

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE GLICOSAMINOGLICANOS E
EXPRESSÃO DE PEQUENOS PROTEOGLICANOS RICOS EM
LEUCINA APÓS CISTOTOMIA EM BEXIGAS SAUDÁVEIS VERSUS
PARCIALMENTE OBSTRUÍDAS.

NATÁLIA CAROLINE NALESSO DE CASTRO

BOTUCATU-SP
JUNHO/2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE GLICOSAMINOGLICANOS E
EXPRESSÃO DE PEQUENOS PROTEOGLICANOS RICOS EM
LEUCINA APÓS CISTOTOMIA EM BEXIGAS SAUDÁVEIS VERSUS
PARCIALMENTE OBSTRUÍDAS.

NATÁLIA CAROLINE NALESSO DE CASTRO

Dissertação para o título de Mestre no Programa de Biotecnologia
Animal apresentada junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

Orientadora: Profa. Dra. Juliany Gomes Quitzan

Botucatu, SP
Junho/2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Castro, Natália Caroline Nalesso de.

Suplementação oral de glicosaminoglicanos e expressão de pequenos proteoglicanos ricos em leucina após cistotomia em bexigas saudáveis versus parcialmente obstruídas / Natália Caroline Nalesso de Castro. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Juliany Gomes Quitzan

Capes: 50501003

1. Bexiga. 2. Colágeno. 3. Glicosaminoglicanos. 4. Imunofluorescência. 5. Proteoglicanos pequenos ricos em leucina.

Palavras-chave: Bexiga; Colágeno; Glicosaminoglicanos; Imunofluorescência; Pequenos Proteoglicanos Ricos em Leucina.

Nome do autor: NATÁLIA CAROLINE NALESSO DE CASTRO

Título: Suplementação oral de Glicosaminoglicanos e expressão de pequenos proteoglicanos ricos em leucina após cistotomia em bexigas saudáveis ou parcialmente obstruídas.

DISSERTAÇÃO AVALIADA EM: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliany Gomes Quitzan
Presidente e Orientadora
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
Fmvz Unesp Botucatu

Prof. Ass. Dr. Hamilto Akihissa Yamamoto
Departamento de Urologia
FMB Unesp Botucatu

Prof. Dr. Victor José Vieira Rosseto
Departamento Cirurgia e Anestesiologia
Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP). São José do Rio Preto

Agradecimento

Agradeço a todos que nos ajudaram nessa etapa, sem um trabalho em equipe esta etapa não seria possível de ser realizada. Agradeço a minha família, meu marido, a minha orientadora, aos alunos de pós-graduação e graduação que nos ajudaram nessa empreitada, aos meus colegas de trabalho e amigos. Sem vocês nada seria possível.

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1.....	Página 8
2 REVISÃO DE LITERATURA	Página 10
2.1 Micção e estrutura vesical	Página 10
2.2 Alterações estruturais e reflexo na dinâmica miccional	Página 11
2.3 Pequenos proteoglicanos ricos em leucina e seu papel na fibrose.....	Página 13
3 OBJETIVO.....	Página15
3.1 Objetivos específicos	Página 15
4 Referências.....	Página 16
5- Capítulo 2.....	Página 21
Artigo Científico.....	Página 21

Castro, N.C.N., Suplementação oral de Glicosaminoglicanos e expressão de pequenos proteoglicanos ricos em leucina após cistotomia em bexigas saudáveis versus parcialmente obstruídas. Botucatu, 2018. 47 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

RESUMO

A diminuição da complacência da bexiga está relacionada com modificações no equilíbrio dos componentes da matriz extracelular e na concentração das fibras de colágeno, acarretando em espessamento da parede vesical e fibrose. O objetivo do estudo é analisar a relação entre suplementação oral dos glicosaminoglicanos (GAGs), distribuição de pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SRLPs) e síntese de colágeno em bexigas saudáveis e fibrosadas por obstrução parcial submetidas a cistotomia. Foram utilizados 56 ratos da linhagem Wistar, fêmeas, divididos em cinco grupos experimentais- G1 (8) – controle, sem procedimento, G2 (12) – animais não suplementados, submetidos ao procedimento de obstrução vesical e posterior cistotomia, G3 (12) – animais suplementados e submetidos ao procedimento de obstrução vesical e posterior cistotomia, G4 (12) – animais não suplementados e submetidos ao procedimento de cistotomia e G5 (12) animais suplementados e submetidos ao procedimento de cistotomia. A suplementação de glicosaminoglicanos foi realizada a cada 24 horas por via oral durante 28 dias pós cistotomia, quando então os animais foram eutanasiados. O colágeno foi avaliado pela Microscopia Cars e biglican, decorina, lumican e fibromodulina pelo método de imunofluorescência. Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA e T-STUDENT, com nível de significância $p < 0,05$. Os animais dos grupos G2 e 3 foram os que apresentaram diferença estatística na seguinte constante: peso bexiga final /peso rato final, com o todos os grupos. A quantificação da imunomarcagem da imunofluorescência foi avaliada com auxílio do software ImageJ, houve maior expressão no grupo G3 de todos os SRLPs, não havendo diferença estatística nos demais grupos. Na microscopia Cars (Coherent anti-Stokes Raman Scattering), houve diminuição do sinal de colágeno nos grupos G2 e 3. Concluímos que o aumento global dos proteoglicanos se deve ao tratamento com os GAGs durante 28 dias por via oral associado também a presença de fibrose tecidual. Ainda, não foi observado diferença aparente quanto ao colágeno após tratamento com os GAGs, no entanto, a obstrução uretral parcial leva a alteração do colágeno no tecido vesical.

Palavras-chave: pequenos proteoglicanos ricos em leucina, glicosaminoglicanos, colágeno, bexiga, obstrução vesical parcial, microscopia cars, imunofluorescência.

Castro, N.C.N.,. Oral Glycosaminoglycan Supplementation and Small Rich Leucine Proteoglycans expression after cystotomy in healthy bladder versus partial bladder outlet obstruction. Botucatu, 2018. 47 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

Decreased bladder compliance is related with changes in the extracellular matrix components and collagen fibers concentration resulting in bladder wall thickening and fibrosis. The purpose of the study is the evaluation of the relationship between oral glycosaminoglycans (GAGs) supplementation, small rich-leucine proteoglycans distribution and collagen synthesis in healthy and fibrous bladder by partial obstruction after cystotomy procedure. Fifty-six female Wistar rats were divided into five experimental groups: G1 (8) – control, without procedure, G2 (12) – not supplemented animals, subjected to bladder obstruction procedure and after cystotomy, G3 (12) – supplemented animals subjected to bladder obstruction procedure and after cystotomy, G4 (12) – not supplemented animals subjected to cystotomy procedure and G5 (12) supplemented animals subjected to cystotomy procedure. Oral GAGs supplementation was done each 24 hours during 28 days after cystotomy, when we performed euthanasia. Collagen was evaluated by CARS (Coherent anti-Stokes Raman Scattering) microscopy and byglycan, decorin, lumican and fibromodulin by immunofluorescent method. Statistical analysis results were done by ANOVA and T-STUDENT test with a significance level of $p < 0,05$. G2 and 3 groups showed statistical difference on follow constant: bladder final weight/ rat final weight $\times 100$. Immunofluorescent staining was measured by Image J software and there was statistical difference in all SRLPs on G3 group. Cars microscopy showed diminish of collagen signal on G2 and 3 groups. We concluded global increased of SRLPS are associated with GAGs supplementation for 28 days and tissue fibrosis. There wasn't clearly modification on bladder collagen with supplementation, however partial bladder outlet causes bladder tissue changes.

Key words: small leucine rich proteoglycans, glycosaminoglycans, collagen, bladder, partial bladder outlet obstruction, Cars microscopy, immunofluorescence.

1. CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A diminuição da complacência vesical pode ser observada em pacientes com válvula de uretra posterior, mielomeningocele e demais pacientes com bexiga neurogênica (retenção urinária), hipertrofia prostática, obstrução uretral parcial ou estenose por diferentes etiologias (AL-SAIKAN et al., 2015; SHEN et al., 2015). O aumento da pressão intravesical resulta em significativa morbidade, uma vez que pode contribuir para a etiologia do refluxo vesicoureteral, litíase, hidronefrose e, por fim, falência renal (EWALT et al., 1992; METCALFE et al., 2010; PASTELÍN et al., 2012).

As propriedades mecânicas de bexigas pouco complacentes encontram-se comprometidas devido a mudanças na arquitetura estrutural e no equilíbrio dos componentes da matriz extracelular (MEC) (KIM et al., 2000; SHEN et al., 2015). A via final comum destas alterações é o espessamento da parede vesical e fibrose (METCALFE et al., 2010). Modificações tanto na concentração de colágeno quanto na relação de fibras tipo I e III estão diretamente relacionadas com baixa complacência e comprometimento da função de armazenamento de urina (DEVEAUD et al., 1998; FOUAD et al., 2009; KIM et al., 2000; RODRÍGUEZ et al., 2004).

A necessidade de intervenções cirúrgicas em bexigas com estas características é frequente e representa um desafio ao cirurgião. A reparação tecidual em uma bexiga estruturalmente alterada pode não só ser insuficiente para garantir a qualidade da cicatrização como exacerbar a fibrose pré-existente (PAUL et al., 2014).

Muitas investigações sobre os mecanismos patofisiológicos e fases da evolução da fibrose, bem como das ações de cada fator que participa de sua formação têm sido desenvolvidas e possuem relevante papel em futuras propostas terapêuticas que possam interferir na morbidade causada por este processo (KRYCZKA; BONCELA, 2015; WIGHT; POTTER-PERIGO, 2011). Neste sentido, destacam-se pesquisas que objetivam avaliar a ação dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs – do inglês small leucine-rich proteoglycans) e ocorrência de fibrose em diferentes órgãos (BAGHY et al.,

2012; KAYA et al., 2017; MACIEJEWSKI et al., 2012; METCALFE et al., 2010; NASTASE, et al., 2014). Estes proteoglicanos regulam diversos processos biológicos e patofisiológicos, dentre eles a fibrillogênese de colágeno. SLRPs classe I (decorina e biglican) e classe II (lumican e fibromodulina) estão diretamente envolvidos na regulação da síntese, diâmetro e organização estrutural de fibras colágenas no tecido, tendo também participação ativa na reparação tecidual (CHEN; BIRK, 2013; TRABUCCO et al., 2007).

A estrutura básica dos proteoglicanos envolve cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) ligadas covalentemente ao cerne proteico e encontram-se amplamente distribuídos na MEC. Durante a biossíntese, GAGs sulfatados incluindo sulfato de condroitina, sulfato de dermatan e sulfato de queratan são diferencialmente sintetizados e modificados, podendo afetar a dinâmica estrutural e funcional dos SLRPs (CHEN; BIRK, 2013; KALAMAJSKI; OLDBERG, 2010; TRABUCCO et al., 2007).

A administração local e sistêmica de GAGs tem sido estudada em enfermidades inflamatórias vesicais. O foco de avaliação dos GAGs concentra-se na sua ação direta no urotélio, uma vez que participam do mecanismo de proteção da mucosa e sua diminuição está correlacionada com os quadros de infecção de trato urinário inferior (ITUI) recorrente, justificando maior número de trabalhos com uso intravesical destes compostos (CICIONE et al., 2014; DAMIANO; CICIONE, 2011; DOWNEY; PAHUJA, 2015; LUCON et al., 2014; SCHWALENBERG et al., 2015; SOBOLEV, 2012)). Adicionalmente, a administração oral de uma formulação contendo diferentes GAGs mostrou resultados promissores em ensaios clínicos (PANCHAPHANPONG et al., 2011; THEOHARIDES et al., 2008; THEOHARIDES; SANT, 2005) e experimentais (SOBOLEV, 2012).

