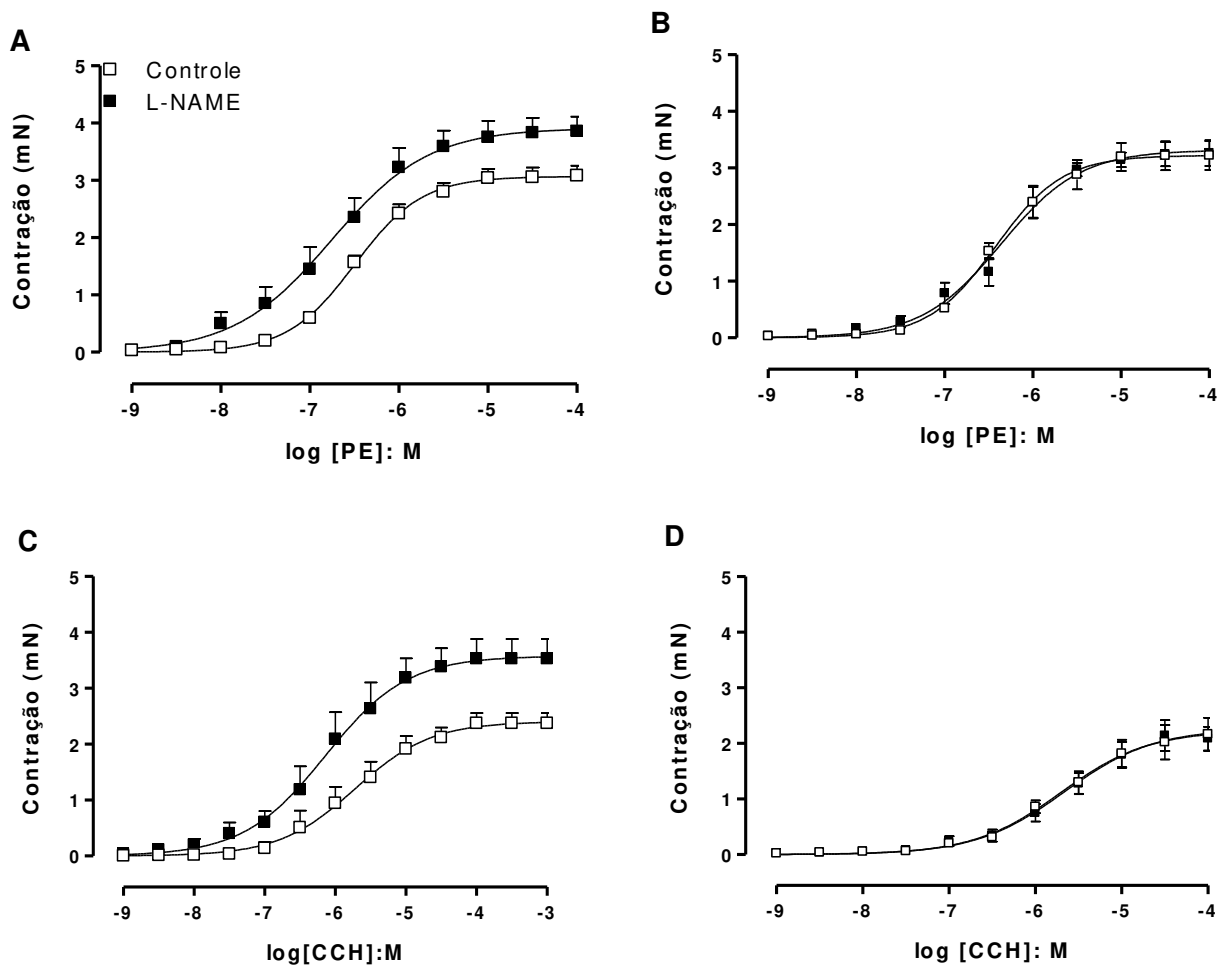


Figura 5. Curva concentração-efeito à fenilefrina (PE) e carbacol (CCh) em musculatura lisa prostática (MLP) de animais tratados cronicamente com L-NAME (A e C) ou adição *in vitro* do L-NAME (100 μ M, 30 minutos) (B e D). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5-11 animais.

Tabela 2. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) obtidos de curvas concentração-efeito à fenilefrina e ao carbacol em musculatura lisa prostática de ratos.

Agonista/Grupo	pEC_{50}	E_{max} (mN)
<i>Fenilefrina</i>		
Controle grupo crônico	6,49 ± 0,04	3,08 ± 0,17
L-NAME grupo crônico	6,75 ± 0,11	3,85 ± 0,25**
Controle grupo <i>in vitro</i>	6,42 ± 0,06	3,22 ± 0,25
L-NAME grupo <i>in vitro</i>	6,35 ± 0,07	3,26 ± 0,22
<i>Carbacol</i>		
Controle grupo crônico	5,72 ± 0,12	2,37 ± 0,18
L-NAME grupo crônico	6,14 ± 0,11*	3,52 ± 0,35**
Controle grupo <i>in vitro</i>	5,72 ± 0,12	2,16 ± 0,29
L-NAME grupo <i>in vitro</i>	5,72 ± 0,10	2,08 ± 0,21

Os dados representam a média ± erro padrão da média de 5-11 animais. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ comparado ao respectivo grupo controle.

3.4. Efeito do L-NAME sobre as respostas contráteis ao agonista purinérgico, α,β -metileno ATP

Neste protocolo experimental, buscamos investigar o efeito da inibição crônica de L-NAME sobre a contratilidade da musculatura lisa prostática em resposta ao agente contrátil dependente da ativação de receptor purinérgico (α,β -metileno ATP).

Os resultados mostraram um aumento significativo na contração induzida pelo α,β -metileno ATP nas concentrações de 3 e 10 μM no grupo que recebeu cronicamente L-NAME em relação ao controle.

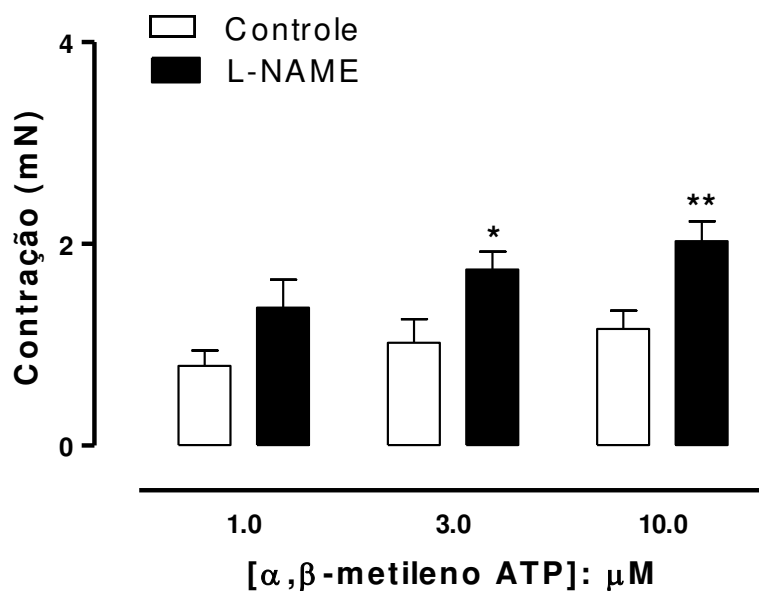


Figura 6. Curva concentração-efeito ao α,β -metileno ATP em musculatura lisa prostática de ratos tratados cronicamente com L-NAME. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5-6 animais. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle.

3.5. Efeito do L-NAME sobre a contração neurogênica

A estimulação elétrica produziu resposta contrátil dependente da frequência em musculatura lisa prostática de ambos os grupos. No grupo L-NAME, notou-se aumento significativo da contração nas frequências mais baixas (1-4 Hz), como mostrado na Figura 7 e 8.

