



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

AKILA LARA DE OLIVEIRA

EFEITO DO METILGLIOXAL NA FUNÇÃO MICCIONAL EM
CAMUNDONGOS: ESTUDO FUNCIONAL E MOLECULAR

*THE EFFECT OF METHYLGLYOXAL ON VOID FUNCTION IN MICE: A
FUNCTIONAL AND MOLECULAR STUDY*

CAMPINAS

2023

AKILA LARA DE OLIVEIRA

EFEITO DO METILGLIOXAL NA FUNÇÃO MICCIONAL EM
CAMUNDONGOS: ESTUDO FUNCIONAL E MOLECULAR

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

ORIENTADOR: EDSON ANTUNES

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
AKILA LARA DE OLIVEIRA, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. EDSON ANTUNES.

Campinas
2023

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

OL4e Oliveira, Akila Lara, 1992-
Efeito do metilglioxal na função miccional em camundongos : estudo funcional e molecular / Akila Lara de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

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

1. Bexiga urinária. 2. Diabetes Mellitus. 3. Complicações do Diabetes. 4. Produtos finais de glicação avançada. 5. Estresse oxidativo. I. Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: The effect of methylglyoxal on void function in mice : a functional and molecular study

Palavras-chave em inglês:

Urinary bladder

Diabetes Mellitus

Diabetes complications

Glycation end products, Advanced

Oxidative stress

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]

Fabiano Beraldi Calmasini

Jamaira Aparecida Victorio

Carlos Renato Tirapelli

Renato Simões Gaspar

Data de defesa: 29-11-2023

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5846-3089>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5464754100623582>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

AKILA LARA DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: EDSON ANTUNES

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. EDSON ANTUNES**
 - 2. PROF. DRA. JAMAIRA APARECIDA VICTORIO**
 - 3. PROF. DR. RENATO SIMÕES GASPAR**
 - 4. PROF. DR. FABIANO BERALDI CALMASINI**
 - 5. PROF. DR. CARLOS RENTAO TIRAPELLI**
-

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia 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: 29/11/2023

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João Batista de Oliveira e Rosária de Fátima Lara (in memoriam), que sempre sonharam em ter uma filha doutora, devo a eles minha dedicação e amor aos estudos.

À minha querida Laila de Fátima (in memoriam), que me acompanhou em todos os meus anos de estudo até aqui, foi e sempre será minha motivação para pesquisar em prol dos animais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido os dons e talentos que me permitiram alcançar todas as minhas conquistas, por ter me mostrado o caminho e por ter colocado grandes oportunidades nele, bem como os ensinamentos que me tornaram e continuam a me tornar uma pessoa melhor a cada dia, para o benefício do próximo, da ciência e da vida.

Dentre essas oportunidades, destaco ter sido abençoado com a orientação do meu orientador, Prof. Dr. Edson Antunes, a quem agradeço imensamente pelo seu trabalho admirável e exemplar como orientador, além da sua personalidade que o torna admirável por sua inteligência e humildade. Sua contribuição para minha carreira e todas as oportunidades de crescimento que tive serão levadas por toda a minha vida como exemplo de orientação e pesquisa.

Meu especial agradecimento ao meu marido, melhor amigo e coautor, Matheus Leite de Medeiros, por ter estado ao meu lado desde que tudo era apenas um sonho, ajudando-me a torná-lo realidade. Seu apoio nos momentos mais desafiadores da minha carreira foi o alicerce que me permitiu comemorar minhas vitórias.

Expresso minha gratidão à minha sogra, Maria Aurora Leite de Medeiros, e ao meu sogro, Antonio Carlos de Medeiros, pelo apoio financeiro, emocional e por torcerem constantemente para que eu alcançasse meus objetivos.

Às minhas irmãs, Sthefany Lara de Oliveira e Smilhyn Lara de Oliveira, e à minha melhor amiga, Jéssica Santos de Almeida, agradeço por torcerem e acreditarem na minha trajetória acadêmica.

Agradeço à Dra. Gláucia Coelho de Mello pela sua amizade, disposição e apoio técnico.

Aos meus amigos e colaboradores do meu trabalho, Dra. Ana Carolina Ghezzi Beghini, Ms. Erick de Toledo Gomes, Dra. Mariana Gonçalves de Oliveira Taranto (especialmente por me auxiliar nos primeiros passos do meu doutorado), Jéssica Bruna da Cunha e Ms. Carolina Coli Zuliani, pelo significativo auxílio técnico no processamento histológico.

Meu agradecimento especial aos colegas do Departamento de Medicina Translacional - área de Farmacologia, tanto aos que passaram quanto aos que estão atualmente, pelo carinho e amizade.

À Professora Fabíola Z. Mônica e aos Professores Gabriel F. Anhê, Stephen Hyslop e Ibsen Bellini Coimbra, agradeço por cederem seus laboratórios para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Translacional - área de Farmacologia, a Cidinha, pelo apoio técnico e administrativo. A Ivani, Ida e Aguinaldo, pela excelência no cuidado diário com os animais de experimentação.

Expresso minha gratidão a todos os animais utilizados nesta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo - 17/15175-1).

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico associado a níveis elevados de glicose sanguínea. O DM leva a complicações, incluindo a disfunção da bexiga diabética (DBD) ou cistopatia diabética, uma condição presente em mais de 50% dos pacientes diagnosticados com DM, especialmente em estados crônicos e não controlados terapêuticamente. As alterações miccionais consistem em diversas manifestações clínicas, como hiperatividade e hipoatividade do músculo liso detrusor. Durante estados de hiperglicemia, ocorre elevação dos níveis de compostos dicarbonílicos, como o metilglioxal (MGO), e aumento na geração de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Esses AGEs são formados pela ligação não enzimática (glicação) do composto dicarbonílico a proteínas, resultando na perda de função das mesmas. Os AGEs interagem com seu receptor (RAGE), desencadeando uma cascata de eventos intracelulares, incluindo o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativação do sistema Rho-quinase. Além disso, ocorre a glicação de proteínas de matriz extracelular, como colágeno, que pode estar implicada na gênese da DBD. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do metilglioxal nas alterações morfológicas, moleculares e funcionais da bexiga em camundongos. Também buscamos avaliar se abordagens terapêuticas para eliminação do MGO refletem na melhora da disfunção da bexiga causada por MGO/AGEs. Para isso, utilizamos a metformina e o cloreto de alagebrium. Na primeira parte do estudo, investigamos os efeitos da administração crônica de MGO (na concentração de 0,5%, por 12 semanas) em camundongos saudáveis, fêmeas, da linhagem C57BL6. Na segunda parte, analisamos os efeitos de fármacos limitantes do MGO, utilizando a metformina (300 mg/kg, 2 semanas) em camundongos saudáveis, machos, da linhagem C57BL6. Além disso, empregamos um modelo animal de DM 2, utilizando camundongos deficientes de leptina ob/ob, machos e fêmeas, e administrando cloreto de alagebrium (ALT-711; "inibidor" de AGE). Realizamos testes para avaliar a função miccional *in vivo* (ensaio do papel de filtro em animais acordados e cistometria de enchimento em animais anestesiados), contratilidade detrusora *in vitro* e avaliação de alterações do eixo MGO-AGE-RAGE por meio de estudos moleculares (ELISA, *western blotting*, RT-PCR e imuno-histoquímica) no soro e bexiga dos animais. Investigamos a participação do canal iônico de potencial receptor transitório (TRPA1) nas alterações vesicais produzidas pela ativação do eixo MGO-AGE-RAGE e geração de EROs, bem como a ativação da Rho-quinase. O acúmulo sérico de MGO elevou os níveis dos AGEs e ativou a sinalização RAGE-EROs, levando à sensibilização muscular induzida pela Rho-quinase e à hiperatividade detrusora. A ativação do TRPA1 no urotélio pelo MGO causou bexiga hiperativa. O tratamento dos animais com metformina reduziu os níveis

de MGO e de AGE, bem como as alterações histológicas e funcionais da bexiga em animais tratados com MGO, sugerindo que a melhora da disfunção miccional pela metformina depende de sua capacidade de eliminar MGO, evitando seu acúmulo no sangue. No modelo animal ob/ob, machos e fêmeas, detectamos níveis significativamente elevados de MGO, AGEs totais, AGEs fluorescentes (F-AGEs), hidroimidazolona (MG-H1) e colágeno no soro e/ou bexigas em comparação com o grupo magro. Camundongos ob/ob apresentaram disfunção miccional (ensaio do papel de filtro). O tratamento com ALT-711 reduziu significativamente os níveis de MGO, AGEs, RAGE e conteúdo de colágeno em camundongos ob/ob, mostrando que a quebra dos AGEs e diminuição do MGO está implicada na DBD do animal ob/ob. Os níveis aumentados de MGO no soro e, conseqüentemente, dos AGEs, levam ao aumento da expressão de RAGE na bexiga, evidenciando um importante papel do eixo MGO > AGEs > RAGE na DBD. Fármacos eliminadores de MGO e de AGEs podem ser estratégias importantes para melhorar ou minimizar a DBD causada pela ativação desse eixo.

Palavras-chave: Bexiga Urinária; Diabetes Mellitus; Complicações do Diabetes; Produtos Finais de Glicação Avançada; Glioxalase; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder associated with high blood glucose levels. DM leads to complications, including diabetic bladder dysfunction (DBD) or diabetic cystopathy, a condition present in more than 50% of patients diagnosed with DM, especially in chronic and therapeutically uncontrolled states. Voiding changes consist of several clinical manifestations, such as hyperactivity and hypoactivity of the detrusor smooth muscle. During states of hyperglycemia, there is an increase in the levels of dicarbonyl compounds, such as methylglyoxal (MGO), and an increase in the generation of advanced glycation end products (AGEs). These AGEs are formed by the non-enzymatic binding (glycation) of the dicarbonyl compound to proteins, resulting in their loss of function. AGEs interact with their receptor (RAGE), triggering a cascade of intracellular events, including increased generation of reactive oxygen species (ROS) and activation of the Rho-kinase system. Furthermore, glycation of extracellular matrix proteins, such as collagen, occurs, which may be implicated in the genesis of DBD. The objectives of this work were to evaluate the effects of methylglyoxal on morphological, molecular and functional changes in the bladder in mice. We also sought to evaluate whether therapeutic approaches to eliminate MGO reflect an improvement in bladder dysfunction caused by MGO/AGEs. For this, we use metformin and alagebrium chloride. In the first part of the study, we investigated the effects of chronic administration of MGO (at a concentration of 0.5%, for 12 weeks) in healthy female mice of the C57BL6 lineage. In the second part, we analyzed the effects of MGO-limiting drugs, using metformin (300 mg/kg, 2 weeks) in healthy male mice of the C57BL6 lineage. Furthermore, we employed an animal model of DM 2, using leptin-deficient ob/ob mice, male and female, and administering alagebrium chloride (ALT-711; AGE "inhibitor"). We performed tests to evaluate voiding function in vivo (filter paper assay in awake animals and filling cystometry in anesthetized animals), detrusor contractility in vitro and evaluation of changes in the MGO-AGE-RAGE axis through molecular studies (ELISA, western blotting, RT-PCR and immunohistochemistry) in the serum and bladder of the animals. We investigated the participation of the transient receptor potential ion channel (TRPA1) in the bladder changes produced by the activation of the MGO-AGE-RAGE axis and generation of ROS, as well as the activation of Rho-kinase. Serum MGO accumulation elevated AGE levels and activated RAGE-ROS signaling, leading to Rho-kinase-induced muscle sensitization and detrusor hyperactivity. Activation of TRPA1 in the urothelium by MGO caused overactive bladder. Treatment of animals with metformin reduced MGO and AGE levels, as well as histological and functional changes in the bladder in animals treated with MGO, suggesting that the

improvement of voiding dysfunction by metformin depends on its ability to eliminate MGO, preventing its accumulation. in the blood. In the ob/ob animal model, males and females, we detected significantly elevated levels of MGO, total AGEs, fluorescent AGEs (F-AGEs), hydroimidazolone (MG-H1) and collagen in serum and/or bladders compared to the lean group. ob/ob mice showed voiding dysfunction (filter paper assay). ALT-711 treatment significantly reduced the levels of MGO, AGEs, RAGE and collagen content in ob/ob mice, showing that the breakdown of AGEs and decrease in MGO is implicated in the DBD of the ob/ob animal. Increased levels of MGO in the serum and, consequently, of AGEs, lead to increased expression of RAGE in the bladder, highlighting an important role of the MGO > AGEs > RAGE axis in DBD. Drugs that eliminate MGO and AGEs can be important strategies to improve or minimize DBD caused by the activation of this axis.

Key-words: Urinary Bladder; Diabetes Mellitus; Diabetes Complications; Glycation End Products, Advanced; Glyoxalase; Oxidative Stress.

LISTA DE REAGENTES E FORNECEDORES

Drogas:

Ácido ciclopiazônico: Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha;

Carbacol: Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha;

Cloreto de alagebrium (ALT-711): Med Chem Express, NJ, Estados Unidos da América;

Cloridrato de metformina: (adquirido em farmácia);

Diidroetídio (DHE): Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha;

Insulina regular: Humulin R, Ely Lilly, Estados Unidos da América

Inibição de protease: Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha

Metilglioxal 40%: Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha

Superóxido dismutase-polipropileno glicol (PEG-SOD): Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha

RIPA, tampão: Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha

α,β -metileno ATP: Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha;

HC-030031 (inibidor do TRPA1): Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha;

TRIZOL: Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América;

Y27632 (Inibidor da Rho-quinase): Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha

Anticorpos:

IgG anti-*mouse* biotinilado: Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha;

IgG anti-*rabbit*-HRP: Cell Signaling Technology, Massachusetts, Estados Unidos da América;

Anti-glioxalase: Abcam, Cambridge, Reino Unido;

Anti-MG-H1: Cell Biolabs, San Diego, Estados Unidos da América;

Anti-TRPA1: Novus Biologicals, LLC, Estados Unidos da América.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Problema de pesquisa: Disfunção da bexiga causada pelo Diabetes Mellitus: A heterogeneidade dos fenótipos clínico e a importância de estudos pré-clínicos na compreensão da doença	15
1.2 A importância de estudos pré-clínicos na compreensão da DBD.....	16
1.3 Compreensão da fisiologia da micção: Trato urinário inferior, anatomia, histologia e o ciclo miccional.....	18
1.4 Hiperglicemia, metilglioxal (MGO) e seus produtos finais de glicação avançada (AGEs): O eixo MGO-AGE-RAGE	26
1.5 Abordagens terapêuticas para limitar o MGO	30
1.6 Justificativa e relevância.....	31
1.7 Hipótese	32
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Caracterização dos efeitos crônicos do MGO em camundongos fêmeas tratadas por 12 semanas.....	34
3.2. Abordagens terapêuticas para limitar o metilglioxal: papel da metformina e do ALT-711	35
3.2.1 Abordagens terapêuticas para limitar o MGO: efeito da metformina em camundongos machos	35
3.2.2 Abordagens terapêuticas para limitar o metilglioxal: efeito do ALT-711 em camundongos controles e obesos deficientes de leptina, machos e fêmeas	35
3.3 Protocolos experimentais.....	36
3.4 Análise estatística	49
4. RESULTADOS	50
4.1. Caracterização dos efeitos crônicos do MGO em camundongos fêmeas tratadas por 12 semanas.....	50
4.1.1 Ativação do TRPA1 pelo MGO induz fenótipo de bexiga hiperativa em fêmeas.....	59
4.1.2 Papel da via MGO-AGE-RAGE-EROs na hipercontratilidade detrusora.....	64
4.2. Abordagens terapêuticas para limitar o MGO: efeito da metformina em camundongos machos	70

4.2.1 Abordagens terapêuticas para limitar o metilglioxal: efeito do ALT-711 em camundongos controles e obesos deficientes de leptina, machos e fêmeas	77
5. DISCUSSÃO	88
5.1 Caracterização dos efeitos crônicos do MGO em camundongos fêmeas tratadas por 12 semanas.....	88
5.2 Efeitos da metformina nas alterações produzidas pela administração crônica de MGO em camundongos machos	93
5.3 Via MGO-AGEs-RAGE e disfunção miccional em camundongos diabéticos, obesos ob/ob	96
5.4 Tratamento com ALT-711 em modelo animal de DM2.....	98
6. SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....	100
6.1 Caracterização dos efeitos crônicos do MGO, em fêmeas tratadas por 12 semanas:.....	100
6.2 Abordagens terapêuticas para limitar o MGO: efeito da metformina em camundongos machos	100
6.3 Abordagens terapêuticas para limitar o metilglioxal: efeito do ALT-711 em camundongos controles e obesos deficientes de leptina, machos e fêmeas.....	100
REFERÊNCIAS.....	102
APÊNDICE	118
ANEXOS.....	119

1. INTRODUÇÃO

1.1 Problema de pesquisa: Disfunção da bexiga causada pelo Diabetes Mellitus: A heterogeneidade dos fenótipos clínico e a importância de estudos pré-clínicos na compreensão da doença

Alterações no ciclo miccional envolvendo o enchimento e o esvaziamento da bexiga podem ocorrer por problemas no detrusor, urotélio, uretra, irrigação sanguínea e inervação autonômica e somática^{1,2}. Clinicamente, alterações do ciclo miccional desencadeiam os chamados sintomas do trato urinário inferior, também referidos como LUTS (da sigla *Lower Urinary Tract Symptoms*), como aumento da frequência e urgência urinária, os quais podem piorar significativamente a qualidade de vida do indivíduo e gerar custos elevados em saúde³. Dentre as doenças associadas às alterações no ciclo miccional, destaca-se o Diabetes Mellitus (DM), referidas como “disfunção da bexiga diabética” (DBD) ou cistopatia diabética⁴. De modo geral, a DM do tipo 1 (DM1) manifesta-se pela destruição de células β -pancreáticas por autoantígenos específicos por linfócitos T, e contribui em cerca de 5% a 10% do total de casos diagnosticados⁵. Por outro lado, a DM tipo 2 (DM2), relacionada, principalmente, à obesidade e estilo de vida sedentário, é a forma mais comum da doença, caracterizando-se como um agravamento progressivo da resistência à insulina, bem como aumentos compensatórios da secreção de insulina, levando à exaustão e falência das ilhotas pancreáticas⁶.

A DBD foi inicialmente descrita em 1935⁷, e posteriormente caracterizada em 1980⁸ como uma doença de difícil precisão em relação à sua incidência e prevalência. Atualmente, sabe-se que a prevalência da DBD é superior a 50% em pacientes diagnosticados com DM1 ou DM2, especialmente em estados crônicos ou em pacientes sem controle adequado da doença^{6,9}. A DBD é descrita como uma tríade que envolve diminuição da sensibilidade da bexiga e aumentos da sua complacência e capacidade, que pode evoluir para prejuízo da contratilidade detrusora e retenção urinária^{6,10}.

Atualmente, com a observação clínica mais precisa e com a utilização de estudos urodinâmicos, a DBD passou a ser definida como uma ampla gama de sintomas do trato urinário^{6,9,11}, que pode variar de hiperatividade^{12,13} a hipocontratilidade detrusora¹⁴, podendo manifestar-se de diversas formas, como arreflexia, retenção urinária, incontinência por transbordamento, incontinência de urgência^{6,15} e aumento da capacidade da bexiga⁹. No geral, essa grande variedade de sintomas da DBD implica em um fenótipo bastante heterogêneo¹⁶. Entretanto, um importante aspecto a ser considerado na investigação da DBD é a diferença na prevalência dos sintomas urinários dependendo do tipo de diabetes, que pode ser da ordem de

43 a 87% na DM1¹⁶ e 25% na DM2^{14,16}, com um aumento de 20% de incontinência urinária em mulheres com DM2¹⁷. Ressalta-se, entretanto, que estes estudos de prevalência têm limitações, pois são retrospectivos e não se concentram nos mecanismos subjacentes à doença, nem são realizados acompanhamentos a longo prazo dos pacientes¹⁶.

Como forma geral, foram propostos dois estados diferentes de DBD com base nos sintomas do paciente e em nível experimental¹⁵. A fase inicial do DBD se manifesta por problemas de armazenamento (urgência e urgeincontinência) e hipercontratilidade do detrusor, enquanto a fase tardia do DBD (após hiperglicemia prolongada e resistência à insulina) se manifesta pela incapacidade da bexiga de esvaziar, causando alta incontinência pós-miccional residual e de transbordamento, e atividade detrusora descompensada¹⁵.

De acordo com as diretrizes para Distúrbios do Trato Urinário Inferior (LUTS), os tratamentos farmacológicos recomendados para distúrbios urinários incluem antagonistas dos receptores α 1-adrenérgicos, inibidores da enzima 5 α -redutase e inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), especialmente nos casos de hiperplasia prostática benigna (HPB)¹⁸. Os antagonistas dos receptores muscarínicos e agonistas de adrenoceptores β 3 podem ser utilizados, particularmente, se o paciente apresentar bexiga hiperativa¹⁹. Mas, de modo geral, essas intervenções farmacológicas parecem ser menos eficazes no LUTS relacionado ao DM, ressaltando-se que em alguns casos podem até piorar o quadro existente de DBD^{20,21}. Dessa forma, a utilização de medicamentos direcionados especificamente ao tratamento de DBD necessita de melhor avaliação, havendo nessa desordem várias janelas de pesquisa ainda a serem exploradas.

1.2 A importância de estudos pré-clínicos na compreensão da DBD

É crucial destacar que os modelos animais de DM1 e DM2 têm sido fundamentais para se compreender os mecanismos subjacentes à DBD¹¹. Os modelos espontâneos de desenvolvimento do DM em roedores podem ser categorizados em DM1 e DM2, sendo amplamente estudados em várias áreas da pesquisa biomédica. Por exemplo, no DM1, o camundongo NOD (*non-obese diabetic mice*) desenvolve insulite na idade de 3 a 4 semanas e DM / hiperglicemia entre 12 e 30 semanas, sendo os mecanismos que levam à DM muito semelhantes àqueles da DM1 humana, os quais envolvem alterações da resposta autoimune mediada por células T e B, macrófagos e células natural Killer (NK)²²⁻²³. O camundongo Ins2AKITA tem hiperglicemia devido à deficiência de produção de insulina causada por mutação no gene da insulina-2, ao passo que o rato *BioBreeding* (BB) desenvolve hiperglicemia devido à ativação autoimune contra as células β -pancreáticas²². Entretanto, a

maioria dos estudos relacionados à DBD em modelos animais foi conduzida no modelo de DM1 por meio da administração de estreptozocina, que induz a destruição das células beta produtoras de insulina no pâncreas^{23,24}. No que diz respeito aos modelos de DM2, há o rato obeso Zucker (ZFR) e o rato obeso diabético Zucker (ZDF). O ZDF tem uma mutação autossômica recessiva no cromossomo 5, que resulta em modificação genética do receptor de leptina no hipotálamo, levando à hiperglicemia e obesidade²². O camundongo ob/ob (Lepr^{ob}) também apresenta hiperglicemia devido a uma mutação autossômica recessiva no cromossomo 6, que leva à modificação genética no gene da leptina, resultando na ausência de produção deste hormônio²²⁻²⁶. O camundongo ob/ob manifesta hiperfagia, diminuição do gasto energético e obesidade, sendo a DM caracterizada por hiperglicemia e intolerância à insulina variando de discreta a moderada²². Por fim, o camundongo db/db (Lepr^{db}) desenvolve hiperglicemia devido a uma mutação genética no receptor de leptina, levando também à obesidade. Este camundongo db/db apresenta semelhanças com o animal ob/ob, porém tem hiperglicemia mais grave, sendo mais utilizado como modelo de diabetes descompensado^{22,26}.

As alterações miccionais *in vivo* observadas nestes modelos animais de DM têm sido caracterizadas principalmente por meio de técnicas de avaliação urodinâmica no animal anestesiado (cistometria) bem como por estudo do comportamento miccional em animais acordados (técnica do papel de filtro)²⁶⁻²⁹. O camundongo NOD, por exemplo, apresenta número de micções e volume total de urina maiores em relação aos controles; apresenta também distribuição anormal das manchas de micção no centro do papel de filtro, parecendo indicar hiperatividade urinária e urgência/perda de micção²⁸⁻²⁹, ao passo que na análise urodinâmica são observados aumento da capacidade da bexiga e redução na pressão intravesical²⁶⁻²⁹. No modelos de estreptozotocina, identificaram-se efeitos temporais que incluem hipertrofia e remodelação da bexiga devido à polidipsia e subsequente poliúria²²⁻²³; essas alterações, a longo prazo, resultam em aumento da contratilidade detrusora, seguido por uma redução da contratilidade e, conseqüentemente, diminuição na capacidade da bexiga e aumento do volume residual^{23,24}.

Nos modelos de DM2, tanto para ob/ob como db/db, notam-se aumentos no volume total de urina, da capacidade da bexiga e do volume de micção^{26, 29-30}, enfatizando-se que esses modelos são importantes para o estudo da DBD, pois têm características fenotípicas heterogênicas da DBD³¹. Os estudos de contratilidade detrusora *in vitro*, que em princípio ajudam a caracterizar o fenótipo de disfunção miccional, são escassos nesses modelos espontâneos de DM.

Os modelos de indução de obesidade e resistência à insulina por meio de dieta hiperlipídica também são empregados para elucidar as alterações no trato urinário inferior³⁰⁻³². Nesses modelos, as alterações urodinâmicas se caracterizam por aumentos na frequência da micção e no número de contrações involuntárias³³, bem como aumento na contratilidade da bexiga em resposta a agonistas muscarínicos³³. No entanto, estas observações podem variar em relação ao tempo de consumo da dieta pelo animal e à composição da dieta, os quais constituem pontos relevantes a serem considerados quando se analisa as variações miccionais nesse modelo^{27, 34}. Portanto, os modelos pré-clínicos de DBD são importantes para o entendimento dessa disfunção, pois permitem avaliar as diversas manifestações fenotípicas e compreender a história natural da doença, além de analisar o efeito temporal da DM. Também são úteis para compreender as alterações multifatoriais do DBD no nível do músculo liso detrusor, urotélio e inervação neuronal¹¹.

1.3 Compreensão da fisiologia da micção: Trato urinário inferior, anatomia, histologia e o ciclo miccional

O ato de urinar é um processo aparentemente muito simples, muitas vezes subestimado em sua importância no contexto fisiológico. Isso pode explicar por que o diagnóstico dos sintomas relacionados ao trato urinário inferior pode ser complexo e desafiador para os pacientes, que muitas vezes não reconhecem que algo está errado e, consequentemente, não buscam ajuda médica³⁵.

Armazenar e eliminar a urina inúmeras vezes ao longo do dia é uma função coordenada pelo trato urinário inferior, no qual a bexiga urinária atua como um reservatório, acomodando a urina sob baixas pressões de enchimento, enquanto o colo da bexiga, uretra e esfíncter uretral atuam como a saída do reservatório, permitindo a continência urinária³³⁻³⁴. O sistema nervoso central (SNC) controla a coordenação entre a bexiga e uretra, que é mediada pela participação do cérebro, medula espinhal e gânglios periféricos³³.

A bexiga é um órgão oco composto por uma parede especializada denominada urotélio, que está em contato com a luz, e por uma camada de musculatura lisa chamada detrusor, que é revestida externamente por uma serosa^{35,36}. A principal função da bexiga é armazenar passivamente a urina produzida pelos rins e eliminá-la intermitentemente de forma consciente e controlada^{36,37}. Portanto, o funcionamento da bexiga envolve dois modos de atividade, armazenamento e eliminação da urina³⁶. Embora a micção ocorra de maneira

voluntária e seja aprendida comportamentalmente, seu processo requer a integração de mecanismos do sistema nervoso autônomo e somático³⁵⁻³⁷.

No que diz respeito à sua anatomia, a bexiga pode ser subdividida em duas regiões distintas. Acima dos orifícios ureterais, por onde a urina flui dos rins através dos ureteres, encontra-se o corpo da bexiga³⁴. Nessa região, o músculo predominante é conhecido como detrusor^{34,36}. Abaixo desses orifícios ureterais, encontramos a região chamada de base da bexiga, cujo principal componente muscular é o trígono. Nessa área também é encontrada a junção uretrovesical, onde está localizado o esfíncter uretral interno^{33,34}.

Na Figura 1, apresentamos a anatomia do trato urinário inferior, com ênfase no dimorfismo sexual. No trato urinário inferior feminino, observa-se a presença de uma uretra menor, e no trato urinário inferior masculino uma uretra maior e presença da próstata adjunta à bexiga e uretra. A extensão da uretra vai do orifício interno ao externo, havendo também uma camada mais externa de músculo estriado esquelético, que recebe o nome de rabdoesfincter^{33,34}, que permite o controle voluntário da micção.

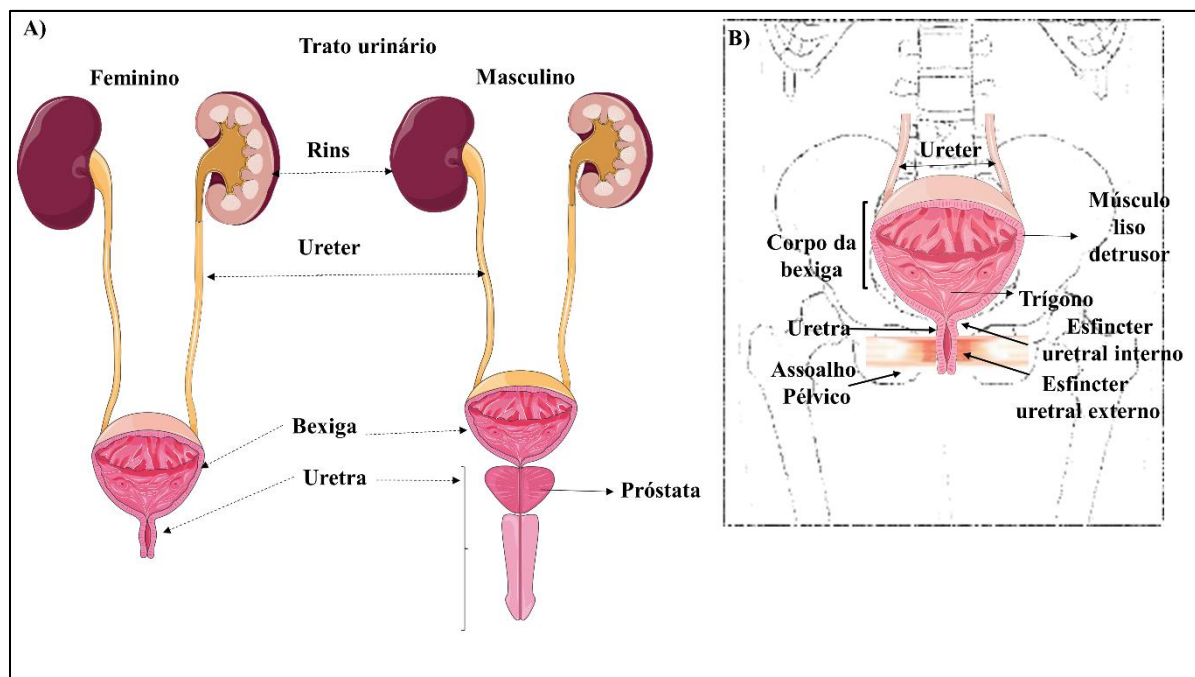


Figura 1. Anatomia do trato urinário. A figura mostra diferenças anatômica entre o trato urinário inferior feminino e masculino (A), no trato urinário inferior feminino, observa-se a presença de uma uretra menor, e no trato urinário inferior masculino uma uretra maior e presença da próstata adjunta à bexiga e uretra. Em (B) são evidenciadas a composição da bexiga urinária, uretra e esfíncteres. A figura foi criada pela autora conforme descrito em ^{33,34} e partes da figura foram ilustradas a partir de imagens disponível e licenciadas em *Servier Medical Art.* ³⁸.

O urotélio é classificado como epitélio estratificado, ou seja, possui múltiplas camadas^{39,40}. Em contato com a urina, no lúmen, há a camada superficial, que recebe o nome de células guarda-chuva, uma camada intermediária, que varia em quantidade de acordo com a espécie animal, e uma única camada de células basais³⁹. A morfo-fisiologia do urotélio difere grandemente de outros tipos de epitélios do corpo, pois apresenta uma transição morfológica que varia de acordo com o fluido urinário recebido pelos ureteres, de maneira que a camada mais superficial e todo o urotélio em si encontram-se distendidos quando a bexiga está cheia, e enrugado quando a bexiga está vazia^{39,40}. Suas funções incluem a formação de uma barreira impermeável a íons, solutos e patógenos e a amplificação de sinais sensoriais, bem como a interação com fibras nervosas, músculo liso, vasos sanguíneos e células intersticiais^{40,41}. O urotélio responde a diversos estímulos químicos, mecânicos e térmicos⁴².

Na Figura 2, apresentamos as alterações histológicas do urotélio em estados de bexiga cheia de urina, e vazia, evidenciando as alterações das pregas do urotélio.

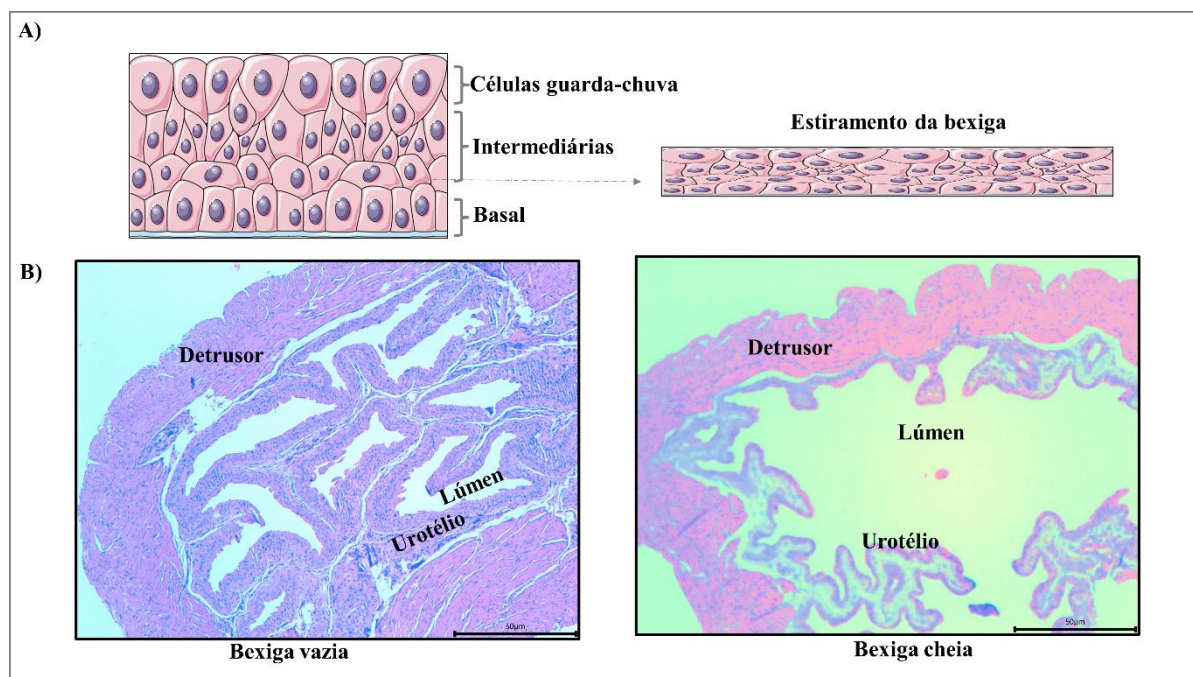


Figura 2. Alterações no urotélio durante o enchimento e esvaziamento vesical. O urotélio possui três camadas de células: uma camada basal, uma intermediária e uma superficial. Durante o enchimento da bexiga, ocorre o estiramento do urotélio (A). A histologia da bexiga, com alterações no urotélio na fase de esvaziamento (bexiga vazia) e enchimento da bexiga (bexiga cheia), é evidenciada no painel (B). As imagens histológicas são de autoria da autora. Partes da figura foram desenhadas a partir de imagens da *Servier Medical Art*³⁸.

Em relação à morfologia do detrusor, foram descritas três camadas de músculo liso, com as células das camadas externa e interna orientadas longitudinalmente, enquanto as camadas intermediárias têm orientação circular¹². Os feixes de células musculares são envolvidos por tecido conjuntivo rico em colágeno¹², que desempenha um papel crucial nas propriedades elásticas da bexiga⁴³. Portanto, alterações no colágeno podem afetar sua função fundamental de acomodação de volume e complacência (capacidade de expandir sem alterações significativas na pressão)⁴³⁻⁴⁴. Os principais tipos de colágeno presentes na bexiga são os tipos I e III, representando aproximadamente 75% e 25%, respectivamente. Assim, estabelece-se uma relação de colágeno tipo III para tipo I de 1:3^{43,44}.