Até o momento, poucos estudos destinaram-se a avaliar o papel dos SLRPs em afecções vesicais (KAYA et al., 2017; MACIEJEWSKI et al., 2012; MACIEJEWSKI et al., 2015; NIEDWOROK et al., 2013). E, apesar dos GAGs participarem da constituição dos proteoglicanos, incluindo SLRPs, pesquisas objetivando observar a relação entre suplementação de GAGs, ação dos SLRPs e disposição de fibras colágenas nas diferentes camadas não tem sido conduzidas, seja em bexigas integras ou estruturalmente alteradas.

Motivados por esta lacuna literária, nos propusemos a avaliar se há relação entre a suplementação oral dos GAGs e distribuição destes proteoglicanos na cicatrização de bexigas íntegras e fibrosadas por obstrução parcial.

2 Revisão de literatura

2.1 Micção e estrutura vesical

A micção pode ser definida como um fenômeno fisiológico em que, após a distensão gradual da bexiga, desencadeia-se a contração do músculo detrusor e o relaxamento do esfíncter uretral, levando à expulsão do seu conteúdo (DE GROAT et al., 2014). O detrusor, músculo liso vesical é considerado o componente primário da micção. Um dos estímulos mais importantes para a contração do músculo liso é a sua sensibilidade ao estiramento. Se o estiramento é grande, a rápida entrada de sódio e cálcio na célula pode ser suficiente para despolarizá-la e iniciar o potencial de ação. Ao cessar o estímulo de estiramento, o músculo retorna ao seu estado de repouso (DE GROAT et al., 2014; ELBADAWI, 1996). Embora as células individuais possam se contrair espontaneamente, a contração coordenada da bexiga como um todo requer ativação do sistema nervoso autônomo (BYRON, 2015).

Cada nervo da parede da bexiga inerva muitas células musculares, mas nem todas têm inervação direta (CHANCELOT; YOSHILURA, 2002). Portanto, a comunicação entre as células também é fundamental para garantir o comportamento contrátil da bexiga (WOLBURG et al., 2002; ZHOU et al., 2016).

As junções GAP e o colágeno, presentes entre as fibras musculares têm papel essencial na sincronização desta comunicação intercelular, permitindo a difusão do estímulo excitatório e transmissão da força de contração (LANE, 1995; OKINAMI et al., 2014). O colágeno possui ainda a importante função de manutenção da complacência vesical adequada (OKINAMI et al., 2014).

O epitélio vesical é um dos mecanismos de defesa local do hospedeiro contra agressões ao trato urinário. Ele é revestido por uma espessa camada de glicosaminoglicanos, os quais atuam como um fator antiaderente e de defesa contra a infecção e fatores irritantes encontrados na urina, como ureia e potássio

(LAZZERI et al., 2016). Estudos conduzidos em mulheres demonstraram que há diminuição na quantidade de glicosaminoglicanos eliminados pela urina em indivíduos com cistite (LUCON et al., 2014).

Os glicosaminoglicanos são classificados em duas categorias: não sulfatados, como o ácido hialurônico, e sulfatados, que são sulfato de condroitina, sulfato de dermatan, sulfato de queratan e sulfato de heparan (DAMIANO; CICIONE, 2011). A atividade biológica da barreira de GAGs é gerada devido à carga aniônica dos polissacarídeos que compõem os glicosaminoglicanos (JANSSEN et al., 2013). Eles são hidrofílicos e estão aderidos a superfície de células de transição da bexiga. A afinidade por moléculas de água cria uma barreira, a qual previne a migração de substâncias da urina para o epitélio. Ainda, a atividade dos GAGs está relacionada à inibição da adesão de cristais e bactérias (COSTANTINI et al., 2013).

2.2 Alterações estruturais e reflexo na dinâmica miccional

Há evidências de que defeitos na camada de GAGs da bexiga podem estar associados ao aumento na absorção de ureia e potássio pela parede vesical além do desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas vesicais, infecções recorrentes do trato urinário, urolitíases e cistite intersticial (LAZZERI et al., 2016; LUCON et al., 2014). Quadros inflamatórios crônicos bloqueiam a reparação espontânea de GAGs via secreção pelas células epiteliais e há alteração na sensibilidade dos receptores neurais, levando a possibilidade de dor neuropática crônica (BASSI et al., 2011).

O estímulo para estudos de novas propostas terapêuticas que possam ser inseridas no tratamento das inflamações e infecções vesicais pode ser notado em inúmeros relatos com uso de terapias alternativas envolvendo administração local e sistêmica de GAGs. Um estudo realizado em mulheres com diagnóstico de infecção do trato urinário recorrente ou cistite intersticial, comparou o tempo de recorrência da infecção, confirmado através de exame bacteriológico de urina, entre grupos submetidos à injeção intravesical de ácido hialurônico e sulfato de condroitina e que receberam tratamento profilático com antimicrobianos ou probióticos. Os resultados demonstraram que a instilação intravesical de ácido hialurônico e sulfato de condroitina apresentam potencial

para a redução da incidência da recorrência da infecção do trato urinário inferior. (CIANI et al., 2016).

O foco de avaliação dos GAGs concentra-se na sua ação direta no urotélio, justificando maior número de trabalhos envolvendo uso intravesical que oral destes compostos. No entanto, em um estudo envolvendo 37 mulheres diagnosticadas com cistite intersticial, submetidas à administração oral de uma formulação contendo diferentes GAGs, durante seis meses, os resultados demonstraram melhora dos sinais de urgência de micção, disúria, hematúria em mais de 60% das mulheres avaliadas (THEOHARIDES, et al. , 2005). Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores, 252 pacientes, dentre eles 25 homens e 227 mulheres, também com o diagnóstico de cistite intersticial, foram submetidos a administração oral da mesma formulação de glicosaminoglicanos durante doze meses. Houve melhora significativa na sintomatologia clínica (avaliação realizada por meio de escala visual global de sintomas) em 51,8% dos homens e 48,8% das mulheres envolvidas no estudo (THEOHARIDES et al., 2008).

Similar ao que é observado na mulher, há grande ocorrência de cistite em felinos e alguns estudos nesta espécie também são apresentados na literatura. Em um estudo conduzido em gatos com cistite intersticial que receberam glicosaminoglicanos via oral durante 28 dias, verificou que a terapia oral promoveu aumento na concentração urinária de glicosaminoglicanos, bem como aumento da concentração plasmática de tal substância. Em análise subjetiva realizada pelos tutores, foi relatada melhora da hematúria apresentada por esses animais bem como na dificuldade e sensibilidade dolorosa durante a micção (PANCHAPHANPONG et al., 2011).

A preservação da função da barreira urotelial é sem dúvida relevante para manutenção da dinâmica miccional. No entanto, a integridade estrutural vesical e a ação neurológica coordenada deste órgão são fundamentais para garantir que as funções de armazenamento e eliminação da urina sejam executadas (CRUZ et al., 2014).

Afecções em que há diminuição da complacência vesical resultam em significativa morbidade, pois comprometem uma das principais funções da bexiga – armazenamento de urina a baixas pressões. Este quadro é observado em pacientes com válvula de uretra posterior, mielomeningocele, bexiga

neurogênica, obstrução uretral parcial ou estenose por diferentes etiologias (AL-SAIKAN et al., 2015; SHEN et al., 2015).

Os efeitos que a obstrução parcial uretral, independentemente de sua etiologia, causam na bexiga são divididos em duas fases (KAYA et al., 2017). Na fase compensatória, apesar do aumento de massa vesical, a contratilidade é preservada (SHEN et al., 2015). Já na fase descompensatória, a massa vesical continua a aumentar, porém as funções de contratilidade e esvaziamento da bexiga estão comprometidas, o final dessa fase é caracterizado pela fibrose da parede vesical, acarretando em baixa complacência e menor capacidade de armazenamento (AL-SAIKAN et al., 2015; KAYA et al., 2017; KIM et al., 2000).

A fibrose caracteriza-se pela síntese aumentada ou deficiência de *turnover* de colágeno, considerado o maior constituinte da matriz extracelular. Modificações tanto na sua concentração, quanto na relação de fibras tipo I e III estão diretamente relacionadas com baixa complacência e comprometimento da função de armazenamento de urina (RODRÌGUEZ et al., 2004). O aumento da pressão intravesical pode contribuir para a etiologia do refluxo vesicoureteral, cálculo, hidronefrose e, por fim, falência renal (AL-SAIKAN et al., 2015; EWALT et al., 1992).

O esvaziamento vesical também encontra-se prejudicado nestas bexigas, uma vez que o colágeno em excesso afeta as propriedades contráteis da musculatura detrusora. O volume residual reflete a inadequada capacidade de esvaziamento e o risco de infecção torna-se comumente um ciclo vicioso nestes pacientes (BYRON, 2015).

2.3 Pequenos proteoglicanos ricos em leucina e seu papel na fibrose

Os pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs) são moléculas compostas por uma proteína central e cadeias de GAGs, que estão amplamente distribuídas na MEC (TRABUCCO et al., 2007). Estes proteoglicanos regulam diversos processos biológicos e patofisiológicos, dentre eles a fibrillogênese de colágeno. Durante a biossíntese, GAGs sulfatados incluindo sulfato de condroitina, sulfato de dermatan e sulfato de queratan são diferencialmente sintetizados e modificados, podendo afetar a dinâmica estrutural e funcional dos SLRPs. Os SLRPs classe I (decorina e biglican) e classe II (lumican e

fibromodulina) estão diretamente envolvidos na regulação da síntese, diâmetro e organização estrutural de fibras colágenas no tecido. Além disso, estes proteoglicanos também tem importante papel na sinalização e regulação imunológica (CHEN; BIRK, 2013; TRABUCCO et al., 2007).

Estudos mostram que ratos com deficiência de SLRPs exibem fenótipos que são consistentes com disfunção da MEC em tecidos conectivos, como osso, cartilagem e tecidos não conectivos, como fígado e útero. Isto comprova que a dinâmica interação entre SLRPs, células e MEC provê uma diversidade de funções teciduais específicas que garantem a homeostase estrutural e funcional do tecido. Decorina, biglican, lumican e fibromodulina são considerados pontos-chaves na regulação das fibras de colágeno, e sua atividade pode variar de acordo com a região de ligação com o colágeno e o tipo de tecido alvo (CIFTCILER et al., 2017; KALAMAJSKI et al., 2016). Decorina tem sido associada ainda com atividade antifibrótica e antitumoral em desordens renais e pulmonares, assim como biglican pode modular o processo inflamatório destes órgãos. A ação antifibrótica da decorina em fígados cirróticos foi relacionada com a inibição de TGF β , uma das mais potentes citocinas pró-fibróticas. Apesar dos mecanismos não completamente esclarecidos, estes autores sugerem que a decorina atua como um bloqueador endógeno de TGF β contra fibrose (BAGHY et al., 2012; NASTASE et al., 2014). Já biglican atua na formação da fibra colágena, bem como, na regulação da atividade das citocinas na patogênese da fibrose, sendo objeto de estudo o aumento da sua concentração sérica dos pacientes como marcador de fibrose hepática (CIFTCILER et al., 2017). Da mesma forma, aumento da expressão de lumican e fibromodulina está sendo associado a quadros de fibrose hepática e pulmonar (KALAMAJSKI et al., 2016; KRISHNAN et al., 2012; MORMONE et al., 2012).

