



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**CAIO ABNER VITORINO GONÇALVES LEITE**

**BLOQUEIO DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA-1 COM ANAKINRA INIBE A  
CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA**

**FORTALEZA**

**2014**

CAIO ABNER VITORINO GONÇALVES LEITE

BLOQUEIO DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA-1 COM ANAKINRA INIBE A  
CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- L55b Leite, Caio Abner Vitorino Gonçalves.  
Bloqueio do receptor da interleucina-1 com anakinra inibe a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida / Caio Abner Vitorino Gonçalves Leite. – 2014.  
114 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2014.  
Área de Concentração: Farmacologia.  
Orientação: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.
1. Cistite. 2. Quimioterapia. 3. Ifosfamida. 4. Proteína Antagonista do Receptor de Interleucina 1. 5. Anticorpos Monoclonais. I. Título.

CAIO ABNER VITORINO GONÇALVES LEITE

BLOQUEIO DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA-1 COM ANAKINRA INIBE A  
CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA

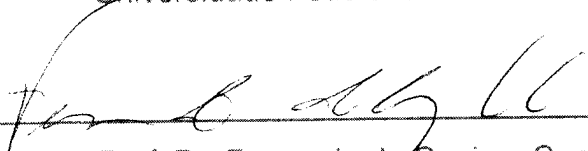
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Universidade de São Paulo – USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Universidade Federal do Ceará - UFC

Aos meus pais, Nivardo e Dilsa (*in memoriam*), pela incansável dedicação e amor à família.

Aos meus irmãos Carlos, Cássio e Nínive, pelo companheirismo.

À toda a minha família pelo carinho e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro pela orientação, amizade, atenção e dedicação. Através do estímulo, força e exemplo foi possível acreditar que é sempre possível fazer mais pelos pacientes, pelos outros e pela ciência.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha pela acolhida em seu laboratório, Laboratório de Inflamação e Dor (LID), na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, onde tive oportunidade de desenvolver grande parte deste trabalho. Além disso, por sua ajuda intensa nos rumos do meu processo de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior pela incansável ajuda em várias situações, desde as mais simples às mais complexas, e pelo exemplo de confiança e dedicação, que foram essenciais na minha formação.

Ao Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães por sua dedicação e paciência em orientar-me nos momentos em que dava os primeiros passos em direção às minhas atuais escolhas, ainda no Programa de Educação Tutorial (PET-Medicina), e pela convivência fundamental para o entendimento da ciência e do ensino.

À Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito pelo auxílio na interpretação de diversos resultados morfológicos presentes no trabalho, e pela convivência no LAFICA.

Ao Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos pela amizade e pela ajuda na realização de experimentos essenciais para o entendimento do trabalho.

À Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro pela atenção e carinho no período em que fiz parte do Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET).

Ao Prof. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, pela amizade e exemplo de professor e médico, essencial a minha formação profissional.

À Profa. Mariana Vale pela convivência e amizade.

Aos estudantes de iniciação científica Viviane Alencar e Davi Melo, amigos do PET-Medicina e do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), pela amizade e companheirismo que transcendem este trabalho, sem os quais teria sido impossível o realizar.

À técnica de laboratório, Maria Silvandira, pelo carinho e dedicação que provê ao LAFICA há anos, sendo peça fundamental para a realização não apenas deste, mas da maior parte dos trabalhos realizados no laboratório.

Aos demais professores do curso de pós-graduação em Farmacologia da UFC, em especial, Prof. Dr. Manasses Claudino Fonteles e Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo pela vontade em transmitir seus preciosos conhecimentos aos alunos.

Aos colegas do (LAFICA), em especial, Amílcar, Ana Carla, Anamaria, Ana Paula, Anielle, Camila, Carlos Heli, Carlos Wagner, Daniel, Danielle, Deysi, Enzo, Eudmar,

Fábio, Juliana, Kamila, Karoline, Larisse, Lívia, Lus Mário, Maraíza, Marcelo Leite, Priscilla, Renata, Rosinha, Vénucia, pela amizade, ajuda e por fazerem os dias de trabalho parecerem mais leves.

Aos colegas do LFAVET, Aline, Daniel, Pedro, Rafael, Renata, Roberta, Terentia, pela convivência e em especial à doutiranda Natacha Queiroz, por seu afeto e amizade.

Aos colegas do LID/FMRP/USP pela acolhida, em especial a Paulo Henrique e José Maurício, os quais além da amizade, contribuíram na fase final deste trabalho.

Aos colegas do PET Medicina, em especial, Adriana, Danni, Everton, Fernando, Geysa, Humberto, Luana, Lucas, Nathália, Raimundo Neto, Noberto, Sarah e Thyago, pela amizade em um dos momentos mais felizes e produtivos da graduação.

Aos colegas de turma, em especial, Ana Taísa, André, Carolyn, Cialdine, Jefferson, Jucyara, Raphael, Rodrigo, com os quais compartilhei um dos momentos mais críticos da vida, a graduação, pela amizade e pela fundamental presença em diversos momentos.

Aos técnicos do LID, Diva, Eliana, Giuliana, Ieda, Katia, Marco, Sérgio pela atenção e prontidão em ajudar.

Aos colegas da pós-graduação, Adriana, Camila Meireles, Delvane, Edílson, Júlia, Thyanne, pelo companheirismo nessa difícil fase.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

“Um desejo pressupõe a possibilidade de ação para alcançá-lo; ação pressupõe uma meta que vale a pena ser alcançada”. (Ayn Rand)

“Para que a quimioterapia prossiga com sucesso é preciso olhar para as substâncias que possuem alta afinidade e alta potência (...), contudo com baixa toxicidade em relação ao corpo (...). Em outras palavras, temos de aprender a mirar em um alvo químico”. (Paul Ehrlich)



## RESUMO

Cistite hemorrágica (CH) induzida por ifosfamida (IFO) é uma importante complicação clínica em pacientes com câncer. Atualmente, mesna e hiper-hidratação são utilizadas como profilaxia, a despeito de ainda ser observada CH através de cistoscopia e histopatologia mesmo com essas medidas. A participação de interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) na patogênese da CH provê alvos para o tratamento dessa doença. Assim, esse trabalho objetivou avaliar o efeito protetor do antagonista do receptor da IL-1 (anakinra) e do anticorpo anti-TNF-alfa (infiximabe) nas respostas inflamatórias, nociceptivas e funcionais da CH experimental induzida por IFO em camundongos. Foram utilizados camundongos Swiss, C57BL6, IL-1R<sup>-/-</sup>, CASP1<sup>-/-</sup>, TNFR1<sup>-/-</sup>, TNFR1/R2<sup>-/-</sup>. Os animais WT foram submetidos ao tratamento com anakinra 100 mg/kg i.p. ou infiximabe 5 mg/kgi.p. ou salina i.p., foram tratados 1h após com IFO 400 mg/kg i.p., e 12 h após a IFO foi realizado o sacrifício, com excisão das bexigas para avaliação macroscópica, histopatológica, permeabilidade vascular, mieloperoxidase, contratilidade, cistometrografia e citometria de fluxo para neutrófilos e macrófagos. Alguns animais, antes do sacrifício, foram submetidos a avaliação de nocicepção visceral. Anakinra foi capaz de atenuar hemorragia, edema, infiltrado neutrofilico, hipernocicepção visceral e disfunção vesical. Além disso, foi observada redução dos parâmetros inflamatórios e no infiltrado vesical de neutrófilos e macrófagos em animais IL-1R<sup>-/-</sup> em comparação a animais selvagens. Por outro lado, com animais caspase-1<sup>-/-</sup>, não houve mudança no padrão inflamatório. O infiximabe, por sua vez, inibiu o edema vesical e a hipernocicepção visceral, sem interferir na hemorragia, no infiltrado de neutrófilos e macrófagos e na disfunção vesical. Foi observada também uma melhora do edema vesical em animais TNFR1<sup>-/-</sup>, sem melhora no infiltrado de neutrófilos e macrófagos, e observou-se uma piora da CH em animais TNFR1/R2<sup>-/-</sup>. Com isso, o presente trabalho demonstra a eficácia de anakinra em prevenir a síndrome da CH induzida por IFO, e a eficácia do infiximabe em inibir a hipernocicepção. Adicionalmente, a patogênese da CH parece ser independente de IL-1 $\beta$  produzido por caspase-1, ou dependente de IL-1 $\alpha$ . Além disso, a CH parece ser dependente parcialmente do receptor TNFR1, e possivelmente possui uma proteção fisiológica advinda do receptor TNFR2.

**Palavras-chave:** cistite hemorrágica, ifosfamida, anakinra, infiximabe

## ABSTRACT

### INTERLEUKIN-1 RECEPTOR BLOCKADE WITH ANAKINRA INHIBITS IFOSFAMIDE INDUCED HEMORRHAGIC CYSTITIS

Hemorrhagic cystitis (HC) induced by ifosfamide (IFO) is an important clinical complication in patients with cancer. Despite prophylaxis, HC is observed. The role of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) in the pathogenesis of HC provides targets for treatment. Thus, this study aimed to evaluate the protective effect of the IL-1 receptor antagonist (anakinra) and anti-TNF-alpha antibody (infliximab) in experimental HC-induced by IFO in mice. Swiss, C57BL6, IL-1R<sup>-/-</sup>, CASP1<sup>-/-</sup>, TNFR1<sup>-/-</sup>, TNFR1/R2<sup>-/-</sup> mice were used. Animals were submitted to pre-treatment with anakinra 100 mg/kg, ip or infliximab 5 mg/kg, ip, or saline ip, 1h after, they were treated with IFO 400 mg/kg ip, and 12 h after IFO injection they were killed. Then, it was performed resection of the bladder for macroscopic and histopathological evaluation, vascular permeability assay, myeloperoxidase assay, muscle contractility, cystometrogram and flow cytometry to neutrophils and macrophages. Some animals prior to death, were subjected to evaluation of visceral nociception. Anakinra was able to attenuate hemorrhage, edema, neutrophil infiltration, visceral hypernociception and bladder dysfunction. In addition, it was observed reduction of inflammatory parameters and bladder infiltration of neutrophils and macrophages in IL-1R<sup>-/-</sup> mice, when compared to wild type animals. In contrast, caspase-1<sup>-/-</sup> mice did not change the inflammatory pattern when compared to wild type animals. Conversely, infliximab inhibited bladder edema and visceral hypernociception, but did not inhibit hemorrhage, infiltration of neutrophils and macrophages and bladder dysfunction. A reduction in bladder edema was also observed in TNFR1<sup>-/-</sup> mice, when compared with wild type animals, although TNFR1<sup>-/-</sup> mice did not block infiltration of neutrophils and macrophages. In other hand, TNFR1/R2<sup>-/-</sup> mice treated with IFO showed a deterioration of HC. Thus, this study shows the efficacy of anakinra in preventing the HC syndrome induced by IFO, and efficacy of infliximab in inhibiting hypernociception. In addition, the pathogenesis of HC appears to be independent of IL-1 $\beta$  produced by caspase-1 or IL-1 $\alpha$  dependent. Furthermore, HC appears to be partially dependent of TNFR1, but possibly arising from a physiological protection TNFR2.

**Keywords:** hemorrhagic cystitis, ifosfamide, anakinra, infliximab

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Causas de cistite em pacientes com câncer.....	20
<b>Figura 2 –</b>	Estrutura molecular da Ifosfamida e Ciclofosfamida.....	21
<b>Figura 3 –</b>	Principais vias do metabolismo da Ifosfamida.....	23
<b>Figura 4 –</b>	Sequência de fases da patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.....	28
<b>Figura 5 –</b>	Mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese da CH.....	29
<b>Figura 6 –</b>	Via de sinalização intracelular da interleucina-1.....	31
<b>Figura 7 –</b>	Via de sinalização intracelular do fator de necrose tumoral e mecanismo de inibição do anticorpo infliximabe.....	35
<b>Figura 8 –</b>	Doenças com patogêneses fortemente relacionadas ao TNF.....	36
<b>Figura 9 –</b>	Teste de Nocicepção visceral (von Frey).....	49
<b>Figura 10 –</b>	Sistema de avaliação da contratilidade do músculo liso da bexiga.....	50
<b>Figura 11 –</b>	Sistema de avaliação de cistometrografia.....	51
<b>Figura 12 –</b>	Exemplo de traçado de cistometrografia com os parâmetros avaliados.....	51
<b>Figura 13 –</b>	Efeito do pré-tratamento com doses crescentes de Anakinra sobre o aumento de PUV induzido por IFO.....	54
<b>Figura 14 –</b>	Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre o aumento de permeabilidade vesical induzido por IFO.....	55
<b>Figura 15 –</b>	Efeito do pré-tratamento com Anakinra nas alterações macroscópicas e microscópicas na bexiga induzidas por IFO.....	57
<b>Figura 16 –</b>	Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre o infiltrado neutrófilico vesical induzido por IFO.....	58
<b>Figura 17 –</b>	Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre hipernocicepção visceral induzida por IFO.....	59
<b>Figura 18 –</b>	Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre a hiporresponsividade do músculo liso vesical induzida por IFO.....	60
<b>Figura 19 –</b>	Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre o aumento da pressão intravesical induzida por IFO.....	62
<b>Figura 20 –</b>	Dosagem de IL-1 $\beta$ vesical 0, 3, 6 e 12 h após a injeção de IFO...	64
<b>Figura 21 –</b>	Efeito da injeção de ifosfamida no PUV de animais WT e	

	CASP1 <sup>-/-</sup> .....	65
<b>Figura 22</b>	– Efeito da injeção de ifosfamida no PUV de animais WT e IL-1R <sup>-/-</sup> .....	66
<b>Figura 23</b>	– Efeito da injeção de ifosfamida no número de neutrófilos nas bexigas de animais WT e IL-1R <sup>-/-</sup> .....	68
<b>Figura 24</b>	– Efeito da injeção de ifosfamida no número de macrófagos nas bexigas de animais WT e IL-1R <sup>-/-</sup> .....	69
<b>Figura 25</b>	– Efeito do pré-tratamento com múltiplas doses de Infliximabe sobre o aumento de PUV induzido por IFO.....	70
<b>Figura 26</b>	– Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre o aumento de permeabilidade vesical induzido por IFO.....	71
<b>Figura 27</b>	– Efeito do pré-tratamento com Infliximabe nas alterações macroscópicas e microscópicas na bexiga induzidas por IFO.....	72
<b>Figura 28</b>	– Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre o infiltrado neutrofílico vesical induzido por IFO.....	73
<b>Figura 29</b>	– Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre hipernocicepção visceral induzida por IFO.....	74
<b>Figura 30</b>	– Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre a hiporresponsividade do músculo liso vesical induzida por IFO.....	75
<b>Figura 31</b>	– Dosagem de TNF-α vesical 0, 3, 6 e 12 h após a injeção de ifosfamida.....	76
<b>Figura 32</b>	– Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre o aumento de neutrófilos na bexiga de animais tratados com IFO.....	77
<b>Figura 33</b>	– Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre o aumento de macrófagos na bexiga de animais tratados com IFO.....	78
<b>Figura 34</b>	– Efeito da injeção de IFO no PUV de animais WT e TNFR1 <sup>-/-</sup> .....	79
<b>Figura 35</b>	– Efeito da ifosfamida no PUV de animais WT e TNFR1/R2 <sup>-/-</sup> .....	81
<b>Figura 36</b>	– Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre o aumento do PUV de animais TNFR1/R2 <sup>-/-</sup> tratados com IFO.....	82
<b>Figura 37</b>	– Efeito da injeção de ifosfamida no número de neutrófilos nas bexigas de animais WT e TNFR1 <sup>-/-</sup> .....	84
<b>Figura 38</b>	– Efeito da injeção de ifosfamida no número de macrófagos nas bexigas de animais WT e TNFR1 <sup>-/-</sup> .....	85
<b>Figura 39</b>	– Efeito da injeção de ifosfamida no número de neutrófilos nas	86

	bexigas de animais WT e TNFR1/R2 <sup>-/-</sup> .....	
<b>Figura 40 –</b>	Efeito da injeção de ifosfamida no número de macrófagos nas bexigas de animais WT e TNFR1/R2 <sup>-/-</sup> .....	87
<b>Figura 41 –</b>	Modelo hipotético da participação de IL-1, TNF, neutrófilos e macrófagos na cascata inflamatória da CH induzida por IFO.....	101

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Efeito do pré-tratamento com Anakinra nos escores macroscópicas e microscópicas de bexigas na CH induzida por IFO.....	57
<b>Tabela 2 –</b>	Parâmetros da cistometrografia durante o enchimento e esvaziamento em camundongos anestesiados.....	63
<b>Tabela 3 –</b>	Escore macroscópicas de bexigas em modelo de CH induzida por IFO em camundongos C57BL/6 selvagens e Caspase-1 <sup>-/-</sup> .....	65
<b>Tabela 4 –</b>	Escore macroscópicas de bexigas em modelo de CH induzida por IFO em camundongos WT e IL-1R <sup>-/-</sup> .....	67
<b>Tabela 5 –</b>	Escore macroscópicas e microscópicas de bexigas em modelo de CH induzida por IFO e pré-tratamento com Infliximabe.....	72
<b>Tabela 6 –</b>	Escore macroscópicas de bexigas em modelo de CH induzida por IFO em camundongos C57BL/6 selvagens e TNFR1 <sup>-/-</sup> .....	80
<b>Tabela 7 –</b>	Escore macroscópicas de bexigas em modelo de CH induzida por IFO em camundongos C57BL/6 selvagens e TNFR1/R2 <sup>-/-</sup> .....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AP-1</b>	Proteína de ativação 1
<b>APC</b>	Células apresentadoras de antígenos
<b>CASP1</b>	Caspase 1
<b>CASP3</b>	Caspase 3
<b>CASP8</b>	Caspase 8
<b>CCh</b>	Carbacol
<b>CH</b>	Cistite hemorrágica
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase 2
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EP1</b>	Receptor de prostaglandina 1
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FACS</b>	Citometria de fluxo
<b>IFO</b>	Ifosfamida
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-11</b>	Interleucina 11
<b>IL-1R</b>	Receptor da IL-1
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase indutível
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase

<b>MyD88</b>	Fator de diferenciação mielóide 88
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa-B
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>ONOO</b>	Peroxinitrito
<b>PBS</b>	Solução Tampão Salina-fosfato
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PUV</b>	Peso úmido vesical
<b>RNAm</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>WT</b>	<i>Wild type</i> (selvagem)



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Cistite.....	20
1.2	Oxazafosforinas.....	21
1.3	Cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.....	23
1.4	Modelo experimental de CH induzida por IFO.....	25
1.5	Patogênese da CH induzida por oxazafosforinas.....	26
1.6	Interleucina-1 (IL-1).....	29
1.6.1	<i>Antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA)</i> .....	32
1.7	Fator de necrose tumoral (TNF) .....	33
1.7.1	<i>Anticorpo anti-TNF</i> .....	36
2	JUSTIFICATIVA.....	38
3	OBJETIVOS.....	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1	Animais.....	41
4.2	Drogas e reagentes.....	41
4.3	Preparo de soluções e reagentes.....	41
4.3.1	<i>Solução de Cetamina e xilazina</i> .....	41
4.3.2	<i>Formol 10 %</i> .....	42
4.3.3	<i>Azul de Evans 2,5 %</i> .....	42
4.3.4	<i>Solução de Tyrode modificada</i> .....	42
4.3.5	<i>Solução Tampão Salina-fosfato (PBS) 10X (Solução Mãe)</i> .....	42
4.3.6	<i>PBS 1X</i> .....	43
4.3.7	<i>RPMI incompleto</i> .....	43
4.3.8	<i>Solução tampão de digestão</i> .....	43
4.3.9	<i>Tampão de citometria de fluxo (Tampão de FACS)</i> .....	43
4.3.10	<i>Tampão de lise</i> .....	43
4.3.11	<i>Parafomaldeído 2%</i> .....	44
4.3.12	<i>Tampões utilizados para o ensaio de ELISA</i> .....	44
4.3.12.1	<i>Solução de ligação (coating buffer) pH 8.4</i> .....	44
4.3.12.2	<i>Tampão de bloqueio (para ELISA da companhia BD)</i> .....	44
4.4	Preparo de soluções e reagentes.....	44
4.5	Grupos experimentais.....	45

4.5.1	<i>Experimento 1</i> .....	45
4.5.2	<i>Experimento 2</i> .....	45
4.5.3	<i>Experimento 3</i> .....	45
4.5.4	<i>Experimento 4</i> .....	46
4.5.5	<i>Experimento 5</i> .....	46
4.6	<b>Análise macroscópica</b> .....	46
4.7	<b>Análise microscópica</b> .....	47
4.8	<b>Avaliação da permeabilidade vascular</b> .....	47
4.9	<b>Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)</b> .....	47
4.10	<b>Teste de nocicepção visceral</b> .....	48
4.11	<b>Avaliação funcional de bexigas isoladas</b> .....	49
4.12	<b>Avaliação funcional de bexigas em camundongos anestesiados</b> .....	50
4.13	<b>Citometria de fluxo</b> .....	52
4.13.1	<i>Preparação da suspensão celular</i> .....	52
4.13.2	<i>Análise da expressão de marcador de neutrófilos e macrófagos</i> .....	52
4.14	<b>Dosagem de citocinas</b> .....	53
4.15	<b>Análise estatística</b> .....	53
5	<b>RESULTADOS</b> .....	54
5.1	<b>Efeitos do pré-tratamento com Anakinra e papel da deleção genética de IL-1R ou Caspase-1 na CH induzida por IFO</b> .....	54
5.1.1	<i>Efeito da administração prévia de Anakinra sobre o peso úmido vesical (PUV) e a permeabilidade vascular na CH induzida por IFO</i> .....	54
5.1.2	<i>Efeito da administração prévia de Anakinra sobre as alterações macroscópicas e microscópicas na CH induzida por IFO</i> .....	56
5.1.3	<i>Efeito do pré-tratamento com Anakinra no infiltrado neutrofilico vesical e na hipernocicepção visceral na CH induzida por IFO</i> ....	58
5.1.4	<i>Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre a disfunção vesical “in vitro” e “in vivo” na CH induzida por IFO</i> .....	60
5.1.5	<i>Efeito da administração de Ifosfamida nos níveis vesicais de IL-1<math>\beta</math></i> .....	63
5.1.6	<i>Efeito da administração de Ifosfamida no PUV e parâmetros macroscópicos em camundongos C57BL/6 selvagens (wild type, WT) e knockout Caspase-1<sup>-/-</sup> ou IL-1R<sup>-/-</sup></i> .....	64

5.1.7	<i>Efeito da administração de Ifosfamida no quantidade de neutrófilos e macrófagos nas bexigas de camundongos C57BL/6 WT e IL-1R<sup>-/-</sup>.....</i>	67
5.2	<b>Efeito do pré-tratamento com Infiximabe e papel da deleção genética dos receptor TNFR1 e TNFR2 na CH induzida por IFO...</b>	70
5.2.1	<i>Efeito do pré-tratamento com infliximabe sobre o PUV e a permeabilidade na CH induzida por IFO.....</i>	70
5.2.2	<i>Efeito da administração prévia de Infiximabe sobre as alterações macroscópicas e microscópicas na CH induzida por IFO.....</i>	71
5.2.3	<i>Efeito da administração prévia de Infiximabe sobre o infiltrado neutrofílico vesical e a hipernocicepção visceral na CH induzida por IFO.....</i>	73
5.2.4	<i>Efeito da administração prévia de Infiximabe sobre a disfunção vesical “in vitro” na CH induzida por IFO.....</i>	74
5.2.5	<i>Efeito da administração de Ifosfamida nos níveis vesicais de TNF-<math>\alpha</math>.....</i>	75
5.2.6	<i>Efeito do pré-tratamento com Infiximabe sobre a quantidade de neutrófilos e macrófagos nas bexigas de camundongos com CH induzida por IFO.....</i>	76
5.2.7	<i>Efeito da administração de Ifosfamida no peso úmido vesical e parâmetros macroscópicos em camundongos C57BL/6 WT e TNFR1<sup>-/-</sup> ou TNFR1/R2<sup>-/-</sup>.....</i>	79
5.2.8	<i>Efeito da administração prévia de Infiximabe sobre o peso úmido vesical camundongos TNFR1/R2<sup>-/-</sup>.....</i>	82
5.2.9	<i>Efeito da administração de Ifosfamida na quantidade de neutrófilos e macrófagos em bexigas de camundongos C57BL/6 selvagens e TNFR1<sup>-/-</sup> ou TNFR1/R2<sup>-/-</sup>.....</i>	83
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	88
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	102
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	103



## 1 INTRODUÇÃO

O câncer representa hoje um dos principais problemas de saúde pública, com incidência estimada em 14,1 milhões e mortalidade em 8,2 milhões de casos por ano no mundo, sendo, com isso, a principal causa de morte em todo o mundo (FERLAY *et al.*, 2013). Essas estimativas são crescentes e relacionadas ao envelhecimento da população (DEGREGORI, 2013).

Em contrapartida, importantes avanços terapêuticos contra o câncer foram sendo desenvolvidos no último século, dentre eles a quimioterapia, a qual limita o crescimento dos tumores através do uso de fármacos. Com esses avanços, houve também um aumento no número de pessoas vivendo com câncer no mundo. Assim, em 2012 a prevalência mundial de câncer girava em torno de 32,6 milhões de pessoas (BRAY *et al.*, 2013).

O tratamento quimioterápico pode, de fato, prolongar a sobrevida de pacientes com câncer, contudo, pode também provocar efeitos colaterais os mais diversos, uma vez que não possui especificidade para as células tumorais. Assim, determinados regimes de quimioterapia podem provocar tantos efeitos colaterais a ponto de comprometer a qualidade de vida dos pacientes e, por fim, limitar a utilização dos quimioterápicos, quer levando à redução na dose, no número de ciclos de tratamento, ou até mesmo à interrupção do tratamento (LYMAN, 2009).

Os efeitos colaterais mais comuns da quimioterapia do câncer são inespecíficos, incluindo alopecia, náuseas e vômitos, anemia, fadiga, anorexia, dispepsia, mielossupressão (LIPP, 1999). Entretanto, a quimioterapia clássica pode também levar ao surgimento de uma série de efeitos adversos característicos de determinados fármacos ou de grupos de fármacos. Nesse contexto, podemos citar a cardiotoxicidade das antraciclinas; a nefrotoxicidade e a ototoxicidade dos compostos platínicos; as neuropatias sensitivas periféricas relacionadas à quimioterapia à base de paclitaxel ou de oxaliplatina; as mucosites gastrointestinais devido ao uso de antimetabólicos como o 5-fluorouracil e o metotrexato, e mais recentemente consequentes à utilização de regimes contendo irinotecano; a cistite hemorrágica provocada pelas oxazafosforinas (ciclofosfamida e ifosfamida), entre outros. Assim sendo, é importante pontuar que o entendimento da patogênese desses efeitos torna-se cada vez mais fundamental para o seu manejo clínico adequado (SONIS; KEEFE, 2013). Dentre os efeitos colaterais mais graves, a cistite

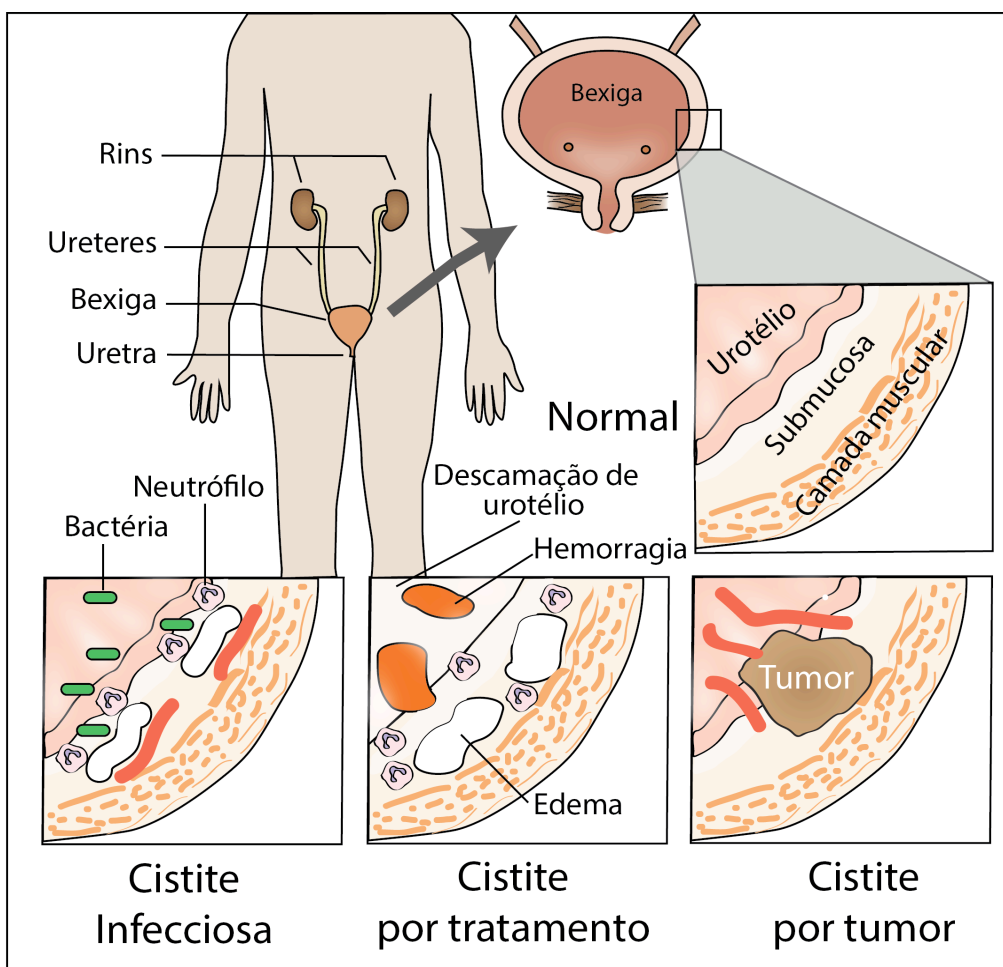
hemorrágica induzida por alguns agentes quimioterápicos permanece ainda com desfecho desafiador (LIVSHITS *et al.*, 2014).

## 1.1 Cistite

Cistite descreve uma síndrome clínica com acometimento da bexiga urinária e caracterizada por disúria, polaciúria, urgência, noctúria, dor suprapúbica e hematúria microscópica ou macroscópica (WEIN *et al.*, 2012).

Em pacientes com câncer, cistite é uma entidade clínica de ocorrência comum, podendo ser dividida em três categorias (FIGURA 1): cistite consequente a tumores de bexiga ou tecidos/órgãos adjacentes que infiltrem a bexiga; cistite induzida por quimioterapia ou radioterapia; cistite infecciosa que ocorre em pacientes imunocomprometidos (MOY, 2013).

Figura 1 – Causas de cistite em pacientes com câncer



Fonte: Elaborada pelo autor

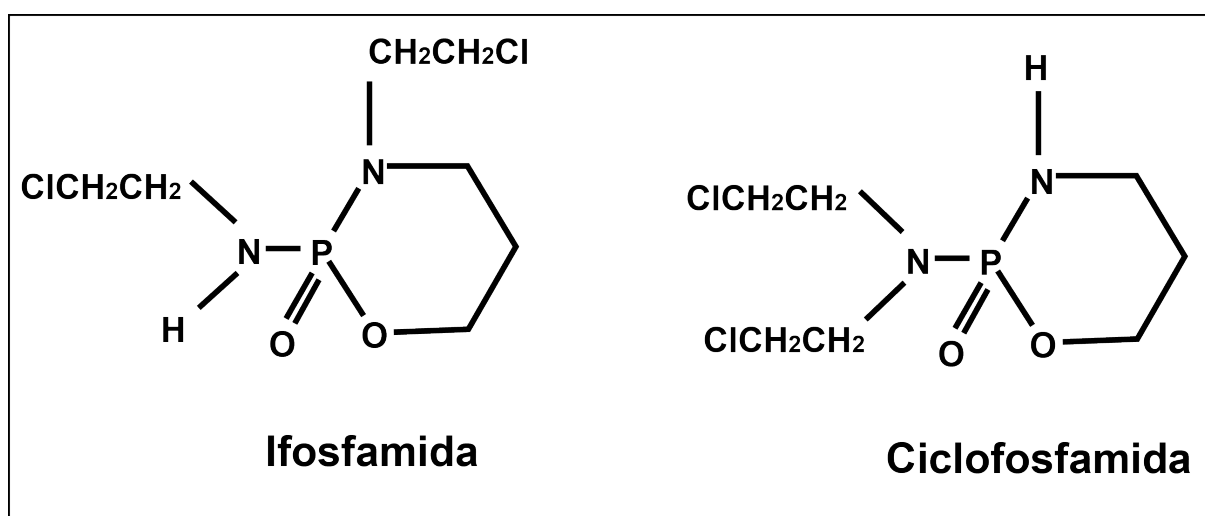
Nesse contexto, a cistite hemorrágica (CH) é considerada a forma mais grave no espectro das lesões vesicais induzidas pela quimioterapia, e é definida como inflamação na bexiga na presença de hemorragia (COGGINS *et al.*, 1960; MOY, 2013; STILLWELL; BENSON, 1988). Em pacientes com CH leve, a hematúria pode causar anemia, contudo, em casos mais graves, pode levar à instabilidade hemodinâmica devido a choque por hipovolemia induzida por perda sanguínea (MARINELLA, 2009).

A etiologia da CH é variável, e, embora substâncias como o bussulfano, microorganismos como o adenovírus, vírus BK, citomegalovírus, e terapias como a radioterapia sejam agentes etiológicos importantes, há uma maior prevalência dessa entidade nosológica com uso de quimioterapia, principalmente em esquemas à base de oxazafosforinas (ciclofosfamida ou ifosfamida) (SEBER *et al.*, 1999).

## 1.2 Oxazafosforinas

Ciclofosfamida e ifosfamida (FIGURA 2) são agentes alquilantes, mais especificamente mostardas nitrogenadas do grupo das oxazafosforinas, moléculas sintetizadas na década de 1960 pelo grupo do farmacologista alemão Norbert Brock na Asta-Werke (atualmente Baxter Oncology) (BROCK, 1996).

Figura 2 – Estrutura molecular da Ifosfamida e Ciclofosfamida



Fonte: Adaptado de Furlanut *et al.* (2003)

Durante a primeira guerra mundial, ficou evidente que o gás mostarda liberado por motivos bélicos causava leucopenia, aplasia da medula óssea e

destruição de tecidos linfáticos. Com isso, Gilman *et al.* (1963) investigaram os mecanismos envolvidos no efeito deletério desse gás, e, logo após, conduziram o primeiro ensaio clínico de quimioterapia contra o câncer com o primeiro análogo de mostarda nitrogenada, a ciclofosfamida. Anteriormente, Gilman *et al.* (1963) haviam-na testado com sucesso em um modelo de fibrossarcoma em ratos.