As fases de armazenamento e eliminação da urina pela bexiga são conhecidas como ciclo miccional. Esse ciclo ocorre várias vezes ao dia e envolve a sincronia das ações da musculatura lisa do detrusor e da uretra, sendo o sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático fundamental para manter essa sincronia⁴⁵ (Figura 3).

Assim, durante a fase de armazenamento da urina, há ativação do nervoso autônomo simpático, que se origina da porção superior lombar da medula espinhal e do gânglio mesentérico inferior³⁴. A liberação de noradrenalina e ativação de receptores $\beta 2/3$ -

adrenérgicos no detrusor leva ao relaxamento deste tecido, cuja sinalização intracelular se dá, principalmente, por ativação de adenilato ciclase e formação subsequente de AMP cíclico; ao mesmo tempo, durante a fase de armazenamento, a musculatura lisa da uretra encontra-se contraída em resposta à ativação dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, sendo a noradrenalina o principal mediador dessas respostas^{33,44}, cuja ação neste tecido é mediada por ativação de Gq/fosfolipase C e subsequente formação de diacilglicerol (DAG) e inositoltrisfosfato (IP3)^{35,44}.

Na fase de eliminação da urina, predomina o tônus parassimpático, exercido por fibras parassimpáticas, que se originam da porção sacral da medula espinhal que inervam a bexiga e uretra via nervo pélvico⁴⁶. Nesta fase há liberação de acetilcolina (ACh) no detrusor, que leva à contração deste tecido por meio da ativação de receptores muscarínicos, principalmente do tipo M_3 ⁴⁵, que culmina com influxo extracelular de cálcio via canal L^{33,47}; nessa fase de eliminação, também há participação do neurotransmissor ATP, liberado pelas fibras colinérgicas, exercendo, portanto, papel de cotransmissor excitatório, que evoca contração da bexiga por ativação de receptores purinérgicos do tipo P2X⁴⁸⁻⁵⁰. Por fim, o nervo pudendo é responsável pela condução do sinal de fibras somáticas para o esfíncter uretral externo, desempenhando papel crucial na contenção urinária, sendo esse mecanismo mediado pela ativação de receptores nicotínicos, os quais, uma vez ativados, leva à despolarização das células musculares, levando à sua contração^{1,14}.

A inervação aferente na bexiga desempenha um papel fundamental nas sensações locais, sendo mediada por fibras nervosas que se originam nos gânglios da raiz dorsal^{51,52}. Essas fibras atravessam o gânglio pélvico e se interconectam com as fibras pós-ganglionares eferentes motoras após passarem pelos ramos urinários do nervo pélvico, inserindo-se em todas as camadas da parede da bexiga⁵³. No urotélio, encontramos uma abundância de nervos aferentes⁴², sendo que no músculo detrusor há a presença de fibras A/ δ e do tipo C⁵⁴. As fibras aferentes na bexiga desempenham principalmente dois papéis essenciais, o de detectar a distensão da bexiga, desempenhando um papel crucial na detecção da sensação de bexiga cheia, o que desencadeia o reflexo da micção⁵⁵; e na detecção de estímulos de dor, e variações térmicas e químicas no ambiente da bexiga⁵⁵.

No que diz respeito à regulação da parte sensorial, que envolve o limiar de micção, percepção de enchimento e dor da bexiga, os receptores de potencial transitório (TRP), referidos como canais iônicos, desempenham um papel importante⁴². A superfamília TRP engloba uma ampla variedade de canais catiônicos com diversas funções celulares, tanto fisiológicas quanto patológicas. Dentro dessa família, incluem-se TRP anquirina 1 (TRPA1),

TRP vanilóide 1 (TRPV1), TRPV3, TRPV4 e TRP melastatina 8 (TRPM8)⁴². Quando ativados, esses canais induzem alterações na excitabilidade da membrana e na regulação do cálcio extracelular. Os canais TRPs estão presentes na bexiga, atuando como sensores de estiramento e/ou irritação química, sendo encontrados tanto em neurônios aferentes primários quanto no urotélio⁴².

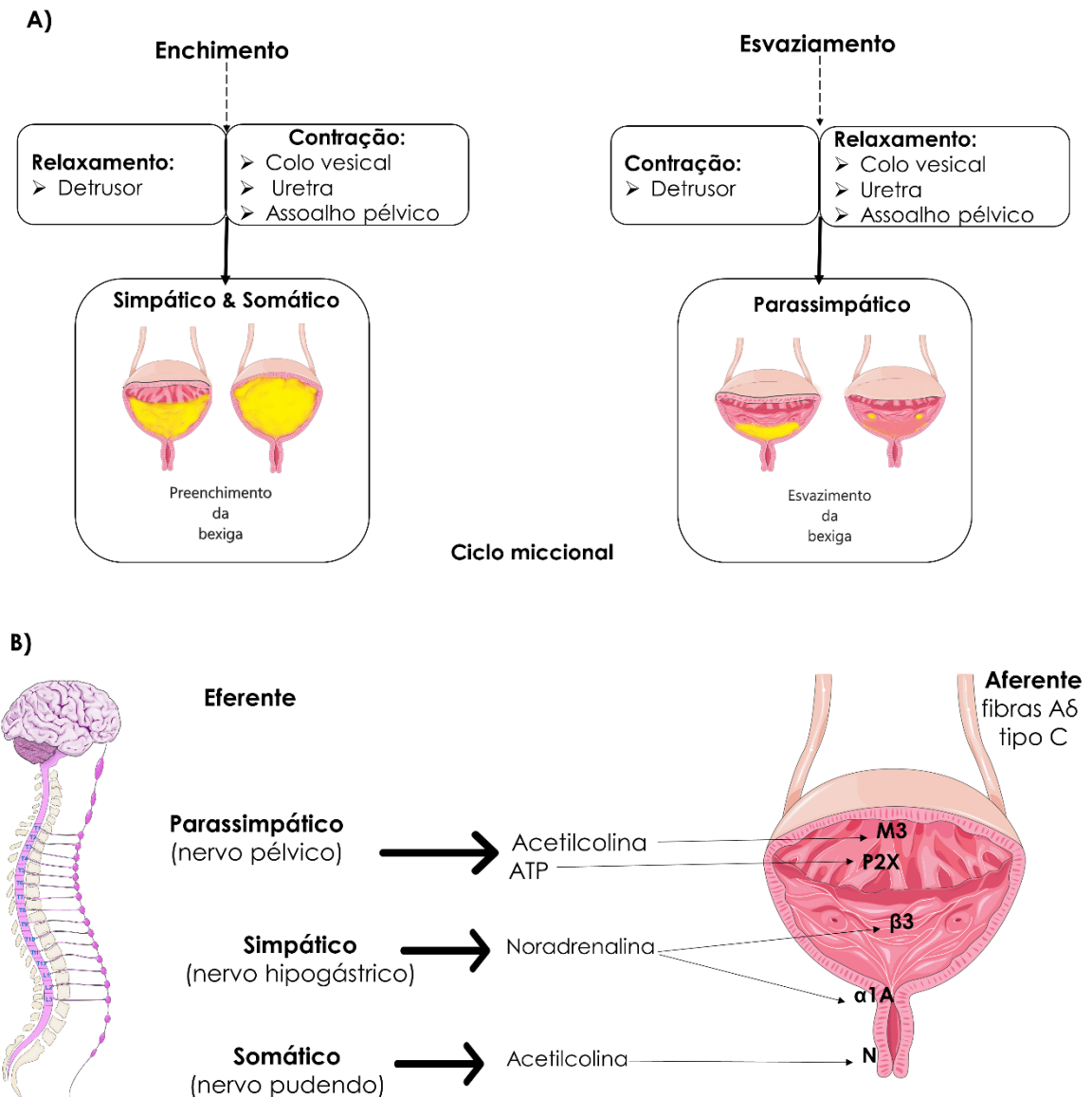


Figura 3. Esquematização da fase de enchimento e esvaziamento da bexiga. O ciclo miccional envolve a sincronia da musculatura lisa detrusora e da uretra. Em (A), são evidenciados a fase de enchimento, com a participação do sistema nervoso autônomo simpático e do sistema nervoso somático. Nesta fase, o detrusor relaxa, enquanto o colo vesical, a uretra e o assoalho pélvico contraem. Já na fase de esvaziamento, com a participação do sistema nervoso autônomo parassimpático, o detrusor contrai para eliminar a urina, e o colo vesical, a uretra e o assoalho pélvico relaxam, permitindo a passagem da urina. Em (B), são apresentados o controle neuronal do trato urinário inferior. Partes da figura foram desenhadas a partir de imagens da *Servier Medical Art*³⁸.

Em relação à sinalização intracelular durante a fase de eliminação da urina, a contração do detrusor é predominantemente mediada pela ativação das fibras parassimpáticas, que levam à liberação de ACh e à ativação dos receptores muscarínicos¹², conforme descrito anteriormente. A manutenção da contração do músculo liso ocorre através da participação da via Rho-A e da Rho-quinase, superfamília de proteínas, envolvida em diversos processos regulatórios relacionados à contração celular^{56,57}. Três isoformas da proteína Rho são conhecidas, a saber: Rho-A, Rho-B e Rho-C, sendo a Rho-A a mais abundante⁵⁸. As proteínas Rho atuam como intermediárias efetoras na sinalização após a ativação de agonistas de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), desempenhando um papel crítico na regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina e na geração de contratilidade actina-miosina em músculos lisos, sejam eles vasculares ou não vasculares⁵⁹.

A Rho-A tem como alvo as enzimas Rho-quinases, também conhecidas como ROCKs⁵⁶. As Rho-quinases são serina/treonina quinases com peso molecular de 160 kDa e compreendem duas isoformas, ROCK1 e ROCK2^{56,57}. A ativação da Rho-A é necessária para ativar as ROCKs, sendo que a atividade da Rho-A é controlada pelos fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs), que catalisam a troca do Rho-GDP inativo pelo estado ativo de Rho-GTP⁵⁶⁻⁵⁸. A Rho-A ativada se liga às ROCKs, resultando em alterações conformacionais dessas enzimas e na subsequente ativação⁵⁶⁻⁵⁸.

A contração da musculatura lisa envolve um equilíbrio entre a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP)⁶⁰. A ligação do agonista aos receptores acoplados a proteínas G (do tipo Gq/G11) leva à ativação da Gq e da fosfolipase C (PLC), desencadeando a formação de IP3 e DAG^{59,60}. Isso resulta na abertura de canais de Ca²⁺ e no aumento do influxo celular de Ca²⁺. O Ca²⁺ forma um complexo com a calmodulina, ativando a MLCK e levando à fosforilação da cadeia MLC e, conseqüentemente, à contração tecidual.

A enzima MLCP possui três subunidades: uma subunidade catalítica PP1c δ , uma reguladora MYPT1 e uma subunidade de 20 kDa⁶⁰. A fosforilação da MLC pela MLCK, dependente de Ca²⁺, é modulada por MYPT1^{60,61}. A ativação da Rho-quinase regula o nível de fosforilação da MLC, ou seja, ela fosforila diretamente essa enzima e inativa a MLCP através da fosforilação de MYPT1 em Thr697 e Thr855, aumentando assim a fosforilação da MLC e, conseqüentemente, a contratilidade da musculatura lisa^{60,61}.

1.4 Hiperglicemia, metilglioxal (MGO) e seus produtos finais de glicação avançada (AGEs): O eixo MGO-AGE-RAGE

O metilglioxal (MGO) é um composto orgânico pertencente à família dos aldeídos. Sua estrutura química consiste em um grupo carbonila (C=O) ligado a dois átomos de carbono, sendo conhecido como composto dicarbonílico altamente reativo com macromoléculas^{62,63}. A formação de MGO ocorre principalmente em condições metabólicas que envolvem aumento no metabolismo da glicose, como a hiperglicemia associada ao DM e obesidade⁶²⁻⁶⁷. Outras fontes de MGO incluem a oxidação da acetona, peroxidação lipídica, degradação de proteínas glicadas pela glicose e degradação de monossacarídeos⁶².

Uma das principais características do MGO é sua capacidade reativa, ou seja, esta molécula pode reagir com proteínas e lipídeos, através de um processo chamado glicação, definido como uma reação não enzimática de ligação de compostos dicarbonílicos (e açúcares redutores) com resíduos de aminoácidos como arginina, cisteína e lisina em proteínas⁶², levando à formação de produtos conhecidos como produtos finais de glicação avançada (AGEs). Dessa forma, os AGEs são formados tanto em proteínas circulantes como com aquelas da matriz extracelular ou intracelular, podendo também interagir em ácidos nucleicos, levando à perda de função e diminuição da meia-vida das proteínas^{62,63}.

A glicação pelo MGO em resíduos de arginina produz diidróxiimidazolidina e hidroimidazolona (MG-H1), sendo o MG-H1 supostamente o AGE mais importante produzido em sistemas fisiológicos^{65,67}. A glicação de resíduos de arginina leva a aumento de seu peso molecular, perda das cargas positivas do grupo guanidina da cadeia lateral e consequentemente perda de suas interações eletrostáticas, prejudicando o dobramento e estabilidade da proteína^{69,70}. A ligação do MGO com resíduos de outros aminoácidos como lisina forma a Nε(1-carboxietil)-lisina (CEL), havendo também a formação da argpirimidina⁶⁷. Além do MGO, outros compostos dicarbonílicos como glioxal e 3-deoxiglicosona são capazes de gerar os AGEs em estados de hiperglicemia⁷⁰.

Provavelmente em função da elevada reatividade dos compostos dicarbonílicos, as células desenvolveram um sistema capaz de desintoxicar esses compostos, que se encontra no citosol das mesmas. As enzimas glioxalases (Glo), especializada na degradação do MGO em D-lactato, qual é posteriormente excretado na urina, consistem na Glo1, dependente de glutathione (lactoilglutathione metilglioxal liase), e Glo2 (hidroxiacilglutathione hidrolase).^{65,66}. Quando há níveis elevados de compostos dicarbonílicos, a atividade desse sistema diminui, resultando em um fenômeno conhecido como “estresse dicarbonílico”, que leva ao aumento

dos níveis de compostos como o MGO e à redução da capacidade de desintoxicação do mesmo⁷⁰ (Figura 4).

No geral, AGEs desencadeiam, intracelularmente, disfunção de proteínas mitocondriais, apoptose, aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)⁷¹, diminuição da atividade antioxidante das células e aumento da expressão de proteínas inflamatórias⁷². Além disso, a glicação contínua pelo MGO em proteínas da matriz extracelular, como o colágeno (proteína de meia vida longa), pode levar ao aumento de sua expressão, que leva a alterações na conformação de vasos, aumento da rigidez e remodelamento tecidual⁷³⁻⁷⁵, os quais podem estar implicados na fisiopatologia cardiovascular do DM^{73,74}. A glicação do colágeno parece ser particularmente relevante na DBD em virtude de a parede da bexiga consistir não apenas de células musculares e intersticiais, mas também de tecido conectivo estromal⁷⁶, o qual é composto principalmente por colágeno e elastina, junto a fibroblastos^{43,44}. Alterações na relação tipo III: tipo I de colágeno, assim como na organização e na densidade de suas fibras podem estar implicadas nas disfunções da bexiga^{43,44,76,77}. Portanto, identificar as alterações no colágeno na bexiga no contexto do DM permite compreender como a reticulação desta proteína pelos AGEs afeta a função deste órgão^{79,80}.

Em resumo, os AGEs têm sido estudados principalmente como causa das complicações do diabetes e podem responder por que muitas das alterações desta doença não melhoram com o tratamento farmacológico, visto que a glicação (processo não enzimático responsável pela formação dos AGEs) é dificilmente desfeita (quebrada) no organismo. O processo de glicação pode levar à perda irreversível da função proteica, e subsequentemente a estresse oxidativo e inflamação⁷⁸.

Além disso, os AGEs também podem ser absorvidos a partir dos alimentos, sendo denominados dAGEs (dietéticos ou exógenos). Alimentos altamente processados apresentam níveis elevados de dAGEs^{81,82}. Em indivíduos saudáveis, os níveis totais dos AGEs séricos são inferiores a 3%^{81,82}; porém, aumentam em até três vezes em condições patológicas como o diabetes⁸⁰, bem como durante o envelhecimento, quando proteínas e peptídeos de longa vida são mais suscetíveis à glicação⁸¹⁻⁸⁵.

A interação dos AGEs com seu receptor (RAGE; *receptor for advanced glycation end products*) vem sendo fortemente implicada nas complicações do DM⁸⁶⁻⁸⁸. O RAGE pertence à superfamília das imunoglobulinas, tem peso molecular de 44-55 kDa, e é constituído por uma região extracelular, compreendendo um domínio V e dois domínios C, nos quais diversos outros ligantes podem interagir com os mesmos. RAGE apresenta uma

única hélice, que atravessa a membrana celular, e uma cauda citoplasmática, esta considerada essencial para a ativação intracelular pela ligação com os AGEs⁸⁶⁻⁸⁸.

RAGE é expresso em níveis mínimos nos tecidos e na vasculatura^{89,90}, com exceção dos pulmões, que têm elevada expressão deste receptor já na condição fisiológica⁹⁰. No entanto, quando há excesso dos AGEs, nota-se aumento da expressão de RAGE em certas células como macrófagos, monócitos, células musculares lisas, células endoteliais e astrócitos⁸⁹⁻⁹¹. Entre as vias de sinalização intracelular desencadeadas pela ativação do RAGE, destaca-se a produção elevada de EROs⁹¹. Muitos estudos experimentais e clínicos vêm demonstrando uma associação entre os níveis elevados do MGO e as complicações do DM⁹², incluindo nefropatia diabética⁹³, retinopatia⁹⁴, e neuropatia periférica^{95,96}.

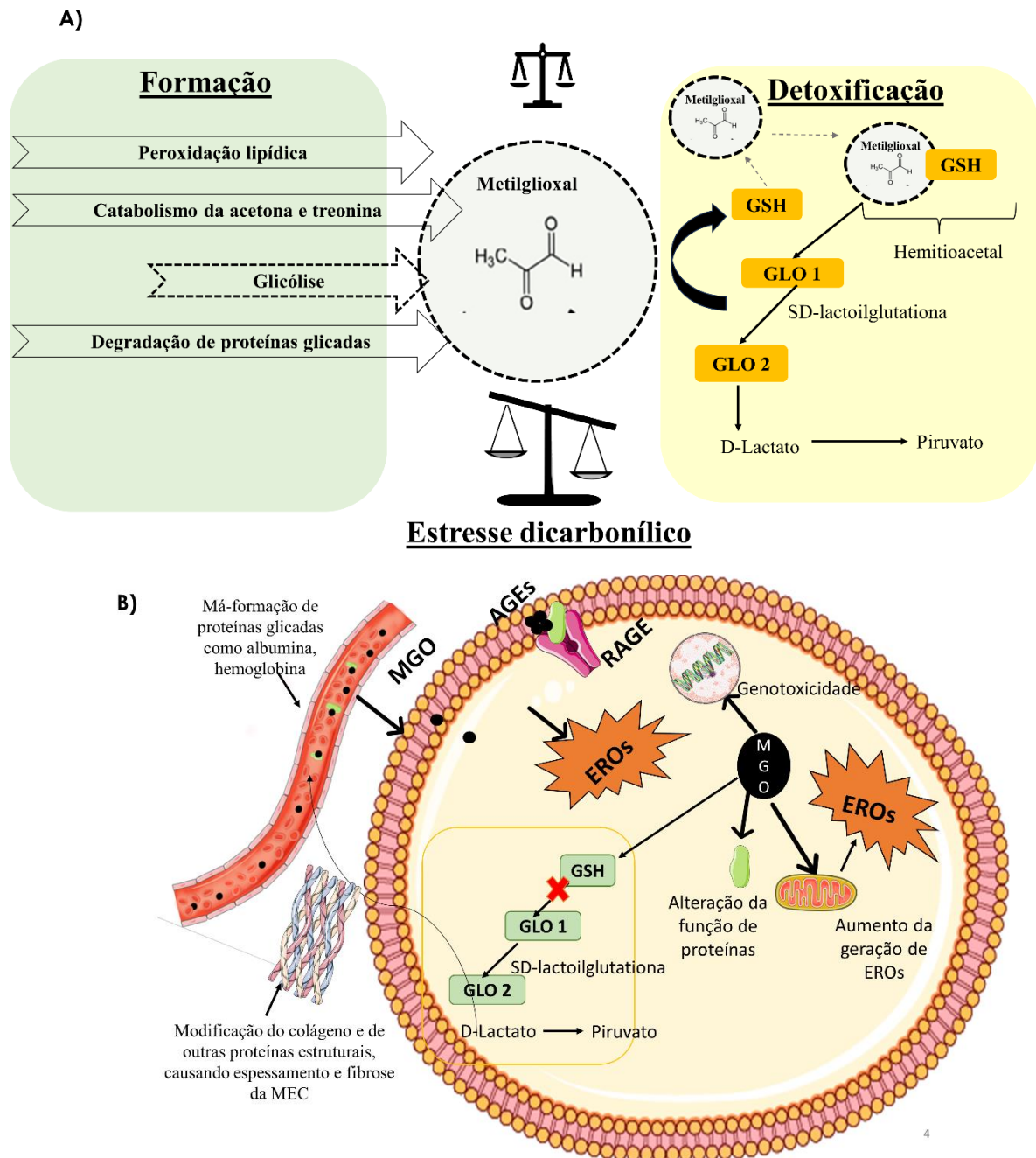


Figura 4. Esquematisação da formação e detoxificação do MGO e seus mecanismos intracelulares. Em (A), o MGO pode ser formado por diversos processos, tais como peroxidação lipídica, catabolismo de aminoácidos e degradação de proteínas glicadas, sendo a glicólise sua principal fonte de formação. A detoxificação da molécula de MGO é realizada pelo sistema glioxalase, composto por duas enzimas: a Glo1, dependente de glutathione (lactoilglutathione metilglioxal liase), e Glo2 (hidroxiacilglutathione hidrolase), as quais convertem o MGO em D-Lactato. Adaptado de Bellier et al (2019)⁶². Em (B), são evidenciadas as alterações causadas pelo MGO e seus AGEs, como a glicação de proteínas no sangue, como a albumina e a hemoglobina, a modificação do colágeno e de outras proteínas estruturais, resultando em espessamento e fibrose da matriz extracelular (MEC). Além disso, destaca-se a interação com o receptor dos AGEs, RAGE, a formação de EROs e as alterações na função de proteínas intracelulares. Partes da figura foram desenhadas a partir de imagens da *Servier Medical Art*³⁸.

1.5 Abordagens terapêuticas para limitar o MGO

As abordagens terapêuticas atualmente propostas para minimizar os efeitos do MGO baseiam-se no emprego de compostos sequestrantes, capazes de se ligar diretamente ao MGO, como aminoguanidina, piridoxamina e metformina ou ainda inibidores dos AGEs como o alagebrium (ALT-711)⁹². Outra abordagem não-farmacológica é a redução dos níveis de MGO no organismo, como redução calórica alimentar e implementação de exercícios físicos. Por último, a utilização de compostos indutores da enzima glioxalase, responsável pela degradação do MGO, como hesperidina (HESP), trans-resveratrol (tRESP) e a combinação dos dois, tRES-HESP^{92,97,98}. Essas estratégias terapêuticas oferecem um potencial promissor para mitigar os efeitos do MGO, podendo ser no futuro importantes para desenvolvimento de novas terapias⁹². Na presente tese, abordamos a ação de dois fármacos nas alterações funcionais e moleculares da disfunção miccional, metformina e ALT-711.

A metformina é um medicamento oral de primeira linha amplamente usado e bem tolerado para o tratamento do DM2, utilizado com sucesso uma vez que aumenta a sensibilidade dos tecidos à insulina e reduz os níveis de hemoglobina glicada^{99, 100}. Possui múltiplos locais de ação, sendo a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), estimulada pelo aumento nos níveis intracelulares de AMP, a mais amplamente estudada^{99, 100}.

Além dos efeitos na regulação dos níveis glicêmicos, a metformina reduz os níveis de MGO no plasma e na urina de pacientes diabéticos e obesos^{101,102}. Tais efeitos são observados devido ao seu grupo guanidina, que se liga a molécula de MGO, agindo como um eliminador dessa espécie dicarbonílica e, por conseguinte, reduzindo a formação de AGEs¹⁰³.

Outro fármaco aqui abordado, o cloreto de alagebrium (cloreto de 4,5-dimetil-3-fenaciltiazólio; ALT-711) é um composto de tiazólio, descrito como capaz de quebrar as ligações não enzimáticas entre os AGEs e as proteínas, mantendo sua função normal^{104,105}, apesar de estudos mostrarem ALT-711 também ser capaz de eliminar diretamente o MGO^{106,107}.

Estudos pré-clínicos demonstraram que o ALT-711 tem efeitos benéficos como a diminuição da resistência vascular e progressão da aterosclerose¹⁰⁷⁻¹¹¹, revertendo a disfunção erétil em ratos alimentados com dieta rica em AGEs¹¹². O ALT-711 desfaz as ligações cruzadas produzidas pelos AGEs nas proteínas¹¹³, mas em princípio não afeta a reticulação natural das proteínas, nem interfere nas ligações cruzadas intramoleculares ou nas ligações peptídicas responsáveis pela manutenção da integridade normal da cadeia de colágeno⁸⁸. Dessa forma, ALT-711 preserva a função das proteínas e reduz sua reticulação anormal.

Estudos pré-clínicos e clínicos mostraram que o tratamento com ALT-711 exerce efeito protetor na doença renal em modelo de DM2¹¹⁴ e na doença cardiovascular^{115,116}.

1.6 Justificativa e relevância

Segundo a Federação Internacional do Diabetes (*Internacional Diabetes Federation*; IDF), atualmente, 537 milhões de pessoas no mundo têm DM, e segundo as projeções esse número aumentará para 784 milhões em 2045¹¹⁷. A prevalência da DBD é superior a 50% em pacientes diagnosticados com DM1 ou DM2^{9,26}; assim, o aumento do número de pacientes acometidos com DM sobrecarregará no futuro os problemas relacionados ao trato urinário inferior, trazendo custos elevados relacionados à baixa qualidade de vida dos pacientes, não deixando de mencionar que as estratégias terapêuticas atuais para o tratamento da DBD têm limitações terapêuticas importantes. O eixo MGO-AGEs-RAGE vem sendo relativamente bem explorado no que se refere às alterações macrovasculares e nas complicações associadas ao DM como nefropatia, retinopatia, e neuropatia, mas a literatura sobre o papel deste eixo na disfunção vesical do DM ainda é muito escassa. Até o momento, identificamos apenas um estudo clínico realizado em pacientes com DM2, diagnosticados com sintomas urinários de moderados a graves, que demonstrou uma correlação entre níveis elevados dos AGEs no soro e redução da contratilidade detrusora⁷³. Não existem estudos disponíveis até o momento que abordem o possível papel patofisiológico do MGO na bexiga. Assim sendo, neste trabalho, apresentamos nossa contribuição para a compreensão dos efeitos do MGO na disfunção da bexiga. Esperamos que nossas descobertas possam contribuir para a elucidação do papel da via MGO-AGEs-RAGE bem como o desenvolvimento de alternativas terapêuticas no tratamento dessa complicação urológica.

1.7 Hipótese

- a) A fisiopatologia da disfunção da bexiga diabética está relacionada ao aumento dos níveis séricos de MGO e subsequente ativação do eixo AGEs-RAGE na parede vesical;
- b) A ativação do TRPA1 pelo MGO leva à disfunção da bexiga;
- c) A metformina, em virtude de sua ação sequestradora de MGO, teria efeito protetor na DBD;
- d) O ALT-711, por diminuir a formação dos AGEs, leva a menor ativação de RAGE, teria efeito protetor na DBD.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do metilglioxal nas alterações morfológicas, moleculares e funcionais da bexiga em camundongos fêmeas. Avaliar se as abordagens terapêuticas para eliminação do MGO refletem na melhora da disfunção da bexiga causada por MGO/AGEs, utilizando a metformina e o cloreto de alagebrium.

2.2 Objetivos específicos

Camundongos, C57BL/6, fêmeas, 5 semanas de idade foram tratados com MGO 0,5% por 12 semanas na água de beber, após o qual avaliamos:

- Níveis séricos de MGO e AGEs;
- Expressão gênica e atividade do sistema glicoxalase em bexigas;
- Alterações histológicas e morfométricas (hipertrofia e deposição de colágeno);
- Perfil miccional de animais expostos ao MGO, através da técnica de ensaio do papel de filtro, animal acordado;
- Alterações urodinâmicas através da técnica de cistometria de enchimento, animal anestesiado;
- Resposta contrátil do músculo detrusor *in vitro*;
- O envolvimento do TRPA1 na disfunção causada pelo MGO, usando-se o antagonista deste receptor, HC-030031;
- O papel das EROs na hipercontratibilidade *in vitro*, usando-se a enzima superóxido dismutase conjugada com polietileno glicol (PEG-SOD);

- O papel do sistema Rho-quinase na hipercontratibilidade *in vitro*, usando-se o inibidor da Rho-quinase, Y27632;

Em camundongos, C57BL/6, machos, tratadas com MGO (0,5%) por 12 semanas, e/ou metformina (2 semanas) e respectivo grupo controle, avaliamos:

- A disfunção miccional pelo tratamento com MGO;
- O efeito protetor da metformina nas alterações funcionais e moleculares da bexiga produzidas pelo MGO.

• Em camundongo deficiente de leptina (ob/ob), machos e fêmeas, avaliamos:

- A disfunção de bexiga neste modelo de DM2;
- O efeito do tratamento com ALT-711 sobre a glicemia de jejum e intolerância à insulina, níveis séricos de MGO (ELISA) e F-AGES, expressão de MG-H1 na bexiga, atividade do sistema glioxalase na bexiga, expressão gênica de RAGE (RT-PCR) na bexiga, as alterações histológicas e morfométricas, a deposição de colágeno na bexiga e o perfil miccional em animal acordado, usando-se o ensaio de papel de filtro

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Diretrizes éticas: O protocolo de estudo seguiu as recomendações do Guia Prepare¹¹⁸ e da diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa Científica - DBCA (Resolução Normativa CONCEA nº 55)¹¹⁹, o Guia ARRIVE¹²⁰ foi utilizado para relato científico.

Os cuidados dos animais, bem como os protocolos de pesquisa foram realizados conforme os princípios e diretrizes adotados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Todos os protocolos experimentais do estudo encontram-se aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), 5443-1/2019 (Anexo-1), 5573-1/2020 (Anexo-2), 5949-1/2022 (Anexo-3).

Todos os animais utilizados neste estudo foram adquiridos Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Condições de manutenção: Os animais foram acondicionados por 10 dias antes do tratamento, alojados em gaiolas (três camundongos por gaiola) feitas de polipropileno com dimensões de 30 × 20 × 13 cm. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM UNICAMP), em estantes apropriadas com temperatura de 24°C ± 2°C, sob dieta padrão para roedores (AIN-93G, da marca NUVILAB), e água *ad libitum*, com período de iluminação diária de 12 horas claro/escuro.

Randomização: Os animais foram designados aleatoriamente usando uma calculadora de randomização numérica (disponível em <https://www.graphpad.com>).

3.1 Caracterização dos efeitos crônicos do MGO em camundongos fêmeas tratadas por 12 semanas

Animais e tratamento: Camundongos, fêmeas, com 5 semanas e meia de idade no início do tratamento, da linhagem C57BL6/J foram divididos em dois grupos, chamados, controle (receberam água filtrada por 12 semanas) e MGO (receberam MGO 0,5% na água filtrada por 12 semanas). As doses e via de administração do MGO foram escolhidas de acordo com nosso estudo prévio¹²¹. O consumo de água foi medido no final do tratamento.

3.2. Abordagens terapêuticas para limitar o metilglioxal: papel da metformina e do ALT-711

3.2.1 Abordagens terapêuticas para limitar o MGO: efeito da metformina em camundongos machos

Animais e tratamento: Camundongos, machos, C57BL6/J, 5 semanas e meia no início do tratamento, foram divididos em 3 grupos: controle (receberam água filtrada), MGO (receberam MGO 0,5% na água filtrada) e MGO mais metformina (MGO + MET); esse último grupo recebeu o tratamento com MGO por 12 semanas somado ao tratamento com metformina (300 mg/kg, administrado nas últimas duas semanas de tratamento com MGO na forma de gavagem). As doses e via de administração de metformina foram escolhidos de acordo com nosso estudo prévio^{121,122}.

3.2.2 Abordagens terapêuticas para limitar o metilglioxal: efeito do ALT-711 em camundongos controles e obesos deficientes de leptina, machos e fêmeas

Animais e tratamento: C57BL/6 e B6.V-Lep ob/JUnib, fêmeas e machos, com 6 semanas e meia de idade no início do tratamento. Os animais foram inicialmente distribuídos aleatoriamente de acordo com seu peso corporal em WT (wild-type, magros), ob/ob (obesos) and ob/ob + ALT-711 ($18,7 \pm 0,4$, $33,4 \pm 1,6$ e $33,7 \pm 1,5$ g, respectivamente). As gaiolas foram atribuídas aleatoriamente usando uma calculadora de randomização numérica (disponível em <https://www.graphpad.com>).

No grupo ob/ob + ALT-711, os camundongos receberam o ALT-711 na dose de 1 mg/kg diluído em água filtrada, por oito semanas, de acordo com um estudo anterior¹²³. Camundongos WT e ob/ob receberam apenas água filtrada. O consumo de água foi realizado semanalmente durante o tratamento.

3.3 Protocolos experimentais

Avaliação do comportamento miccional - Coleta de urina em animal acordado

A coleta de urina foi realizada de acordo com um estudo anterior¹²⁴. Os animais foram mantidos em gaiolas para urinar e andar, sem acesso à água e comida. Resumidamente, os animais foram mantidos por 4 horas na gaiola, a primeira hora foi utilizada para adaptação e as 3 horas restantes para realização do teste.

A realização do teste ocorreu no mesmo horário do dia, começando às 9h-10h e terminando às 13h-14h em ambiente com umidade e temperatura controlado (24°C e de 53 ± 1%). Dois observadores coletaram a urina de cada animal usando uma pipeta de precisão e registrando o volume de urina e o tempo de cada micção. Foram adquiridos os seguintes parâmetros¹²⁵:

- Volume total de micção (soma de todas as micções no período de experimento);
- Volume médio de micção (média de volume de micção no período de experimento);
- Número de micções (n; número total de número de micções);
- Intervalo entre micções (tempo entre uma micção e outra, apresentado como média entre os *spots*).
- Gravidade específica (densidade urinária, definida como concentração urinária em relação à densidade da água, refere-se a concentração da urina).

As amostras de urina foram armazenadas em gelo durante o experimento. Após a coleta de urina, utilizando um refratômetro veterinário, a gravidade específica, como índice de densidade urinária, foi medida de acordo com um estudo anterior^{125,126}.

Avaliação do comportamento miccional - Ensaio no papel de filtro em animal acordado

Os ensaios de pontos de micção foram conduzidos de acordo com estudos anteriores^{125,127,128}. Os animais foram alojados, individualmente, em gaiolas limpas, cobertas com papel filtro medindo 25 × 15 cm (papel de filtro qualitativo 250g Unifil®, cód. 502.1250).

Durante o experimento os animais não tiveram acesso à água para evitar diluição de urina no papel de filtro, mas tiveram livre acesso à ração. Os ensaios foram conduzidos

durante 4 horas dentro da gaiola, sempre no mesmo horário, começando às 9h-10h e terminando às 13h-14h. A temperatura da sala e umidade foi mantida controlada (24 ± 1 °C com umidade de $53 \pm 1\%$).

Os animais foram aclimatados ao papel de filtro por dois dias e as medidas área/*spots* (manchas de micção) foram realizadas no terceiro dia. Ao final do ensaio, os animais foram devolvidos às suas condições normais de habitação.

Para a quantificação a área de micção de cada ponto foi circulada com lápis após o término do teste, e os pontos de sobreposição foram marcados. Os papéis de filtros foram secos e fotografados usando luz UV (Photo-documenter Chemi-Doc, Bio Rad, Califórnia, EUA). Os papéis de filtro foram analisados usando Versão Fiji do software ImageJ (versão 1.46r) (<http://fiji.sc/wiki/index.php/Fiji>). Para converter a área em volume, utilizamos um padrão (curva de calibração), com valores relacionados linearmente até 200 μl ¹²⁵.

