



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas**

Michele Simões Almeida Silva

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA BEXIGA DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDAS À OBSTRUÇÃO
PARCIAL URETRAL E DEPLEÇÃO DE ÓXIDO
NÍTRICO**

**Campinas
2023**

Michele Simões Almeida Silva

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA BEXIGA DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDAS À OBSTRUÇÃO PARCIAL URETRAL E DEPLEÇÃO DE
ÓXIDO NÍTRICO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Luis Zanettini Riccetto

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MICHELE SIMÕES ALMEIDA SILVA
E ORIENTADA PELO PROF^o. DR. CASSIO LUIS ZANETTINI RICCETTO

**Campinas
2023**

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

Si51a Simões, Michele, 1992-
Alterações morfológicas na bexiga de camundongos submetidas a obstrução parcial uretral e depleção do óxido nítrico / Michele Simões Almeida Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Cássio Luis Zanettini Ricceto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bexiga urinária. 2. Obstrução ureteral. 3. Óxido nítrico. I. Ricceto, Cássio Luis Zanettini. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Morphological changes in the bladder of mice remained partial urethral reserve and nitric oxide depletion

Palavras-chave em inglês:

Urinary bladder

Ureteral obstruction

Nitric oxide

Área de concentração: Ciências da Cirurgia

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Cássio Luis Zanettini Ricceto [Orientador]

Adriano Fregonesi

José Tadeu Nunes Tamani

Luiz Carlos Maciel

Maria Cláudia Bicudo Furst

Data de defesa: 18-04-2023

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6613-6504>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1226105152868751>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MICHELE SIMÕES ALMEIDA SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Riccetto

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. Cássio Luís Zanettini Riccetto

2. PROF. DR. Adriano Fregonesi

3. PROF. DR. José Tadeu Nunes Tamanini

4. PROF. DR. Luiz Carlos Maciel

5. PROFA. DRA. Maria Cláudia Bicudo Fürst

Programa de Pós-Graduação em (Ciências da Cirurgia) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 18/04/2023

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Jorge Kenedy e Simone Simões, exemplos de amor e dedicação, que me apoiaram em todos os momentos. Ao meu irmão Jorge Kenedy Simões, pelo carinho constante. Ao Thyago Pereira, por todo amor e paciência e a minha filha Isabela Simões, que foi peça fundamental na reta final deste trabalho. Amo todos vocês.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por tornar esse momento possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas da Universidade Estadual de Campinas, agradeço pela acolhida em seu serviço, pela oportunidade de cursar o doutorado nesta instituição.

Ao Prof. Dr. Cassio Luis Zanettini Riccetto por ter me aceitado como orientanda e ter sido de grande importância na finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona e ao Prof. Dr. Wagner Fávaro pelo ensinamento e pela compreensão em todos os momentos necessários. É de fundamental importância para execução desta pesquisa.

A Dr^a. Marcy Lancia Pereira agradeço pela parceria na confecção deste trabalho.

Aos meus pais, Jorge Kenedy Almeida Silva e Simone Simões de Oliveira Silva, pelos ensinamentos, dedicação e apoio em todas as fases escolares e que nunca mediram esforços para a realização desse trabalho.

Ao meu marido, Thyago Pereira Leite de Santana, pelo apoio, torcida, pelo carinho, amor e atenção a mim dedicados.

Ao meu irmão, Jorge Kenedy Simões Almeida Silva, pelo carinho recebido.

Aos meus avós, em especial Damião Paulo Melo e Maria Lúcia Simões, que infelizmente não estarão conosco na conclusão desse curso e que me deram todo incentivo e que com certeza estariam muito felizes.

A minha filha Isabela Simões Santana, que foi peça fundamental de estímulo para finalização deste trabalho.

Agradeço também, a todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho tenha sido realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

Introdução. A Hiperplasia Prostática Benigna é a causa primária mais prevalente de sintomas no trato urinário inferior. Apesar da alta prevalência de hiperplasia prostática benigna entre homens, os mecanismos responsáveis pela disfunção miccional induzida pela obstrução infravesical ainda não são bem compreendidos. Animais podem ser utilizados como modelos experimentais para o estudo de obstrução parcial uretral. Alterações quantitativas e qualitativas do detrusor hipertrófico incluem modificações nas células musculares e aumento da síntese e deposição de colágeno, que levam a aumento do peso vesical. L-NAME (L-NG-Nitro arginina metil éster) tem sido amplamente aplicado em pesquisas básicas e clínicas como um antagonista do óxido nítrico. **Objetivos.** Comparar aspectos morfométricos em camundongos com obstrução parcial uretral, tratados ou não com L-NAME. **Métodos.** Foram utilizados 20 camundongos machos adultos, que foram divididos em 4 grupos experimentais: Sham, Sham + L-NAME, obstrução parcial uretral, obstrução parcial uretral + L-NAME. Para análise histológica, os fragmentos de bexiga foram corados com hematoxilina e eosina e Tricrômico de Masson, e na análise imunohistoquímica foram utilizados: anticorpos anti-alfa actina para avaliação da densidade de músculo liso, anti-CD31 para avaliação da densidade vascular, anti-IL6 para avaliação da expressão de interleucina 6, e anti-I-NOS para avaliação da densidade da enzima óxido nítrico sintetase induzível tecidual. As lâminas coradas foram fotografadas e capturadas em aumento de 200x e as densidades de superfície dos parâmetros mencionados foram aferidas com o software Image J®. As médias de cada grupo foram analisadas com teste ANOVA com pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® considerando-se a significância superior a 95% ($p < 0,05$). **Resultados.** Verificou-se aumento significativo da densidade de músculo liso, aumento de densidade vascular e redução na densidade de luz no grupo sham+L-NAME e aumento da densidade de IL-6 no grupo OPU. Não observou-se diferenças entre os grupos OPU e OPU + L-NAME quanto a densidade de músculo liso, de tecido conjuntivo e densidade vascular. **Conclusão.** A obstrução parcial da uretra associou-se com edema intersticial, o qual foi parcialmente prevenido pela depleção do NO induzida pelo L-NAME. A inibição do NO pelo L-NAME associou-se com inibição da sinalização inflamatória na presença de obstrução parcial da uretra.

Palavras-chave: Bexiga urinária, Obstrução parcial da uretra, depleção de óxido nítrico.

ABSTRACT

Introduction. Benign Prostatic Hyperplasia is the most prevalent primary cause of the lower urinary tract symptoms. Despite the high prevalence of benign prostatic hyperplasia among men, the mechanisms responsible for voiding dysfunction induced by infravesical obstruction are still not well understood. Animals can be used as experimental models for the study of partial urethral obstruction. Quantitative and qualitative changes in the hypertrophic detrusor include changes in muscle cells and increased collagen synthesis and deposition, which lead to increase of bladder weight. L-NAME (L-NG-Nitro arginine methyl ester) has been widely applied in both basic and clinical research as an antagonist of nitric oxide. **Objectives.** To compare morphometric aspects in mice with partial urethral obstruction, treated or not with L-NAME. Twenty adult male mice were used and divided into 4 experimental groups: Sham, Sham + L-NAME, partial urethral obstruction, partial urethral obstruction + L-NAME. For histological analysis, the bladder fragments were stained with hematoxylin and eosin and Masson's Trichrome, and in the immunohistochemical evaluation the following were used: anti-alpha actin antibodies (smooth muscle density); anti-CD31 (vascular density); anti-IL6 (proinflammatory interleukin 6 expression); and anti-iNOS (inducible form of NOS) density. The stained slides were photographed and captured in 200x magnification and the surface density was measured with ImageJ software. The means of each group were analyzed with ANOVA test with Tukey's post-test. All analyzes were performed using the Graph Pad Prism software. In all cases, the significance was set at a probability value of 95% ($p < 0,05$). **Results.** There was a significant increase in smooth muscle density, an increase in vascular density and a reduction in lumen density in the sham+L-NAME group and an increase in IL-6 density in the OPU group. No differences were observed between the OPU and OPU + L-NAME groups regarding smooth muscle density, connective tissue density and vascular density. **Conclusion.** Partial urethral obstruction was associated with interstitial edema, which was partially prevented by NO depletion induced by L-NAME. NO inhibition by L-NAME was associated with inhibition of inflammatory signaling in the presence of partial urethral obstruction.

Keywords: Urinary Bladder, Bladder outlet obstruction, Oxide nitric depletion.

LISTA DE ABREVIATURAS

CD31: molécula de adesão celular endotelial plaquetária também conhecida como cluster de diferenciação 31 (CD31)

DAB: diaminobenzidina-tetrahidro cloridro

DP: desvio padrão

DE: disfunção erétil

eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial

HE: hematoxilina e eosina

HPB: hipertrofia prostática benigna

IL-6: interleucina 6

I-NOS: sintase de óxido nítrico induzível

L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster

LUTS/STUI: *lower urinary tract symptoms* (sintomas de trato urinário inferior)

NO: óxido nítrico

NOS: sintase de óxido nítrico

OPU e OP: obstrução parcial uretral

PBS : tampão fosfato salina

PBS/BSA: tampão fosfato salina e soro bovino

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
g	grama
μm	micrômetro
H ₂ O	molécula da água
cm	centímetro
mm	milímetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Em A: Camundongos anestesiados com realização da tricotomia, assepsia do abdômen e laparotomia pré-retro umbilical. Em B: Exposição da bexiga e do colo vesical e junto a ele posicionado um cateter de 0,6 mm de diâmetro. Em C: Aproximação do músculo reto abdominal com pontos simples contínuos e pele em pontos simples separados. Em D: Desenho esquemático expondo a técnica para realização da OPU.....24

Figura 2. Seleção do arquivo fotográfico e enquadramento na janela de trabalho. A numeração indicada pelo círculo vermelho representa a área a ser utilizada. Tricrômico de Masson (200x).....30

Figura 3. Configuração para sobreposição da grade de 99 pontos no software ImageJ. A imagem mostra a seleção da ferramenta *plugins, grid*. Em *Grid*, a utilização da área previamente mensurada (vide Figura 1), dividida pelo número de pontos a ser colocado na grade e a seleção do tipo de grade (*lines*).....31

Figura 4. Recurso *cell conter* para quantificação no software ImageJ. A imagem mostra a grade de 99 pontos (cruzes) sobreposta a fotomicrografia, com a janela *cell counter* aberta. Tricrômico de Masson (200x).....32

Figura 5. Representação gráfica das variáveis do estudo morfométrico. Densidades avaliadas na bexiga de camundongos, caracterizadas em μm (micrômetros) de acordo com Sistema Internacional de Medidas (SI). *: diferença significativa. OPU: Obstrução Parcial Uretral.....35

Figura 6. Corte histológico do tecido da bexiga de cada grupo. Em (A): Sham; Em (B): Sham + L-NAME; Em (C): obstrução parcial uretral; Em (D): obstrução

parcial uretral + L-NAME. Tricrômico de Masson (200x).
.....36

Figura 7. A à D: cortes histológicos de músculo liso de cada grupo. (A): Sham; (B): Sham + L-NAME; (C): obstrução parcial uretral; (D): obstrução parcial uretral + L-NAME. Imunomarcação por anticorpo anti-alfa actina (200x).....37