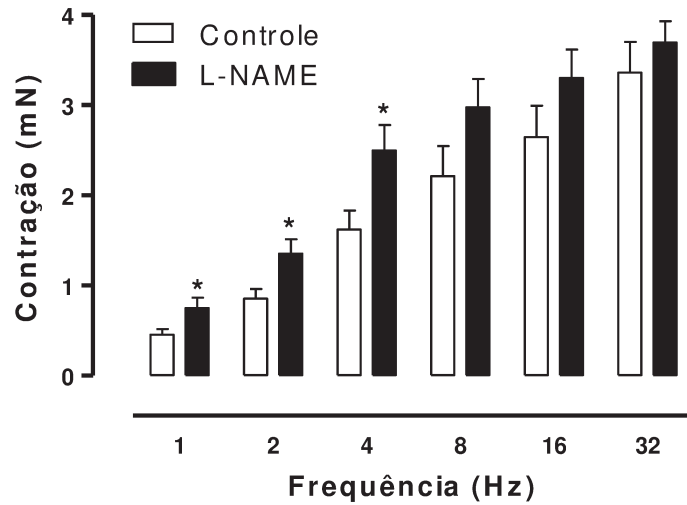


Figura 7. Curva frequência-resposta à estimulação elétrica (1 – 32 Hz) em musculatura lisa prostática de ratos tratados cronicamente com L-NAME. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 7-9 animais. * $P < 0.05$, comparado com os respectivos valores do grupo controle.

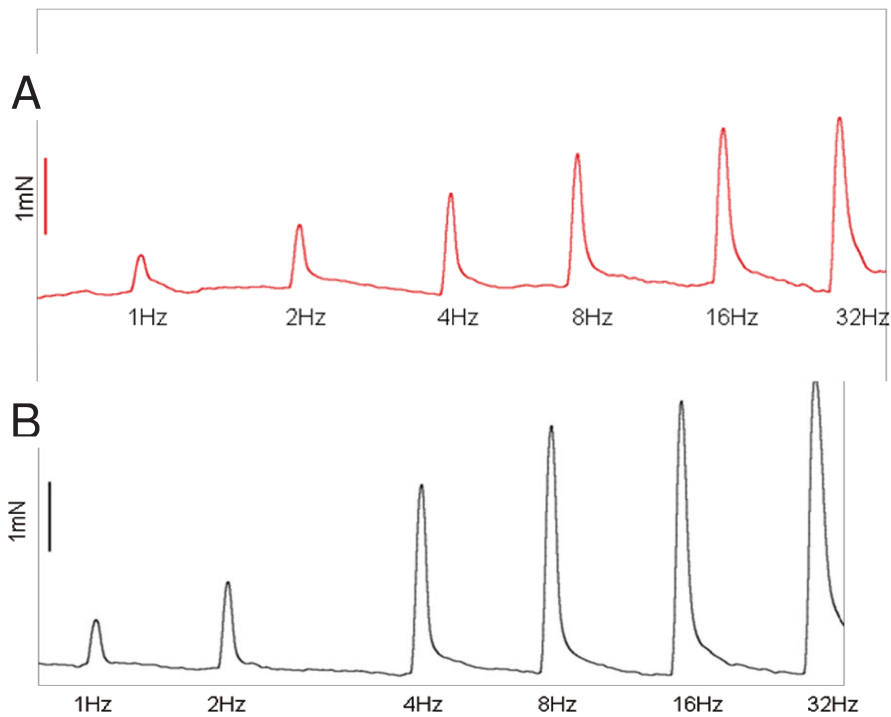


Figura 8: Ilustração representativa da estimulação elétrica na MLP de animal controle (A) e tratado cronicamente com L-NAME (B).

3.6. Efeito do L-NAME sobre as respostas relaxantes ao isoproterenol, Y27632 e nitroprussiato de sódio (SNP)

O isoproterenol (agonista β -adrenérgico não seletivo), Y27632 (inibidor da rho-quinase) e o SNP (doador de NO) produziram relaxamentos dependentes da concentração em MLP de ratos tratados cronicamente com L-NAME e controles. A resposta máxima (E_{max}) foi menor no grupo L-NAME para o isoproterenol (Figura 8A), não se observando diferenças significativas para o SNP e Y27632 entre os grupos (Figura 8B e C; Tabela 3). O tratamento prévio da preparação com o ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel; 10 μ M) reduziu significativamente ($P < 0,001$) o relaxamento induzido pelo SNP, como esperado (Figura 8C). O tratamento com L-NAME não modificou a potência (pEC_{50}) para nenhum agonista (Tabela 3).

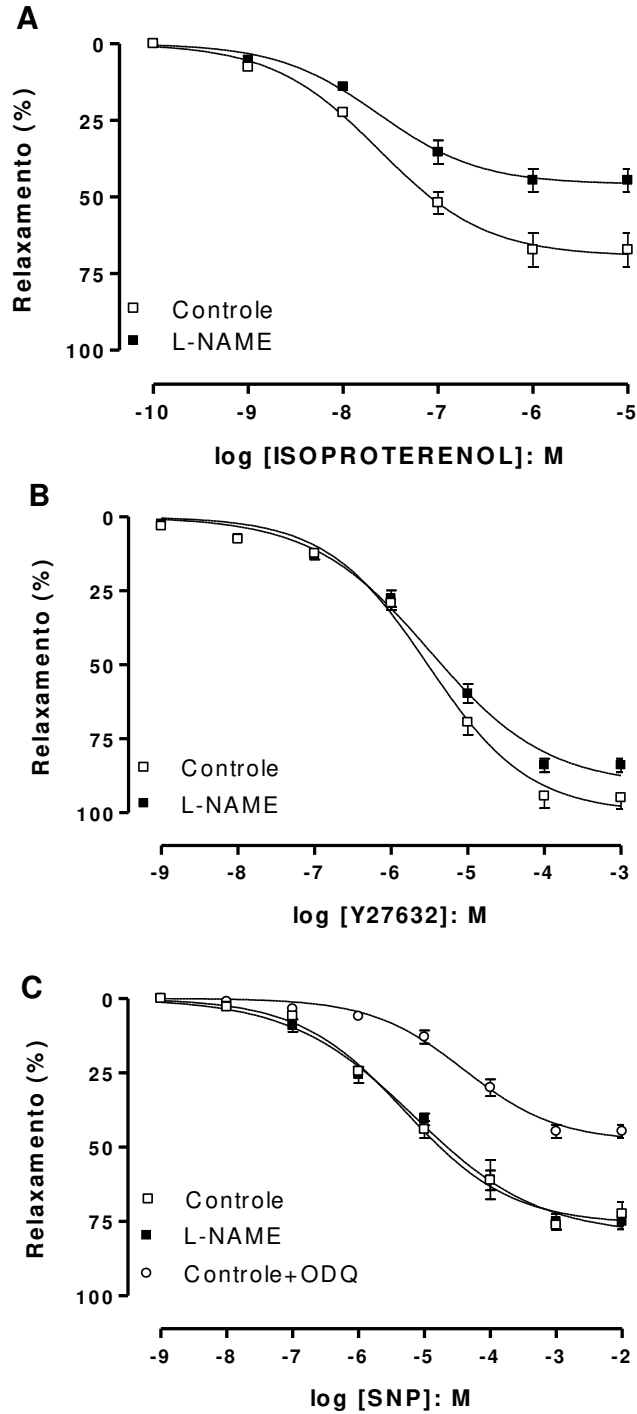


Figura 9. Curva concentração-efeito ao isoproterenol (A), Y27632 (B) e nitroprussiato de sódio (SNP; C) em musculatura lisa prostática de ratos tratados cronicamente com L-NAME. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5-12 animais.

Tabela 3. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) obtidos de curvas concentração-resposta ao isoproterenol, Y27632 e nitroprussiato de sódio (SNP) em musculatura lisa prostática de ratos tratados cronicamente com L-NAME e controle.

Agonista/Grupo	pEC_{50}	E_{max} (%)
<i>Isoproterenol</i>		
Controle	7,62 ± 0,06	67,3 ± 5,56
L-NAME	7,62 ± 0,08	44,6 ± 3,75*
<i>Y27632</i>		
Controle	5,52 ± 0,12	95,0 ± 3,76
L-NAME	5,52 ± 0,15	84,1 ± 2,32
<i>SNP</i>		
Controle	5,27 ± 0,12	72,6 ± 4
L-NAME	5,14 ± 0,11	75,1 ± 2,58
Controle+ODQ	4,39 ± 0,14*	44,8 ± 2,2**

Os dados representam a média ± erro padrão da média de 5-12 animais. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo controle.

3.7. Papel da rho-quinase na hipercontratilidade da musculatura lisa prostática à fenilefrina e carbacol em ratos tratados com L-NAME

Curvas concentração-resposta à fenilefrina e carbacol foram realizadas na presença do inibidor da rho-quinase, Y27632 (1 μ M). Este inibidor reduziu significativamente a potência à fenilefrina para os animais do grupo controle e L-

NAME, deslocando em 4,3 e 7,9 vezes, respectivamente, a curva para a direita (Tabela 4; Figura 9). A resposta máxima à fenilefrina no grupo controle não foi modificada pelo Y27632; entretanto, este inibidor reduziu significativamente a Emax do grupo L-NAME (Figura 9A).