Como medida de exclusão foram considerados partículas menores que 0,20 cm^2 (equivalente a 2 μl) para minimizar interpretações relacionadas às marcas das patas ou cauda dos animais¹²⁵.

- Volume total de micção (μl ; volume de urina no período de experimento de 4 horas);
- Volume médio por micção (μl ; definido como o volume médio por pontos de micção no papel de filtro);
- Número de micções (definido como o número de pontos de micção no papel de filtro);
- Número de pontos de micção no centro do papel de filtro (definida como o número de pontos de micção depositados em 95% da área total do papel de filtro; este parâmetro indica perda de controle da urina ou hiperatividade, uma vez que roedores desenvolvem um comportamento descrito como tigmotaxia, sendo a busca pelos cantos da gaiola para urinar, que está relacionado a micção normal;
- Número de pontos de micção no canto (definida como o número de pontos de micção depositadas em 5% da área total do papel de filtro). Este parâmetro pode ser apresentado em % de área de micções nos cantos;
- % de área de micção primária (definida como maior micção encontrada no papel);
- Divisão do número de micções por volume que indica micções secundárias (pequenos pontos menores que 25 μl) e micções primárias (que indica pontos maiores que 25 μl até 100 μl), e micções de alta capacidade vesical referindo-se àquelas maiores que 200 μl).

Cistometria de enchimento, animal anestesiado

Os procedimentos da cistometria de enchimento são descritos conforme o estudo¹²⁵.

Os animais foram anestesiados utilizando o sistema de anestesia inalatória para roedores (Sistema Harvard), mantido sob anestesia com 1,5 - 2% de isoflurano e 98% de oxigênio (2 l/min). Foi feita uma incisão retro umbilical na região hipogástrica, medindo 0,5-1 cm, e a bexiga foi exposta. Um cateter PE10 foi inserido na região do ápice da bexiga e suturado utilizando uma sutura de náilon 6-0.

A vedação e a permeabilidade da sutura foram verificadas usando uma agulha 23 g acoplada em uma seringa de 1 ml, enchendo-se lentamente a bexiga com 0,1 ml de salina heparinizada a 2%; posteriormente, a bexiga foi esvaziada por aspiração. A bexiga foi reposicionada, e a musculatura e a pele foram fechadas.

Ao fim do procedimento cirúrgico, a anestesia com isoflurano foi interrompida, administrando-se uma injeção intraperitoneal de uretano (1,2 g/kg). A cânula foi conectada a uma torneira de três vias, da qual uma porta foi conectada em uma bomba de infusão via um cateter PE-10. Antes de começar a cistometria, foi realizado um período de estabilização de 10 minutos, com subsequente infusão intravesical contínua de solução salina a 0,6 ml/h por 1 hora^{130,131}.

Os animais foram eutanasiados no final dos protocolos. A aquisição de registros foi realizada usando o PowerLab System e as análises foram realizadas utilizando o software LabChart® (ADInstruments Inc., Sydney, Australia, <https://www.adinstruments.com/products/labchart>).

Os parâmetros abaixo foram avaliados em todos os ciclos de micção durante a primeira hora de aquisição de dados. Os animais foram eutanasiados ao final dos protocolos. Os seguintes parâmetros foram avaliados^{130,131}.

- Pressão basal (pressão mínima entre duas micções);
- Frequência de contrações não miccionais (CNMs; *non-voing contractions*, NVCs), definidas como contrações espontâneas da bexiga superior a 4 mmHg de pressão a partir da linha de base que não resultem em micção);
- Capacidade da bexiga (CB; volume necessário infundido para induzir a primeira micção);
- Pressão de intermicturação (pressão média entre duas micções);

- Pressão média oscilatória (pressão média menos pressão basal);
- Volume residual (volume restante na bexiga calculado pelo volume total infundido subtraído do volume de micção);
- Pressão de limiar (pressão intravesical imediatamente antes da micção);
- Pressão máxima de pico (pressão máxima da bexiga durante uma micção);
- Volume de micção (volume total de micção no período avaliado em média 1 h);
- Frequência de micções (número de micções no período avaliado, em média, 1 h);
- Intervalo entre micção (IM; o período entre duas pressões de pico);
- Complacência da bexiga (capacidade da bexiga dividida pela pressão limiar subtraído da pressão basal);
- Eficiência de micção (VE). A VE é calculada pela seguinte fórmula: $\%VE = (IM * 0,6/h) / CB$ onde o intervalo entre micção (IM) é multiplicado pela taxa de infusão (capacidade funcional da bexiga em ml) e dividido pela capacidade da bexiga (CB; capacidade verdadeira da bexiga em ml).

Contratilidade *in vitro* do músculo detrusor

Os procedimentos de contratilidade *in vitro* são descritos conforme os estudos 24,33,61,125.

Preparação da bexiga e configuração de banho de órgãos

Os animais foram pesados e anestesiados com isoflurano em uma concentração superior a 5%, realizando-se em seguida deslocamento cervical para confirmar a eutanásia. A bexiga foi removida e cuidadosamente dividida em 2 tiras. Utilizamos tiras intactas da bexiga (com a presença do urotélio e suburotélio) e desnudadas (sem a presença do urotélio e suburotélio, apenas o músculo detrusor).

Para a remoção do urotélio e suburotélio, foram utilizadas duas pinças de ponta fina, uma para segurar o músculo detrusor enquanto o urotélio e o suburotélio eram cuidadosamente removidos com a outra pinça⁶¹. As tiras foram montadas em banhos de órgãos contendo 10 ml de solução Krebs-Henseleit (117 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃ e 11 mM de glicose, pH 7,4) continuamente borbulhadas com uma mistura de 95% O₂ e 5% de CO₂. Os tecidos foram mantidos em um período de equilíbrio de 45 minutos sob tensão em repouso e depois ajustados por 5 mN a cada

15 minutos. Alterações na força isométrica foram registradas usando um sistema PowerLab (Ad Instruments Inc., Sydney, Australia).

Contrações da bexiga induzidas por estimulação elétrica de campo (EFS)

EFS foi aplicado a tiras de bexiga (intactas ou desnudadas), colocadas entre dois eletrodos de anel de platina conectadas a um estimulador (Grass Telefactor; Rodhe Island, Estados Unidos da América)⁶¹.

Os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 80V, com duração dos pulsos de 1 milissegundo (ms), intervalo entre os pulsos de 0,2 ms, duração de estimulação de 10 segundos, nas frequências de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 Hz, com intervalo de 2 minutos entre os estímulos. As respostas contráteis em resposta a EFS foram expressas como mN por miligrama de tecido úmido (mN/mg)^{24,33,61,125}.

Curvas concentração-resposta para carbacol e α,β -metileno ATP

Curvas cumulativas concentração-resposta para o agonista do receptor muscarínico carbacol (1 nM - 100 μ M) foram construídas em ambas as tiras de tecido (com e sem urotélio), dependendo do protocolo experimental^{24,33,61,125}.

Para verificar a viabilidade dos preparativos, a solução de 80 mM de KCl foi adicionada aos banhos no final do tempo de equilíbrio.

Em experimentos separados, curvas não-cumulativas para o agonista purinérgico P2X1 α,β -metileno ATP (1, 3 e 10 μ M) foram construídos em tiras de bexiga intactas ou desnudadas de urotélio e suburotélio, usando intervalos de 20 minutos entre as concentrações para evitar dessensibilização.

As respostas contráteis do carbacol e α,β -metileno ATP foram expressas como mN por miligrama de tecido úmido (mN/mg).

Para a curva concentração-resposta ao carbacol, os valores de potência (pEC_{50}) e respostas máximas (E_{max}) foram calculados pela seguinte equação:

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

- 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 contração do agonista que produz 50% da resposta máxima;

- “x” é o logaritmo da concentração do agonista,
- o expoente “N” significa a inclinação da curva concentração-resposta;
- 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 software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Califórnia, EUA), considerando o parâmetro Φ como zero^{24,33,61,125}.

Curvas concentração-resposta cumulativa para cálcio extracelular

Curvas cumulativas de concentração-resposta para CaCl_2 extracelular²⁴ (10 μM -100 mM) foram realizadas em tiras de bexiga intactas ou desnudadas. Os tecidos foram equilibrados por 45 min em banhos de órgão contendo 10 ml de solução de Krebs-Henseleit.

Após o período de equilíbrio a solução de solução Krebs-Henseleit foi removida e substituída por solução Krebs sem Ca^{2+} contendo EGTA (1 mM) para sequestrar íons Ca^{2+} . As tiras foram contraídas com KCl (80 mM) seguido de contrações com carbacol (10 μM) para se esgotar o Ca^{2+} intracelular.

Em seguida, as tiras foram incubadas com ácido ciclopiazônico (CPA; 10 μM) por 30 min para bloquear a liberação do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. As curvas concentração-resposta para CaCl_2 (10 μM -100 mM) foram então construídas²⁴.

Análises morfométricas da bexiga

Após a eutanásia a bexiga foi removida e o peso úmido foi determinado, para determinação do peso vesical e da relação peso vesical/peso do animal (bexiga para proporção do corpo).

A bexiga foi mantida em 10% de formalina tamponada com fosfato por 24 horas, desidratada em etanol e incorporada em parafina. O material foi enviado ao laboratório de apoio VETPAT (Campinas-SP) para processamento histológico. As bexigas foram cortadas em seções de 5 μm , usando um micrótomo (Leica, Wetzlar, Alemanha).

Foram realizadas desparafinação em xileno, reidratação com diferentes gradientes de álcool e coloração com hematoxilina e eosina (H&E), tricrômico de Masson ou *picrosirius red* para exame de microscopia de luz.

As imagens digitais foram obtidas com um microscópio eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital (DS-U3, Nikon). Para a análise quantitativa

da espessura do urotélio e do detrusor, e do conteúdo do colágeno no detrusor, foi utilizado o software Image J- Fuji (Versão 1.46R).

Para quantificação perímetro do urotélio e do músculo liso detrusor, dois observadores mediram, em baixa ampliação (10 ×), dez pontos aleatórios no obtidos de duas imagens de cada animal. Os resultados são apresentados como a média das medidas individuais.

A área de colágeno é visualizada em azul na coloração tricrômico de Masson e roxo na coloração *Picrosirius red*. Já a área do músculo detrusor é visualizada em vermelho pela técnica de tricrômico de Masson e lilás pela técnica *Picrosirius red*.

O conteúdo de colágeno foi analisado no músculo detrusor usando a técnica de imagem pseudo colorimétrica¹³²; para tanto, foi utilizado um *plugin Colour Deconvolution* (software ImageJ a versão Fiji) para medir a área do colágeno no detrusor. Os dados foram quantificados em porcentagem de área e expressos pela relação (proporção) de colágeno/músculo.

Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A determinação dos níveis de EROs foi realizada conforme estudo anterior¹³³.

Resumidamente, as bexigas foram adicionadas em um meio de inclusão *Tissue-Tek® O.C.T* (do inglês “*Optimal Cutting Temperature*”), que permite um congelamento rápido, visando obtenção de qualidade ideal de corte em criostato.

O corante fluorescente oxidativo dihidroetídio (DHE) foi utilizado para avaliar a formação de EROs *in situ*. Os cortes foram realizados em criostato, em seções transversais (12 µm), coletado em lâminas de vidro, e posteriormente equilibrados por 10 min em solução de Hank (1,6 mM de CaCl₂, 1,0 mM de MgSO₄, 145,0 mM de NaCl, 5,0 mM KCl, 0,5 mM NaH₂PO₄, 10,0 mM de glicose, 10,0 mM de HEPES, pH 7,4). A solução DHE (2 µM) foi aplicada a cada corte de tecido, e posteriormente incubadas em uma estufa protegida da luz à 37°C por 30 min.

A fluorescência foi detectada com um filtro *long-pass* de 585 nm. utilizando um microscópio (Eclipse 80i, Nikon, Tóquio, Japão) equipado para epifluorescência (excitação a 488 nm; emissão a 610 nm) e uma câmera digital (DS-U3, Nikon).

Para quantificação o número de núcleos rotulados com brometo de etídio foram contados automaticamente no urotélio e no músculo liso do detrusor utilizando o software

ImageJ (NIH, Maryland, Estados Unidos da América) e expressos como núcleos rotulados por milímetro quadrado.

Ensaio moleculares e bioquímicos

Quantificação dos níveis de MGO, AGEs fluorescentes e glicose no soro ou sangue

Os procedimentos foram realizados conforme descrito em^{61,125}. O sangue (0,5 ml) foi coletado por punção intracardíaca, centrifugado a $5.000 \times g$ por 10 minutos à 4°C e o soro foi transferido para tubos de microcentrífuga.

Para medir os níveis de MGO no soro, as amostras foram primeiramente desproteinizadas utilizando o Kit de Preparação de amostras desproteinizantes - TCA (Abcam ab204708), conforme as instruções do fabricante.

Os níveis de MGO no soro foram medidos usando kit ELISA competitivo para OxiSelect™ Metilglioxal (Catálogo No. STA-811, Cell Biolabs, San Diego, CA, Estados Unidos da América) ou o kit de ensaio fluorométrico de metilglioxal (Abcam ab273284, Cambridge, Reino Unido), conforme a disponibilidade dos mesmos no laboratório.

A quantificação dos AGEs fluorescentes (F-AGEs) foi feita diluindo as amostras de soro em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7.4; diluição 1:2), transferindo-as em seguida para placas pretas de 96 poços (200 µl no total por poço). Os espectros de fluorescência foram registrados em duplicata usando fluorômetro (Synergy™ H1 Hybrid Reader, Biotek, Estados Unidos da América). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 360 e 447 nm, respectivamente, e a solução de PBS foi usada como branco. As concentrações individuais foram normalizadas por branco de fluorescência. A intensidade da fluorescência foi expressa em unidades arbitrárias (u.a.).

Os animais foram mantidos em jejum de 8 horas para avaliar a concentração de glicose, após o qual o sangue da veia da cauda foi coletado. O nível glicêmico foi medido usando o ACCUCHECK Blood Glucose (Monitoring System®, Roche Diagnostics, Indianápolis, Estados Unidos da América).

Controle glicêmico e teste de intolerância à insulina (ITT)

Para minimizar o efeito do estresse de jejum os animais foram submetidos a um período de jejum de 3 horas, duas vezes por semana. Amostras de sangue foram coletadas da cauda após 6 h de jejum, e a sensibilidade sistêmica à insulina foi analisada pelo teste de tolerância à insulina (ITT).

Para este teste uma primeira coleta de sangue foi obtida no tempo zero; em seguida, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 1,00 U/Kg de insulina regular (*Humulin R*, Ely Lilly, Indianápolis, Estados Unidos da América), e as demais amostras de sangue foram coletadas nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min após a injeção de insulina.

As concentrações de glicose foram medidas usando um glicosímetro (ACCUCHEK Performa; Roche Diagnostics, Indianapolis, EUA). Os valores de glicose foram usados para calcular a taxa constante de decaimento de glicose no sangue (K_{ITT}), que se baseia na regressão linear do logaritmo Neperiano das concentrações de glicose obtidas de 0 a 30 min do teste. O K_{ITT} foi calculado pela fórmula $0,693/(t_{1/2}) \times -1 \times 100^{135}$.

Atividade do sistema glioxalase na bexiga

As bexigas foram isoladas e homogeneizadas em 350 µl de PBS (pH 7,0) e centrifugadas a $2000 \times g$ por 30 min à 4°C. O sobrenadante foi removido e mantido em gelo. Para medir a atividade da glioxalase na bexiga foi utilizado o kit de ensaio de atividade GLO1 (GLO1; Catálogo No. MAK114, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e GLO2 (GLO2; Abcam, Catálogo No. AB273319, Cambridge, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína total das amostras de bexiga.

Atividade da superóxido dismutase (SOD) na bexiga

Para a quantificação da atividade da SOD, as bexigas foram homogeneizadas seguindo o protocolo do fabricante, e o sobrenadante armazenado e utilizado para medição, utilizando o kit de ensaio de atividade da SOD-enzimático (Cayman Chemical, Catálogo no.706002, Ann Arbor, MI, Estados Unidos da América).

Expressão gênica por RT-PCR na bexiga

Os procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente¹³³.

A expressão gênica foi quantificada usando o quantitativo real-Time RT-PCR (qPCR). O reagente Trizol® (Invitrogen, MS, EUA) foi utilizado para extrair o RNA total seguindo as instruções do fabricante.

O kit de transcrição reversa de alta capacidade (Applied Biosystems, CA, EUA) foi utilizado para a transcrição das amostras de RNA tratadas com DNase. As concentrações de amostras de cDNA foram quantificadas usando um espectrofotômetro (Nanodrop Lite®, Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América). As reações foram realizadas com 10 ng de cDNA, 6 µl SYBR Green Master Mix® (Life Technologies, CA, EUA) e iniciadores (concentração ideal em um volume total de 12 µl).

A PCR em tempo real foi realizada no equipamento StepOne-Sistema de PCR em tempo real Plus® (Applied Biosystems). A reação foi programada no intervalo de 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, então 60°C por 1 min; no final de uma amplificação normal, foi adicionado tempo durante o qual a temperatura aumentou, gradualmente, de 60°C a 95°C.

Para determinar a especificidade da amplificação, a análise da curva de Melt foi realizada para garantir que apenas um fragmento fosse amplificado. Ciclo de Threshold (limiar) (CT) foi definido como o ponto em que a fluorescência sobe acima da fluorescência de fundo. O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizado para analisar os resultados, expressos pela diferença entre os valores de CT dos genes endógeno e gene alvo de interesse. Na Tabela 1 são apresentados os iniciadores de oligonucleotídeos sintéticos utilizados.

Tabela 1- Sequências de primers usados para amplificações de PCR em tempo real.

Gene	Forward	Reverse
RAGE (IDT Integrated DNA Technologies)	5'- CTGAACTCACAGCCAGTGTCCC- 3'	5'- CTGAACTCACAGCCAGTGTCCC- 3'
Cacn1 (Exxtend Oligo Solutions)	5'-ACCCTCCTCCGTCGAATTC-3'	5'-ACCCTCCTCCGTCGAATTC-3'
Rho-A (Exxtend Oligo Solutions)	5'-CCTTCGGAATGACGAGCAC-3'	5'-AGATGAGGCACCCAGACTTTT- 3'
ROCK1 (Exxtend Oligo Solutions)	5'-ACCCACCATCTGGCTTTGTC-3'	5'-CGGTTTATCAGGTAGCATCCC- 3'
ROCK 2 (Exxtend Oligo Solutions)	5'-GATGGTTGTCATTGCCTGTGC- 3'	5'-TGCTCTTTATCTTGTTTCGCTGT- 3'
ACTB (Qiagen Quantitec Primers Assays)	QT00095242	NM_007,393
18S rRNA (IDT Integrated DNA Technologies)	5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT -3'	5' - CATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
GLO 1 (IDT Integrated DNA Technologies)	5'- CCCTGCTATGAAGTTCTCGCTC-3'	5'-CCTGCTATGAAGTTCTCGCTC-3

Quantificação de AGEs totais em bexigas

Os procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente¹³⁴.

AGEs totais, incluindo N-épsilon-(carboximetil) lisina (CML), dímero de lisina derivado de glioxal (GOLD), N-épsilon-(1-carboxietil) lisina (CEL), dímero de lisina derivado de metilglioxal (MOLD), 3-dímero de lisina derivado de desoxiglucosona (DOLD) e 3-desoxiglucosona (3-DG), foram medidos em bexigas isoladas.

As bexigas foram homogeneizadas em 300 µl de tampão RIPA com coquetel de inibição de protease e mantidas em gelo por 1 hora, centrifugadas a 12.500 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante resultante foi coletado.

A quantificação dos AGEs totais foi realizada utilizando o AGE Assay Kit (Catalogo No. ab238539, Abcam, Cambridge, UK) por meio de colorimetria, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Quantificação dos níveis de RAGE na bexiga

Os procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente¹³⁴.

Amostras de bexiga foram isoladas e homogeneizadas em 300 µl de tampão RIPA + coquetel de inibição de protease, centrifugadas a 12.000g por 15 min a 4°C, e o sobrenadante resultante foi coletado. Para quantificação de RAGE foi utilizado o Kit Mouse RAGE ELISA (Nº de Catálogo ab100738, Abcam, Cambridge, Reino Unido), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Imuno-histoquímica para MG-H1, TRPA1 e RAGE na bexiga

Os procedimentos foram realizados conforme descrito em^{61,134}

As bexigas inteiras foram removidas, imersas em solução fixadora de formalina a 10% por 48 h e incorporadas em parafina e enviadas ao laboratório de apoio VETPAT. Cortes de 5 µm foram montados em lâminas de vidro revestidas com aminopropiltriethoxysilano. Os cortes foram desparafinizados, reidratados e lavados com solução tampão Tris de 0,05 M (TBS), pH 7,0. Posteriormente, para recuperação de antígenos, os cortes foram tratados com tampão de citrato (0,01 M) contendo 0,05% de Tween-20 (pH 6,0) ou solução de tampão TRIS-EDTA (0,01 M) contendo 0,05% tween-20 por 40 min a 98°C.

A atividade endógena da peroxidase foi inibida com solução 0.3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para bloquear os locais não específicos, foi utilizada uma solução de albumina sérica bovina a 5% (BSA) contendo 0,1% de Tween-20 por 60 min.

Os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-MG-H1 monoclonal de camundongo (1:60; Cell Biolabs, Inc, número de catálogo STA-011, San Diego, Estados Unidos da América) e anticorpo primário para RAGE (1:70; Cat. No. AB54741, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anticorpo TRPA1 cat. Número 40763, Novus Biologicals, LLC, Estados Unidos da América). diluído em TBS contendo 3% de BSA durante a noite à 4°C.

Os cortes foram lavados e incubados com anticorpo secundário IgG anti-*mouse* biotinizado (1:20; Extra2, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Para a detecção da área imunocorada com anticorpo primário, foi empregada uma solução de 3,3 'de diaminobenzidina (DAB; Cat. No. D4293, Sigma Aldrich).

Um corte foi usado em paralelo à omissão primária de anticorpos, como controle negativo, Todas as lâminas foram contrastadas com hematoxilina e montadas para observação

por microscopia. As imagens representativas foram adquiridas usando um microscópio de luz (Série Optika Itália B-1000, Optika S.R.L., Ponteranica, BG, Itália).

Western blotting MG-H1, GLO 1 e TRPA1

Os procedimentos foram realizados conforme descrito em¹³⁴

Extratos proteicos totais foram obtidos de bexigas homogeneizadas usando tampão RIPA + coquetel de inibição de protease (10 µl/ ml). As amostras foram incubadas por 1 hora à 4°C e depois centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos à 4°C.

As concentrações de proteína nos sobrenadantes foram determinadas utilizando o DC Protein Assay Kit I (Nº de Catálogo 5000111EDU, BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos da América). Uma quantidade igual de proteína (30 µg) de cada amostra foi tratada com tampão Laemmli 4x contendo 355 mM de 2-mercaptoetanol (Nº de Catálogo 161-0747, BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos da América).

As amostras foram aquecidas em banho-maria fervente por 5 min e resolvidas por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas foram então eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose a 20 V por 20 min utilizando um dispositivo semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos da América).

Para reduzir a ligação inespecífica às proteínas, a membrana foi pré-incubada durante a noite à 4°C em tampão de bloqueio (0,5% de leite em pó desnatado, Tris 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 a 0,02%).

Anticorpos primários, incluindo anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-MG-H1 (1:1000; Cell Biolabs, INC, Cat. No STA-011, San Diego, Estados Unidos da América), anticorpo anti-GLO1 (1:1000; Cat. No. ab96032, Abcam), anti-TRPA1 (1:1000; cat. No. 40763, Novus Biologicals, LLC, Estados Unidos da América) e anticorpo monoclonal β-actina peroxidase (1:50000, Catálogo No. A3854, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), diluído em solução basal contendo 3% de albumina sérica bovina (BSA). Os anticorpos primários foram incubados durante a noite à 4°C, enquanto o anticorpo β-actina foi incubado durante 1 h à temperatura ambiente.

Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário IgG *anti-rabbit-HRP* (1:5000; Nº de Catálogo 7074S, Cell Signaling Technology, Massachusetts, Estados Unidos da América) diluído em solução basal por 1 h. As bandas imunorreativas foram detectadas utilizando o Substrato *Clarity Western ECL* (Catálogo No. 1705061, BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos da América), um sistema de quimiluminescência melhorado da

BioRad. A análise densitométrica foi realizada utilizando o *software Image Lab* versão 6.1 (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos da América). Os resultados foram representados como a razão entre a expressão da proteína em relação à β -actina e/ou normalizados pelo grupo controle.

3.4 Análise estatística

- Os dados são apresentados com médias $\pm$ erro padrão das médias (EPM) de um número experimental (n).
- A distribuição paramétrica dos dados foi avaliada com o teste de Shapiro.
- A diferença estatística entre dois grupos foi determinada usando o teste de Student teste t não pareado.
- ANOVA uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett foi usada ao comparar mais de dois grupos com o grupo controle.
- ANOVA uma via seguida pelo teste de Tukey ou Bonferroni foi usada para comparar todos os grupos juntos.
- Na comparação de duas variáveis, foi utilizada ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey ou Bonferroni.
- Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.
- Para tabulação dos dados foi utilizado o *software* Excel® (Microsoft Office 365), e para as análises estatísticas foi utilizado o *software* GraphPad Prism®.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos efeitos crônicos do MGO em camundongos fêmeas tratadas por 12 semanas

Nesta etapa da pesquisa, buscamos primeiramente avaliar os níveis séricos de MGO e de F-AGEs, os níveis sanguíneos de glicose, e o consumo de água e de comida dos animais, assim como eventuais alterações morfométricas e histológicas da bexiga causadas pelo tratamento com MGO por 12 semanas em camundongos fêmeas.

Com o objetivo de determinar se o MGO, administrado por via oral durante 12 semanas, atingia níveis séricos significantes, procedemos à sua quantificação no soro dos animais. A concentração sérica de MGO nos animais tratados foi 4,8 vezes maior que a dos animais controle ($p < 0,01$; Figura 5A). Notamos também que os níveis séricos de F-AGEs aumentaram significativamente no grupo MGO em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$; Figura 5B).

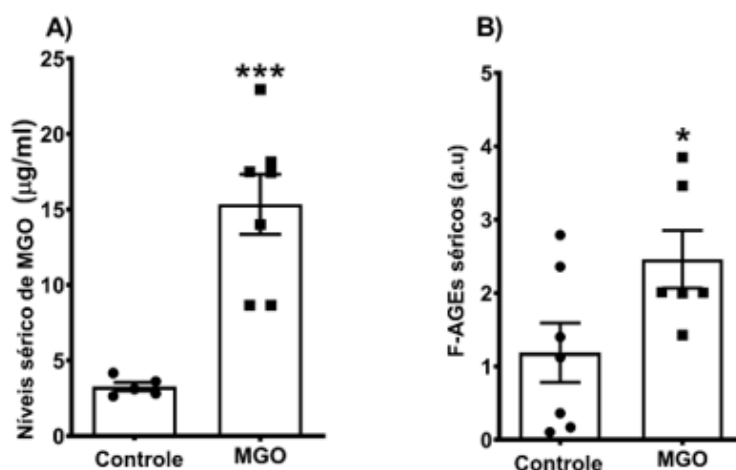


Figura 5. Níveis séricos de metilglioxal (MGO) (A) e fluorescência dos produtos finais de glicação avançada (F-AGEs; B) em camundongos fêmeas controles ou que receberam MGO 0,5% por 12 semanas na água de beber. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. ($n = 5-7$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em comparação com grupo controle (teste t não pareado).

O tratamento com MGO não alterou de modo significativo a glicemia de jejum, sendo os resultados apresentados no grupo controle ($86,8 \pm 5,43$) semelhantes ao grupo MGO ($89,7 \pm 4,63$ mg/dl) ($n = 7$), indicando que o tratamento crônico com MGO não interfere no metabolismo da glicose.

O consumo de água também não diferiu entre os grupos controle e MGO ($2,61 \pm 0,09$ e $2,45 \pm 0,22$ ml/dia para MGO e controle, respectivamente; $n = 7$). Igualmente, não

notamos diferenças significativas entre os grupos controle e MGO para o consumo de comida ($3,2 \pm 0,11$ e $3,4 \pm 0,11$ g/dia para MGO e controle, respectivamente; $n = 7$).

O passo subsequente consistiu em investigar se o tratamento crônico com MGO ocasionava alterações morfométricas na bexiga. Não se observou diferença significativa no peso corporal entre os grupos controle e MGO (Figura 6A); no entanto, notou-se um aumento de aproximadamente 20% ($p < 0,05$) no peso absoluto da bexiga (Figura 6B) e no peso relativo da bexiga (Figura 6C; $p < 0,05$) no grupo MGO em relação ao controle. A análise histológica das bexigas, realizada por meio das colorações com hematoxilina e eosina (HE; Figura 6D) e tricrômico de Masson (Figura 6E), revelou que a exposição ao MGO provocou aumentos discretos, porém significativos ($p < 0,05$), na espessura das camadas do urotélio e do músculo liso detrusor, assim como do conteúdo de colágeno (Figura 6F, G, H).

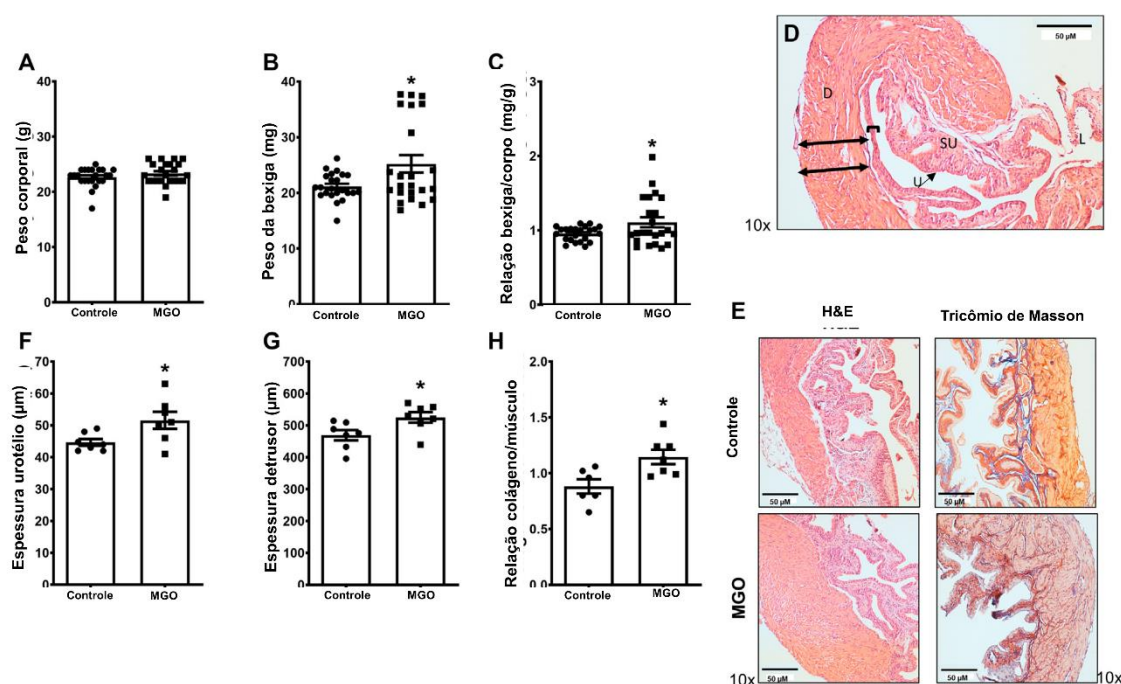


Figura 6. Medidas morfométricas e avaliação histológica da bexiga em camundongos tratados com metilglioxal (MGO) em comparação com animais controle. Os painéis A, B e C mostram o peso corporal, o peso da bexiga e o peso relativo da bexiga, respectivamente, para os grupos controle e MGO. O painel D mostra uma imagem histológica de bexiga de camundongos controle, mostrando o urotélio e o músculo liso detrusor onde as setas pretas com pontas duplas indicam os limites de quantificação no detrusor, e o colchete indica o limite de quantificação no urotélio. O painel E mostra imagens histológicas representativas de bexigas de grupos controle e MGO usando hematoxilina e eosina (HE) e coloração tricrômica de Masson. Os painéis F, G e H mostram quantificações da espessura do urotélio, espessura do detrusor e conteúdo de colágeno, respectivamente. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7$). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t não pareado). D, músculo liso detrusor; SU, suburotélio; U, urotélio; L, lúmen. As barras pretas no painel D (canto superior direito) e painel E (canto inferior esquerdo) representam uma escala de 50 μm (objetiva 10 $\times$).

Em seguida, procuramos investigar se o tratamento crônico com MGO também alterou o conteúdo de seu principal AGE, o MG-H1. Constatamos um aumento significativo ($p < 0,05$) no conteúdo de MG-H1 na bexiga do grupo MGO em comparação ao controle (Figura 7A e B). A Figura 7C confirma, por imuno-histoquímica, a forte presença de MG-H1 nas bexigas dos animais tratados com MGO, tanto no urotélio quanto no detrusor, enquanto bexigas do grupo controle apresentaram discreta imunocoloração para MG-H1 e somente no urotélio.

A próxima questão da nossa pesquisa consistiu em avaliar se o aumento dos níveis de MGO (soro e bexiga) resultariam em alterações na expressão e atividade da GLO1, enzima crucial no processo de detoxificação de aldeídos, como o MGO. Não notamos alteração significativa na expressão proteica da GLO1 (Figura 7D e E); porém, detectamos uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na atividade dessa enzima no grupo MGO em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$; Figura 7F).

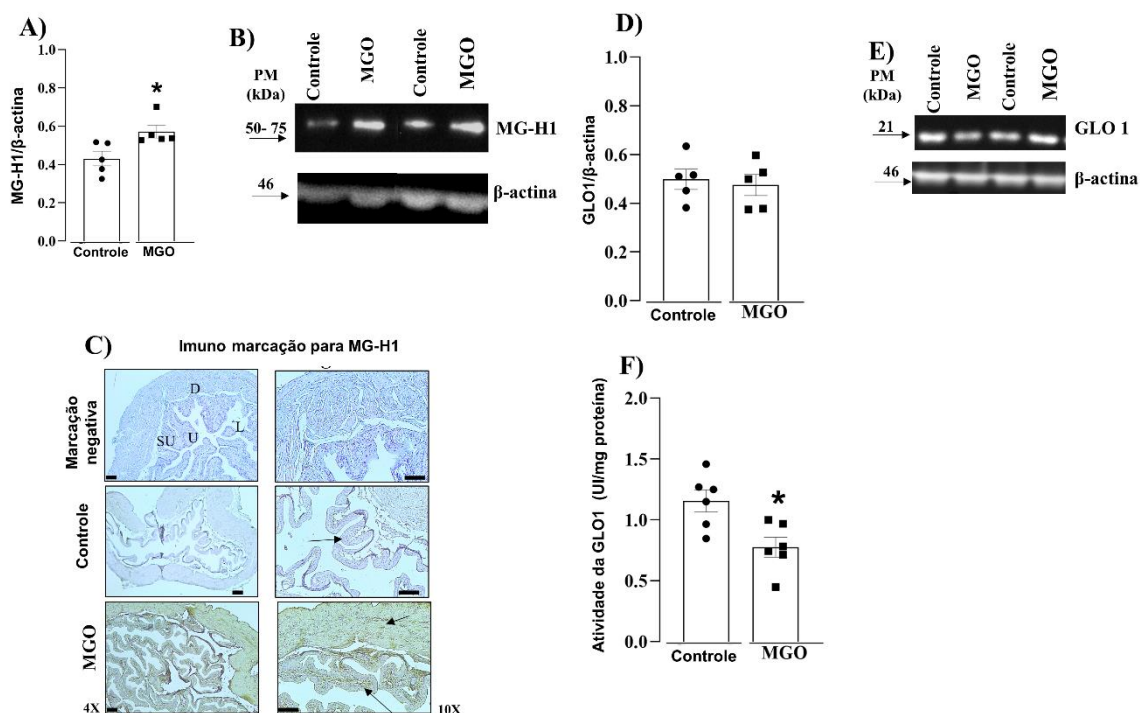


Figura 7. Quantificação de hidroimidazolona derivada de metilglioxal-1 (MG-H1) e glioxalase 1 (GLO1) em bexigas de animais controle e tratados com metilglioxal (MGO). Painéis A e B mostram análises de *western blotting* para MG-H1. O painel C mostra a imunohistoquímica para MG-H1, demonstrando coloração negativa (ausência de ligação primária ao anticorpo), imunocoloração nos grupos controle e MGO, destacando coloração positiva fraca no urotélis do grupo controle, e forte coloração positiva no urotélis e no detrusor no grupo MGO. Os painéis D e E exibem a expressão proteica da GLO1 e o Painel F mostra os dados de atividade enzimática. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5-6$ animais por grupo). * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle (teste t não pareado). D, músculo liso detrusor; SU, suburotélis; U, urotélis; L, lúmen. As barras pretas (canto inferior esquerdo ou direito) no painel C representam uma escala de 10 μ m (objetivas $\times 4$ e $\times 10$). As setas pretas no painel C indicam imunocoloração de MG-H1.