Figura 8. A à D: cortes histológicos da densidade vascular de cada grupo. (A): Sham; (B): Sham + L-NAME; (C): obstrução parcial uretral; (D): obstrução parcial uretral + L-NAME. Imunomarcação por anticorpo anti – CD31 (200x).....38

Figura 9. A à D: cortes histológicos de expressão de interleucina 6 de cada grupo. (A): Sham; (B): Sham + L-NAME; (C): obstrução parcial uretral; (D): obstrução parcial uretral + L-NAME. Imunomarcação por anticorpo anti-I-L6 (200x).....39

Figura 10. A à D: cortes histológicos de densidade de I-NOS de cada grupo. (A): Sham; (B): Sham + L-NAME; (C): obstrução parcial uretral; (D): obstrução parcial uretral + L-NAME. Imunomarcação por anticorpo anti-I-NOS (200x).....40

Figura 11. Representação gráfica da análise estatística da densidade de músculo liso, densidade vascular, densidade de IL-6 e densidade de I-NOS. Densidades caracterizadas em μm (micrômetros) de acordo com Sistema Internacional de Medidas (SI). *: diferença significativa. OPU: obstrução parcial uretral.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados numéricos referente à média da densidade histológica das diferentes estruturas analisadas.....	34
--	----

LISTA DE DROGAS

Droga	Procedência
L-NAME	Sigma
Quetamina	Ceva
Xilazina	Syntec

SUMÁRIO

Introdução.....	17
Justificativa.....	22
Objetivo.....	22
Materiais e métodos.....	24
Análises Estatística.....	33
Resultados.....	34
Discussão.....	42
Conclusão.....	46
Referências.....	47
Anexo I - Declaração do Comitê de Ética.....	51

INTRODUÇÃO

Os sintomas de trato urinário inferior podem ser divididos em três grupos de acordo com a *International Continence Society*: sintomas de armazenamento, esvaziamento e pós-miccionais. Os sintomas de armazenamento incluem aumento de frequência de micção, noctúria, urgência miccional e incontinência urinária. Os sintomas de esvaziamento referem-se a jato urinário fraco e hesitação. Já os relacionados à pós-micção consistem em sensação de esvaziamento incompleto e gotejamento terminal (1).

O aumento benigno da próstata resultante da hiperplasia prostática benigna (HPB), é a causa primária mais prevalente de sintomas do trato urinário inferior (STUI), em homens com mais de 50 anos de idade (2).

A Associação Europeia de Urologia tem diretrizes quanto a abordagem, terapia e acompanhamento de sintomas sugestivos de formas benignas não neurogênicas de STUI/HPB, como por exemplo, obstrução prostática benigna (OPB), hiperatividade do detrusor e poliúria noturna ou noctúria em homens com 40 anos ou mais (3,4). Ainda, especula-se que a disfunção erétil (DE) também é altamente prevalente na população com HPB (5).

Apesar da alta prevalência da HPB, os mecanismos responsáveis pela disfunção miccional induzida pela obstrução infravesical ainda não são bem compreendidos. A investigação e o desenvolvimento de terapias adequadas incluem o uso de modelos animais, de forma a entender o controle fisiológico da continência urinária, bem como as condições fisiopatológicas envolvidas na disfunção vesical (6).

A coleta, o armazenamento da urina e sua eliminação através da uretra dependem de vias neurais. Os neurotransmissores e os mecanismos que regulam essas vias podem fornecer uma base para intervenção terapêutica em pacientes com disfunção miccional. O óxido nítrico (NO) é reconhecido como um

importante mediador celular com uma ampla gama de funções no trato urinário inferior. É considerado um importante neurotransmissor inibitório, bem como um modulador da resposta imune celular a microorganismos invasores e células tumorais no trato urinário inferior de diferentes espécies animais, incluindo humanos. A administração com depletors ou doadores de óxido nítrico (NO) foi efetiva na redução da disfunção vesical em coelhos com OPU por duas semanas (7). Desta forma, a manipulação do NO pode formar a base para novas intervenções terapêuticas (7).

Vários estudos utilizaram animais como modelos experimentais para o estudo de obstrução parcial uretral (OPU). A indução desta condição leva a alterações estruturais e fisiológicas da parede vesical semelhantes às observadas em homens acometidos por HPB (6).

De acordo com Taiming Liua, et al. a identificação do óxido nítrico (NO) como um receptor derivado do endotélio vascular capaz de promover o relaxamento vascular, está sendo de grande interesse na literatura em estudar este bioativo. O L-NAME é uma molécula produzida endogenamente a partir da L-arginina pela NO sintase. Devido aos seus efeitos inibidores da NO sintase, vários análogos da L-arginina têm sido ferramentas farmacológicas úteis na pesquisa relacionada à NOS. De tudo, tais antagonistas de NO sintase, L-NG-nitro arginina metil éster (L-NAME) tem sido o mais utilizado em tratamentos que necessitam do efeito de relaxamento muscular.

Estudos experimentais em ratos que têm deficiência crônica de NO sugerem que o NO tem efeito de estimular o relaxamento muscular tanto na bexiga quanto na uretra. A redução sistêmica do NO causa hiperatividade do detrusor e diminuição do relaxamento funcional da uretra. Verificou-se que animais tratados com L-NAME tiveram aumento do número de ciclos miccionais em comparação com os animais que não receberam quaisquer tratamentos (8).

Um estudo em ratos teve como objetivo avaliar os efeitos do L-NAME na apoptose induzida por lesão de isquemia-reperfusão. Dessa forma, a aorta abdominal foi pinçada por 30 minutos visando induzir lesão isquêmica da bexiga.

Nos animais tratados com L-NAME por 7 dias, houve aumento da resposta contrátil vesical, assim como redução da apoptose que o tratamento com L-NAME foi eficaz na reperfusão vesical (9)

A obstrução vesical leva a alterações histológicas e funcionais na bexiga ao longo do tempo. O papel da síntese do óxido nítrico vem sendo estudado como possível alvo para o tratamento desta obstrução. Foi verificada melhora das alterações funcionais e fibróticas na bexiga em um estudo em ratos que foram submetidos a OPU simulada por meio de cirurgia e tratados com inibidor de I-NOS (aminoguanidina) por 2 semanas, sugerindo assim que o NO contribuiu para as alterações fisiopatológicas da OPU (10).

Alterações quantitativas e qualitativas do detrusor hipertrofiado, verificados em estudos experimentais, incluíram modificações nas células musculares e aumento da síntese e deposição de colágeno, que levaram a aumento do peso vesical (11,12). Em estudo de obstrução vesical, realizado em ratos, foi observado aumento significativo das fibras musculares em até 13 semanas após a obstrução (13). Já em coelhos, foi observado o mesmo achado (14), ainda que sem o emprego de métodos morfométricos. Num outro estudo foi investigada a influência do tratamento por sete dias com L-NAME após a indução de obstrução uretral, em coelhos. Observou-se hipertrofia de músculo liso nos animais tratados com L-NAME e diminuição do peso vesical e contratilidade vesical no grupo tratado em comparação com o não tratado (15).

Foi verificado, em ratos e coelhos submetidos à obstrução vesical, formação significativa de microvasos no detrusor, após uma semana de obstrução (16,17). Porém, os métodos empregados foram inespecíficos sem análise objetiva da densidade vascular.

Além disso, constatou-se que a expressão das enzimas eNOS e I-NOS, que são fundamentais no metabolismo do NO nos tecidos, está aumentada, em ratos submetidos à obstrução vesical (18).

Em estudo em ratos machos Wistar a administração crônica de L-NAME (antagonista não seletivo da NOS) aumentou acentuadamente o número de contrações não miccionais ($2,62 \pm 0,89$), e frequência de micção ($1,97 \pm 0,78$), demonstrando um aumento do limiar de volume ($2,83 \text{ mL} \pm 1,64$) em comparação com o grupo controle (8).

Quando há obstrução parcial da uretra em camundongos, foi observada piora da função do detrusor em comparação com grupo sham e piora quando L-NAME foi administrado. Esse estudo demonstra que a depleção do NO promove alterações importantes na função vesical e que a obstrução parcial da uretra provoca alterações mais acentuadas na função vesical (8)

Em outro estudo foi proposto que a inibição não-seletiva da NOS (realizada com L-NAME) pode ser útil na diminuição da apoptose causada pela isquemia-reperfusão pela qual a bexiga passa em obstrução uretral (9).

JUSTIFICATIVA

Do exposto, observa-se que o NO exerce funções na homeostase do detrusor e que sua expressão excessiva pode contribuir para mecanismos fisiopatológicos que se relacionam à obstrução infravesical. Assim intervenções sobre as vias que regulam a expressão do NO no detrusor podem representar alvos terapêuticos em humanos.

A literatura atual carece de estudos que tenham por objetivo avaliar os efeitos histológicos decorrentes de intervenções sobre a expressão vesical do NO. Assim, o presente estudo buscou caracterizar, por meio de um estudo experimental em camundongos, tais alterações em animais sob tratamento crônico com antagonista não seletivo da enzima I-NOS, tendo como focos as alterações morfométricas na matriz extracelular e nas fibras colágenas bem como efeitos sobre vascularização e resposta inflamatória tecidual, por meio de técnica imunohistoquímica em tecido.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Comparar e caracterizar os aspectos morfométricos em camundongos com obstrução parcial uretral (OPU), submetidos ou não ao tratamento com L-NAME.
2. Comparar e caracterizar aspectos imunohistoquímicos em camundongos com obstrução parcial uretral (OPU), submetidos ou não ao tratamento com L-NAME.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos adultos da linhagem C57BL/6, com 8 a 9 semanas de idade e peso entre 20 e 25 gramas. Os animais, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB – UNICAMP), ficaram alojados no biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia – UNICAMP, mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), à temperatura de 25°C, em gaiolas tipo “caixa de sapato” (1 a 3 camundongos por gaiola). Ração peletizada e água foram fornecidas *ad libitum*. Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP protocolo nº 3170-1).

Os animais foram separados em 4 grupos experimentais (5 animais por grupo):

Grupo A: Sham;

Grupo B: Sham + L-NAME;

Grupo C: obstrução parcial uretral;

Grupo D: obstrução parcial uretral + L-NAME.

Obstrução Parcial Uretral (OPU)

Os camundongos foram anestesiados com xilazina (30 mg/kg) e quetamina (2 mg/kg) por meio de injeção intraperitoneal. Posteriormente foi realizada tricotomia, assepsia do abdômen e laparotomia pré-retro umbilical. Utilizando lupa cirúrgica, expôs-se a bexiga e o colo vesical e junto a ele posicionou-se um cateter de 0,6 mm de diâmetro. A obstrução foi obtida por ligadura simples com fio de nylon 6-0, preservando-se os ureteres e vasos sanguíneos adjacentes. Em seguida, o cateter foi retirado, o músculo reto abdominal foi aproximado com pontos simples contínuos e pele em pontos simples separados e ambos os planos feitos com fio nylon 6-0.

No grupo Sham, os mesmos procedimentos cirúrgicos da OPU foram realizados, entretanto sem ligadura uretral (Figura 1).