Na curva concentração-resposta ao carbacol, notamos que o Y27632 reduziu a pEC_{50} do grupo L-NAME (deslocamento de 3,9 vezes), sem modificar os valores do grupo controle (Tabela 4). Quanto à Emax para o carbacol, notamos que o Y27632 reduziu a hipercontratilidade do grupo L-NAME sem alterar estatisticamente esse parâmetro no grupo controle (Figura 9).

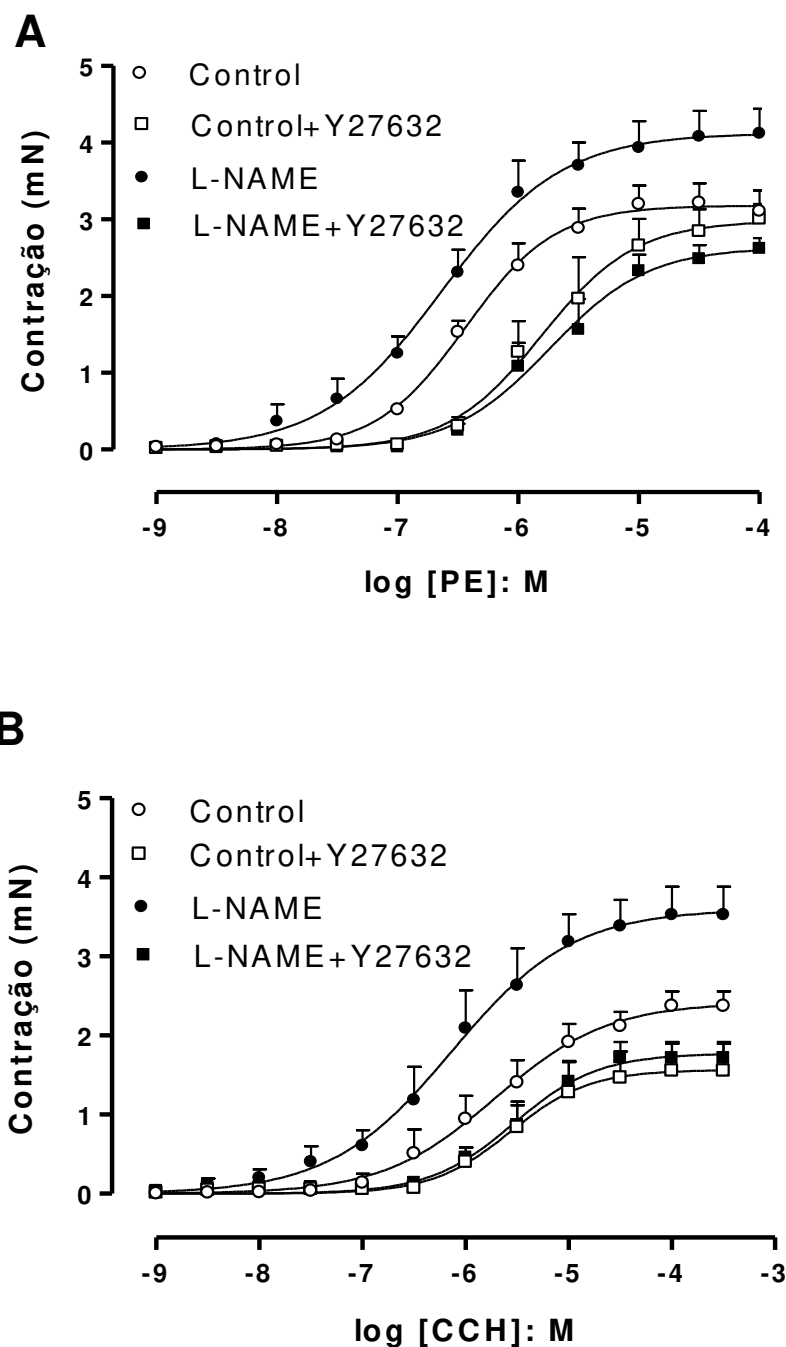


Figura 10. Curva concentração-efeito em musculatura lisa prostática de ratos tratados com L-NAME e controle. Contração à fenilefrina (PE; 1 nM – 100 μ M; A) e ao carbacol (CCh; 1 nM – 300 μ M; B) na presença e ausência de Y27632. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5-12 animais.

Tabela 4. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) obtidos de curvas concentração-efeito à fenilefrina e ao carbacol na presença e ausência do Y27632 (1 μ M) em musculatura lisa prostática de ratos tratados cronicamente com L-NAME.

Agonista/Grupo	pEC_{50}	E_{max} (mN)
<i>Fenilefrina</i>		
Controle	6,43 \pm 0,06	3,10 \pm 0,27
Controle+Y27632	5,80 \pm 0,11***	3,00 \pm 0,19
L-NAME	6,63 \pm 0,09	4,12 \pm 0,32*
L-NAME+Y27632	5,73 \pm 0,10###	2,61 \pm 0,13##
<i>Carbacol</i>		
Controle	5,71 \pm 0,13	2,37 \pm 0,18
Controle+Y27632	5,56 \pm 0,17	1,55 \pm 0,34
L-NAME	6,13 \pm 0,15	3,52 \pm 0,35*
L-NAME+Y27632	5,53 \pm 0,11#	1,71 \pm 0,20##

Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5-6 animais. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado com o grupo controle, # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ comparado com o grupo L-NAME.

3.8. Níveis intracelulares de AMPc e GMPc em tecido prostático

Os níveis basais de AMPc não diferiram entre si nos grupos controle e L-NAME. No grupo controle, a incubação da próstata com isoproterenol (1 μ M) aumentou significativamente a concentração intracelular de AMPc em relação ao basal (Figura 10A; $P < 0,001$). No grupo L-NAME, os níveis de AMPc em tecido

estimulado pelo isoproterenol foram significativamente menores do que o grupo controle. Como esperado, o SQ 22536 (100 μ M) inibiu a produção de AMPc frente à estimulação com isoproterenol em ambos os grupos experimentais.

Os níveis de GMPc basal na próstata foram menores no grupo L-NAME (Figura 10B).

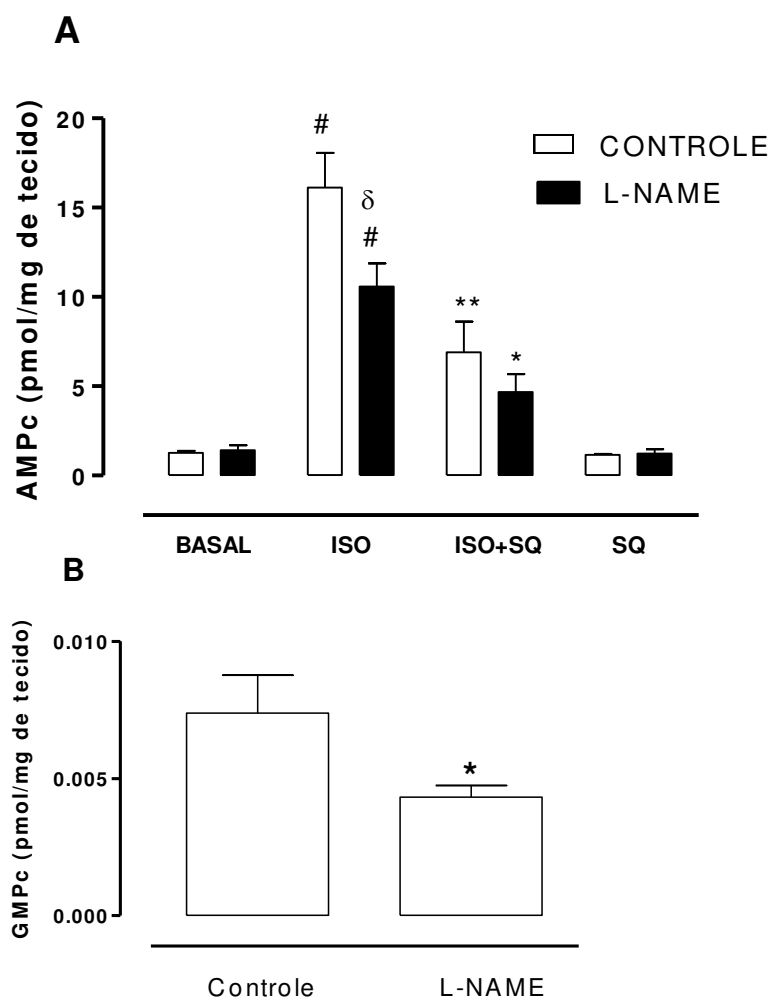


Figura 11. Níveis de AMPc e GMPc em próstata de ratos controles e tratados cronicamente com L-NAME. **A.** Os tecidos foram estimulados por 4 minutos com isoproterenol (ISO, 1 μ M). **B.** Nível basal de GMPc. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 3 animais. #P<0,001 comparado com os respectivos níveis basais; δ P<0,05 comparado com o respectivo controle; * P<0,05 e ** P<0,001 comparado com os respectivos controles na ausência de SQ22536.

