

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

TAMMYRIS HELENA REBECCHI E SILVEIRA

**IMPACTO DA HEMÓLISE INTRAVASCULAR NAS
ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MOLECULARES NA BEXIGA
URINÁRIA: IMPLICAÇÃO PARA A BEXIGA HIPERATIVA NA
ANEMIA FALCIFORME**

Bragança Paulista

2024

TAMMYRIS HELENA REBECCHI E SILVEIRA - R.A.: 202220922

**IMPACTO DA HEMÓLISE INTRAVASCULAR NAS
ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MOLECULARES NA
BEXIGA URINÁRIA: IMPLICAÇÃO PARA A BEXIGA
HIPERATIVA NA ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito para o Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Fábio Henrique da Silva

Bragança Paulista

2024

WJ 140
S584i

Silva, Tammyris Helena Rebecchi da
Impacto da hemólise intravascular nas alterações
funcionais e moleculares na bexiga urinária:
implicação para a bexiga hiperativa na anemia
falciforme / Tammyris Helena Rebecchi da Silva. –
Bragança Paulista, 2024.
47 p.

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

Orientação de: Fábio Henrique da Silva.

1. Disfunção miccional. 2. Óxido nítrico.
3. Estresse oxidativo. 4. Detrusor. 5. Hemólise.
6. Anemia falciforme. I. Silva, Fábio Henrique da
II. Título.



Educando
para a paz

SILVEIRA, Tammyris Helena Rebecchi e. "Impacto da hemólise intravascular nas alterações funcionais e moleculares na bexiga urinária: implicação para a bexiga hiperativa na anemia falciforme". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 6 de fevereiro de 2024 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Fábio Henrique da Silva - Orientador e Presidente
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Ivan Gustavo Masselli dos Reis
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Reis
(por videoconferência)
Universidade São Francisco

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo me conduzindo nos melhores caminhos e me dando sabedoria para fazer meu trabalho com excelência.

Ao meu orientador pela confiança, apoio e ensinamentos durante todo o processo do mestrado.

A Universidade São Francisco pelo apoio e pelo espaço concedidos.

Aos meus colegas de trabalho por toda ajuda e suporte em dias de experimentos e em momentos de dúvidas.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida, processo n° 2022/10548-2.

RESUMO

Pacientes com anemia falciforme (AF) apresentam hemólise intravascular, resultando em níveis elevados de hemoglobina plasmática. A hemoglobina em excesso reage com o óxido nítrico (NO), resultando em baixa biodisponibilidade do NO. Este déficit de NO contribui para os problemas de saúde decorrentes dessa condição, como o acidente vascular cerebral, hipertensão pulmonar, vasooclusão, úlceras de perna e priapismo. Estudos recentes do nosso grupo mostraram que a baixa biodisponibilidade de NO contribui para o desenvolvimento de bexiga hiperativa em camundongos falciformes. Até o momento nenhum estudo investigou o papel exclusivo da hemólise intravascular na disfunção miccional. O objetivo geral de nosso estudo é explorar o impacto da hemólise intravascular na função do trato geniturinário inferior em camundongos C57BL/6J, com a hemólise intravascular induzida através do uso de fenilhidrazina (PHZ). Os camundongos foram submetidos a técnica de mancha de micção em papel de filtro e as contrações e relaxamento do DSM foram avaliadas em banhos de órgãos para análises *in vitro*. Adicionalmente, a quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Western Blot. O grupo PHZ exibiu aumento da frequência urinária e aumento do volume miccional. As respostas contráteis do detrusor induzidas por carbacol (1 nM – 100 µM), KCl (1 – 300 mM), α - β -metileno-ATP (1, 3 e 10 µM) e a contração neurogênica por estimulação elétrica (EFS; 1-32 Hz) foram significativamente maiores ($P < 0.05$) em detrusor do grupo PHZ. O relaxamento induzido pelo isoproterenol (1 nM – 10 µM), mirabregon (1nM – 100uM) e SNP (1nM – 300uM) avaliado através de curvas concentração-efeito não mostrou alteração para os valores de resposta máxima (E_{max}) e potência (pEC_{50}) entre o grupo controle e PHZ. A expressão proteica da NO sintase endotelial fosforilada (p-eNOS) (Ser-1177), da NO sintase neuronal fosforilada (p-nNOS) (Ser-1417) e da VASP fosforilada (p-VASP) (Ser-239) diminuiu na bexiga do grupo PHZ. A expressão proteica da NOX-2, 3-nitrotirosina, marcador de estresse nitrosativo (3-NT) e 4-hidroxinonenal, marcador de estresse oxidativo (4-HNE) foi maior ($P < 0.05$) no detrusor do grupo PHZ. Nosso estudo mostra que a hemólise intravascular promove disfunção miccional devido a alterações na via de sinalização do NO na bexiga, evidenciada pelos níveis reduzidos de p-eNOS (Ser-1177), nNOS (Ser-1417) e p-VASP (Ser- 239). Em conclusão, a hemólise intravascular, promoveu hipercontratilidade do músculo detrusor, sintomas observados em pacientes e camundongos com AF.

Palavras-chave: Disfunção miccional. Estresse Oxidativo. Óxido nítrico. Músculo Detrusor da Bexiga.

ABSTRACT

Patients with sickle cell anemia (SCA) experience intravascular hemolysis, resulting in elevated plasma hemoglobin levels. Excess hemoglobin reacts with nitric oxide (NO), resulting in low NO bioavailability. This NO deficit contributes to the health problems resulting from this condition, such as stroke, pulmonary hypertension, vasoocclusion, leg ulcers and priapism. Recent studies from our group have shown that low NO bioavailability contributes to the development of overactive bladder in sickle cell mice. To date, no study has investigated the exclusive role of intravascular hemolysis in voiding dysfunction. The overall objective of our study is to explore the impact of intravascular hemolysis on the function of the lower genitourinary tract in C57BL/6J mice, with intravascular hemolysis induced through the use of phenylhydrazine (PHZ). The mice were subjected to the urination stain technique on filter paper and DSM contractions and relaxation were evaluated in organ baths for in vitro analyses. Additionally, protein quantification was performed using the Western Blot method. The PHZ group exhibited increased urinary frequency and increased voiding volume. Detrusor contractile responses induced by carbachol (1 nM – 100 μ M), KCl (1 – 300 mM), α - β -methylene-ATP (1, 3 and 10 μ M) and neurogenic contraction by electrical stimulation (EFS; 1 -32 Hz) were significantly higher ($P < 0.05$) in the detrusor of the PHZ group. The relaxation induced by isoproterenol (1 nM – 10 μ M), mirabregon (1nM – 100uM) and SNP (1nM – 300uM) evaluated through concentration-effect curves showed no change in the values of maximum response (E_{max}) and power (pEC_{50}) between the control group and PHZ. The protein expression of phosphorylated endothelial NO synthase (p-eNOS) (Ser-1177), phosphorylated neuronal NO synthase (p-nNOS) (Ser-1417) and phosphorylated NO synthase (p-VASP) (Ser-239) decreased in the bladder from the PHZ group. The protein expression of NOX-2, 3-nitrotyrosine, a marker of nitrosative stress (3-NT) and 4-hydroxynonenal, a marker of oxidative stress (4-HNE) was higher ($P < 0.05$) in the detrusor of the PHZ group. Our study shows that intravascular hemolysis promotes voiding dysfunction due to changes in the NO signaling pathway in the bladder, evidenced by reduced levels of p-eNOS (Ser-1177), nNOS (Ser-1417) and p-VASP (Ser-239). In conclusion, intravascular hemolysis promoted hypercontractility of the detrusor muscle, symptoms observed in patients and mice with SCD.

Keywords: *Voiding dysfunction. Oxidative stress. Nitric oxide. Bladder Detrusor Muscle.*

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.

3-NT: 3-Nitrotirosina, marcador de estresse nitrosativo

4-HNE: 4-Hidroxinonenal, marcador de estresse oxidativo

ACh: Acetilcolina

AF: Anemia Falciforme

AMPc: Monofosfato Cíclico de Adenosina

ATP: Adenosina trifosfato

BH: Bexiga Hiperativa

Ca²⁺: Íon cálcio

EFS: Estímulo elétrico

E_{max}: Resposta máxima

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina

Hb: Hemoglobina

HbS: Hemoglobina S

KCl: Cloreto de potássio

LUTS: Sintomas do trato urinário inferior

M3: Receptor muscarínico colinérgico/acetilcolina

NA: noradrenalina

NO: Óxido nítrico

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

pEC₅₀: Potência

PKG: Proteína kinase ativada por GMPc

PHZ: Fenilhidrazina

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. Anatomia da bexiga urinária..... | 16 |
| FIGURA 2. Ciclo miccional da bexiga, fases de armazenamento e esvaziamento..... | 19 |
| FIGURA 3. Principal via de relaxamento do músculo liso detrusor (SNS, noradrenalina/receptor beta/ AC/AMPC/PKA). NA, Noradrenalina; β_3 , receptor beta 3; G, Proteína Gs; AC, Adenilato Ciclase; AMPc, Monofosfato Cíclico de Adenosina; ATP, Adenosina trifosfato; PKA, Proteína Kinase A; Ca^{2+} , cálcio..... | 20 |
| FIGURA 4. Sinalização NO/GCs/GMPc: Via de relaxamento do músculo liso detrusor. eNOS, Óxido nítrico sintase endotelial; L-arg, L-arginina GCs, Guanilato ciclase solúvel; GTP, Guanosina trifosfato; GMPc, Monofosfato cíclico de guanosina; PKG, Proteína kinase dependente de GMPc; Ca^{2+} , Cálcio..... | 21 |
| FIGURA 5. Principal via de contração do músculo liso detrusor. <i>Ach, acetilcolina; M3, receptor muscarínico de acetilcolina; PLC, Fosfolipase C; PIP₂, fosfatidilinositol; IP₃, Inositol trifosfato; Dag, Diacilglicerol; PKC, Proteína kinase C; Rs, Retículo sarcoplasmático; Ca^{2+}, Cálcio; Cam, Calmodulina; MLC, Quinase da cadeia leve de miosina; MLC-P, Fosfatase de cadeia leve de miosina.....</i> | 22 |
| FIGURA 6. Modelo de hemólise intravascular induzida por fenilhidrazina. PHZ, fenilhidrazina; HbS, hemoglobina S..... | 26 |
| FIGURA 7. Modelo de hemólise intravascular. PHZ, fenilhidrazina..... | 28 |
| FIGURA 8. (A) Hemácias, (B) hemoglobina total e (C) hemoglobina plasmática. Os dados são apresentados como média \pm SEM de 5-7 camundongos por grupo. *P < 0.05, indicando uma diferença significativa em comparação com o grupo controle..... | 32 |
| FIGURA 9. (A) Imagens representativas de mancha de micção em papel de filtro, (B) número de micções, (C) volume de micções normalizado pelo peso corporal. Os dados são apresentados como média \pm SEM de 5 camundongos por grupo. *P < 0.05, indicando uma diferença significativa em comparação com o grupo controle..... | 33 |

- FIGURA 10.** Contrações de detrusor em resposta à estimulação elétrica em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 6 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle.....34
- FIGURA 11.** (A) Contrações de detrusor em resposta ao carbacol em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 6 animais. (B) Valores de resposta máxima e (C) potência (pEC_{50}) do carbacol. *P < 0.05 comparado com o grupo controle.....34
- FIGURA 12.** (A) Contrações de detrusor em resposta ao KCl em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais. (B) Valores de resposta máxima e (C) potência (pEC_{50}) do carbacol. *P < 0.05 comparado com o grupo controle.....35
- FIGURA 13.** Contrações de detrusor em resposta ao α - β -metileno-ATP em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 6 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle.....36
- FIGURA 14.** (A) Relaxamento de detrusor em resposta ao isoproterenol em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 6 animais. (B) Valores de resposta máxima (E_{max}) e (C) potência (pEC_{50}) do isoproterenol.....36
- FIGURA 15.** (A) Relaxamento de detrusor em resposta ao mirabegron em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais. (B) Valores de resposta máxima (E_{max}) e (C) potência (pEC_{50}) do mirabegron.....37
- FIGURA 16.** (A) Relaxamento de detrusor em resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais. (B) Valores de resposta máxima (E_{max}) e (C) potência (pEC_{50}) do SNP.....37
- FIGURA 17.** Expressão proteica da da p-eNOS (Ser-1177), p-nNOS (Ser-1417) e p-VASP (Ser-239) no detrusor de camundongos controles (CTL) e PHZ. Western blotting representativo e densitometria para (A) p-eNOS (Ser-1177), (B) p-nNOS (Ser-1417) e (C) p-

VASP (Ser-239). Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 7 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle. A densitometria das proteínas foi normalizada em relação à beta-actina.....38

FIGURA 18. Expressão proteica da NOX-2, 3-NT e 4-HNE em bexigas de camundongos controles (CTL) e PHZ. Western blotting representativo e densitometria para (A) gp91phox, (B) 3-NT e (C) 4-HNE. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 7 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle. A densitometria das proteínas foi normalizada em relação à beta-actina.....39