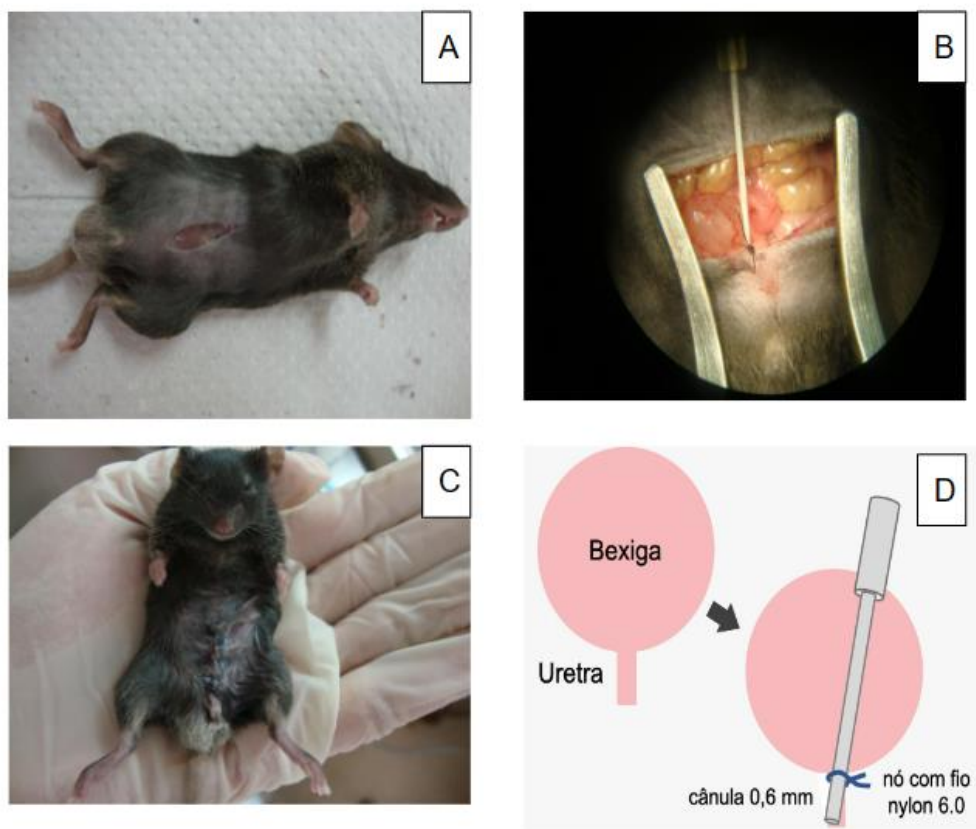


Figura 1. Em A: Camundongos anestesiados com realização da tricotomia, assepsia do abdômen e laparotomia pré-retro umbilical. Em B: Exposição da bexiga e do colo vesical e junto a ele posicionado um cateter de 0,6 mm de diâmetro. Em C: Aproximação do músculo reto abdominal com pontos simples contínuos e pele em pontos simples separados. Em D: Desenho esquemático expondo a técnica para realização da OPU.

Tratamento com L-NAME

O tratamento crônico com L-NAME foi conduzido de acordo com estudos prévios (Mônica, FZT et al., 2008; Lintomen L et al., 2009). A droga foi dissolvida em água e oferecida ad libitum, na dose aproximada de 150 mg/Kg/dia. Os animais Sham + L-NAME, OPU + L-NAME receberam tratamento por cinco semanas a partir do pós-operatório imediato.

Após este tratamento os camundongos foram submetidos à eutanásia, sendo que o método utilizado neste estudo está de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.

Os procedimentos acima descritos foram realizados previamente, durante outro projeto de pesquisa realizado na nossa instituição (Marcy L P, et al. 2017). Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo complementar pesquisa por meio do estudo morfométrico e imunohistoquímico dos fragmentos de bexiga obtidos no referido projeto anterior.

Morfometria

Os fragmentos contendo bexiga de camundongo do estudo foram processados para inclusão em Paraplast conforme padronização do laboratório Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia no Instituto de Biologia da UNICAMP, sob orientação do Prof. Dr. Wagner Fávaro. Destes, foram obtidos cortes histológicos com 5µm de espessura. Estes cortes foram corados com hematoxilina e eosina para análise de aspectos histológicos do tecido, e com Tricrômico de Masson, para identificação detalhada do colágeno, sua diferenciação do músculo liso e densidade de luz que representa a área sem estruturas ou com edema tecidual. Colorações especiais e imunomarcações foram utilizadas para análises específicas, detalhadas na seção Imunohistoquímica.

Após as devidas preparações histológicas, foram obtidas fotomicrografias digitais com uma câmera digital (Olympus DP70, Tokyo, Japan) diretamente acoplada a um microscópio (Olympus BX51, Tokyo, Japan). Todas as fotomicrografias foram capturadas em resolução de 2040 x 1536 pixels e

armazenadas no formato de arquivo TIF. Nestas imagens foram realizadas as análises bidimensionais morfométricas utilizando-se o software ImageJ versão 1.46r (National Institute of Health, Bethesda, EUA).

Densidade de superfície de fibras musculares e colágeno

A análise da densidade de superfície de fibras musculares e colágeno foi realizada por 25 fotomicrografias adquiridas sob magnificação de 100x. Estas, foram obtidas de pelo menos cinco cortes histológicos corados com Tricrômico de Masson. De forma complementar as áreas não ocupadas por tecido muscular ou colágeno foram também mensuradas e identificadas como densidade de luz.

Para tanto, os cortes histológicos foram desparafinizados em estufa a 60° e clarificados em xilol. Em seguida foram desidratados em banhos consecutivos de álcool, corados em fucsina ácida e azul de anilina. Posteriormente foram revelados em água acética a 1%, hidratados em banhos consecutivos de álcool e clarificados em xilol.

Imunohistoquímica

Densidade de superfície de fibras musculares

As análises da densidade de superfície de fibras musculares foram realizadas em 25 fotomicrografias adquiridas sob magnificação de 400x. Estas, foram obtidas de, pelo menos, cinco cortes histológicos imunomarcados com anticorpo anti alfa-actina (número de catálogo 08-0106; Invitrogen Brasil Ltda, São Paulo-SP).

Para tanto, os cortes histológicos foram acondicionados em lâminas silanizadas evitando-se a perda destes durante o preparo histotécnico. A etapa de recuperação antigênica foi realizada em banho de tampão TRIS-EDTA (pH 9.0) *overnight* em uma estufa a 60°C. Após bloqueio de sítios inespecíficos, o anticorpo primário (anti alfa-actina) foi incubado em câmara úmida por 60 minutos a 40°C. De acordo com a orientação do fabricante, este anticorpo não necessita de diluição para sua utilização. A revelação com anticorpo secundário e diamino-benzidina-tetrahidro cloridro (DAB) foi realizada com o kit Histostain-

Plus, segundo as orientações do fabricante (número de catálogo 003006, Invitrogen).

Densidade vascular

As análises da densidade de superfície de fibras elásticas foram realizadas em 25 fotomicrografias adquiridas sob magnificação de 200x. Estas, foram obtidas de, pelo menos, cinco cortes histológicos imunomarcados com anticorpo anti-CD31 (número de catálogo ab28364; ABCAM) que é utilizado como imunomarcador de endotélio vascular, permitindo, assim, a análise da densidade vascular.

Para tanto, os cortes histológicos foram acondicionados em lâminas silanizadas evitando-se a perda destes durante o preparo histotécnico. A etapa de recuperação antigênica foi realizada em banho de tampão TRIS-EDTA (pH 9.0) *overnight* em uma estufa a 60°C. Após bloqueio de sítios inespecíficos, o anticorpo primário (anti-CD31) foi incubado em câmara úmida por 60 minutos a 40°C. Este foi diluído em PBS/BSA a 1% na proporção de 1:100. A revelação com anticorpo secundário e diamino-benzidina-tetrahidro clorido (DAB) foi realizada com o kit Histostain-Plus, segundo as orientações do fabricante (número de catálogo 003006, Invitrogen).

Densidade de superfície de Interleucina 6

As análises da densidade de superfície de Interleucina 6 foram realizadas em 25 fotomicrografias adquiridas sob magnificação de 400x. Estas, foram obtidas de, pelo menos, cinco cortes histológicos imunomarcados com anticorpo IL-6 (número de catálogo ab 6672, Brasil Ltda, São Paulo-SP).

Para tanto, os cortes histológicos foram acondicionados em lâminas silanizadas evitando a perda destes durante o preparo histotécnico. A etapa de recuperação antigênica foi realizada em banho de tampão TRIS-EDTA (pH 9.0) *overnight* em uma estufa a 60°C. Após bloqueio de sítios inespecíficos, o anticorpo primário (anti- IL - 6) foi incubado em câmara úmida por 60 minutos a 40°C. Este foi diluído em PBS/BSA a 1% na proporção de 1:100. A revelação com anticorpo secundário e diamino-benzidina-tetrahidro clorido (DAB) foi

realizada com o kit Histostain-Plus, segundo as orientações do fabricante (número de catálogo 003006, Invitrogen).

Densidade de superfície de I-NOS

As análises da densidade de superfície de I-NOS foram realizadas em 25 fotomicrografias adquiridas sob magnificação de 400x. Estas, foram obtidas de, pelo menos, cinco cortes histológicos imunomarcados com anticorpo anti I-NOS (número de catálogo 08-15532); Invitrogen Brasil Ltda, São Paulo-SP).

Para tanto, os cortes histológicos foram acondicionados em lâminas silanizadas evitando a perda destes durante o preparo histotécnico. A etapa de recuperação antigênica foi realizada em banho de tampão TRIS-EDTA (pH 9.0) *overnight* em uma estufa a 60°C. Após bloqueio de sítios inespecíficos, o anticorpo primário (anti I-NOS) foi incubado em câmara úmida por 60 minutos a 40°C. De acordo com a orientação do fabricante, este anticorpo não precisa de diluição para sua utilização. A revelação com anticorpo secundário e diaminobenzidina-tetrahidro clorido (DAB) foi realizada com o kit Histostain-Plus, segundo as orientações do fabricante (número de catálogo 003006, Invitrogen).

Análises das fotomicrografias

A partir das fotomicrografias das bexigas coradas e imunomarcadas, a densidade de superfície de vasos sanguíneos, músculo liso, I-NOS, Interleucina-6 e colágeno foram mensuradas pela técnica de contagem de pontos (Michele Simões, et al.). Para tanto, foi utilizada uma grade de 99 pontos sobreposta à imagem, através da função Cell Counter, do software ImageJ.

Análise morfométrica e imunohistométrica

As figuras a seguir mostram as etapas para colocação da grade de 99 pontos no ImageJ (**Figuras 2, 3 e 4**). O valor da contagem de pontos foi expresso em porcentagem.