A atividade dos proteoglicanos e sua interação com o colágeno em bexigas alteradas pode dar subsídios à investigação de propostas terapêuticas que visem minimizar a sequência de eventos deletérios que se instalam nestes pacientes. Porém, poucos estudos destinaram-se a avaliar o papel dos SLRPs em afecções vesicais. Em um estudo realizado em 2012 (MACIEJEWSKI et al., 2012), demonstrou por meio de imunofluorescência e PCR a diminuição de decorina e aumento de biglican em bexigas fibrosadas de ratos parcialmente obstruídos. Como proposta terapêutica, utilizando o mesmo modelo

experimental, o mesmo grupo avaliou o tratamento destes animais com tadalafina, demonstrando possível efeito antifibrótico do fármaco e diminuição dos níveis teciduais de decorina e TGF β . Níveis inferiores de decorina e lumican por meio de avaliação proteômica também foram detectados em ratos após 14 dias de obstrução uretral parcial por Al-Saikan et al., (2015).

Outro grupo (KAYA et al., 2017), avaliou a resposta terapêutica do uso intradetrusora de decorina em bexigas fibrosadas de coelhos parcialmente obstruídos. Foram realizadas análises histopatológicas, imunohistoquímicas, farmacodinâmicas e estimulação elétrica, apresentando resultados favoráveis decorrentes da ação antifibrótica da decorina, como aumento da contratilidade nas bexigas fibrosadas e demonstrando efeitos protetores contra ação excessiva da fibrose.

Outra preocupação relacionada ao desequilíbrio na deposição de colágeno vesical, diz respeito à necessidade de intervenções cirúrgicas em bexigas com estas características, procedimento este que representa um desafio ao cirurgião. A reparação tecidual em uma bexiga estruturalmente alterada pode não só ser insuficiente para garantir a qualidade da cicatrização como exacerbar um processo fibrótico pré-existente. Considerando-se que os SLRPs facilitam a reparação tecidual e regeneração em condições patológicas como inflamação e ferimentos, participando ativamente da fibrillogênese do colágeno (CHEN; BIRK, 2013), avaliar a distribuição destes proteoglicanos na cicatrização de bexigas alteradas comparado a bexigas saudáveis pode trazer contribuição importante ao meio científico.

3 Objetivo

Objetiva-se com o presente trabalho identificar se há relação entre a administração oral dos glicosaminoglicanos com a distribuição de pequenos proteoglicanos ricos em leucina e colágeno na matriz extracelular de bexigas de ratos previamente obstruídos ou não, submetidos à cistotomia.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da suplementação oral de GAGs na distribuição de proteoglicanos (SLRPs) em bexigas de ratos saudáveis ou submetidos à obstrução parcial, tendo como comparativo os mesmos parâmetros obtidos de animais não suplementados;

- Avaliar a relação da distribuição de SLRPs e deposição de colágeno após cistotomia em bexigas de ratos saudáveis ou submetidos à obstrução parcial, tendo como comparativo os mesmos parâmetros obtidos de animais não suplementados;

4 REFERÊNCIAS

AL-SAIKAN, B. et al. Proteomic profile of an acute partial bladder outlet obstruction. **Canadian Urological Association Journal**, v. 9, n. 3–4, p. 114, 2015.

BAGHY, K.; IOZZO, R. V.; KOVALSZKY, I. Decorin-TGF β Axis in Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 60, n. 4, p. 262–268, 2012.

BASSI, P. F. et al. Glycosaminoglycan Therapy for Bladder Diseases: Emerging New Treatments. **European Urology, Supplements**, v. 10, n. 6, p. 451–459, 2011.

BYRON, J. K. Micturition Disorders. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 45, n. 4, p. 769–782, 2015.

CHANCELOR, M. .; YOSHILURA, N. Physiology and pharmacology of the bladder and urethra. In: **Campbell's urology**. 8. ed. Philadelphia: [s.n.]. p. 4168.

CHEN, S.; BIRK, D. E. The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. **FEBS Journal**, v. 280, n. 10, p. 2120–2137, maio 2013.

CIANI, O. et al. Intravesical administration of combined hyaluronic acid (HA) and chondroitin sulfate (CS) for the treatment of female recurrent urinary tract infections: A European multicentre nested case-control study. **BMJ Open**, v. 6, n. 3, p. 1–8, 2016.

CICIONE, A. et al. Intravesical treatment with highly-concentrated hyaluronic acid and chondroitin sulphate in patients with recurrent urinary tract infections: Results from a multicentre survey. **Journal of the Canadian Urological Association**, v. 8, n. 9–10 OCTOBER, p. E721–E727, 2014.

CIFTCILER, R. et al. The importance of serum biglycan levels as a fibrosis marker in patients with chronic hepatitis B. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 31, n. 5, p. 1–6, 2017.

COSTANTINI, E. et al. Morphological changes of bladder mucosa in patients who underwent instillation with combined sodium hyaluronic acid-chondroitin sulphate (ialuril®). **Urologia Internationalis**, v. 91, n. 1, p. 81–88, 2013.

CRUZ, Y. et al. Somatomotor and sensory urethral control of micturition in female rats. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 307, n. 11, p. F1207-14, 2014.

DAMIANO, R.; CICIONE, A. The role of sodium hyaluronate and sodium chondroitin sulphate in the management of bladder disease. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 3, n. 5, p. 223–232, 2011.

DE GROAT, W. C.; GRIFFITHS, D.; YOSHIMURA, N. Neural Control of the Lower Urinary Tract. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 327–396.

DEVEAUD, C. M. et al. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. **Journal of Urology**, v. 160, n. 4, p. 1518–1527, 1998.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645–647, fev. 1976.

DOWNEY, A.; PAHUJA, A. Intravesical chondroitin sulphate for interstitial cystitis/painful bladder syndrome. **Ulster Med J**, v. 84, n. 3, p. 161–163, 2015.

ELBADAWI, A. FUNCTIONAL ANATOMY OF THE ORGANS OF MICTURITION. **Urologic Clinics of North America**, v. 23, n. 2, p. 177–210, maio 1996.

EWALT, D. H. et al. Is Lamina Propria Matrix Responsible for Normal Bladder Compliance? **The Journal of Urology**, v. 148, n. 2, p. 544–549, ago. 1992.

FODITSCH, E. E. et al. Structural changes of the urinary bladder after chronic complete spinal cord injury in minipigs. **International Neurourology Journal**, v. 21, n. 1, p. 12–19, 2017.

FOUAD, K. et al. Transplantation and repair: Combined cell implantation and chondroitinase delivery prevents deterioration of bladder function in rats with complete spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 47, n. 10, p. 727–732, 2009a.

FOUAD, K. et al. Transplantation and repair: Combined cell implantation and chondroitinase delivery prevents deterioration of bladder function in rats with complete spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 47, n. 10, p. 727–732, 3 out. 2009b.

HRAPKIEWICZ, K.; MEDINA, L. **Clinical Laboratory Animal Medicine, an Introduction**. 3. ed. Ames, Ia: Blackwell Publishing Professional, 2007.

JANSSEN, D. A. W. et al. The distribution and function of chondroitin sulfate and other sulfated glycosaminoglycans in the human bladder and their

contribution to the protective bladder barrier. **Journal of Urology**, v. 189, n. 1, p. 336–342, 2013.

KALAMAJSKI, S. et al. Fibromodulin interacts with collagen cross-linking sites and activates lysyl oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 15, p. 7951–7960, 2016.

KALAMAJSKI, S.; OLDBERG, A. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. **Matrix Biology**, v. 29, n. 4, p. 248–253, 2010a.

KALAMAJSKI, S.; OLDBERG, Å. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. **Matrix Biology**, v. 29, n. 4, p. 248–253, maio 2010b.

KAYA, E. et al. The histopathological and pharmacodynamic effects of intradetrusor decorin injected in a rabbit partial bladder outlet obstruction model. **International Urology and Nephrology**, v. 49, n. 4, p. 607–614, 30 abr. 2017.

KIM, J. C. et al. Effects of partial bladder outlet obstruction and its relief on types I and III collagen and detrusor contractility in the rat. **Neurourology and Urodynamics**, v. 19, n. 1, p. 29–42, 2000.

KITTA, T. et al. Benefits and limitations of animal models in partial bladder outlet obstruction for translational research. **International Journal of Urology**, p. 1–9, 2017.

KRISHNAN, A. et al. Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis. **Laboratory Investigation**, v. 92, n. 12, p. 1712–1725, 2012.

KRYCZKA, J.; BONCELA, J. Leukocytes : The Double-Edged Sword in Fibrosis. v. 2015, 2015.

LANE, I. F. Disorders of micturition. In: **Canine and feline nephrology and urology**. 2. ed. BALTIMORE: [s.n.]. p. 528.

LAZZERI, M. et al. Managing chronic bladder diseases with the administration of exogenous glycosaminoglycans: An update on the evidence. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 8, n. 2, p. 91–99, 2016.

LUCON, M. et al. Evaluation of the metabolism of glycosaminoglycans in patients with interstitial cystitis. **International Braz J Urol**, v. 40, n. 1, p. 72–79, 2014.

MACIEJEWSKI, C. C. et al. Differential expression of class I small leucine-rich proteoglycans in an animal model of partial bladder outlet obstruction. **Journal of Urology**, v. 188, n. 4 SUPPL., p. 1543–1548, 2012.

MACIEJEWSKI, C. C.; TREDGET, E. E.; METCALFE, P. D. Urodynamic improvements following oral medical therapy for partial bladder outlet obstruction in an animal model. **Neurourology and Urodynamics**, v. 34, n. 3, p. 286–291, mar. 2015.

METCALFE, P. D. et al. Bladder outlet obstruction: progression from inflammation to fibrosis. **BJU International**, v. 106, n. 11, p. 1686–1694, dez. 2010.

MORMONE, E. et al. Fibromodulin, an oxidative stress-sensitive proteoglycan, regulates the fibrogenic response to liver injury in mice. **Gastroenterology**, v. 142, n. 3, p. 612–621, 2012.

NASTASE, M. V. et al. Small Leucine-Rich Proteoglycans in Renal Inflammation: Two Sides of the Coin. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 66, n. 4, p. 261–272, abr. 2018.

NASTASE, M. V.; IOZZO, R. V.; SCHAEFER, L. Key roles for the small leucine-rich proteoglycans in renal and pulmonary pathophysiology. [s.d.].

NIEDWOROK, C. et al. Inhibitory Role of the Small Leucine-Rich Proteoglycan Biglycan in Bladder Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

OKINAMI, T. et al. Altered Detrusor Gap Junction Communications Induce Storage Symptoms in Bladder Inflammation: A Mouse Cyclophosphamide-Induced Model of Cystitis. 2014.

PANCHAPHANPONG, J.; ASAWAKARN, T.; PUSOONTHORNTHUM, R. Effects of oral administration of N-acetyl-dglucosamine on plasma and urine concentrations of glycosaminoglycans in cats with idiopathic cystitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 6, p. 843–850, 2011.

PASTELÍN, C. F. et al. Neural pathways of somatic and visceral reflexes of the external urethral sphincter in female rats. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 14, p. 3120–3134, 1 out. 2012.

PAUL, G. M.; FILHO, R. T.; DOMINGUES REPKA, J. C. Qualitative analysis of the deposit of collagen in bladder suture of rats treated with tacrolimus combined with mycophenolate-mofetil. **International Braz J Urol**, v. 40, n. 2, p. 257–263, 2014.

RODRÍGUEZ, L. V.; WANG, B.; SHORTLIFFE, L. M. D. Structural changes in the bladder walls of pregnant and hormone-treated rats: Correlation with bladder dynamics. **BJU International**, v. 94, n. 9, p. 1366–1372, 2004.

SCHWALENBERG, T. et al. Intravesical Glycosaminoglycan Replacement with Chondroitin Sulphate (Gepan®instill) in Patients with Chronic Radiotherapy- or Chemotherapy-Associated Cystitis. **Clinical Drug Investigation**, v. 35, n. 8, p. 505–512, 2015.