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1. Anatomia | 15 |
| 2.2. Inervação | 16 |
| 2.3. Ciclo miccional do trato urinário inferior | 17 |
| 2.3.1. Fase de armazenamento | 17 |
| 2.3.2. Fase de esvaziamento (micção)..... | 18 |
| 2.3.3. Mecanismos contráteis e relaxante da bexiga durante o ciclo miccional. 19 | |
| 2.4. Anemia falciforme | 22 |
| 2.5. Hemólise intravascular na AF..... | 23 |
| 2.8. Sintomas do trato urinário inferior: visão geral | 24 |
| 2.9. Disfunção miccional na AF..... | 24 |
| 2.10. Modelo de hemólise intravascular induzida por PHZ..... | 26 |
| 3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO ESTUDO..... | 27 |
| 4. OBJETIVO GERAL | 27 |
| 4.1. Objetivos específicos: | 27 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 5.1. Animais e modelo de hemólise intravascular..... | 28 |
| 5.2 Preparação do músculo liso detrusor para o estudo funcional in vitro | 29 |
| 5.3. Western Blotting | 30 |
| 5.4. Técnica de mancha de micção em papel de filtro | 30 |
| 5.5. Análise estatística..... | 31 |
| 6. RESULTADOS..... | 32 |
| 6.1. Parâmetros hematológicos | 32 |
| 6.2. Caracterização do perfil de micção | 32 |
| 6.3. Contração de detrusor induzida pela EFS, carbacol, KCL e α - β -metileno-ATP: efeito da hemólise intravascular | 33 |
| 6.4. Relaxamento induzido pelo isoproterenol, mirabegron e nitroprussiato de sódio em detrusores de camundongos PHZ | 36 |
| 6.5. Expressão da p-eNOS (Ser-1177), p-nNOS (Ser-1417) e p-VASP (Ser-239) em detrusores de camundongos PHZ | 38 |
| 6.6. Expressão da NOX-2, 3-NT e 4-HNE em detrusores de camundongos PHZ. 39 | |

| | |
|--------------------|----|
| 7. DISCUSSÃO | 40 |
| 8. CONCLUSÃO | 43 |
| REFERÊNCIAS | 44 |

1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF), um distúrbio genético autossômico recessivo, é caracterizada pela produção anormal de hemoglobina S (HbS) (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). Essa mutação genética desencadeia a polimerização da HbS, formando eritrócitos em forma de foice. Essas células alteradas apresentam maior rigidez e menor tempo de vida, levando a hemólise intravascular e extravascular, que são características críticas da AF e contribuem para suas diversas manifestações clínicas (KATO et al., 2018). Uma consequência molecular significativa da hemólise intravascular é a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) devido à interação direta NO-hemoglobina e ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que atuam como sequestradores de NO (REITER et al., 2002; VONA et al., 2021). A redução da biodisponibilidade de NO está associada a várias complicações graves da AF, incluindo úlcera de perna, hipertensão pulmonar, priapismo e bexiga hiperativa (BH) (ANELE et al., 2016; CITA et al., 2016; KATO et al., 2006; NOLAN et al., 2005).

As funções da bexiga urinária, que englobam o armazenamento e a eliminação de urina, são reguladas por uma complexa interação de neurotransmissores (ANDERSSON; ARNER, 2004). A BH, uma condição clínica marcada por urgência persistente para urinar, pode ocorrer com ou sem incontinência por urgência e é comumente acompanhada por aumento da frequência urinária e noctúria (EAPEN; RADOMSKI, 2016). Em pacientes com AF, a prevalência de BH é significativa, com estudos clínicos sugerindo que até 40% desses pacientes podem apresentar sintomas de BH (ANELE et al., 2016; PORTOCARRERO et al., 2012). Um contribuinte comum para a BH é o aumento da contração do músculo liso detrusor durante a fase de armazenamento de urina, levando à hiperatividade do detrusor (MICHEL; CHAPPLE, 2009).

A via de sinalização do NO-GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) desempenha um papel essencial no funcionamento normal do trato urinário. O NO, sintetizado pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e pela óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), é essencial para manter o tônus e a funcionalidade do músculo liso detrusor (BURNETT et al., 1997; MÓNICA et al., 2008). A deficiência de NO tem sido associada ao fenótipo de BH e ao aumento da contração do músculo liso detrusor em camundongos com AF e vários modelos experimentais (KARAKUS et al., 2019, 2020; KHAN et al., 1999; LEE et al., 2021; LEIRIA et al., 2013, 2014; MÓNICA et al., 2011; MUSICKI et al., 2019). Além disso, o aumento da produção de superóxido pela isoforma NOX-2

da NADPH oxidase, que atua ativando o NO, também contribui para a fisiopatologia da BH em modelos animais (AKAKPO; MUSICKI; BURNETT, 2017; ALEXANDRE et al., 2016, 2018; DE OLIVEIRA et al., 2022), mas ainda não foi avaliado no trato urinário inferior na AF.

Considerando o papel relevante da hemólise intravascular na AF e seu potencial impacto na via de sinalização do NO na bexiga, é plausível que a hemólise intravascular tenha uma contribuição significativa para a disfunção miccional. Até o presente momento, os efeitos específicos da hemólise intravascular na disfunção miccional ainda não foram avaliados. Diante disso, formulamos a hipótese de que a hemólise intravascular desempenha um papel importante na disfunção miccional associada à AF. Para testar essa hipótese e investigar os efeitos exclusivos da hemólise intravascular, utilizamos um modelo de hemólise intravascular induzida por fenilhidrazina (PHZ) em camundongos.

A compreensão dos mecanismos envolvidos na hemólise intravascular e seus agravantes contribui para o melhor conhecimento da fisiopatologia desta doença, sendo essencial para identificar novas abordagens terapêuticas. Investigar o impacto da hemólise intravascular na função miccional e nas vias de sinalização do NO pode fornecer novas informações para o desenvolvimento de tratamentos direcionados a disfunção urinária na AF. Nossas pesquisas têm o potencial de melhorar a qualidade de vida dos pacientes falciformes, abrindo caminho para intervenções mais eficazes e específicas para este aspecto da doença.

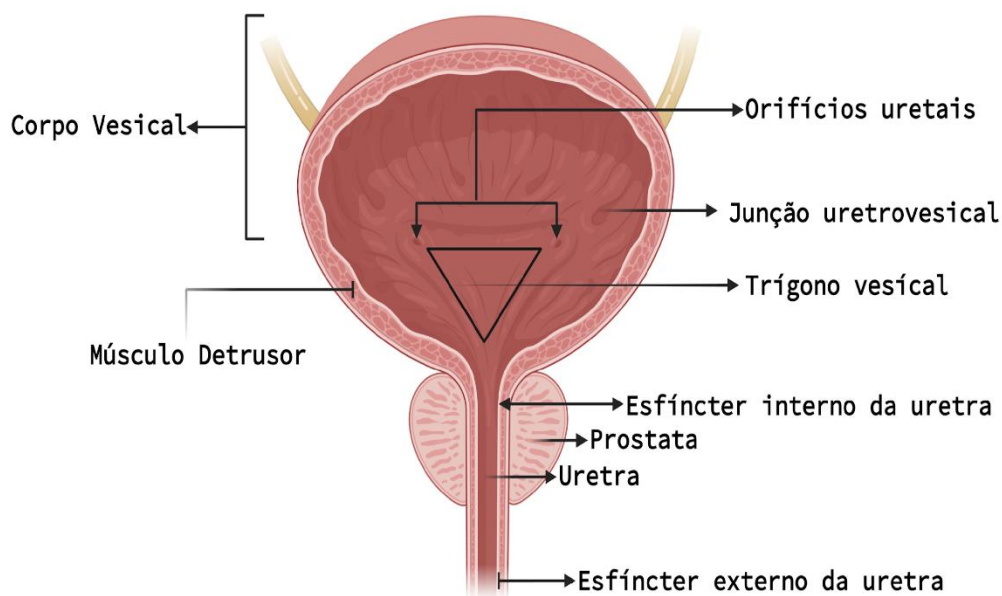
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia

A bexiga urinária pode ser classificada em corpo vesical, localizada acima dos orifícios ureterais, e pela base a qual é formada pela parede anterior, trígono, junção uretrovesical e detrusor profundo, com o músculo liso revestido por uma membrana mucosa (HOLSTEGE, 2016). Sendo a parede muscular da bexiga formada por células musculares lisas, as quais constituem o músculo detrusor (TYAGI et al., 2014). Localizado no tronco encefálico, situado onde ocorre a coordenação da micção, se encontra o centro pontino da micção onde fica situado o fim da via comum dos neurônios da bexiga (FRY; MCCLOSKEY, 2019).

A bexiga é composta por quatro camadas, sendo elas uma serosa externa; camada de músculo liso detrusor; uma lâmina própria e urotélio que formam a mucosa, exercendo uma atividade integrada na atividade espontânea (QUAGHEBEUR et al., 2021). Em relação a uretra, é importante mencionar a diferença entre o sexo masculino e feminino, sendo a uretra masculina, formada pelo esfíncter interno, esfíncter externo e próstata diferente da uretra feminina, a qual é composta por esfíncter interno (sendo este menor comparado ao sexo masculino) e esfíncter externo (HOLSTEGE, 2016).

A uretra é composta pelos músculos estriados e liso, onde a parte proximal é revestida pelo epitélio de transição, mas quando tem sua abertura na parte externa, o revestimento é modificado para epitélio pseudoestratificado cilíndrico e estratificado pavimentoso (FRY; VAHABI, 2016) (Figura 1).



Created with BioRender.com

FIGURA 1. Anatomia da Bexiga urinária.

2.2. Inervação

A bexiga é inervada por uma grande rede nervosa, sendo feita pelo plexo hipogástrico, originado da T10 ao L4 o qual contém apenas fibras simpáticas (plexo hipogástrico), já o plexo pélvico originado de S2 e S4, contém tanto fibras simpáticas como parassimpáticas (QUAGHEBEUR et al., 2021). Este sistema promoverá ações de contração e relaxamento

esfinteriano através da ativação de neurotransmissores como acetilcolina (ACh) e noradrenalina (NA) que atuarão no receptor muscarínico colinérgico/acetilcolina (M3) e beta-adrenérgicos (FRY; VAHABI, 2016).

Outro regulador das funções da bexiga é a inervação eferente e somática (nervo pudendo), sendo localizada no núcleo de Onuf localizado na medula sacral, inervando o esfíncter uretral externo e os músculos do assoalho pélvico (HOLSTEGE, 2016). Há também a inervação aferente, partindo dos receptores, raízes dorsais, nervos, gânglios, tratos espinotalâmicos, vias espinhais ascendentes, centros superiores e região L leva impulsos sensitivos da bexiga até os centros corticais (BIRDER, 2014).

Em relação ao reflexo de armazenamento responsável pelo enchimento da bexiga, ocasionada pelo relaxamento do músculo liso detrusor, o principal agente será o reflexo pélvico-pudendo somático de guarda (DRAKE et al., 2017). Enquanto ocorre as contrações dos músculos do assoalho pélvico a superfície medial do lobo frontal bilateral (área motora primária), são ativadas giro pré-central esquerdo e a área motora suplementar bilateral, com a parada da contração do músculo liso detrusor (KRHUT et al., 2014).

2.3. Ciclo miccional do trato urinário inferior

O ciclo miccional é compreendido pelo armazenamento e eliminação da urina na bexiga, ocasionados por movimentos de relaxamento e contração do músculo detrusor, sendo os principais órgãos responsáveis por essa ação a uretra e bexiga (DRAKE et al., 2017).

2.3.1. Fase de armazenamento

O começo do ciclo miccional ocorre com o enchimento vesical, tendo início com as fibras nervosas simpáticas ocasionando o relaxamento na parede vesical, acarretando a distensão e o estreitamento do esfíncter interno da uretra (músculo liso) (FRY; VAHABI, 2016). A bexiga se expande causando a ativação dos nervos aferentes vesicais, consecutivamente ocorre a suspensão temporária reflexa da bexiga pelo nervo hipogástrico (BOLLA et al., 2023). Paralelamente acontece a indução do esfíncter externo pelo nervo pudendo, o qual é constantemente verificado,

mantém sua ação inibitória sobre o centro medular sacral, gradativamente fazendo a liberação da ativação do esfíncter externo (FRY; MCCLOSKEY, 2019).