A obtenção do resultado da área da imagem para realização do método de contagem de pontos no software ImageJ. A **Figura 2** mostra a mensuração da área da imagem, necessária para colocar o sistema teste. Na janela “results” aberta observa-se o resultado da mensuração

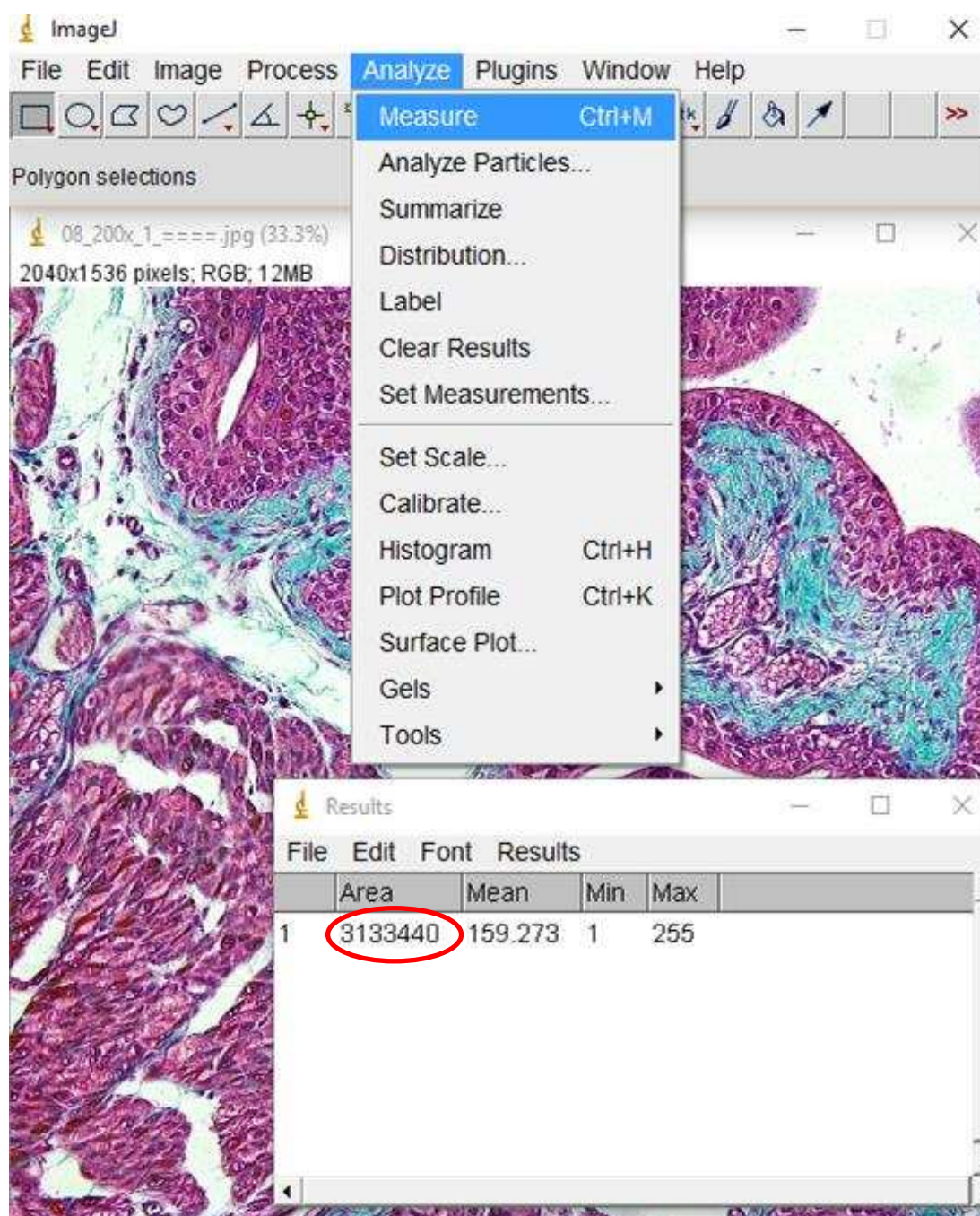


Figura 2. Seleção do arquivo fotográfico e enquadramento na janela de trabalho. A numeração indicada pelo círculo vermelho representa a área a ser utilizada. Tricrômico de Masson (200x).

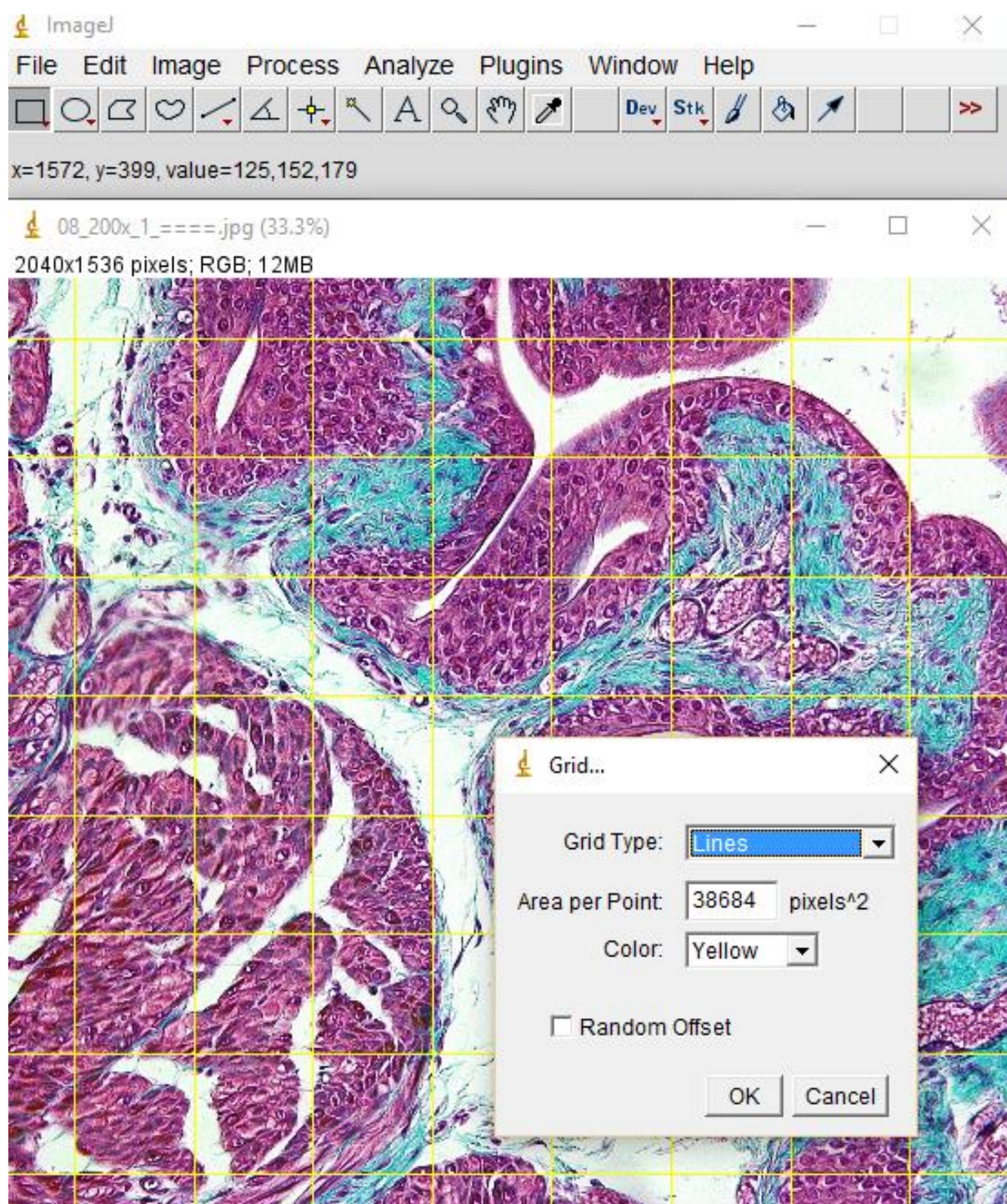


Figura 3. Configuração para sobreposição da grade de 99 pontos no software ImageJ. A imagem mostra a seleção da ferramenta *plugins, grid*. Em *Grid*, a utilização da área previamente mensurada (vide Figura 1), dividida pelo número de pontos a ser colocado na grade e a seleção do tipo de grade (*lines*).

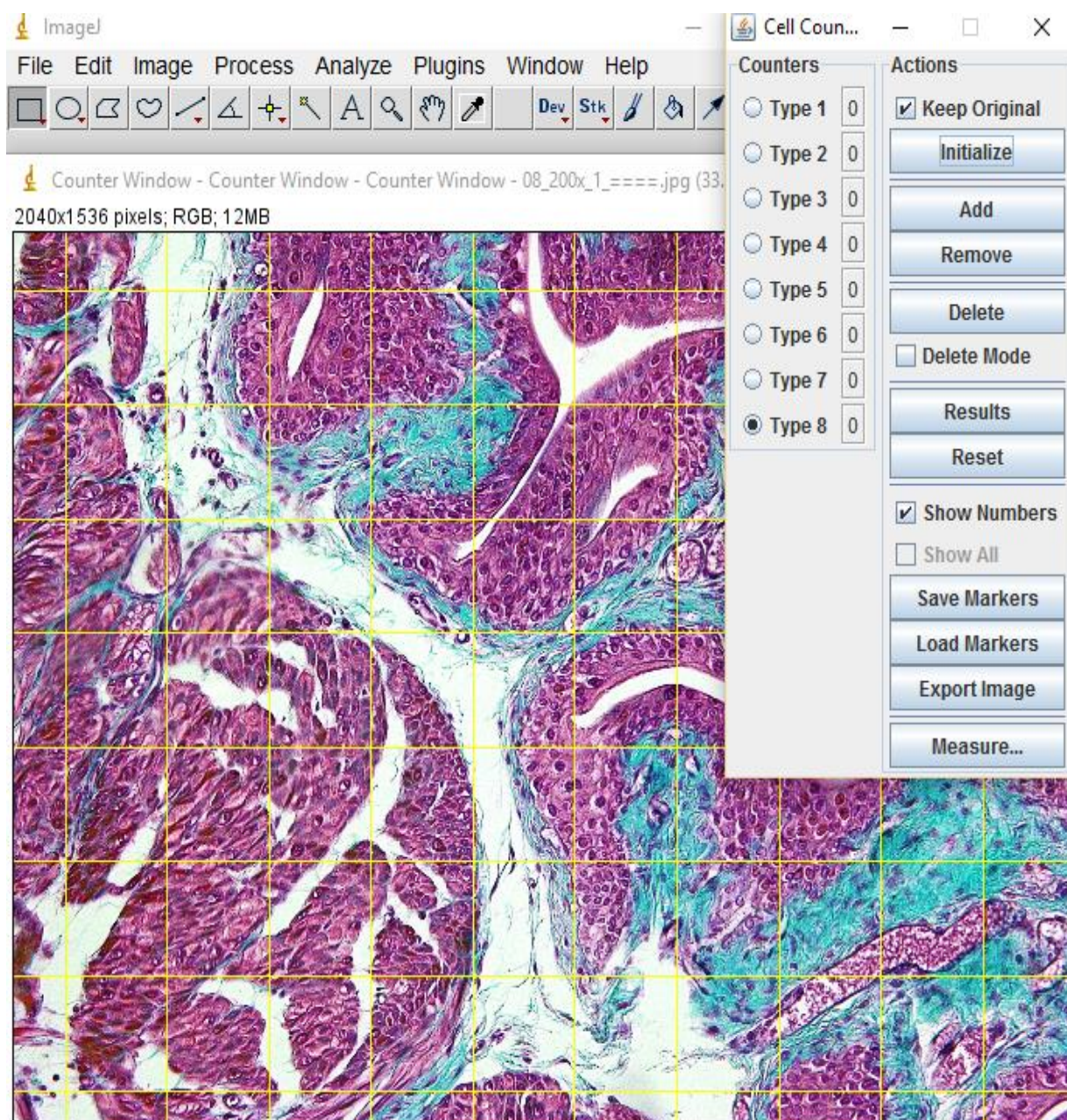


Figura 4. Recurso *cell counter* para quantificação no software ImageJ. A imagem mostra a grade de 99 pontos (cruzes) sobreposta a fotomicrografia, com a janela *cell counter* aberta. Tricrômico de Masson (200x).

Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilhas do tipo Microsoft Excel e as médias dos grupos foram comparadas pelo método estatístico ANOVA com pós-teste de Tukey.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os resultados foram apresentados como média +/- desvio padrão de cada grupo.

RESULTADOS

Na análise morfométrica verificou-se diferença significativa na densidade de superfície de tecido muscular liso ($p=0,0078$) e densidade de luz ($p=0,003$) no grupo sham + L-NAME em relação aos demais grupos conforme demonstrado na **Figura 5 e Tabela 1**. Não observou-se diferença significativa no tecido conjuntivo e densidade epitelial entre os grupos. Na **Figura 6** encontra-se exemplificada a coloração utilizada nos quatro grupos estudados.

Tabela 1. Resultados numéricos referente a média da densidade histológica das diferentes estruturas analisadas.

	SHAM	SHAM+L-NAME	OPU	OPU+L-NAME	p
DENSIDADE DE LUZ	15,80	9,20	19,20	16,20	0,003
DENSIDADE EPITELIAL	19,60	19,80	21,00	23,60	0,960
DENSIDADE DE TECIDO CONJUNTIVO	20,60	20,00	25,00	23,00	0,420
DENSIDADE DE MÚSCULO LISO	32,00	52,20	28,40	23,60	0,0064
DENSIDADE VASCULAR	4,40	12,00	3,80	4,40	0,0014
DENSIDADE DE IL-6	11,80	78,40	24,20	12,00	0,00235
DENSIDADE DE I-NOS	55,60	39,80	58,60	13,40	0,512

IL-6: interleucina 6

I-NOS: sintetase de óxido nítrico induzível

L-NAME:NG-nitro-L-arginina metil éster

OPU: obstrução parcial uretral

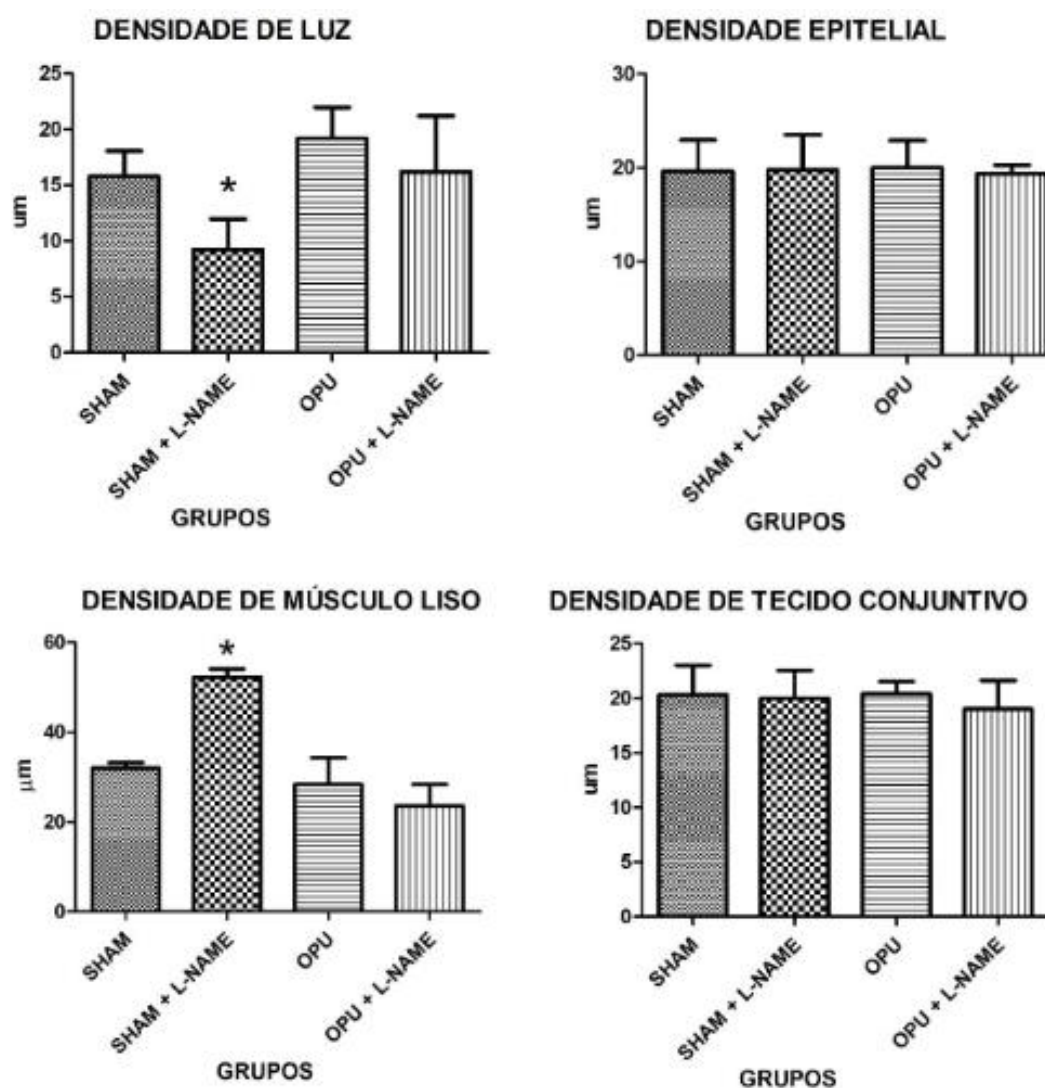


Figura 5. Representação gráfica das variáveis do estudo morfométrico. Densidades avaliadas na bexiga de camundongos, caracterizadas em μm (micrômetros) de acordo com Sistema Internacional de Medidas (SI). *: diferença significativa. OPU: Obstrução Parcial Uretral.

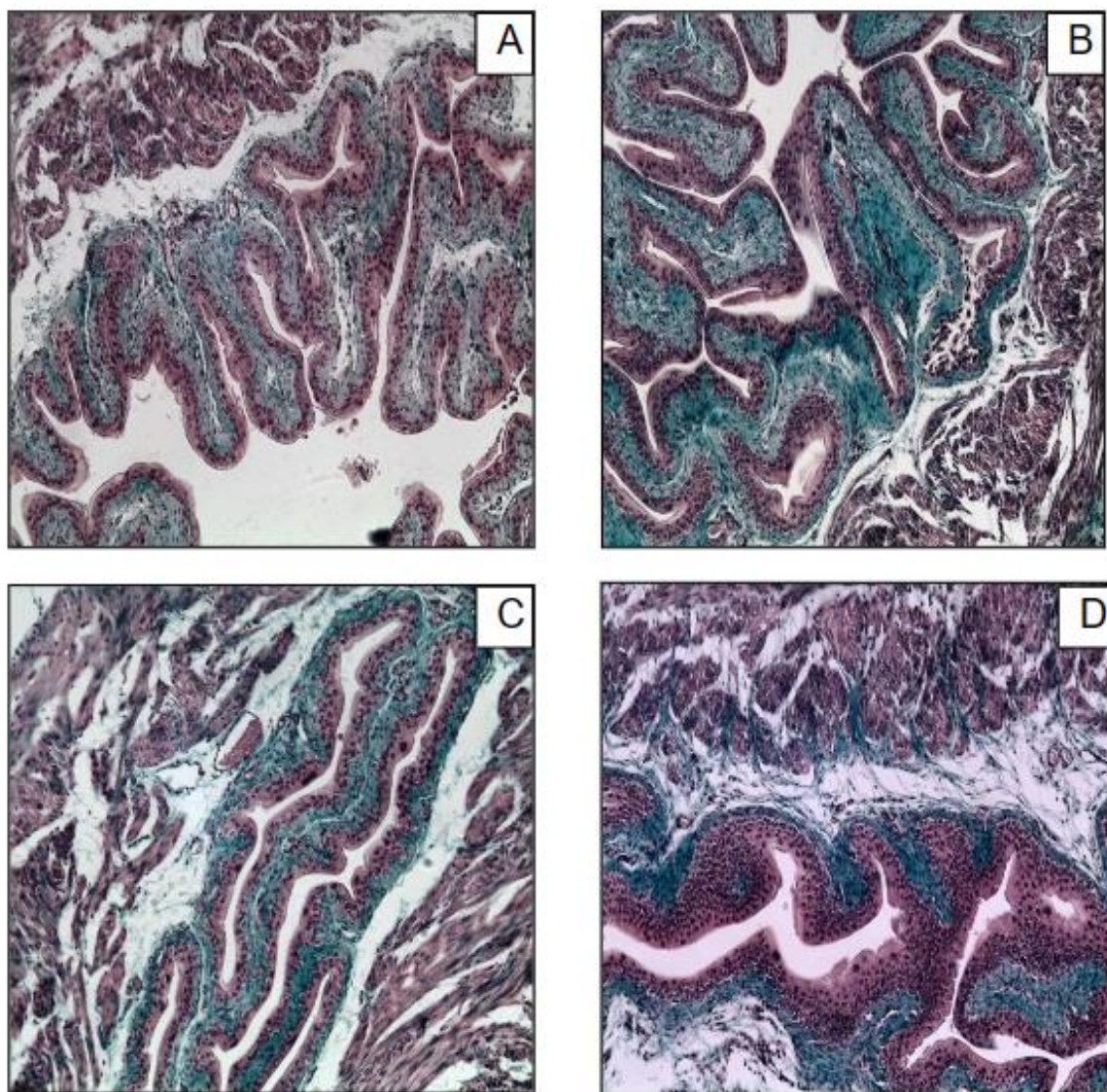


Figura 6. Corte histológico do tecido da bexiga de cada grupo. Em (A): Sham; Em (B): Sham + L-NAME; Em (C): obstrução parcial uretral; Em (D): obstrução parcial uretral + L-NAME. Tricrômico de Masson (200x).

A densidade do músculo liso do tecido da bexiga de camundongos também foi avaliada por meio de imunomarcacão com anticorpo anti-alfa actina, a qual confirmou maior densidade de músculo liso no grupo Sham + L-NAME ($p=0,0064$), representados na **Figura 7**, **Figura 11** e **Tabela 1**.