SHEN, S.; XIA, C. M.; QIAO, L. Y. The urinary bladder of spontaneously hypertensive rat demonstrates bladder hypertrophy, inflammation, and fibrosis but not hyperplasia. **Life Sciences**, v. 121, p. 22–27, 2015.

SOBOLEV, V. E. Effects of Exogenous Glycosaminoglycans on the Histological Structure of the Rat Bladder in Experimental Cystitis. v. 154, n. 1, p. 108–111, 2012.

STEWART, S. et al. Raman Imaging. **Annual Review of Analytical**

Chemistry, v. 5, n. 1, p. 337–360, 19 jul. 2012.

THEOHARIDES, T. C. et al. Treatment of refractory interstitial cystitis/painful bladder syndrome with CystoProtek – an oral multi-agent natural supplement. **The Canadian Journal of Urology™**, v. 15, n. 6, p. 4410–4, 2008.

THEOHARIDES, T. C.; SANT, G. R. A pilot open label study of CystoProtek® in interstitial cystitis. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 183–188, 2005.

TRABUCCO, E. et al. Role of proteoglycans in the organization of periurethral connective tissue in women with stress urinary incontinence. **Maturitas**, v. 58, n. 4, p. 395–405, dez. 2007.

WIGHT, T. N.; POTTER-PERIGO, S. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, n. 6, p. G950–G955, 2011.

WOLBURG, H. et al. Detrusor smooth muscle cells of the guinea-pig are functionally coupled via gap junctions in situ and in cell culture. **Cell and Tissue Research**, v. 309, n. 2, p. 301–311, 1 ago. 2002.

ZHANG, S. et al. Dynamic Sparse Sampling for Confocal Raman Microscopy. **Analytical Chemistry**, p. acs.analchem.7b04749, 20 mar. 2018.

ZHOU, F. et al. Structural and functional changes in gap junctional intercellular communication in a rat model of overactive bladder syndrome induced by partial bladder outlet obstruction. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 6, p. 2139–2146, 2016.

5- Capítulo 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista International Journal of Urology (ISSN: 1442-2042; The Japanese Urological Association). Site da revista: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1442-2042](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1442-2042). As normas para submissão de manuscritos podem ser encontradas através do link: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)14422042/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)14422042/homepage/ForAuthors.html)

SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE GLICOSAMINOGLICANOS E EXPRESSÃO DE PEQUENOS PROTEOGLICANOS RICOS EM LEUCINA APÓS CISTOTOMIA EM BEXIGAS SAUDÁVEIS VERSUS PARCIALMENTE OBSTRUÍDAS.

Natalia Caroline Nalesso de Castro¹, Paulo Roberto Kawano² Renan Cavaleiro³, Helena B. Nader³, Tainá R. S. M. Peres⁴, Vinicius A. Gonzalez⁴ Bruna R. Paiva⁴, Juliany Gomes Quitzan⁵

1- Departamento de Cirurgia Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP BOTUCATU

2- Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina de Botucatu

3- Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo

4- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP BOTUCATU

5- Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP BOTUCATU

Corresponding author: Juliany Gomes Quitzan, Docente no Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp Botucatu, Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n, Bairro: Unesp Campus de Botucatu 18618-681 - Botucatu, SP, Brasil – +551438802159, juquitzan@fmvz.unesp.br

Resumo:

Objetivo: Investigar se há relação entre a suplementação oral de glicosaminoglicanos com a distribuição de pequenos proteoglicanos ricos em leucina e colágeno na matriz extracelular de bexigas saudáveis e fibrosadas submetidas ao procedimento de cistotomia.

Métodos: 56 ratos da linhagem *Wistar* foram divididos em cinco grupos, controle (G1), obstrução vesical parcial e cistotomia (G2), obstrução vesical parcial, cistotomia e suplementação oral de glicosaminoglicanos (G3), cistotomia (G4), cistotomia e tratamento (G5). As bexigas foram excisadas e pesadas. A distribuição dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina foi avaliada por imunofluorescência e o colágeno via Microscopia Cars (Coherente anti strokes raman Scattering).

Resultado: A média final do peso das bexigas do grupo G2 e 3 foi estatisticamente diferente do grupo controle. Apenas o grupo G3 apresentou diferença estatística para decorina, biglican, lumican e fibromodulina comparado ao grupo controle. Na microscopia Cars a intensidade do sinal do colágeno foi menor nos grupos G2 e G3.

Conclusão: A partir da análise da distribuição dos proteoglicanos e de colágeno frente a diferentes insultos vesicais, concluímos que o aumento global dos proteoglicanos se deve ao tratamento com os glicosaminoglicanos durante 28 dias por via oral, associado também a presença de fibrose tecidual. Ainda, não foi observado diferença aparente quanto ao colágeno após tratamento com os glicosaminoglicanos, no entanto, a obstrução uretral parcial leva a alteração do colágeno no tecido vesical.

Palavras chaves: Bexiga, Microscopia Cars, Colágeno, Imunofluorescência, Pequenos Proteoglicanos Ricos em Leucina

Introdução

A diminuição da complacência vesical pode ser observada em pacientes com válvula de uretra posterior, mielomeningocele e demais pacientes com bexiga neurogênica (retenção urinária), hipertrofia prostática, obstrução uretral parcial ou estenose por diferentes etiologias^{1,2}. O aumento da pressão intravesical resulta em significativa morbidade, uma vez que pode contribuir para a etiologia do refluxo vesicoureteral, litíase, hidronefrose e, por fim, falência renal^{3,4,5}. As propriedades mecânicas de bexigas pouco complacentes encontram-se comprometidas devido a mudanças na arquitetura estrutural e no equilíbrio dos componentes da matriz extracelular (MEC)^{2,6}. A via final comum destas alterações é o espessamento da parede vesical e fibrose⁴. Modificações tanto na concentração de colágeno quanto na relação de fibras tipo I e III estão diretamente relacionadas com baixa complacência e comprometimento da função de armazenamento de urina⁶⁻⁹.

Muitas investigações sobre os mecanismos patofisiológicos e fases da evolução da fibrose, bem como das ações de cada efector que participa de sua formação têm sido desenvolvidas e possuem relevante papel em futuras propostas terapêuticas que possam interferir na morbidade causada por este processo^{10,11}. Neste sentido, destacam-se pesquisas que objetivam avaliar a ação dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs – do inglês small leucine-rich proteoglycans) e ocorrência de fibrose em diferentes órgãos^{4,12-15}. Estes proteoglicanos regulam diversos processos biológicos e patofisiológicos, dentre eles a fibrillogênese de colágeno. SLRPs classe I (decorina e biglican) e classe II (lumican e fibromodulina) estão diretamente envolvidos na regulação da

síntese, diâmetro e organização estrutural de fibras colágenas no tecido, tendo também participação ativa na reparação tecidual^{16,17}.

A estrutura básica dos proteoglicanos envolve cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) ligadas covalentemente ao cerne proteico e encontram-se amplamente distribuídos na MEC. Durante a biossíntese, GAGs sulfatados incluindo sulfato de condroitina, sulfato de dermatan e sulfato de queratan são diferencialmente sintetizados e modificados, podendo afetar a dinâmica estrutural e funcional dos SLRPs¹⁶⁻¹⁸

A administração local e sistêmica de GAGs tem sido estudada em enfermidades inflamatórias vesicais. O foco de avaliação dos GAGs concentra-se na sua ação direta no urotélio, uma vez que participam do mecanismo de proteção da mucosa e sua diminuição está correlacionada com os quadros de infecção de trato urinário inferior (ITU) recorrente, justificando maior número de trabalhos com uso intravesical destes compostos¹⁹⁻²³. No entanto, a administração oral de uma formulação contendo diferentes GAGs mostrou resultados promissores em ensaios clínicos²⁴⁻²⁶ e experimentais²².

Até o momento, poucos estudos destinaram-se a avaliar o papel dos SLRPs em afecções vesicais^{14-15,27-28}. E, apesar dos GAGs participarem da constituição dos proteoglicanos, incluindo SLRPs, pesquisas objetivando observar a relação entre suplementação de GAGs, ação dos SLRPs e disposição de fibras colágenas nas diferentes camadas não tem sido conduzidas, seja em bexigas integras ou estruturalmente alteradas.

O objetivo do presente trabalho foi identificar se há relação entre a administração oral dos glicosaminoglicanos com a distribuição de pequenos

proteoglicanos ricos em leucina e colágeno na matriz extracelular de bexigas de ratos previamente obstruídos ou não, submetidos à cistotomia.

Método

O Projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, sendo aprovado sob protocolo 35/2016. Foram utilizados 56 animais da espécie *Rattus Novergicus* – linhagem Wistar, fêmeas, os mesmos foram randomicamente divididos em cinco grupos: G1, G2, G3, G4 e G5 (Figura 1).

A figura abaixo (Figura 1) apresenta o delineamento experimental do projeto de modo esquemático.

G1 (8)	G2 (12)	G3 (12)	G4 (12)	G5 (12)
• Controle	• Obstrução Uretral por 12 semanas • Cistotomia • Água destilada por 28 dias • Eutanásia	• Obstrução Uretral por 12 semanas • Cistotomia • Gag por 28 dias • Eutanásia	• Cistotomia • Água destilada por 28 dias • Eutanásia	• Cistotomia • GAG por 28 dias • Eutanásia

Figura 1- Representação esquemática da divisão dos grupos e suas devidas etapas, com o número de animais apresentado entre parênteses.

Nos animais dos grupos 2 e 3, a obstrução uretral foi feita de acordo com modelo descrito em estudos anteriores⁴, porém com utilização do cateter 20G. Uma punção foi realizada na face ventral da bexiga, possibilitando a passagem de cateter em direção à uretra (Figura 2).

Após 12 semanas, os animais do grupo G2 e G3 foram submetidos ao procedimento de cistotomia. Após exposição da bexiga, foi feita incisão na região ventral, com extensão de 0,6 cm (Figura 2), com auxílio de lupa para magnificação da imagem (3.5x). A sutura foi feita em um primeiro plano com

padrão de sutura contínua simples e segundo plano com padrão de sutura invaginante, ambas utilizando ácido poliglicólico 8-0 (Figura 2). Nos animais dos grupos 4 e 5, foi realizado apenas o procedimento de cistotomia, conforme descrito anteriormente.

Ainda, durante a cirurgia de cistotomia, o cateter 20G foi reposicionado na uretra, em todos os animais, com o intuito de verificar a patência do lúmen uretral considerando-se a obstrução previamente realizada. No entanto, um total de 6 animais do grupo 2 e 3 não estavam obstruídos, os mesmos foram descartados do estudo. O tempo total de obstrução foi de 16 semanas (12 semanas pós obstrução e 4 semanas pós cistotomia).