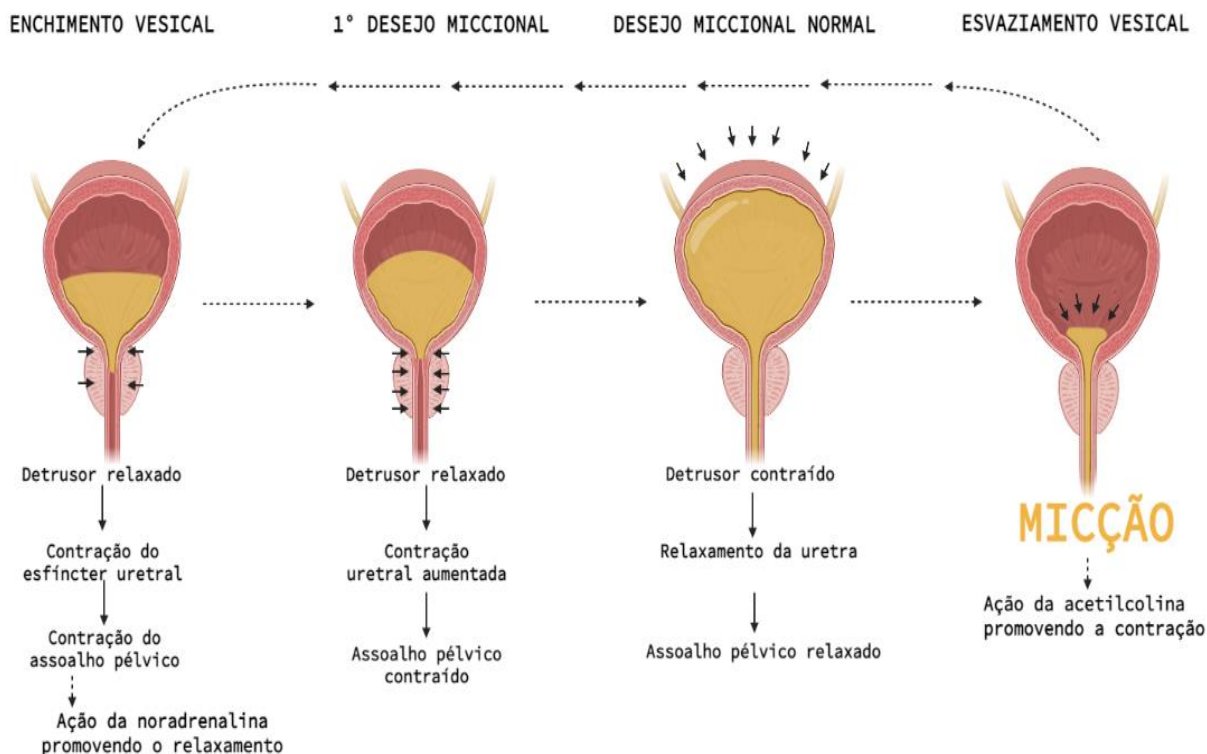
Em condições fisiológicas, durante a fase de preenchimento a pressão intravesical é baixa e constante até o volume abaixo do limiar de pressão que estimula o esvaziamento da bexiga (DRAKE et al., 2017). Durante o armazenamento urinário da bexiga, o esfíncter uretral e a musculatura lisa da uretra estão contraídos para manter a continência urinária (BOLLA et al., 2023).

2.3.2. Fase de esvaziamento (micção)

O início do esvaziamento ocorre depois da bexiga atingir seu estado máximo de armazenamento, bloqueando o centro sacral de micção (FRY; MCCLOSKEY, 2019). Através da indução de receptores do estiramento no detrusor, ocorre a ativação das contrações vesicais por intermédio do nervo pélvico (HOLSTEGE, 2016). Os receptores enviam sinais de forma aferente, para a região de S2 e S4 da medula espinal através dos nervos esplâncnicos pélvicos (FRY; VAHABI, 2016). Concomitantemente a atividade inibitória exercida na bexiga por meio do sistema simpático, através do nervo hipogástrico, é interrompida de forma simultânea a inibição da ativação somática do esfíncter, ocasionando o relaxamento do aparelho esfínteriano ao decorrer da micção (FRY; VAHABI, 2016).

O sistema nervoso simpático exerce sua influência sobre o trato urinário inferior através da estimulação adrenérgica, atuando principalmente na ação de liberação da NA nos receptores do corpo vesical, da próstata e uretra (HOLSTEGE, 2016). Em ambas as fases de armazenamento e micção podemos notar a ação do urotélio. Já a adenosina trifosfato (ATP) atua nos receptores P2X e P2Y (FRY; MCCLOSKEY, 2019). Quando oportuno, ocorre o relaxamento de forma voluntária do esfíncter externo da uretra, tanto no sexo masculino quanto feminino, acarretando na micção, por meio dos nervos eferentes somáticos, através do nervo pudendo (S2-S4) (FRY; VAHABI, 2016). No esvaziamento vesical, temos a contração do esfíncter externo, deixando a bexiga vazia (no sexo masculino o responsável por expulsar as últimas gotas de urina é o músculo bulbo

esponjoso), após o esvaziamento o detrusor se relaxa novamente através do sistema nervoso simpático (BOLLA et al., 2023; FRY; VAHABI, 2016) (Figura 2).



Created with BioRender.com

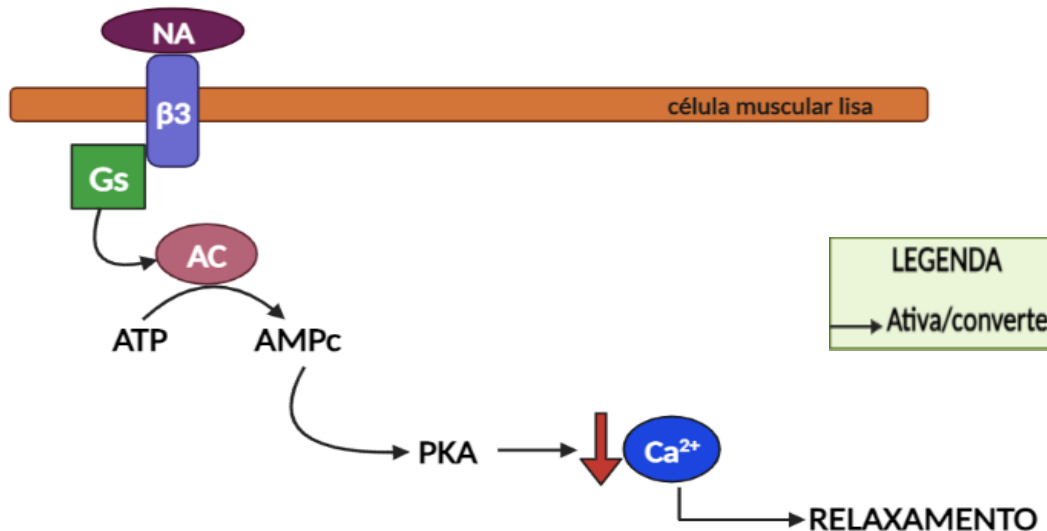
FIGURA 2. Ciclo miccional da bexiga, fases de armazenamento e esvaziamento.

Em suma a ação de micção em condições fisiológicas, se resume a um processo de desliga e liga, se alternando entre atividades de enchimento e esvaziamento (DRAKE et al., 2017).

2.3.3. Mecanismos contráteis e relaxante da bexiga durante o ciclo miccional

No corpo vesical há duas vias para se ter o relaxamento do músculo detrusor, para assim ser armazenada a urina dentro da bexiga (BOLLA et al., 2023). Em uma das vias, quem irá promover o relaxamento vesical é a NA, sendo este o principal neurotransmissor do sistema nervoso simpático (SNS). A NA se liga ao receptor β_3 o qual está ligado a proteína Gs, que estimula a adenilato ciclase sintetizando o segundo mensageiro monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) a partir do ATP (DRAKE et al., 2017). A elevação de níveis citoplasmáticos de AMPC, irá ativar a

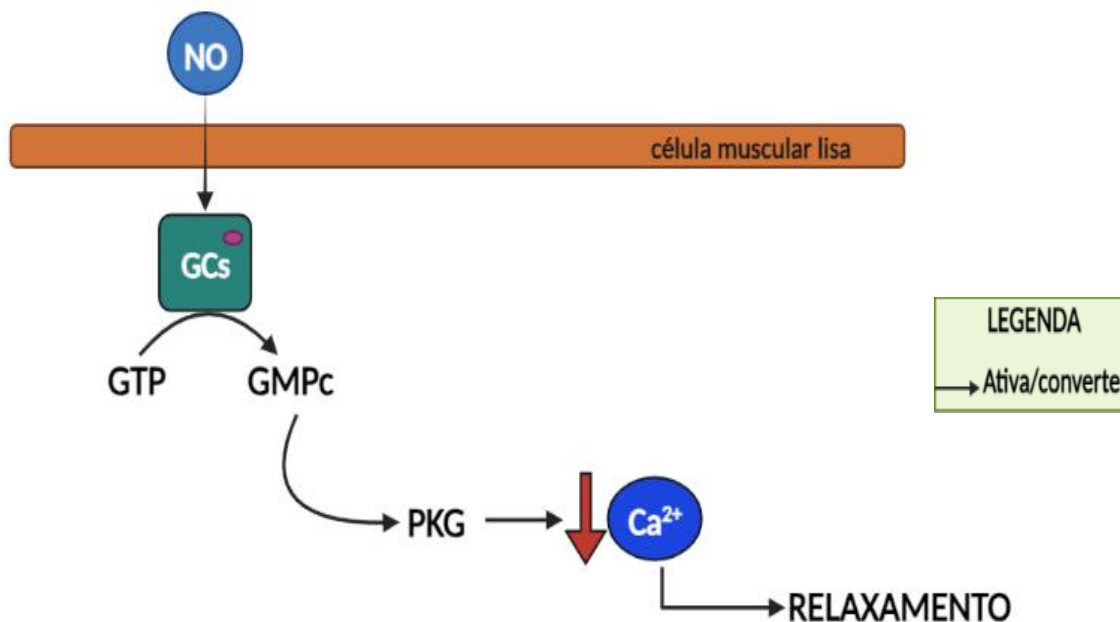
proteína kinase (PKA), reduzindo os níveis de cálcio (Ca^{2+}) promovendo o relaxamento do músculo detrusor (FRY; VAHABI, 2016) (Figura 3).



Created with BioRender.com

FIGURA 3. Relaxamento do músculo liso detrusor: receptor β_3 /AMPc/PKA. NA, Noradrenalina; β_3 , receptor beta 3; G, Proteína Gs; AC, Adenilato Ciclase; AMPc, Monofosfato Cíclico de Adenosina; ATP, Adenosina trifosfato; PKA, Proteína Kinase A; Ca^{2+} , Cálcio.

A via NO-GMPc atua da seguinte forma para promover o relaxamento do detrusor: O NO é originado pela L-arginina (L-arg) através do óxido nítrico sintase (NOS) (BALKE; ZHANG; PERCIVAL, 2019; DRAKE et al., 2017). O NO interage com o ferro do grupo heme localizado na enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), alterando a conformação desta enzima e a tornando ativa, a qual converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (FRY; VAHABI, 2016). Com a elevação de GMPc ocorre a ativação da proteína kinase dependente de GMPc (PKG), assim reduzindo os níveis de Ca^{2+} intracelular e promovendo o relaxamento do detrusor (TENOPOULOU; DOULIAS, 2020) (Figura 4).



Created with BioRender.com

FIGURA 4. Via de relaxamento do músculo liso detrusor: Sinalização NO/GCs/GMPc. eNOS, Óxido nítrico sintase endotelial; L-arg, L-arginina; NO, óxido nítrico; GCs, Guanilato ciclase solúvel; GTP, Guanosina trifosfato; GMPc, Monofosfato cíclico de guanosina; PKG, Proteína quinase dependente de GMPc; Ca²⁺, Cálcio.

Em relação as vias de esvaziamento, quem atua no corpo vesical é a ACh, principal neurotransmissor do fibras parassimpáticas (DRAKE et al., 2017). Nesta via a ACh se liga e estimula o receptor M3 que ativam a fosfolipase C que converte o fosfatidilinositol (PIP₂) no diacilglicerol (DAG) e também em inositol trifosfato. O inositol trifosfato vai ativar seu receptor no retículo endoplasmático, aumentando os níveis de Ca²⁺ intracelular (FRY; MCCLOSKEY, 2019). O Ca²⁺ se acopla com calmodulina originando um complexo que ativa a kinase de cadeia leve de miosina (MLC-kinase) aumentando a fosforilação MLC-kinase, deixando a fibra muscular contraída (DRAKE et al., 2017) (Figura 5).

As concentrações intracitoplasmáticas de Ca²⁺ também podem ser alteradas através de diferentes neurotransmissores, sendo estes liberados em terminações nervosas de eferência parassimpáticas exercendo ação no trato urinário inferior (TENOPOULOU; DOULIAS, 2020). Estes mecanismos acarretam na potencialização ou promoção da contração da bexiga. O principal

entre eles é o ATP, que atua em receptores do tipo P2X auxiliando na contração e P2Y gerando o relaxamento da bexiga (FRY; MCCLOSKEY, 2019).