Com base nos dados obtidos, o tratamento com MGO induziu um estresse dicarbonílico no animal, conforme demonstrado pelo aumento dos níveis desta molécula no soro e na bexiga, ao mesmo tempo em que a atividade da enzima de detoxificação (GLO1) encontra-se reduzida.

Procuramos, então, compreender como a sobrecarga de MGO afetaria o comportamento miccional dos animais, utilizando, inicialmente, o ensaio em papel de filtro. Na Figura 8A são apresentadas imagens representativas do papel de filtro de cada grupo. No grupo MGO observamos aumento significativo no número de micções ($p < 0,01$; Figura 8B), e diminuição significativa no volume médio de micção ($p < 0,01$; Figura 8C). Em relação ao volume total de micção, não se constatou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 8D). Em relação ao grupo controle, é possível ainda verificar no grupo MGO um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de micções menores que 25 μl (Figura 8E) e de micções entre 25 μl e 100 μl (Figura 8F), enquanto o número de micções com volume superior a 100 μl foi significativamente menor neste grupo experimental ($p < 0,01$; Figura 8G). Em relação à distribuição das micções (canto *versus* centro), não houve diferença significativa entre os grupos controle e MGO quanto à distribuição nos cantos (Figura 8H); no entanto, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na distribuição de micções no centro no grupo MGO (Figura 8I), evidenciando que o tratamento com MGO induz um perfil de hiperatividade vesical nos animais.

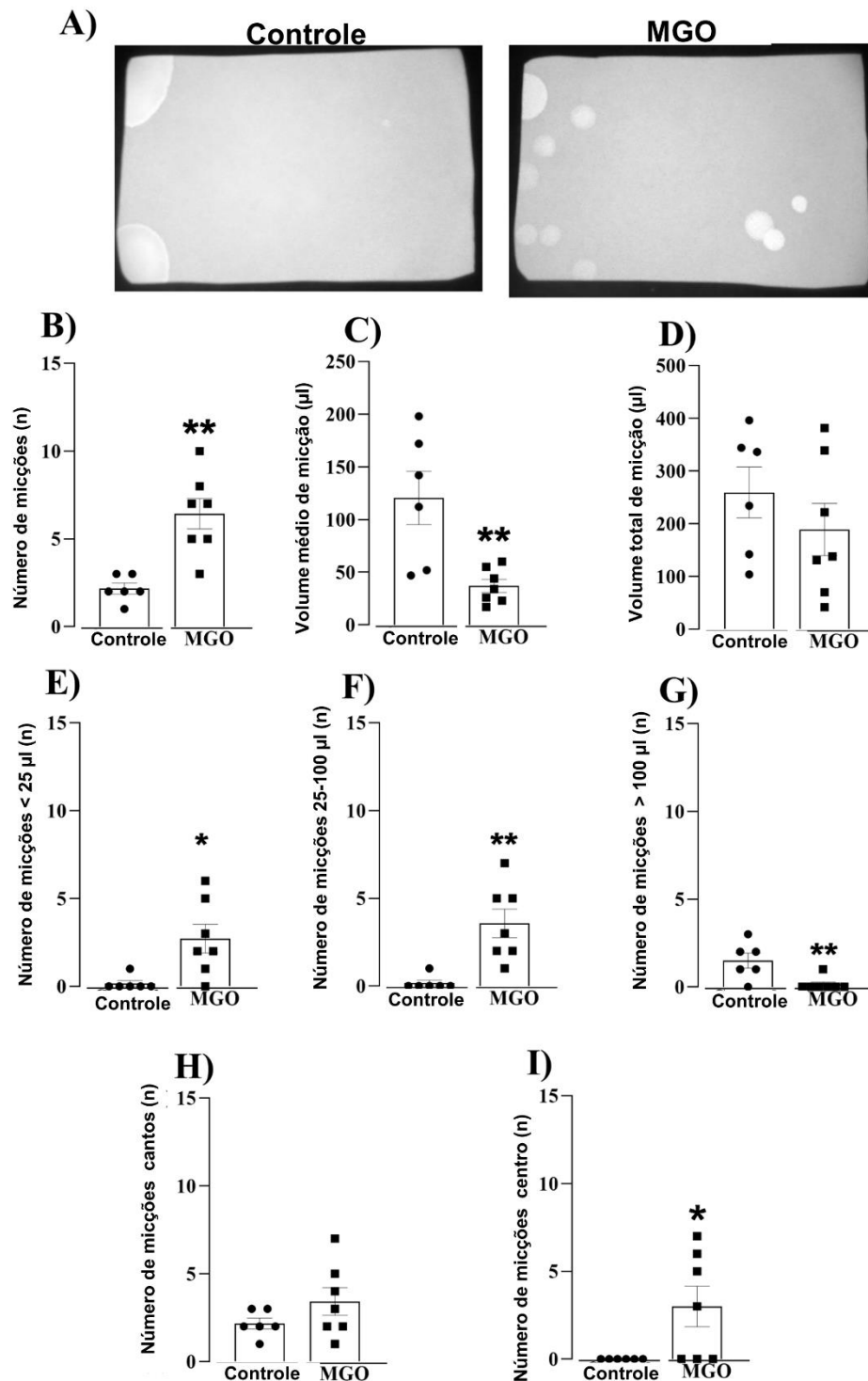


Figura 8. Análise do comportamento miccional de animais expostos ao metilglioxal (MGO; 0,5% por 12 semanas). O Painel A mostra imagens representativas do ensaio de papel de filtro nos grupos controle e MGO. Os painéis B, C e D exibem o número de micções, volume médio de micções e volume total de micções, respectivamente. A distribuição das micções em diferentes volumes é ilustrada nos Painéis E a G (< 25 μl, 25-100 μl e > 100 μl, respectivamente). A distribuição das micções no papel filtro é apresentada nos painéis H (micções no canto) e I (micções no centro). Os dados são expressos como média ± EPM (n= 6-7 animais por grupo). * p < 0,05, ** p < 0,01 em comparação com o grupo controle (teste t não pareado).

Para a caracterização da contratilidade *in vitro* do músculo detrusor, bexiga foi mantida intacta, presença do urotélio e suburotélio, ou ambos foram removidos mecanicamente (denudada). A Figura 9A mostra, por meio de histologia, que a remoção mecânica da mucosa preservou a camada detrusora, sem produzir danos aparentes.

Em seguida, avaliamos as respostas contráteis à estimulação elétrica de campo (EFS; 1-32 Hz), ao agonista muscarínico carbacol (10^{-10} a 10^{-4} M), ao agonista do receptor P2X α,β -metileno ATP (1-10 μ M) e ao Ca^{2+} extracelular (10^{-5} a 10^{-1} M) em bexigas obtidas de camundongos controle e expostos a MGO.

A aplicação de EFS (1 a 32 Hz) produziu contrações dependentes da frequência nos grupos controle e MGO (Figura 9B). No grupo controle, a remoção do urotélio e suburotélio não afetou significativamente as respostas contráteis da bexiga ao EFS em qualquer frequência avaliada; no entanto, no grupo MGO, as respostas contráteis ao EFS foram significativamente maiores do que no grupo controle, independentemente da bexiga estar intacta ou não ($p < 0,05$; Figura 9B).

A adição cumulativa de carbacol (10^{-10} a 10^{-4} M) produziu contrações dependentes da concentração nos grupos controles e MGO (Figura 9C). No grupo controle, a remoção do urotélio e suburotélio não afetou significativamente as contrações da bexiga induzidas pelo carbacol. A exposição ao MGO também não alterou significativamente as contrações induzidas por carbacol em preparações com a bexiga intacta, mas aumentou significativamente as contrações em bexiga denudada ($p < 0,01$; Figura 9C). A potência do carbacol foi significativamente menor em bexiga denudada do grupo MGO ($5,79 \pm 0,11$; $p < 0,05$) em comparação com os outros grupos ($6,16 \pm 0,13$, $6,12 \pm 0,14$ e $6,27 \pm 0,15$ para controle-intacto, MGO-intacto e controle-denudado, respectivamente).

Em relação ao α,β -metileno ATP, a adição não cumulativa deste agonista purinérgico produziu respostas contráteis dependentes da concentração nos grupos controles e MGO (Figura 9D). Comparado ao grupo controle, a exposição ao MGO aumentou significativamente as respostas contráteis ao α,β -metileno ATP, fenômeno este observado tanto em bexigas intactas como naquelas sem mucosa ($p < 0,05$; Figura 9D).

A adição cumulativa de CaCl_2 extracelular (10^{-5} a 10^{-1} M) em meio totalmente desprovido deste íon causou contrações da bexiga dependentes da concentração da solução nos grupos controle e MGO (Figura 9E). No grupo controle, a remoção da mucosa aumentou significativamente as contrações da bexiga. A exposição ao MGO aumentou as contrações induzidas por CaCl_2 nas preparações de bexiga intacta comparado ao grupo controle-intacto

($p < 0,05$), sendo que as contrações permaneceram aumentadas nas preparações desnudadas de mucosa (Figura 9E).

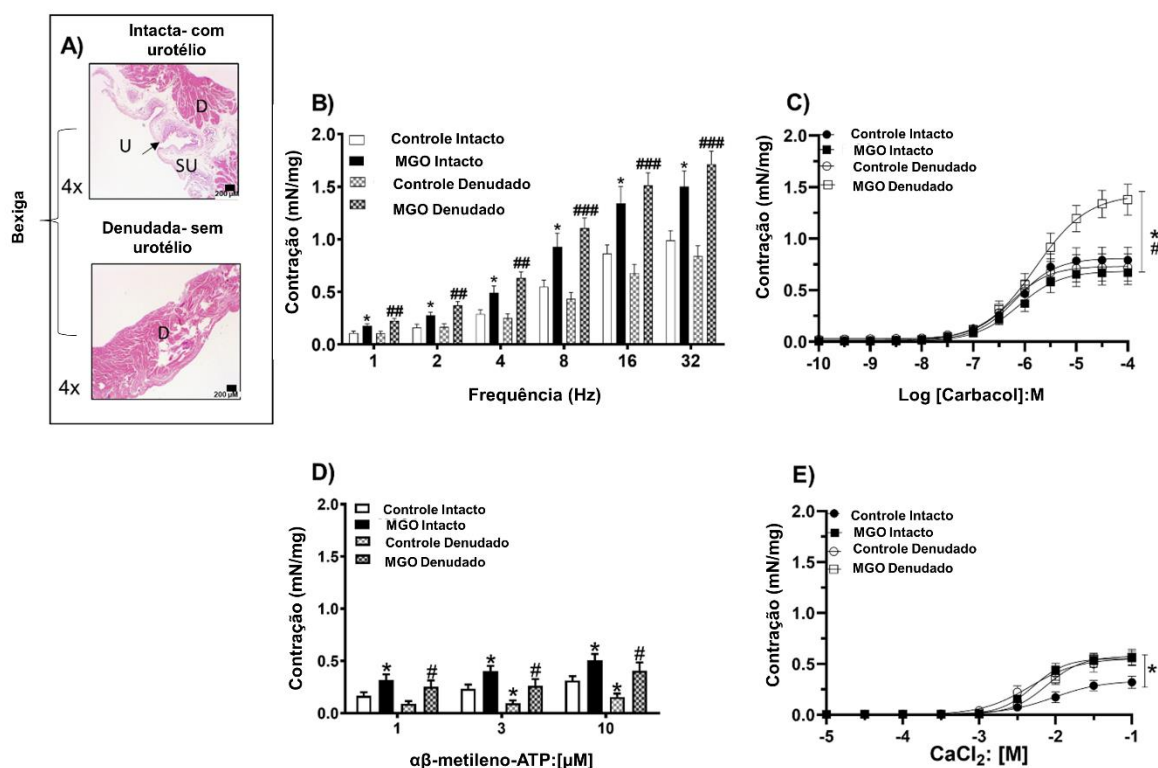


Figura 9. Efeitos do tratamento com metilglioxal (MGO) nas contrações da bexiga intacta e sem mucosa. O painel A mostra imagens histológicas representativas de bexigas intactas, indicando a presença de urotélio, suburotélío e músculo liso detrusor, enquanto na bexiga denudada apenas o detrusor é observado. Os painéis B, C, D e E mostram as contrações induzidas por estimulação de campo elétrico (EFS; 1 a 32 Hz), carbachol (10^{-10} a 10^{-4} M), α , β -metileno-ATP (1, 3 e 10 μ M) e Ca^{2+} extracelular (10^{-5} a 10^{-1} M), respectivamente. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM (6 a 10 ratos por grupo). * $p < 0,05$ em comparação com os respectivos grupos controle-intactos; # $p < 0,05$, ## $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ em comparação com os respectivos grupos de controle denudados. No painel A, o urotélio, o suburotélío e o músculo liso detrusor são designados como U, SU e D, respectivamente. As barras pretas (canto inferior direito) do painel A representam uma escala de 200 μ m (objetiva 4 $\times$).

No próximo passo da pesquisa buscamos identificar os possíveis alvos em que o MGO poderia estar agindo a fim de levar ao perfil de hiperatividade (*in vivo*) e hipercontratilidade detrusora (*in vitro*). Como ilustrado na Figura 10, investigamos se as alterações decorrentes do tratamento crônico com MGO e, conseqüentemente, a formação de AGEs (1) poderiam conduzir a modificações tanto no urotélio quanto no detrusor (2). No que se refere às células uroteliais, elegemos o TRPA1 (3) e o RAGE (3 e 4) como alvos de interesse. Já no músculo detrusor, além do RAGE, analisamos a geração de EROs e a ativação

do sistema Rho-quinase como possíveis vias de ação (4), para verificar nossa hipótese de que o tratamento com MGO leva à hiperatividade vesical pela ativação dessas vias (5).

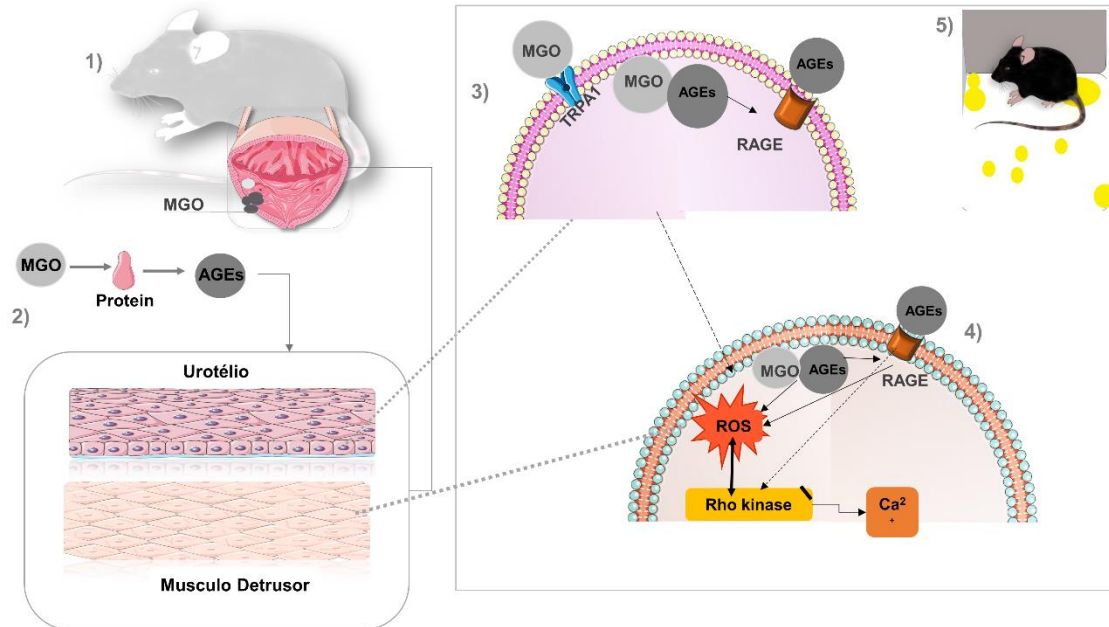


Figura 10: Esquematização dos alvos de ação do metilglioxal (MGO) em potencial na bexiga de animais submetidos ao tratamento crônico com este composto.

4.1.1 Ativação do TRPA1 pelo MGO induz fenótipo de bexiga hiperativa em fêmeas

Com o propósito de investigar se o tratamento crônico com MGO ativa o TRPA1, buscamos inicialmente evidências de alterações na expressão proteica deste canal na bexiga. Observamos um aumento significativo na expressão proteica do TRPA1 no grupo MGO em comparação ao controle ($p < 0.01$; Figura 11A) no urotélio. A imuno-histoquímica revelou forte marcação para TRPA1 no grupo MGO, presente principalmente no urotélio, ao passo que no grupo controle notamos apenas marcação fraca para TRPA1 no urotélio (Figura 11B).

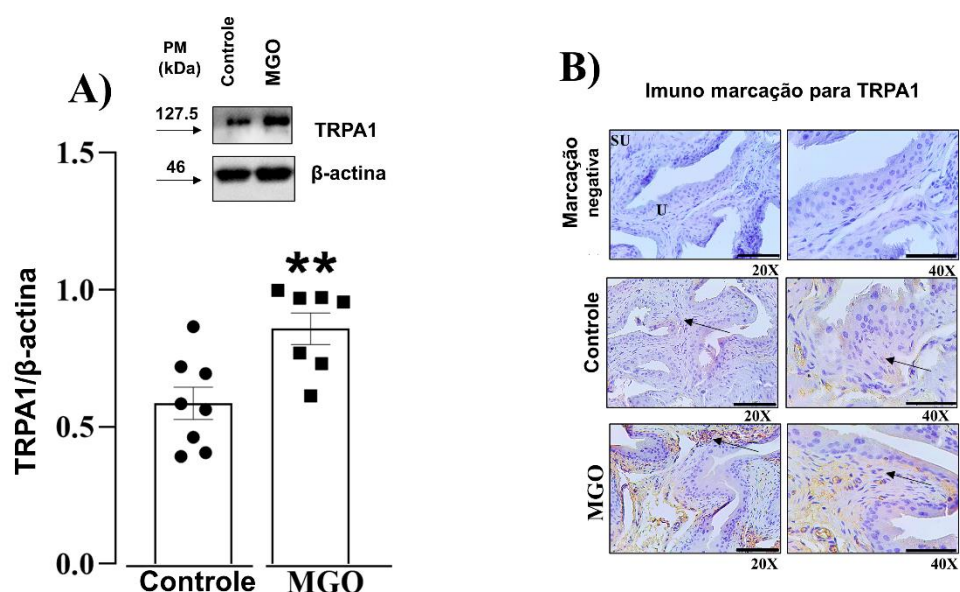


Figura 11. Expressão proteica e imuno-histoquímica de TRPA1 na bexiga de animais controle ou tratados com metilglioxal (MGO 0,5% por 12 semanas). O painel A mostra a expressão proteica através de análise *western blotting*. O painel B apresenta imuno-histoquímica para TRPA1, destacando imunocoloração negativa (ausência de sinal de anticorpo), bem como imunocoloração nos grupos controle e MGO. A imunocoloração positiva é observada nas regiões urotelial (U) e suburotelial (SU) da bexiga. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7-8$ animais por grupo). ** $p < 0,01$) em comparação com o grupo controle (teste t não pareado). As barras pretas nos painéis C (canto inferior direito) representam uma escala de 10 μ m (objetivas $\times 20$ e $\times 40$). As setas pretas indicam a imunocoloração do TRPA1.

Com o intuito de investigar se o canal TRPA1 está implicado na hiperatividade vesical induzida pelo MGO, realizamos o ensaio de cistometria de enchimento, empregando o antagonista seletivo do TRPA1, HC 030031, por meio de infusão contínua. Para tanto, cada grupo (controle ou MGO) foi aleatoriamente dividido em três subgrupos: (i) infusão contínua de salina, (ii) infusão contínua de veículo (0.001% de DMSO) e (iii) infusão contínua de HC 030031. Foram analisados os seguintes parâmetros: frequência de micção (Figura 12B), capacidade da bexiga (Figura 12C), volume de micção (Figura 12D), complacência (Figura 12E), pressão basal (Figura 12F), pressão limiar (Figura 12G) e pressão máxima (Figura 12H).

Na Figura 12A, apresentamos os cistometrogramas representativos de cada subgrupo, mostrando micções regulares no grupo controle (recebendo salina ou veículo) e micções alteradas no grupo MGO, as quais foram normalizadas pelo tratamento com HC 030031. No grupo controle não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros medidos em relação à infusão de HC 030031 ou de veículo. Porém, no grupo MGO, observou-se um aumento significativo na frequência de micção ($p < 0,001$; Figura 12B) e diminuições significativas na capacidade da bexiga (Figura 12C), no volume de micção (Figura 12D)) e na complacência da bexiga (Figura 12E), sem alterações nas pressões basal, limiar e de pico (Figura 12F, G, H), quando comparado ao grupo controle, evidenciando um perfil de hiperatividade da bexiga. A infusão contínua de HC 030031 no grupo MGO reduziu significativamente os parâmetros de frequência de micção ($p < 0,001$), e aumentou a capacidade da bexiga ($p < 0,01$), volume de micção ($p < 0,001$) e complacência ($p < 0,001$). Não foram observadas alterações nas pressões basal, limiar e de pico pelo HC 030031.

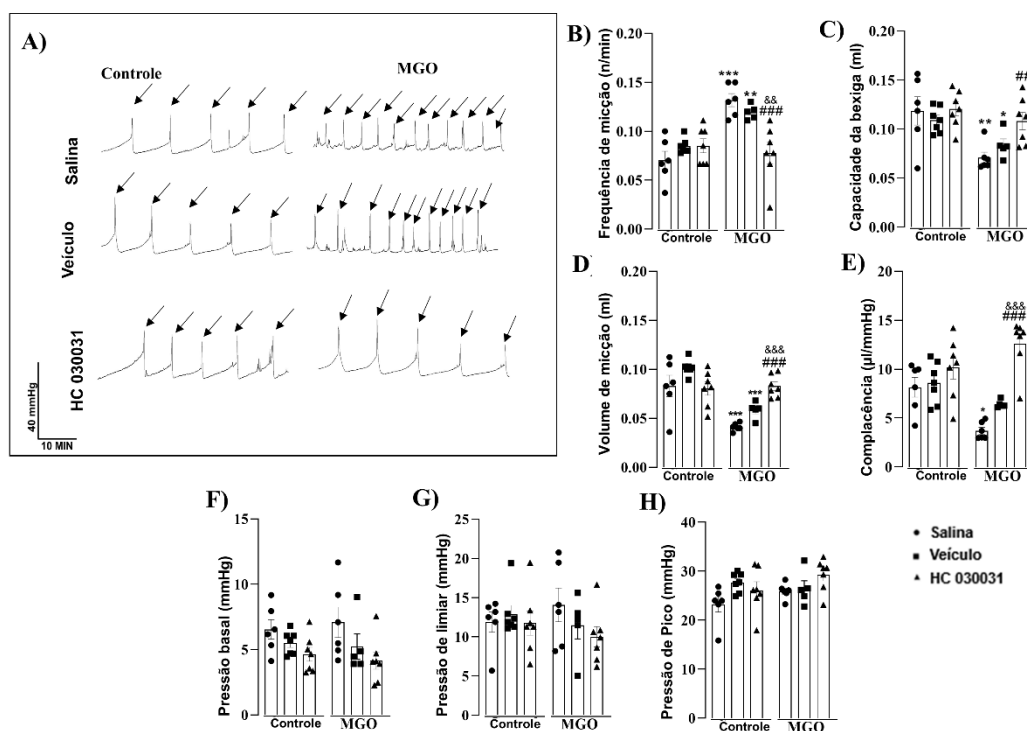


Figura 12. Efeito da infusão contínua do antagonista seletivo TRPA1, HC 030031, nos parâmetros cistométricos em animais controle e tratados com metilglioxal (MGO 0,5% por 12 semanas). O Painel A mostra cistometria representativa da infusão de solução salina, veículo (DMSO 0,001%) e HC 030031 (1 nmol/min) por 1 hora na bexiga. Os painéis de B a H mostram frequência de micção, capacidade da bexiga, volume de micção, complacência, pressão basal, pressão limiar e pressão de pico, respectivamente. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM ($n = 5-7$ animais por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com o respectivo grupo de controle, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ em comparação com o grupo de solução salina MGO e $p < 0,05$, && $p < 0,01$, &&& $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo MGO (ANOVA de uma via, seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett para comparação com o grupo controle; o teste de comparações múltiplas de Bonferroni foi utilizado para comparar todos os grupos). As setas no painel A indicam picos de micção.

Em experimentos separados, incubamos tiras de bexigas intactas com HC 030031 (30 min, 10 μ M) ou veículo (DMSO 0,001%), submetendo-as posteriormente à contração induzida por EFS e carbacol. O objetivo foi de confirmar se a ativação do TRPA1 pelo MGO contribui para o detrusor hiperativo (Figura 9). Os resultados estão apresentados na Tabela 2 e Figura 13. Para EFS, a incubação com HC 030031 reduziu de modo significativo a resposta contrátil no grupo MGO, particularmente nas frequências de 4 a 32 Hz, sem alterar a resposta no grupo controle (Figura 13 A, B). Em relação ao carbacol (Figura 13 C, D, E), o HC 030031 também reduziu de modo significativo a resposta contrátil a este agonista no grupo MGO, sem modificar a do grupo controle. A incubação com veículo não alterou a resposta contrátil induzida por EFS ou carbacol nem no grupo controle nem no grupo MGO. Não observamos diferenças significativas na potência (pEC_{50}) ao carbacol nos grupos avaliados (Tabela 2).

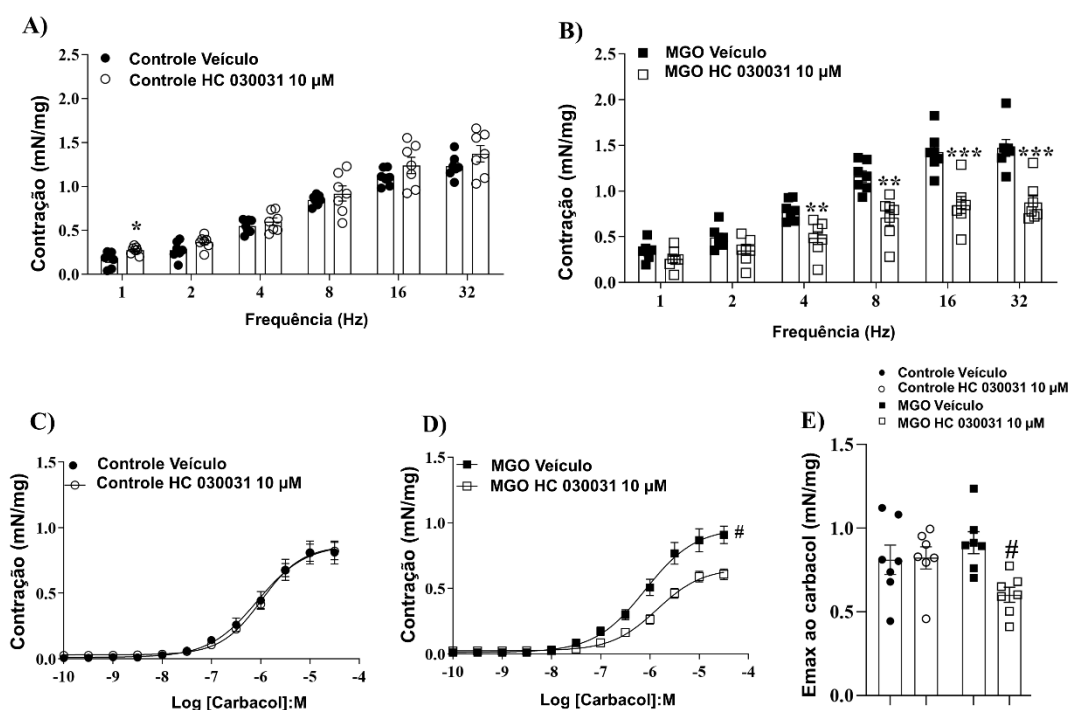


Figura 13. Efeito da incubação do antagonista seletivo de TRPA1, HC 030031 (10 μ M), e veículo (DMSO 0,001%) por 30 minutos, nas contrações induzidas por estimulação elétrica de campo (EFS) e carbacol em tiras intactas de bexiga obtidas de animais controles ou tratados com metilglioxal (MGO 0,5%, 12 semanas). Os painéis A e B mostram as contrações induzidas por EFS (1–32 Hz) e os painéis C e D mostram a resposta ao carbacol (10^{-10} a 3×10^{-5} M). O painel E mostra a resposta máxima (E_{max}) ao carbacol. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7$ animais por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao veículo (DMSO 0,001%) do mesmo grupo. # $p < 0,05$ comparado ao veículo do grupo MGO (teste t não pareado e ANOVA de uma via seguido de Tukey).

Tabela 2- Resposta contrátil induzida por estimulação elétrica de campo (EFS; 1-32 Hz) e carbacol em bexigas obtidas de animais controles ou tratados cronicamente com metilglioxal (MGO 0.5% 12 semanas).

Resposta contrátil (mN/mg) por grupo				
Frequência	Controle + veículo	MGO + veículo	Controle + HC 030031	MGO + HC 030031
1Hz	0,17 ± 0,03	0,34 ± 0,03**	0,25 ± 0,16	0,26 ± 0,04
2 Hz	0,27 ± 0,03	0,49 ± 0,04**	0,36 ± 0,02	0,34 ± 0,05
4Hz	0,54 ± 0,02	0,78 ± 0,04**	0,60 ± 0,04	0,48 ± 0,06##
8Hz	0,84 ± 0,02	1,16 ± 0,06*	0,92 ± 0,08	0,70 ± 0,08##
16Hz	1,10 ± 0,03	1,42 ± 0,08*	1,23 ± 0,09	0,84 ± 0,09###
32Hz	1,23 ± 0,04	1,47 ± 0,09*	1,47 ± 0,09	0,87 ± 0,08###
E_{max} ao carbacol	0,81 ± 0,08	0,91 ± 0,06	0,82 ± 0,06	0,60 ± 0,04#
pEC₅₀ ao carbacol	6,06 ± 0,11	5,98 ± 0,06	6,09 ± 0,10	5,85 ± 0,08

Os dados são expressos como média ± EPM (n = 7 animais por grupo). *p < 0,05, **p < 0,01, comparado ao grupo controle veículo; # p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 comparado ao grupo MGO veículo; ANOVA de uma via seguido de Tukey

4.1.2 Papel da via MGO-AGE-RAGE-EROs na hipercontratilidade detrusora

Com o propósito de investigar se o tratamento com MGO ao longo de 12 semanas induziria um aumento na expressão de RAGE na bexiga, realizamos ensaios de RT-PCR e imuno-histoquímica. Para a avaliação do conteúdo de RAGE, utilizamos pulmões de camundongos saudáveis como controle positivo, visto que o RAGE neste tecido é também visualizado em condições fisiológicas⁹⁰. De fato, a imuno-histoquímica mostrou claramente a presença de imunocoloração para RAGE nos pulmões de camundongos, principalmente nas regiões peribronquiolares e perivasculares (Figura 14A). Na Figura 14B, são apresentados controles negativos de imunocoloração, nos quais não há a presença do anticorpo primário, em amostras de bexiga.

Nas bexigas obtidas de animais controles, a imunorreatividade para RAGE foi observada apenas no urotélio (Figura 14C). Entretanto, no grupo tratado com MGO, observou-se intensa imunorreatividade para RAGE, não somente no urotélio como também no detrusor, além de ser detectada no próprio endotélio vascular de vasos irrigando o detrusor e a lâmina própria (Figura 14D).

A análise das expressões de mRNA de RAGE nos tecidos da bexiga revelou uma expressão significativamente maior no grupo MGO em comparação ao controle ($p < 0,01$; Figura 14E).

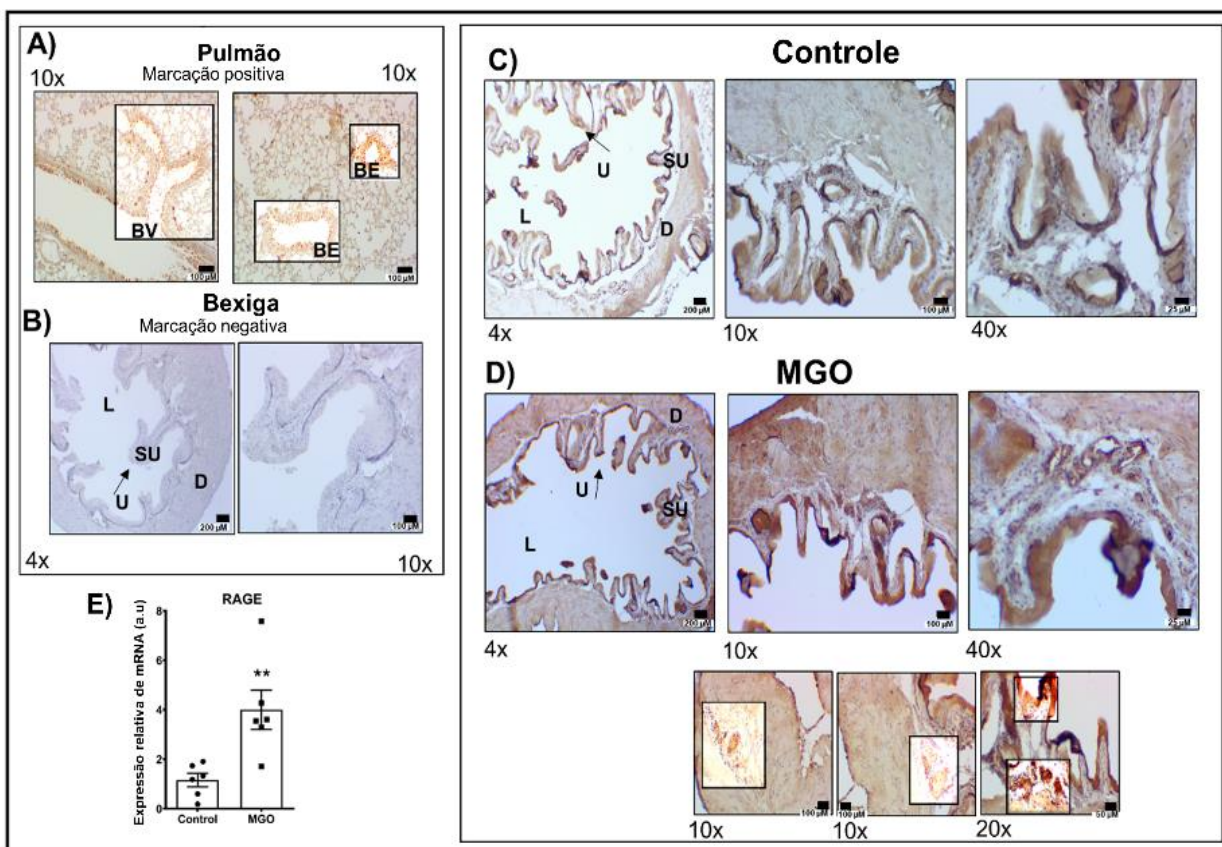


Figura 14. Imunocoloração e expressão de mRNA de RAGE em camundongos controle e tratados com metilglioxal (MGO). O painel A mostra a imuno-histoquímica para RAGE em pulmões de camundongos saudáveis (coloração marrom), como controle positivo, detalhando o epitélio brônquico (BE) e os vasos sanguíneos (BV). O painel B mostra o controle negativo (omissão de anticorpo) na bexiga, detalhando o urotélio (U), suburotélio (SU), lúmen (L) e músculo liso detrusor (D). Os painéis C e D mostram, respectivamente, a imunorreatividade para RAGE na bexiga dos grupos controle e MGO. Os três subpainéis do painel D (grupo MGO) detalham a imunocoloração para RAGE nos vasos que irrigam o detrusor e o urotélio, bem como na camada superficial do urotélio e nos vasos do sub-urotélio. Na bexiga dos camundongos controle, a imunorreatividade do RAGE foi observada apenas no urotélio, enquanto no grupo MGO, uma forte imunorreatividade do RAGE foi observada no urotélio, detrusor e endotélio vascular. As barras pretas nos painéis A a D (canto inferior direito) representam escalas de 200 µm (objetiva 4×), 100 µm (objetiva 10×), 50 µm (objetiva 20×) e 25 µm (objetiva 40×). O painel E mostra as expressões de mRNA de RAGE em tecidos da bexiga com dados expressos como média ± EPM de unidades arbitrárias (au; **p < 0,01 em comparação com controle, n = 6).