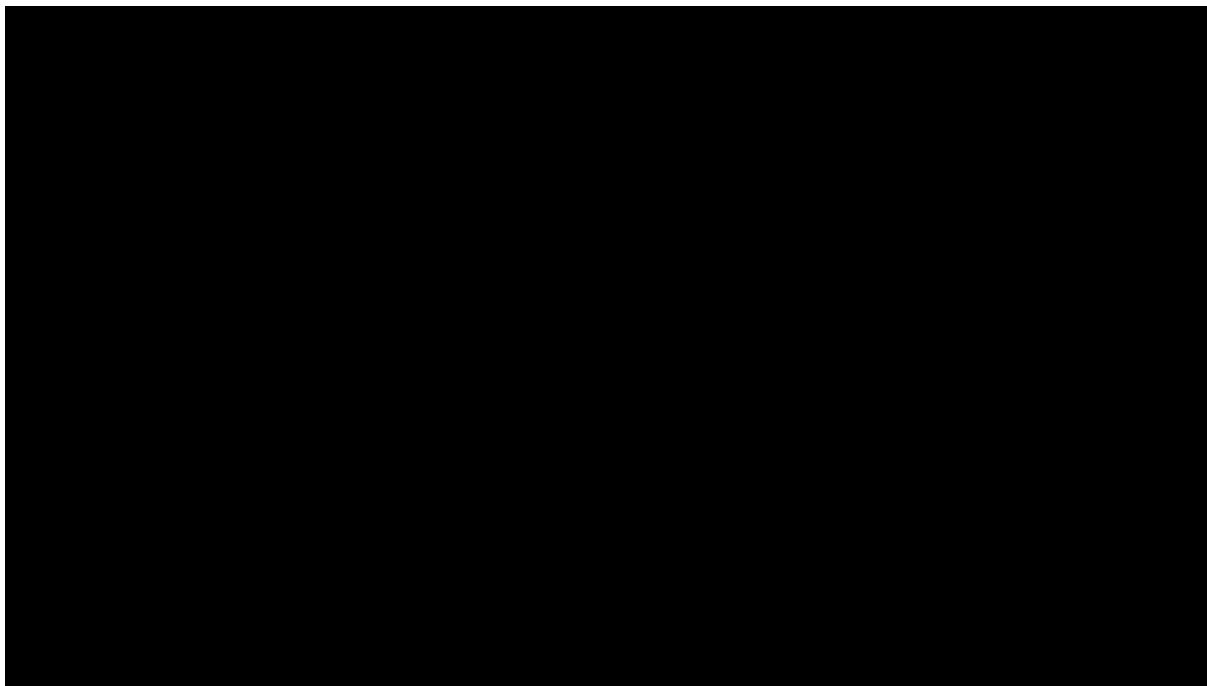
A ifosfamida (N,3-bis(2-cloroetil)tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-2-amino, 2-óxido) foi sintetizada como uma modificação química da ciclofosfamida (FIGURA 2), provendo uma estrutura com maior solubilidade em água, menor mielotoxicidade (permitindo uso em maiores doses), e melhor atividade antineoplásica (BROCK, 1996).

A ifosfamida (IFO) é metabolizada em uma variedade de metabólitos ativos e potencialmente tóxicos (FIGURA 3). Seu metabolismo é mediado pelo sistema de cadeias oxidativas do citocromo P450. A conversão de ifosfamida em 4-OH-ifosfamida é catalisado pela isoforma CYP3A4, e essa reação compete com a reação de decloroetilação, a qual gera o metabólito neurotóxico e nefrotóxico cloroacetaldeído. 4-OH-ifosfamida é um metabólito instável, existindo em equilíbrio com aldofosfamida, a qual é convertida espontaneamente em mostarda de isofosforamida (metabólito ativo) e acroleína (metabólito urotóxico). A isofosforamida tem a capacidade de promover uma ligação alquilante estável ao DNA celular, com a formação de uma ligação cruzada. Por impossibilidade de reparo da ligação cruzada no DNA, a célula entra em apoptose (FURLANUT; FRANCESCHI, 2003).

A ifosfamida tem indicação terapêutica em múltiplos tumores, incluindo câncer testicular de células germinativas, sarcoma de partes moles, câncer pancreático (recorrente ou refratário), câncer cervical (recorrente ou metastático), e pode ser usada ainda com indicação *off-label* para câncer de bexiga (metastático), câncer do colo do útero (recorrente ou metastático), câncer de ovário, câncer de pulmão de pequenas células (recorrente), linfoma de Hodgkin (recorrente ou refratário), linfomas não-Hodgkin, timoma (avançado), sarcoma de Ewing, osteossarcoma (IFOSFAMIDE: DRUG INFORMATION, 2013).



Figura 3 – Principais vias do metabolismo da Ifosfamida



Fonte: Adaptado de Furlanut *et al.* (2003)

### 1.3 Cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas

A incidência de CH induzida por oxazafosforinas é variável e parece ser dependente do regime de tratamento realizado. Antes da utilização de esquemas profiláticos, CH ocorria em 10-40% dos pacientes com tumores sólidos expostos a altas doses de ciclofosfamida (WATSON; NOTLEY, 1973), e em até 70% dos pacientes submetidos a regime de indução com ciclofosfamida para transplante de medula óssea (SHEPHERD *et al.*, 1991). A incidência foi reduzida para 6-50%, utilizando medidas profiláticas, tais como hiper-hidratação, irrigação da bexiga e uso do 2-mercapto-etano-sulfonato de sódio (Mesna) (MEISENBERG *et al.*, 1994; SHEPHERD *et al.*, 1991; VOSE *et al.*, 1993). Em outro estudo, Hadjibabaie *et al.* (2008) submeteram pacientes com câncer hematológico a regime baseado em ciclofosfamida para realização de transplante alogênico de medula óssea, e evidenciaram que a irrigação contínua da bexiga urinária com salina associado ao protocolo padrão com uso de mesna e hiper-hidratação pode reduzir a incidência de CH aguda (32,5% vs 50%) e tardia (7,7% vs 45%) quando comparado ao protocolo padrão de profilaxia.

O mesna (2-mercaptoetano sulfonato sódico) é um composto sulfidríla que age inativando a acroleína, identificada como o metabólito responsável pela urotoxicidade intrínseca ao tratamento com oxazafosforinas. Após injeção intravenosa, o mesna circula em sua forma dimérica, o dimesna, a qual é pouco absorvida, mas novamente reduzido a mesna por metabolismo renal, e excretado na urina. Talvez por esse motivo, o mesna seja capaz de prevenir a CH sem atuar na atividade antitumoral das oxazafosforinas (ELIAS *et al.*, 1990).

Apesar das abordagens profiláticas existentes, a CH continua sendo uma complicação comum quando o agente alquilante é usado em altas doses de quimioterapia durante o transplante de medula óssea, com consequente hospitalização prolongada (HADJIBABAIE *et al.*, 2008; KOC *et al.*, 2000) e em alguns casos morte (EL-ZIMAITY *et al.*, 2004). O protocolo profilático padrão não protege completamente a cistite induzida pela quimioterapia, mesmo quando os sinais clínicos e os sintomas não são relatados pelos pacientes (LIMA *et al.*, 2007). Em estudo clínico randomizado controlado com pacientes submetidos à quimioterapia baseada em ifosfamida, pesquisadores do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) demonstraram que, mesmo com a profilaxia clássica com três doses de mesna, 66,7% dos pacientes apresentavam algum grau de lesão visto na cistoscopia, e 100% apresentaram danos no urotélio, tais como edema, exocitose, e hemorragia (LIMA *et al.*, 2007), sugerindo a presença de uma "cistite hemorrágica subclínica." Ainda não se sabe se essa ocorrência pode ter consequências negativas.

Assim, a CH permanece um problema clínico, e várias medidas preventivas e terapêuticas veem sendo analisadas na intenção de inibir a inflamação e principalmente a hemorragia. Em casos de hemorragia grave, diversas intervenções são utilizadas para produzir hemostasia, tais como a irrigação contínua da bexiga com solução salina isotônica, a evacuação do coágulo por cistoscopia, a eletrocoagulação de vasos hemorrágicos, a terapia intravesical com produtos químicos (alumínio, formalina, nitrato, fenol, prata e prostaglandina), e mais recentemente a oxigenoterapia hiperbárica. Em casos mais graves pode ser realizada a embolização ou a ligadura das artérias vesicais ou ilíacas internas (GINÉ *et al.*, 2003), o desvio urinário, e até mesmo a cistectomia, embora tais medidas devam ser reservadas para aqueles casos de hemorragia refratária (MANIKANDAN *et al.*, 2010).

Portanto, a compreensão da patogênese da CH induzida por oxazafosforinas deve ser melhor explorada para nortear o desenvolvimento de medidas preventivas e estratégias terapêuticas com maior eficácia. Por essa razão, modelos animais de CH induzida por oxazafosforinas foram desenvolvidos para contribuir no entendimento da patogênese da CH. A hipótese mais recente implica na participação de citocinas, enzimas induzíveis e fatores de transcrição.

#### **1.4 Modelo experimental de CH induzida por IFO**

Diversos modelos animais foram desenvolvidos na tentativa de mimetizar as alterações morfológicas e funcionais causadas por oxazafosforinas em humanos. Com base na evidência de que a CH é observada com maior frequência em pacientes submetidos a regimes à base de ifosfamida do que ciclofosfamida (ZHANG *et al.*, 2006), Ribeiro *et al.* (2002) desenvolveram um modelo experimental para estudar a CH induzida por ifosfamida em camundongos. Esses pesquisadores realizaram experimentos de curva dose-resposta e tempo-resposta com pico de inflamação na dose de 400 mg/kg, 12h após a injeção de ifosfamida. Anteriormente, foram estabelecidos critérios macroscópicos e microscópicos para avaliar a CH induzida por ciclofosfamida (GRAY *et al.*, 1986), os quais foram repetidos no modelo com uso de ifosfamida. Além disso, o aspecto microscópico das bexigas assemelha-se aos encontrados na correspondente patologia humana, com congestão vascular, edema, hemorragia, deposição de fibrina, infiltração de neutrófilos e desnudação epitelial (LIMA *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2002). Com esse modelo, foi possível avaliar a atividade de agentes preventivos de CH, como talidomida, pentoxifilina, (RIBEIRO *et al.*, 2002) latex de *Calotropis procera* (ALENCAR *et al.*, 2004), amifostina, glutathione (BATISTA *et al.*, 2007), oprevelcina ou IL-11 (MOTA *et al.*, 2007), e ainda demonstrar alguns mediadores envolvidos na patogênese da CH, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e a Interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ), óxido nítrico (RIBEIRO *et al.*, 2002), Interleucina-4 (IL-4) (MACEDO *et al.*, 2012), entre outros (Para revisão, consultar Ribeiro *et al.*, 2012).

## 1.5 Patogênese da CH induzida por oxazafosforinas

Durante algumas décadas, os mecanismos envolvidos na patogênese da CH induzida por oxazafosforinas estiveram totalmente desconhecidos.

A primeira descrição de hematúria e dano vesical após a administração de ciclofosfamida foi feita logo após sua liberação como agente antineoplásico em 1958 (ARNOLD *et al.*, 1958). Em seguida, a ciclofosfamida também foi capaz de causar CH quando experimentalmente utilizada em ratos e cachorros (PHILIPS *et al.*, 1961).

Inicialmente, acreditava-se que a ciclofosfamida era capaz de causar lesão direta no tecido vesical, contudo, Philips *et al.* (1961) demonstraram que o agente causador da CH poderia ser um metabólito da ciclofosfamida, uma vez que, cães que receberam injeção intravesical de urina proveniente de animais tratados com ciclofosfamida desenvolveram CH. Dez anos mais tarde, a acroleína foi identificada na urina de animais tratados com ciclofosfamida (ALARCON; MEIENHOFER, 1971).

Em 1979, Cox *et al.* definitivamente identificaram a acroleína como o agente causador da CH induzida por ciclofosfamida. Apesar desse avanço no entendimento da etiologia da CH, foi apenas na década de 90 que se demonstrou pela primeira vez a participação de mediadores pró-inflamatórios, tais como óxido nítrico (SOUZA-FILHO *et al.*, 1995) e citocinas (GOMES *et al.*, 1997) na gênese da CH.

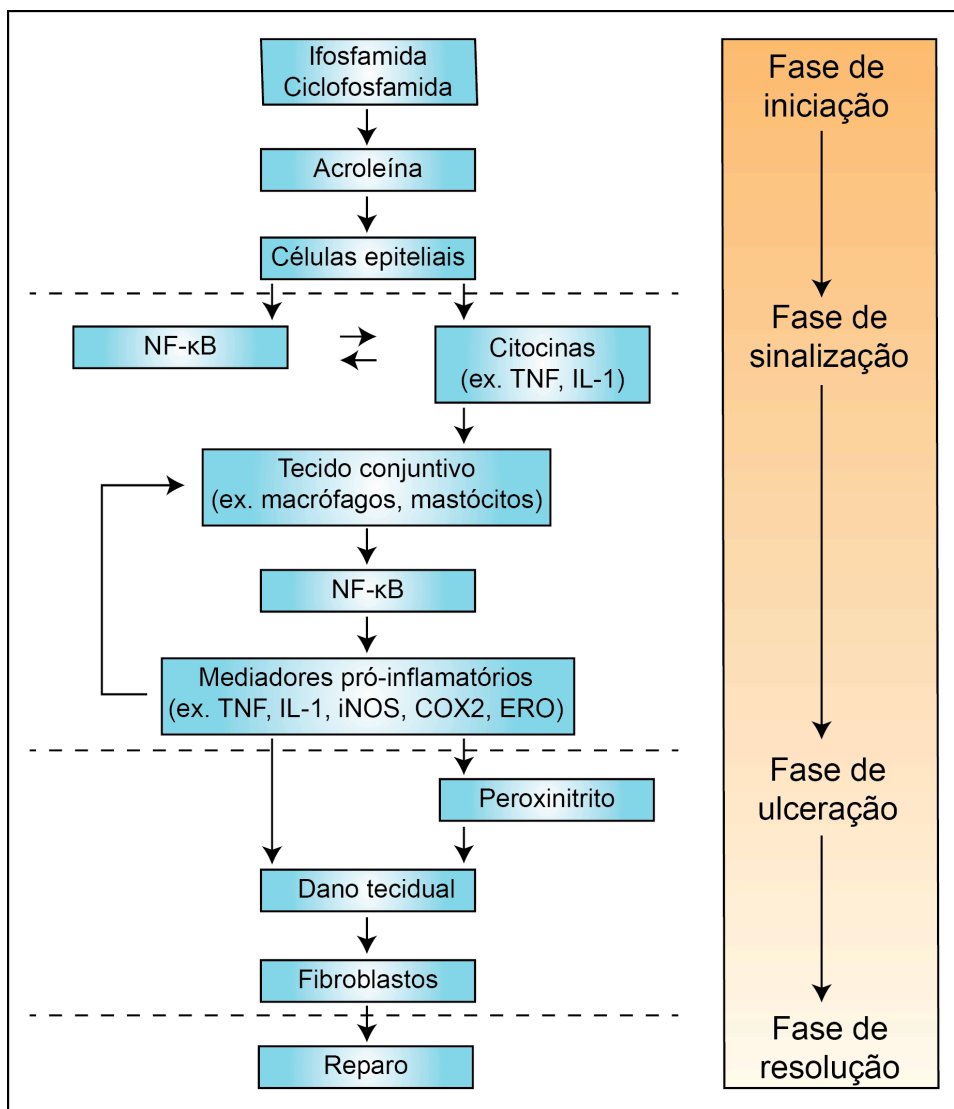
Desde então vários outros mediadores pró- e anti-inflamatórios foram implicados na patogênese da CH. Nesse contexto, a partir da revisão do grupo de pesquisa do LAFICA (Ribeiro *et al.*, 2012) foi possível vislumbrar a CH como um processo concatenado com múltiplas etapas. Nesse sentido, a CH foi dividida em quatro etapas principais (FIGURA 4):

- a) a primeira etapa (fase de iniciação) ocorre depois do acúmulo de acroleína na bexiga, levando a danos uroteliais.
- b) a fase seguinte (fase inflamatória) é marcada pela *up-regulation* dos fatores de transcrição, tais como o factor nuclear *kappa*-B (NF-*kappa*B) (KIUCHI *et al.*, 2009; KORKMAZ *et al.*, 2007) e a liberação de citocinas inflamatórias pelas células residentes epiteliais e

conjuntivas, tais como os macrófagos (GOMES *et al.*, 1995; RIBEIRO *et al.*, 2002). A resposta amplificada é marcada por grande quantidade de citocinas, além de espécies reativas de oxigênio (KORKMAZ *et al.*, 2007) e nitrogênio (KORKMAZ *et al.*, 2005) e a expressão de enzimas inflamatórias, tais como a óxido nítrico sintase induzida (OTER *et al.*, 2004; SOUZA-FILHO *et al.*, 1997) e a ciclooxigenase-2 (MACEDO *et al.*, 2008a; MACEDO *et al.*, 2008b).

- c) a terceira fase (fase sintomática) envolve o desnudamento urotelial e a formação de úlceras, também levando à dor (MARTINS *et al.*, 2012) e disfunção vesical (MACEDO *et al.*, 2011).
- d) a quarta etapa (fase de cicatrização) envolve o reparo dos tecidos, com a possível sinalização a partir de fibroblastos e a liberação de fatores de crescimento, tais como fator de crescimento de queratinócitos (ULICH *et al.*, 1997).