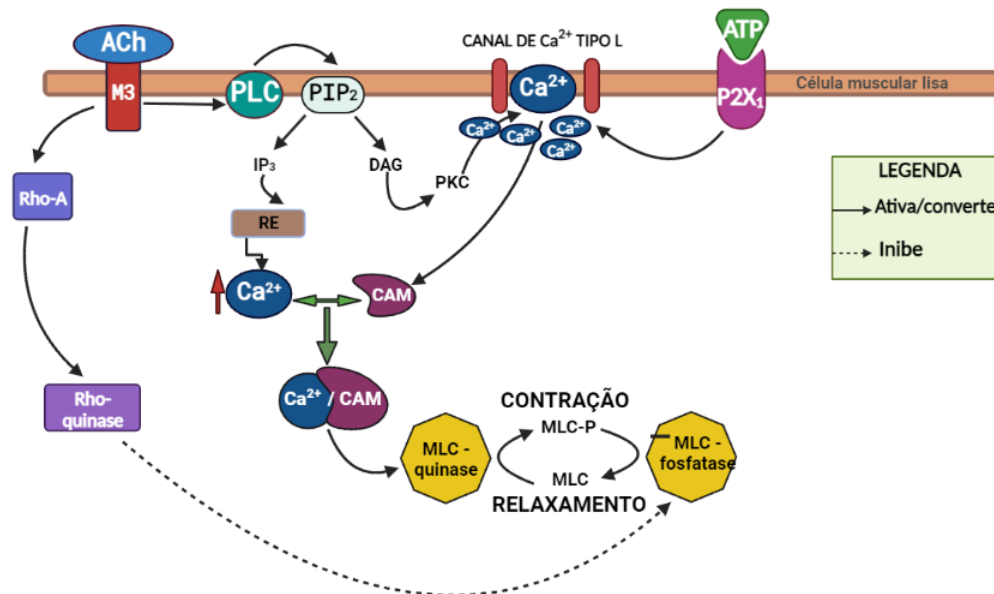


FIGURA 5. Principal via de contração do músculo liso detrusor. ACh, acetilcolina; M3, receptor muscarínico de acetilcolina; PLC, Fosfolipase C; PIP₂, fosfatidinositol; IP₃, Inositol trifosfato; Dag, Diacilglicerol; PKC, Proteína Kinase C; Re, Retículo endoplasmático; Ca²⁺, Cálcio; Cam, Calmodulina; MLC, Kinase da cadeia leve de miosina; MLC-P, Fosfatase de cadeia leve de miosina; Rho-A/ Rho-kinase, Rock; ATP, adenosina trifosfato, P2X₁, receptor de ATP.

2.4. Anemia falciforme

A AF, distúrbio monogênico hereditário, de caráter autossômico recessivo, é caracterizada por apresentar uma hemoglobina (Hb) atípica. A Hb normal é classificada como hemoglobina A (HbA), já na AF é classificada como HbS. A HbS apresenta características bioquímicas particulares, que se deve ao fato da troca de um ácido glutâmico por uma valina na 6ª posição da cadeia beta, permitindo a polimerização da HbS quando houver a desoxigenação (PINTO et al., 2019; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019; WILLIAMS; THEIN, 2018). Esta polimerização permite que os glóbulos vermelhos obtenham um formato de foice, causando deformação, enrijecimento e falta de flexibilidade necessária para atravessar os pequenos capilares (KATO et

al., 2018; PINTO et al., 2019). Como consequência desta deformação ocorre a obstrução do fluxo sanguíneo, acarretando em outras manifestações fisiológicas (PINTO et al., 2019).

O eritrócito é danificado pelo polímero de HbS levando a uma população heterogênea de células falciformes, resultando na deterioração do citoesqueleto membranoso (PACE; STARLARD-DAVENPORT; KUTLAR, 2021). A substância de cátiões e água é diminuída fazendo uma distribuição alterada de lipídios na membrana (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). Quanto a vascularização, ocorre uma interação das células falciformes com o endotélio e outras células do sangue, o que acarreta em vasocclusão (PACE; STARLARD-DAVENPORT; KUTLAR, 2021).

2.5. Hemólise intravascular na AF

A hemólise intravascular é uma das principais alterações que ocorre na AF (DELESDERRIER et al., 2020; PICCIN et al., 2019; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). A hemólise intravascular libera uma grande concentração de HbS para o plasma. O excesso de HbS pode reagir com o NO, assim reduzindo a sua biodisponibilidade (PACE; STARLARD-DAVENPORT; KUTLAR, 2021). Além disso, a hemólise intravascular pode aumentar a produção de anión superóxido que também pode reagir com o NO e reduzir a sua biodisponibilidade (NOMIYA et al., 2012). A redução da biodisponibilidade de NO está associada com crise vaso oclusivas acompanhadas de dores intensas, síndrome torácica aguda, lesão renal e priapismo na AF (CHENOU et al., 2021; DELESDERRIER et al., 2020; PACE; STARLARD-DAVENPORT; KUTLAR, 2021).

Nas condições fisiológicas normais, a proteína haptoglobina é responsável em combater o excesso de hemoglobina no plasma (BUEHLER; HUMAR; SCHAER, 2020). A haptoglobina reage com a hemoglobina formando um complexo que é metabolizado pelos macrófagos no sistema retículo endotelial (BUEHLER; HUMAR; SCHAER, 2020; DI MASI et al., 2020). Entretanto, a concentração de haptoglobina está reduzida no plasma de pacientes com AF devido ao excesso de hemoglobina no plasma (DI MASI et al., 2020).

2.8. Sintomas do trato urinário inferior: visão geral

Sintomas do trato urinário inferior (LUTS), do inglês "Lower Urinary Tract Symptoms") englobam uma variedade de sinais clínicos que afetam o sistema urinário inferior, incluindo a bexiga e a uretra. Esses sintomas são comuns em homens e mulheres e podem ter um impacto significativo na qualidade de vida. Os LUTS são frequentemente classificados em três categorias principais: sintomas de armazenamento, sintomas de esvaziamento e sintomas pós-miccional (ABRAMS et al., 2003).

Sintomas de Armazenamento: Estes sintomas ocorrem durante a fase de enchimento da bexiga e incluem urgência urinária (necessidade súbita e forte de urinar), aumento da frequência urinária (necessidade de urinar frequentemente), noctúria (necessidade de acordar à noite para urinar) e incontinência urinária (perda involuntária de urina).

Sintomas de Esvaziamento: Estes sintomas estão relacionados a dificuldades na fase de eliminação da urina e incluem hesitação (dificuldade em iniciar a micção), jato urinário fraco ou interrompido, esforço para urinar e sensação de esvaziamento incompleto da bexiga.

Sintomas Pós-miccional: Estes sintomas ocorrem após a micção e incluem a sensação de esvaziamento incompleto e gotejamento pós-miccional (liberação de pequenas quantidades de urina após a micção).

2.9. Disfunção miccional na AF

A associação entre a AF e os LUTS tem sido documentada em diversos estudos epidemiológicos, os quais destacam o impacto significativo desses sintomas na qualidade de vida dos pacientes (ANELE et al., 2016; PORTOCARRERO et al., 2012). Observa-se que a incontinência urinária é mais prevalente em indivíduos com AF em comparação com a população saudável, evidenciando uma correlação entre a doença e a disfunção miccional (PORTOCARRERO et al., 2012). Em crianças e adolescentes com até 16 anos portadores de AF, há uma maior prevalência de BH, caracterizada por urgência miccional aumentada e maior incidência de noctúria (PORTOCARRERO et al., 2012). Estudo também indica que adultos com AF apresentam uma incidência maior de BH quando comparados a indivíduos saudáveis, com aproximadamente 38% dos pacientes com AF relatando sintomas de BH (ANELE et al., 2016).

Apesar da evidência clínica da relação entre a AF e os LUTS, os mecanismos fisiopatológicos subjacentes a essas alterações ainda não foram amplamente investigados. No contexto de modelos animais para estudo da AF, até o momento, apenas quatro estudos foram realizados focando nas alterações de disfunção miccional associadas à doença (CLAUDINO et al., 2015; KARAKUS et al., 2019, 2020; MUSICKI et al., 2019). Estudo publicado recentemente por nosso grupo, constatou que a bexiga de camundongos com AF apresentam disfunção miccional associada a diminuição de eNOS fosforilada (Ser-1177) e nNOS fosforilada (Ser-14120) nos sítios regulatórios positivos na bexiga, indicando disfunção da via NO-GMPc (MUSICKI et al., 2019), assim como aumento das contrações do músculo detrusor induzidas pelo carbacol e pela estimulação neurogênica (KARAKUS et al., 2019, 2020). Em outros modelos experimentais, a disfunção miccional também tem sido associado com a redução da biodisponibilidade de NO no trato urinário inferior (BURNETT et al., 1997; MÓNICA et al., 2011, 2008). Conforme mencionado anteriormente, na AF, o excesso de hemoglobina resultante da hemólise intravascular reduz a biodisponibilidade de NO. Portanto, é plausível que a hemólise intravascular contribua significativamente para a disfunção miccional observada na AF, reforçando a necessidade de uma investigação mais aprofundada dos mecanismos envolvidos.

Na AF, o estresse oxidativo, definido como um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante do tecido, desempenha um papel importante na fisiopatologia, contribuindo para a lesão de órgãos em pacientes. O excesso de superóxido podem reagir rapidamente com o NO, reduzindo a biodisponibilidade deste importante neurotransmissor (NUR et al., 2011). Em modelos experimentais com roedores, tem-se observado que o aumento do estresse oxidativo, associado à diminuição da biodisponibilidade de NO na uretra e bexiga, está relacionado à disfunção miccional (ALEXANDRE et al., 2014; NOMIYA et al., 2012; YAMAGUCHI; NOMIYA; ANDERSSON, 2014). Dessa forma, é plausível que a redução da biodisponibilidade de NO, devido ao excesso de EROs, possa contribuir para a disfunção miccional na AF. No entanto, até o momento, nenhum estudo investigou especificamente o impacto do estresse oxidativo na disfunção miccional em pacientes com AF.

2.10. Modelo de hemólise intravascular induzida por PHZ

O modelo de hemólise intravascular induzida por PHZ provoca peroxidação lipídica nas hemácias, resultando em lise celular e consequente extravasamento de hemoglobina para o plasma (GOLDSTEIN; ROZEN; KUNIS, 1980) (Figura 6). A PHZ leva a diversas alterações hematológicas semelhantes as observadas na AF, como anemia, redução no número de hemácias, redução do hematócrito e aumento da hemoglobina no plasma, sendo um modelo amplamente utilizado para avaliar os efeitos da hemólise intravascular apenas (HENRIQUE SILVA et al., 2018; IACOPUCCI et al., 2022).

Um recente estudo publicado pelo nosso grupo mostrou que a hemólise intravascular induzida pela PHZ em camundongos gera um fenótipo de priapismo (IACOPUCCI et al., 2022), caracterizado pelo aumento do relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos e aumento do estresse oxidativo e da isoforma da NADPH oxidase (NOX-2), complexo enzimático responsável pela produção de ânion superóxido. No trato urinário inferior, os efeitos exclusivos da hemólise intravascular ainda não foram investigados.



Created with BioRender.com

FIGURA 6. Modelo de hemólise intravascular induzida por PHZ. PHZ, fenilhidrazina; Hb, hemoglobina.

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO ESTUDO

Estudos epidemiológicos relataram a associação entre a AF e os LUTS, mas os mecanismos fisiopatológicos envolvidos ainda são pouco compreendidos. Na AF, ocorre a liberação de elevadas concentrações de hemoglobina no plasma. Esse excesso de hemoglobina pode reduzir a biodisponibilidade de NO e aumentar a produção de EROs, que também comprometem a biodisponibilidade de NO. Em modelos animais de bexiga hiperativa, estudos anteriores mostraram que camundongos machos deficientes em NO exibem hipertrofia e hiperatividade detrusora. Com base nesses estudos, levantamos a hipótese de que a redução da biodisponibilidade de NO, devido à presença de hemoglobina no trato geniturinário inferior, contribui para a bexiga hiperativa na AF. Assim, propomos investigar o papel da hemólise intravascular na função do trato geniturinário inferior em camundongos C57BL/6 submetidos a hemólise intravascular induzida por PHZ. Este modelo específico é ideal para o estudo isolado dos efeitos da hemólise intravascular, permitindo uma análise detalhada das alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares associadas a este fenômeno.

4. OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito da hemólise intravascular na função do trato geniturinário inferior em camundongos C57BL/6J com hemólise intravascular induzida pela PHZ.

4.1. Objetivos específicos:

- (I) Determinar as alterações hematológicas promovidas pela PHZ;
- (II) Avaliar o efeito da hemólise intravascular na função miccional;
- (III) Investigar as alterações funcionais *in vitro* do músculo liso detrusor;
- (IV) Avaliar a expressão das proteínas envolvidas na via NO-GMPc na bexiga;
- (V) Avaliar os marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo na bexiga;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais e modelo de hemólise intravascular

No presente estudo, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J, com idade entre 3 e 5 meses, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram alojados no Biotério da Universidade São Francisco (USF), mantidos em condições controladas com temperatura de 24°C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, tendo acesso livre a água e ração. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da USF, conforme o protocolo número 002.03.2021, garantindo o cumprimento das diretrizes éticas para experimentação animal.

No modelo de hemólise intravascular adotado neste estudo, foram utilizadas duas injeções intraperitoneais de PHZ (50 mg/kg) em camundongos C57BL/6J. Este modelo já havia sido padronizado e utilizado em um estudo anterior realizado no laboratório (IACOPUCCI et al., 2022). A segunda dose de PHZ foi administrada 8 horas após a primeira. Decorridas 96 horas da primeira dose, os camundongos foram eutanasiados.



Created with BioRender.com

FIGURA 7. Modelo de hemólise intravascular. PHZ, fenilhidrazina.