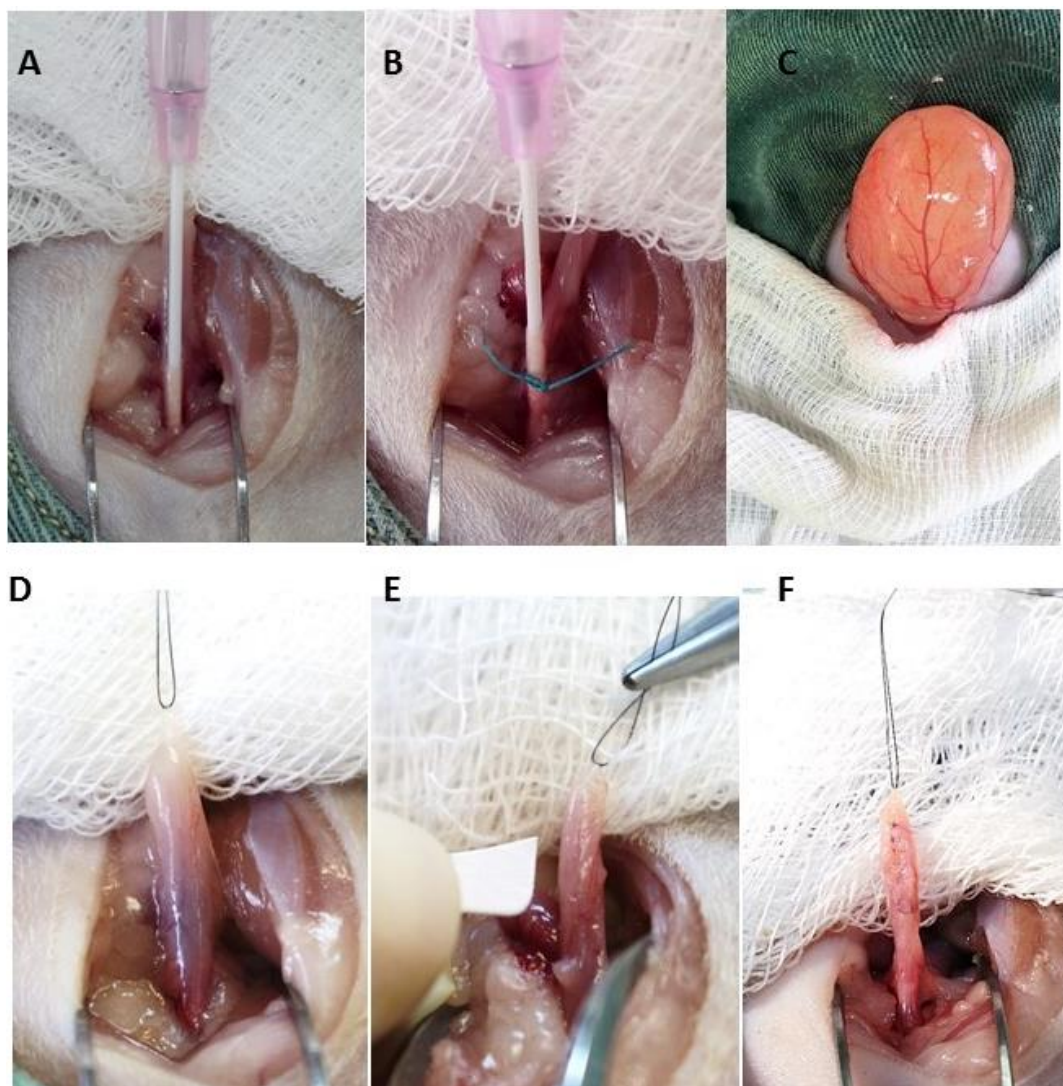


Figura 2- Procedimento de Obstrução Uretral Parcial (A, B, C) e Cistotomia (D, E, F). A- Cateterização da uretra por meio de punção no colo vesical, com cateter de calibre 20G. B- Obstrução uretral parcial realizada por meio da passagem do fio de Poliéster 4-0. C- Aspecto da bexiga após doze semanas de obstrução. D- Exposição vesical e colocação de sutura de reparo no polo cranial. E- Incisão na face ventral com medida pré-determinada de 0,6 cm. F- Aspecto final da bexiga após sutura em duas camadas.

Para suplementação dos animais pertencentes aos grupos 3 e 5, foi utilizado o suplemento que cada sachê contém 1,5 g de sulfato de glucosamina e 1,2 g de sulfato de condroitina (Condroflex® pó oral Zodiac® produtos farmacêuticos S.A.). A dose para cada rato foi baseada conforme estudos anteriores que utilizaram suplementação de GAGs via oral ²⁴⁻²⁶. O conteúdo do

sachê foi diluído em 45 mL de água e homogeneizado, atingindo a concentração de 150 mg de sulfato de glucosamina e 120 mg de sulfato de condroitina por mL. Cada rato recebeu 1 mL por sonda de gavagem uma vez ao dia durante 28 dias. Os grupos G2 e G4 receberam a mesma dose, em mL, de água destilada.

A eutanásia dos animais foi feita 28 dias após a cistotomia. Os animais foram pesados bem como as bexigas excisadas. Após este procedimento, a bexiga foi aberta longitudinalmente pela face dorsal, preservando a área ventral de sutura, sendo posteriormente armazenada em freezer -80°C.

Para normalização dos dados e comparação do peso da bexiga entre diferentes animais e grupos, foi feito um índice percentual, obtido a partir da fórmula $\text{peso bexiga} \times 100 / \text{peso final do rato}$. Utilizou-se o peso final dos animais e da bexiga em miligramas.

As amostras de bexiga, armazenadas em freezer -80°C, foram processadas para análise da concentração dos SRLPs - biglican, lumican, decorina e fibromodulina. Foi avaliado todo o tecido vesical. O preparo do tecido para o ensaio de imunofluorescência foi realizado de acordo com a metodologia descrita pelo Center for Biological Imaging – Universidade de Pittsburgh. Foram utilizados anticorpos primários da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California), incluindo anti-decorin (sc 22613), anti-lumican (sc 27718), anti-fibromodulina (sc 33772), anti-biglican (sc 33788). As imagens foram capturadas usando microscópio confocal Leica TCS SP8, equipado com software de captura de imagem LAS AF. A intensidade de fluorescência foi mensurada utilizando-se o software ImageJ.

Para avaliação do colágeno, foi utilizado a microscopia Cars (Coherent anti-Stokes Raman Scattering). Foram avaliados seis campos diferentes de

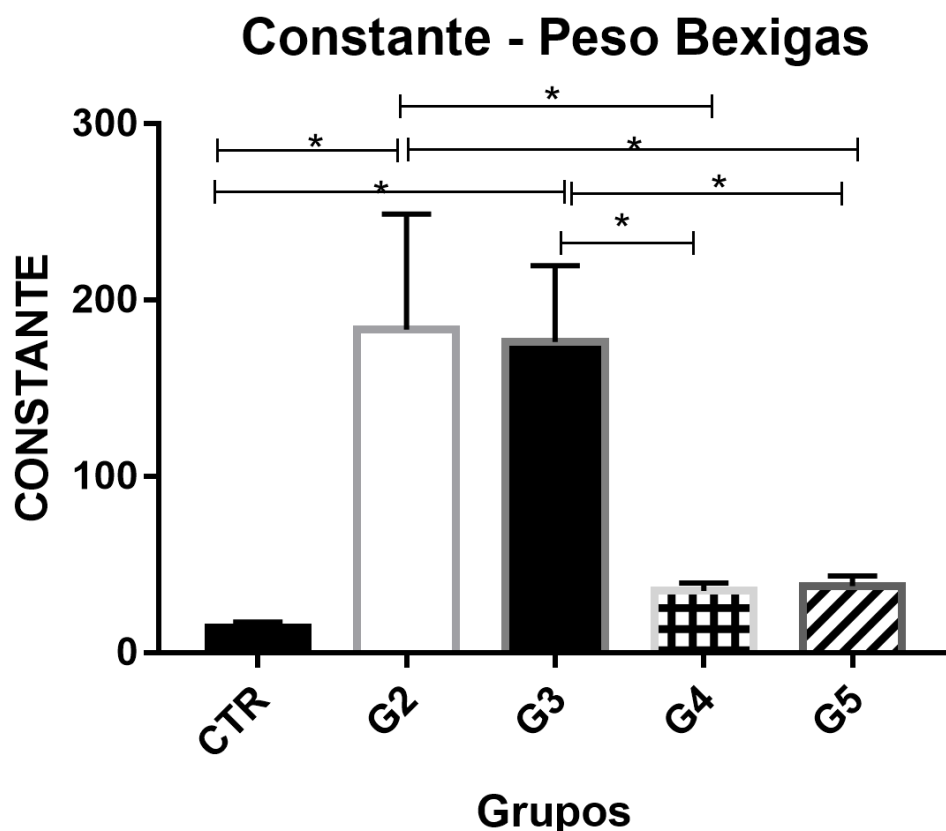
tecido vesical de cada animal e as imagens foram representadas em projeção de máxima intensidade, o que corresponde às imagens coletadas da série Z dos diferentes planos confocais.

Para análise de todos os dados foi utilizado o software GraphPad Prism, 7.0, California - EUA, com nível de significância de 0,05. Para o peso das bexigas, os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão e a análise estatística foi feita com One-way ANOVA seguido por teste de Turkey para normalização e comparação dos grupos. Para a expressão dos SRLPs foi realizado análise paramétrica não pareada T-student.

Resultados

A média e respectivo desvio padrão do peso final da bexiga correlacionado com o peso final de cada animal foi avaliado nos diferentes grupos. Os resultados estão apresentados no Gráfico 1.

Gráfico 1: Representação dos valores da constante aplicada para cada animal submetido ao procedimento cirúrgico (peso bexiga final / peso rato final x 100). Dados expressos em médias $\pm$ desvio padrão (* $p < 0,05$).



Houve diferença estatística entre o grupo controle (G1) e os grupos submetidos a obstrução uretral parcial (G2 e G3), estes dois grupos também apresentaram diferença estatística com os grupos G4 e G5, apenas submetidos ao procedimento de cistotomia. Não houve diferença estatística nos grupos G1, G4 e G5.

As figuras abaixo representam a imunofluorescência dos SRLPs (biglican, decorina, lumican e fibromodulina) no tecido vesical e o gráfico representa os valores referentes à quantificação da imunomarcagem dos SRLPs no tecido vesical de cada grupo avaliado.

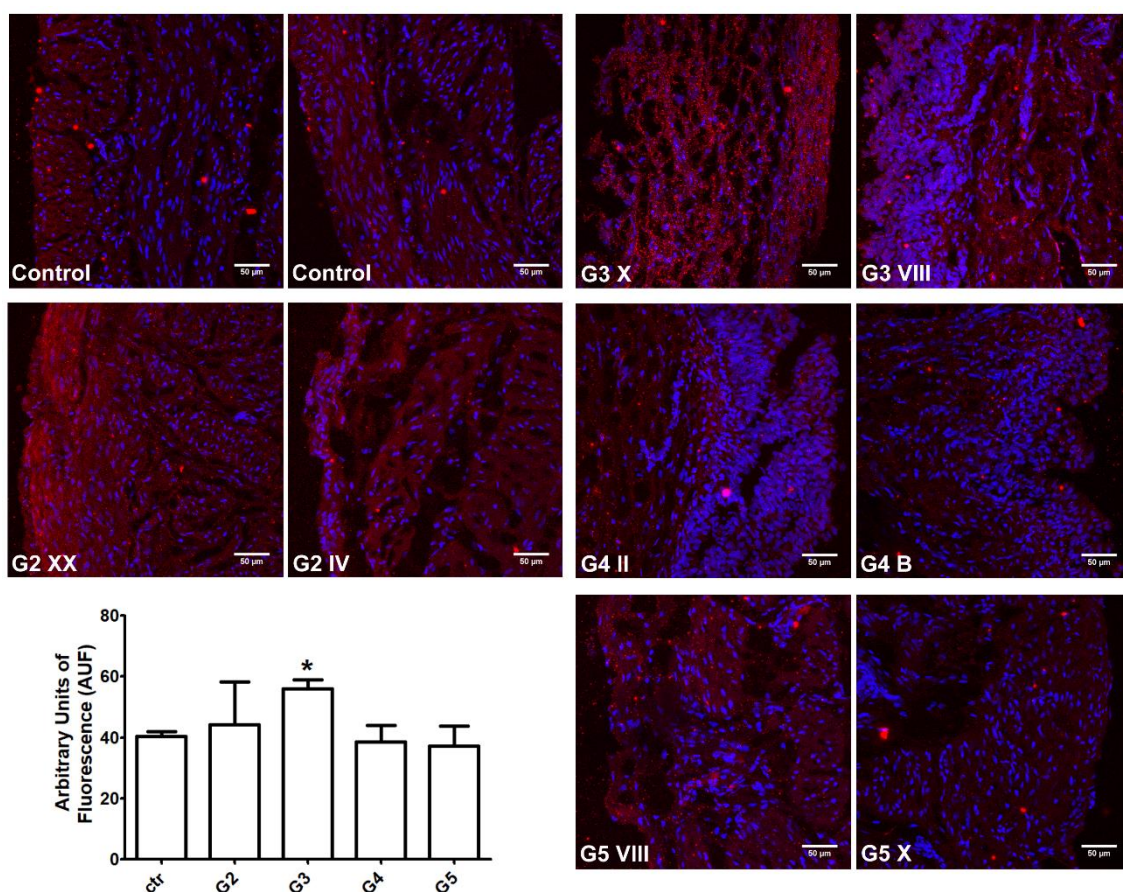


Figura 3- Representação da marcação (vermelho) na imunofluorescência de biglican nos tecidos vesicais dos grupos controle (G1), e experimentais (G2, G3, G4 e G5). Gráfico apresentando valores média $\pm$ desvio padrão em relação a quantificação de biglican no tecido vesical (* $p < 0,05$).