Figura 4 – Sequência de fases da patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas



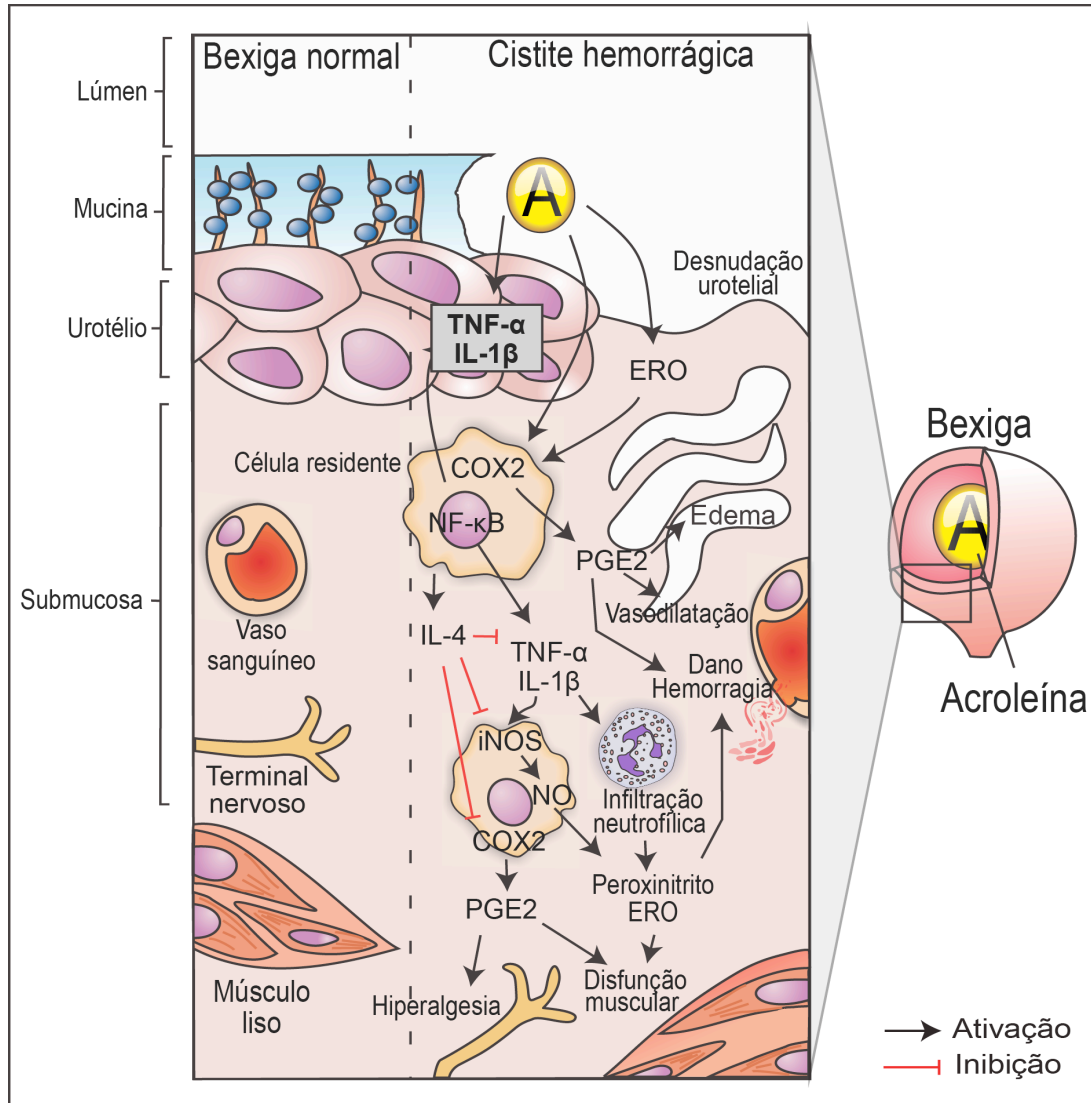
Fonte: Adaptado de Ribeiro *et al.* (2012)

Através do conhecimento prévio da participação de mediadores inflamatórios Ribeiro *et al.* (2012) propuseram um modelo hipotético que representa as vias de sinalização celulares e moleculares presentes na patogênese da CH (FIGURA 5).

Com os avanços no entendimento da patogênese de diversas doenças inflamatórias, tornou-se possível o desenvolvimento de moléculas com seu alvo direcionado às vias de sinalização responsáveis pela gênese de processos inflamatórios, constituindo uma nova modalidade terapêutica conhecida por terapia alvo dirigida (FELDMANN *et al.*, 2008). Atualmente, terapias alvo dirigidas vem

sendo amplamente utilizadas em doenças inflamatórias dependentes da sinalização de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Figura 5 – Mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese da CH



Fonte: Adaptado de Ribeiro *et al.* (2012)

## 1.6 Interleucina-1 (IL-1)

Durante séculos, a febre esteve diretamente associada a infiltração de leucócitos no organismo. Em 1943, o grupo do pesquisador Eli Menkin evidenciou que fatores solúveis presentes no sobrenadante de peritonite estéril de coelhos eram capazes de induzir febre ao serem injetados em outros coelhos. Outros pesquisadores obtiveram resultados semelhantes, contudo, com os recursos tecnológicos existentes na época, era inviável realizar a purificação das moléculas responsáveis pela indução da febre (DINARELLO, 2010). Três décadas depois, Dinarello *et al.* (1974) purificaram duas proteínas provenientes de leucócitos

humanos capazes de induzir febre, uma delas foi denominada de pirógeno leucocítico (LP), a qual, em 1979, passaria a ser denominada interleucina-1 $\beta$ . A segunda molécula pirógena atualmente é conhecida como IL-1 $\alpha$  (DINARELLO, 2010).

O precursor de IL-1 $\alpha$  está constitutivamente presente nas células de indivíduos normais, sendo encontrada nas células epiteliais da pele, das mucosas, nas células endoteliais, assim como em células do fígado, pulmão e rins. Como o precursor de IL-1 $\alpha$  é uma molécula ativa, pode atuar na defesa inata. Quando exposto a condições patológicas, IL-1 $\alpha$  migra para a membrana das células, podendo ligar-se ao receptor de IL-1 (DINARELLO *et al.*, 2012). Durante uma inflamação estéril aguda, a morte celular por necrose pode causar a liberação do precursor de IL-1 $\alpha$ , e este pode ser o primeiro passo para o recrutamento de neutrófilos (CHEN *et al.*, 2007).

Diferentemente da IL-1 $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  não está presente em células de indivíduos normais. IL-1 $\beta$  é, de fato, o produto de um número limitado de células, como monócitos, macrófagos e células dendríticas. A produção de IL-1 $\beta$  é dependente de sua transcrição, a qual pode ser estimulada por produtos microbianos e outras citocinas (TNF, IL-18, IL-1 $\alpha$  ou até mesmo a própria IL-1 $\beta$ ). O produto dessa transcrição é na verdade um precursor inativo, o qual precisa ser clivado pela caspase-1 para que seja liberado seu produto ativo. A caspase-1, por sua vez, também é um produto inativo, a qual é ativada por um complexo grupo de proteínas denominado inflamassoma (DINARELLO *et al.*, 2012).

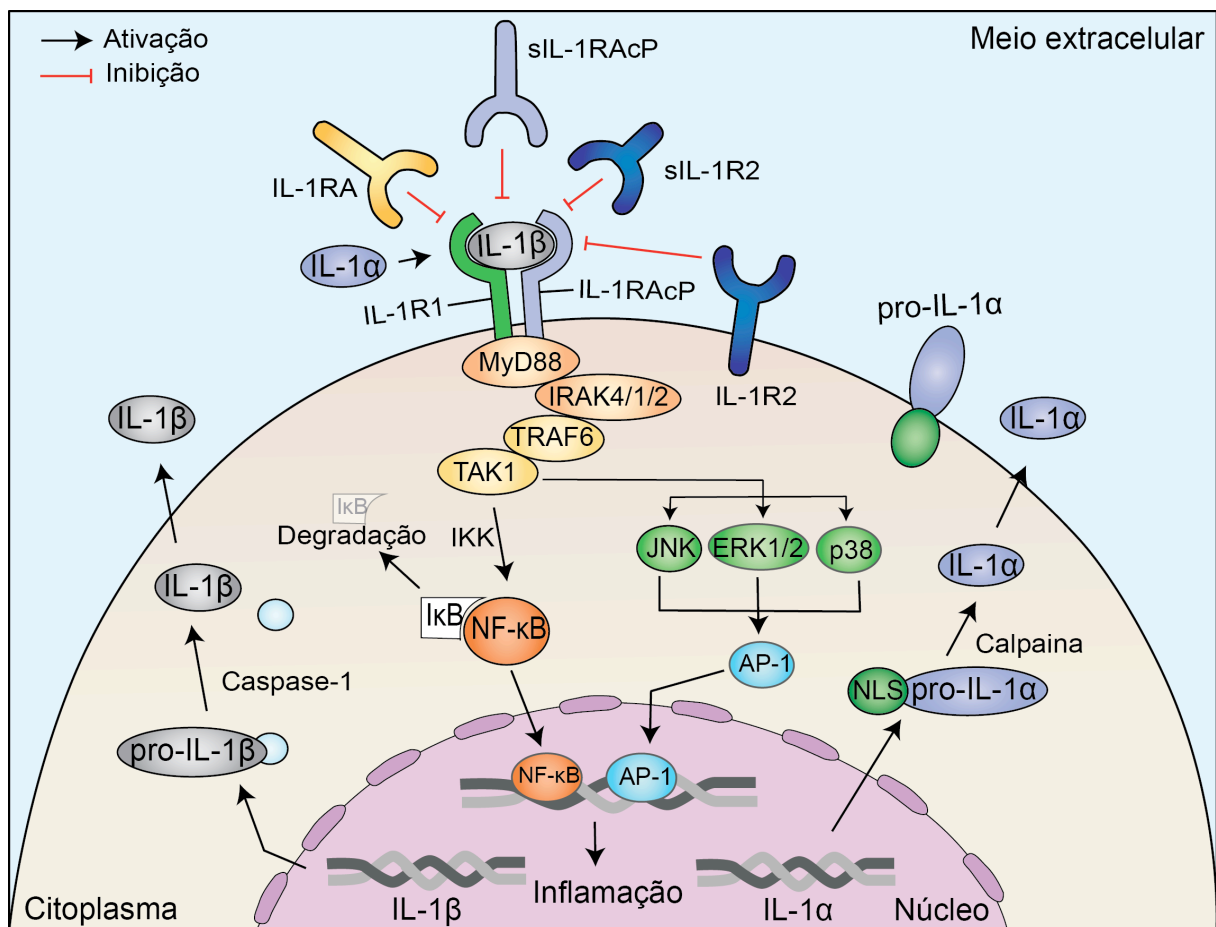
Ambas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ligam-se ao receptor IL-1R tipo I, que é um receptor amplamente expresso pelas células. Um terceiro ligante, o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), liga-se ao IL-1R com especificidade e afinidade similar aos outros dois ligantes, contudo sem produzir efeito biológico conhecido. O receptor IL-1R tipo II pode ligar-se aos ligantes IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , contudo não denota sinalização intracelular, servindo como um receptor *decoy* (WEBER *et al.*, 2010). Além disso, existem domínios solúveis no citoplasma (sIL-1RI, sIL-1RII, and sIL-1RAcP), os quais podem se unir aos ligantes inativando-os. (WEBER *et al.*, 2010).

A via de sinalização da IL-1 inicia com a reação entre o ligante e o receptor IL-1R1, a qual facilita a formação de um heterodímero entre IL-1R1 e IL-1RAcP. Posteriormente, há a fosforilação de proteínas acopladas ao receptor, MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) e IRAK4 (*interleukin-1*



receptor-activated protein kinase), a partir das quais ocorre uma sequência de fosforilações de proteínas (IRAK1, IRAK2 e TRAF6 [tumor necrosis factor-associated factor]) que culminam na ativação de fatores de transcrição NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) e AP-1 (activator protein 1) (FIGURA 6) (DINARELLO, 2011a).

Figura 6 – Via de sinalização intracelular da interleucina-1



Fonte: Adaptado de Risbud *et al.* (2014).

Legenda: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são sintetizados como proteínas precursoras (pro-IL-1 $\alpha$  e pro-IL-1 $\beta$ ), que são submetidas a um processo de clivagem pela calpaina e caspase-1, respectivamente, para produzir suas formas ativas. Embora pro-IL-1 $\beta$  seja biologicamente inativa, a pro-IL-1 $\alpha$  associada a membrana pode sinalizar através do receptor IL-1R nas células adjacentes. Adicionalmente, a translocação nuclear de pro-IL-1 $\alpha$  ou a clivagem N-terminal podem induzir resposta biológica. pro-IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  podem se ligar ao receptor IL-1R1, que é capaz de recrutar seu co-receptor IL-1RAcP. Uma cascata de eventos à jusante resulta em ativação de proteínas de sinalização, como quinases ativadas por mitógenos (JNK, p38, ERK1/2), fatores de transcrição, incluindo NF $\kappa$ B (subunidades p65 e p50) e c-Jun (uma subunidade de AP-1), que controlam a expressão de uma série de genes envolvidos na inflamação e catabolismo. A sinalização de IL-1R é modulada por inibidores, como IL-1R2, sIL-1R2, sIL-1RAcP e IL-1Ra.

Abreviações: AP-1, proteína de ativação 1; ERK1/2, quinase reguladora de sinal extracelular 1/2; I $\kappa$ B, inibidor do fator nuclear  $\kappa$ B; IKK, quinases I $\kappa$ B; IL-1R1, receptor da interleucina-1 1; IL-1R2, receptor da interleucina-1 2; IL-1Ra, antagonista do receptor de IL-1; IL-1RAcP, proteína acessória do receptor da interleucina-1; IRAK, proteína quinase ativadora do receptor de IL-1; JNK, quinase c-Jun N-terminal; MyD88, fator de diferenciação mielóide 88; NF $\kappa$ B, fator nuclear  $\kappa$ B; sIL-1R2, IL-1R2 solúvel;

sIL-1RAcP, IL-1RAcP solúvel; TAK1, proteína quinase 1 ativadora do fator de crescimento transformador- $\beta$ ; TRAF6, fator 6 associado ao receptor de TNF.

A IL-1 $\beta$  está fundamentalmente implicada na patogênese de diversas doenças, como a diabetes, o acidente vascular cerebral, a artrite reumatoide, entre outras (DINARELLO, 2011b).

Gomes *et al.* (1997) avaliaram o efeito da injeção sistêmica de antissoro anti-IL-1 $\beta$  no modelo animal de CH induzida por ciclofosfamida, e evidenciaram prevenção de lesão vesical. Posteriormente, Ribeiro *et al.* (2002) realizaram um tratamento prévio em animais submetidos à CH induzida por ifosfamida com pentoxifilina, uma substância imunomoduladora que reduz a síntese de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e evidenciaram uma importante inibição dos danos vesicais. Além disso, foi demonstrado, através de imunohistoquímica, que IL-1 $\beta$  encontra-se aumentada nas células epiteliais e subepiteliais de bexigas de ratos tratados com ifosfamida (MACEDO *et al.*, 2011).

Considerando-se a capacidade de IL-1 $\beta$  para modular diversos processos inflamatórios, dentre eles a CH, a sua inibição seletiva torna-se um alvo terapêutico atraente.

### **1.6.1 Antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA)**

Anakinra é uma forma recombinante do IL-1RA endógeno, que difere da forma nativa na medida em que não é glicosilado e tem uma metionina N-terminal adicional. Anakinra está aprovado para o tratamento de artrite reumatoide, com dose de 100 mg ao dia, contudo possui uma menor eficácia em comparação com os inibidores de TNF, e o uso concomitante com inibidores de TNF deve ser evitado devido ao risco aumentado de infecções graves (STONE, 2013a). Apesar disso, anakinra mostrou-se eficaz no tratamento de um grande espectro de doenças (DINARELLO *et al.*, 2012), como:

- a) Doenças das articulações:
  - espondilite anquilosante;
  - osteoartrite erosiva das mãos;
- b) Doenças autoinflamatórias sistêmicas hereditárias:
  - febre familiar do Mediterrâneo;
  - síndrome periódica associada ao receptor TNF;

c) Doenças inflamatórias sistêmicas:

- artrite idiopática juvenil sistêmica;
- doença de Still;
- doença de Behçet

c) Doenças inflamatórias comuns:

- gota;
- diabetes tipo 2;
- hidradenite supurativa;
- insuficiência cardíaca sistólica;
- síndrome do olho seco;
- psoríase pustulosa.

Apesar dos avanços no entendimento da biologia do IL-1, não se mostrou ainda quanto da eficácia do anakinra se deve à inibição de IL-1 $\alpha$  e quanto à inibição de IL-1 $\beta$ . Contudo, o uso de anakinra é preferível em condições de fase aguda, devido sua habilidade de bloquear a ação das duas citocinas (DINARELLO *et al.*, 2012).

Levando em consideração a eficácia do anakinra no tratamento de inúmeras doenças inflamatórias, em especial em fase aguda (DINARELLO *et al.*, 2012), torna-se atraente a realização de estudos pré-clínicos para investigar sua eficácia no tratamento da CH.