5.2 Preparação do músculo liso detrusor para o estudo funcional *in vitro*

A bexiga foi retirada através de um corte horizontal na região dos ureteres. A base da bexiga foi removida para o isolamento apenas do músculo detrusor. Após esse procedimento o tecido foi colocado na solução de Krebs-Henseleit na seguinte composição (mM): NaCl, 130; NaHCO₃, 14.9; dextrose, 5.5; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.18; MgSO₄·7H₂O, 1.17 e CaCl₂·2H₂O, 1.6. Cortes foram realizados nas laterais direita e esquerda do tecido e posteriormente um corte ao meio, formando assim dois segmentos. Os segmentos da bexiga foram colocados ao meio de um transdutor de força de unidade fixa de forma que ficassem suspensos. A tensão empregada na bexiga (5,0 mN) foi regulada inicialmente e a cada 15 minutos até chegar à estabilização que foi de 60 minutos. Ao decorrer o período de estabilização a solução de Krebs foi trocada a cada 15 minutos. Todas alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e gravadas em sistema PowerLab 4/35 de aquisição de dados (software versão 7.0, AD Instruments, Austrália). Foram obtidos gráficos traçados pelo programa computacional “GraphPad PRISM” (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e os parâmetros de resposta máxima (E_{max}) e potência (pEC₅₀) calculados.

Protocolos de contração

Para a realização dos protocolos de contração, após o período de estabilização, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas ao agonista muscarínico pleno carbacol (10 nM- 100 µM) e ao KCl (1 – 300 mM). Adicionalmente, foram realizadas curvas concentração-resposta não cumulativas ao agonista purinérgico (P2X), α-β-metileno-ATP (1-10 µM). As respostas contráteis foram quantificadas em mN/mg, considerando o peso úmido do tecido.

No estudo da contração neurogênica induzida por estimulação elétrica (EFS), os tecidos foram posicionados entre dois eletrodos de platina dispostos paralelamente. A estimulação elétrica foi realizada com uma voltagem de 20 V, duração de pulso de 1 milissegundo e intervalo entre os pulsos de 0,2 ms. A duração da estimulação foi de 10 segundos, aplicada em frequências de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 Hz, com intervalos de 2 minutos entre os estímulos, seguindo a metodologia adotada em experiências prévias realizadas no laboratório.

Protocolos de relaxamento

Nos protocolos de relaxamento do músculo liso, os detrusores foram inicialmente pré-contraídos com carbacol na concentração de 300 nM. Após alcançar a estabilização da contração, foram realizadas curvas concentração-resposta para avaliar o relaxamento induzido pelos agentes farmacológicos. Utilizou-se o isoproterenol, um agonista não seletivo de receptores β -adrenérgicos, em concentrações variando de 1 nM a 10 μ M. Também foram aplicadas concentrações de 1 nM a 100 μ M do mirabegron, um agonista seletivo de receptores β_3 -adrenérgicos. Além disso, empregou-se o doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP), nas concentrações de 1 nM a 300 μ M, para investigar o relaxamento mediado pelo NO.

5.3. Western Blotting

As proteínas da bexiga foram separadas utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida a 4-20% com lauril sulfato de sódio a 0,1% (SDS-PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de PVDF, utilizando um sistema de transferência submerso. Para minimizar ligações inespecíficas das proteínas à membrana, realizou-se uma pré-incubação da membrana com um tampão de bloqueio contendo 5% de leite em pó, Tris 10 mM, NaCl 100 mM e 0,02% de Tween 20 por uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos para NOX-2, 4-hidroxinonenal (4-HNE), 3-nitrotirosina (3-NT), p-eNOS (Ser-1177), p-NOS (Ser-1417) e p-VASP (Ser-239) por 15 a 18 horas a 4°C. Após a incubação, as membranas foram lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos secundários. As bandas imunorreativas foram então visualizadas utilizando um kit de quimiluminescência (ECL).

5.4. Técnica de mancha de micção em papel de filtro

A técnica de mancha de micção em papel de filtro consiste na avaliação da função miccional utilizando um papel filtro. Os camundongos foram colocados individualmente em gaiolas vazias, forradas com papel de filtro qualitativo (250 g), durante 4 horas. Durante esse período, eles receberam comida, mas não água. Após quatro horas, os papéis de filtro foram removidos e secos naturalmente por 24 horas. Os ensaios foram realizados para cada animal entre 9h e 14h. As

imagens foram fotografadas utilizando transiluminação de luz UV e capturadas com o sistema ChemiDoc MP Image System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). O número de micções foi avaliado, e a área de micção foi quantificada utilizando o programa ImageJ (ImageJ Software, NIH, Maryland, EUA). Para a determinação do volume de micção, realizou-se uma curva de calibração com volumes conhecidos de urina aplicados no papel filtro, e os resultados foram relativizados com a área obtida. A análise de mancha de micção foi realizada em manchas maiores que 0,02 cm² para reduzir áreas de fluorescência inespecífica e artefatos que podem ter sido gerados por detritos e fezes (KEIL et al., 2016).

A análise foi conduzida 96 horas após a administração da primeira dose de PHZ ou solução salina para o grupo controle. Antes disso, os animais foram submetidos a um período de adaptação de três dias consecutivos. Durante esse período, os camundongos foram mantidos isolados em caixas individuais por quatro horas diárias.

5.5. Análise estatística

Foram apresentados os resultados de acordo com a média \pm erro padrão das médias (E.P.M.) de n experimentos indicados em cada caso. Foi utilizado o Teste t não-pareado de *Student* na comparação de dois grupos. Foram considerados significativos valores de $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Parâmetros hematológicos

Os camundongos tratados com PHZ apresentaram níveis significativamente reduzidos de hemácias (Figura 8A) e hemoglobina total (Figura 8B) em comparação com o grupo controle ($P < 0.05$). Além disso, houve um aumento acentuado nas concentrações plasmáticas de hemoglobina no grupo PHZ ($P < 0.05$) em comparação ao controle (Figura 8C), confirmando a ocorrência de hemólise intravascular.

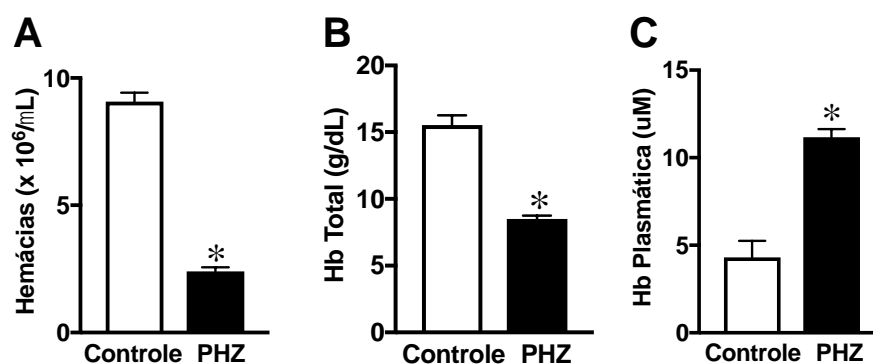


Figura 8. (A) Hemácias, (B) hemoglobina total e (C) hemoglobina plasmática. Os dados são apresentados como média \pm SEM de 5-7 camundongos por grupo. * $P < 0.05$, indicando uma diferença significativa em comparação com o grupo controle.

6.2. Caracterização do perfil de micção

A Figura 9A mostra exemplos de papel de filtro do grupo controle e PHZ. O grupo PHZ apresentou aumento significativo no número de micções em comparação com o grupo controle ($P < 0.05$) (Figura 9B). Os volumes totais de micção também foram significativamente maiores no grupo PHZ em comparação com o grupo controle ($P < 0.05$) (Figura 9C).

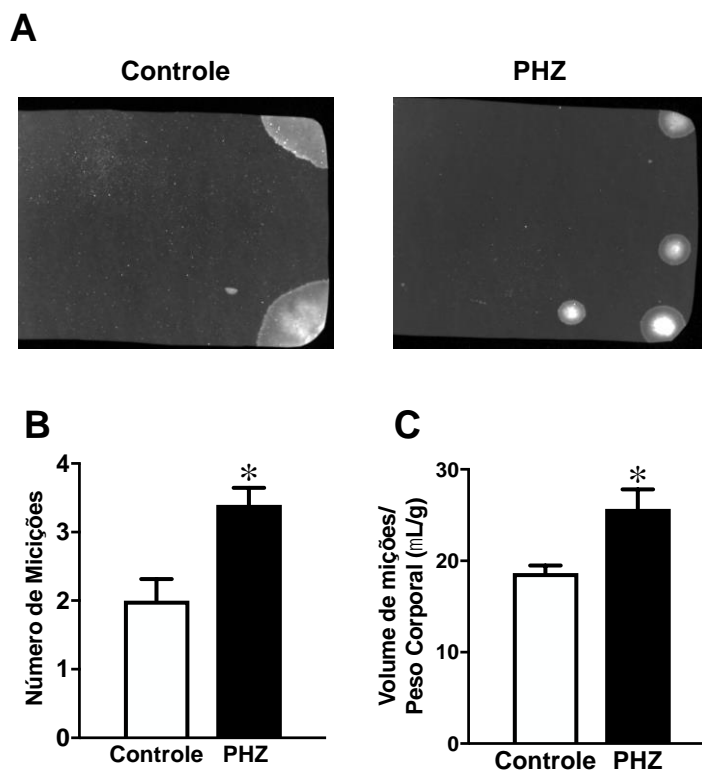


Figura 9. (A) Imagens representativas de mancha de micção em papel de filtro, (B) número de micções, (C) volume de micções normalizado pelo peso corporal. Os dados são apresentados como média \pm SEM de 5 camundongos por grupo. * $P < 0.05$, indicando uma diferença significativa em comparação com o grupo controle.

6.3. Contração de detrusor induzida pela EFS, carbacol, KCL e α - β -metileno-ATP: efeito da hemólise intravascular

A estimulação elétrica (EFS; 1-32 Hz) gerou contrações frequência-dependentes no músculo liso detrusor de camundongos controle e PHZ. No entanto, as contrações foram significativamente maiores ($P < 0.05$) nos camundongos PHZ em comparação com o grupo controle nas frequências de 4-32Hz (Figura 10).

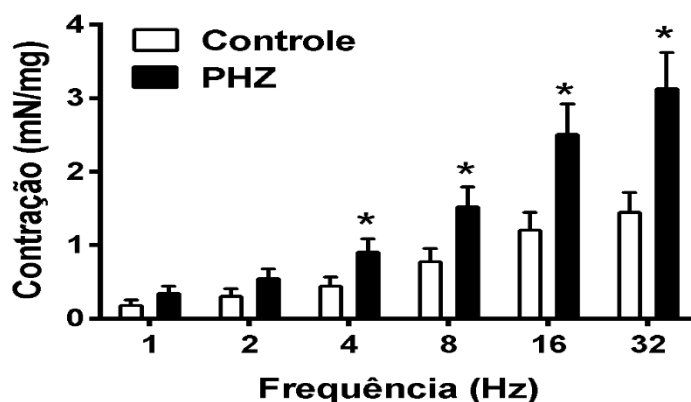


Figura 10. Contrações de detrusor em resposta à estimulação elétrica em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 6 animais. * $P < 0.05$, indicando uma diferença significativa em comparação com o grupo controle.

A contração ao carbacol foi analisada através da construção de curvas concentração-efeito a este agonista (10 nM – 100 μ M) em detrusor de camundongos PHZ e controle (Figura 11A). A resposta máxima (E_{max}) do carbacol foi significativamente maior ($P < 0.05$) no detrusor do grupo PHZ em comparação com o grupo controle (Figura 11B). Não houve alterações para os valores de potência (pEC_{50}) do carbacol entre o grupo controle e PHZ (Figura 11C).

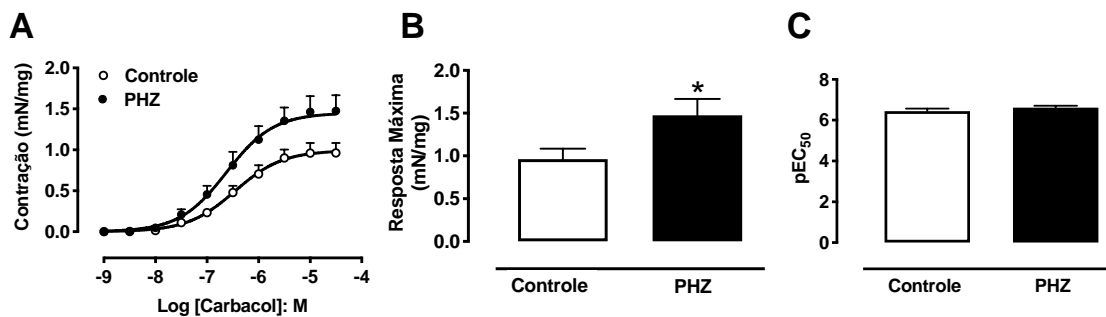


Figura 11. (A) Contrações de detrusor em resposta ao carbacol em camundongos controles e PHZ. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 6 animais. (B) Valores de resposta máxima e (C) potência (pEC_{50}) do carbacol. * $P < 0.05$, indicando uma diferença significativa em comparação com o grupo controle.