3.9. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO)

O tratamento crônico com L-NAME não alterou os níveis prostáticos basais de ERO em relação ao grupo controle (Figura 11).

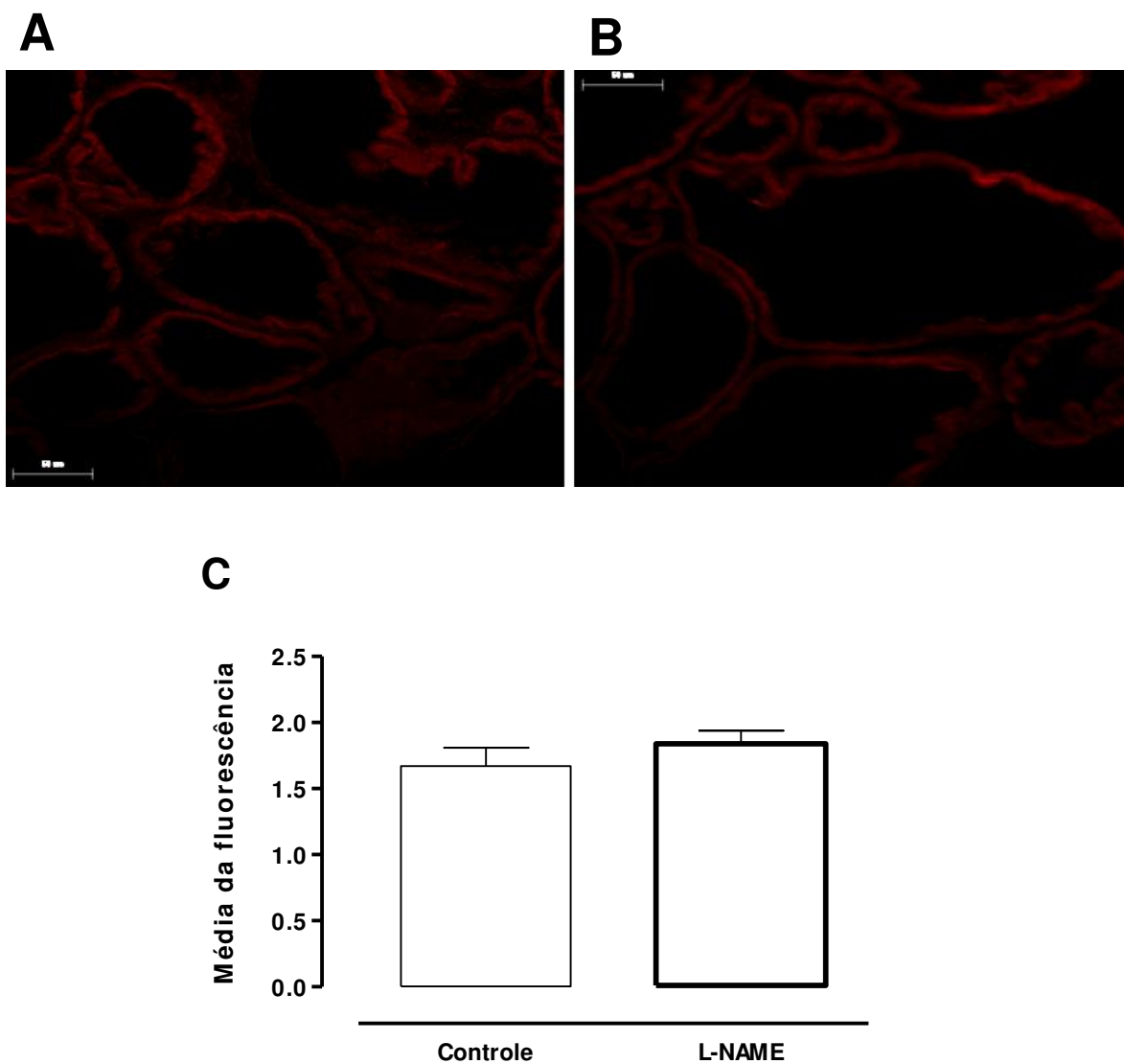


Figura 12. Determinação de ERO em próstata de ratos controles (A) e tratados cronicamente com L-NAME (B). Os dados representam média \pm erro padrão da média de 4 animais (C).

4. DISCUSSÃO

Esse trabalho mostrou pela primeira vez que a deficiência crônica de NO na próstata de ratos leva a aumento em seu peso relativo, alterações histomorfométricas como aumento na área epitelial média e muscular lisa e diminuição no índice de contorno dos ácinos. Além disso, a deficiência crônica de NO promove aumento na resposta contrátil à fenilefrina, carbacol e ao α,β -metileno ATP, bem como na contração neurogênica. Foi observado também redução no relaxamento da MLP ao isoproterenol com conseqüente diminuição nos níveis de AMPc.

Alterações na próstata, como a HPB, vem sendo relacionadas a algumas alterações do baixo trato urinário devido à obstrução da uretra e base da bexiga. Clinicamente, essas alterações podem levar aos sintomas do baixo trato urinário (LUTS), caracterizados por hiperatividade de bexiga, sintomas de urgência miccional com ou sem incontinência, noctúria e aumento na frequência miccional.⁸⁸ A hiperatividade de bexiga é considerada de causa multifatorial, incluindo hipertensão, diabetes, obesidade e ausência de NO.⁸⁹⁻⁹²

O NO exerce um papel fundamental na fisiopatologia em diversos tecidos do organismo, mas na próstata, seu papel ainda permanece pouco explorado. Sendo assim, inicialmente realizamos ensaios funcionais para avaliar a influência da ausência crônica de NO nas respostas contráteis da MLP frente à fenilefrina, carbacol e ao α,β -metileno ATP. Nossos resultados mostraram que a inibição crônica de NO leva a aumento na resposta máxima para os três agonistas citados acima, com aumento na potência apenas para o carbacol. A adição *in vitro* de L-NAME (100 μ M) à preparação não gerou alterações na reatividade da MLP

confirmando estudos anteriores.^{85,86} Isto indica que apenas a ausência crônica do NO é que resulta na hipercontratibilidade da musculatura lisa prostática. O remodelamento vascular e cardíaco pelo bloqueio do NO em ratos são evidentes pelo uso diário e prolongado do L-NAME.^{93,94} O uso crônico (mas não agudo) de L-NAME evoca bexiga hiperativa.⁹⁵

Está bem estabelecido que o sistema nervoso simpático, por meio da ativação dos receptores α_1 adrenérgicos pós-sinápticos, é o principal responsável pela contração da MLP na maioria das espécies.³ A próstata também apresenta fibras colinérgicas, as quais liberam ACh como principal neurotransmissor. A ACh age sinergicamente com a noradrenalina e o ATP para promover a contração da MLP. O receptor muscarínico M_3 é o principal responsável pela contração colinérgica em ratos e cães⁹⁶, enquanto o subtipo M_1 mostra-se presente em maior quantidade na próstata humana.³⁶ Todos esses três receptores, M_1 , M_3 e α_1 , são acoplados à proteína G e exercem sua sinalização intracelular através da hidrólise do PIP_2 da membrana celular, dando origem aos segundos mensageiros IP_3 e DAG. Além disso, a estimulação desses receptores leva à ativação de uma importante via responsável pela sensibilização celular ao cálcio, a rho-quinase.⁹⁷ Essa via é responsável pela regulação na reatividade da MLCP na musculatura lisa de diversos órgãos e sistemas, incluindo o baixo trato urinário, corpo cavernoso e próstata.^{98,99} Proteínas fundamentais para o correto funcionamento dessa via já foram identificadas em próstata de ratos utilizando técnica de imunohistoquímica e western blotting.¹⁰⁰ Além disso, alguns estudos mostram a existência de um antagonismo funcional entre a via da rho-quinase e a do