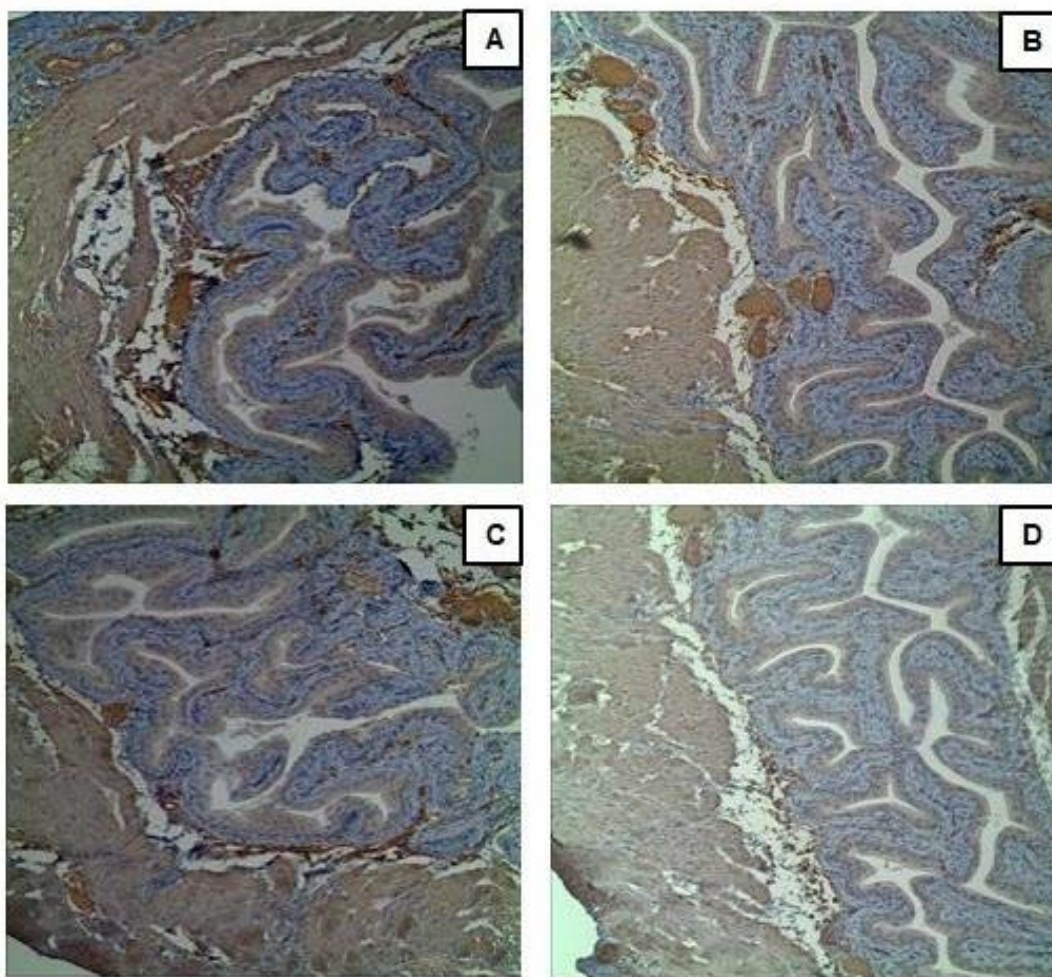


Figura 7. A à D: cortes histológicos de músculo liso de cada grupo. (A): Sham; (B): Sham + L-NAME; (C): obstrução parcial uretral; (D): obstrução parcial uretral + L-NAME. Imunomarcacão por anticorpo anti-alfa actina (200x).

A densidade do vascular do tecido da bexiga de camundongos foi avaliada por meio de imunomarcacão com anticorpo anti-CD31. Verificamos que o grupo Sham + L-NAME apresentou densidade tecidual significativamente diferente dos demais grupos ($p=0,0014$) conforme apresentado na **Figura 8**, **Figura 11** e **Tabela 1**.

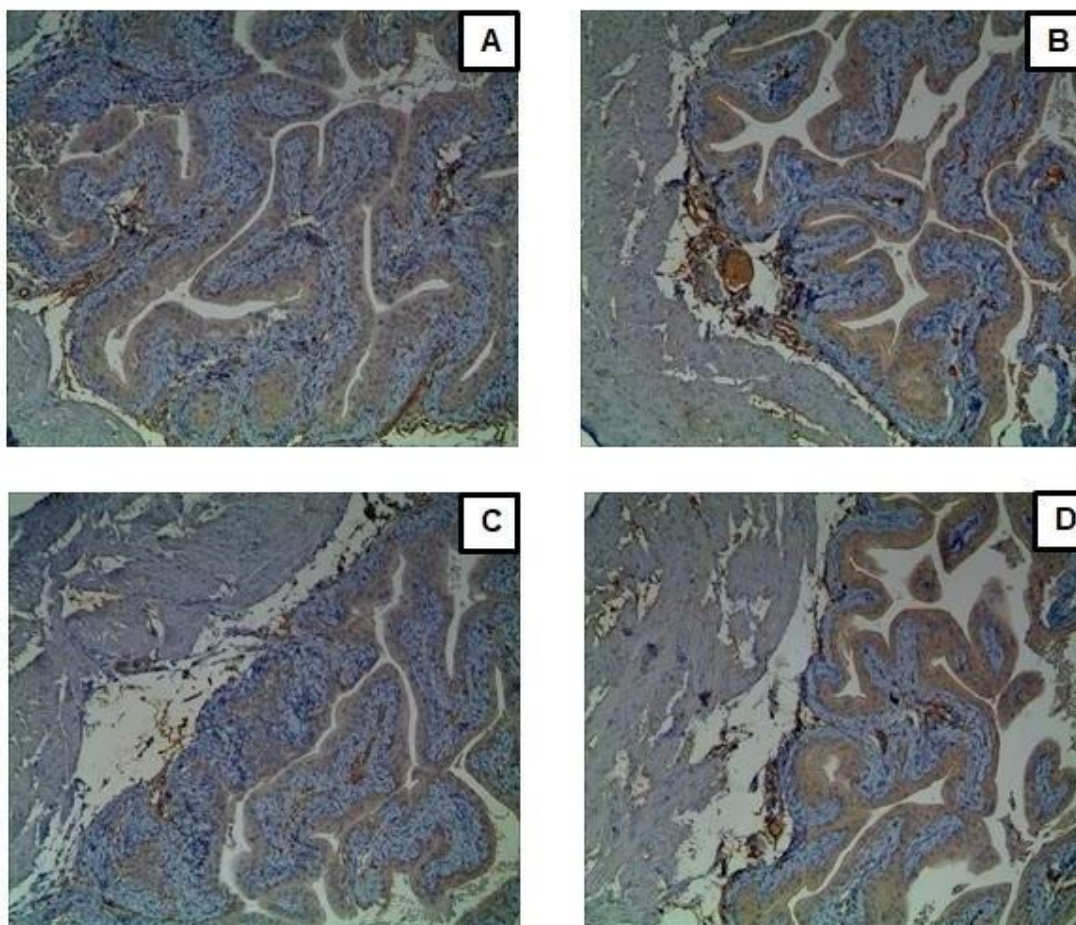


Figura 8. A   D: cortes histológicos da densidade vascular de cada grupo. (A): Sham; (B): Sham + L-NAME; (C): obstrução parcial uretral; (D): obstrução parcial uretral + L-NAME. Imunomarcacão por anticorpo anti – CD31 (200x).

A expressão de interleucina 6 no tecido da bexiga de camundongos foi avaliada por meio de imunomarcção com anticorpos anti- I-L6. Verificamos que o grupo OPU apresentou uma maior expressão de interleucina 6 significativamente diferente dos demais grupos ($p=0,00235$) conforme apresentado na **Figura 9, Figura 11 e Tabela 1**.

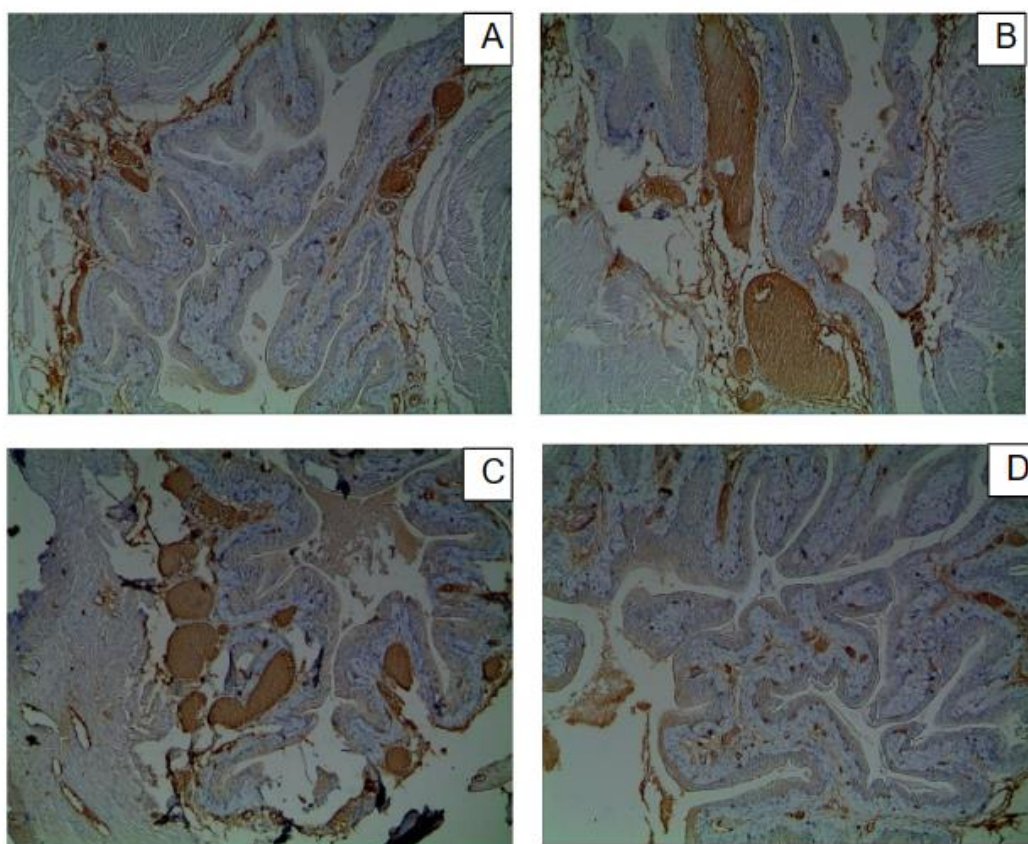


Figura 9. A à D: cortes histológicos de expressão de interleucina 6 de cada grupo. (A): Sham; (B): Sham + L-NAME; (C): obstrução parcial uretral; (D): obstrução parcial uretral + L-NAME. Imunomarcção por anticorpo anti-I-L6 (200x).

A densidade do I-NOS do tecido da bexiga de camundongos foi avaliada por meio de imunomarcacão com anticorpo anti-I-NOS. Verificamos que após análise estatística que nenhum dos grupos apresentou diferença significativa aos demais ($p=0,512$) conforme apresentado na **Figura 10**, **Figura 11** e **Tabela 1**.