Nas curvas cumulativas de contração receptor-independente ao agente contrátil KCl também foram obtidas em tiras de detrusor isolado de camundongos PHZ e controles (Figura 12A). O KCl (1 – 300 mM) produziu contrações concentração-dependentes nos dois grupos, mas a resposta máxima (E_{max}) do KCl foi significativamente maior ($P < 0.05$) no detrusor do grupo PHZ quando comparado ao grupo controle (Figura 12B). Não houve alterações para os valores de potência (pEC_{50}) do KCl entre o grupo controle e PHZ (Figura 12C).

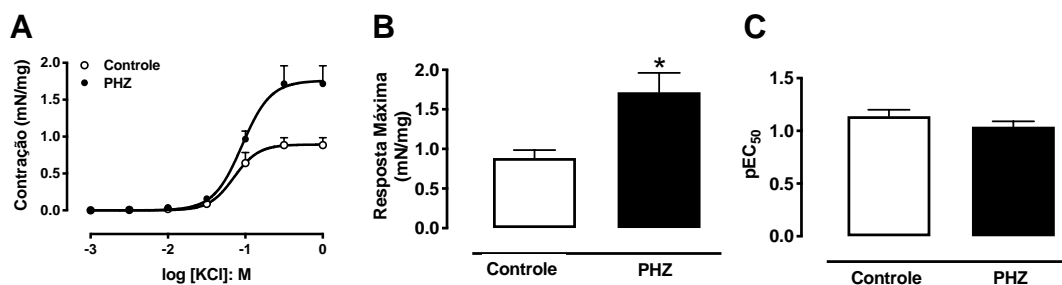


Figura 12. (A) Contrações de detrusor em resposta ao KCl em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais. (B) Valores de resposta máxima e (C) potência (pEC_{50}) do KCl. * $P < 0.05$, indicando uma diferença significativa em comparação com o grupo controle.

A contração ao α - β -metileno-ATP foi avaliada por meio da construção de curvas concentração-efeito não cumulativas (1 – 10 μ M) em detrusor de camundongos PHZ e controle (Figura 13). A resposta contrátil induzida pelo α - β -metileno-ATP se mostrou significativamente maior ($P < 0.05$) no detrusor do grupo PHZ em comparação ao grupo controle (Figura 13) em todas as concentrações estudadas.

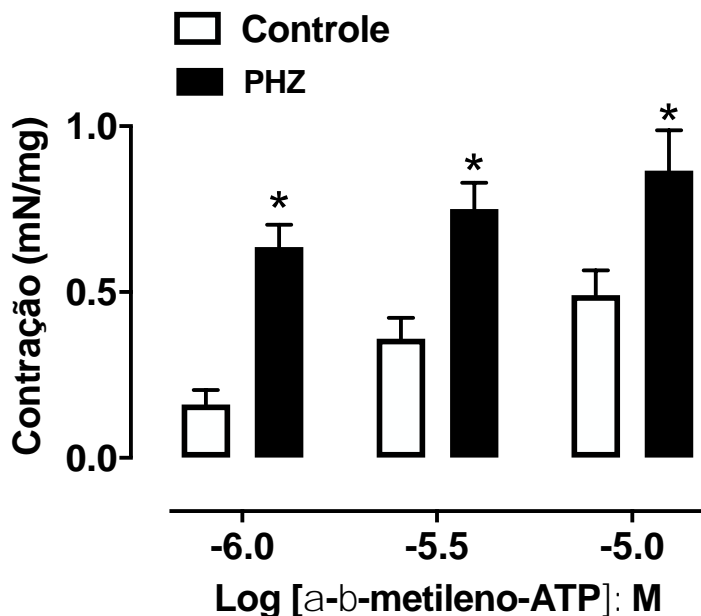


FIGURA 13. Contrações do detrusor em resposta ao α - β -metileno-ATP em camundongos controles e PHZ. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 6 animais. * $P < 0.05$, indicando uma diferença significativa em comparação com o grupo controle.

6.4. Relaxamento induzido pelo isoproterenol, mirabegron e nitroprussiato de sódio em detrusores de camundongos PHZ

O relaxamento induzido pelo isoproterenol foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito para este agonista (1 nM – 10 μ M) em detrusor de camundongos PHZ e controle (Figura 14A). Não houve alteração para os valores de resposta máxima (E_{max}) e potência (pEC_{50}) do isoproterenol entre o grupo controle e PHZ (Figura 14B e 14C, respectivamente).

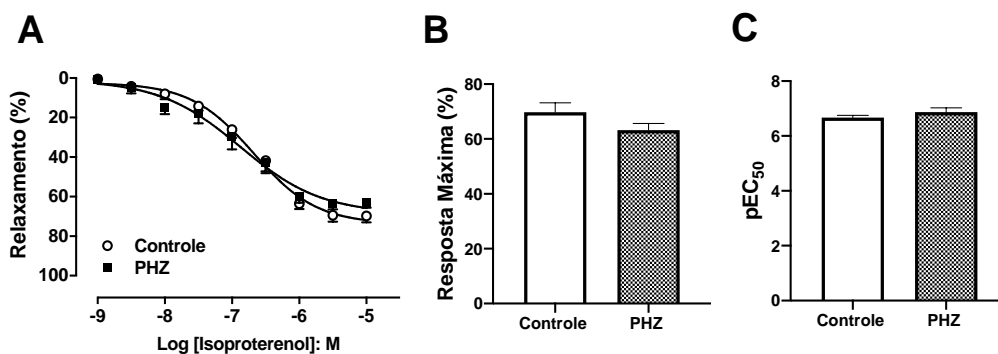


Figura 14. (A) Relaxamento de detrusor em resposta ao isoproterenol em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 6 animais. (B) Valores de resposta máxima (E_{max}) e (C) potência (pEC_{50}) do isoproterenol.

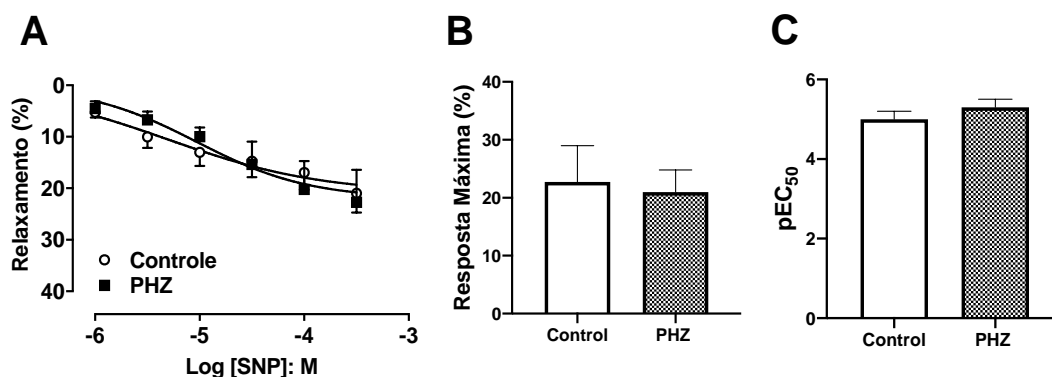


Figura 15. (A) Relaxamento de detrusor em resposta ao mirabegron em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais. (B) Valores de resposta máxima (E_{max}) e (C) potência (pEC_{50}) do mirabegron.

O relaxamento induzido pelo mirabegron foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito a este agonista (1 nM – 100 μ M) em detrusor de camundongos PHZ e controle (Figura 15A). Não houve alteração para os valores de resposta máxima (E_{max}) e potência (pEC_{50}) do mirabegron entre o grupo controle e PHZ (Figura 15B e 15C, respectivamente).

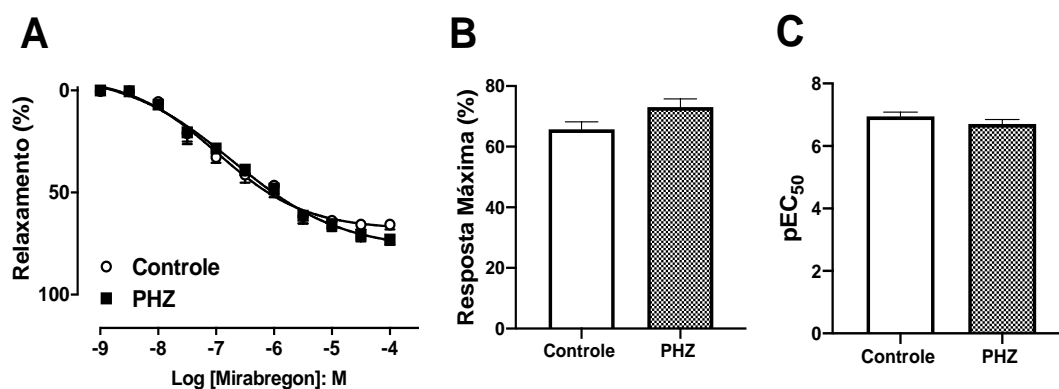


Figura 16. (A) Relaxamento de detrusor em resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) em camundongos controles e PHZ. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais. (B) Valores de resposta máxima (E_{max}) e (C) potência (pEC_{50}) do SNP.

O relaxamento induzido pelo SNP foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito a este agonista (1 – 300 μ M) em detrusor de camundongos PHZ e controle (Figura 16A).

Não houve alteração para os valores de resposta máxima (E_{max}) e potência (pEC_{50}) do SNP entre o grupo controle e PHZ (Figura 16B e 16C, respectivamente).

6.5. Expressão da p-eNOS (Ser-1177), p-nNOS (Ser-1417) e p-VASP (Ser-239) em detrusores de camundongos PHZ

A expressão proteica da p-eNOS (Ser-1177) (Figura 17A), p-nNOS (Ser-1417) (Figura 17B) e p-VASP (Ser-239) (Figura 17C) foi significativamente menor ($P < 0.05$) no detrusor do grupo PHZ em comparação com o grupo controle.

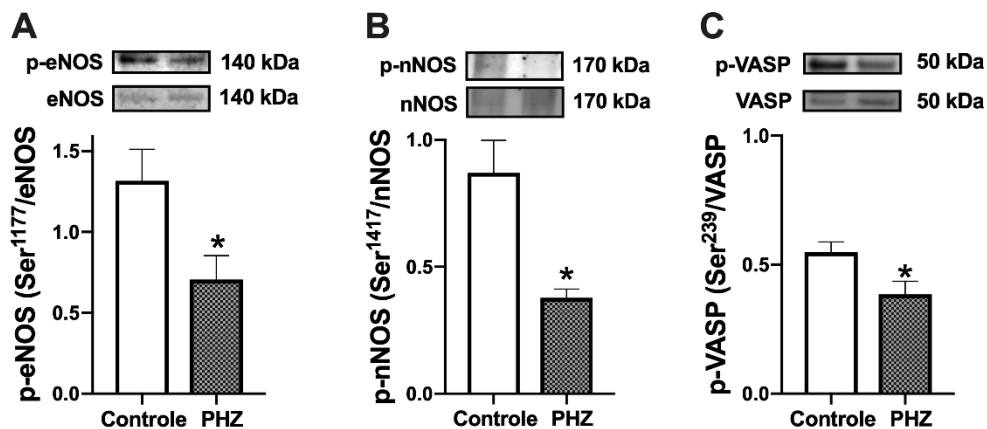


Figura 17. Expressão proteica da p-eNOS (Ser-1177), p-nNOS (Ser-1417) e p-VASP (Ser-239) no detrusor de camundongos controles e PHZ. Western blotting representativo e densitometria para (A) p-eNOS (Ser-1177), (B) p-nNOS (Ser-1417) e (C) p-VASP (Ser-239). Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 7 animais. * $P < 0.05$ comparado com o grupo controle. A densitometria das proteínas foi normalizada em relação à beta-actina.

6.6. Expressão da NOX-2, 3-NT e 4-HNE em detrusores de camundongos PHZ

A expressão proteica da NOX-2 (Figura 18A), 3-NT (Figura 18B) e 4-HNE (Figura 18C) foi significativamente maior ($P < 0.05$) no detrusor do grupo PHZ em comparação com o grupo controle.