Diante desses dados mostrando aumento na expressão de RAGE na bexiga de animais tratados com MGO, nosso próximo passo foi investigar se a ativação do eixo MGO-AGE-RAGE contribuiria para o aumento da formação de EROs na bexiga dos camundongos (Figura 15A). Para tanto, utilizamos o corante fluorescente DHE em seções frescas da bexiga, quantificando a marcação no urotélio (Figura 15B) e no músculo detrusor (Figura 15C). Em comparação com o grupo controle, a exposição ao MGO resultou em um aumento significativo dos níveis de EROs (Figura 15A), detectados tanto no urotélio ($p < 0,05$; Figura 15B) quanto no músculo liso detrusor ($p < 0,001$; Figura 15C).

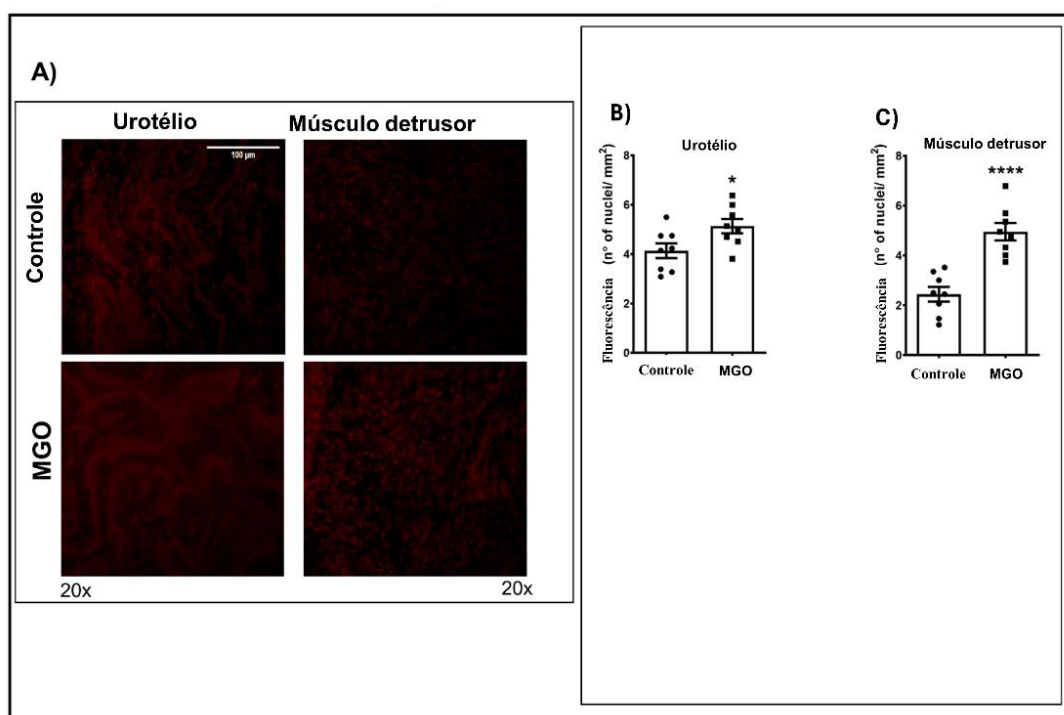


Figura 15. O tratamento com metilglioxal (MGO) aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) no urotélio e no músculo liso detrusor. O painel A mostra imagens representativas da geração de EROs através da fluorescência induzida por corante diidroetídio (DHE) no urotélio e no músculo liso detrusor nos grupos controle e MGO (20 $\times$). Os painéis B e C mostram dados quantitativos dos níveis de EROs no urotélio e no músculo liso detrusor em ambos os grupos ($n = 8$). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo controle. A barra branca no painel A (canto superior direito) representa uma escala de 100 μm (objetiva 20 $\times$).

Com base nesses dados, investigamos em seguida o efeito do tratamento crônico com MGO sobre a atividade da SOD na bexiga. Nossos dados revelaram que o tratamento crônico com MGO provocou uma diminuição significativa na atividade da SOD, quando comparada ao grupo controle ($p < 0,01$; Figura 16A).

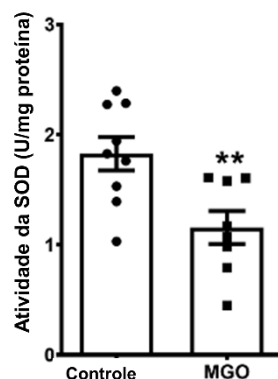


Figura 16- Atividade da superóxido dismutase (SOD) em bexigas de animais controles ou tratados cronicamente com metilglioxal (MGO 0,5%, 12 semanas). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM ($n = 5-9$ animais por grupo). ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle (teste T não pareado).

Com o objetivo de compreender a natureza da hipercontratilidade detrusora *in vitro* (veja Figura 9), passamos a investigar se a ativação da via AGE-RAGE-EROs pelo MGO na parede vesical afeta a atividade da Rho-GTPase, contribuindo para aumento da sensibilidade ao cálcio.

Em um primeiro conjunto de experimentos, realizamos ensaios de RT-PCR para avaliar a expressão dos canais de cálcio tipo L (Cacn1) e dos componentes do sistema Rho-quinase nas bexigas de animais expostos ao MGO. A análise de qPCR revelou que a exposição ao MGO resultou em um aumento significativo das expressões de mRNA dos canais de cálcio tipo L, RhoA, ROCK1 e ROCK2, quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 17A-D).

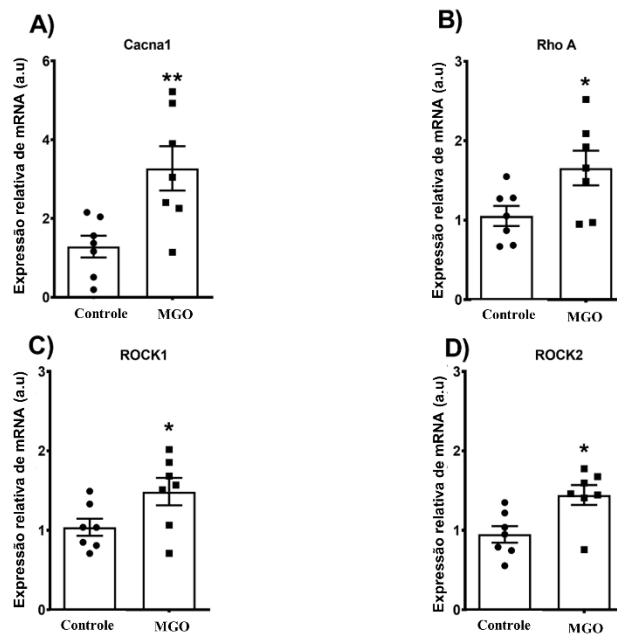


Figura 17. O tratamento com metilglioxal (MGO) aumenta as expressões de mRNA dos canais de Ca^{2+} tipo L (A), RhoA (B), ROCK1 (C) e ROCK 2 (D) em bexiga intacta. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM para $n = 7$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle.

Por fim, investigamos a possibilidade de que o aumento das contrações da bexiga em camundongos expostos ao MGO estivesse relacionado a uma maior produção de EROs e à ativação do sistema Rho-quinase no músculo liso detrusor. Para isso, foram realizadas preparações desnudadas de mucosa pré-incubadas por 30 minutos com PEG-SOD (87 UI/ml) ou com o inibidor da Rho-quinase Y27632 (1 μM).

No grupo de controle, nas concentrações utilizadas, tanto de SOD quanto de Y27632 não afetaram as contrações induzidas por EFS, carbachol, α, β -metileno ATP e CaCl_2 (Figura 18 A, C, E, G). No entanto, no grupo MGO, a pré-incubação com SOD ou Y27632 reduziu de modo significativo as contrações da bexiga em resposta a EFS, carbachol e α, β -metileno ATP (Figura 18B, D, F). No grupo MGO, o aumento das contrações induzidas por CaCl_2 não foi afetado pela pré-incubação com SOD, mas foi normalizado pelo Y27632 (Figura 18H).

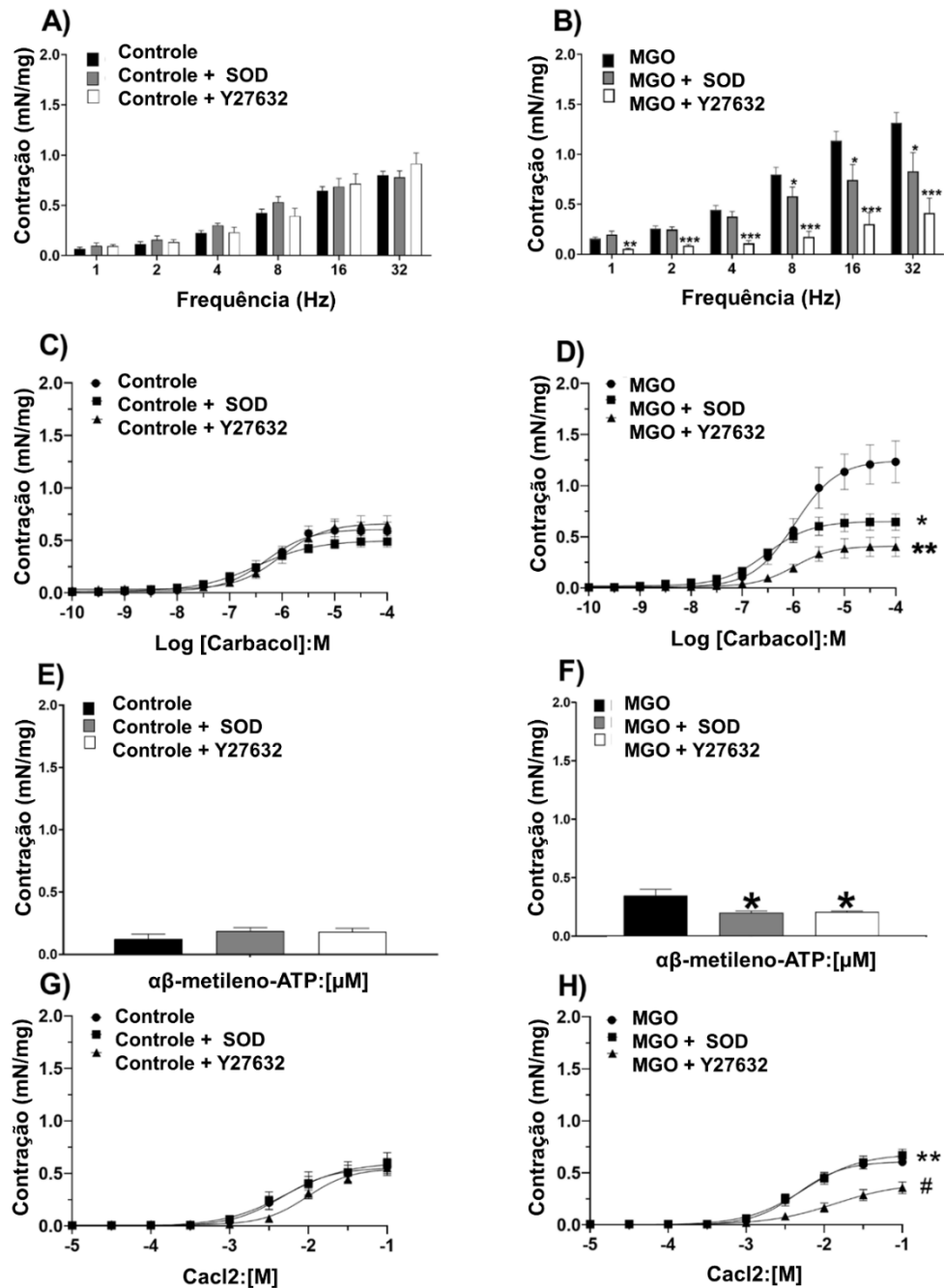


Figura 18- Efeito da superóxido dismutase (PEG-SOD; 87 UI/ml) e do inibidor de Rho-quinase Y27632 (1 μ M) em bexigas desprovidas de mucosa / urotélio obtidas de animais controles ou tratados com metilglioxal (MGO 0,5%, 12 semanas). Os painéis A, C, E e G mostram as respostas contráteis induzidas por estimulação elétrica de campo (frequência), carbacol, $\alpha\beta$ -metileno-ATP (1 μ M) e Ca^{2+} extracelular em camundongos controle, respectivamente. Os painéis B, D, F e H mostram as contrações induzidas pelos mesmos estímulos em camundongos tratados com MGO. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 5-6 por grupo). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 em comparação com preparações não tratadas. #p < 0,05 comparado ao grupo MGO + SOD

4.2. Abordagens terapêuticas para limitar o MGO: efeito da metformina em camundongos machos

Avaliamos em seguida o potencial da metformina em bloquear as ações desencadeadas pelo MGO. Para abordar essa questão, adotamos o mesmo desenho experimental de tratamento de 12 semanas com MGO 0,5%, acrescido ou não de metformina (300 mg/kg) nas últimas 2 semanas (10^a. a 12^a. semana) utilizando camundongos machos. Incluímos um grupo controle que não foi exposto ao MGO.

A Figura 19A confirma que os níveis séricos de MGO são significativamente maiores ($p < 0,001$) nos animais tratados com MGO em comparação com o grupo controle, os quais foram significativamente reduzidos pelo tratamento com metformina. Os níveis séricos de F-AGEs foram também maiores no grupo MGO em relação ao controle, havendo uma forte tendência de redução dos mesmos nos animais tratados com metformina (Figura 19B).

No que diz respeito à expressão gênica e à atividade da glioxalase, constatamos que o tratamento com MGO resultou em redução significativa de ambos os parâmetros no grupo MGO ($p < 0,01$), sendo tais reduções revertidas pelo tratamento com metformina ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente; Figura 19C-D).

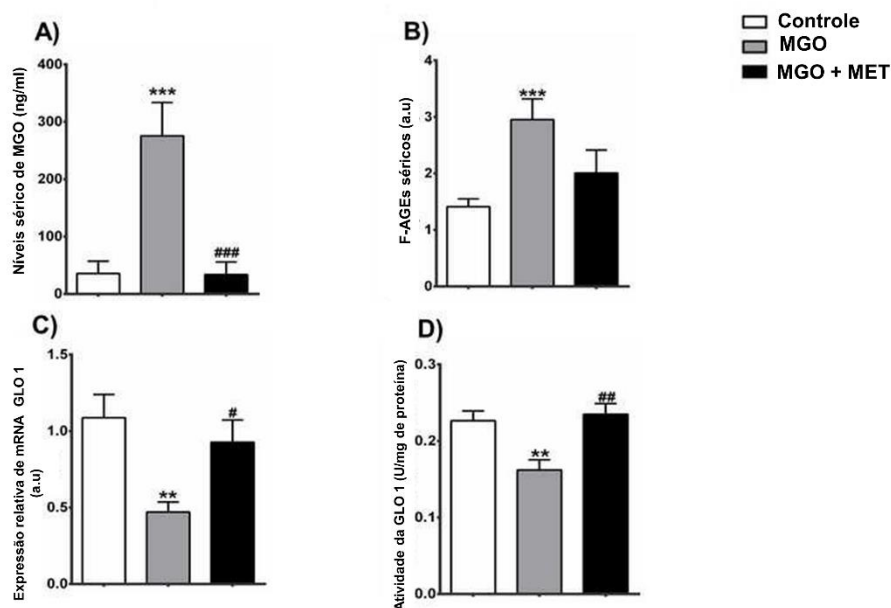


Figura 19. O efeito do tratamento com metformina nos níveis séricos de metilglioxal (MGO) painel A, níveis séricos de AGEs fluorescentes (F-AGEs) painel B, expressão de mRNA painel C e atividade painel D de glioxalase 1 (GLO1) em bexigas de controles ou camundongos tratados com MGO, machos. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7-8$ animais em cada grupo). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ em comparação com o grupo MGO+MET. a.u., unidades arbitrárias.

O conteúdo de colágeno foi significativamente maior no grupo MGO em comparação ao controle ($p < 0,01$; Figura 20A, B), sendo que o tratamento com metformina reverteu o conteúdo de colágeno observado no grupo MGO.

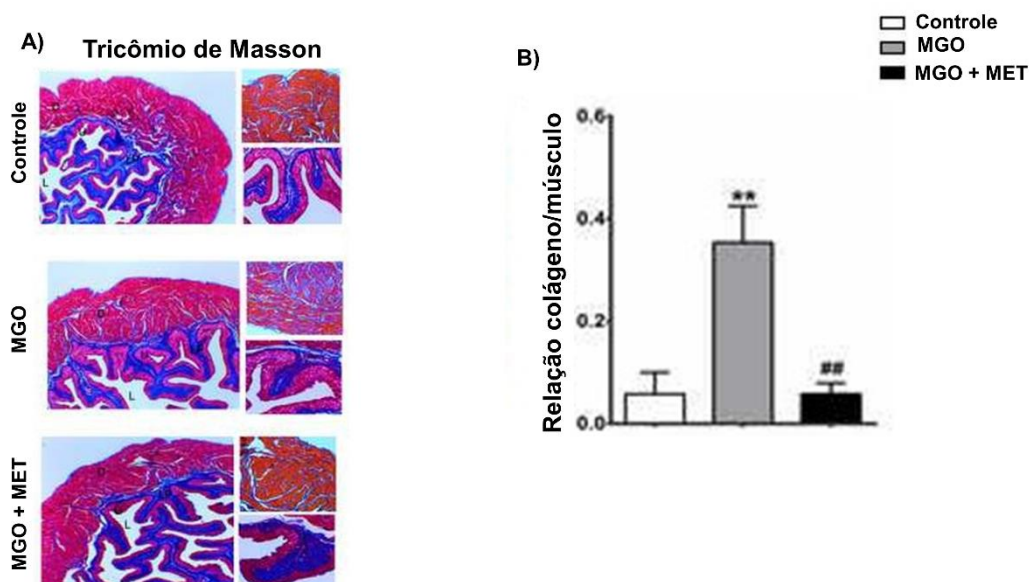


Figura 20. O tratamento com metformina restaura o conteúdo do colágeno no detrusor de camundongos tratados com metilglioxal (MGO) aos níveis controles. Painel A mostra as imagens histológicas da coloração de tricrômico de Masson nos grupos controle, MGO e MGO + MET (escalas 20× e 10× para as imagens maiores e menores). O painel B mostra a relação colágeno/músculo. Os dados são expressos como média ± EPM para $n = 6$ animais para o grupo. ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle. ## $p < 0,01$ em comparação com o grupo MGO+MET.

Posteriormente, investigamos se o tratamento com metformina poderia melhorar o comportamento miccional dos animais sob tratamento com MGO. A avaliação do comportamento miccional incluiu três ensaios distintos: a coleta de urina (Figura 21), o ensaio do papel de filtro (Figura 22) e a cistometria de enchimento (Figura 23).

Na coleta de urina, quantificamos o volume total de micção, o volume médio de micção, o número de micções, o intervalo entre micções e a gravidade específica adquirida durante a coleta (Figura 21A-E). Observamos aumentos significativos no volume total de micções e no volume médio de micções no grupo MGO em comparação com os animais controle ($p < 0,05$), sendo esses efeitos totalmente revertidos pelo tratamento com metformina (Figura 21A, B). No entanto, o número de micções, os intervalos entre micções e a gravidade específica não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 21C, D e E).

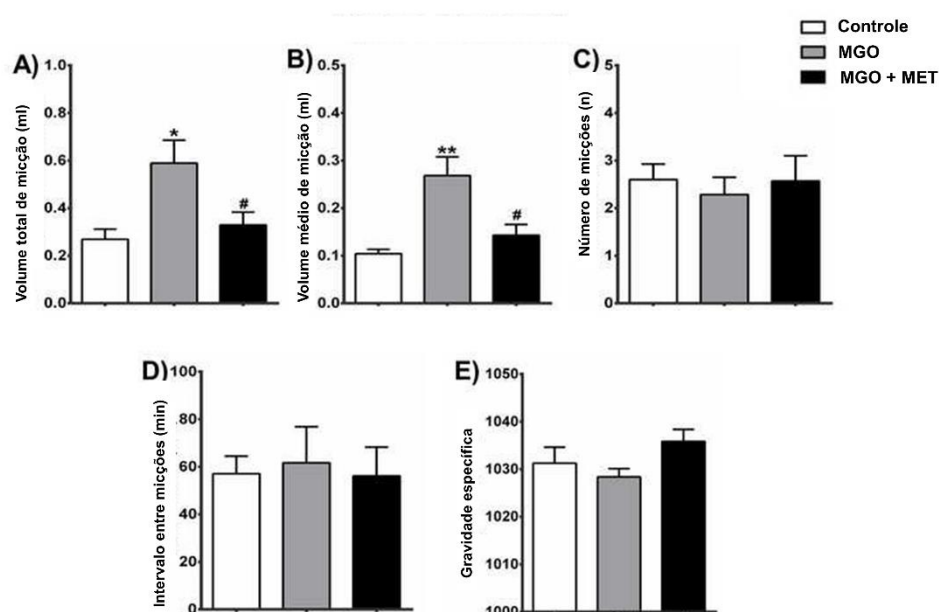


Figura 21. Parâmetros de coleta de urina em animais controle, tratados com metilglioxal (MGO) e tratados com MGO + metformina (MET). Os painéis de A a E mostram, respectivamente, volume total de micções, volume médio de micções, número de micções, intervalo entre micções e gravidade específica. Os dados são expressos como média ± EPM para n = 6-7 animais por grupo. *p < 0,05 comparado ao grupo controle; **p < 0,01 em comparação com o grupo controle, #p < 0,05 em comparação com o grupo MGO+MET.

A Figura 22 apresenta os resultados da análise do comportamento miccional usando a técnica do papel de filtro. No Painel 22A, mostramos papel de filtro representativo dos comportamentos miccionais nos três grupos estudados.

Comparados ao grupo controle, os camundongos tratados com MGO apresentaram aumentos significativos no volume total de micções (p < 0,05; Figura 22B) e no volume médio de micções (p < 0,05; Figura 22C), não havendo alterações nem no número de micções (Figura 22D) nem na área de micção primária (Figura 22E). Além disso, cerca de 95% das manchas de micção dos camundongos do grupo MGO ocorreram nos cantos (Figura 22E). O tratamento com metformina normalizou o volume total de micções e o volume médio de micções em camundongos tratados com MGO, sem modificar os outros parâmetros.

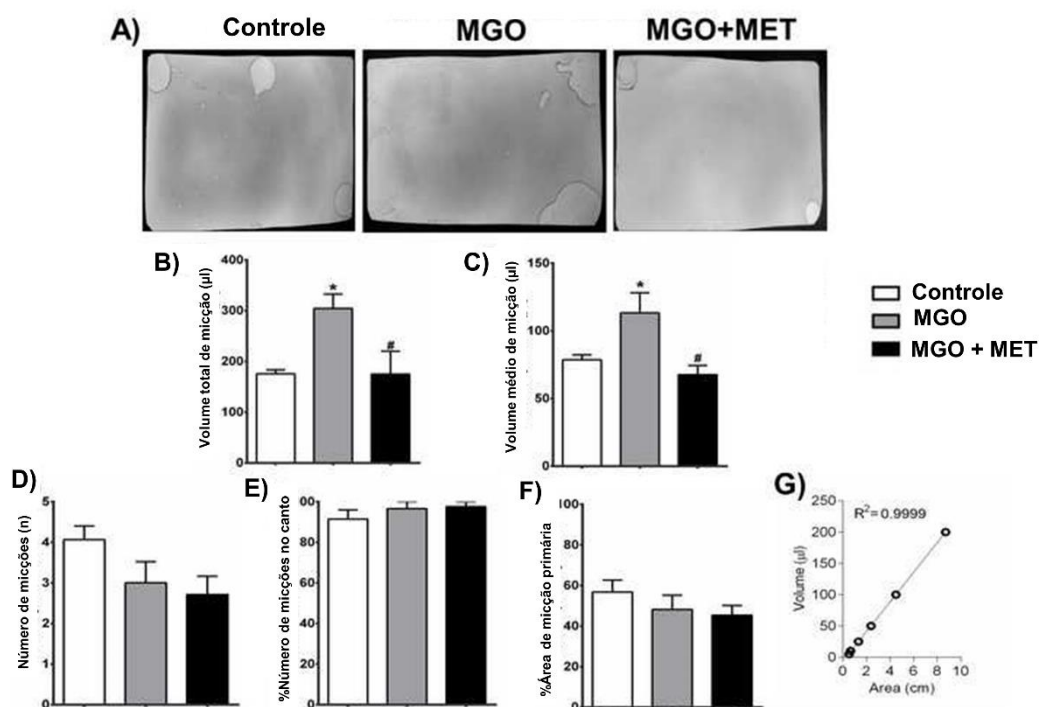


Figura 22. Análise do comportamento de micção através da técnica de papel de filtro em animais controle, tratados com metilglioxal (MGO) e tratados com MGO + metformina (MET). Os painéis de A a G mostram, respectivamente, imagens de micção no papel de filtro, volume total de micção, volume médio de micção, número de micções, % de número de micções nos cantos, % de área de micção primária e curva padrão área-volume. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM para $n = 6-7$ animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo MGO+MET.

Os dados da cistometria de enchimento são apresentados na Figura 23. No Painel 23A, exibimos os traçados cistométricos representativos para os três grupos de animais. A micção em camundongos tratados com MGO foi caracterizada por aumentos significativos ($p < 0,05$) na pressão basal, frequência de contrações não miccionais (CNMs), capacidade da bexiga, pressão intermiccional, pressão oscilatória intermiccional média e volume residual (Figura 23B-G).

A eficiência da micção em animais tratados com MGO foi reduzida em 40% ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (Figura 23H). O tratamento com metformina normalizou essas alterações no grupo MGO. Os demais parâmetros cistométricos (pressão limiar, pressão máxima, frequência de micção, volume miccional, intervalos entre micções e complacência vesical) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 23I-N).

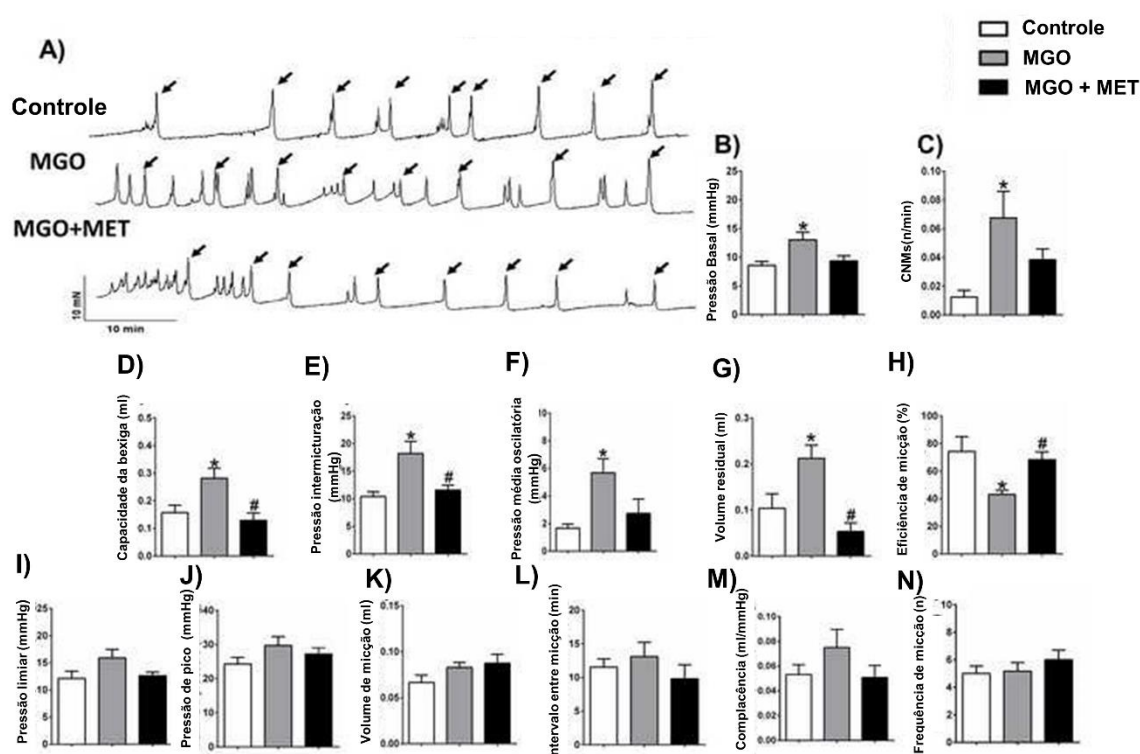


Figura 23. Efeito do tratamento com metformina (MET) nas alterações cistométricas em camundongos tratados com metilglioxal (MGO). Os painéis de A a N mostram, respectivamente, registros cistométricos representativos (A), pressão basal (B), frequência de contrações não miccionais/min (CNMs; C), capacidade da bexiga (D), pressão intermicturação (E), pressão oscilatória média (F), volume residual (G), eficiência de micção (H), pressão limiar (I), pressão de pico (J), volume miccional (K), intervalo entre micções (L), complacência (M) e frequência de micção (N). Os dados são expressos como média ± EPM para n = 4-6 animais por grupo. *p < 0,05 comparado ao grupo controle; #p < 0,05 comparado ao grupo MGO+MET. As setas no painel A indicam picos de micção.

Por fim, investigamos se o tratamento com metformina reduz as alterações de contratilidade *in vitro* em animais tratados com MGO. Observamos que as respostas contráteis ao carbachol (10^{-10} a 3×10^{-5} M; Figura 24A) e EFS (1-32 Hz; Figura 24B) foram significativamente maiores nas bexigas, intactas com a presença do urotélio, dos camundongos tratados com MGO em relação ao grupo controle (p < 0,05).

O tratamento com metformina normalizou essas respostas contráteis aos níveis do grupo controle. Além disso, as respostas contráteis ao α, β -metileno-ATP (1, 3 e 10 μ M) também foram significativamente maiores no grupo MGO, sendo esse efeito normalizado pelo tratamento com metformina (Figura 24C). Não observamos diferenças significativas nas contrações induzidas por KCl (80 mM) entre os grupos estudados (Figura 24D).

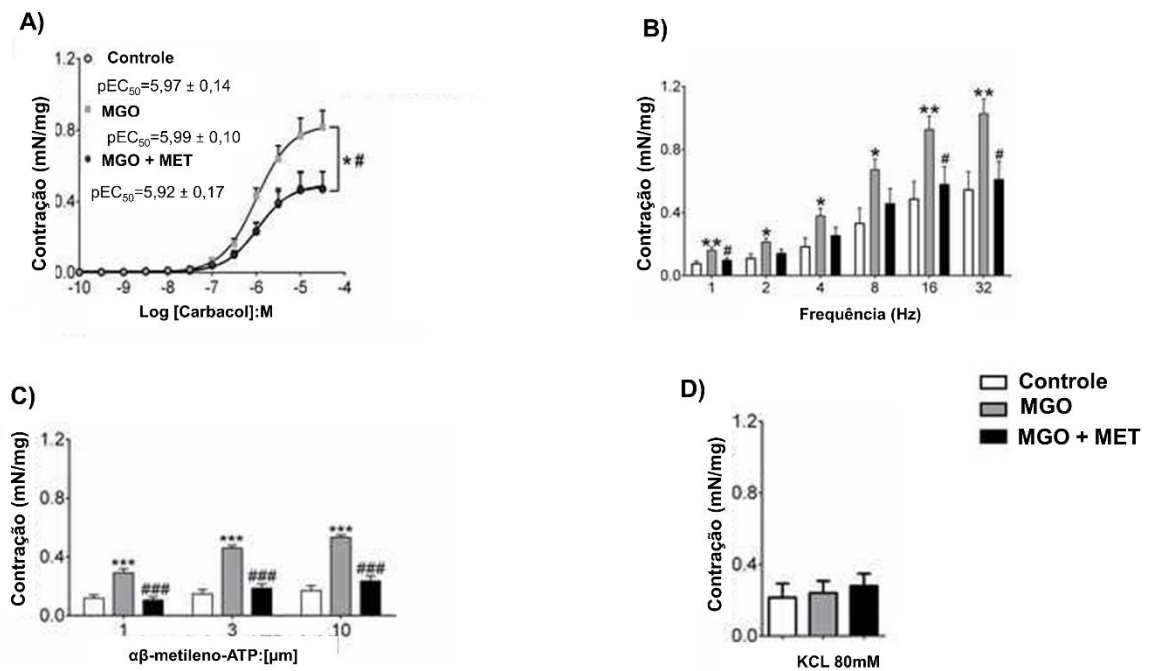


Figura 24. Tratamento com metformina (MET) reverte a hipercontratibilidade detrusora *in vitro* em bexigas, intactas com a presença do urotélio, de camundongos tratados com metilglioxal (MGO). Os painéis A, B, C e D mostram as respostas contráteis ao carbacol, EFS, α -metileno-ATP e KCl (80 mM), respectivamente. Observe que os valores de pEC₅₀ para carbacol (inserido no interior do painel A) não diferiram entre os grupos. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM para n = 7-8 animais por grupo. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 em comparação com o grupo controle; #p < 0,05, ###p < 0,001 em comparação com o grupo MGO+MET.

4.2.1 Abordagens terapêuticas para limitar o metilglioxal: efeito do ALT-711 em camundongos controles e obesos deficientes de leptina, machos e fêmeas

Como objetivo final deste estudo, buscamos elucidar os efeitos do MGO em animais que apresentam condições de obesidade e diabetes. Para alcançar esse objetivo, optamos por utilizar um modelo animal de DM2, especificamente, o camundongo deficiente de leptina ob/ob. Esses animais são caracterizados por hiperglicemia, hiperfagia e desenvolvimento de obesidade^{26,29-30}. Em seguida, nosso objetivo foi investigar os efeitos ALT-711 sobre as alterações vesicais, pois essa droga é descrita como capaz de inativar os AGEs, sem afetar os níveis de glicose¹⁰⁴⁻¹⁰⁵.

Camundongos ob/ob, machos e fêmeas, foram tratados ou não com ALT-711 (1 mg/kg) por 8 semanas, utilizando-se como controle um grupo de animais magros (wild-type). Na Figura 25, mostramos os dados do peso corporal dos animais e parâmetros glicêmicos no final do tratamento. O peso corporal em machos e fêmeas ob/ob foi marcadamente maior em comparação com o respectivo grupo magro ($p < 0,001$; Figura 25A). Nos grupos magros, foi observada uma pequena (mas significativa) redução no peso corporal das fêmeas em comparação com os camundongos machos ($p < 0,05$). ALT-711 não alterou o peso corporal nos camundongos ob/ob.

Os níveis de glicose em jejum foram significativamente maiores em camundongos ob/ob machos e fêmeas ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) em comparação com o respectivo grupo magro (Figura 25B). Camundongos ob/ob machos apresentaram nível de glicose 33% maior em comparação com o grupo ob/ob fêmea ($p < 0,05$). O tratamento com ALT-711 não alterou significativamente os níveis de glicose em jejum em camundongos ob/ob machos e fêmeas (Figura 25B).

Em seguida, realizamos testes de tolerância à insulina onde os níveis de glicose foram avaliados dentro de 20 a 30 minutos após uma injeção intraperitoneal de insulina (1,0 U/kg; Figura 1C) e calculamos a área sob a curva (AUC; Figura 25D) e os valores de Kitt (como índice de resistência à insulina; Figura 25E). Os valores de AUC do teste de tolerância à insulina foram maiores em camundongos ob/ob machos e fêmeas em comparação com os grupos magros. Os valores de AUC em fêmeas ob / ob foram menores em comparação com camundongos machos ob/ob ($p < 0,001$; Figura 25D). Entretanto, o tratamento com ALT-711 não interferiu significativamente nos valores de AUC nos grupos ob/ob.