## 1.7 Fator de necrose tumoral (TNF)

Em 1893, o médico William Coley publicou um trabalho no qual tratava pacientes com sarcoma através do extrato de bactérias provenientes de erisipelas, evidenciando redução tumoral com presença de necrose hemorrágica. Quase um século depois, Carswell *et al.* (1975) identificaram um fator presente no soro de camundongos com endotoxemia capaz de induzir necrose hemorrágica em sarcomas de camundongos em modelo de tumor subcutâneo singeneico. Esse fator ficou conhecido como Fator de Necrose Tumoral (TNF), e seu correspondente humano foi clonado apenas em 1985 (PENNICA *et al.*, 1985). Após a clonagem do TNF, foi possível identificar a semelhança estrutural e funcional com uma molécula produzida por linfócitos, a linfotóxina- $\alpha$ , com isso, o TNF passou a ser denominado

TNF- $\alpha$  e a linfotoxina- $\alpha$  de TNF- $\beta$ , e ambos pertencem a uma família de ligantes relacionados ao TNF (WAJANT *et al.*, 2003).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida por diversas células, dentre elas macrófagos, linfócitos, neutrófilos (GRIVENNIKOV *et al.*, 2005), nas quais atua como importante modulador da função imune durante a inflamação, proliferação celular, diferenciação e apoptose (ZELOVÁ; HOŠEK, 2013).

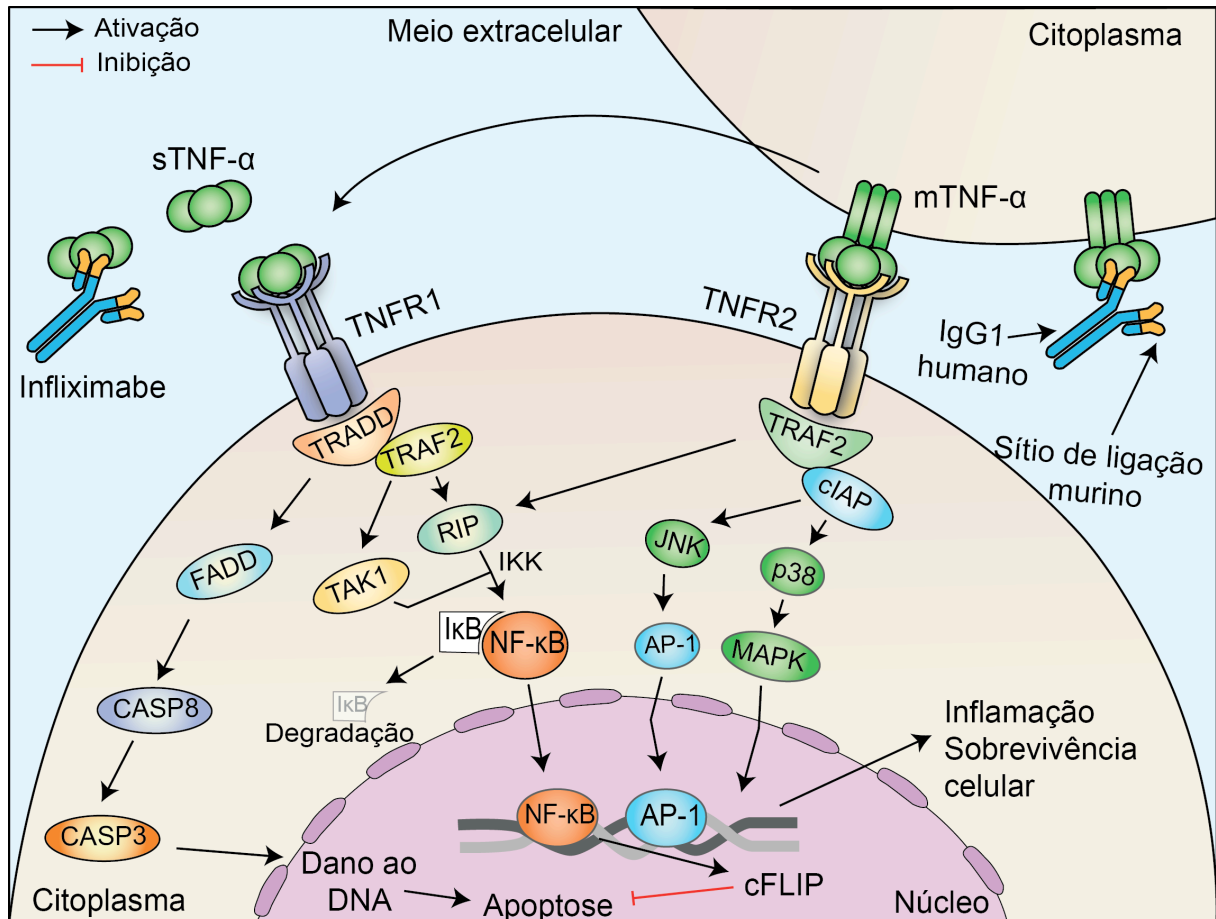
O TNF- $\alpha$  apresenta-se como uma proteína de membrana tipo II (TNFm), que pode ser clivada por metaloproteases com a liberação de uma forma solúvel (TNFs) (FIGURA 7). Ambas as formas tem funções distintas *in vivo*, TNFs está envolvido principalmente no desenvolvimento da inflamação aguda e crônica, enquanto o TNFm participa do desenvolvimento de tecidos linfoides e da proteção contra infecções bacterianas intracelulares, inflamação crônica e autoimunidade (RICHTER *et al.*, 2012).

As respostas celulares provenientes do TNF são sinalizadas a partir de dois receptores, TNFR1 (p55, CD120a) e TNFR2 (p75, CD120b). O TNFR1 pode ser ativado por ambas as formas de TNF, já o TNFR2 é efetivamente ativado apenas pelo TNFm, apesar de também se ligar ao TNFs. Uma vez ativados, ambos os receptores utilizam vias distintas de sinalização intracelular, contudo podendo haver interações entre elas (FIGURA 7) (LOCKSLEY *et al.*, 2001).

O TNFR1 ativa a sinalização clássica do fator de transcrição (NF- $\kappa$ B) e, através do seu domínio de morte celular, pode ativar a via das caspases. Por outro lado, o TNFR2 não possui um domínio de morte celular e possui funções citoprotetoras através da ativação clássica e não clássica do NF- $\kappa$ B. Dessa forma, TNFR1 e TNFR2 podem transmitir sinalizações opostas, com TNFR2 suprimindo a resposta pró-inflamatória mediada pelo TNFR1 e exercendo funções de regeneração (NAUDÉ *et al.*, 2011).

A desregulação da sinalização proveniente do TNF pode exercer um importante papel em diversas doenças humanas, incluindo artrite reumatoide, psoríase, colite ulcerativa e doença de Crohn (FIGURA 8) (AGGARWAL *et al.*, 2012).

Figura 7 – Via de sinalização intracelular do fator de necrose tumoral e mecanismo de inibição do anticorpo infliximabe

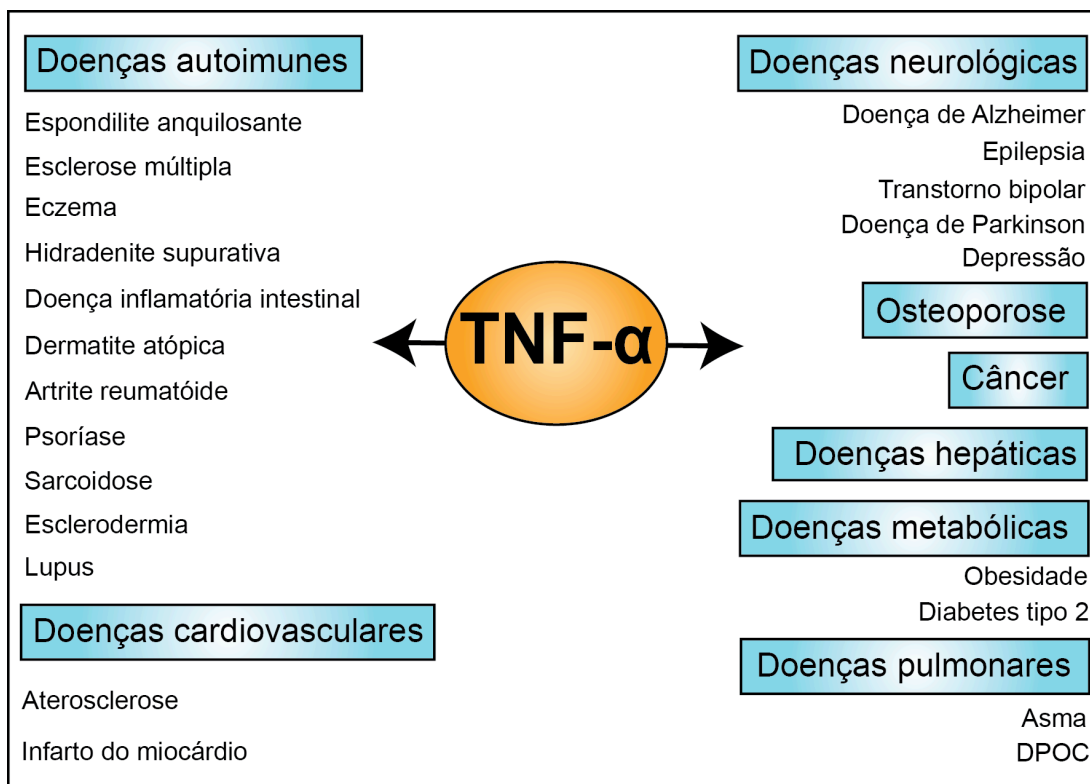


Fonte: Adaptado de Faustman; Davis (2010); Knight *et al.* (1993); Naudé *et al.* (2011).

Legenda: O fator de necrose tumoral solúvel (sTNF) liga-se ao receptor de TNF tipo 1 (TNFR1), e o TNF transmembranar (mTNF) liga-se a ambos TNFR1 e TNFR2. Com isso, há a estimulação de dois processos diferentes. Em geral, a sinalização do TNFR1 resulta em estímulo de caspase-3 e resulta em apoptose, dependendo do tipo celular, do estado de ativação celular e do ciclo celular. TNFR1 pode também produzir estímulos pró-inflamatórios, através da estimulação de fatores de transcrição. Em contraste, a sinalização de TNFR2 induz vias de sobrevivência e proliferação celular.

Abreviações: AP1, proteína de ativação 1; cFLIP, proteína inibidora celular FLICE-like; cIAP, proteína inibidora de apoptose celular; FADD, domínio de morte associado ao Fas; IKK, quinase I $\kappa$ B; JNK, quinase Jun N-terminal; MAPK, proteína quinase ativada por mitógenos; NF- $\kappa$ B, fator nuclear  $\kappa$ B; RIP, proteína interagindo ao receptor; TRADD, domínio de morte associado ao TNFR1; TRAF, fator associado ao receptor TNF; TAK1, proteína quinase 1 ativadora do fator de crescimento transformador- $\beta$ .

Figura 8 – Doenças com patogêneses fortemente relacionadas ao TNF



Fonte: Adaptado de Aggarwal *et al.* (2012)

Na CH, a participação do TNF- $\alpha$  foi investigada anteriormente por Gomes *et al.* (1995), que demonstraram claramente inibição na lesão tecidual induzida por ciclofosfamida ao utilizar antisoro anti-TNF- $\alpha$ . Essa evidência foi corroborada por Ribeiro *et al.* (2002) que evidenciou inibição nas lesões vesicais induzidas por ifosfamida ao utilizar talidomida, um inibidor seletivo da produção de TNF- $\alpha$  pelo aumento da degradação de seu RNAm (SAMPAIO *et al.*, 1991).

### 1.7.1 Anticorpo anti-TNF

Atualmente, estão disponíveis para uso comercial cinco agentes com alvo no TNF: infliximabe, etanercept, adalimumabe, certolizumabe pegol e golimumabe (STONE, 2013b).

O Infliximabe (FIGURA 7) é um anticorpo monoclonal quimérico humano-murino com uma região constante humana (Fc) e uma região murina variável (Fv), que apresenta alta especificidade, afinidade e avidéz ao TNF- $\alpha$ , tanto na forma solúvel como na forma transmembranar, contudo sem afinidade ao TNF- $\beta$

(FELDMANN, 2002). A administração clínica é realizada por via intravenosa, com doses variando de 3 a 10 mg/kg, com meia-vida em torno de 9,5 dias. O Infiximabe tem apresentado boa resposta no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, com indicação clínica na artrite reumatóide (WIENS *et al.*, 2010), doença de Crohn (PEYRIN-BIROULET *et al.*, 2008), espondilite anquilosante (INMAN *et al.*, 2010), colite ulcerativa (OUSSALAH *et al.*, 2010) e psoríase (MOSSNER; REICH, 2009). Contudo, apesar de em baixa proporção, o infliximabe também pode apresentar eventos adversos, como reação cutânea, cefaleia, náuseas, diarreia, elevação de transaminases, infecção de vias aéreas superiores (STONE, 2013b).

Com a perspectiva de que a terapia anti-TNF- $\alpha$  é eficaz no tratamento de várias doenças (AGGARWAL *et al.*, 2012), torna-se atraente a realização de estudos pré-clínicos que investiguem a eficácia de agentes moduladores específicos do TNF no tratamento da CH.

## 2 JUSTIFICATIVA

Durante vários anos, estudos tem demonstrado o relevante efeito urotóxico induzido pelas oxazafosforinas em pacientes submetidos a regimes de quimioterapia do câncer (COGGINS *et al.*, 1960; MOY, 2013; STILLWELL; BENSON, 1988) ou regimes de condicionamento para transplante de medula óssea (HADJIBABAIE *et al.*, 2008; SEBER *et al.*, 1999). Clinicamente, os pacientes que desenvolvem CH apresentam queixas de disúria, hematúria, polaciúria, dor abdominal (WEIN *et al.*, 2012).

Com o objetivo de combater a CH, diversas condutas preventivas e terapêuticas são aplicadas no manejo da urotoxicidade, contudo, nem sempre logram êxito (EL-ZIMAITY *et al.*, 2004; HADJIBABAIE *et al.*, 2008; KOC *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2007). Esse fato aumenta a importância de se estudar a fisiopatologia das lesões vesicais resultantes do tratamento com oxazafosforinas para o desenvolvimento de medidas mais eficazes.

O modelo de CH induzida por IFO em camundongos é de extrema relevância, uma vez que as alterações agudas evidenciadas nos camundongos, como inflamação da bexiga (RIBEIRO *et al.*, 2002), disfunção do músculo liso vesical (MACEDO *et al.*, 2011) e hiperalgesia (Martins *et al.*, 2012), mimetizam a síndrome clínica apresentada por pacientes com CH. Através do modelo de CH induzida por IFO, foi possível demonstrar a participação de mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, NO e outros e sua importância na gênese da CH (RIBEIRO *et al.*, 2002).

Com os avanços atuais da terapêutica de doenças inflamatórias, alguns medicamentos visam bloquear de forma seletiva moléculas essenciais para a fisiopatologia de algumas doenças. Nesse contexto, o Infliximabe (anticorpo anti-TNF- $\alpha$ ) foi aprovado para o uso em pacientes com artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, e o Anakinra (antagonista do receptor de IL-1) foi aprovado para o uso em pacientes com artrite reumatóide.

Dessa forma, o presente estudo se justifica como uma tentativa de se demonstrar que as novas terapias alvo dirigidas à citocinas, já utilizadas no tratamento de algumas doenças, poderiam proporcionar benefícios na CH. Para isso, foi adotado o modelo de CH induzida por IFO, o qual foi ampliado, visando investigar, além da inflamação, novos parâmetros, como disfunção e



hipernocicepção nos animais, assim, simulando a síndrome clínica de forma mais ampla.

Portanto, o foco principal de investigação deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos uroprotetores agudos do Infliximabe e do Anakinra nos eventos inflamatórios (edema, infiltração de neutrófilos, aumento de permeabilidade), na hipernocicepção e nas alterações funcionais observadas na cistite hemorrágica, utilizando o modelo experimental de CH induzida por IFO.

### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Avaliar a inibição da CH ao bloquear o receptor da interleucina-1 e o TNF-alfa, através da avaliação das respostas funcionais, inflamatórias e nociceptivas da cistite hemorrágica experimental induzida por ifosfamida.

#### Objetivos específicos

- Avaliar a uroproteção promovida pelo anakinra e infliximabe em relação a parâmetros inflamatórios, como edema, hemorragia, infiltrado neutrofílico, na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.
- Avaliar a uroproteção do anakinra e do infliximabe na função contrátil do músculo liso da bexiga “*in vitro*”.
- Avaliar a uroproteção do anakinra e do infliximabe na função contrátil da bexiga “*in vivo*”.
- Avaliar a analgesia do anakinra e do infliximabe frente à hipernocicepção abdominal induzida por ifosfamida.
- Investigar se os receptores de IL-1 e TNF estariam envolvidos na uroproteção promovida por anakinra e infliximabe.
- Investigar se neutrófilos e macrófagos estariam envolvidos na lesão vesical induzida por ifosfamida, assim como se os receptores de IL-1 e TNF influenciam na presença dessas células.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, C57BL6 (*wild type*, WT), e camundongos deficientes para as proteínas TNFR1<sup>-/-</sup>, TNFR1/R2<sup>-/-</sup>, IL-1R<sup>-/-</sup>, CASP1<sup>-/-</sup>, machos ou fêmeas, com peso entre 20-25g, idade entre 6-10 semanas. Os camundongos Swiss e C57Bl/6 foram fornecidos pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará e pelo Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (FMRP/USP). Os camundongos deficientes foram criados e fornecidos pelo Centro de Criação de Camundongos Especiais da FMRP/USP. Todos os animais foram mantidos sob condições de temperatura (23-25 °C) e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Os protocolos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Esta pesquisa recebeu aprovação do comitê de ética em pesquisa animal da FM-UFC protocolo 11/14.