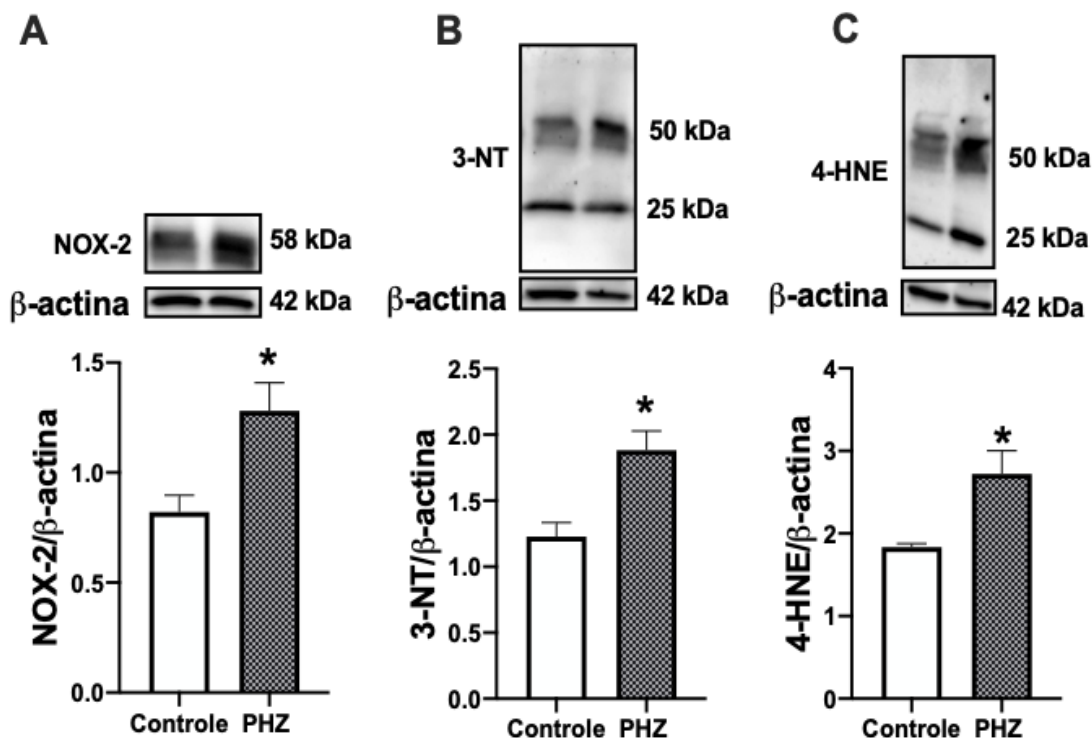


Figura 18. Expressão proteica da NOX-2, 3-NT e 4-HNE no detrusor de camundongos controles e PHZ. Western blotting representativo e densitometria para (A) NOX-2, (B) 3-NT e (C) 4-HNE. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 7 animais. * $P < 0.05$ comparado com o grupo controle. A densitometria das proteínas foi normalizada em relação à beta-actina.

7. DISCUSSÃO

Nossos resultados expandem o conhecimento atual sobre os efeitos da hemólise intravascular no trato geniturinário inferior. No presente estudo, a hemólise induzida pela PHZ em camundongos promoveu alterações hematológicas, semelhantes as observadas na AF. O aumento da frequência urinária e o aumento do volume urinário observado nos camundongos tratados com PHZ alinha-se com os sintomas de BH, sugerindo uma ligação entre a hemólise intravascular e a disfunção miccional. O aumento da contratilidade do músculo detrusor no grupo PHZ indica um impacto direto da hemólise intravascular nos mecanismos contráteis. A expressão diminuída de p-eNOS (Ser-1177), nNOS (Ser-1417) e p-VASP (Ser-239) na bexiga indica que a sinalização da via do NO está prejudicada. Além disso, o aumento da expressão de marcadores do estresse oxidativo na bexiga de camundongos tratados com PHZ reforçam o papel do estresse oxidativo na BH.

Um aspecto central na fisiopatologia da AF é a hemólise intravascular, onde o conteúdo dos glóbulos vermelhos, como hemoglobina, arginase e outros componentes celulares, é liberado no plasma (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). O modelo de hemólise intravascular induzida por PHZ em camundongos é amplamente utilizado para avaliar apenas os efeitos da hemólise intravascular (GOTARDO et al., 2023; HENRIQUE SILVA et al., 2018; VANNUCCHI et al., 2001). Nosso estudo corrobora achados anteriores e confirma que a hemólise intravascular induzida pela PHZ em camundongos levou a alterações hematológicas significativas, replicando o ambiente hemolítico observado na AF. A hemoglobina livre (HbFe^{2+}) no plasma ou espaço intersticial reage rapidamente com o NO, levando à produção de nitrato e à formação de metemoglobina (HbFe^{3+}), a forma oxidada da hemoglobina (REITER et al., 2002). Este processo reduz significativamente a biodisponibilidade do NO, contribuindo para danos teciduais (GLADWIN; KANIAS; KIM-SHAPIRO, 2012; KATO et al., 2018; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). Uma estratégia farmacológica eficiente que tem sido estudada para limitar os efeitos da hemoglobina envolve o tratamento com haptoglobina. Essa proteína plasmática liga-se à hemoglobina livre, formando um complexo que é eliminado da circulação pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial (BUEHLER; HUMAR; SCHAER, 2020).

O NO desempenha um papel importante na fisiologia do trato urinário inferior, sendo que sua biodisponibilidade reduzida está ligada à disfunção miccional. Estudos anteriores mostraram que a BH em camundongos com AF está associada à diminuição da expressão de eNOS e nNOS

fosforiladas em seus sítios regulatórios positivos Ser-1177 e Ser-1412, respectivamente (MUSICKI et al., 2019). Da mesma forma, em nosso estudo, camundongos tratados com PHZ também apresentaram redução na expressão de p-eNOS (Ser-1177) e p-nNOS (Ser-1417), sugerindo uma menor produção de NO na bexiga. O NO ativa a GCs no músculo liso, aumentando a produção de GMPc. O GMPc ativa a PKG, que fosforila a VASP no sítio Ser-239, um biomarcador confiável para monitorar a via NO-GMPc-PKG (FRANCIS et al., 2010; OELZE et al., 2000). Em nosso estudo, a expressão proteica para p-VASP (Ser-239) foi menor na bexiga do grupo PHZ, indicando níveis reduzidos de GMPc. Estudo prévio mostrou que camundongos deficientes para nNOS apresentam hipertrofia de bexiga e aumento da frequência urinária (BURNETT et al., 1997), enquanto ratos tratados cronicamente com inibidores de NOS desenvolvem um fenótipo de BH (MÓNICA et al., 2011, 2008). Alterações nos padrões de micção também foram relatadas em camundongos deficientes na proteína quinase I dependente de GMPc (PERSSON et al., 2000). Camundongos tratados com PHZ exibiram aumento na frequência urinária e volume urinário, resultados que estão alinhados com estudos com modelos animais deficientes para eNOS e nNOS e camundongos falciformes, (KARAKUS et al., 2019, 2020; MUSICKI et al., 2019), reforçando a importância da via do NO na função urinária.

A acetilcolina é o principal neurotransmissor excitatório nas terminações nervosas parassimpáticas do músculo liso detrusor, atuando principalmente através dos receptores M3 (ANDERSSON; ARNER, 2004). Além disso, o ATP, que é co-armazenado e co-liberado com a acetilcolina, também desempenha um papel importante na contração da bexiga mediada pelos nervos, contribuindo para a eliminação eficiente da urina (BURNSTOCK, 2011). Em nosso estudo, as contrações do detrusor induzidas pela EFS foram significativamente maiores no grupo PHZ. De maneira similar, as respostas do músculo liso detrusor aos agonistas dos receptores muscarínicos e purinérgicos (carbacol e α , β -metileno ATP, respectivamente), bem como ao agente independente do receptor, KCl, também foram aumentadas no grupo PHZ. Estes resultados sugerem que a hemólise intravascular resulta em hipercontratibilidade do detrusor. O aumento da contração do músculo detrusor é provavelmente decorrente da baixa acumulação de GMPc na bexiga, um conhecido segundo mensageiro que neutraliza os mecanismos contrácteis do músculo liso (MÓNICA; ANTUNES, 2018). Ratos tratados cronicamente com um inibidor não seletivo da NOS (L-NAME) apresentaram aumento da contração do detrusor induzida por agonistas de receptores muscarínico.

O aumento do estresse oxidativo, caracterizado pela produção elevada de EROs ou pela redução da capacidade antioxidante, está associado com o desenvolvimento de BH em modelos experimentais e participa da fisiopatologia da AF (AKAKPO; MUSICKI; BURNETT, 2017; ALEXANDRE et al., 2016, 2018; DE OLIVEIRA et al., 2022; SILVA et al., 2016; VONA et al., 2021). A NOX-2, uma isoforma da NADPH oxidase, catalisa a transferência de elétrons para o oxigênio, gerando ânion superóxido (VERMOT et al., 2021). O excesso de superóxido reage com o NO, produzindo peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio altamente tóxica (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). Estudos mostraram um aumento na expressão de NOX-2 em modelos animais de BH (AKAKPO; MUSICKI; BURNETT, 2017; ALEXANDRE et al., 2016, 2018; DE OLIVEIRA et al., 2022). No presente estudo, identificamos aumento na expressão de NOX-2 no grupo PHZ, juntamente com marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo, como 4-HNE e 3-NT. Estes resultados estão de acordo com estudo anterior, que também mostrou aumento na expressão de marcadores de estresse oxidativos/nitrosativo e NOX-2 no pênis de camundongos tratados com PHZ (IACOPUCCI et al., 2022). Pesquisa anterior indicou que a NOX-2 pode ser regulada negativamente por mecanismos dependentes de NO-GMPc (TEIXEIRA; PRIVIERO; WEBB, 2007). Por outro lado, o NO pode inibir a produção de ânion superóxido dependente da NADPH oxidase por um mecanismo independente de GMPc, sem alterar a expressão proteica da NOX-2 (SELEMIDIS et al., 2007). Neste contexto, é plausível que o aumento dos níveis de hemoglobina plasmática possa resultar em um aumento do estresse oxidativo através da redução da biodisponibilidade de NO e GMPc, conforme evidenciado pela redução de p-VASP (Ser-239).

Durante a fase de enchimento, o músculo liso detrusor relaxa devido à ação da noradrenalina, liberada pelas fibras simpáticas, que ativa os receptores β_3 adrenérgicos (FRY; VAHABI, 2016). Essa ativação estimula a via adenilato ciclase-AMPC-PKA, facilitando o relaxamento do detrusor (FRY; VAHABI, 2016). No nosso estudo, utilizamos o isoproterenol, um agonista não seletivo de receptores beta-adrenérgicos, e o mirabegron, um agonista seletivo de receptores β_3 adrenérgicos, para avaliar o relaxamento do músculo liso detrusor. Adicionalmente, empregamos o SNP, um doador exógeno de NO, para avaliar o relaxamento mediado pela via NO-GMPc. Observamos que o relaxamento induzido tanto pelos agonistas dos receptores β adrenérgicos quanto pelo SNP não foi alterado no grupo PHZ, sugerindo que a hemólise intravascular após 4 dias não afeta os mecanismos de relaxamento do detrusor. No entanto, estudos com hemólise intravascular crônica

são necessários para investigar os efeitos mais prolongados da hemólise intravascular sobre esses mecanismos de relaxamento.

8. CONCLUSÃO

A hemólise intravascular promove disfunção miccional devido a alterações na via de sinalização do NO na bexiga, evidenciada pelos níveis reduzidos de p-eNOS (Ser-1177), nNOS (Ser-1417) e p-VASP (Ser-239). O estudo também mostrou que a hemólise intravascular aumenta o estresse oxidativo na bexiga. Nosso estudo indica que a hemólise intravascular promove fenótipo de bexiga hiperativa semelhante aos observados em pacientes e camundongos com AF. Esses achados sugerem que intervenções farmacológicas direcionadas à hemólise intravascular podem melhorar a disfunção miccional na AF.

REFERÊNCIAS

ABREU-MENDES, P.; SILVA, J.; CRUZ, F. Pharmacology of the lower urinary tract: update on LUTS treatment. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 12, p. 1756287220922425, 2020.

AKAKPO, W.; MUSICKI, B.; BURNETT, A. L. cAMP-dependent regulation of RhoA/Rho-kinase attenuates detrusor overactivity in a novel mouse experimental model. **BJU international**, v. 120, n. 1, p. 143–151, jul. 2017.

ALEXANDRE, E. C. et al. Soluble guanylyl cyclase (sGC) degradation and impairment of nitric oxide-mediated responses in urethra from obese mice: reversal by the sGC activator BAY 60-2770. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 349, n. 1, p. 2–9, abr. 2014.

ALEXANDRE, E. C. et al. Chronic treatment with resveratrol improves overactive bladder in obese mice via antioxidant activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 788, p. 29–36, 15 jun. 2016.

ALEXANDRE, E. C. et al. Influence of the periprostatic adipose tissue in obesity-associated mouse urethral dysfunction and oxidative stress: Effect of resveratrol treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 836, p. 25–33, 5 out. 2018.

ANDERSSON, K.-E.; ARNER, A. Urinary Bladder Contraction and Relaxation: Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 935–986, 1 jul. 2004.

ANELE, U. A. et al. Overactive bladder in adults with sickle cell disease. **Neurourology and Urodynamics**, v. 35, n. 5, p. 642–646, jun. 2016.

BALKE, J. E.; ZHANG, L.; PERCIVAL, J. M. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) splice variant function: Insights into nitric oxide signaling from skeletal muscle. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 82, p. 35–47, 1 jan. 2019.

BIRDER, L. A. Urinary bladder, cystitis and nerve/urothelial interactions. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 182, p. 89–94, maio 2014.

BOLLA, S. R. et al. Histology, Bladder. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

BRYANT, C. E.; SYMMONS, M.; GAY, N. J. Toll-like receptor signalling through macromolecular protein complexes. **Molecular Immunology**, v. 63, n. 2, p. 162–165, fev. 2015.