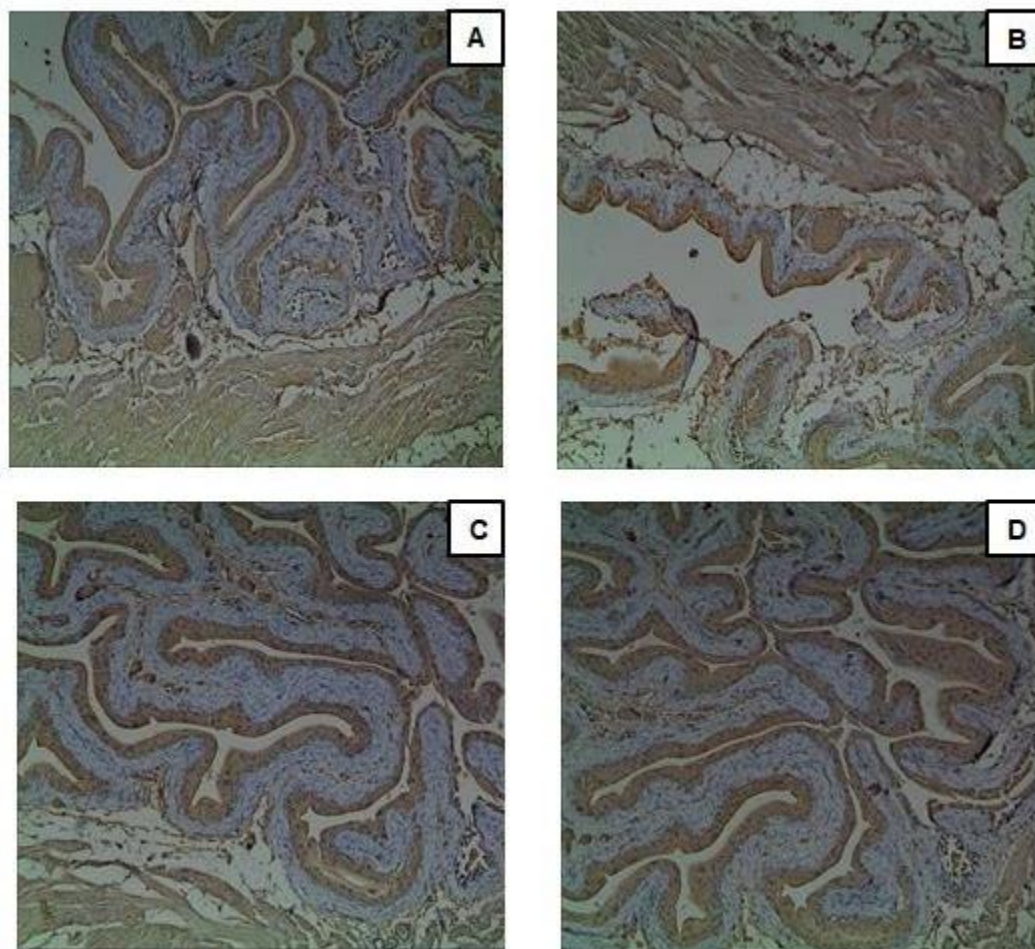


Figura 10. A à D: cortes histológicos de densidade de I-NOS de cada grupo. (A): Sham; (B): Sham + L-NAME; (C): obstrução parcial uretral; (D): obstrução parcial uretral + L-NAME. Imunomarcacão por anticorpo anti-I-NOS (200x).

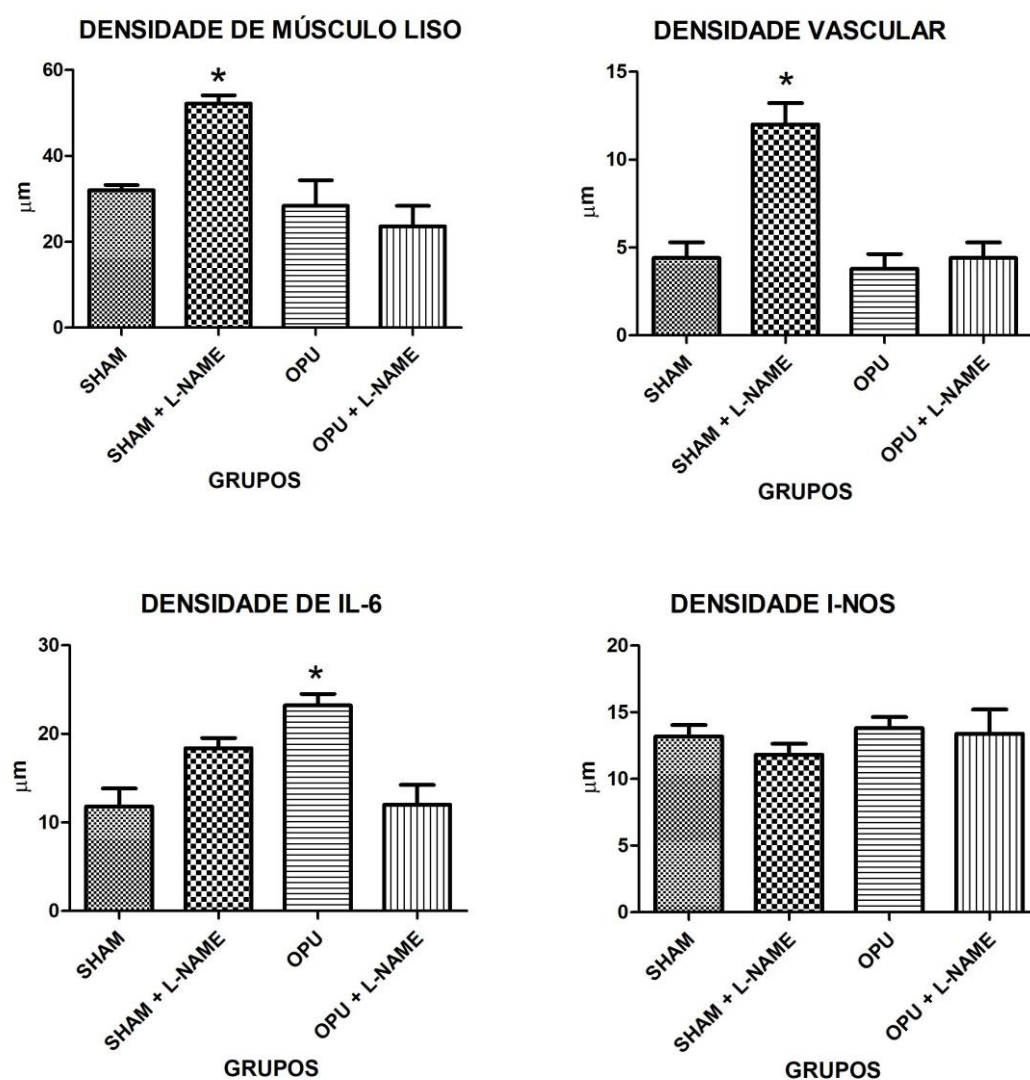
Figura 11.

Figura 11. Representação gráfica da análise estatística da densidade de músculo liso, densidade vascular, densidade de IL-6 e densidade de I-NOS. Densidades caracterizadas em μm (micrômetros) de acordo com Sistema

Internacional de Medidas (SI). *: diferença significativa. OPU: obstrução parcial uretral.

DISCUSSÃO

A obstrução parcial da uretra é uma das principais causas de disfunção miccional e de sintomas do trato urinário inferior. Pode ser oriunda do aumento benigno da próstata ou de estenose da uretra (20). O aumento benigno da próstata é um problema comum em homens idosos, associado com sintomas do trato urinário inferior, como esvaziamento incompleto da bexiga, jato de urina fraco, frequência urinária, urgência, incontinência de urgência e noctúria. Apesar da plêiade de estudos translacionais acerca dos mecanismos fisiopatológicos relacionados com a patogênese dos sintomas do trato urinário inferior, consideramos que ainda se justificam as propostas de estudos como o presente, dadas as dificuldade de se obter modelos experimentais que reproduzam os fenômenos observados no ser humano (19).

O rigor metodológico em estudos com tecidos depende de um conjunto de cuidados, desde a extração das amostras, conservação e fixação das mesmas, bem como qualidade dos insumos empregados. Assim, a preocupação com esses aspectos norteou todos os nossos procedimentos. Nesse sentido, a concordância dos resultados observados no estudo morfológico quanto a densidade de músculo liso, e no estudo imunohistoquímico por meio de imunomarcacão de anti-alfa actina, nos levam a considerar que a qualidade das amostras e do seu processamento pode ser considerada satisfatória, uma vez que tais métodos colheram, direta ou indiretamente, informações sobre o mesmo alvo microscópico (músculo liso).

Estudos demonstram que o estresse oxidativo desempenha papel importante para os mecanismos patológicos associados com a obstrução parcial

da uretra (20). No presente estudo, a menor densidade de músculo liso nos grupos submetidos na OPU pode ter decorrido seja da deterioração ou do estiramento do músculo liso decorrentes da OPU. O edema intersticial decorrente da OPU, também pode justificar a menor densidade de músculo liso nos grupos onde foi realizada a OPU. De forma contrária, no grupo SHAM + L-NAME foi observada densidade de luz (que consideramos que representa a somatória do edema tecidual, intensidade de estiramento muscular e/ou deterioração muscular) significativamente menor, o que nos leva a considerar eventual efeito protetor da depleção de NO sobre esses eventos, uma vez que a densidade de luz observada foi, também, significativamente menor que no grupo SHAM. Nesse sentido, em estudo de Mônica et al, 2008, que utilizou o mesmo modelo experimental de OPU em camundongos, observou-se que a depleção crônica da expressão do NO pelo L-NAME contribuiu para aumentar a atividade contrátil do detrusor. De forma contrária do mesmo autor, em ratos que não sofreram intervenções cirúrgicas, mas somente a administração do L-NAME por 30 dias, Mônica FTZ et al observou espessamento da camada muscular do trigono vesical (23). Porém de forma diversa ao nosso estudo, não foi utilizado um método morfométrico, mas sim critérios exclusivamente histológicos qualitativos.

Ainda sobre a influência do metabolismo no NO sobre o detrusor, no estudo de Lin WY, et al. 2007 (15), que envolveu coelhos que foram submetidos à OPU e tratados com L-NAME, observou-se que os animais tratados com L-NAME + OPU apresentaram atrofia de células musculares. Tal achado foi concordante com as nossas observações, embora não tenhamos obtido significância estatística na nossa análise.

A ausência de diferença no parâmetro densidade de luz, que estamos considerando como proporcional ao edema intersticial, entre os grupos OPU e OPU + L-NAME nos leva a considerar que a inibição do NO, neste cenário, não determinou efeito protetor significativo sobre esse aspecto do interstício vesical, ou seja, os efeitos da OPU no microambiente independeram da atividade do NO no tecido. Tal inferência pode, eventualmente ser motivo de outros estudos que tenham por objetivo avaliar efeitos terapêuticos de inibidores do NO sobre o

interstício vesical num contexto clínico. Dessa forma, esclarecemos que o propósito da imunomarcagem com o anticorpo anti-IL6 foi avaliar os efeitos pró-inflamatórios da OPU e eventual efeito modulatório da depleção do NO neste processo. Observamos que os animais do grupo OPU apresentaram expressão significativamente maior desse marcador, a qual decorreu provavelmente dos efeitos do possível estresse oxidativo tecidual induzido pela OPU. Nesse sentido, a menor expressão nos grupos tratados com L-NAME sugere que a depleção do NO pode ter efeito inibidor sobre o estresse oxidativo. A referida sinalização pró-inflamatória, também pode justificar maior grau de edema intersticial, e consequentemente, a maior densidade de luz observada na presença de OPU.