### 4.2 Drogas e reagentes

Ifosfamida (EUROFARMA – São Paulo - Brasil); Infliximabe (Remicade®, Mantecorp - Brasil); Anakinra ou IL-1Ra recombinante (NIBSC, South Mimms, Hertfordshire, UK), Uretana, Carbacol (CCh) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)

### 4.3 Preparo de soluções e reagentes

#### 4.3.1 Solução de Cetamina e Xilazina:

Cetamina 10% (Agener União) .....	1,25 mg/ml
Xilazina 2% (Agener União) .....	0,5 mg/ml
Salina 0.9 % q.s.p .....	100 ml

A solução foi estocada à 4 °C.

**4.3.2 Formol 10%:**

Formol (Formol concentrado – Merck) .....	10,0 mL
Água destilada q. s. p. ....	100,0 mL

**4.3.3 Azul de Evans 2,5%:**

Azul de Evans (Sigma) .....	2,5 g
Água destilada q.s.p. ....	100 ml

**4.3.4 Solução de Tyrode modificada:**

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck) .....	7,95 g
Cloreto de Potássio (KCl, Merck) .....	0,37 g
Cloreto de Magnésio (MgCL <sub>2</sub> , Merck) .....	93,3 mg
Cloreto de Cálcio (CaCL <sub>2</sub> , Merck) .....	0,22 g
Fosfato de dissódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Merck) .....	51,1 mg
Bicarbonato de Sódio (NaHCO <sub>3</sub> , Merck) .....	1 g
Glicose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> , Merck) .....	1 g
Água destilada q.s.p. ....	1000 ml

A solução foi estocada à temperatura ambiente.

**4.3.5 Solução Tampão Salina-fosfato (PBS) 10X (Solução Mãe):**

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck) .....	80 g
Cloreto de Potássio (KCl, Merck) .....	2 g
Fosfato de Sódio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Merck) .....	11,5 g
Fosfato de Potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Merck) .....	20 g
Água deionizada Milli-Q q.s.p. ....	1000 ml

A solução foi estocada à 4 °C.

**4.3.6 PBS 1X:**

PBS10X .....100 ml

Água Milli-Q q.s.p. ....900 ml

O pH foi ajustado para pH 7.2, a solução foi filtrada e estocada à 4 °C.

**4.3.7 Meio RPMI incompleto**

Hepes (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, Sigma) .....2,40 g

RPMI 1640 (Sigma) – 1 frasco .....10,4 g

Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, Merck) ..... 2,0 g

Água de Milli-Q q.s.p. ....1 g

O pH foi ajustado para pH 7.2, a solução foi filtrada e estocada à 4 °C.

**4.3.8 Solução tampão de digestão:**

Colagenase tipo II (Sigma) ..... 100 mg

DNAse tipo I (Sigma) .....10 mg

RPMI incompleto q.s.p.....100 ml

A solução foi preparada no dia do uso e utilizada gelada.

**4.3.9 Tampão de citometria de fluxo (Tampão de FACS):**

Soro Bovino Fetal inativado (SBF-I, Difco) 2% .....2 ml

PBS 1X q.s.p. ....100 ml

A solução foi preparada no dia do uso e utilizada gelada.

**4.3.10 Tampão de lise:**

Cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl, Merck) .....4,01 g

EDTA (Labsynth) .....0,18 g

Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, Merck) .....0,42 g

Água de Milli-Q q.s.p. ....500 ml

O pH foi ajustado para pH 7.2, a solução foi filtrada e estocada à 4 °C.

#### **4.3.11 Paraformaldeído 2%:**

Paraformaldeído (Sigma) .....2 g  
 Água destilada q.s.p. ....100 ml

A solução foi preparada e estocada à 4 °C.

#### **4.3.12 Tampões utilizados para o ensaio de ELISA:**

##### *4.3.12.1. Solução de ligação (coating buffer) pH 8.4*

Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, Merk) .....4,2 g  
 Água de Milli-Q q.s.p. ....500 ml

##### *4.3.12.2. Tampão de bloqueio (para ELISA da companhia BD)*

Soro Bovino Fetal inativado (SBF-I, Difco) 10% .....5 ml  
 PBS 1X q.s.p. ....50 ml

#### **4.4 Indução de Cistite Hemorrágica**

Os animais foram submetidos a uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ifosfamida (IFO) (400 mg/kg). Após 12 h, foram sacrificados com dose elevada de anestésico. Em seguida, foi realizada uma incisão abdominal baixa, excisão da bexiga, com retirada da urina remanescente. As bexigas foram, então, analisadas macroscopicamente, pesadas e submetidas a algum dos métodos descritos a seguir.

## 4.5 Grupos experimentais

### 4.5.1 Experimento 1:

Camundongos Swiss foram randomizados nos seguintes grupos experimentais:

Grupo 1: Salina (1 mL/kg. i.p.)

Grupo 2: IFO (400 mg/kg. i.p.)

Grupo 3: IL-1Ra (25, 50, 100 mg/kg) 1h antes de IFO (400mg/kg. i.p.)

Em seguida, os animais foram submetidos aos protocolos dos itens 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 e 4.12

### 4.5.2 Experimento 2:

Camundongos C57Bl/6 foram randomizados nos seguintes grupos experimentais:

– Grupo 1: Salina (1 mL/kg. i.p.)

– Grupo 2: Ifosfamida (IFO 400 mg/kg. i.p.)

– Grupo 3: Infliximabe (1,67, 5, 15 mg/kg) 1h antes de IFO (400 mg/kg. i.p.)

Em seguida, os animais foram submetidos aos protocolos dos itens 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.13

### 4.5.3 Experimento 3:

Camundongos C57Bl/6 (*wild type*) ou TNFR1<sup>-/-</sup> ou TNFR1/R2<sup>-/-</sup> ou IL-1R<sup>-/-</sup> foram randomizados nos seguintes grupos experimentais:

– Grupo 1: Salina (1 mL/kg. i.p.)

– Grupo 2: Ifosfamida (IFO 400 mg/kg. i.p.)

Em seguida, os animais foram submetidos aos protocolos dos itens 4.6, 4.7 e 4.13

#### 4.5.4 Experimento 4:

Camundongos C57Bl/6 (*wild type*) ou CASP1<sup>-/-</sup> foram divididos no seguintes grupos experimentais:

- Grupo 1: Salina (1 mL/kg. i.p.)
- Grupo 2: Ifosfamida (IFO 400mg/kg. i.p.)

Em seguida, os animais foram submetidos aos protocolos dos itens 4.6 e 4.7.

#### 4.5.5 Experimento 5:

Camundongos C57Bl/6 receberam Ifosfamida (IFO 400 mg/kg. i.p.) e foram divididos em 4 grupos para serem sacrificados 0, 3, 6 ou 12 horas após a injeção de Ifosfamida e submetidos ao protocolo 4.14.

### 4.6 Análise Macroscópica

Na avaliação macroscópica foram quantificados o edema e a hemorragia de acordo com os critérios de Gray *et al.* (1986), abaixo descritos :

a) Edema:

- Grave (+3): edema interno e externo;
- Moderado (+2): edema interno (mucosa);
- Leve (+1): intermediário;
- Normal (0): nenhum.

b) Hemorragia:

- Grave (+3): coágulo intravesical;
- Moderado (+2): hematomas na mucosa;
- Leve (+1): telangiectasia ou dilatação dos vasos da bexiga;
- Normal (0): nenhum.



#### 4.7 Análise Microscópica

As bexigas foram fixadas em formol a 10%, em seguida desidratadas em álcool a 70%, imersas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia óptica. As alterações microscópicas foram determinadas de acordo com os critérios de Gray *et al* (1986), que se seguem:

- Histologia Normal: caracterizada pelo urotélio normal, bem como ausência de úlcera e infiltrado inflamatório.
- Alterações discretas (+1): caracterizada por número de células epiteliais diminuídas pela descamação, “apagamento” das dobras habituais da mucosa em decorrência do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras.
- Alterações graves (+2): caracterizada por ulceração da mucosa, edema intenso, infiltrado inflamatório importante, depósito de fibrina e hemorragia.

#### 4.8 Avaliação da permeabilidade vascular vesical

A permeabilidade vascular vesical foi avaliada pela técnica de extravazamento com injeção i.v. de azul de Evans. Resumidamente, foi injetado, por via i.v. retroorbital, 2.5% de solução de azul de Evans (25 mg/kg) 30 minutos antes do sacrifício dos animais. As bexigas foram excisadas e colocadas em tubos de ensaio contendo solução de formamida (1 mL/bexiga) à 56°C por 12 h para extração do corante presente nos tecidos. O corante total presente na solução foi mensurado pela absorbância em 630 nm (ELISA), concomitantemente, foi realizada uma curva de absorbância. Os resultados foram relatados em microgramas de azul de Evans por bexiga (média ± SEM).

#### 4.9 Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)

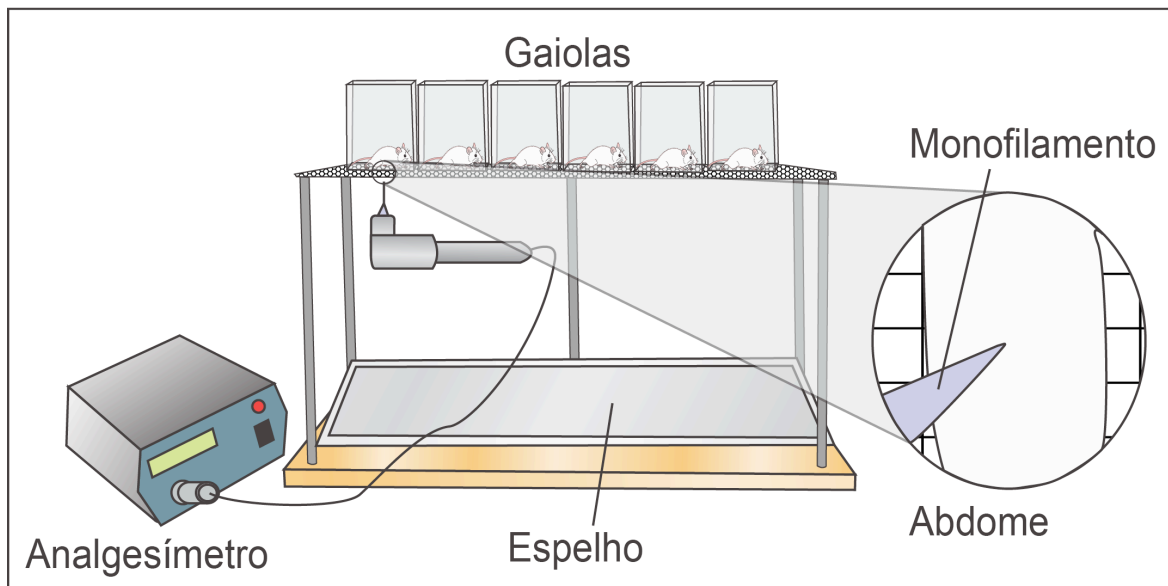
MPO é uma enzima abundantemente encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, podendo ser usada como marcador de infiltração neutrofílica, seguindo um método colorimétrico previamente descrito (BRADLEY, 1982). A

amostra da bexiga foi homogeneizada em solução tampão de HTAB (hexadecyltrimethyl-ammonium bromide) na proporção de 50 mg de tecido/mL. O homogeneizado foi centrifugado em 2000 G por 15 min a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso, e a atividade da MPO foi avaliada através da medição da variação de absorvância a 450 nm utilizando uma solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µL of 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 3 mL tampão de fosfato; 27 mL H<sub>2</sub>O). A mudança na absorvância foi gravada e plotada em uma curva padrão de densidade de neutrófilos, com os dados obtidos e expressa como atividade de MPO (neutrófilos/mg de tecido).

#### **4.10 Teste de nocicepção visceral**

O teste de nocicepção visceral (Figura 9) foi realizado utilizando um analgesímetro digital (von Frey, Insight) antes e 12 h após a injeção de ifosfamida. Resumidamente, os animais foram mantidos em caixas de acrílico de dimensões 12x20x17 cm com o piso fenestrado, e um espelho posicionado abaixo das caixas. O von Frey é conectado a um transdutor de força, cuja ponta em polipropileno possui 0,7 mm<sup>2</sup> e detecta as intensidades de estimulação (gramas/área) aplicadas ao animal na região abdominal inferior. A nocicepção é identificada de acordo com determinados comportamentos do animal como: retração acentuada do abdome, ato de lambem ou coçar imediatamente o local de aplicação da pressão, tremor com esquivas abruptas (LAIRD et al., 2001). Evitou-se estimular o mesmo ponto sucessivas vezes, e estimular a área da genitália externa. As análises foram feitas antes (baseline ou T0) e após 12h (T1) a administração intraperitoneal de IFO. Os resultados foram obtidos pela diferença entre as forças aplicadas ( $\Delta F = T0 - T1$ , em g).

Figura 9 – Teste de Nocicepção visceral (von Frey)



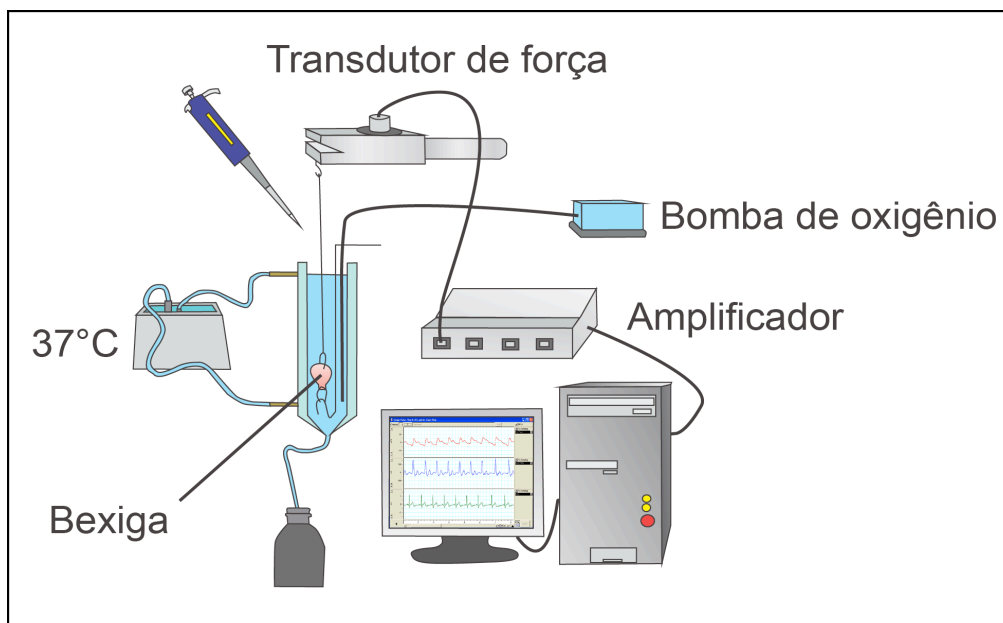
Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.11 Avaliação funcional de bexigas isoladas

Após o sacrifício dos animais, as bexigas foram transferidas para uma placa de Petri com solução de Tyrode modificada. Cada bexiga foi posicionada em cubas de 5ml contendo solução de Tyrode modificada, as quais eram aeradas continuamente e aquecidas a 37°C. A preparação foi mantida em equilíbrio por 30 minutos, período no qual as bexigas foram submetidas a uma tensão de 1 g, registrada por um transdutor isométrico (modelo FT03C, Quincy, Mass., EUA) ligado a sistema de aquisição de dados DATAQ (PM-1000, WCE, USA) (FIGURA 10).

Inicialmente, para avaliar a viabilidade do tecido, as preparações foram expostas a soluções despolarizantes com 60 mM de K<sup>+</sup> por 30-60 min até a obtenção de duas respostas com mesma amplitude. Os pontos das curvas concentração-resposta foram construídos através da razão entre a resposta da bexiga a sucessivas concentrações de carbacol (CCh [10<sup>-9</sup> a 10<sup>-5</sup> M], com 60 s para cada concentração) e a resposta ao cloreto de potássio 60 mM. A amplitude contráctil foi medida no pico de deflexão. Os valores foram obtidos em porcentagem da resposta ao CCh/ 60mM de KCl.