BUEHLER, P. W.; HUMAR, R.; SCHAER, D. J. Haptoglobin Therapeutics and Compartmentalization of Cell-Free Hemoglobin Toxicity. **Trends in Molecular Medicine**, v. 26, n. 7, p. 683–697, jul. 2020.

BURNETT, A. L. et al. Urinary bladder-urethral sphincter dysfunction in mice with targeted disruption of neuronal nitric oxide synthase models idiopathic voiding disorders in humans. **Nature Medicine**, v. 3, n. 5, p. 571–574, maio 1997.

BURNSTOCK, G. Therapeutic potential of purinergic signalling for diseases of the urinary tract. **BJU international**, v. 107, n. 2, p. 192–204, jan. 2011.

CHENOU, F. et al. Effect of hydroxyurea therapy on intravascular hemolysis and endothelial dysfunction markers in sickle cell anemia patients. **Annals of Hematology**, v. 100, n. 11, p. 2669–2676, nov. 2021.

- CHESS-WILLIAMS, R. et al. Chronic psychological stress and lower urinary tract symptoms. **Lower Urinary Tract Symptoms**, v. 13, n. 4, p. 414–424, out. 2021.
- CITA, K.-C. et al. Men with Sick Cell Anemia and Priapism Exhibit Increased Hemolytic Rate, Decreased Red Blood Cell Deformability and Increased Red Blood Cell Aggregate Strength. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0154866, 2016.
- CLAUDINO, M. A. et al. Urinary Bladder Dysfunction in Transgenic Sick Cell Disease Mice. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0133996, 2015.
- CUI, X. et al. Cystitis-induced bladder pain is Toll-like receptor 4 dependent in a transgenic autoimmune cystitis murine model: a MAPP Research Network animal study. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 317, n. 1, p. F90–F98, 1 jul. 2019.
- DE OLIVEIRA, M. G. et al. Selective Pharmacological Inhibition of NOX2 by GSK2795039 Improves Bladder Dysfunction in Cyclophosphamide-Induced Cystitis in Mice. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 1, p. 92, 30 dez. 2022.
- DELESDERRIER, E. et al. Antioxidant nutrients and hemolysis in sickle cell disease. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 510, p. 381–390, nov. 2020.
- DI MASI, A. et al. Haptoglobin: From hemoglobin scavenging to human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 73, p. 100851, jun. 2020.
- DRAKE, M. J. et al. The potential role of unregulated autonomous bladder micromotions in urinary storage and voiding dysfunction; overactive bladder and detrusor underactivity. **BJU international**, v. 119, n. 1, p. 22–29, jan. 2017.
- EAPEN, R. S.; RADOMSKI, S. B. Review of the epidemiology of overactive bladder. **Research and Reports in Urology**, v. 8, p. 71–76, 6 jun. 2016.
- FIGUEIREDO, R. T. et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20221–20229, 13 jul. 2007.
- FRANCIS, S. H. et al. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 525–563, set. 2010.
- FRY, C. H.; MCCLOSKEY, K. D. Spontaneous Activity and the Urinary Bladder. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1124, p. 121–147, 2019.
- FRY, C. H.; VAHABI, B. The Role of the Mucosa in Normal and Abnormal Bladder Function. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 119 Suppl 3, n. Suppl 3, p. 57–62, out. 2016.
- GHOSH, S. et al. Extracellular heme crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 11, p. 4809–4820, nov. 2013.
- GLADWIN, M. T.; KANIAS, T.; KIM-SHAPIRO, D. B. Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1205–1208, abr. 2012.
- GOLDSTEIN, B. D.; ROZEN, M. G.; KUNIS, R. L. Role of red cell membrane lipid peroxidation in hemolysis due to phenylhydrazine. **Biochemical Pharmacology**, v. 29, n. 10, p. 1355–1359, 15 maio 1980.
- GOTARDO, É. M. F. et al. Molecular and cellular effects of in vivo chronic intravascular hemolysis and anti-inflammatory therapeutic approaches. **Vascular Pharmacology**, v. 150, p.

107176, jun. 2023.

HENRIQUE SILVA, F. et al. Impairment of Nitric Oxide Pathway by Intravascular Hemolysis Plays a Major Role in Mice Esophageal Hypercontractility: Reversion by Soluble Guanylyl Cyclase Stimulator. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 367, n. 2, p. 194–202, nov. 2018.

HOLSTEGE, G. How the Emotional Motor System Controls the Pelvic Organs. **Sexual Medicine Reviews**, v. 4, n. 4, p. 303–328, out. 2016.

HVIDBERG, V. et al. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2572–2579, 1 out. 2005.

IACOPUCCI, A. P. M. et al. Intravascular hemolysis leads to exaggerated corpus cavernosum relaxation: Implication for priapism in sickle cell disease. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 36, n. 10, p. e22535, out. 2022.

KARAKUS, S. et al. Urinary dysfunction in transgenic sickle cell mice: model of idiopathic overactive bladder syndrome. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 317, n. 3, p. F540–F546, 1 set. 2019.

KARAKUS, S. et al. NO-Releasing Nanoparticles Ameliorate Detrusor Overactivity in Transgenic Sickle Cell Mice via Restored NO/ROCK Signaling. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 373, n. 2, p. 214–219, 2020.

KATO, G. J. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2279–2285, 15 mar. 2006.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 4, p. 18010, 15 mar. 2018.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 1 mar. 2017.

KEIL, K. P. et al. Influence of animal husbandry practices on void spot assay outcomes in C57BL/6J male mice. **Neurourology and Urodynamics**, v. 35, n. 2, p. 192–198, fev. 2016.

KHAN, M. A. et al. Up-regulation of endothelin (ET(A) and ET(B)) receptors and down-regulation of nitric oxide synthase in the detrusor of a rabbit model of partial bladder outlet obstruction. **Urological Research**, v. 27, n. 6, p. 445–453, dez. 1999.

KRHUT, J. et al. Brain activity during bladder filling and pelvic floor muscle contractions: a study using functional magnetic resonance imaging and synchronous urodynamics. **International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association**, v. 21, n. 2, p. 169–174, fev. 2014.

LEE, W.-C. et al. Tadalafil ameliorates bladder overactivity by restoring insulin-activated detrusor relaxation via the bladder mucosal IRS/PI3K/AKT/eNOS pathway in fructose-fed rats. **Scientific Reports**, v. 11, p. 8202, 15 abr. 2021.

LEI, J. et al. Heme Causes Pain in Sickle Mice via Toll-Like Receptor 4-Mediated Reactive Oxygen Species- and Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Glial Activation. **Antioxidants &**

Redox Signaling, v. 34, n. 4, p. 279–293, 1 fev. 2021.

LEIRIA, L. O. et al. Insulin relaxes bladder via PI3K/AKT/eNOS pathway activation in mucosa: unfolded protein response-dependent insulin resistance as a cause of obesity-associated overactive bladder. **The Journal of Physiology**, v. 591, n. Pt 9, p. 2259–2273, 1 maio 2013.

LEIRIA, L. O. et al. The soluble guanylyl cyclase activator BAY 60-2770 ameliorates overactive bladder in obese mice. **The Journal of Urology**, v. 191, n. 2, p. 539–547, fev. 2014.

MERLE, N. S. et al. Characterization of Renal Injury and Inflammation in an Experimental Model of Intravascular Hemolysis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 179, 2018.

MICHEL, M. C.; CHAPPLE, C. R. Basic mechanisms of urgency: preclinical and clinical evidence. **European Urology**, v. 56, n. 2, p. 298–307, ago. 2009.

MÓNICA, F. Z. et al. Long-term administration of BAY 41-2272 prevents bladder dysfunction in nitric oxide-deficient rats. **Neurourology and Urodynamics**, v. 30, n. 3, p. 456–460, mar. 2011.

MÓNICA, F. Z.; ANTUNES, E. Stimulators and activators of soluble guanylate cyclase for urogenital disorders. **Nature Reviews. Urology**, v. 15, n. 1, p. 42–54, jan. 2018.

MÓNICA, F. Z. T. et al. Long-term nitric oxide deficiency causes muscarinic supersensitivity and reduces beta(3)-adrenoceptor-mediated relaxation, causing rat detrusor overactivity. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 8, p. 1659–1668, abr. 2008.

MUSICKI, B. et al. Dysregulated NO/PDE5 signaling in the sickle cell mouse lower urinary tract: Reversal by oral nitrate therapy. **Life Sciences**, v. 238, p. 116922, 1 dez. 2019.

NOLAN, V. G. et al. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3264–3267, 1 nov. 2005.

NOMIYA, M. et al. Increased bladder activity is associated with elevated oxidative stress markers and proinflammatory cytokines in a rat model of atherosclerosis-induced chronic bladder ischemia. **Neurourology and Urodynamics**, v. 31, n. 1, p. 185–189, jan. 2012.

NUR, E. et al. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. **American Journal of Hematology**, v. 86, n. 6, p. 484–489, jun. 2011.

OELZE, M. et al. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. **Circulation Research**, v. 87, n. 11, p. 999–1005, 24 nov. 2000.

O'NEILL, L. A. J.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews. Immunology**, v. 7, n. 5, p. 353–364, maio 2007.

PACE, B. S.; STARLARD-DAVENPORT, A.; KUTLAR, A. Sickle cell disease: progress towards combination drug therapy. **British Journal of Haematology**, v. 194, n. 2, p. 240–251, jul. 2021.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, jan. 2007.

PEREIRA, P. DA S. et al. Haptoglobin treatment contributes to regulating nitric oxide signal and reduces oxidative stress in the penis: A preventive treatment for priapism in sickle cell disease. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 961534, 2022.

- PERSSON, K. et al. Functional characteristics of urinary tract smooth muscles in mice lacking cGMP protein kinase type I. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 3, p. R1112-1120, set. 2000.
- PICCIN, A. et al. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. **European Journal of Haematology**, v. 102, n. 4, p. 319–330, abr. 2019.
- PINTO, V. M. et al. Sickle cell disease: a review for the internist. **Internal and Emergency Medicine**, v. 14, n. 7, p. 1051–1064, out. 2019.
- PORTOCARRERO, M. L. et al. Prevalence of Enuresis and Daytime Urinary Incontinence in Children and Adolescents With Sickle Cell Disease. **The Journal of Urology**, v. 187, n. 3, p. 1037–1040, mar. 2012.
- QUAGHEBEUR, J. et al. The innervation of the bladder, the pelvic floor, and emotion: A review. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 235, p. 102868, nov. 2021.
- REITER, C. D. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1383–1389, dez. 2002.
- SELEMIDIS, S. et al. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 2, p. 349–358, 15 jul. 2007.
- SILVA, C. S. et al. Luts-V: A new simplified score for assessing lower urinary tract symptoms in men. **International Braz J Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 47, n. 3, p. 525–532, 2021.
- SILVA, F. H. et al. Beneficial Effect of the Nitric Oxide Donor Compound 3-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)Benzyl Nitrate on Dysregulated Phosphodiesterase 5, NADPH Oxidase, and Nitrosative Stress in the Sickle Cell Mouse Penis: Implication for Priapism Treatment. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 359, n. 2, p. 230–237, nov. 2016.
- SMITH, A.; MORGAN, W. T. Haem transport to the liver by haemopexin. Receptor-mediated uptake with recycling of the protein. **The Biochemical Journal**, v. 182, n. 1, p. 47–54, 15 jul. 1979.
- SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Pathology**, v. 14, p. 263–292, 24 jan. 2019.
- SZASZ, T. et al. Toll-Like Receptor 4 Activation Contributes to Diabetic Bladder Dysfunction in a Murine Model of Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 65, n. 12, p. 3754–3764, dez. 2016.
- TEIXEIRA, C. E.; PRIVIERO, F. B. M.; WEBB, R. C. Effects of 5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine (BAY 41-2272) on Smooth Muscle Tone, Soluble Guanylyl Cyclase Activity, and NADPH Oxidase Activity/Expression in Corpus Caverosum from Wild-Type, Neuronal, and Endothelial Nitric-Oxide Synthase Null Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 3, p. 1093–1102, 9 jan. 2007.
- TENOPOULOU, M.; DOULIAS, P.-T. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. **F1000Research**, v. 9, p. F1000 Faculty Rev-1190, 2020.
- TYAGI, P. et al. Pathophysiology and animal modeling of underactive bladder. **International**

Urology and Nephrology, v. 46 Suppl 1, n. 0 1, p. S11-21, set. 2014.

VANNUCCHI, A. M. et al. Accentuated response to phenylhydrazine and erythropoietin in mice genetically impaired for their GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). **Blood**, v. 97, n. 10, p. 3040–3050, 15 maio 2001.

VERMOT, A. et al. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 6, p. 890, 1 jun. 2021.

VONA, R. et al. Sickle Cell Disease: Role of Oxidative Stress and Antioxidant Therapy. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 296, fev. 2021.

WILLIAMS, T. N.; THEIN, S. L. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 19, p. 113–147, 31 ago. 2018.

YAMAGUCHI, O.; NOMIYA, M.; ANDERSSON, K.-E. Functional consequences of chronic bladder ischemia. **Neurourology and Urodynamics**, v. 33, n. 1, p. 54–58, jan. 2014.