Os valores de Kitt foram significativamente menores em camundongos ob/ob machos e fêmeas em comparação com o grupo magro, revelando resistência à insulina nos

animais obesos (Figura 25E). O tratamento com ALT-711 não afetou significativamente os valores de Kitt em camundongos ob/ob (Figura 25E).

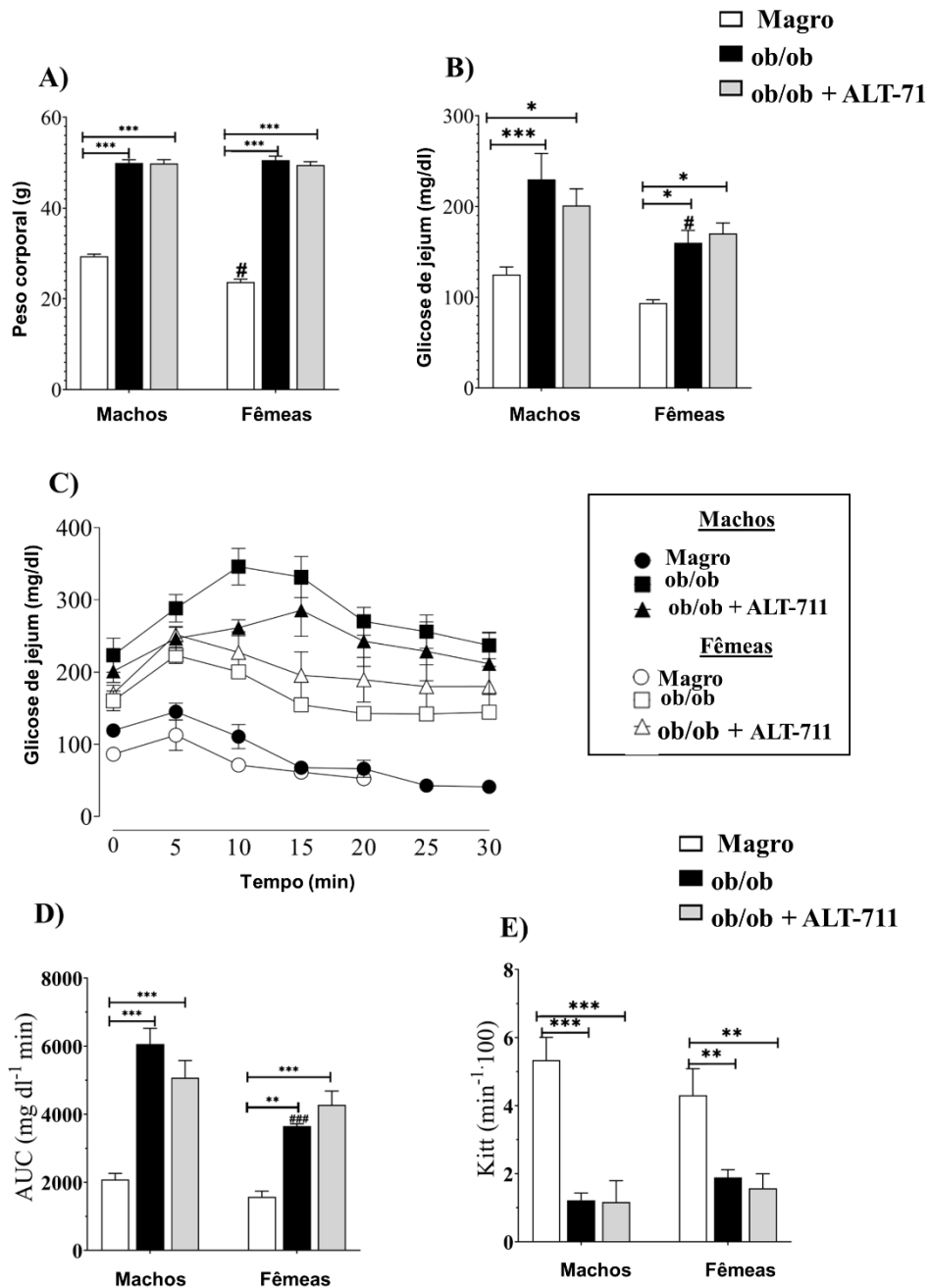


Figura 25. Peso corporal (A), glicemia de jejum (B), sensibilidade à insulina (C), área sob a curva (AUC; *area under the curve*) para o teste de sensibilidade à insulina (D) e valores de K_{itt} (E) em camundongos machos e fêmeas wild-type (magros) e ob/ob (obesos). Animais ob/ob foram tratados ou não com alagebrium (ALT-711). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 13$ a 18 animais para peso corporal no painel A; e $n = 5-7$ animais por grupo para parâmetros glicêmicos mostrados nos painéis B e E). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ entre grupos (ANOVA duas-vias, seguida de comparações múltiplas pelo teste post-hoc de Tukey); # $p < 0,01$ em comparação com o respectivo grupo macho (ANOVA duas-vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

Posteriormente, procedemos à avaliação dos níveis séricos de MGO e F-AGEs em camundongos controles e ob/ob. Observou-se que os níveis séricos de MGO foram significativamente elevados tanto em camundongos ob/ob machos ($p < 0,001$) quanto em fêmeas ($p < 0,05$) em comparação com os grupos magros (Figura 26A). Notavelmente, os níveis de MGO no grupo ob/ob macho (e no grupo ob/ob + ALT-711, macho) foram significativamente maiores aos observados no respectivo grupo ob/ob fêmeas ($p < 0,01$). No entanto, o tratamento com ALT-711 reduziu de forma significativa os níveis elevados de MGO tanto em camundongos ob/ob machos quanto em ob/ob fêmeas (Figura 25A).

Adicionalmente, os níveis séricos de F-AGEs mostraram-se significativamente elevados em camundongos ob/ob machos ($p < 0,001$) e fêmeas ($p < 0,01$) em relação aos grupos magros (Figura 26B), notando-se aqui que não houve diferenças estatísticas entre camundongos machos e fêmeas ob/ob para este parâmetro. No entanto, o tratamento com ALT-711 resultou em redução significativa nos níveis de F-AGEs em camundongos ob/ob, independentemente do sexo. Curiosamente, no grupo ob/ob + ALT-711, os níveis de F-AGEs nas fêmeas foram ainda mais baixos em comparação com o grupo ob/ob machos ($p < 0,01$; Figura 26B).

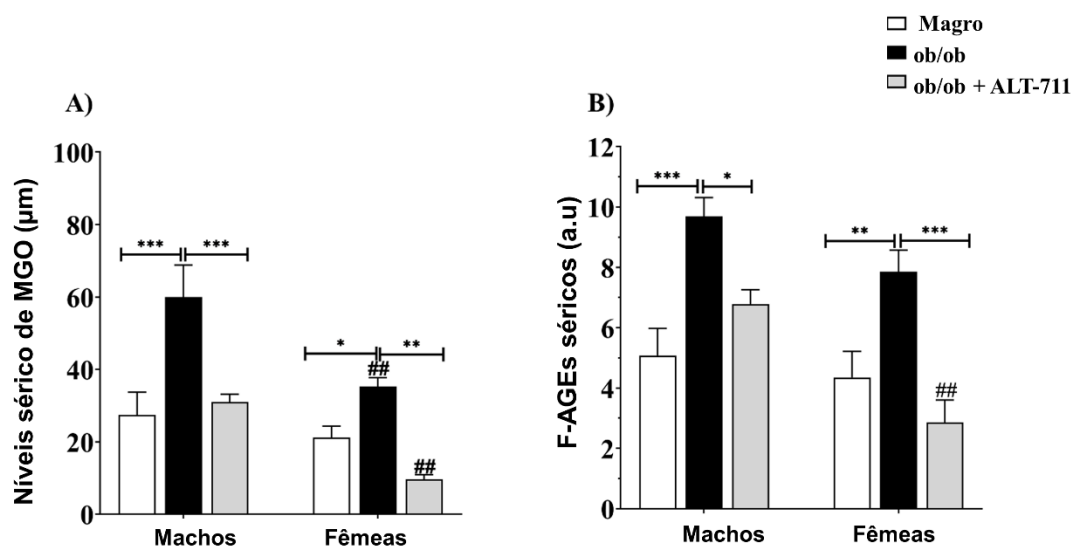


Figura 26. Níveis de metilglioxal (MGO; A) e produtos finais de glicação avançada fluorescentes (F-AGEs; B) em soro de camundongos machos e fêmeas wild-type (magros) e ob/ob (obesos). Animais ob/ob foram tratados ou não com alagebrium (ALT-711). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 4-9$ animais em cada grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ entre grupos (ANOVA duas-vias, seguida de comparações múltiplas pelo teste post-hoc de Tukey). ## $p < 0,01$ em comparação com o respectivo grupo macho (ANOVA duas-vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni). a.u., unidades arbitrárias.

Determinamos o conteúdo total dos AGEs na bexiga avaliando os seguintes AGEs: dímero de lisina derivado de glioxal (GOLD), dímero de lisina derivado de metilglioxal (MOLD), dímero de lisina derivado de 3-desoxiglucosona (DOLD), 3-desoxiglucosona (3-DG), N-épsilon-(carboximetil) lisina (CML), N-épsilon-(1-carboxietil) lisina (CEL). Utilizamos um ensaio colorimétrico para a quantificação e os resultados estão representados na Figura 27A.

Paralelamente, avaliamos o conteúdo de MG-H1 por meio de *western blotting* e imuno-histoquímica, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 26B e C, respectivamente. O grupo ob/ob, machos e fêmeas, exibiu níveis marcadamente elevados dos AGEs totais (Figura 27A) e MG-H1 (Figura 27B) na bexiga em comparação com o grupo magro, os quais foram reduzidos pelo tratamento com ALT-711. A imunocoloração de MG-H1 foi realizada nas bexigas para indicar a localização de MG-H1 (Figura 27C). Nos grupos magros, a imunomarcação de MG-H1 não foi detectada na bexiga de camundongos machos, enquanto o grupo das fêmeas apresentou coloração discreta de MG-H1. Comparado aos grupos magros, no grupo ob/ob, o MG-H1 foi corado com maior intensidade no urotélio e no músculo liso do detrusor. O tratamento com ALT-711 reduziu a imunocoloração MG-H1 em grupos ob/ob machos e fêmeas (Figura 27C).

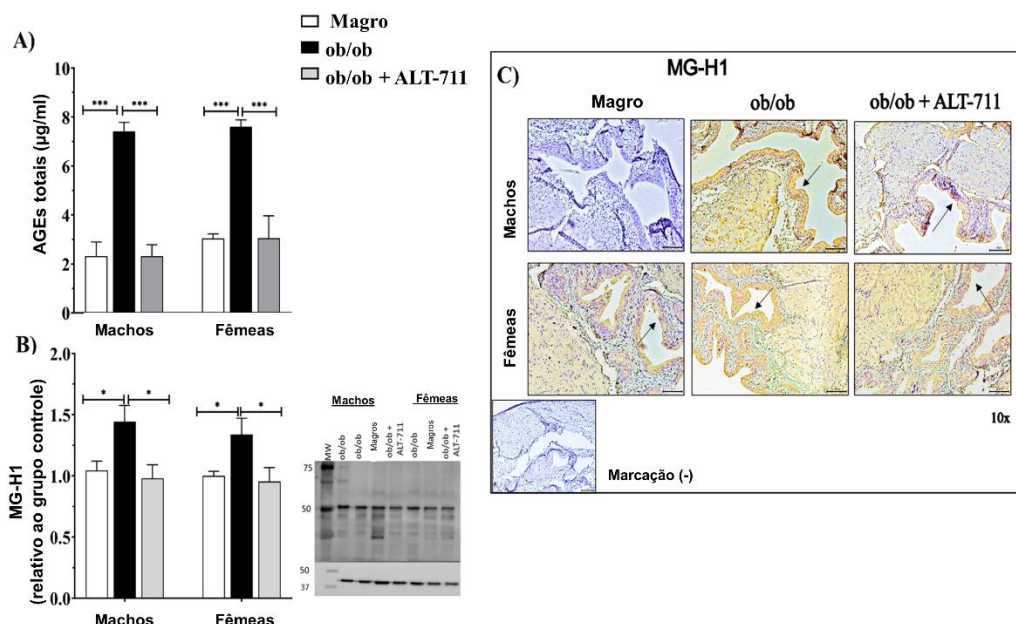


Figura 27. Níveis de AGEs totais (A), expressão proteica de hidroimidazolona 1 derivada de metilglioxal (MG-H1; B) e imunocoloração para MG-H1 (C) em bexiga de camundongos machos e fêmeas, magros, obesos (ob/ob) e obesos ob/ob tratados com alagebrium (ALT-711). Em (A), os níveis de AGEs total consistindo em N-épsilon-(carboximetil) lisina (CML), dímero de lisina derivado de glioxal (GOLD), N-épsilon-(1-carboxietil) lisina (CEL), lisina derivada de metilglioxal dímero (MOLD), dímero de lisina derivado de 3-desoxiglucosona (DOLD) e 3-desoxiglucosona (3-DG) foram medidos usando um ensaio colorimétrico. Em (B), os níveis de proteína de MG-H1 foram analisados por *western blotting*. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5-7$ animais em cada grupo). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ entre grupos (ANOVA duas-vias, seguida de comparações múltiplas pelo teste post-hoc de Tukey). Em (C), a imuno-histoquímica do MG-H1 mostra imagens representativas de cada grupo; observe aqui que a coloração MG-H1 foi observada no urotélio (indicado por setas pretas) e no músculo liso detrusor (indicado por x) em todos os grupos, exceto no grupo magro macho que não apresentou coloração MG-H1. A coloração MG-H1 foi claramente aumentada nos grupos ob/ob machos e fêmeas em comparação com os outros grupos.

Em seguida, procedemos à avaliação dos níveis de RAGE na bexiga por meio da técnica de RT-PCR em tempo real (Figura 28A) e do ensaio ELISA (Figura 28B). Observou-se um aumento significativo na expressão de mRNA do RAGE em camundongos ob/ob, machos ($p < 0,001$) e fêmeas ($p < 0,01$), quando comparados aos camundongos magros.

Ademais, notou-se que a expressão de RAGE nos machos ob/ob foi superior à das fêmeas ob/ob ($p < 0,05$). Destaca-se que o tratamento com ALT-711 promoveu uma redução significativa na expressão de RAGE nas bexigas de camundongos ob/ob, tanto machos quanto fêmeas, restaurando essa expressão aos níveis observados no grupo magro (Figura 28A). Paralelamente, constatou-se que os níveis de proteína RAGE estavam significativamente elevados nas bexigas de machos e fêmeas ob/ob em comparação com seus respectivos grupos magros ($p < 0,05$). O tratamento com ALT-711 promoveu uma redução significativa nesse parâmetro ($p < 0,001$; Figura 28B).

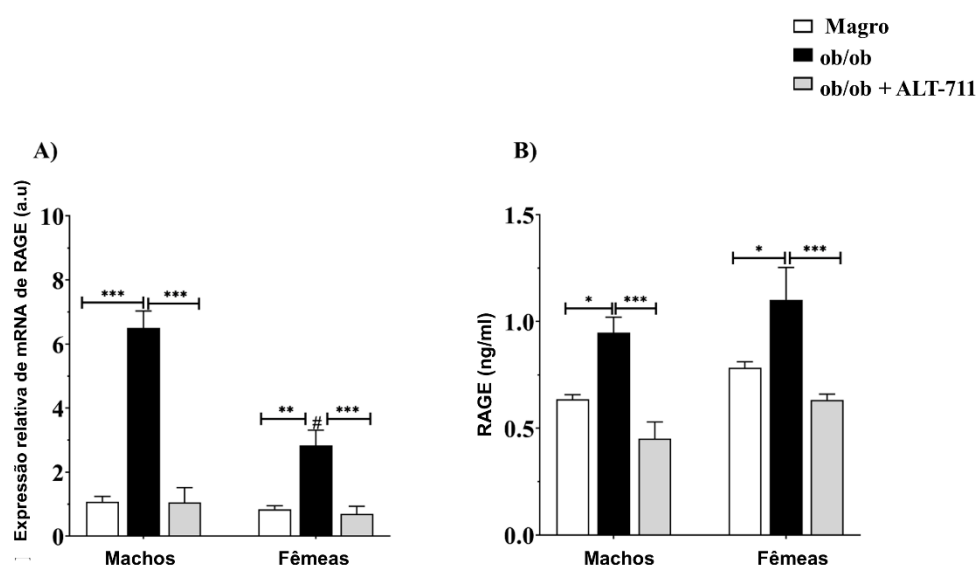


Figura 28. Expressão de mRNA (A) e níveis de proteína de RAGE em bexiga de camundongos, machos e fêmeas (magros), ob/ob (obesos) e ob/ob tratados ou não com alagebrium (ALT-711). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 5-8$ animais em cada grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ entre grupos; # $p < 0,05$ em comparação com o respectivo grupo macho (ANOVA duas-vias, seguida de comparações múltiplas usando o teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

A Tabela 3 mostra a atividade de GLO1 e GLO2 na bexiga. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos de machos (magros e ob/ob). No entanto, em camundongos fêmeas, as atividades para ambas, GLO1 e GLO2, foram significativamente maiores em ob/ob em comparação com o grupo magro ($p < 0,001$) ou com os grupos ob/ob machos ($p < 0,05$). O tratamento com ALT-711 reduziu o aumento das atividades GLO1 e GLO2 em camundongos fêmeas ob/ob ($p < 0,001$; Tabela 3).

Tabela 4. Atividade da glioxalase 1 (GLO1) e glioxalase 2 (GLO2) na bexiga nos grupos magro, ob/ob e ob/ob tratado com ALT-711.

Grupos	Atividade da GLO1 (UI/mg proteína)		Atividade da GLO2 (UI/mg proteína)	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Magro	1.10 ± 0.03	0.98 ± 0.09	1.62 ± 0.16	1.38 ± 0.12
ob/ob	1.05 ± 0.09	1.38 ± 0.12**	1.52 ± 0.13	2.15 ± 0.15***
ob/ob + ALT-711	1.07 ± 0.03	0.83 ± 0.06###	1.35 ± 0.06	1.27 ± 0.08###

Os valores são expressos como média ± EPM de 5-6 animais/grupo. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ em comparação com o grupo magro (fêmeas). ### $p < 0,01$ em comparação com fêmeas do grupo ob/ob (não tratado).

O consumo de água durante os protocolos experimentais de 8 semanas não foi diferente entre camundongos obesos (ob/ob) e magros (Tabela 4). No entanto, detectamos uma diferença entre os sexos na sexta semana de tratamento, onde o consumo de água nos machos (magro e ob/ob) foi significativamente maior do que nas fêmeas correspondentes ($p < 0,01$; Tabela 4).

Tabela 5. Consumo de água (ml/camundongo/dia) durante protocolos experimentais de oito semanas em camundongos magros e ob/ob, machos e fêmeas. O grupo ob/ob foi tratado ou não com ALT-711.

Semanas de tratamento	Machos			Fêmeas		
	Magro	ob/ob	ob/ob + ALT-711	Magro	ob/ob	ob/ob + ALT-711
0	3.5 ± 0.48	2.9 ± 0.13	3.4 ± 0.38	3.6 ± 0.29	4.6 ± 0.58	4.2 ± 0.04
1	3.5 ± 0.50	3.0 ± 0.57	3.7 ± 0.19	3.0 ± 0.52	3.4 ± 0.62	3.4 ± 0.82
2	3.5 ± 1.46	2.8 ± 0.83	3.0 ± 0.96	2.5 ± 0.02	2.4 ± 0.20	2.9 ± 0.06
3	3.0 ± 0.10	3.0 ± 0.02	3.5 ± 0.52	2.6 ± 0.10	2.6 ± 0.37	2.8 ± 0.63
4	2.7 ± 0.45	2.7 ± 0.70	2.6 ± 0.51	2.5 ± 0.15	3.3 ± 0.67	2.7 ± 0.01
5	3.9 ± 0.95	2.9 ± 0.43	3.0 ± 0.21	2.9 ± 0.95	2.9 ± 0.13	2.9 ± 0.60
6	5.8 ± 1.08 ^{##}	6.2 ± .34 ^{##}	4.2 ± 0.06 ^{###}	2.9 ± 0.11	3.2 ± 0.19	2.5 ± 0.24
7	4.9 ± 0.06	4.6 ± 0.04	3.6 ± 0.13	2.8 ± 0.07	2.5 ± 0.47	2.7 ± 0.11
8	4.3 ± 0.16	4.1 ± 0.14	3.6 ± 0.32	2.8 ± 0.05	2.7 ± 0.24	2.7 ± 0.12

A ingestão de água (ml/camundongo/dia) foi medida semanalmente durante protocolo experimental de 8 semanas em camundongos com idade entre 5 e 14 semanas. Tempo 0: Avaliação do consumo pré-tratamento às 5 semanas de idade. Tempo de 1 a 8 semanas (animais com 6 a 14 semanas de idade). Os dados são expressos como média ± EPM para 16 animais em cada grupo. ^{##} p < 0,01, ^{###} p < 0,001 em comparação com os respectivos grupos de fêmeas (ANOVA duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

Observou-se que, em geral, o peso da bexiga foi menor nos camundongos fêmeas em comparação aos machos em todos os grupos (p < 0,05; Figura 29). Entretanto, o peso da bexiga em camundongos ob/ob, tanto machos quanto fêmeas, não foi significativamente diferente em comparação com os respectivos grupos magros. O tratamento com ALT-711 não modificou de modo significativo o peso da bexiga em nenhum dos grupos.

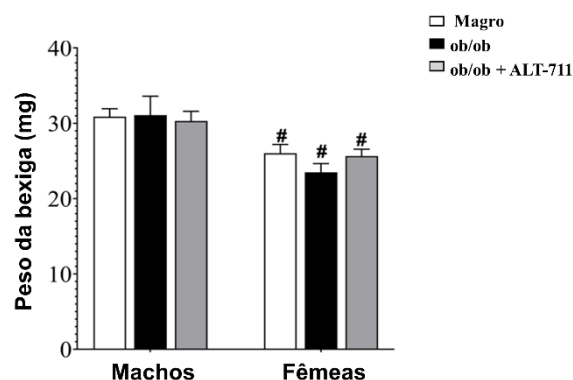


Figura 29. Peso da bexiga de camundongos machos e fêmeas magros e ob/ob (obesos) e em animais ob/ob tratados ou não com ALT-711. Os dados são expressos como média ± EPM (n = 9 – 17 animais por grupo para peso da bexiga). [#] P < 0,05 comparado ao respectivo grupo masculino (ANOVA duas-vias, seguida de comparações múltiplas usando o teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

Utilizando as colorações *Picrosirius Red* (Figura 30A, B) e tricrômico de Masson (Figura 30C e D) procedemos a análise do conteúdo de colágeno. A coloração *Picrosirius Red* revela o colágeno em roxo, o músculo detrutor em violeta e os núcleos em roxo azulado. Nos grupos magros machos e fêmeas, a proporção entre colágeno e músculo foi de aproximadamente 1:1 (Figura 30B), enquanto nos grupos ob/ob (tanto machos quanto fêmeas), essa proporção aumentou significativamente em relação aos grupos magros ($p < 0,001$). O tratamento com ALT-711 nos camundongos ob/ob restabeleceu a proporção do conteúdo de colágeno para cerca de 1:1 em ambos os sexos ($p < 0,001$).

A coloração tricrômico de Masson revela o colágeno em azul e o músculo em vermelho. A análise do conteúdo de colágeno por essa coloração revelou uma proporção de aproximadamente 1:1 entre colágeno e músculo no grupo magro. Houve um aumento significativo nesta proporção nos grupos ob/ob machos ($p < 0,05$) e fêmeas ($p < 0,001$), que foi restaurado para a proporção 1:1 nos camundongos tratados com ALT-711 (Figura 30C, D).

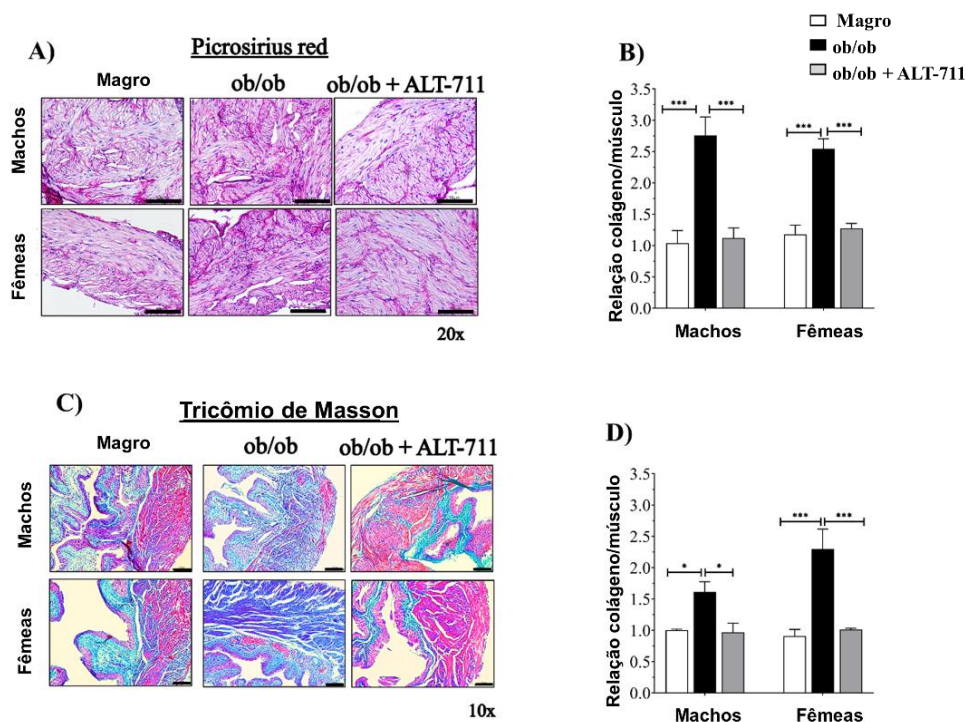


Figura 30. Imagens representativas e quantificação das proporções de colágeno: músculo liso detrutor usando as colorações *Picrosirius Red* (A, B) ou Tricrômio de Masson (C, D) em bexigas de machos e fêmeas de camundongos magros e ob/ob (obesos) ou ob/ob tratados ou não com alagebrium (ALT-711). Na coloração *Picrosirius Red*, o conteúdo de colágeno é exibido em roxo, o conteúdo muscular em violeta e os núcleos corados em roxo azulado, enquanto na coloração Tricrômio de Masson, o colágeno fica marcado em azul e o músculo em vermelho. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 4-7$ animais em cada grupo). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ entre grupos (ANOVA duas-vias, seguida de comparações múltiplas usando o teste post-hoc de Tukey).

Por último, realizamos a análise do comportamento miccional utilizando a técnica do papel de filtro, e os resultados são apresentados na Figura 31. No Painel A, são exibidas imagens representativas do comportamento miccional nos três grupos de estudo, tanto em machos quanto em fêmeas. Comparando com os grupos magros, os camundongos ob/ob machos e fêmeas apresentaram aumentos significativos no volume total de micção ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente; Figura 31B) e no volume médio de micção ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$, respectivamente; Figura 31C), enquanto o número de micções não foi significativamente afetado pela obesidade (Figura 31D).

O tratamento com ALT-711 não alterou o volume total de micção nos camundongos ob/ob machos e fêmeas (Figura 31B), mas normalizou o volume médio de micção em ambos os sexos ob/ob ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$, respectivamente; Figura 31C). Além disso, o tratamento com ALT-711 em camundongos ob/ob machos e fêmeas aumentou significativamente a frequência de micção (número de micções) em animais de ambos os sexos ($p < 0,001$ e $p < 0,05$; Figura 31D).

Para compreender o comportamento miccional mais profundamente, analisamos o número de micções de acordo com o volume de micção (Figura 31E e F). Os camundongos magros apresentaram um maior número de micções com volumes inferiores a 100 μ l, já os camundongos ob/ob (machos e fêmeas) demonstraram um padrão inverso, ou seja, elevado número de micções em volumes superiores a 200 μ l (Figura 31E e F). O tratamento com ALT-711 em camundongos ob/ob machos e fêmeas normalizou o tamanho das micções para os volumes observados no grupo magro (Figura 31E).

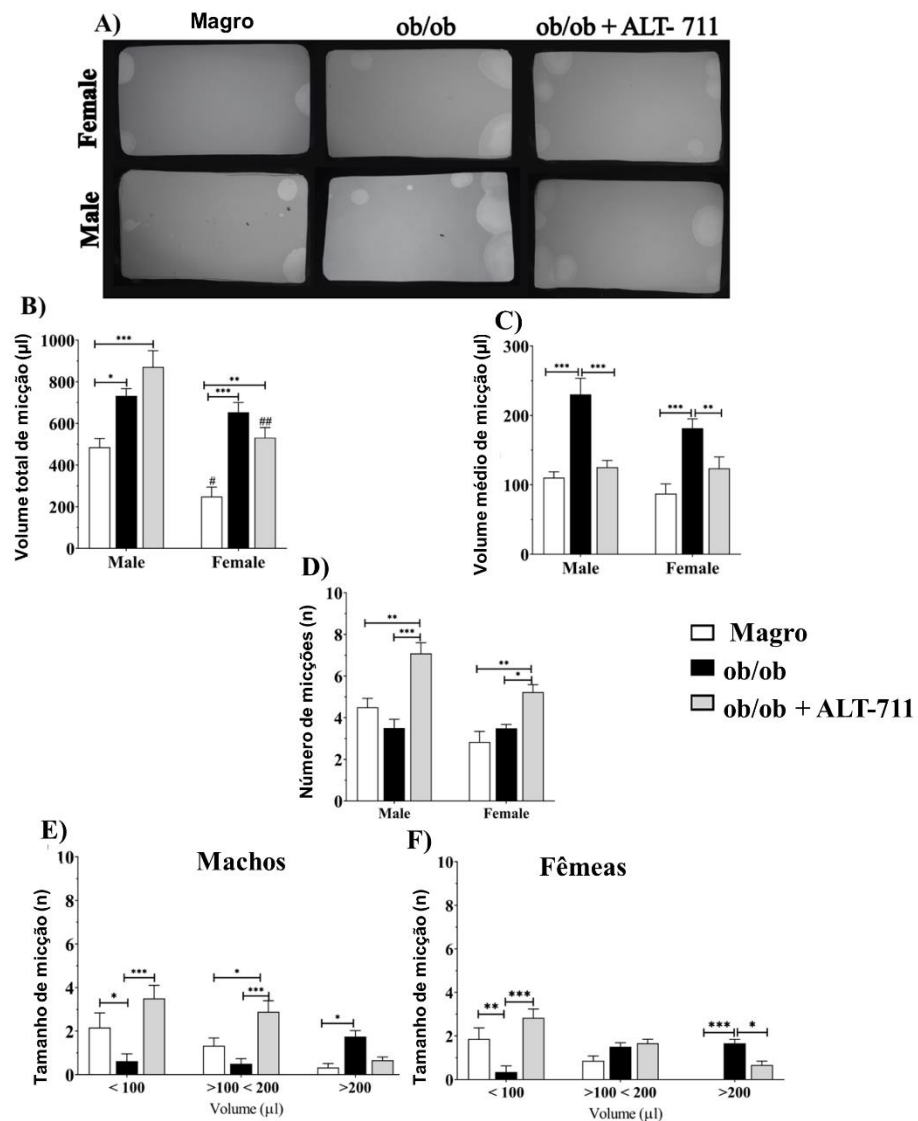


Figura 31. Análise do comportamento miccional em camundongos machos e fêmeas magros, ob/ob e ob/ob tratados com alagebrium (ALT-711). O Painei A mostra as imagens representativas do papel de filtro. Os painéis de B a F mostram o volume total de micções, volume médio de micção, número de micções, tamanho das micções em machos e tamanhos das micções em fêmeas, respectivamente. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7-10$ animais por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ entre grupos (ANOVA duas vias, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (painel B) em comparação com o respectivo sexo macho grupos (ANOVA duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

5. DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos efeitos crônicos do MGO em camundongos fêmeas tratadas por 12 semanas

Neste estudo, objetivamos investigar os efeitos da administração crônica de MGO na função miccional e morfologia da bexiga. A questão que norteou nossa investigação foi a possível implicação desse composto na disfunção da bexiga em pacientes diabéticos. A relevância deste estudo é fundamentada pelo fato de que pacientes com diabetes e obesidade apresentam níveis elevados deste composto, que talvez expliquem as alterações funcionais e moleculares do indivíduo^{67,136}.

Para abordar essa questão, empregamos como estratégia inicial a administração exógena de MGO na água de beber de camundongos ao longo de 12 semanas. Investigamos tanto as mudanças no comportamento miccional *in vivo* e respostas contráteis *in vitro* quanto as alterações moleculares e funcionais na bexiga dos animais. Para atingir esse objetivo, optamos por realizar o estudo em fêmeas, a fim de destacar as alterações específicas na bexiga que não são influenciadas por eventuais problemas na próstata decorrentes da própria ação do MGO^{137,138}.

Acredita-se que o aumento marcante na produção de MGO mediado pela glicose seja responsável pelo dano celular nas condições patológicas associadas ao diabetes¹³⁹. Dessa forma, inicialmente, nossa pesquisa teve como objetivo investigar se os níveis séricos de MGO se elevam no modelo de administração crônica por via oral. Nossos resultados indicaram que tanto os níveis séricos de MGO como os de F-AGEs estão significativamente elevados em comparação com os animais que receberam somente água (grupo controle). Portanto, considerando que os níveis desta substância se mostram elevados, nosso modelo parece mimetizar a situação de acúmulo de MGO no plasma de pacientes com DM.

O estresse dicarbonílico manifesta-se principalmente em cenários de sobrecarga glicolítica, onde se observa um acúmulo exacerbado de compostos dicarbonílicos, como MGO, glioxal, 3-deoxiglicosona, e diminuição da atividade de desintoxicação desses compostos pelo sistema glioxalase^{140,141}. A desintoxicação envolve uma etapa crítica, na qual a atividade da enzima GLO1 desempenha um papel central. O substrato primário da GLO1 é o hemitioacetil, originado da reação entre o MGO e a glutatona reduzida (GSH)¹⁴². O aumento nos níveis de MGO resulta em uma elevação correspondente nos níveis de hemitioacetil, reduzindo consequentemente a disponibilidade de GSH, que desempenha um

papel essencial na conversão do SD-lactoilglutathione em D-Lactato pela enzima GLO2¹⁴¹. Nossos resultados mostraram que a expressão da proteína GLO1 não foi modificada pelo tratamento com MGO. Entretanto, a atividade desta enzima foi significativamente reduzida, provavelmente em decorrência do excesso de MGO (detectado no soro e bexiga). De fato, estudos prévios mostram que redução nos níveis de expressão e principalmente atividade da GLO1 está associada ao aumento dos níveis de MGO em condições como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares, arteriosclerose, hipertensão e doenças cerebrovasculares^{143,144}.

O tratamento crônico com MGO provocou alterações na morfologia da bexiga, incluindo aumento de seu peso e, consequentemente, elevação na relação entre o peso da bexiga e o peso corporal. Além disso, observamos um aumento na espessura do detrusor, juntamente com acúmulo de colágeno nesta camada. Notavelmente, também identificamos um aumento na espessura do urotélio no grupo MGO. O urotélio é um epitélio de baixa taxa de renovação celular; em roedores, a vida útil das células epiteliais superficiais, conhecidas como células guarda-chuva, é estimada em 200 dias^{145,146}. Apesar disso, o urotélio tem uma notável capacidade de reparação e regeneração quando exposto a produtos químicos, distensão mecânica excessiva e infecções por bactérias uropatogênicas¹⁴⁷.

Nossos dados indicam que o MGO administrado cronicamente por via oral se acumula na bexiga, visto que os níveis de MG-H1 (principal AGE formado por MGO¹³⁶) se mostraram elevados no tecido dos animais. Observamos um aumento na expressão proteica de MG-H1, tanto por meio da técnica de *western blotting* quanto por imuno-histoquímica, evidenciando um acúmulo deste AGE não apenas no detrusor, mas também no urotélio, destacando-se, porém, intensa marcação no urotélio e no suburotélio.