Figura 10 – Sistema de avaliação da contratilidade do músculo liso da bexiga

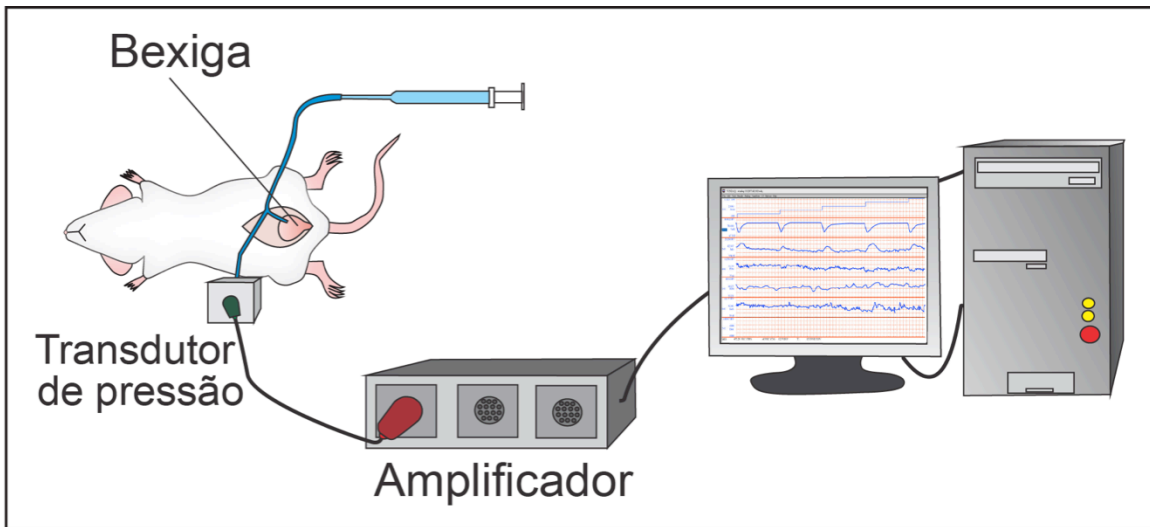


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.12 Avaliação funcional da pressão intravesical em camundongos anestesiados

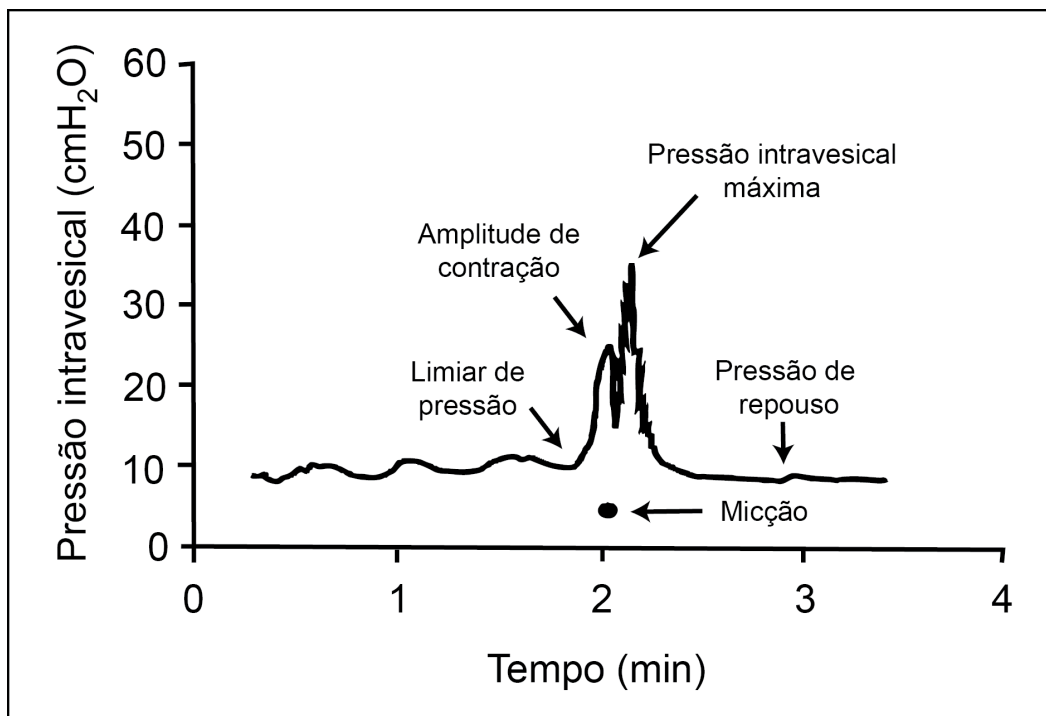
Após 12 horas da administração da IFO, os animais foram anestesiados com uretana a 50% na dose de 1,2 g/kg por via subcutânea (s.c.). Para o registro da pressão intravesical através da técnica de cistometrografia contínua, foi realizada uma incisão abdominal baixa, através da qual a bexiga foi exposta e submetida a pequena incisão no seu ápice, por onde foi introduzido um cateter de polietileno (PE-50, Clay Adams, USA) com comprimento suficiente para que o extremo distal alcance o lúmen da bexiga. O cateter foi afixado à bexiga com fio de nylon 4-0, com a extremidade livre exposta, uma vez que a parede abdominal foi fechada com fio de algodão 3-0. Os registros urodinâmicos foram feitos mediante a conexão do cateter a um conector em T, para, ao mesmo tempo, infundir solução salina continuamente com uma seringa acoplada a uma bomba de infusão e ligar a um sistema de aquisição de pressão (PowerLab/8sp, ADInstruments) (FIGURA 11). Os registros foram gravados em um computador (FIGURA 12) e analisados no programa Chart v 4.0 (ADInstruments).

Figura 11 – Sistema de avaliação de cistometrografia



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 12 – Exemplo de traçado de cistometrografia com os parâmetros avaliados



Fonte: Elaborado pelo autor

## **4.13 Citometria de fluxo**

### ***4.13.1 Preparação da suspensão celular***

Após os camundongos serem sacrificados, as bexigas foram retiradas e colocadas em placas de 6 poços (Costar®) contendo 2 ml/poço de solução tampão de digestão, e mantidas em estufa (37°C) durante 1h. A seguir, as bexigas foram passadas em peneira de propietileno (Falcon® - separador de células – 100 µm) com auxílio do êmbolo da seringa de 3 ml (Plastipak®), e com acréscimo de RPMI incompleto com o objetivo de carrear as células remanescentes, formando uma única suspensão celular, a qual foi centrifugada a 400 G, por 10 min, à 4°C. As hemácias foram lisadas por choque hiposmótico utilizando um tampão de lise por 15 min e uma nova centrifugação foi realizada. Subsequentemente, as células das bexigas foram ressuspensas em solução de FACS. As células foram contadas em contador automático (COULTER® AC T; Coulter Corporation, Miami, Florida, USA).

### ***4.13.2 Análise da expressão de marcador de neutrófilos e macrófagos***

Resumidamente, foi realizada a suspensão de células das bexigas como descrito no item 1.13.1. As células ( $1 \times 10^6$  células/tubo) foram incubadas com anticorpos 1,0 µl (0,2 µg) de CD45 APC (Biolegend), 1,0 µl (0,5 µg) de F4/80 FITC (eBioscience) e 1,0 µl (0,2 µg) de GR-1 Percp (BD Biosciences) (anticorpos monoclonais extracelulares), por 45 minutos, a 4 °C. Após a incubação, as amostras foram lavadas 2 vezes com tampão de FACS, centrifugadas a 400 G por 10 minutos e ressuspensas em 50 µl de solução de formaldeído a 2 % em PBS. Após esses procedimentos, as amostras foram analisadas em FACScanto (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ), utilizando os canais de fluorescência 1 (FL1) para moléculas conjugadas a FITC; 4 (FL4) para moléculas conjugadas a APC; 3 (FL3) para moléculas conjugadas a Percp. As análises foram realizadas utilizando-se o programa FCS Express V3 (DE NOVO SOFTWARE) e os resultados foram expressos como porcentagem da expressão de marcadores ou como valores absolutos de neutrófilos e macrófagos.

#### 4.14 Dosagem de citocinas

A determinação dos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi realizada por método imunoenzimático (ELISA). Resumidamente, as placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50  $\mu$ l/ poço do anticorpo específico anti-IL-1 $\beta$  (RD) e anti-TNF- $\alpha$  (RD) nas concentrações descritas pelos fabricantes. Esses anticorpos foram diluídos em solução de ligação (coating buffer) e incubados por 18-24 horas a 4°C. As placas foram lavadas por quatro vezes com PBS/Tween-20 (0,05 % Sigma). As ligações não-específicas foram bloqueadas com 200  $\mu$ l de PBS contendo BSA 1 % durante 1 hora a 37 °C. As amostras e o padrão (curva-padrão) contendo as concentrações adequadas de IL-1 $\beta$  (5000 pg/ml) e TNF- $\alpha$  (10000 pg/ml) foram colocados nas placas (50  $\mu$ l) e incubados por 12 h a 4 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50  $\mu$ l dos anticorpos biotinilados específicos para cada citocina foram adicionados nas concentrações descritas pelos fabricantes. Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween e o conjugado avidina-peroxidase, na diluição de 1/5000, foi adicionado a cada poço. A seguir, as placas foram incubadas por 45 min. Posteriormente, elas foram lavadas com PBS/Tween e o substrato (TMB) foi adicionado. A densidade óptica foi medida a 630 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). A concentração de citocinas nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão com 12 pontos obtidos por diluição seriada. Os resultados foram expressos em pg/ml.

#### 4.15 Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis conforme propriedade. Quando houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou teste de Dunn. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

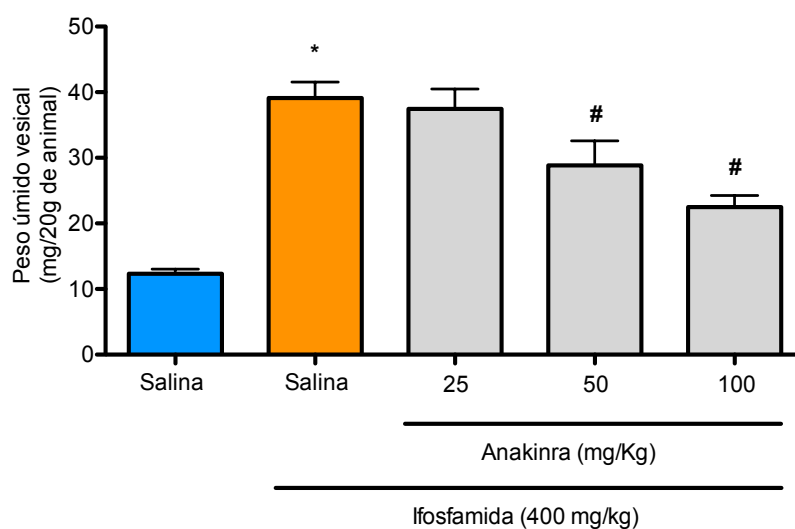
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeitos do pré-tratamento com Anakinra e papel da deleção genética de IL-1R ou Caspase-1 na CH induzida por IFO

#### 5.1.1 Efeito da administração prévia de Anakinra sobre o peso úmido vesical (PUV) e a permeabilidade vascular na CH induzida por IFO

Como previamente descrito por Ribeiro *et al.* (2002), a dose de 400 mg/kg de IFO i.p. foi capaz de promover CH com aumento significativo de PUV ( $39,11 \pm 2,43$  mg/ 20 g de animal) quando comparado ao controle tratado com salina ( $12,32 \pm 0,73$  mg/ 20g de animal). O PUV nessa circunstância torna-se uma medida indireta do edema vesical (FIGURA 13). No mesmo experimento, foi realizado um pré-tratamento com Anakinra nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, sendo evidenciada uma inibição significativa do aumento do PUV induzido por IFO quando se usou as doses de 50 mg/kg ( $28,84 \pm 3,75$  mg/ 20 g de animal) e 100 mg/kg ( $22,48 \pm 1,78$  mg/ 20g de animal) (FIGURA 13).

Figura 13 – Efeito do pré-tratamento com doses crescentes de Anakinra sobre o aumento de PUV induzido por IFO

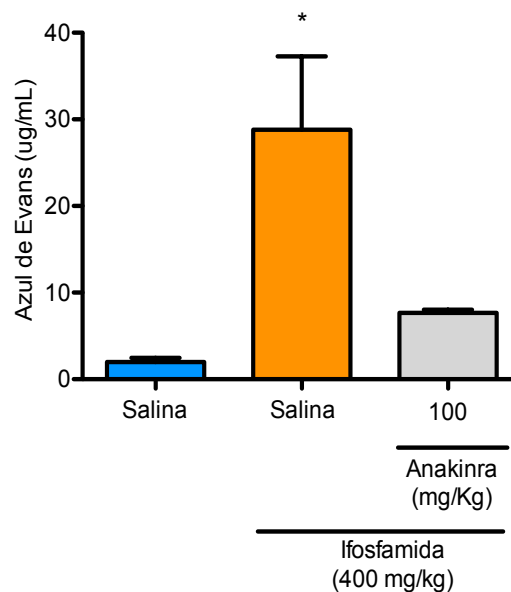


Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do peso úmido vesical após 12 h de injeção de Ifofamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p.), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifofamida 400 mg/kg, i.p.) Anakinra (anakinra 25, 50 ou 100 mg/kg, i.p. + Ifofamida 400 mg/kg, i.p.). n=6/grupo. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \* $p < 0,05$  vs salina e # $p < 0,05$  vs IFO.



Subsequentemente, a dose de 100 mg/kg de Anakinra foi adotada como de escolha para os demais experimentos. Assim como o PUV, outro protocolo de avaliação de edema é o ensaio de permeabilidade vascular utilizando azul de Evans. Como observado na figura 14, os animais submetidos a uma injeção de IFO apresentaram aumento significativo do extravasamento de azul de Evans ( $28,81 \pm 8,47 \mu\text{g/mL}$ ) quando comparado ao controle ( $2,00 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$ ), e, por outro lado, esse aumento foi prevenido com o uso de Anakinra ( $7,66 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ ).

Figura 14 – Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre o aumento de permeabilidade vesical induzido por IFO



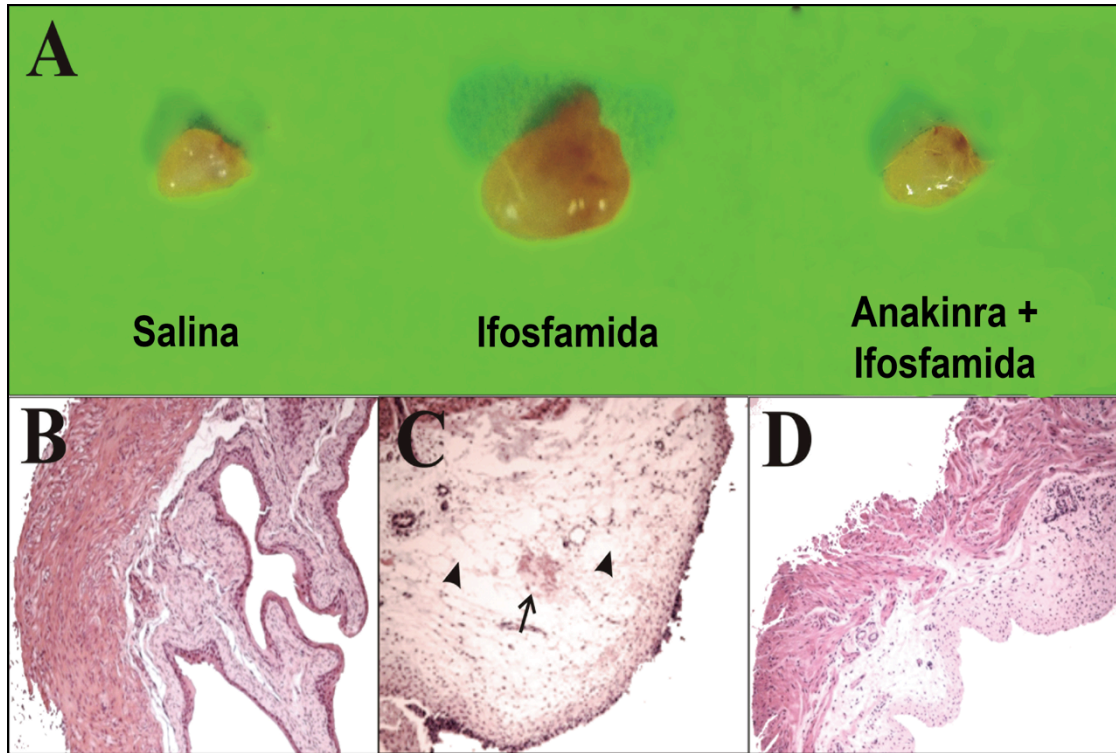
Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do extravasamento de azul de Evans vesical após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Anakinra (anakinra 100 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). n=6/grupo. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$ .

### **5.1.2 Efeito da administração prévia de Anakinra sobre as alterações macroscópicas e microscópicas na CH induzida por IFO**

Como pode ser observado na figura 15A, as bexigas dos animais submetidos à injeção de IFO apresentaram hemorragia e edema macroscópicos, os quais foram avaliados pelos escores de Gray *et al.*, (1986) mostrados na tabela 1, com hemorragia 3[1-3] e edema 2[1-3] evidentes, contrastando com os animais tratados com salina que tiveram suas bexigas macroscopicamente normais. Por outro lado, o pré-tratamento com Anakinra foi capaz de atenuar significativamente a hemorragia 0[0-2] e o edema 0[0-2] presentes nas bexigas.

A análise histopatológica, por sua vez, evidenciou a presença de CH nos animais submetidos ao tratamento com IFO, com descamação do urotélio, edema, hemorragia e infiltração leucocitária (FIGURA 15C). Os animais que receberam Anakinra previamente, por sua vez, apresentaram microscopicamente uma CH significativamente mais branda com mediana de 1[1-2], com descamação de urotélio e edema, quando comparado aos animais tratados apenas com IFO com mediana de 2[2-2] (FIGURA 15D).

Figura 15 – Efeito do pré-tratamento com Anakinra nas alterações macroscópicas e microscópicas na bexiga induzidas por IFO



(A) Macroscopicamente, foi evidenciado aumento do volume da bexiga com hemorragia induzido por IFO (meio), em comparação com a bexiga do animal tratado com salina (esquerda). Por outro lado, alterações induzidas por IFO foram atenuadas com o pré-tratamento com Anakinra (à direita), (B, C, D) fotomicrografias de bexigas, HE, x40. (B) bexiga de animal que recebeu salina com urotélio intacto; (C) descamação do urotélio, edema (cabeça de seta), hemorragia (seta), a deposição de fibrina e infiltração leucocitária induzida por IFO; (D) efeitos deletérios da IFO foram amenizados com pré-tratamento com Anakinra.