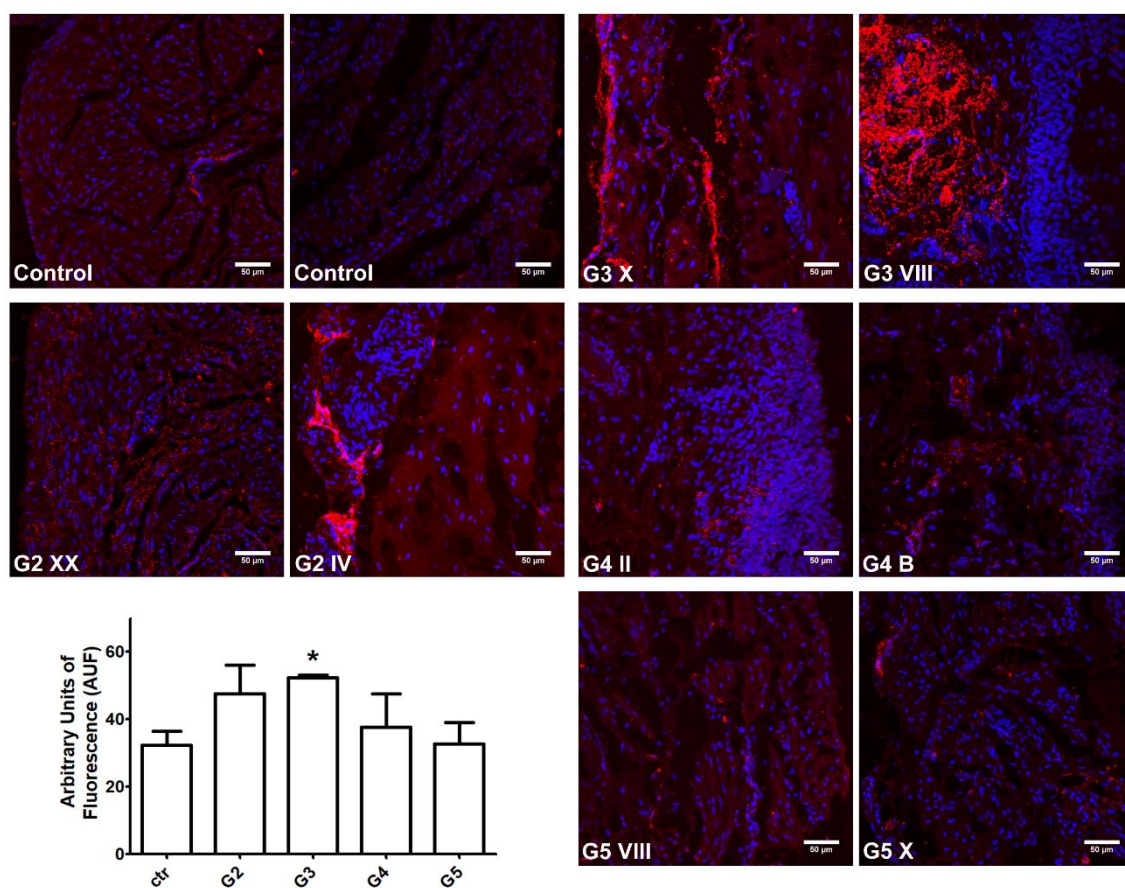


Figura 4: Representação da marcação de decorina (vermelho) na imunofluorescência do tecido vesical. O gráfico representa valores média $\pm$ desvio padrão referentes a quantificação de decorina no tecido vesical dos animais dos cinco grupos (* $p < 0,05$).

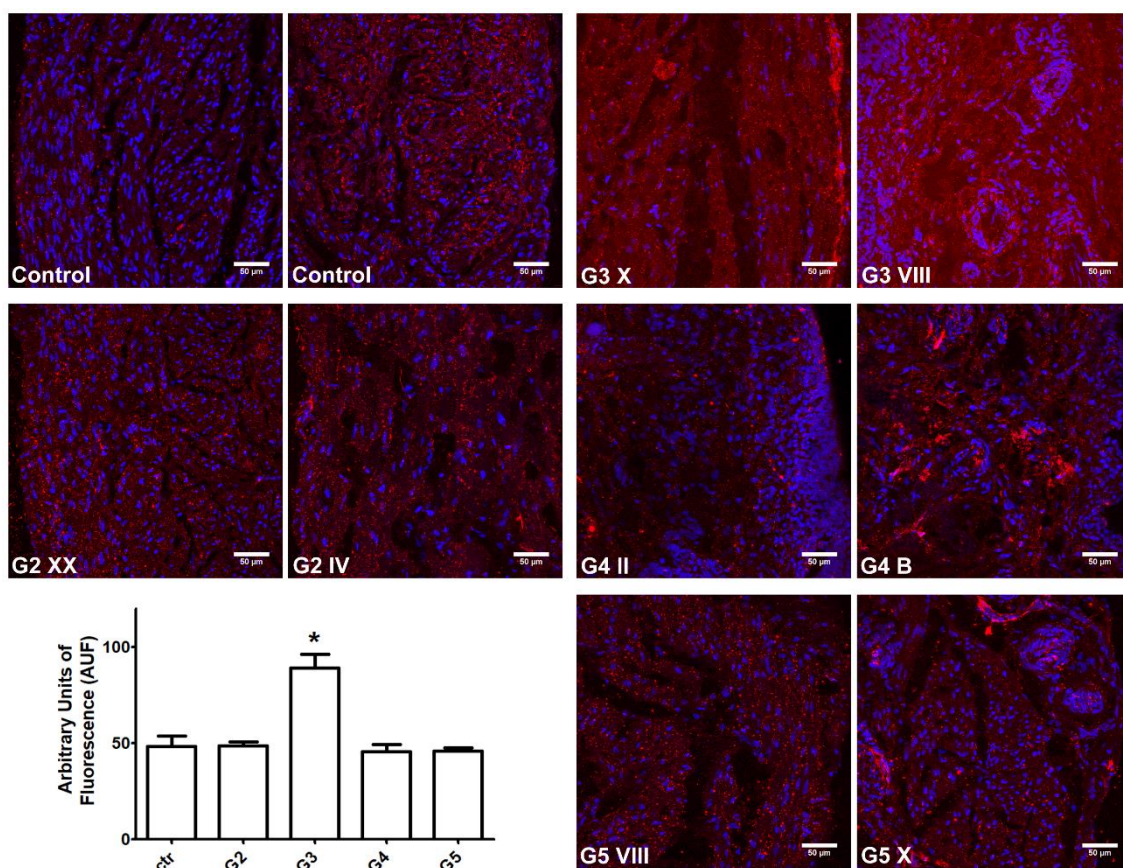


Figura 5: Representação da marcação (vermelho) de lumican na imunofluorescência do tecido vesical. O gráfico representa valores média $\pm$ desvio padrão referentes a quantificação de lumican no tecido vesical dos animais dos cinco grupos (* $p < 0,05$).

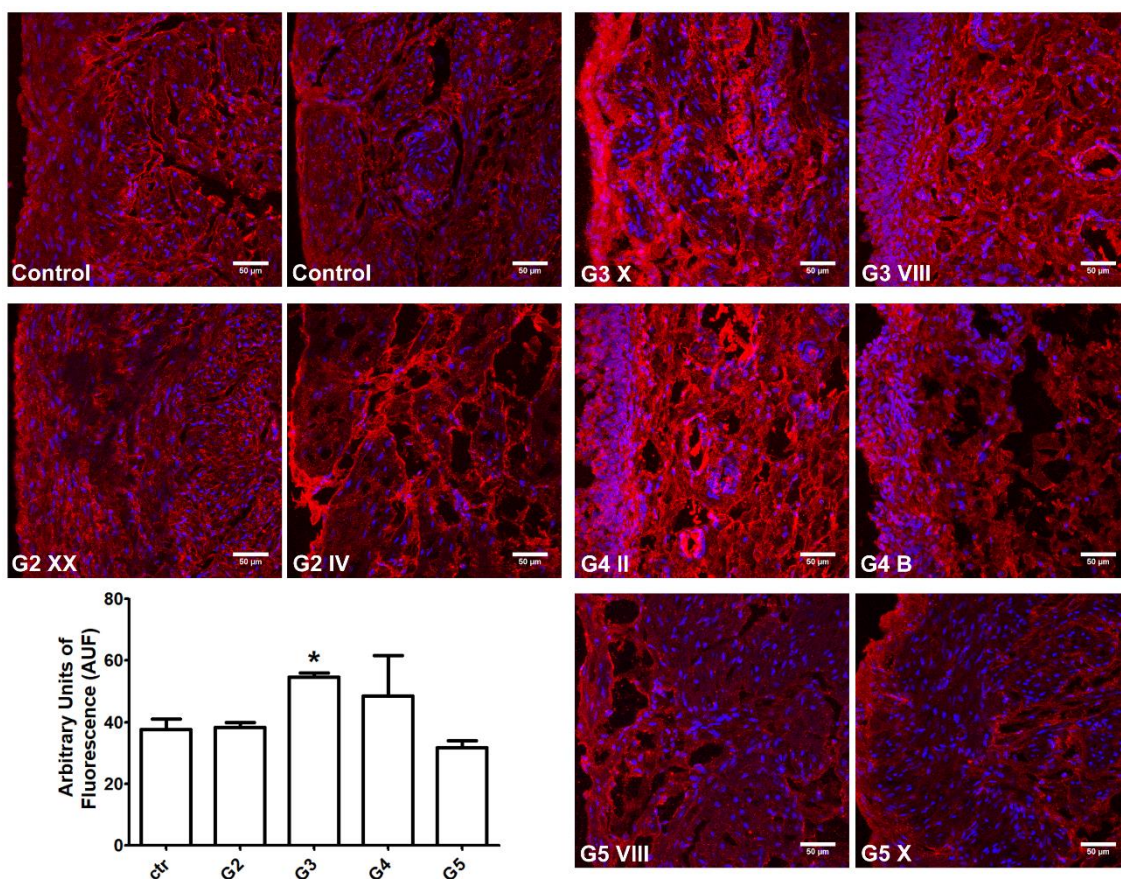


Figura 6- Representação da imunomarcção (vermelho) de fibromodulina no tecido vesical do grupo controle (G1) e grupos experimentais (G2,G3,G4, G5). O gráfico representa os valores média $\pm$ desvio padrão referentes a quantificação da marcação de fibromodulina no tecido vesical dos animais dos cinco grupos (* $p < 0,05$).