Ainda no estudo de Lin WY, et al. 2007, observou-se diminuição da vascularização da camada muscular nas bexigas dos coelhos tratados com L-NAME + OPU até 8 semanas após a intervenção. No presente estudo, não verificamos diferenças significativas na densidade vascular avaliada por meio da imunomarcagem pelo anticorpo anti-CD31 nos animais submetidos a OPU ou OPU + L-NAME os quais foram significativamente menores que a imunomarcagem observada no grupo SHAM + L-NAME, a qual interpretamos como decorrente da maior densidade muscular, que também foi significativamente maior neste grupo.

Não foram observadas alterações significativas com relação à densidade epitelial nos 4 grupos estudados no presente estudo. Entretanto, em um estudo em coelhos submetidos à OPU e tratados com L-NAME, já citado anteriormente nesta discussão, observou-se que o L-NAME determinou denudação do urotélio (15). A atribuímos esse fato ao desenho do experimento, que não teve por objetivo avaliar alterações do epitélio, o qual não corresponde ao principal alvo de atividade do NO. As hipóteses para explicar tais divergências incluem a diferença no modelo experimental (camundongos versus coelhos), o tempo decorrido da OPU e outras diferenças metodológicas.

As alterações no metabolismo do colágeno e alterações mais significativas na matriz extracelular vesical ocorrem tardiamente no processo de obstrução infravesical. Consideramos que o presente estudo não capturou essa

fase. De fato, é conhecida a hipertrofia do tecido conjuntivo nas fases mais tardias na obstrução infravesical, em contraposição a diminuição da quantidade de fibras musculares lisas (detrusor). O espessamento da parede vesical e sua distensão repetitiva podem decorrer de ciclos de isquemia e reperfusão durante e após cada ciclo miccional (22). Assim, apesar de reconhecermos o potencial efeito do estresse oxidativo (no qual o NO está envolvido) nesse processo, consideramos que outro experimento, com tempos de observação mais prolongados seriam necessários para permitir inferências sobre eventual efeito protetor de um inibidor no NO como o L-NAME nesse processo.

A avaliação da imunomarcacão com anticorpo anti I-NOS teve por objetivo quantificar a produçãO de NO tecidual e avaliar o poder de depleçãO tecidual de NO induzido pelo L-NAME. Entretanto, em nossos resultados nãO foi observada diferençA significativa entre os grupos. Consideramos que variaçõEs na imunoexpressãO da I-NOS nãO foram captadas no estudo, por limitaçãO técnicA, em virtude de sua meia vida curta, embora tenhamos observado tendênciA aumentada de expressãO no grupo OPU.

O NO apresenta funçãO tecidual multifacetada em funçãO de sua concentraçãO e tempo de disponibilizaçãO num determinado processo biológicO. Dessa forma, estudos envolvendo o NO devem ser interpretados com cautela e a comparaçãO de modelos experimentais diferentes pode torna-se imprecisa. Esperamos que nossos achados contribuam para a compreensãO da açãO do NO na OPU e suas consequênciAs e que a metodologia de análise histométrica empregada no presente estudo possa servir de referênciA para futuros modelos experimentais nessa linha de investigaçãO.

No nosso estudo deparamos com alguns fatores limitantes que sugerimos assim, serem aprimorados em um futuro experimento. Assim, a inclusãO de mais marcadores imunohistoquímicos, tais como o anti CD38 (imunomarcador de macófrago) e anti collagen 2 (imunomarcador de neocolagênese) poderiam auxiliar a esclarecer alguns aspectos da influênciA do L-NAME sobre a obstruçãO infravesical.

CONCLUSÃO

A obstrução parcial da uretra associou-se com edema intersticial, o qual foi parcialmente prevenido pela depleção do NO induzida pelo L-NAME, de acordo com os parâmetros histomorfométricos e imunohistoquímicos estudados.

A inibição do NO pelo L-NAME associou-se com inibição da sinalização inflamatória nos camundongos com OPU, segundo os parâmetros histomorfométricos e imunohistoquímicos estudados.

REFERÊNCIAS

1. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, Van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. The standardization of terminology in lower urinary tract function: report from the standardization sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn*.2002;21:167-78.
2. Garraway WM, Collins GN, Lee RJ. High prevalence of benign prostatic hypertrophy in the community. *Lancet*.1991;338:469–71.
3. Oelke M, Bachmann A, Descazeaud A, Emberton M, Gravas S, Michel MC, N'dow J, Nordling J, de la Rosette JJ. EAU guidelines on the treatment and follow-up of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction. *Eur Urol*.2013;64:118-40.
4. McGuire EJ, Cespedes RD, O'Connell HE. Leak-point pressures. *Urol Clin North Am*.1996;23:253-62.
5. Martin-Morales A, Sanchez-Cruz JJ, Saenz De Tejada I, Rodriguez-Vela L, Jimenez-Cruz JF, Burgos-Rodriguez R. Prevalence and independent risk factors for erectile dysfunction in Spain: results of the Epidemiologia de la Disfuncion Erectil Masculina Study. *J Urol*.2001;166:569-75.
6. McMurray G, Casey JH, Naylor AM. Animal models in urological disease and sexual dysfunction. *Br J Pharmacol*.2006;147:S62-79.
7. Mumtaz FH, Khan MA, Thompson CS, Morgan RJ, Mikhailidis DP. Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological implications. *Br J Urol Int*.2000;85:567-78.

8. Ricardo Reges , Carlos D'Ancona, Fabíola Mônica, Edson Antunes. Effect of acute administration of sildenafil to rats with detrusor overactivity induced by chronic deficiency of nitric oxide *Int Braz J Urol.* Mar-Apr 2013;39(2):268-75.

9. Saito M, Miyagawa I. *NG*-nitro-L-arginine methyl ester, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes apoptosis induced by ischemia-reperfusion in the rat bladder. *Neurourol Urodyn.*2002;21:566–71.

10. Felsen D, Dardashti K, Ostad M, Lemer ML, Gross SS, Chen J, Vaughan ED, Poppas DP. Inducible nitric oxide synthase promotes pathophysiological consequences of experimental bladder outlet obstruction. *J Urol.*2003;169:1569-72.

11. Kim JC, Ki DB, Seo SII, Park YH, Hwang TK. Nerve growth factor and vanilloid receptor expression, and detrusor instability, after relieving bladder outlet obstruction in rats. *Br J Urol Int.*2004;94:915-8.

12. Beamon CR, Mazar C, Salkini MW, Phull HS, Comiter CV. The effect of sildenafil citrate on bladder outlet obstruction: a mouse model. *Br J Urol Int.*2008, 104: 252-6.

13. Metcalfe PD, Wang J, Jiao H, Huang Y, Hori K, Moore RB, Tredget EE. Bladder outlet obstruction: progression from inflammation to fibrosis. *BJU Int.* 2010, 1686-94

14. J Salinas Casado, M Virseda Chamorro, A Martín Vega, A Hernández Lao, J A Herrero Payo Experimental study of the expression of the bladder wall proteins in bladder outlet obstruction in the rabbit *Actas Urol Esp.* 2004 May;28(5):341-9.

15. Lin WY, Levin RM, Chichester P, Leggett R, Juan YS, Johnson A, Neumann p, Whitbeck C, Guven A, Kogan B, Mannikarottu A. Effects of L-arginine and L-NAME on chronic partial bladder outlet obstruction in rabbit. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*2007;293:R2390–9.

16. Chichester P, Schröder A, Horan P, Levin RM. Vascular response of the rabbit bladder to chronic partial outlet obstruction. *Mol Cell Biochem.* 2001; 226(1-2):1-8.

17. Chichester P, Lieb J, Levin SS, Buttyan R, Horan P, Levin RM. Vascular response of the rabbit bladder to short term partial outlet obstruction. *Mol Cell Biochem.* 2000; 208(1-2):19-26.

18. Gur S, Sikka SC, Chandra S, Koka PS, Agrawal KC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Alfuzosin attenuates erectile dysfunction in rats with partial bladder outlet obstruction. *. BJU Int,* 2008; 1651-7

19. Takeya Kitta, Yukiko Kanno, Hiroki Chiba, Madoka Higuchi, Mifuka Ouchi, Mio Togo, Kimihiko Moriya, Nobuo Shinohara Benefits and limitations of animal models in partial bladder outlet obstruction for translational research. *Urology.* 2017, volume 25.

20. Yasuyoshi Miyata , Tomohiro Matsuo , Kensuke Mitsunari , Akihiro Asai , Kojiro Ohba , Hideki Sakai. A review of oxidative stress and urinary dysfunction caused by bladder outlet obstruction and treatments using antioxidants. *Antioxidants (Basel).* 2019, 15;8(5):132.

21. Gabella G, Uvelius B. Urinary bladder of rat: fine structure of normal and hypertrophic musculature. *Cell Tiss Res.*1990,262:67–79.

22. Connors W, Whitebeck C, Chichester P, Leggett R, Johnson A, Kogan B, Levin R, Mannikarottu A. L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes oxidative damage in urinary bladder partial outlet obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol.*2006,290:F357–63.

23. F Z T Mónica, A A O Bricola, F R Báú, L L Lopes Freitas, S A Teixeira, M N Muscará, F M F Abdalla, C S Porto, G De Nucci, A Zanesco, E Antunes Long-

term nitric oxide deficiency causes muscarinic supersensitivity and reduces β_3 -adrenoceptor-mediated relaxation, causing rat detrusor overactivity . Br J Pharmacol 2008 Apr;153(8):1659-68.

24. Pereira M L, Carlos Arturo Levi D'ancona , Julio Alejandro Rojas-Moscoso, Antonio Celso Saragossa Ramos Filho, Fabiola Zakia Monica , Edson Antunes. Effects of nitric oxide inhibitors in mice with bladder outlet obstruction Int Braz J Urol 2017;43(2):356-366.

25. Michele Simões, Diogo B de Souza, Carla BM Gallo, Marco A Pereira-Sampaio, Waldemar S. Costa, Francisco J Sampaio. Histomorphometric comparison of the human, swine, and ovine collecting systems. Anat Rec .2016 jul;299(7):967-72.

26. Taiming Liua, Meijuan Zhanga, George T. Mukoseraa, Dan Borchardt, Qian Lic, Trent E. Tipplec, Abu Shufian Ishtiaq Ahmedd, Gordon G. Powere, Arlin B. Blooda. L-NAME releases nitric oxide and potentiates subsequent nitroglycerin-mediated vasodilation. Redox Biology. 2019 September, 101238

ANEXOS

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética.



UNICAMP



CEUA/UNICAMP

INFORMAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP - CEUA/UNICAMP - esclarece que não há necessidade de submeter o projeto de pesquisa "Alterações morfológicas de bexiga de camundongo com obstrução parcial uretral e depleção de óxido nítrico", de responsabilidade do Prof. Carlos Arturo Levi D'Ancona e da pós-graduanda Michele Simões Almeida Silva, para análise desta comissão.

Justifica-se por se tratar de projeto que utilizará resultados previamente obtidos em etapas experimentais realizadas na Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, cujo projeto possui aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais - CEUA/Unicamp protocolo nº 3170-1, parecer de aprovação emitido em 07/10/2013). Não haverá, assim, manipulação *in vivo* na UNICAMP para a execução do projeto atual.

Campinas, 20 de agosto de 2020.



Prof. Dr. WAGNER JOSÉ FÁVARO
Presidente da CEUA/UNICAMP