NO.^{101,102} O NO é capaz de inibir a via da rho-quinase pela fosforilação do resíduo serina 188 e consequente inibição da rhoA, proteína importante para a ativação dessa via.^{103,104} No presente estudo, o inibidor seletivo da rho-quinase, Y27632, restaurou ao nível controle a contração induzida pela fenilefrina e carbacol nos animais tratados cronicamente com L-NAME. Esse achado sugere que a via da rho-quinase participa ativamente no processo contrátil nos animais deficientes de NO, achado este consistente com estudos prévios na literatura realizados com outros tipos de musculatura lisa.¹⁰⁵ O aumento da resposta contrátil frente ao agonista purinérgico, α,β -metileno ATP, pode também estar relacionado à rho-quinase. Esse agonista ao ativar os receptores purinérgicos P2X, promove aumento nos níveis intracelulares de cálcio o qual pode, segundo estudos realizados em bexiga e uretra, levar a ativação da via da rho-quinase.^{49,106,107}

A contração neurogênica na próstata reflete parcialmente a liberação de noradrenalina/ATP e ACh de fibras adrenérgicas e colinérgicas, respectivamente.^{5,20,35} A noradrenalina é o principal neurotransmissor adrenérgico responsável pela contração da MLP em diversas espécies.³¹ Em humanos, a próstata expressa três subtipos diferentes de receptores α_1 adrenérgico ($\alpha_{1A,B}$ e D) sendo que o α_{1A} é predominante e o principal responsável pela resposta contrátil prostática.¹⁰⁸ A estimulação crônica desses receptores, tanto pelo aumento na liberação de noradrenalina, quanto por administração exógena de agonistas levam a alterações histológicas na próstata.^{109,110} O sistema parassimpático também atua no funcionamento da próstata em diversas espécies. A estimulação do nervo pélvico, o qual inerva principalmente o estroma prostático, leva à liberação de

ACh. Esse neurotransmissor atua via receptores muscarínicos e exerce diversas funções como contração e crescimento prostático, além de alterações nos níveis intracelulares de cálcio e AMPc.³⁶ Em nosso estudo, o estímulo elétrico de campo induziu contrações da MLP, mostrando-se maior nos animais tratados com L-NAME. Estudos prévios relatam a modulação da liberação de noradrenalina pelo NO em diferentes tecidos.^{111,112} O NO endógeno ou exógeno pode diminuir a liberação de noradrenalina dos neurônios simpáticos. É possível, que o aumento da contração neurogênica observada no grupo L-NAME seja resultado do aumento na liberação de noradrenalina devido à ausência prolongada de NO.

O relaxamento da MLP é mediado por receptores β -adrenérgicos e pela via do NO/GMPc. Essas vias contribuem para o correto funcionamento da próstata e a manutenção do tônus basal fisiológico. Estudos mostram a presença de RNAm para receptores β_2 e β_3 -adrenérgicos na próstata de ratos e humanos respectivamente.^{9,113} Em nosso estudo, o isoproterenol produziu relaxamento concentração-dependente da MLP indicando uma importância funcional para o receptor β -adrenérgico na próstata de ratos, o que corrobora com estudos prévios.¹¹⁴ A resposta relaxante ao isoproterenol foi significativamente menor na MLP de ratos do grupo L-NAME em comparação ao grupo controle. A via de sinalização intracelular da ativação dos receptores β -adrenérgicos inclui a ativação da adenilato ciclase com consequente formação de AMPc.¹¹⁵ No grupo L-NAME, após estimulação do tecido prostático com isoproterenol, obtivemos níveis de AMPc significativamente menores do que o grupo controle, confirmando que distúrbios da via adenilato ciclase-AMPc contribuem para as alterações

prostáticas. Além disso, é possível que o aumento nas contrações neurogênicas reflita um aumento na liberação de noradrenalina e possa estar associado à diminuição nos níveis de AMPc, uma vez que estudos realizados em próstata humana mostraram que a ativação de receptores α_1 -adrenérgico leva à fosforilação dos receptores β -adrenérgico com consequente dessensibilização dos mesmos.^{116,117}

O NO regula a proliferação e diferenciação da musculatura lisa, onde atua como inibidor desse processo.¹¹⁷ A ausência da nNOS leva a hipertrofia da camada muscular lisa na bexiga além de hiperatividade.⁸⁹ Além disso, evidências sugerem uma alteração da via NO/GMPc em pacientes com HPB. Inibidores da PDE5 vêm sendo utilizados com sucesso na clínica para o tratamento da HPB por aumentar os níveis de GMPc, com consequente diminuição no tônus basal prostático e inibição na proliferação celular.^{16,118-120} Em nosso estudo, o relaxamento da MLP frente ao SNP não se apresentou alterado entre os grupos, sugerindo que o bloqueio crônico de NO não altera a maquinaria intracelular de ativação da GCs.

O sistema oxidante/antioxidante fisiológico exerce um papel importante na regulação dos níveis intracelulares de NO. O desbalanço nesse sistema pode levar ao aumento na produção de ERO, podendo gerar dano celular como resultado ao estresse oxidativo.¹²¹ Estudos mostram aumento das ERO associado à disfunção erétil e hiperatividade de bexiga em modelos animais.¹²²⁻¹²⁴ Além disso, corpo cavernoso de ratos tratados cronicamente com L-NAME exibem aumento na expressão gênica da subunidade gp91^{phox} da NADPH oxidase, uma enzima

importante na produção de ERO.¹²⁵ No presente estudo, não foi observado diferenças significativas nos níveis de ERO entre os grupos, mostrando que o tratamento crônico com L-NAME não altera esses níveis basais na próstata.

Em resumo, ratos tratados cronicamente com L-NAME apresentam aumento no peso relativo da próstata com alterações no índice de contorno e na área epitelial média e muscular lisa. Além disso, a contração da MLP dos animais tratados com L-NAME foi maior em relação ao controle para fenilefrina, carbacol, α,β -metileno ATP e EFS, bem como uma diminuição ao relaxamento β -adrenérgico. A inibição da via da rho-quinase pelo Y27632, restaurou a contração ao nível do controle, sugerindo um aumento na participação dessa via no processo contrátil.

5. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

➤ O tratamento crônico com L-NAME aumentou significativamente o peso relativo e seco da próstata, promoveu alterações histomorfométricas como aumento da área epitelial e muscular lisa e redução no índice de contorno dos ácinos;

➤ As respostas contráteis induzidas pela fenilefrina, carbacol, α,β -metileno ATP e estimulação elétrica mostraram-se maiores nos animais do grupo L-NAME, ao passo que as respostas relaxantes à isoprenalina mostraram-se menores neste grupo experimental;

➤ O relaxamento da musculatura lisa prostática (MLP) induzido pelo nitroprussiato de sódio e pelo Y27632 não foi modificado pelo tratamento com L-NAME;

➤ A inibição da via da rho-quinase normalizou a hipercontratibilidade para a fenilefrina e carbacol nos animais tratados com L-NAME;

➤ Os níveis de AMPc e GMPc na próstata dos animais tratados com L-NAME foram significativamente menores do que nos animais controles;

➤ O tratamento com L-NAME não promoveu alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio na próstata dos animais;

➤ Em conclusão, nossos dados mostram que a deficiência crônica de NO gera alterações funcionais, bioquímicas e morfológicas em próstata de ratos com participação da via da rho-quinase nesse processo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hayward, S.W. & Cunha, G.R. The prostate: development and physiology. **Radiologic clinics of North America** 38, 1-14 (2000).
2. Farnsworth, W.E. Prostate stroma: physiology. **The Prostate** 38, 60-72 (1999).
3. Michel, M.C. & Vrydag, W. Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. **British journal of pharmacology** 147 Suppl 2, S88-119 (2006).
4. Saito, M., Kazuyama, E., Shimizu, S., Dimitriadis, F., Kinoshita, Y., Masuda, E., Yamada, S. & Satoh, K. Muscarinic receptors and their mRNAs in type 2 Goto-Kakizaki diabetic rat prostate. **The Prostate** 70, 1533-1539 (2010).
5. Ventura, S., Dewalagama, R.K. & Lau, L.C. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is an excitatory cotransmitter with noradrenaline to the smooth muscle of the rat prostate gland. **British journal of pharmacology** 138, 1277-1284 (2003).
6. Buljubasich, R. & Ventura, S. Adenosine 5'-triphosphate and noradrenaline are excitatory cotransmitters to the fibromuscular stroma of the guinea pig prostate gland. **Eur J Pharmacol** 499, 335-344 (2004).
7. Longhurst, P.A., Schwegel, T., Folander, K. & Swanson, R. The human P2x1 receptor: molecular cloning, tissue distribution, and localization to chromosome 17. **Biochimica et biophysica acta** 1308, 185-188 (1996).
8. Konrad, L., Schiemann, P., Renneberg, H., Wennemuth, G., Fini, C. & Aumuller, G. Expression and enzymic activity of ecto 5'-nucleotidase in the human male genital tract. **Biology of reproduction** 59, 190-196 (1998).
9. Collins, S., Quarmby, V.E., French, F.S., Lefkowitz, R.J. & Caron, M.G. Regulation of the beta 2-adrenergic receptor and its mRNA in the rat ventral prostate by testosterone. **FEBS letters** 233, 173-176 (1988).
10. Berkowitz, D.E., Nardone, N.A., Smiley, R.M., Price, D.T., Kreutter, D.K., Fremeau, R.T. & Schwinn, D.A. Distribution of beta 3-adrenoceptor mRNA in human tissues. **Eur J Pharmacol** 289, 223-228 (1995).
11. Chamberlain, P.D., Jennings, K.H., Paul, F., Cordell, J., Berry, A., Holmes, S.D., Park, J., Chambers, J., Sennitt, M.V., Stock, M.J., Cawthorne, M.A., Young, P.W. & Murphy, G.J. The tissue distribution of the human beta3-adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: direct evidence of the beta3-adrenoceptor in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle. **Int J Obes Relat Metab Disord** 23, 1057-1065 (1999).