A figura 7 apresenta a análise de colágeno total nos tecidos vesicais dos animais dos grupos controle (G1) a G5 por meio da análise da Microscopia Cars.

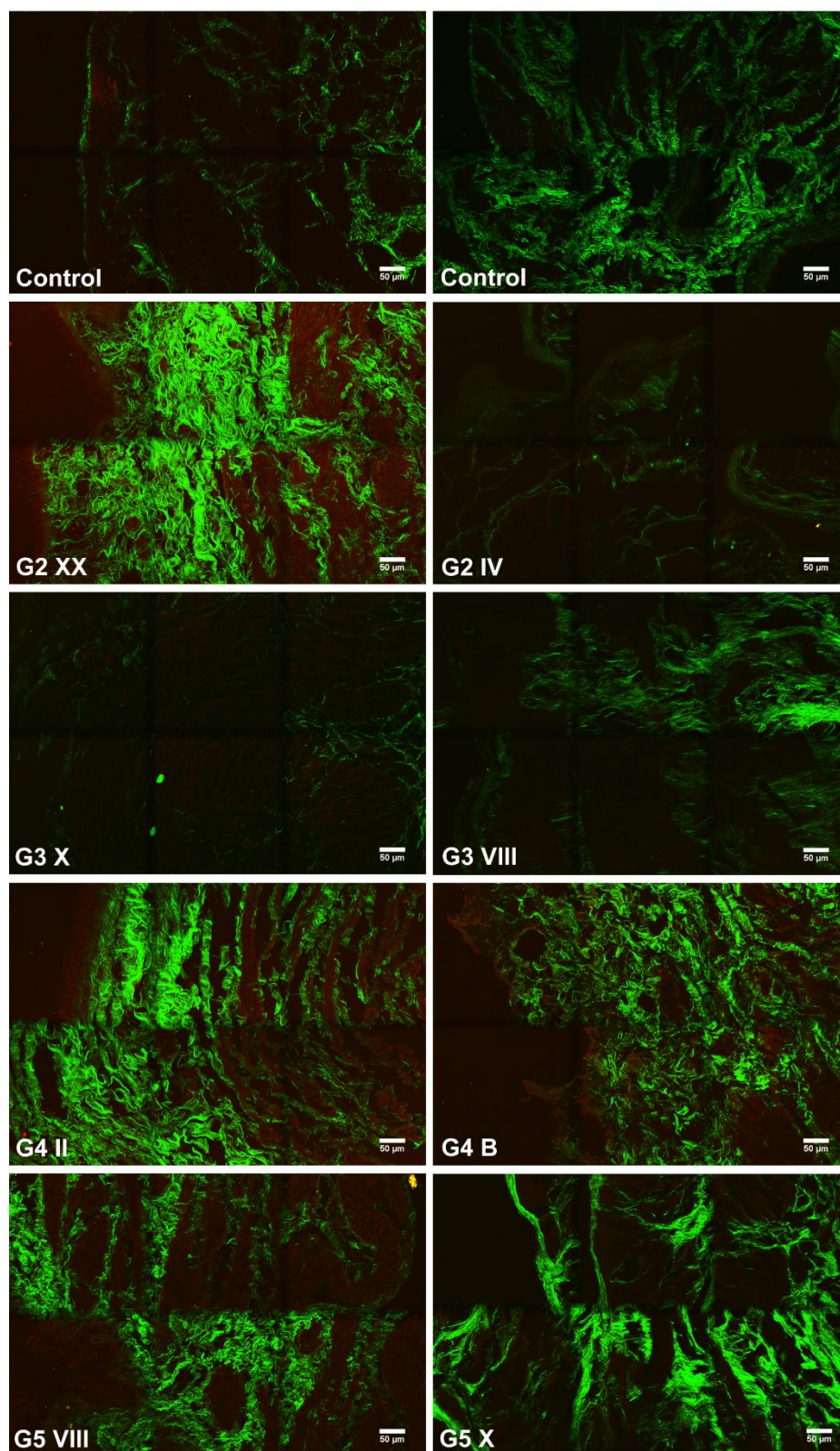


Figura 7- Análise do colágeno nos tecidos vesicais por meio da Microscopia Cars. As marcações em coloração verde representam a concentração do colágeno no tecido.

Na etapa da obstrução parcial uretral, nos animais pertencentes aos grupos 2 e 3, algumas complicações foram encontradas. O tempo total de obstrução nestes animais foi de 16 semanas (12 semanas pós obstrução e 4 semanas pós cistotomia), sendo registrados 4 óbitos neste período, 2 com quatro dias após o procedimento de obstrução uretral parcial, 1 com 20 dias e 1 com 95 dias pós obstrução.

Discussão

O processo que mobiliza a deposição de colágeno nas camadas da bexiga e regula as alterações fibróticas após obstruções infravesicais ainda não foi completamente elucidado. Sabe-se que os SRLPs são considerados mediadores da fibrilogênese do colágeno em tecidos normais e fibróticos, incluindo a bexiga¹⁵. A distribuição dos SRLPs e sua relação com o mecanismo da fibrose vem sendo objeto de várias pesquisas^{1,13,15,18,29}.

No entanto, a influência da suplementação das GAGS na distribuição de SRLPs e colágeno, após lesão em tecido vesical normal ou alterado, não foi previamente descrita. Para avaliar bexigas com alteração em sua matriz extracelular, utilizamos modelo experimental de obstrução infravesical. Esta técnica é frequentemente citada na literatura^{1,4,27,30}, pois permite a obtenção de uma bexiga com alterações morfológicas e funcionais³⁰, devido ao processo inflamatório precursor de fibrose, que cursa com hipertrofia e instabilidade detrusora^{6,9}. Dentre os métodos utilizados para obstrução uretral, cita-se a abordagem transperitoneal, transperineal e o modelo de envolvimento uretral, sendo a abordagem transperitoneal a mais utilizada por permitir adequada visualização e obstrução uretral, mimetizando quadro similar ao de humanos e animais que apresentam hiperplasia prostática e estenoses uretrais de diversas

etiologias^{1,30}. No entanto, encontramos dificuldade para isolamento da uretra para ligadura. Devido a presença de tecido adiposo periuretral, sua individualização não foi facilmente realizada em todos os animais, mesmo com auxílio de magnificação. Em seis animais, a ligadura não manteve o padrão de tensão desejado ou não envolveu toda a circunferência uretral, sendo os mesmos descartados do estudo. Embora estudos anteriores^{4,27} tenham utilizado cateter 18 G em animais com peso similar aos ratos do nosso estudo, nós adaptamos o calibre do cateter para 20 G, visto que não observamos dificuldade no esvaziamento vesical com o calibre maior. De acordo com estudos anteriores³⁰, este procedimento não está livre de complicações. A taxa de complicação relacionada ao modelo de obstrução infravesical pode ser superior a 15%³⁰. Nosso estudo apresentou taxa de 17%, incluindo cálculo, piúria macroscópica e óbito, nas 16 semanas que se seguiram ao processo obstrutivo, um outro grupo²⁷ obteve uma taxa de 19,4% de complicações, durante o período de 16 semanas de obstrução uretral parcial, incluindo óbito, desidratação, letargia, hidronefrose e empiema vesical. Por outro lado, em um estudo⁴ não houve complicações relacionadas a obstrução uretral dos animais.

O aumento do peso que ocorre em bexigas expostas à obstrução infravesical decorre da hipertrofia da musculatura detrusora^{2,6}, seguida pelo processo de fibrose⁹. Como esperado, a média de peso da bexiga dos animais dos grupos G4 e 5 não foi estatisticamente diferente do grupo controle. No entanto, nos grupos G2 e 3 o aumento de peso vesical diferiu do grupo controle, sendo que em G3 não houve influência do tratamento visto que, apesar da suplementação de GAGs, houve aumento da média de peso da bexiga dos animais deste grupo, similar ao observado em G2, sem tratamento

O período de 12 semanas de obstrução é compatível com o desenvolvimento da fase descompensatória de inflamação vesical, intimamente relacionada com a atuação de SRLPs no tecido²⁷. Em nosso estudo, a técnica de cistotomia foi utilizada com o intuito de estimular síntese e organização na deposição de colágeno em bexigas com alteração estrutural em decorrência da fibrose, após 12 semanas de obstrução uretral parcial. Para comparar o efeito da cistotomia nestas bexigas, utilizamos bexigas de ratos saudáveis, não submetidos à obstrução. Desta forma, objetivamos traçar um delineamento do comportamento tecidual, com foco no colágeno e SRLPs, em animais tratados ou não com glicosaminoglicanos.

A diminuição de GAGs na bexiga está correlacionada com ocorrência de infecção, uma vez que participam do mecanismo de proteção da mucosa e, por este motivo, a administração destes compostos vem sendo objeto de diversos ensaios clínicos envolvendo pacientes com ITUI, principalmente pela via intravesical devido sua ação direta na mucosa^{21,31}. Embora a via intravesical seja a mais citada em ensaios clínicos¹⁹⁻²², há maior morbidade relacionada a essa abordagem comparada à administração oral, devido a necessidade de cateterização uretral.

A administração oral e a dose para administração das GAGs foi baseada em estudos realizados em humanos e felinos²⁴⁻²⁶. Entretanto, a via oral possui como desvantagem a variação no metabolismo de absorção da medicação e ação no local esperado, e particularidades como perda do medicamento durante sua administração³¹, por esta razão, a suplementação dos ratos em nosso estudo foi realizada com auxílio da sonda de gavagem.

Estudos relatam alterações na distribuição dos SRLPs em bexigas fibrosadas, envolvendo diminuição de decorina e lumican e aumento de biglican^{1,15}. Decorina está associada com atividade antifibrótica e anti-inflamatória em diversos tecidos, por meio da modulação da expressão do TGF- β e outros mediadores inflamatórios^{13-14,32}. Tais evidências sugerem que o aumento de decorina e diminuição de biglican é satisfatório do ponto de vista terapêutico, considerando-se principalmente as bexigas já alteradas.

Os GAGs são componentes da estrutura básica dos SRLPs; portanto, a diferenciação durante a biossíntese do GAGs sulfatados e não sulfatados influencia a dinâmica estrutural e funcional dos SRLPs¹⁶⁻¹⁸. Com a suplementação via oral de condroitina e glucosamina, GAGs sulfatados precursores de SRLPs, principalmente decorina e biglican, procuramos avaliar se haveria alteração na distribuição dos SLRPs em bexigas saudáveis e fibrosadas após cistotomia.

No entanto, na imunofluorescência, G3 (obstrução uretral parcial e tratamento) apresentou a maior imunomarcação para os quatros tipos de SRLPs avaliados (biglican, lumican, decorina e fibromodulina) e o único com diferença estatística na análise comparativa com o grupo controle da quantificação da imunomarcação. Nos animais submetidos à obstrução previamente à cistotomia houve aumento tanto de decorina como biglican. Na MEC, ocorrem diversas formas de ligação entre o colágeno e os SRLPs e, a partir destas conexões, as moléculas tornam-se aptas a sequestrar diversos mediadores, podendo promover tanto cascata pró inflamatória como anti-inflamatória³².

Biglican atua na formação da fibra colágena, bem como, na regulação da atividade das citocinas na patogênese da fibrose, sendo seu aumento observado

tanto na fibrose hepática como vesical^{15,29}. O aumento de biglican e fibromodulina vem sendo correlacionado com presença de processos fibróticos em diversos tecidos, como rim, fígado, bexiga e pulmão^{1,32-33}, sendo inclusive objeto de estudo como marcadores da presença de fibrose no tecido hepático^{15,29}.