No que diz respeito à função contrátil detrusora, nossos resultados revelaram padrões intrigantes. Em bexigas intactas, observamos um aumento na contratilidade em resposta ao EFS, α,β -metileno-ATP e ao Ca^{2+} extracelular. No entanto, não observamos alterações na resposta ao carbachol. Para investigar a influência do urotélio nessas alterações contráteis, procedemos à remoção do urotélio. Nossas observações revelaram que a hipercontratilidade em resposta à EFS no grupo MGO se manteve presente em bexigas desnudadas, parecendo-nos descartar que o urotélio modula a resposta contrátil frente a este estímulo. Curiosamente, a retirada do urotélio reduziu a contratilidade ao α,β -metileno-ATP no grupo controle, sugerindo então que no estado fisiológico existam receptores purinérgicos P2X uroteliais que modulam negativamente a contração do músculo detrusor⁴². De qualquer forma, no grupo MGO continuamos a ver o aumento da resposta contrátil frente ao α,β -metileno-ATP, sugerindo que o urotélio não é fundamental para a hipercontratilidade

detrusora vista no grupo MGO. Quanto ao Ca^{2+} extracelular, a resposta contrátil também se mostrou aumentada pela ausência do urotélio no grupo controle, mantendo-se elevada no grupo MGO. E, por fim, a contratilidade detrusora em resposta ao carbacol, que não havia sido modificada na bexiga intacta, agora, na ausência de urotélio, mostrou-se significativamente elevada frente a exposição ao MGO. Sugerimos que na bexiga intacta, o carbacol interaja simultaneamente com receptores muscarínicos presentes no urotélio, induzindo liberação de mediadores relaxantes que se opõem à atividade contrátil do detrusor em receptores muscarínicos M3⁴². Ou seja, no caso do carbacol, o MGO atuaria no urotélio no sentido de frear as respostas contráteis do detrusor. Parece-nos paradoxal, entretanto, que este mecanismo urotelial não tenha sido detectado com EFS, pois estimulação elétrica libera maciçamente ACh e ATP na bexiga de roedores, os quais por sua vez promovem contração por ativação de receptores muscarínicos M3 e P2X1, respectivamente¹⁴⁸.

Estudos prévios mostraram que o MGO pode ativar o TRPA1, resultando em aumento do influxo de cálcio¹⁴⁹⁻¹⁵³. Há também estudos mostrando a presença do TRPA1 no urotélio^{42,154}. Por isso, passamos a pensar no TRPA1 como um alvo de interesse para explicar disfunção vesical causada pelo MGO. O TRPA1 está incorporado na membrana celular e apresenta-se como uma forma tetramérica de um canal de influxo de Ca^{2+} ¹³⁷. Após a ativação do TRPA1, há influxo de Ca^{2+} , juntamente com outros cátions extracelulares, como Na^+ e H^+ , desencadeando respostas nocivas, principalmente aquelas associadas a dor, frio e coceira¹³⁸. É possível que TRPA1 medeie a transdução sensorial na bexiga e esteja associado à contratilidade alterada no contexto do diabetes. Na bexiga, o TRPA1 pode desempenhar um papel na transdução sensorial e estar envolvido em doenças inflamatórias. Além disso, também pode ser alvo de EROs em excesso, liberadas em condições de estresse oxidativo¹⁴⁴. Em nosso estudo, observamos níveis elevados de proteína TRPA1 em bexigas de camundongos tratados com MGO em comparação com o grupo controle. Detectamos ainda intensa imunomarcção de TRPA1 na camada urotelial (mas não da camada detrusora) da bexiga do grupo MGO.

Para reforçar que as alterações miccionais causadas pelo MGO na bexiga estão relacionadas à ativação do TRPA1, realizamos a técnica de cistometria de enchimento. Essa abordagem, que envolve a infusão contínua da droga diretamente na bexiga, nos permitiu compreender os efeitos diretos sobre o órgão, sem alterações renais associadas. Os ensaios cistométricos foram conduzidos em animais controle e tratados com MGO, sob anestesia, tanto na ausência quanto na presença de infusão intravesical do antagonista seletivo do TRPA1, HC-030031, em comparação com veículo (DMSO 0,001%) ou solução salina.

Camundongos tratados com MGO apresentaram aumento da frequência miccional juntamente com reduções do volume de micção, da capacidade e da complacência, que são consistentes com as alterações miccionais observadas em animais conscientes (ensaio de papel de filtro). Estas alterações cistométricas induzidas por MGO foram todas revertidas pela infusão intravesical de HC-030031, indicando que a ativação do TRPA1 no urotélio participa da maquinaria que leva à bexiga hiperativa.

Em seguida, avaliamos as contrações da bexiga *in vitro* frente a EFS e carbacol em camundongos controle e tratados com MGO. Nossos dados mostraram respostas contráteis significativamente maiores ao EFS em bexigas do grupo MGO em comparação com o grupo controle, que foram normalizadas por incubação prévia com HC-030031. Por outro lado, as contrações da bexiga induzidas pelo carbacol não diferiram entre os grupos controle e grupo MGO; no entanto, curiosamente, o HC-030031 reduziu significativamente as contrações induzidas por carbacol no grupo MGO sem afetar as respostas no grupo controle. Um estudo anterior realizado em ratos diabéticos mostrou um aumento na expressão de mRNA de TRPA1 nos gânglios da raiz dorsal (DRG) que inervam a bexiga, sendo que a ativação do TRPA1 aumenta a amplitude das contrações do músculo liso do detrusor induzidas por EFS através de mecanismos relacionados à ativação do sistema taquicininérgico e liberação de prostanóides¹⁵⁵.

Metilglioxal modifica resíduos de lisina, arginina e cisteína em peptídeos ou proteínas para produzir os AGEs, levando à reticulação e desnaturação de proteínas¹³⁹. Os AGEs ligam-se ao seu receptor RAGE, que é um membro da superfamília de imunoglobulinas de receptores de superfície celular reconhecidos por alguns ligantes endógenos¹⁵⁶. Após a ativação, o RAGE desencadeia múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo a ativação da NADPH oxidase, produzindo níveis excessivos de EROs^{140,157,158}.

Sabe-se, ainda, que a via da Rho quinase regula a sensibilidade do sistema regulador dependente de Ca^{2+} ¹⁵⁹; a desregulação do sistema Rho quinase tem sido implicada na hiperatividade do detrusor em modelos animais de cistite induzida por ácido acético, contrações da bexiga induzidas por estiramento e isquemia crônica da bexiga¹⁶⁰⁻¹⁶⁴. Níveis elevados de EROs podem levar à regulação positiva da Rho-quinase na bexiga¹⁶⁵⁻¹⁶⁹. Dessa forma, buscamos investigar a importância de EROs e Rho-quinase na disfunção vesical em animais tratados com MGO. Testamos aqui a hipótese de que a hiperatividade da bexiga induzida por MGO é uma consequência da ativação do eixo AGE-RAGE-EROs, levando à ativação do sistema Rho-quinase no músculo liso do detrusor. Para tanto, conduzimos ensaios bioquímicos *in vitro* e estudos *in vitro* na bexiga. Nossos resultados mostraram que o

tratamento crônico com MGO aumenta a expressão gênica de RAGE, assim como seu conteúdo na bexiga, tanto no urotélio como no detrusor. Além disso, usando o corante fluorescente DHE em seções frescas da bexiga, mostramos que o tratamento com MGO aumentou significativamente os níveis de EROs tanto no urotélio quanto no músculo liso do detrusor, que foi acompanhado pela redução da atividade de SOD na bexiga. Posteriormente, buscamos compreender se o tratamento com MGO alterou a expressão gênica do sistema Rho quinase. Nossos achados mostram expressões significativamente elevadas de mRNA para Rho A, ROCK1 e ROCK2, como também dos canais de Ca^{2+} tipo L na bexiga do grupo MGO.

Em seguida, realizamos ensaios funcionais em tiras de bexiga sem mucosa na ausência e na presença de SOD ou Y27632. Nas concentrações aqui empregadas neste estudo, no grupo controle, nenhum composto teve efeito nas contrações induzidas por EFS, carbacol e α,β -metileno ATP. No entanto, no grupo MGO, SOD e Y27632 reduziram significativamente as respostas contráteis, indicando claramente um papel importante para superóxido e Rho-quinase na hiperatividade detrusora. É possível, portanto, que o excesso de EROs pelo tratamento com MGO seja o responsável pela ativação da Rho-quinase no músculo detrusor.

5.2 Efeitos da metformina nas alterações produzidas pela administração crônica de MGO em camundongos machos

Conforme discutido anteriormente, acreditamos que estratégias de redução do acúmulo de MGO no organismo oferecem novas perspectivas terapêuticas para mitigar as alterações patológicas produzidas pelo mesmo¹⁰⁷. Decidimos testar a metformina em nossos modelos experimentais, optando agora no emprego de camundongos machos, pois neste momento do estudo havíamos obtido resultados interessantes com este fármaco em modelo de injúria pulmonar aguda¹⁵⁷. A metformina é amplamente reconhecida por seu sucesso no tratamento do DM, devido à sua capacidade de aumentar a sensibilidade dos tecidos à insulina e reduzir os níveis de hemoglobina glicada⁹⁹. Além disso, a metformina, por meio do seu grupo guanidina, tem a capacidade de se ligar ao MGO, atuando como um agente eliminador dessa espécie de dicarbonila⁹⁹. Nossa hipótese foi a de que a metformina poderia inativar a molécula MGO, atenuando os efeitos prejudiciais na bexiga. Para testar essa hipótese, em conjunto com a administração de MGO (0,5%) na água ao longo de 12 semanas, um grupo de animais recebeu metformina (300 mg/kg) por gavagem durante as duas últimas semanas do tratamento com MGO.

É importante primeiramente observar que, embora a dose de metformina utilizada seja considerada elevada, não observamos alterações no metabolismo da glicose nos animais tratados com metformina, conforme avaliado pelos níveis de glicose em jejum, e já evidenciados pelo teste de tolerância à insulina e cálculo de Kitt em estudo prévio do nosso grupo na mesma dose utilizada¹⁷¹. Dessa forma, descartamos que efeitos benéficos deste fármaco no grupo MGO seja consequência de eventuais melhoras do perfil glicêmico dos animais.

No grupo MGO, o tratamento com metformina normalizou os níveis séricos de MGO e AGEs, bem como a expressão e atividade de GLO1 na bexiga. Além disso, a metformina normalizou o padrão irregular de micção *in vivo* e a hipercontratilidade *in vitro* da bexiga do grupo MGO, sugerindo fortemente que esta droga elimina eficientemente o MGO, evitando seu acúmulo no sangue circulante e na urina. Apesar de a metformina também poder prevenir a formação de MGO^{92,172}, nossos dados mostrando que os níveis de glicose em jejum permanecem inalterados entre os grupos parecem descartar a possibilidade desta droga prevenir a formação endógena de MGO. Portanto, os efeitos benéficos da metformina nas

alterações da bexiga de ratos alimentados com dieta rica em gordura³³ parecem refletir, ao menos em parte, sua capacidade de inativar o MGO.

Posteriormente, procedemos à avaliação dos comportamentos de micção em camundongos conscientes, utilizando tanto a coleta de urina quanto ensaios de micção em papel filtro. A análise de ambos os ensaios revelou que os camundongos expostos ao MGO têm aumentos significativos no volume total de micções e no volume médio de micção, sem alterações concomitantes no número de micções. Além disso, não foram observadas mudanças significativas na área de micção primária nem na marcação de urina nos cantos, o que sugere um comportamento miccional normal. É importante ressaltar que os roedores exibem tigmotaxia, um comportamento descrito como "busca na parede" para miccionar¹²⁷.

Na análise cistométrica, realizada em animais anestesiados, os camundongos expostos ao MGO apresentaram aumentos significativos na pressão basal, na capacidade vesical e na pressão intermiccional, sem alterações no número de micções e no intervalo entre micções. Além disso, detectamos aumentos significativos na pressão oscilatória média e na frequência de contrações não-miccionais no grupo MGO, o que pode indicar uma alta atividade espontânea da musculatura detrusora. Adicionalmente, no grupo MGO, observamos uma redução na eficiência miccional, acompanhada de aumento no volume residual.

A aparente discrepância entre o volume total de micção que permaneceu inalterado (medido por cistometria de enchimento) e o volume total de micção aumentado (quantificados nos ensaios de comportamento miccional em animais conscientes) pode ser atribuída ao fato de que o débito urinário em camundongos conscientes é consideravelmente menor (aproximadamente 0,1 ml/h¹⁷³) em comparação com a infusão intravesical de solução salina em camundongos anestesiados (0,6 ml/h). Essa diferença permite que animais conscientes eliminem a urina com maior eficiência, resultando em volumes residuais reduzidos.

Após a análise do comportamento miccional, conduzimos investigações das contrações da bexiga *in vitro* induzidas por EFS, carbacol e α , β -metileno ATP. Comparando com o grupo controle, observamos que o tratamento com metformina normalizou os níveis séricos aumentados de MGO e AGEs, bem como a expressão e atividade reduzida de mRNA de GLO1 em bexiga de camundongos tratados com MGO. Apesar de a metformina também poder prevenir a formação de MGO^{92,172}, nossos dados mostrando que os níveis de glicose em jejum permanecem inalterados entre os grupos parecem descartar a possibilidade desta droga prevenir a formação endógena de MGO.

No geral, nossas descobertas de que a metformina normaliza o padrão de micção *in vivo* e as contrações *in vitro* da bexiga sugerem fortemente que esta droga elimina

eficientemente o MGO, evitando seu acúmulo no sangue e na urina circulantes. Portanto, os efeitos benéficos da metformina nas alterações da bexiga de ratos alimentados com dieta rica em gordura³³ podem refletir em parte a sua capacidade de inativar o MGO.

Embora o nosso estudo não tenha sido desenhado para investigar as diferenças entre os sexos, e os testes não tenham sido realizados simultaneamente, o que representa uma limitação, é possível realizar uma análise geral das diferenças no comportamento miccional e na contratilidade detrusora *in vitro* entre machos e fêmeas expostos ao MGO durante 12 semanas. Inicialmente, observamos discrepâncias na contratilidade detrusora no grupo de controle, no qual as fêmeas demonstraram uma maior contratilidade *in vitro* (mg/mN) em comparação aos machos, porém sem alterações significativas no comportamento miccional entre os sexos. Nossos achados mostraram ainda que as fêmeas tratadas com MGO tem um padrão de hiperatividade vesical, avaliado tanto na análise de comportamento miccionais em animais conscientes (ensaios com papel de filtro) quanto em animais anestesiados (ensaios de cistometria), que se refletiu como diminuição da capacidade e do aumento do número de micções. Inversamente, os machos tratados com MGO tem um perfil de hipoatividade vesical, associado a aumento na capacidade da bexiga, sem alterações no número de micções.

Os demais achados comparativos indicam que tanto a expressão do mRNA quanto a atividade da enzima GLO-1 são significativamente reduzidas nas bexigas de camundongos machos tratados com MGO. Em fêmeas, observou-se que a expressão proteica não sofre alterações, porém, a atividade da glioxalase diminuiu. É importante destacar que esse efeito na atividade da glioxalase foi observado tanto em machos quanto em fêmeas submetidos ao tratamento com MGO. Esses resultados indicam um comprometimento na capacidade de desintoxicação do MGO na bexiga, que pode resultar em um aumento do estresse de dicarbonílico na bexiga, contribuindo para a formação dos AGEs. É fundamental ressaltar que o nosso estudo foi pioneiro ao relatar as alterações da enzima GLO-1 na bexiga. Até o momento, não houve investigações que explorassem a utilização de indutores de glioxalase na disfunção vesical, representando uma lacuna significativa que requer futuras abordagens.

5.3 Via MGO-AGEs-RAGE e disfunção miccional em camundongos diabéticos, obesos ob/ob

Na literatura, têm sido descritos diferentes modelos de DMT1 e DMT2 em roedores que afetam os padrões de micção^{11,27}. Em modelos de DMT1, como diabetes induzido por estreptozotocina e camundongos Akita²²⁻²⁴, foram documentados aumentos no número e no volume de micções, bem como na capacidade vesical.

Por outro lado, estudos de comportamento miccional em modelos de DMT2 são muito menos frequentes na literatura. Estes modelos DMT2 incluem emprego de camundongos deficientes de leptina (ob/ob), deficientes do receptor de leptina (db/db), animais com nocaute duplo dos genes *Irs1* e *Irs2*, camundongos KK-Ay, ratos Zucker diabéticos / obesos e animais alimentados com dieta rica em gordura. Nestes modelos, a frequência de micção, o volume urinário e a capacidade vesical podem aumentar, diminuir ou permanecer inalterados, dependendo das especificidades de cada modelo^{30,33,37,173-177}.

Em nosso estudo, selecionamos como modelo de DMT2 o camundongo ob/ob, pois são fornecidos pelo Biotério Central desta Instituição, e tem disfunção vesical²⁷. É fundamental ressaltar que o modelo ob/ob (animais diabéticos) difere grandemente daquele de ingestão crônica de MGO, uma vez que o MGO ingerido não foi gerado a partir do metabolismo da glicose, mas sim administrado por ingestão oral prolongada, que, por si só, não altera a sensibilidade à insulina¹⁷⁸, os níveis de glicose e o consumo de água.

Camundongos ob/ob são hiperfágicos, hiperglicêmicos, intolerantes à insulina e tem obesidade grave²²⁻²⁶. Há poucos estudos avaliando a função miccional de camundongos ob/ob, mas sabe-se que exibem disfunção vesical dependentes do sexo e da idade²⁷. Em animais ob/ob, machos e fêmeas, conduzimos análises histológicas da bexiga, medidas dos níveis séricos de glicose, de MGO e de F-AGEs, assim como medidas dos AGEs totais, de MG-H1, de RAGE e atividade e expressão de mRNA de GLO-1 nas bexigas. Realizamos avaliações do comportamento miccional *in vivo*, incluindo a coleta de urina e ensaios de comportamento miccional (técnica de papel de filtro). Observamos em animais ob/ob machos e fêmeas um aumento significativo nos níveis séricos de MGO e F-AGEs em comparação com o grupo magro. De maneira similar, na bexiga, identificamos níveis significativamente elevados de AGEs totais (incluindo CML, GOLD, CEL, MOLD, DOLD e 3-DG) assim como de MG-H1, tanto em animais machos quanto em fêmeas ob/ob em comparação com os grupos magros. A expressão de mRNA e os níveis de proteína de RAGE também foram significativamente elevados na bexiga de camundongos ob/ob machos e fêmeas.

Observamos ainda um aumento marcante no conteúdo de colágeno no músculo liso detrusor de ambos os sexos, que parece estar em consonância com bexigas de animais diabéticos^{30,75} e com pacientes com DM2 que apresentam sintomas do trato urinário inferior¹⁷⁹. Curiosamente, em cultura de mioblastos de ratos a redução da expressão de GLO1 parece estar associada a aumento na biossíntese de colágeno¹⁸⁰.

Na análise do comportamento miccional por meio do emprego da técnica de papel de filtro, observamos um aumento significativo tanto no volume total de micções quanto no volume médio de micções em camundongos ob/ob, tanto machos quanto fêmeas, quando comparados aos respectivos grupos magros. Contudo, não foram observadas alterações concomitantes no número de micções. Além disso, a média de volume de micção de camundongos ob/ob compreenderam volumes superiores a 200 µl, em contraste com o padrão de micção nos grupos magros, no qual a concentração da média de volume de micção compreende volumes abaixo de 200 µl. Esse achado sugere que os camundongos ob/ob compensam a disfunção da bexiga aumentando o volume da micção. De maneira semelhante, aumentos na capacidade da bexiga foram observados em camundongos diabéticos db/db³⁰.

A ingestão de água durante o período experimental de 8 semanas não foi diferente entre os grupos ob/ob e magros, o que está em concordância com um estudo recente que demonstrou um aumento na ingestão de água em camundongos ob/ob até somente a idade de um mês, seguido posteriormente por uma estabilização desse parâmetro¹⁸¹. Portanto, as modificações no comportamento miccional observadas em camundongos ob/ob, podem ser atribuídas a mecanismos independentes da ingestão de líquidos. Essas modificações podem estar relacionadas a alterações na bexiga em si. Contudo, não podemos descartar que alterações ao nível renal e/ou na atividade aferente vesical¹⁸² possam contribuir para o comportamento miccional alterado do animal ob/ob.

5.4 Tratamento com ALT-711 em modelo animal de DM2

Em um segundo conjunto de experimentos, administramos o ALT-711 em camundongos ob/ob. A escolha pelo ALT-711 se justifica pela necessidade de encontrar uma substância que pudesse quebrar os AGEs formados, sem influenciar significativamente os níveis glicêmicos. Isso foi importante para garantirmos que nossos dados refletissem de forma mais precisa a ação dos AGEs, sem que fossem afetados pelos níveis glicêmicos.

De fato, o tratamento de oito semanas com ALT-711 por via oral não alterou significativamente o ganho de peso corporal, a hiperglicemia e a resistência à insulina, o que confirma estudos anteriores em ratos e camundongos diabéticos^{110,113}. No entanto, o tratamento com ALT-711 em camundongos ob/ob reduziu significativamente os níveis séricos de F-AGEs, bem como os níveis dos AGEs totais e MG-H1 na bexiga, sugerindo que o ALT-711 cliva os AGEs pré-formados diretamente no tecido vesical; no entanto, no momento em nosso estudo não é possível diferenciar entre ruptura e prevenção de novas formações.

A utilização de desintegradores de AGE, como brometo de fenacildimetiltiazólio (PMT) e o N-fenaciltiazólio (PTB) foram eficazes na clivagem de ligações cruzadas de dicarbonila *in vitro* quando testados com fenilpropanodiona (PPD). Entretanto, essas drogas não conseguiram reverter o aumento de ligações cruzadas no colágeno da pele e cauda de ratos diabéticos^{102,106}.

Além disso, em nosso estudo, o ALT-711 reduziu significativamente os níveis de MGO no soro de camundongos ob/ob machos e fêmeas, sugerindo que, além de atuar como um disjuntor dos AGEs, o ALT-711 pode atuar indiretamente eliminando o próprio MGO (à semelhança da metformina), reforçando assim estudos mostrando ALT-711 como um eliminador de MGO eficiente em condições fisiológicas¹⁸³.

Ademais, o aumento da expressão de mRNA e dos níveis de proteína de RAGE na bexiga de camundongos ob / ob machos e fêmeas foi diminuído pelo tratamento com ALT-711, que provavelmente reflete as reduções anteriores dos níveis de MGO e AGEs. É interessante notar que o tratamento com ALT-711 reduziu a imunocoloração para RAGE em rins de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina¹¹⁰ e na aorta de rato obtida de animais com doença renal crônica¹⁸³. Nossos dados indicam que o aumento da expressão/conteúdo de RAGE se deve ao aumento de MGO e consequentemente dos AGEs, visto tanto no modelo de ingestão com MGO como pela diminuição de MGO e dos AGEs no modelo ob/ob.

Finalmente, em camundongos ob/ob machos e fêmeas, o ensaio do papel de filtro revelou que o tratamento com ALT-711 normalizou o volume médio de micção e aumentou

significativamente a frequência de micção em volumes médios de micção menores que 200 µl, porém sem alterar o volume total de micções. O consumo de água não foi afetado pelo tratamento com ALT-711. Além disso, o tratamento com ALT-711 restaurou o conteúdo de colágeno nas bexigas de camundongos ob/ob para os níveis de camundongos magros; entretanto, precisaríamos de mais estudos para saber se a normalização do conteúdo de colágeno está relacionada diretamente com a melhora no perfil miccional no grupo ALT-711.

No presente estudo, realizamos nossos estudos paralelamente em camundongos ob/ob machos e fêmeas, tratados ou não com ALT-711. Em comparação com camundongos ob/ob machos, o grupo ob/ob fêmea apresentou níveis reduzidos de glicose em jejum, de peso da bexiga, da expressão sérica de MGO e de mRNA de RAGE na bexiga. Outros parâmetros como níveis dos AGEs totais e MG-H1, conteúdo de colágeno e comportamento miccional não diferiram significativamente entre camundongos ob/ob machos e fêmeas. O tratamento com ALT-711 também reverteu igualmente as alterações moleculares e funcionais em camundongos ob/ob machos e fêmeas.

No entanto, é importante destacar uma diferença significativa entre os sexos observada em nosso estudo, relacionada à maior atividade das enzimas GLO1 e GLO2 na bexiga das fêmeas ob/ob em comparação com a dos machos ob/ob ou mesmo com camundongos magros. Essa regulação positiva da atividade da glioxalase provavelmente indica uma desintoxicação mais eficiente do MGO em D-lactato nas fêmeas ob/ob, o que pode explicar os níveis séricos mais baixos de MGO encontrados nas bexigas desse sexo. No entanto, é importante observar que essa atividade da glioxalase não seguiu o mesmo padrão no modelo de ingestão crônica de MGO. Se esse achado reflete alterações devido à formação de MGO, tanto via exógena quanto endógena, ou se está relacionado à idade dos animais ob/ob, é uma questão que requer investigações adicionais.

6. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

6.1 Caracterização dos efeitos crônicos do MGO, em fêmeas tratadas por 12 semanas:

- Não alterou o peso corporal e os níveis glicêmicos;
- Aumentou de modo significativo os níveis séricos de MGO e F-AGEs séricos, e de MG-H1 na bexiga;
- Diminuiu a atividade da GLO1 na bexiga;
- Aumentou a expressão de RAGE, EROs e TRPA1 na bexiga;
- Produziu alterações morfológicas na bexiga como, aumento ou do peso da bexiga, e da espessura do urotélio e detrusor;
- Elevou o conteúdo do colágeno na bexiga;
- Promoveu a alterações do comportamento miccional, caracterizado principalmente por diminuição da capacidade da bexiga, aumento da frequência por número e intervalo de micção;
- Causou hipercontratilidade detrusora (*in vitro*);
- A incubação com SOD ou com Y27632 reduziu a hipercontratilidade detrusora *in vitro*.
- Concluímos que na bexiga do animal que recebeu cronicamente MGO, há hiperativação da via AGE-RAGE-EROs-Rho-quinase levando a um quadro de bexiga hiperativa.

6.2 Abordagens terapêuticas para limitar o MGO: efeito da metformina em camundongos machos

O tratamento com metformina:

- Diminuiu os níveis séricos de MGO, com potencial ação sequestrante da molécula;
- Aumentou a atividade da Glioxalase 1;
- Reverteu as alterações miccionais de comportamento miccional e hiperatividade detrusora observada nos animais tratados com MGO.

6.3 Abordagens terapêuticas para limitar o metilglioxal: efeito do ALT-711 em camundongos controles e obesos deficientes de leptina, machos e fêmeas

O modelo de DM tipo 2, camundongos deficientes de leptina apresentam:

- Aumentou os níveis de MGO e F-AGEs séricos;
- Aumentou a expressão de MGO na bexiga;
- Aumentou a expressão de RAGE na bexiga;
- Aumentou o conteúdo do colágeno no detrusor;
- Aumentou a capacidade da bexiga sem alterar número de micções.

O tratamento com ALT-711 em animais deficientes de leptina:

- Reverteu os níveis de MGO e F-AGEs séricos, sem alterar os níveis glicêmicos;
- Diminuiu a expressão de RAGE;
- Diminuiu o conteúdo do colágeno;
- Diminuiu a capacidade aumentando o número de micções.

Como conclusão final deste estudo, mostramos que os níveis aumentados de MGO no soro e, conseqüentemente, dos AGEs levam ao aumento da expressão de RAGE na bexiga, evidenciando um importante papel do eixo MGO > AGEs > RAGE na disfunção vesical do DM. Fármacos eliminadores de MGO e de AGEs podem ser importantes estratégias para melhorar ou minimizar a disfunção vesical causada pela ativação desse eixo.

REFERÊNCIAS

- 1- Sadananda P, Vahabi B, Drake MJ. Bladder outlet physiology in the context of lower urinary tract dysfunction. *Neurourol Urodyn*. 2011;30(5):708-13. doi:10.1002/nau.21137.
- 2- Irwin DE, Kopp ZS, Agatep B, Milsom I, Abrams P. Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction. *BJU Int*. 2011;108(7):1132-8. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09993.x.
- 3- Yoshimura N, Chancellor MB. Neurophysiology of lower urinary tract function and dysfunction. *Rev Urol*. 2003;5 Suppl 8(Suppl 8):S3-S10.
- 4- Gomez CS, Kanagarajah P, Gousse AE. Bladder dysfunction in patients with diabetes. *Curr Urol Rep*. 2011;12(6):419-26. doi: 10.1007/s11934-011-0214-0.
- 5- Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013; 93(1):137-88. doi: 10.1152/physrev.00045.2011.
- 6- Wittig L, Carlson KV, Andrews JM, Crump RT, Baverstock RJ. Diabetic Bladder Dysfunction: A Review. *Urology*. 2019;123:1-6. doi: 10.1016/j.urology.2018.10.010.
- 7- Jordan WR, Crabtree HH. Paralysis of the bladder in diabetic patients. *Arch Intern Med (Chic)*. 1935;55(1):17-25. doi:10.1001/archinte.1935.00160190020003
- 8- Frimodt-Møller C. Diabetic cystopathy: epidemiology and related disorders. *Ann Intern Med*. 1980; 92(2 Pt 2):318-21. doi: 10.7326/0003-4819-92-2-318.
- 9- Golbidi S, Laher I. Bladder dysfunction in Diabetes Mellitus. *Front Pharmacol*. 2010; (16);1:136. doi: 10.3389/fphar.2010.00136.
- 10- Kebapci N, Yenilmez A, Efe B, Entok E, Demirustu C. Bladder dysfunction in type 2 diabetic patients. *Neurourol Urodyn*. 2007;26(6):814-9. doi: 10.1002/nau.20422.
- 11- Daneshgari F, Liu G, Birder L, Hanna-Mitchell AT, Chacko S. Diabetic bladder dysfunction: current translational knowledge. *J Urol*. 2009;182(6 Suppl):S18-26. doi: 10.1016/j.juro.2009.08.070.
- 12- Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2004;84(3):935-86. doi: 10.1152/physrev.00038.2003.
- 13- Kaplan SA, Te AE, Blaivas JG. Urodynamic findings in patients with diabetic cystopathy. *J Urol*. 1995;153(2):342-4. doi: 10.1097/00005392-199502000-00013.
- 14- Changxiao H, Zhengyong Y, Shibing Y, Caiwen W, Yingchuan H, Wei H, et al. Clinical and urodynamic evaluation of women referred with Diabetes Mellitus. *Int Urogynecol J*. 2014;25(7):979-83. doi: 10.1007/s00192-014-2354-5.
- 15- Liu G, Daneshgari F. Diabetic bladder dysfunction. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(7):1357-64.

- 16- Powell C, Gehring V. Mechanisms of Action for Diabetic Bladder Dysfunction — State of the Art. *Curr Bladder Dysfunct Rep*. 2023;18:173-182. doi: 10.1007/s11884-023-00691-w.
- 17- Danforth KN, Townsend MK, Curhan GC, Resnick NM, Grodstein F. Type 2 diabetes mellitus and risk of stress, urge and mixed urinary incontinence. *J Urol*. 2009; 181(1):193-7. doi: 10.1016/j.juro.2008.09.007.
- 18- Oelke M , Bachmann A, Descazeaud A, Emberton M, Gravas S, Michel MC, et al. 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.
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.03.00>
- 19- Gratzke C, Bachmann A, Descazeaud A, Drake MJ, Madersbacher S, Mamoulakis C, et al. EAU guidelines on the assessment of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction. *Eur Urol*. 2015; 67:1099–109.
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.12.038>
- 20- Erdogan BR, Liu G, Arioglu-Inan E, Michel MC. Established and emerging treatments for diabetes-associated lower urinary tract dysfunction. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2022;395(8):887-906. doi: 10.1007/s00210-022-02249-9.
- 21- Livingstone DE, Barat P, Di Rollo EM, Rees GA, Weldin BA, Rog-Zielinska EA, et al. 5 α -Reductase type 1 deficiency or inhibition predisposes to insulin resistance, hepatic steatosis, and liver fibrosis in rodents. *Diabetes*. 2015;64:447–458.
<https://doi.org/10.2337/db14-0249>.
- 22- Daneshgari F, Leiter EH, Liu G, Reeder J. Animal models of diabetic uropathy. *J Urol*. 2009;182(6 Suppl):S8-13. doi: 10.1016/j.juro.2009.07.084.
- 23- Daneshgari F, Liu G, Imrey PB. Time-dependent changes in diabetic cystopathy in rats include compensated and decompensated bladder function. *J Urol*. 2006;176(1):380-6. doi: 10.1016/S0022-5347(06)00582-9.
- 24- Leiria LO, Mónica FZ, Carvalho FD, Claudino MA, Franco-Penteado CF, Schenka A, Grant AD, et al. Functional, morphological, and molecular characterization of bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: evidence of a role for L-type voltage-operated Ca²⁺ channels. *Br J Pharmacol*. 2011;163(6):1276-88. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01311.x.
- 25-Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:447-85. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643
- 26- Yuan Z, Tang Z, He C, Tang W. Diabetic cystopathy: A review. *J Diabetes*. 2015; 7(4):442-7. doi: 10.1111/1753-0407.12272.
- 27- Kim AK, Hamadani C, Zeidel ML, Hill WG. Urological complications of obesity and diabetes in males and females of three mouse models: temporal manifestations. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020; 318(1):F160-F174. doi: 10.1152/ajprenal.00207.2019.

- 28- Bjorling DE, Wang Z, Vezina CM, Ricke WA, Keil KP, Yu W, et al. Evaluation of voiding assays in mice: impact of genetic strains and sex. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015; 308(12):F1369-78. doi: 10.1152/ajprenal.00072.2015.
- 29- Yu W, Ackert-Bicknell C, Larigakis JD, MacIver B, Steers WD, Churchill GA, et al. Spontaneous voiding by mice reveals strain-specific lower urinary tract function to be a quantitative genetic trait. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(11):F1296-307. doi: 10.1152/ajprenal.00074.2014
- 30- Wu L, Zhang X, Xiao N, Huang Y, Kavran M, Elrashidy RA, et al. Functional and morphological alterations of the urinary bladder in type 2 diabetic FVB(db/db) mice. *J Diabetes Complications*. 2016;30(5):778-85. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.03.003.
- 31- Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res*. 2007;125(3):451-72.
- 32- Daneshgari F, Liu G, Hanna-Mitchell AT. Path of translational discovery of urological complications of obesity and diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017; 312(5):F887-F896. doi: 10.1152/ajprenal.00489.2016.
- 33- Leiria LO, Sollon C, Calixto MC, Lintomen L, Mónica FZ, Anhê GF, De Nucci G, et al. Role of PKC and CaV1.2 in detrusor overactivity in a model of obesity associated with insulin resistance in mice. *PLoS One*. 2012;7(11):e48507. doi: 10.1371/journal.pone.0048507.
- 34- Aizawa N, Homma Y, Igawa Y. Influence of high-fat diet feeding for 20 weeks on lower urinary tract function in mice. *Low Urin Tract Symptoms*. 2013;5(2):101-8. doi: 10.1111/j.1757-5672.2012.00172.x.
- 31-Chaikin DC, Blaivas JG. Voiding dysfunction: definitions. *Curr Opin Urol*. 2001;11(4):395-8. doi: 10.1097/00042307-200107000-00010.
- 32- Frimodt-Moller C. Diabetic cystopathy: epidemiology and related disorders. *Ann Intern Med*. 1980; 92:318-21.
- 33- de Groat WC. Neuroanatomy and neurophysiology: innervation of the lower urinary tract. In: Raz S, Rodríguez LV, editores. *Female Urology (Third Edition)*. W.B. Saunders; 2008. p. 26-46. doi: 10.1016/B978-1-4160-2339-5.50052-5.
- 34-Pradidarcheep W, Wallner C, Dabhoiwala NF, Lamers WH. Anatomy and histology of the lower urinary tract. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;117-148. doi: 10.1007/978-3-642-16499-6_7
- 35- Malysz J, Petkov GV. Urinary bladder smooth muscle ion channels: expression, function, and regulation in health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020; 1;319(2):F257-F283. doi: 10.1152/ajprenal.00048.2020.