12. Slater, M., Barden, J.A. & Murphy, C.R. Tyrosine kinase A, autonomic and transmitter receptors, but not innervation, are upregulated in the aging rat prostate. **Acta Histochem** 102, 427-438 (2000).
13. Di Iulio, J.L., Li, C.G. & Rand, M.J. Determination of nitric oxide synthase activity in rat, pig and rabbit prostate glands. **Eur J Pharmacol** 337, 245-249 (1997).
14. Kedia, G.T., Uckert, S., Jonas, U., Kuczyk, M.A. & Burchardt, M. The nitric oxide pathway in the human prostate: clinical implications in men with lower urinary tract symptoms. **World J Urol** 26, 603-609 (2008).
15. Hedlund, P. Nitric oxide/cGMP-mediated effects in the outflow region of the lower urinary tract--is there a basis for pharmacological targeting of cGMP? **World journal of urology** 23, 362-367 (2005).
16. Bloch, W., Klotz, T., Loch, C., Schmidt, G., Engelmann, U. & Addicks, K. Distribution of nitric oxide synthase implies a regulation of circulation, smooth muscle tone, and secretory function in the human prostate by nitric oxide. **The Prostate** 33, 1-8 (1997).
17. Lee, C.H., Akin-Olugbade, O. & Kirschenbaum, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Endocrinol Metab Clin North Am** 40, 565-575, viii-ix (2011).
18. McNeal, J.E., Bostwick, D.G., Kindrachuk, R.A., Redwine, E.A., Freiha, F.S. & Stamey, T.A. Patterns of progression in prostate cancer. **Lancet** 1, 60-63 (1986).
19. Roger, S.K. & Timothy, J.C. *Benign Prostatic Hyperplasia*, (Wolfe, Londres, 1993).
20. Pennefather, J.N., Lau, W.A., Mitchelson, F. & Ventura, S. The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. **Journal of autonomic pharmacology** 20, 193-206 (2000).
21. Harmelin, A., Danon, T., Kela, I. & Brenner, O. Biopsy of the mouse prostate. **Lab Anim** 39, 215-220 (2005).
22. Timms, B.G. Prostate development: a historical perspective. **Differentiation** 76, 565-577 (2008).
23. Vaalasti, A. & Hervonen, A. Nerve endings in the human prostate. **Am J Anat** 157, 41-47 (1980).

24. Ali, M., Johnson, I.P., Hobson, J., Mohammadi, B. & Khan, F. Anatomy of the pelvic plexus and innervation of the prostate gland. **Clin Anat** 17, 123-129 (2004).
25. Kepper, M. & Keast, J. Immunohistochemical properties and spinal connections of pelvic autonomic neurons that innervate the rat prostate gland. **Cell Tissue Res** 281, 533-542 (1995).
26. Rodrigues, A.O., Machado, M.T. & Wroclawski, E.R. Prostate innervation and local anesthesia in prostate procedures. **Revista do Hospital das Clinicas** 57, 287-292 (2002).
27. Hedlund, H., Andersson, K.E. & Larsson, B. Alpha-adrenoceptors and muscarinic receptors in the isolated human prostate. **J Urol** 134, 1291-1298 (1985).
28. Ventura, S., Oliver, V., White, C.W., Xie, J.H., Haynes, J.M. & Exintaris, B. Novel drug targets for the pharmacotherapy of benign prostatic hyperplasia (BPH). **Br J Pharmacol** 163, 891-907 (2011).
29. Nasu, K., Moriyama, N., Kawabe, K., Tsujimoto, G., Murai, M., Tanaka, T. & Yano, J. Quantification and distribution of alpha 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human prostate: comparison of benign hypertrophied tissue and non-hypertrophied tissue. **Br J Pharmacol** 119, 797-803 (1996).
30. Yono, M., Foster, H.E., Jr., Weiss, R.M. & Latifpour, J. Age related changes in the functional, biochemical and molecular properties of alpha1-adrenoceptors in the rat genitourinary tract. **The Journal of urology** 176, 1214-1219 (2006).
31. Haynes, J.M. & Ventura, S. Current models of human prostate contractility. **Clinical and experimental pharmacology & physiology** 32, 797-804 (2005).
32. Vikram, A., Jena, G.B. & Ramarao, P. Increased cell proliferation and contractility of prostate in insulin resistant rats: linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia. **Prostate** 70, 79-89 (2010).
33. Burnstock, G. P2X receptors in sensory neurones. **British journal of anaesthesia** 84, 476-488 (2000).
34. Magni, G. & Ceruti, S. P2Y purinergic receptors: new targets for analgesic and antimigraine drugs. **Biochemical pharmacology** 85, 466-477 (2013).

35. White, C.W., Short, J.L., Haynes, J.M., Evans, R.J. & Ventura, S. The residual nonadrenergic contractile response to nerve stimulation of the mouse prostate is mediated by acetylcholine but not ATP in a comparison with the mouse vas deferens. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics** 335, 489-496 (2010).
36. Witte, L.P., Chapple, C.R., de la Rosette, J.J. & Michel, M.C. Cholinergic innervation and muscarinic receptors in the human prostate. **Eur Urol** 54, 326-334 (2008).
37. Crowe, R., Chapple, C.R. & Burnstock, G. The human prostate gland: a histochemical and immunohistochemical study of neuropeptides, serotonin, dopamine beta-hydroxylase and acetylcholinesterase in autonomic nerves and ganglia. **British journal of urology** 68, 53-61 (1991).
38. Caine, M., Raz, S. & Zeigler, M. Adrenergic and cholinergic receptors in the human prostate, prostatic capsule and bladder neck. **British journal of urology** 47, 193-202 (1975).
39. Gup, D.I., Shapiro, E., Baumann, M. & Lepor, H. Contractile properties of human prostate adenomas and the development of infravesical obstruction. **The Prostate** 15, 105-114 (1989).
40. Aaltoma, S.H., Lipponen, P.K. & Kosma, V.M. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer. **Anticancer research** 21, 3101-3106 (2001).
41. Heppner, T.J., Herrera, G.M., Bonev, A.D., Hill-Eubanks, D. & Nelson, M.T. Ca²⁺ sparks and K(Ca) channels: novel mechanisms to relax urinary bladder smooth muscle. **Advances in experimental medicine and biology** 539, 347-357 (2003).
42. Christ, G. & Wingard, C. Calcium sensitization as a pharmacological target in vascular smooth-muscle regulation. **Curr Opin Investig Drugs** 6, 920-933 (2005).
43. Somlyo, A.P. & Somlyo, A.V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **The Journal of physiology** 522 Pt 2, 177-185 (2000).
44. Morgan, K.G. & Gangopadhyay, S.S. Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins. **J Appl Physiol** 91, 953-962 (2001).