No grupo G5 (cistotomia e tratamento) não encontramos diferença estatística de nenhum SRLPs comparado ao grupo controle, portanto avaliando o quesito tratamento, constatamos que a suplementação de GAGs não apresenta efeitos em bexigas saudáveis, entretanto o seu uso em bexigas doentes desencadeia alteração na distribuição global dos SRLPs, bem como na cascata inflamatória. Sendo assim, pode-se sugerir que o ambiente influencia a biotransformação, síntese e deposição dos SRLPS.

Além do SRLPs, a dinâmica da deposição das fibras colágenas também está envolvida no processo de fibrose tecidual. O colágeno é considerado o maior constituinte da MEC e sua síntese aumentada ou deficiência de *turnover* caracterizam o processo fibrótico. Modificações tanto na sua concentração, quanto na relação de fibras tipo I e III estão diretamente relacionadas com baixa complacência e comprometimento da função de armazenamento de urina^{8,34}. Devido a sua importância na dinâmica estrutural e funcional da micção, a avaliação da deposição de colágeno no tecido vesical, por meio de diversas metodologias (espectrometria de massa, imunohistoquímica, microscopia confocal), é realizada em diversos estudos^{4,6,34}. A microscopia Cars baseia-se no fenômeno RAMAN de espalhamento de luz. As características moleculares geram estados vibracionais e rotacionais particulares para cada molécula. Desta forma, a junção da microscopia confocal com a técnica CARS é uma nova

metodologia que permite gerar imagens 3D baseadas no espectro intrínseco vibracional característico de cada molécula. As vantagens primordiais deste método são que as amostras permanecem inalteradas sem o uso de fluoróforos e sem efeitos de citotoxicidade, e o sinal é limpo sem autofluorescência. Esta nova abordagem possibilita a geração de uma imagem real, livre dos vários artefatos ocasionados pelo uso de fluoróforos, além de ser uma metodologia não destrutiva e minimamente invasiva para análise de colágeno³⁵⁻³⁶. Os grupos submetidos ao procedimento de obstrução uretral (G2 e G3) apresentaram menor intensidade de sinal comparado aos grupos controle e submetidos apenas a cistotomia. Esta alteração de intensidade de sinal pode ser justificada pelo tempo da permanência da obstrução uretral parcial, visto que durante o período de dezesseis semanas ocorre menor concentração das fibras colágenas na musculatura detrusora, uma vez que a concentração dessas fibras pode ser alterada pelos feixes musculares presentes no tecido intersticial⁶. Outro fator importante, é que a microscopia Cars avalia o sinal da segunda harmônica geracional da molécula a, portanto alterações na orientação da fibra colágena no tecido podem afetar a intensidade do sinal vibracional emitido³⁷. Em nosso estudo não realizamos a análise histopatológica do tecido vesical para melhor caracterização da hipertrofia muscular e da deposição das fibras colágenas. No entanto, como citado em estudos anteriores, no processo da fibrose ocorre deficiência na síntese e na deposição das fibras colágenas alterando sua orientação e conformação em relação a tecidos saudáveis³⁴.

Concluimos a partir da análise da expressão dos proteoglicanos e de colágeno frente a diferentes insultos vesicais, que o aumento global dos proteoglicanos se deve ao tratamento com os GAGs durante 28 dias por via oral

associado também a presença de fibrose tecidual. Ainda, não foi observado diferença aparente quanto ao colágeno após tratamento com os GAGs, no entanto, a obstrução uretral parcial leva a alteração do colágeno no tecido vesical.

Conflito de Interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

1. Al-Saikan B, Tredget E, Fahlman R, Ding J, Metcalfe P. Proteomic profile of an acute partial bladder outlet obstruction. *Can Urol Assoc J* [Internet]. 2015;9(3–4):114. Available from: <http://journals.sfu.ca/cuaj/index.php/journal/article/view/2267>
2. Shen S, Xia CM, Qiao LY. The urinary bladder of spontaneously hypertensive rat demonstrates bladder hypertrophy, inflammation, and fibrosis but not hyperplasia. *Life Sci*. 2015;121:22–7.
3. Ewalt DH, Howard PS, Blyth B, Snyder HM, Duckett JW, Levin RM, et al. Is Lamina Propria Matrix Responsible for Normal Bladder Compliance? *J Urol* [Internet]. 1992 Aug [cited 2018 Feb 17];148(2):544–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022534717366508>
4. Metcalfe PD, Wang J, Jiao H, Huang Y, Hori K, Moore RB, et al. Bladder outlet obstruction: progression from inflammation to fibrosis. *BJU Int* [Internet]. 2010 Dec [cited 2018 Feb 17];106(11):1686–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1464-410X.2010.09445.x>
5. Pastelín CF, Juárez R, Damaser MS, Cruz Y. Neural pathways of somatic and visceral reflexes of the external urethral sphincter in female rats. *J Comp Neurol* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2018 Feb 17];520(14):3120–34. Available

from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.23079>

6. Kim JC, Yoon JY, Seo S, Hwang TK, Park YH. Effects of partial bladder outlet obstruction and its relief on types I and III collagen and detrusor contractility in the rat. *Neurourol Urodyn*. 2000;19(1):29–42.
7. Deveaud Cm, Macarak Ej, Kucich U, Ewalt Dh, Abrams Wr, Howard Ps. Molecular Analysis Of Collagens In Bladder Fibrosis. *J Urol* [Internet]. 1998 Oct [cited 2018 Feb 17];160(4):1518–27. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022534701626065>
8. Rodriguez L V., Wang B, Shortliffe LMD. Structural changes in the bladder walls of pregnant and hormone-treated rats: correlation with bladder dynamics. *BJU Int* [Internet]. 2004 Dec [cited 2018 Feb 17];94(9):1366–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1464-410X.2004.05174.x>
9. Fouad K, Pearse DD, Tetzlaff W, Vavrek R. Transplantation and repair: Combined cell implantation and chondroitinase delivery prevents deterioration of bladder function in rats with complete spinal cord injury. *Spinal Cord* [Internet]. 2009;47(10):727–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sc.2009.10>
10. Kryczka J, Boncela J. Leukocytes : The Double-Edged Sword in Fibrosis. 2015;2015.
11. Wight TN, Potter-Perigo S. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am J Physiol Liver Physiol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2018 Feb 17];301(6):G950–5. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00132.2011>
12. Nastase, M. V; Iozzo, R. V; Schaefer, L. Key roles for the small leucine-rich proteoglycans in renal and pulmonary pathophysiology. *Biochim Biophys*

Act. 2014; 1840(8): 2460–70.

13. Baghy K, Iozzo R V., Kovalszky I. Decorin-TGF β Axis in Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(4):262–8.

14. Kaya E, Kibar Y, Yılmaz S, Ebiloglu T, Ozcan A, Seyrek M, et al. The histopathological and pharmacodynamic effects of intradetrusor decorin injected in a rabbit partial bladder outlet obstruction model. *Int Urol Nephrol* [Internet].

2017 Apr 30 [cited 2018 Mar 5];49(4):607–14. Available from:

<http://link.springer.com/10.1007/s11255-017-1518-x>

15. Maclejewski CC, Honardoust D, Tredget EE, Metcalfe PD. Differential expression of class i small leucine-rich proteoglycans in an animal model of partial bladder outlet obstruction. *J Urol* [Internet]. 2012;188(4 SUPPL.):1543–8.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2012.03.045>

16. Chen S, Birk DE. The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. *FEBS J* [Internet]. 2013 May [cited 2018 Feb 17];280(10):2120–37. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.12136>

17. Trabucco E, Soderberg M, Cobellis L, Torella M, Bystrom B, Ekman-Ordeberg G, et al. Role of proteoglycans in the organization of periurethral connective tissue in women with stress urinary incontinence. *Maturitas* [Internet]. 2007 Dec [cited 2018 Feb 17];58(4):395–405. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378512207002630>

18. Kalamajski S, Oldberg Å. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol* [Internet]. 2010 May [cited 2018 Feb 17];29(4):248–53. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X10000053>

19. Cicione A, Cantiello F, Ucciero G, Salonia A, Torella M, De Sio M, et al.

Intravesical treatment with highly-concentrated hyaluronic acid and chondroitin sulphate in patients with recurrent urinary tract infections: Results from a multicentre survey. *J Can Urol Assoc.* 2014;8(9–10 OCTOBER):E721–7.

20. Damiano R, Cicione A. The role of sodium hyaluronate and sodium chondroitin sulphate in the management of bladder disease. *Ther Adv Urol.* 2011;3(5):223–32.

21. Ciani O, Arendsen E, Romancik M, Lunik R, Costantini E, Di Biase M, et al. Intravesical administration of combined hyaluronic acid (HA) and chondroitin sulfate (CS) for the treatment of female recurrent urinary tract infections: A European multicentre nested case-control study. *BMJ Open.* 2016;6(3):1–8.

22. Sobolev VE. Effects of Exogenous Glycosaminoglycans on the Histological Structure of the Rat Bladder in Experimental Cystitis. 2012;154(1):108–11.

23. Lucon M, Martins JR, Leite KRM, Soler R, Nader HB, Srougi M, et al. Evaluation of the metabolism of glycosaminoglycans in patients with interstitial cystitis. *Int Braz J Urol.* 2014;40(1):72–9.

24. Theoharides TC, Kempuraj D, Vakali S, Sant GR. Treatment of refractory interstitial cystitis/ painful bladder syndrome with CystoProtek – an oral multi-agent natural supplement. *Can J Urol [Internet].* 2008;15(6):4410–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19046494>

25. Theoharides TC, Sant GR. A pilot open label study of CystoProtek® in interstitial cystitis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2005;18(1):183–8.

26. Panchaphanpong J, Asawakarn T, Pusoonthornthum R. Effects of oral administration of N-acetyl-dglucosamine on plasma and urine concentrations of glycosaminoglycans in cats with idiopathic cystitis. *Am J Vet Res.*

2011;72(6):843–50.

27 Maciejewski, C. C.; Tredget, E. E.; Metcalfe, P. D. Urodynamic improvements following oral medical therapy for partial bladder outlet obstruction in an animal model. *Neurourology and Urodynamics*. 2015; 34(3): 286–91.

28 Niedworok, C. et al. Inhibitory Role of the Small Leucine-Rich Proteoglycan Biglycan in Bladder Cancer. *PLoS ONE*. 2013; 8 (11).

29 Ciftciler, R. Et Al. The importance of serum biglycan levels as a fibrosis marker in patients with chronic hepatitis B. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2017; 31(5):1–6.

30 Kitta, T. Et Al. Benefits and limitations of animal models in partial bladder outlet obstruction for translational research. *International Journal of Urology*. 2017;1–9.

31 Bassi, P. F. et al. Glycosaminoglycan Therapy for Bladder Diseases: Emerging New Treatments. *European Urology, Supplements*. 2011; 10(6):451–59.

32 Nastase, M. V. et al. Small Leucine-Rich Proteoglycans in Renal Inflammation: Two Sides of the Coin. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2018; 66,(4): 261–72.

33 Rydell-Tormanen, K. et al. Absence of fibromodulin affects matrix composition, collagen deposition and cell turnover in healthy and fibrotic lung parenchyma. *Scientific Reports*. 2014; 4(6383): 1-10.

34 Foditsch, E. E. et al. Structural changes of the urinary bladder after

chronic complete spinal cord injury in minipigs. *International Neurourology Journal*. 2017; 21(1):12–19.

35 Stewart, S. et al. Raman Imaging. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2012; 5(1): 337–60.

36 Zhang, S. et al. Dynamic Sparse Sampling for Confocal Raman Microscopy. *Analytical Chemistry*, p. *acs.analchem*. 2018.

37 Yasui, T.; Tohno, Y.; Araki, T. Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light. *Applied Optics*. 2004; 43(14): 2861-67.