- 36- Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2004; 84(3):935-86. doi: 10.1152/physrev.00038.2003.
- 37- Chapple C. Overview on the lower urinary tract. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(202):1-14. doi: 10.1007/978-3-642-16499-6_1.
- 38- Servier Medical Art da Servier [Internet]. Available from: <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.
- 39- Dalghi MG, Montalbetti N, Carattino MD, Apodaca G. The urothelium: life in a liquid environment. *Physiol Rev.* 2020; 1;100(4):1621-1705. doi: 10.1152/physrev.00041.2019.
- 40- Melicow MM. Tumors of the urinary drainage tract: urothelial tumors. *J Urol* 54: 186–193, 1945. doi: 10.1016/S0022-5347(17)70066-3.
- 41- Amano O, Kataoka S, Yamamoto TY. Turnover of asymmetric unit membranes in the transitional epithelial superficial cells of the rat urinary bladder. *Anat Rec.* 1991;229:9-15. doi: 10.1002/ar.1092290103.
- 42- Birder L, Andersson KE. Urothelial signaling. *Physiol Rev.* 2013;93(2):653-80. doi: 10.1152/physrev.00030.2012.
- 43- Macarak EJ, Howard PS. The role of collagen in bladder filling. *Adv Exp Med Biol.* 1999;462:215-23; discussion 225-33. doi: 10.1007/978-1-4615-4737-2_17.
- 44- Rubinstein M, Sampaio FJ, Costa WS. Stereological study of collagen and elastic system in the detrusor muscle of bladders from controls and patients with infravesical obstruction. *Int Braz J Urol.* 2007;33(1):33-41.
- 45- Turner WH, Brading AF. Smooth muscle of the bladder in the normal and the diseased state: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Pharmacol Ther.* 1997; 75(2):77-110. doi: 10.1016/s0163-7258(97)00038-7.
- 46- Igawa Y, Aizawa N, Michel MC. β_3 -Adrenoceptors in the normal and diseased urinary bladder-What are the open questions? *Br J Pharmacol.* 2019;176(14):2525-2538. doi: 10.1111/bph.14658.
- 47- Fowler CJ, Griffiths D, de Groat WC. The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(6):453-66. doi: 10.1038/nrn2401.
- 48- Phelps C, Chess-Williams R, Moro C. The role of intracellular calcium and Rho kinase pathways in G protein-coupled receptor-mediated contractions of urinary bladder urothelium and lamina propria. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2023; 1;324(3):C787-C797. doi: 10.1152/ajpcell.00441.2022.
- 49- Bo X, Burnstock G. Species differences in characteristics and distribution of [3H] alpha,beta-methylene ATP binding sites in urinary bladder and urethra of rat, guinea-

- pig and rabbit. *Eur J Pharmacol.* 1992; 27;216(1):59-66. doi: 10.1016/0014-2999(92)90209-m.
- 50- Bradley E, Kadima S, Kyle B, Hollywood MA, Thornbury KD, McHale NG, et al. P2X receptor currents in smooth muscle cells contribute to nerve mediated contractions of rabbit urethral smooth muscle. *J Urol.* 2011 Aug;186(2):745-52. doi: 10.1016/j.juro.2011.03.140.
 - 51- Applebaum AE, Vance WH, Coggeshall RE. Segmental localization of sensory cells that innervate the bladder. *J Comp Neurol.* 1980;192(2):203-209. doi: 10.1002/cne.901920202.
 - 52- de Groat WC, Yoshimura N. Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease. In: *Sensory Nerves*, Canning B & Spina D, editors. *Handbook Exp Pharmacol.* 2009;194:91-138.
 - 53- Gabella G. The structural relations between nerve fibers and muscle cells in the urinary bladder of the rat. *J Neurocytol.* 1995;24(3):159-87. doi: 10.1007/BF01181533.
 - 54- Sengupta JN, Gebhart GF. Mechanosensitive properties of pelvic nerve afferent fibers innervating the urinary bladder of the rat. *J Neurophysiol.* 1994;72(5):2420-2430. doi: 10.1152/jn.1994.72.5.2420.
 - 55- Gabella G. Afferent nerve fibers in the wall of the rat urinary bladder. *Cell Tissue Res.* 2019;376(1):25-35. doi: 10.1007/s00441-018-2965-0.
 - 56- Shimokawa H, Sunamura S, Satoh K. RhoA/Rho-Kinase in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2016;118:352-366. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306532.
 - 57- Peters SL, Schmidt M, Michel MC. Rho kinase: a target for treating urinary bladder dysfunction? *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27:492-497. doi: 10.1016/j.tips.2006.07.002.
 - 58- Narumiya S. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem.* 1996 Aug;120(2):215-28. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021401.
 - 59- Nunes KP, Webb RC. New insights into RhoA/Rho-kinase signaling: a key regulator of vascular contraction. *Small GTPases.* 2020;12:458-469. doi: 10.1080/21541248.2020.1822721.
 - 60- MacDonald JA, Walsh MP. Regulation of smooth muscle myosin light chain phosphatase by multisite phosphorylation of the myosin targeting subunit, MYPT1. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2018;18:4-13. doi: 10.2174/1871529X18666180326120638.
 - 61- Oliveira AL, Medeiros ML, de Oliveira MG, Teixeira CJ, Mónica FZ, Antunes E. Enhanced RAGE Expression and Excess Reactive-Oxygen Species Production Mediates Rho Kinase-Dependent Detrusor Overactivity After Methylglyoxal Exposure. *Front Physiol.* 2022; 28;13:860342. doi: 10.3389/fphys.2022.860342.

- 62- Bellier J, Nokin MJ, Lardé E, Karoyan P, Peulen O, Castronovo V, et al. Methylglyoxal, a potent inducer of AGEs, connects between diabetes and cancer. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;148:200-211. doi: 10.1016/j.diabres.2019.01.002.
- 63- Poulsen MW, Hedegaard RV, Andersen JM, de Courten B, Bügel S, Nielsen J, et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem Toxicol.* 2013;60:10-37. doi: 10.1016/j.fct.2013.06.052.
- 64- Hernandez-Castillo C, Shuck SC. Diet and Obesity-Induced Methylglyoxal Production and Links to Metabolic Disease. *Chem Res Toxicol.* 2021 Dec 20;34(12):2424-2440. doi: 10.1021/acs.chemrestox.1c00221.
- 65- Rabbani N, Thornalley PJ. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nat Protoc.* 2014;9(8):1969-79. doi: 10.1038/nprot.2014.134.
- 66- Senda M, Ogawa S, Nako K, Okamura M, Sakamoto T, Ito S. The strong relation between post-hemodialysis blood methylglyoxal levels and post-hemodialysis blood glucose concentration rise. *Clin Exp Nephrol.* 2015;19(3):527-33. doi: 10.1007/s10157-014-1018-6.
- 67- Kilhovd, BK, Giardino, I, Torjesen, PA, Birkeland, KI, Berg, TJ, Thornalley, PJ, et al. Increased Serum Levels of the Specific AGE-Compound Methylglyoxal-Derived Hydroimidazolone in Patients with Type 2 Diabetes. *Metabolism.* 2003; 52, 163–167. doi:10.1053/meta.2003.50035
- 69- Kold-Christensen R, Johannsen M. Methylglyoxal Metabolism and Aging-Related Disease: Moving from Correlation toward Causation. *Trends Endocrinol Metab.* 2020;31(2):81-92. doi: 10.1016/j.tem.2019.10.003.
- 70- Maessen DE, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci (Lond).* 2015;128(12):839-61. doi: 10.1042/CS20140683.
- 71- Twarda-Clapa A, Olczak A, Białkowska AM, Koziolkiewicz M. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells.* 2022; 12;11(8):1312. doi: 10.3390/cells11081312.
- 72- Bellier J, Nokin MJ, Lardé E, Karoyan P, Peulen O, Castronovo V, et al. Methylglyoxal, a potent inducer of AGEs, connects between diabetes and cancer. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;148:200-211. doi: 10.1016/j.diabres.2019.01.002.
- 73- Rhee, SY, Kim, YS. The Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Vascular Complications. *Diabetes & Metabolism Journal,* 2018; 42(3), 188-195. doi: 10.4093/dmj.2017.0105.
- 74- Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol.* 2019; 20:247-260. doi: 10.1016/j.redox.2018.09.025

- 75- Todoriki S, Hosoda Y, Yamamoto T, Watanabe M, Sekimoto A, Sato H, et al. Methylglyoxal Induces Inflammation, Metabolic Modulation and Oxidative Stress in Myoblast Cells. *Toxins (Basel)*. 2022; 7;14(4):263. doi: 10.3390/toxins14040263
- 76- Gautieri A, Passini FS, Silván U, Guizar-Sicairos M, Carimati G, Volpi P, et al. Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue. *Matrix Biol*. 2017;59:95-108. doi: 10.1016/j.matbio.2016.09.001.
- 77- Badenhorst, D, Maseko, M, Tsotetsi, OJ, Naidoo, A, Brooksbank, R, Norton, et al. Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats. *Cardiovascular Research*. 2003; 57(3), 632-641. doi: 10.1016/s0008-6363(02)00733-2.
- 78- Rhee, SY, Kim, YS. The Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Vascular Complications. *Diabetes & Metabolism Journal*, 2018; 42(3), 188-195. doi: 10.4093/dmj.2017.0105.
- 79- de Groat WC, Yoshimura N. Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. *Prog Brain Res*. 2006;152:59-84. doi: 10.1016/S0079-6123(05)52005-3.
- 80- Eika, B, Levin, RM., & Longhurst, PA. Collagen and bladder function in streptozotocin-diabetic rats: Effects of insulin and aminoguanidine. *Journal of Urology*, 1992; 148(1), 167-172. doi: 10.1016/s0022-5347(17)36546-1.
- 81- Singh, VP., Bali, A, Singh, N, Jaggi, AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2014; 18(1), 1-14. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1.
- 82- Twarda-Clapa A, Olczak A, Białkowska AM, Koziolkiewicz M. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells*. 2022;11(8):1312. doi: 10.3390/cells11081312.
- 83- Moheimani F, Morgan PE, van Reyk DM, Davies MJ. Deleterious effects of reactive aldehydes and glycated proteins on macrophage proteasomal function: possible links between diabetes and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(6):561-571. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.02.007.
- 84- Kisugi R, Kouzuma T, Yamamoto T, Akizuki S, Miyamoto H, Someya Y, et al. Structural and glycation site changes of albumin in a diabetic patient with very high glycated albumin. *Clin Chim Acta*. 2007;382(1-2):59-64. doi: 10.1016/j.cca.2007.04.001.
- 85- Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res*. 2013;47(Suppl 1):3-27. doi: 10.3109/10715762.2013.815348.
- 86- Ramasamy, R, Yan, SF, Schmidt, AM.). Receptor for AGE (AGER): Signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Annals of the New*

- York Academy of Sciences. 2011; 1243, 88-102. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06320.x.
- 87- Yonekura, H, Yamamoto, Y, Sakurai, S, Petrova, RG., Abedin, MJ, Li, H, et al Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochemical Journal*. 2003; 370(Pt 3), 1097-1109. doi: 10.1042/BJ20021371.
 - 88- Taguchi, K, Fukami K. AGER signaling regulates the progression of diabetic complications. *Front Pharmacol*. 2023;16;14:1128872. doi: 10.3389/fphar.2023.1128872.
 - 89- Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52(6):940-950. doi: 10.1590/S0004-27302008000600005.
 - 90- Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*. 1992; 25;267(21):14987-97. doi: 10.1016/S0021-9258(18)41914-8
 - 91- Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect*. 2004; 6(13):1219-25. doi: 10.1016/j.micinf.2004.08.004.
 - 92- Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases. *Physiol Rev*. 2020;100(1):407-461. doi: 10.1152/physrev.00001.2019.
 - 93- Hanssen NMJ, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG. Methylglyoxal stress, the glyoxalase system, and diabetic chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2019;28:26-33. doi: 10.1097/MNH.0000000000000465.
 - 94- Kim J, Kim OS, Kim CS, Kim NH, Kim JS. Cytotoxic role of methylglyoxal in rat retinal pericytes: Involvement of a nuclear factor-kappaB and inducible nitric oxide synthase pathway. *Chem Biol Interact*. 2010;188:86-93. doi: 10.1016/j.cbi.2010.07.002.
 - 95- Ryle C, Donaghy M. Non-enzymatic glycation of peripheral nerve proteins in human diabetics. *J Neurol Sci*. 1995;129:62-68. doi: 10.1016/0022-510X(94)00251-I.
 - 96- Andersson KE. Oxidative stress and its potential relationship to lower urinary tract functional pathology. *BJU Int*. 2018;121(4):527-533. doi: 10.1111/bju.14063.
 - 97- Engelen L, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15:677-689. doi:10.1111/dom.12058.

- 98- Schalkwijk CG, Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids*. 2012;42:1193-1204. doi:10.1007/s00726-010-0779-9.
- 99- Mbara KC, Mofo Mato PE, Driver C, Nzuzi S, Mkhombo NT, Gcwensa SK, et al. Metformin turns 62 in pharmacotherapy: Emergence of non-glycaemic effects and potential novel therapeutic applications. *Eur J Pharmacol*. 2021; 898:173934. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.173934.
- 100- Markowicz-Piasecka M, Sadkowska A, Huttunen KM, Podsiedlik M, Mikiciuk-Olasik E, Sikora J. An investigation into the pleiotropic activity of metformin. A glimpse of haemostasis. *Eur J Pharmacol*. 2020;872:172984. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172984.
- 101- Kender Z, Fleming T, Kopf S, Torzsa P, Grolmusz V, Herzig S, et al. Effect of metformin on methylglyoxal metabolism in patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122(5):316-9. doi: 10.1055/s-0034-1371818.
- 102- Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S, Szwergold BS. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999;48(1):198-202. doi: 10.2337/diabetes.48.1.198.
- 103- Kinsky OR, Hargraves TL, Anumol T, Jacobsen NE, Dai J, Snyder SA, et al. Metformin scavenges methylglyoxal to form a novel imidazolinone metabolite in humans. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(2):227-234. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00497.
- 104- Toprak C, Yigitaslan S. Alagebrium and Complications of Diabetes Mellitus. *Eurasian J Med*. 2019;51(3):285-292. doi: 10.5152/eurasianjmed.2019.18434.
- 105- Sourris KC, Watson A, Jandeleit-Dahm K. Inhibitors of Advanced Glycation End Product (AGE) Formation and Accumulation. *Handb Exp Pharmacol*. 2021; 264:395-423. doi: 10.1007/164_2020_391.
- 106- Kim T, Spiegel DA. The unique reactivity of N-phenacyl-derived thiazolium salts toward α -dicarbonyl compounds. *Rejuvenation Res*. 2013;16(1):43-50. doi: 10.1089/rej.2012.1370
- 107- Brings S, Fleming T, Freichel M, Muckenthaler MU, Herzig S, Nawroth PP. Dicarbonyls and advanced glycation end-products in the development of diabetic complications and targets for intervention. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5):984. doi: 10.3390/ijms18050984.
- 108- Coughlan MT, Forbes JM, Cooper ME. Role of the AGE crosslink breaker, alagebrium, as a renoprotective agent in diabetes. *Kidney Int Suppl*. 2007 Aug;(106):S54-60. doi: 10.1038/sj.ki.5002387.
- 109- Watson AMD, Soro-Paavonen A, Sheehy K, Li J, Calkin AC, Koitka A, et al. Delayed intervention with AGE inhibitors attenuates the progression of diabetes-accelerated atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia*. 2011;54:681-689. doi: 10.1007/s00125-010-2000-9.

- 110- Forbes JM, Thallas V, Thomas MC, Founds HW, Burns WC, Jerums G, et al. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. *FASEB J.* 2003;17(12):1762-1764. doi: 10.1096/fj.02-1102fje.
- 111- Wang H, Weihrauch D, Kersten JR, Toth JM, Passerini AG, Rajamani A, et al. Alagebrium inhibits neointimal hyperplasia and restores distributions of wall shear stress by reducing downstream vascular resistance in obese and diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309:H1130-H1140. doi: 10.1152/ajpheart.00123.2014.
- 112- Gurbuz N, Gurkan R, Ender Caylan A, Surmen Usta S, Usta MF. The therapeutic effect of ALT-711 on erectile function in rats treated with high-level AGEs (advanced glycation end products) containing diet. *Int J Impot Res.* 2022;34(2):222-228. doi: 10.1038/s41443-021-00417-8.
- 113- Peppia M, Brem H, Cai W, Zhang J-G, Basgen J, Li Z, et al. Uribarri J. Prevention and Reversal of Diabetic Nephropathy in db/db Mice Treated with Alagebrium (ALT-711). *Am J Nephrol* 26: 430–436, 2006. doi: 10.1159/000095786.
- 114- Park J, Kwon MK, Huh JY, Choi WJ, Jeong LS, Nagai R, et al. Renoprotective antioxidant effect of alagebrium in experimental diabetes. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(11):3474-84. doi: 10.1093/ndt/gfr152.
- 115- Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroof RC, et al. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation.* 2001; 25;104(13):1464-70. doi: 10.1161/hc3801.097806.
- 116- Asif M, Egan J, Vasan S, Jyothirmayi GN, Masurekar MR, Lopez S, et al. An advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age-related increases in myocardial stiffness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 14;97(6):2809-13. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 9;97(10):5679. doi: 10.1073/pnas.040558497
- 117- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 11th ed. 2022. Available from: <https://www.diabetesatlas.org>
- 118- Smith AJ, Clutton RE, Lilley E, Hansen KEA, Brattelid T. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. *Lab Anim.* 2018;52(2):135-141. doi: 10.1177/0023677217724823. Available from: <https://norecopa.no/prepare>
- 119- BRASIL, Resolução Normativa CONCEA nº 55, de 05.10.2022. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_normativa_Concea_55_de_05102022.html
- 120- Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020; 14;18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410.

- 121- Medeiros, ML., de Oliveira, MG, Tavares, EG., Mello, GC, Anhê, GF, Mônica, F.Z., et al. Long-term methylglyoxal intake aggravates murine Th2-mediated airway eosinophil infiltration. *Int. Immunopharm.* 2020; 81:106254. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106254
- 122- Leiria, LO, Sollon, C, Calixto, MC, Lintomen, L, Mônica, FZ, Anhê, GF, et al. 2012. Role of PKC and CaV1.2 in detrusor overactivity in a model of obesity associated with insulin resistance in mice. *PloS One* 7, e48507
- 123- Peppia M, Brem H, Cai W, Zhang JG, Basgen J, Li Z, et al. Prevention and reversal of diabetic nephropathy in db/db mice treated with alagebrium (ALT-711). *Am J Nephrol.* 2006;26(5):430-6. doi: 10.1159/000095786.
- 124- Woollam M, Teli M, Angarita-Rivera P, Liu S, Siegel AP, Yokota H, et al. Detection of volatile organic compounds (VOCs) in urine via gas chromatography-mass spectrometry QTOF to differentiate between localized and metastatic models of breast cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):2526. doi: 10.1038/s41598-019-38920-0.
- 125- Oliveira AL, de Oliveira MG, Medeiros ML, Mônica FZ, Antunes E. Metformin abrogates the voiding dysfunction induced by prolonged methylglyoxal intake. *Eur J Pharmacol.* 2021; 5;910:174502. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174502.
- 126- Collins DE, Mulka KR, Hoenerhoff MJ, Taichman RS, Villano JS. Clinical assessment of urinary tract damage during sustained-release estrogen supplementation in mice. *Comp Med.* 2017;67(1):11-21.
- 127- Hill, WG, Zeidel, ML, Bjorling, DE, Vezina, CM. Void spot assay: recommendations on the use of a simple micturition assay for mice. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2018; 315, F1422–F1429.
- 128- Keil, KP, Abler, LL, Altmann, HM, Bushman, W, Marker, PC, Li, L, et al. Influence of animal husbandry practices on void spot assay outcomes in C57BL/6J male mice. *Neurourol. Urodyn.* 2016; 35, 192–198.
- 129- Yu, W, Ackert-Bicknell, C, Larigakis, JD, MacIver, B, Steers, WD., Churchill, GA., et al. Spontaneous voiding by mice reveals strain-specific lower urinary tract function to be a quantitative genetic trait. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2014; 306, 1296–1307.
- 130- Andersson, KE, Soler, R, Füllhase, C. Rodent models for urodynamic investigation. *Neurourol. Urodyn.* 2011, 30, 636–646. doi: 10.1002/nau.21108. PMID: 21661007.
- 131- Fraser, MO, Smith, PP, Sullivan, MP, Bjorling, DE, Campeau, L, Andersson, KE. et al.. Best practices for cystometric evaluation of lower urinary tract function in muriform rodents. *Neurourol. Urodyn.* 2020; 39, 1868–1884.
- 132- Chen, Y, Yu, Q, Xu, CB. A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2017; 10, 14904–14910.

- 133- de Oliveira MG, Medeiros ML, Tavares EBG, Mónica FZ, Antunes E. Methylglyoxal, a Reactive Glucose Metabolite, Induces Bladder Overactivity in Addition to Inflammation in Mice. *Front Physiol.* 2020 3;11:290. doi: 10.3389/fphys.2020.00290.
- 134- Oliveira AL, Medeiros ML, Ghezzi AC, Dos Santos GA, Mello GC, Mónica FZ, et al. Evidence that methylglyoxal and the receptor for advanced glycation end products are implicated in bladder dysfunction in obese diabetic ob/ob mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2023;325(4):F436-F447. doi: 10.1152/ajprenal.00089.2023.
- 135- Amato AA, Rajagopalan S, Lin JZ, Carvalho BM, Figueira AC, Lu J, et al. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. *J Biol Chem.* 2012;287:28169–28179. doi: 10.1074/jbc.M111.332106.
- 136- Han Y, Randell E, Vasdev S, Gill V, Curran M, Newhook LA, et al. Plasma advanced glycation endproduct, methylglyoxal-derived hydroimidazolone is elevated in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Clin Biochem.* 2009;42:562-569. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.12.016.
- 137- Mongiu AK, McVary KT. Lower urinary tract symptoms, benign prostatic hyperplasia, and obesity. *Curr Urol Rep.* 2009;10(4):247-253. doi: 10.1007/s11934-009-0041-8.
- 138- Parsons JK, Sarma AV, McVary K, Wei JT. Obesity and benign prostatic hyperplasia: clinical connections, emerging etiological paradigms and future directions. *J Urol.* 2013;189(1 Suppl):S102-S106. doi: 10.1016/j.juro.2012.11.029.
- 139- Liu J, Mak TC, Banigesh A, Desai K, Wang R, Wu L. Aldolase B knockdown prevents high glucose-induced methylglyoxal overproduction and cellular dysfunction in endothelial cells. *PLoS One.* 2012;7:e41495. doi: 10.1371/journal.pone.0041495.
- 140- Rabbani N, Thornalley PJ. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 458:221-226. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.140.
- 141- Rabbani N, Adaikalakoteswari A, Larkin JR, Panagiotopoulos S, MacIsaac RJ, Yue DK, et al. Analysis of serum advanced glycation endproducts reveals methylglyoxal-derived advanced glycation MG-H1 free adduct is a risk marker in non-diabetic and diabetic chronic kidney disease. *Int J Mol Sci.* 2022; 24:152. doi: 10.3390/ijms24010152
- 142- He Y, Zhou C, Huang M, Tang C, Liu X, Yue Y, et al. Glyoxalase system: A systematic review of its biological activity, related diseases, screening methods, and small molecule regulators. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110663. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110663.
- 143- Maessen DE, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci (Lond).* 2015;128(12):839-861. doi: 10.1042/CS20140683.

- 144- Rabbani N, Thornalley PJ. Glyoxalase 1 modulation in obesity and diabetes. *Antioxid Redox Signal*. 2019;30(3):354-374. doi: 10.1089/ars.2017.7424.
- 145- Jost SP. Cell cycle of normal bladder urothelium in developing and adult mice. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1989;57(1):27-36. doi: 10.1007/BF02899062.
- 146- Jost SP, Potten CS. Urothelial proliferation in growing mice. *Cell Tissue Kinet*. 1986;19(2):155-160. doi: 10.1111/j.1365-2184.1986.tb00725.x.
- 147- Dalghi MG, Montalbetti N, Carattino MD, Apodaca G. The urothelium: life in a liquid environment. *Physiol Rev*. 2020;100(4):1621-1705. doi: 10.1152/physrev.00041.2019.
- 148- Fry CH, Meng E, Young JS. The physiological function of lower urinary tract smooth muscle. *Auton Neurosci*. 2010;154(1-2):3-13. doi: 10.1016/j.autneu.2009.10.006.
- 149- Andersson DA, Gentry C, Light E, Vastani N, Vallortigara J, Bierhaus A, et al. Methylglyoxal evokes pain by stimulating TRPA1. *PLoS One*. 2013;8(10):e77986. doi: 10.1371/journal.pone.0077986. Erratum in: *PLoS One*. 2013;8(12). doi:10.1371/annotation/e707d50a-13b3-
- 150- Andersson KE. TRP channels as lower urinary tract sensory targets. *Med Sci (Basel)*. 2019;7(5):67. doi: 10.3390/medsci7050067.
- 151- Huang Q, Chen Y, Gong N, Wang YX. Methylglyoxal mediates streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain via activation of the peripheral TRPA1 and Nav1.8 channels. *Metabolism*. 2016;65(4):463-474. doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.002.
- 152- Griggs RB, Laird DE, Donahue RR, Fu W, Taylor BK. Methylglyoxal requires AC1 and TRPA1 to produce pain and spinal neuron activation. *Front Neurosci*. 2017;11:679. doi: 10.3389/fnins.2017.00679.
- 153- Becker AK, Babes A, Düll MM, Khalil M, Kender Z, Gröner J, et al. Spontaneous activity of specific C-nociceptor subtypes from diabetic patients and mice: Involvement of reactive dicarbonyl compounds and (sensitized) transient receptor potential channel A1. *J Peripher Nerv Syst*. 2023;28(2):202-225. doi: 10.1111/jns.12546.
- 154- Zhao M, Ding N, Wang H, Zu S, Liu H, Wen J, et al. Activation of TRPA1 in Bladder Suburothelial Myofibroblasts Counteracts TGF- β 1-Induced Fibrotic Changes. *Int J Mol Sci*. 2023 May 30;24(11):9501. doi: 10.3390/ijms24119501.
- 155- Philypov IB, Paduraru ON, Gulak KL, Skryma R, Prevarskaya N, Shuba YM. TRPA1-dependent regulation of bladder detrusor smooth muscle contractility in normal and type I diabetic rats. *J Smooth Muscle Res*. 2016;52:1-17. doi: 10.1540/jsmr.52.1.

- 156- Kim HJ, Jeong MS, Jang SB. Molecular Characteristics of RAGE and Advances in Small-Molecule Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6904. doi: 10.3390/ijms22136904.
- 157- Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules.* 2015; 16;5(1):194-222. doi: 10.3390/biom5010194.
- 158- Mey JT, Haus JM. Dicarbonyl Stress and Glyoxalase-1 in Skeletal Muscle: Implications for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Cardiovasc Med.* 2018 Sep 10;5:117. doi: 10.3389/fcvm.2018.00117.
- 159- Wegener JW, Schulla V, Lee TS, Koller A, Feil S, Feil R, et al. An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *FASEB J.* 2004; 18(10):1159-61. doi: 10.1096/fj.04-1516fje.
- 160- Peters SL, Schmidt M, Michel MC. Rho kinase: a target for treating urinary bladder dysfunction? *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27:492-497. doi: 10.1016/j.tips.2006.07.002.
- 161- Shimizu N, De Velasco MA, Umekawa T, Uemura H, Yoshikawa K. Effects of the Rho kinase inhibitor, hydroxyfasudil, on bladder dysfunction and inflammation in rats with HCl-induced cystitis. *Int J Urol.* 2013;20:1136-1143. doi: 10.1111/iju.12119.
- 162- Shiomi H, Takahashi N, Kawashima Y, Ogawa S, Haga N, Kushida N, et al. Involvement of stretch-induced Rho-kinase activation in the generation of bladder tone. *Neurourol Urodyn.* 2013;32:1019-1025. doi: 10.1002/nau.22360.
- 163- Wróbel A, Rechberger T. The influence of Rho-kinase inhibition on acetic acid-induced detrusor overactivity. *Neurourol Urodyn.* 2017;36:263-270. doi: 10.1002/nau.22918.
- 164- Akaihata H, Nomiya M, Matsuoka K, Koguchi T, Hata J, Haga N, et al. Protective Effect of a Rho-kinase Inhibitor on bladder dysfunction in a rat model of chronic bladder ischemia. *Urology.* 2018;111:238.e7-238.e12. doi: 10.1016/j.urology.2017.10.007.
- 165- Peters SL, Schmidt M, Michel MC. Rho kinase: a target for treating urinary bladder dysfunction? *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27:492-497. doi: 10.1016/j.tips.2006.07.002.
- 166- Shimizu N, De Velasco MA, Umekawa T, Uemura H, Yoshikawa K. Effects of the Rho kinase inhibitor, hydroxyfasudil, on bladder dysfunction and inflammation in rats with HCl-induced cystitis. *Int J Urol.* 2013;20:1136-1143. doi: 10.1111/iju.12119.
- 167- Shiomi H, Takahashi N, Kawashima Y, Ogawa S, Haga N, Kushida N, et al. Involvement of stretch-induced Rho-kinase activation in the generation of bladder tone. *Neurourol Urodyn.* 2013;32:1019-1025. doi: 10.1002/nau.22360.
- 168- Wróbel A, Rechberger T. The influence of Rho-kinase inhibition on acetic acid-induced detrusor overactivity. *Neurourol Urodyn.* 2017;36:263-270. doi: 10.1002/nau.22918.

- 169- Akaihashi H, Nomiya M, Matsuoka K, Koguchi T, Hata J, Haga N, et al. Protective Effect of a Rho-kinase Inhibitor on bladder dysfunction in a rat model of chronic bladder ischemia. *Urology*. 2018;111:238.e7-238.e12. doi: 10.1016/j.urology.2017.10.007.
- 170- Medeiros ML, Oliveira AL, de Oliveira MG, Mônica FZ, Antunes E. Methylglyoxal exacerbates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via RAGE-induced ROS generation: protective effects of metformin. *J Inflamm Res*. 2021;14:6477-6489. doi: 10.2147/JIR.S337115
- 171- Calixto MC, Lintomen L, André DM, Leiria LO, Ferreira D, Lellis-Santos C, et al. Metformin attenuates the exacerbation of the allergic eosinophilic inflammation in high-fat-diet-induced obesity in mice. *PLoS One*. 2013 Oct 24;8(10):e76786. doi: 10.1371/journal.pone.0076786.
- 172- Battah, S, Ahmed, N, Thornalley, PJ. Kinetics and mechanism of the reaction of metformin with methylglyoxal. *Int. Congress Series*, 2002; 1245, 355- 356.
- 173- Yang XF, Wang J, Wang R, Xu YF, Chen FJ, Tang LY, et al. Time-dependent functional, morphological, and molecular changes in diabetic bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice. *Neurourol Urodyn*. 2019;38:1266-1277. doi: 10.1002/nau.24008.
- 174- Ellenbroek JH, Arioglu Inan E, Michel MC. A systematic review of urinary bladder hypertrophy in experimental diabetes: Part 2. Comparison of animal models and functional consequences. *Neurourol Urodyn*. 2018;37:2346-2360.
- 175- Arioglu-Inan E, Ellenbroek JH, Michel MC. A systematic review of urinary bladder hypertrophy in experimental diabetes: Part I. Streptozotocin-induced rat models. *Neurourol Urodyn*. 2018;37:1212-1219.
- 176- Wang Z, Cheng Z, Cristofaro V, Li J, Xiao X, Gomez P, et al. Inhibition of TNF- α improves the bladder dysfunction that is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012;61:2134-2145.
- 177- Gasbarro G, Lin DL, Vurbic D, Quisno A, Kinley B, Daneshgari F, et al. Voiding function in obese and type 2 diabetic female rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298:F72-77. doi: 10.1152/ajprenal.00309.2009.
- 178- Medeiros ML, de Oliveira MG, Tavares EG, Mello GC, Anhê GF, Mônica FZ, et al. Long-term methylglyoxal intake aggravates murine Th2-mediated airway eosinophil infiltration. *Int Immunopharmacol*. 2020;81:106254. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106254.
- 179- Averbek MA, De Lima NG, Motta GA, Beltrão LF, Abboud Filho NJ, Rigotti CP. Et al. Collagen content in the bladder of men with LUTS undergoing open prostatectomy: A pilot study. *Neurourol Urodyn*. 2018;37(3):1088-1094. doi: 10.1002/nau.23418.

- 180- Stratmann B, Goldstein B, Thornalley PJ, Rabbani N, Tschoepe D. Intracellular accumulation of methylglyoxal by glyoxalase 1 knockdown alters collagen homeostasis in L6 myoblasts. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 23;18(3):480. doi: 10.3390/ijms18030480.
- 181- Suriano F, Vieira-Silva S, Falony G, Roumain M, Paquot A, Pelicaen R, et al. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin. *Microbiome.* 2021;9(1):147. doi: 10.1186/s40168-021-01097-8.
- 182- Heppner TJ, Hennig GW, Nelson MT, Herrera GM. Afferent nerve activity in a mouse model increases with faster bladder filling rates *in vitro*, but voiding behavior remains unaltered *in vivo*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2022;1:R682-R693. doi: 10.1152/ajpregu.00156.2022.
- 183- Chen NX, Srinivasan S, O'Neill K, Nickolas TL, Wallace JM, Allen MR, et al. Effect of Advanced Glycation End-Products (AGE) Lowering Drug ALT-711 on Biochemical, Vascular, and Bone Parameters in a Rat Model of CKD-MBD. *J Bone Miner Res.* 2020;35:43-50. doi: 10.1002/jbmr.3925.

APÊNDICE

Os resultados deste capítulo foram publicados e podem ser consultados nas publicações:

Oliveira AL, de Oliveira MG, Medeiros ML, Mónica FZ, Antunes E. Metformin abrogates the voiding dysfunction induced by prolonged methylglyoxal intake. *Eur J Pharmacol.* 2021 Nov 5;910:174502. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174502.

Oliveira AL, Medeiros ML, de Oliveira MG, Teixeira CJ, Mónica FZ, Antunes E. Enhanced RAGE expression and excess reactive-oxygen species production mediate Rho kinase-dependent detrusor overactivity after methylglyoxal exposure. *Front Physiol.* 2022 Mar 28;13:860342. doi: 10.3389/fphys.2022.860342.

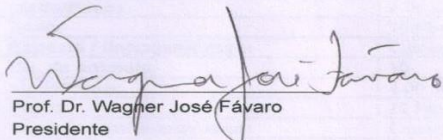
Oliveira AL, Medeiros ML, Ghezzi AC, Dos Santos GA, Mello GC, Mónica FZ, Antunes E. Evidence that methylglyoxal and receptor for advanced glycation end products are implicated in bladder dysfunction of obese diabetic ob/ob mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2023 Oct 1;325(4):F436-F447. doi: 10.1152/ajprenal.00089.2023.

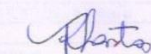
Oliveira AL, Medeiros ML, Gomes EdT, Mello GC, Costa SKP, Mónica FZ, Antunes E. TRPA1 channel mediates methylglyoxal-induced mouse bladder dysfunction. *Front Physiol.* 2023;14:1308077. doi: 10.3389/fphys.2023.1308077.

Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Farmacologia, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **05 de dezembro de 2019.**


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Metilgloxal na função miccional em camundongos: Estudo funcional e molecular**, registrada com o nº **5573-1/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Edson Antunes e AKila Lara de Oliveira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de **16/07/2020**.

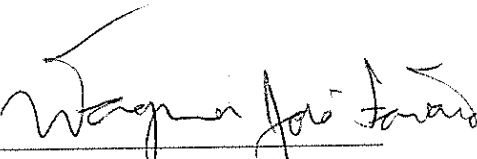
Universidade Estadual de Campinas - CEA/UNICAMP, em reunião de 16/07/2020.	
Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/09/2020 a 30/07/2023
Vigência da autorização para manipulação animal:	16/07/2020 a 30/07/2023
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos

23

Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Farmacologia, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **28 de agosto de 2020**.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO C

ANEXO 3- Aprovação do comitê de ética de uso animal (CEUA)

CERTIFICADO



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Avaliação do efeito do Alagebrium (ALT 711) na disfunção vesical de camundongos obesos deficientes de leptina, registrada com o nº 5949-1/2022, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Antunes e Akila Lara de Oliveira, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 21/03/2022.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/04/2022 a 01/12/2023
Vigência da autorização para manipulação animal:	21/03/2022 a 01/12/2023
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	20
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	20
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	20
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	20
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	20
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	20
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas

CERTIFICADO

Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas

CERTIFICADO

Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 17.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lep ob /JUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 19.00 Gramas
Sexo:	6 Machos 6 Fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Farmacologia, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **29 de março de 2022.**

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Rosângela dos Santos

Presidente

Secretária Executiva

— **IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário

CERTIFICADO

encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO**, **PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 01/04/2022, às 09:27 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS**, **SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 31/03/2022, às 10:05 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: **07BAD767 2B0640F3 BF3AC5D4 19846845**