45. de Godoy, M.A. & Rattan, S. Role of rho kinase in the functional and dysfunctional tonic smooth muscles. **Trends in pharmacological sciences** 32, 384-393 (2011).
46. Woodsome, T.P., Polzin, A., Kitazawa, K., Eto, M. & Kitazawa, T. Agonist- and depolarization-induced signals for myosin light chain phosphorylation and force generation of cultured vascular smooth muscle cells. **Journal of cell science** 119, 1769-1780 (2006).
47. Bregeon, J., Loirand, G., Pacaud, P. & Rolli-Derkinderen, M. Angiotensin II induces RhoA activation through SHP2-dependent dephosphorylation of the RhoGAP p190A in vascular smooth muscle cells. **American journal of physiology. Cell physiology** 297, C1062-1070 (2009).
48. Arner, A. & Pfitzer, G. Regulation of cross-bridge cycling by Ca²⁺ in smooth muscle. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology** 134, 63-146 (1999).
49. Sakurada, S., Takuwa, N., Sugimoto, N., Wang, Y., Seto, M., Sasaki, Y. & Takuwa, Y. Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. **Circulation research** 93, 548-556 (2003).
50. Takahashi, N., Tuiki, H., Saya, H. & Kaibuchi, K. Localization of the gene coding for ROCK II/Rho kinase on human chromosome 2p24. **Genomics** 55, 235-237 (1999).
51. Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. & Narumiya, S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. **FEBS letters** 392, 189-193 (1996).
52. Wirth, A. Rho kinase and hypertension. **Biochimica et biophysica acta** 1802, 1276-1284 (2010).
53. Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Kaibuchi, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science** 273, 245-248 (1996).
54. Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P. & Brautigan, D.L. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. **The Journal of biological chemistry** 275, 9897-9900 (2000).

55. Shao, J., Welch, W.J., Diprospero, N.A. & Diamond, M.I. Phosphorylation of profilin by ROCK1 regulates polyglutamine aggregation. **Molecular and cellular biology** 28, 5196-5208 (2008).
56. Li, Z., Dong, X., Wang, Z., Liu, W., Deng, N., Ding, Y., Tang, L., Hla, T., Zeng, R., Li, L. & Wu, D. Regulation of PTEN by Rho small GTPases. **Nature cell biology** 7, 399-404 (2005).
57. Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M. & Kaibuchi, K. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. **The Journal of cell biology** 147, 1023-1038 (1999).
58. Asano, M. & Nomura, Y. Comparison of inhibitory effects of Y-27632, a Rho kinase inhibitor, in strips of small and large mesenteric arteries from spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension** 26, 97-106 (2003).
59. Chrissobolis, S. & Sobey, C.G. Evidence that Rho-kinase activity contributes to cerebral vascular tone in vivo and is enhanced during chronic hypertension: comparison with protein kinase C. **Circulation research** 88, 774-779 (2001).
60. Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. & Schlossmann, J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. **Physiological reviews** 86, 1-23 (2006).
61. Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288, 373-376 (1980).
62. Palmer, R.M., Ferrige, A.G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** 327, 524-526 (1987).
63. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. & Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 84, 9265-9269 (1987).

64. 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 of the United States of America** 88, 2166-2170 (1991).
65. Stuehr, D.J. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. **The Journal of nutrition** 134, 2748S-2751S; discussion 2765S-2767S (2004).
66. Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P. & Waldman, S.A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological reviews** 52, 375-414 (2000).
67. Hofmann, F., Bernhard, D., Lukowski, R. & Weinmeister, P. cGMP regulated protein kinases (cGK). **Handbook of experimental pharmacology**, 137-162 (2009).
68. Soderling, S.H. & Beavo, J.A. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. **Current opinion in cell biology** 12, 174-179 (2000).
69. Uckert, S., Kuthe, A., Jonas, U. & Stief, C.G. Characterization and functional relevance of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes of the human prostate. **The Journal of urology** 166, 2484-2490 (2001).
70. Qiu, Y., Kraft, P., Craig, E.C., Liu, X. & Haynes-Johnson, D. Identification and functional study of phosphodiesterases in rat urinary bladder. **Urological research** 29, 388-392 (2001).
71. Kuhn, R., Uckert, S., Stief, C.G., Truss, M.C., Lietz, B., Bischoff, E., Schramm, M. & Jonas, U. Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide-dependent pathways. **Urological research** 28, 110-115 (2000).
72. Gradini, R., Realacci, M., Ginepri, A., Naso, G., Santangelo, C., Cela, O., Sale, P., Berardi, A., Petrangeli, E., Gallucci, M., Di Silverio, F. & Russo, M.A. Nitric oxide synthases in normal and benign hyperplastic human prostate: immunohistochemistry and molecular biology. **The Journal of pathology** 189, 224-229 (1999).
73. Burnett, A.L., Maguire, M.P., Chamness, S.L., Ricker, D.D., Takeda, M., Lepor, H. & Chang, T.S. Characterization and localization of nitric oxide synthase in the human prostate. **Urology** 45, 435-439 (1995).

74. McVary, K. Lower urinary tract symptoms and sexual dysfunction: epidemiology and pathophysiology. **BJU international** 97 Suppl 2, 23-28; discussion 44-25 (2006).
75. Kang, K.K., Kim, J.M., Yu, J.Y., Ahn, B.O., Yoo, M. & Kim, Y.C. Effects of phosphodiesterase type 5 inhibitor on the contractility of prostate tissues and urethral pressure responses in a rat model of benign prostate hyperplasia. **International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association** 14, 946-951; discussion 951 (2007).
76. Dey, A., Lang, R.J. & Exintaris, B. Nitric oxide signaling pathways involved in the inhibition of spontaneous activity in the guinea pig prostate. **The Journal of urology** 187, 2254-2260 (2012).
77. Takeda, M., Tang, R., Shapiro, E., Burnett, A.L. & Lepor, H. Effects of nitric oxide on human and canine prostates. **Urology** 45, 440-446 (1995).
78. Uckert, S., Sormes, M., Kedia, G., Scheller, F., Knapp, W.H., Jonas, U. & Stief, C.G. Effects of phosphodiesterase inhibitors on tension induced by norepinephrine and accumulation of cyclic nucleotides in isolated human prostatic tissue. **Urology** 71, 526-530 (2008).
79. Giuliano, F., Uckert, S., Maggi, M., Birder, L., Kissel, J. & Viktrup, L. The mechanism of action of phosphodiesterase type 5 inhibitors in the treatment of lower urinary tract symptoms related to benign prostatic hyperplasia. **European urology** 63, 506-516 (2013).
80. Mirone, V., Sessa, A., Giuliano, F., Berges, R., Kirby, M. & Moncada, I. Current benign prostatic hyperplasia treatment: impact on sexual function and management of related sexual adverse events. **International journal of clinical practice** 65, 1005-1013 (2011).
81. Fukumura, D., Kashiwagi, S. & Jain, R.K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nature reviews. Cancer** 6, 521-534 (2006).
82. Wang, D., Lu, S. & Dong, Z. Regulation of TGF-beta1 gene transcription in human prostate cancer cells by nitric oxide. **The Prostate** 67, 1825-1833 (2007).
83. Huerta-Yepez, S., Vega, M., Jazirehi, A., Garban, H., Hongo, F., Cheng, G. & Bonavida, B. Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-kappa B and inhibition of Bcl-xl expression. **Oncogene** 23, 4993-5003 (2004).

84. Uotila, P., Valve, E., Martikainen, P., Nevalainen, M., Nurmi, M. & Harkonen, P. Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human prostate cancer. **Urological research** 29, 23-28 (2001).
85. Najbar-Kaszkiel, A.T., Di Iulio, J.L., Li, C.G. & Rand, M.J. Characterisation of excitatory and inhibitory transmitter systems in prostate glands of rats, guinea pigs, rabbits and pigs. **European journal of pharmacology** 337, 251-258 (1997).
86. Ventura, S., Lau, W.A., Buljubasich, S. & Pennefather, J.N. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) inhibits contractions of the prostatic stroma of the rat but not the guinea-pig. **Regulatory peptides** 91, 63-73 (2000).
87. Ribeiro, M.O., Antunes, E., de Nucci, G., Lovisollo, S.M. & Zatz, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension** 20, 298-303 (1992).
88. Andersson, K.E. LUTS treatment: future treatment options. **Neurourology and urodynamics** 26, 934-947 (2007).
89. Burnett, A.L., Calvin, D.C., Chamness, S.L., Liu, J.X., Nelson, R.J., Klein, S.L., Dawson, V.L., Dawson, T.M. & 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** 3, 571-574 (1997).
90. Jin, L.H., Andersson, K.E., Kwon, Y.H., Park, C.S., Yoon, S.M. & Lee, T. Substantial detrusor overactivity in conscious spontaneously hypertensive rats with hyperactive behaviour. **Scandinavian journal of urology and nephrology** 43, 3-7 (2009).
91. Rahman, N.U., Phonsombat, S., Bochinski, D., Carrion, R.E., Nunes, L. & Lue, T.F. An animal model to study lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction: the hyperlipidaemic rat. **BJU international** 100, 658-663 (2007).
92. Pandita, R.K., Mizusawa, H. & Andersson, K.E. Intravesical oxyhemoglobin initiates bladder overactivity in conscious, normal rats. **The Journal of urology** 164, 545-550 (2000).
93. Moreno, H., Jr., Metze, K., Bento, A.C., Antunes, E., Zatz, R. & de Nucci, G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. **Basic research in cardiology** 91, 248-255 (1996).

94. Numaguchi, K., Egashira, K., Takemoto, M., Kadokami, T., Shimokawa, H., Sueishi, K. & Takeshita, A. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. **Hypertension** 26, 957-962 (1995).
95. Monica, F.Z., Bricola, A.A., Bau, F.R., Freitas, L.L., Teixeira, S.A., Muscara, M.N., Abdalla, F.M., Porto, C.S., De Nucci, G., Zanesco, A. & Antunes, E. Long-term nitric oxide deficiency causes muscarinic supersensitivity and reduces beta(3)-adrenoceptor-mediated relaxation, causing rat detrusor overactivity. **British journal of pharmacology** 153, 1659-1668 (2008).
96. Ventura, S., Pennefather, J. & Mitchelson, F. Cholinergic innervation and function in the prostate gland. **Pharmacology & therapeutics** 94, 93-112 (2002).
97. Lee, D.L., Webb, R.C. & Jin, L. Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature. **Hypertension** 44, 796-799 (2004).
98. Takahashi, R., Nishimura, J., Seki, N., Yunoki, T., Tomoda, T., Kanaide, H. & Naito, S. RhoA/Rho kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the contraction of human prostate. **Neurourology and urodynamics** 26, 547-551 (2007).
99. Christ, G.J. & Andersson, K.E. Rho-kinase and effects of Rho-kinase inhibition on the lower urinary tract. **Neurourology and urodynamics** 26, 948-954 (2007).
100. Saito, M., Ohmasa, F., Shomori, K., Dimitriadis, F., Ohiwa, H., Shimizu, S., Tsounapi, P., Kinoshita, Y. & Satoh, K. Rhos and Rho kinases in the rat prostate: their possible functional roles and distributions. **Molecular and cellular biochemistry** 358, 207-213 (2011).
101. Williams, J., Bogwu, J. & Oyekan, A. The role of the RhoA/Rho-kinase signaling pathway in renal vascular reactivity in endothelial nitric oxide synthase null mice. **Journal of hypertension** 24, 1429-1436 (2006).
102. Bivalacqua, T.J., Champion, H.C., Usta, M.F., Cellek, S., Chitaley, K., Webb, R.C., Lewis, R.L., Mills, T.M., Hellstrom, W.J. & Kadowitz, P.J. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 101, 9121-9126 (2004).

103. Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P. & Loirand, G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. **The Journal of biological chemistry** 275, 21722-21729 (2000).
104. Sawada, N., Itoh, H., Yamashita, J., Doi, K., Inoue, M., Masatsugu, K., Fukunaga, Y., Sakaguchi, S., Sone, M., Yamahara, K., Yurugi, T. & Nakao, K. cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. **Biochemical and biophysical research communications** 280, 798-805 (2001).
105. Priviero, F.B., Jin, L.M., Ying, Z., Teixeira, C.E. & Webb, R.C. Up-regulation of the RhoA/Rho-kinase signaling pathway in corpus cavernosum from endothelial nitric-oxide synthase (NOS), but not neuronal NOS, null mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics** 333, 184-192 (2010).
106. Lam, M., Kerr, K.P. & Exintaris, B. Involvement of rho-kinase signaling pathways in nerve evoked and spontaneous contractions of the Guinea pig prostate. **The Journal of urology** 189, 1147-1154 (2013).
107. Teixeira, C.E., Jin, L., Priviero, F.B., Ying, Z. & Webb, R.C. Comparative pharmacological analysis of Rho-kinase inhibitors and identification of molecular components of Ca²⁺ sensitization in the rat lower urinary tract. **Biochemical pharmacology** 74, 647-658 (2007).
108. Schwinn, D.A. & Roehrborn, C.G. Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms. **International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association** 15, 193-199 (2008).
109. Golomb, E., Kruglikova, A., Dvir, D., Parnes, N. & Abramovici, A. Induction of atypical prostatic hyperplasia in rats by sympathomimetic stimulation. **The Prostate** 34, 214-221 (1998).
110. Rosenzweig, N., Horodniceanu, J. & Abramovici, A. Phenylephrine-induced neurogenic prostatitis facilitates the promotion of PIN-like lesions in rats. **The Prostate** 59, 107-113 (2004).
111. Schwarz, P., Diem, R., Dun, N.J. & Forstermann, U. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. **Circulation research** 77, 841-848 (1995).

112. Greenberg, S.S., Diecke, F.P., Cantor, E., Peevy, K. & Tanaka, T.P. Inhibition of sympathetic neurotransmitter release by modulators of cyclic GMP in canine vascular smooth muscle. **European journal of pharmacology** 187, 409-423 (1990).
113. Berridge, M.J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of physiology** 586, 5047-5061 (2008).
114. Kalodimos, P.J. & Ventura, S. Beta2-adrenoceptor-mediated inhibition of field stimulation induced contractile responses of the smooth muscle of the rat prostate gland. **European journal of pharmacology** 431, 81-89 (2001).
115. Carmena, M.J., Clemente, C., Carrero, I., Solano, R.M. & Prieto, J.C. G-proteins and beta-adrenergic stimulation of adenylate cyclase activity in the diabetic rat prostate. **The Prostate** 33, 46-54 (1997).
116. Hennenberg, M., Strittmatter, F., Walther, S., Hedlund, P., Andersson, K.E., Stief, C.G., Schlenker, B. & Gratzke, C. alpha1-adrenoceptor activation induces phosphorylation of beta2-adrenoceptors in human prostate tissue. **BJU international** 108, 922-928 (2011).
117. Jeremy, J.Y., Rowe, D., Emsley, A.M. & Newby, A.C. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. **Cardiovascular research** 43, 580-594 (1999).
118. Luo, J., Dunn, T., Ewing, C., Sauvageot, J., Chen, Y., Trent, J. & Isaacs, W. Gene expression signature of benign prostatic hyperplasia revealed by cDNA microarray analysis. **The Prostate** 51, 189-200 (2002).
119. Zenzmaier, C., Kern, J., Sampson, N., Heitz, M., Plas, E., Untergasser, G. & Berger, P. Phosphodiesterase type 5 inhibition reverts prostate fibroblast-to-myofibroblast trans-differentiation. **Endocrinology** 153, 5546-5555 (2012).
120. Oelke, M., Giuliano, F., Mirone, V., Xu, L., Cox, D. & Viktrup, L. Monotherapy with tadalafil or tamsulosin similarly improved lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia in an international, randomised, parallel, placebo-controlled clinical trial. **European urology** 61, 917-925 (2012).
121. Frey, R.S., Ushio-Fukai, M. & Malik, A.B. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. **Antioxidants & redox signaling** 11, 791-810 (2009).

122. Silva, F.H., Monica, F.Z., Bau, F.R., Brugnerotto, A.F., Priviero, F.B., Toque, H.A. & Antunes, E. Superoxide anion production by NADPH oxidase plays a major role in erectile dysfunction in middle-aged rats: prevention by antioxidant therapy. **The journal of sexual medicine** 10, 960-971 (2013).
123. Masuda, H., Kihara, K., Saito, K., Matsuoka, Y., Yoshida, S., Chancellor, M.B., de Groat, W.C. & Yoshimura, N. Reactive oxygen species mediate detrusor overactivity via sensitization of afferent pathway in the bladder of anaesthetized rats. **BJU international** 101, 775-780 (2008).
124. Musicki, B., Liu, T., Lagoda, G.A., Strong, T.D., Sezen, S.F., Johnson, J.M. & Burnett, A.L. Hypercholesterolemia-induced erectile dysfunction: endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling in the mouse penis by NAD(P)H oxidase. **The journal of sexual medicine** 7, 3023-3032 (2010).
125. Claudino, M.A., Franco-Penteado, C.F., Priviero, F.B., Camargo, E.A., Teixeira, S.A., Muscara, M.N., De Nucci, G., Zanesco, A. & Antunes, E. 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** 75, 961-967 (2010).