Tabela 1. Efeito do pré-tratamento com Anakinra nos escores macroscópicos e microscópicos de bexigas na CH induzida por IFO

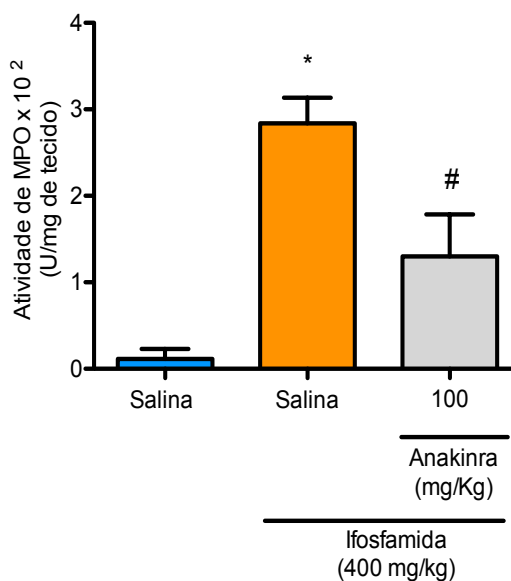
Grupos	Escore macroscópicos		Escore microscópicos
	Edema	Hemorragia	
Salina	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Ifosfamida	2(1-3)*	3(1-3)*	2(2-2)*
Anakinra + Ifosfamida	0(0-2)#	0(0-2)#	1(1-2)#

\*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo salina e #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com ifosfamida por Kruskal-Wallis e teste de Dunn.

### 5.1.3 Efeito do pré-tratamento com Anakinra no infiltrado neutrofílico vesical e na hipernocicepção visceral na CH induzida por IFO

Na figura 16, pode-se observar que houve um aumento significativo no infiltrado de neutrófilos nas bexigas de animais tratados com IFO ( $2,84 \pm 0,30$  U/ mg de tecido) quando comparado aos animais controle que foram submetidos à uma injeção de salina ( $0,11 \pm 0,11$  U/ mg de tecido), e o pré-tratamento com Anakinra, por sua vez, foi capaz de inibir significativamente esse infiltrado neutrofílico ( $1,30 \pm 0,49$  U/ mg de tecido).

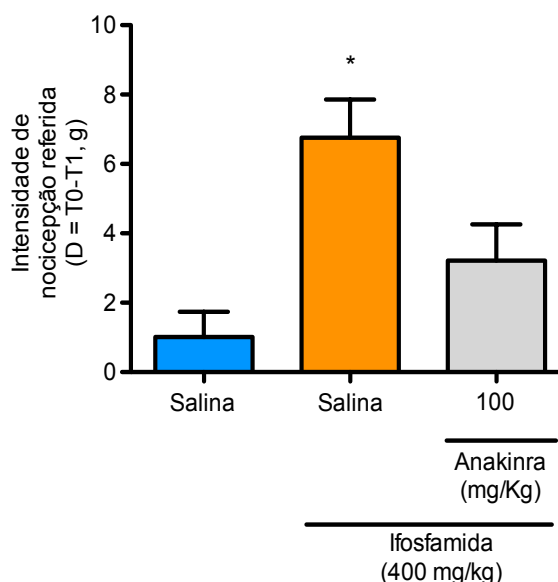
Figura 16 – Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre o infiltrado neutrofílico vesical induzido por IFO



Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de mieloperoxidase vesical após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Anakinra (anakinra 100 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). n=6/grupo. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \* $p < 0,05$ .

Segundo Wein *et al.*, (2012) um dos principais sintomas referidos por pacientes com CH é a dor suprapúbica. Em concordância com esse fato, no modelo experimental de CH foi possível evidenciar, através de estímulo abdominal com analgesímetro digital, uma redução no limiar de nocicepção após 12 horas da injeção de IFO ( $6,76 \pm 1,10$  g) quando comparado aos animais controle ( $1,01 \pm 0,72$  g). Essa redução do limiar de nocicepção foi significativamente atenuada com o uso do Anakinra ( $3,21 \pm 1,05$  g).

Figura 17 – Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre hipernocicepção visceral induzida por IFO

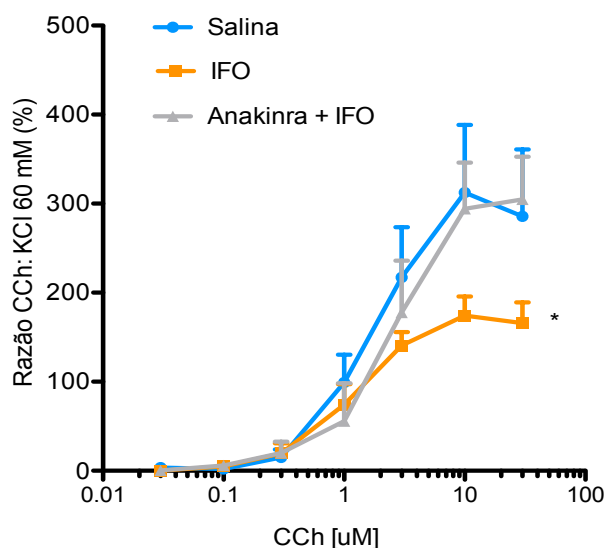


Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de intensidade de nocicepção visceral após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Anakinra (anakinra 100 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). n=6/grupo. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$ .

#### 5.1.4 Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre a disfunção vesical “in vitro” e “in vivo” na CH induzida por IFO

Após a eutanásia dos animais, suas bexigas foram isoladas e estimuladas, primeiramente, com 60 mM de KCl e, em seguida, com concentrações crescentes de CCh ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M), como mostrado na figura 18, evidenciando-se curvas concentração-resposta. Bexigas de animais tratados com salina obtiveram uma contração máxima de  $285,62 \pm 23,16$  % da razão entre a contração observada com a maior concentração de CCh e a contração com 60 mM de KCl. O grupo que recebeu IFO, obteve uma razão máxima de  $165,90 \pm 23,16$  %, valor significativamente menor que o apresentado pelos animais controle. Em contraste, o pré-tratamento com Anakinra preveniu significativamente a hiporresponsividade vesical induzida por IFO, correspondendo a  $304,77 \pm 47,87$  %.

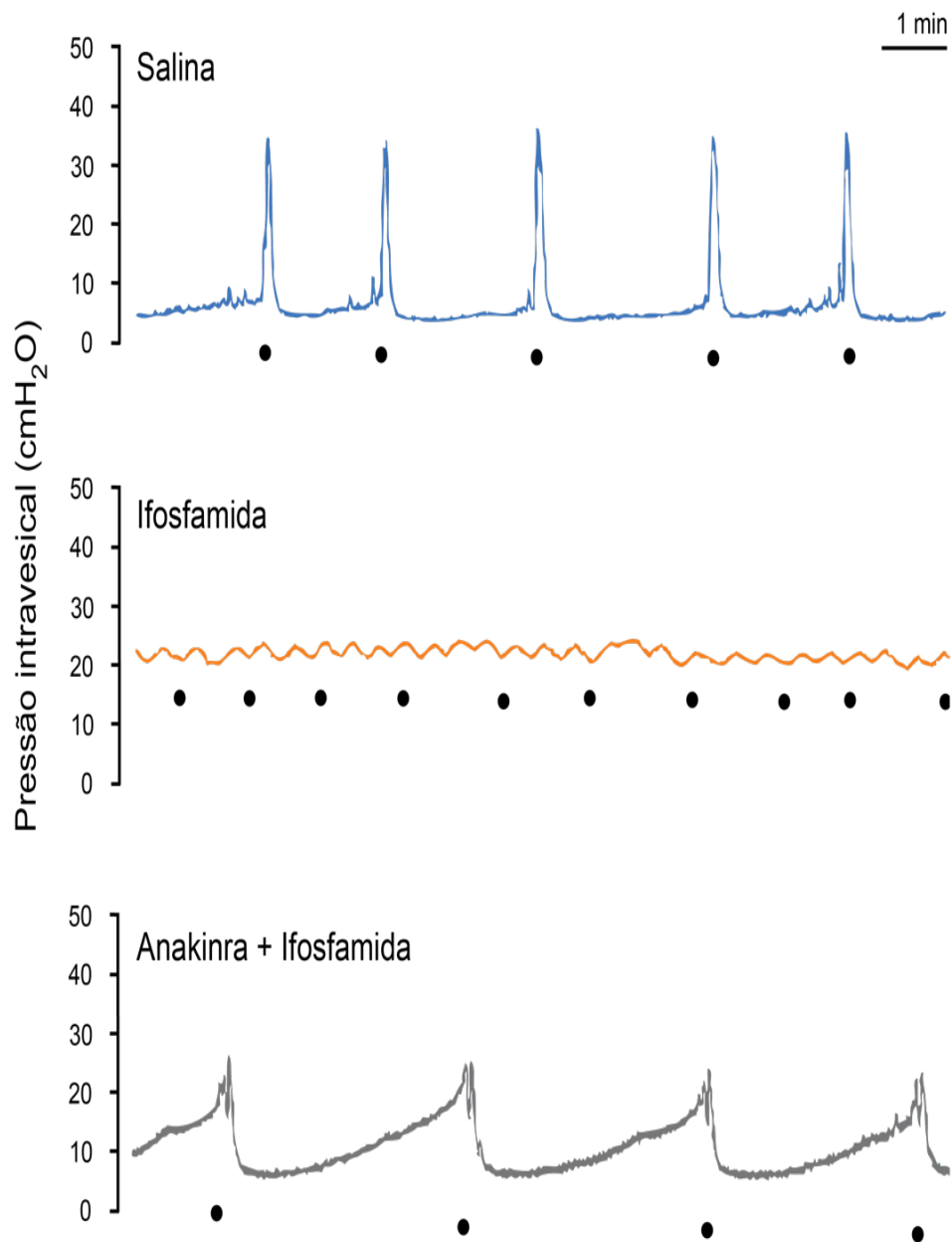
Figura 18 – Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre a hiporresponsividade do músculo liso vesical induzida por IFO



Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de % da contração muscular máxima induzida por CCh dividido pela contração muscular induzida por 60mM de KCl após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Anakinra (anakinra 100 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). n=5/grupo. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \* $p < 0,05$ .

Na figura 19, estão apresentados traçados de urodinâmica dos animais. Os dados obtidos a partir desses traçados estão demonstrados na tabela 2. Nessa tabela, pode-se observar que o tempo de expulsão, a duração de contração, o limiar de pressão, a amplitude de pressão de gatilho e a pressão máxima intravesical não foram determinadas para o grupo de animais tratados com IFO, uma vez que os traçados desses animais não mostraram contrações típicas que pudessem ser associadas à micção. Por outro lado, a pressão intravesical de repouso dos animais que receberam apenas IFO ( $24,65 \pm 8,52$  cmH<sub>2</sub>O) foi significativamente maior que a do grupo controle ( $7,55 \pm 2,78$  cmH<sub>2</sub>O) e grupo Anakinra ( $10,91 \pm 10,36$  cmH<sub>2</sub>O) (FIGURA 19), estando estes dois últimos grupos, por sua vez, sem diferença significativa. Além disso, a frequência de micção dos animais tratados com IFO ( $1,04 \pm 0,28$  mic/ min) foi maior que no grupo controle ( $0,65 \pm 0,25$  mic/ min,  $p < 0,05$ ) e no grupo Anakinra ( $0,55 \pm 0,24$  mic / min ,  $p < 0,05$ ). Embora o tempo de expulsão, a duração da contração e o limiar de pressão sejam significativamente iguais em animais que receberam apenas salina em comparação com aqueles que receberam Anakinra, existem diferenças significativas entre estes grupos quando analisada a amplitude de pressão de gatilho e a pressão máxima intravesical (FIGURA 19, TABELA 2).

Figura 19 – Efeito do pré-tratamento com Anakinra sobre o aumento da pressão intravesical induzida por IFO



Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de pressão intravesical após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Anakinra (anakinra 100 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). n=5/grupo.



Tabela 2. Parâmetros da cistometrografia durante o enchimento e esvaziamento em camundongos anestesiados

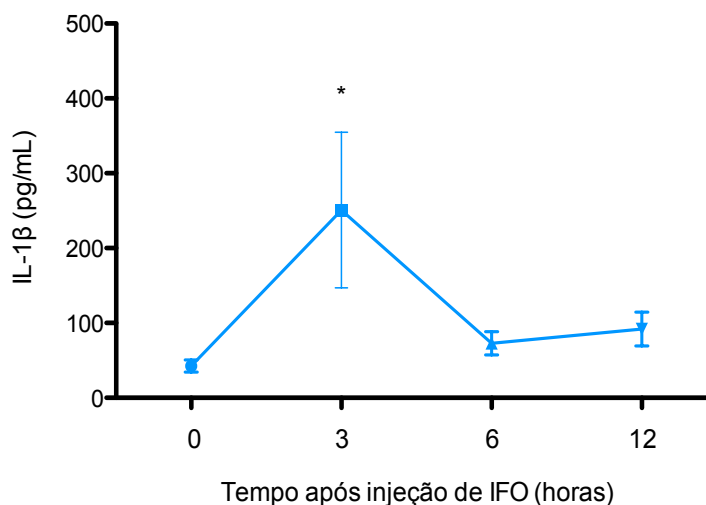
Parâmetros	Salina	IFO	Anakinra + IFO
Tempo de expulsão (s)	4,08 ± 2,44	-	5,74 ± 1,37
Duração da contração (s)	21,80 ± 7,93	-	20,45 ± 5,22
Limiar de pressão (cmH <sub>2</sub> O)	11,6 ± 2,63	-	16,29 ± 10,22
Pressão de repouso (cmH <sub>2</sub> O)	7,55 ± 2,78	24,65 ± 8,52 <sup>a</sup>	10,91 ± 10,36 <sup>b</sup>
Amplitude de pressão de gatilho (cmH <sub>2</sub> O)	41,52 ± 8,60	-	23,38 ± 12,42 <sup>c</sup>
Pressão máxima intravesical (cmH <sub>2</sub> O)	41,81 ± 10,94	-	25,27 ± 11,63 <sup>c</sup>
Frequência de micção (micturition/min)	0,65 ± 0,25	1,04 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,24 <sup>b</sup>

a, p<0,05, versus controle, teste de Holm-Sidak; b, p<0,05, versus IFO, Holm-Sidak teste; c, p<0,05, versus controle, teste t de Student.

### 5.1.5 Efeito da administração de Ifofamida nos níveis vesicais de IL-1 $\beta$

Com o intuito de identificar o momento no qual a quantidade de IL-1 $\beta$  poderia estar alterada nas bexigas, IFO foi injetada em 4 grupos de animais, os quais foram sacrificados em tempos diferentes, e quantificados os níveis de IL-1 $\beta$ . Esse experimento mostrou que houve um aumento significativo de IL-1 $\beta$  3 horas após a injeção de IFO (250,80 ± 103,90 pg/mL) quando comparado ao tempo de 0h (42,59 ± 8,03 pg/mL) (FIGURA 20).

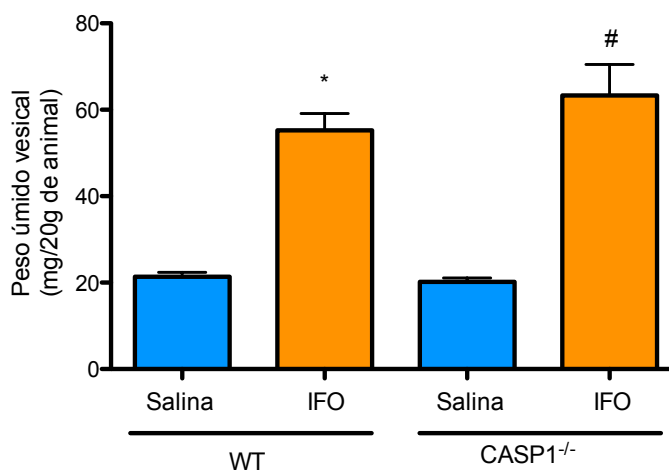
Figura 20 – Dosagem de IL-1 $\beta$  vesical 0, 3, 6 e 12 h após a injeção de ifosfamida



Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de IL-1 $\beta$  (pg/mL) após 0, 3, 6 e 12 h de injeção de Ifosfamida 400 mg/kg i.p. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=5/grupo. Os valores significativos tinham \*p< 0,05.

#### **5.1.6 Efeito da administração de Ifosfamida no PUV e parâmetros macroscópicos em camundongos C57BL/6 selvagens (wild type, WT) e knockout Caspase-1<sup>-/-</sup> ou IL-1R<sup>-/-</sup>**

A caspase-1 é um enzima que converte a pró-IL-1 $\beta$  em sua forma ativa, assim, sua deleção deveria causar uma prevenção da CH induzida por IFO, caso a IL-1 $\beta$  tenha um papel essencial na patogênese dessa doença. Contudo, ao utilizar animais *knockout* para caspase 1, observou-se aumento significativo de PUV (63,33  $\pm$  7,16 mg/ 20 g de animal) quando comparado ao controle *knockout* tratado com salina (20,20  $\pm$  0,91 mg/ 20 g de animal), apresentando também CH com hemorragia 1[1-2] e edema 1[1-2] macroscópicos, e esses resultados foram semelhantes aos animais WT tratados com IFO que apresentaram PUV de 55,25  $\pm$  3,88 mg/ 20 g de animal, e escores de hemorragia de 2[1-2] e edema de 2[1-2] (FIGURA 21).

Figura 21 – Efeito da injeção de ifosfamida no PUV de animais WT e Caspase 1<sup>-/-</sup>

Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do PUV após 12 h de injeção de ifosfamida. Grupos: WT Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), WT IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.), CASP1<sup>-/-</sup> Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), CASP1<sup>-/-</sup> IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=6/grupo. Os valores significativos tinham \*p< 0,05.

Tabela 3. Escores macroscópicas de bexigas em modelo de CH induzida por IFO em camundongos C57BL/6 selvagens e Caspase-1<sup>-/-</sup>

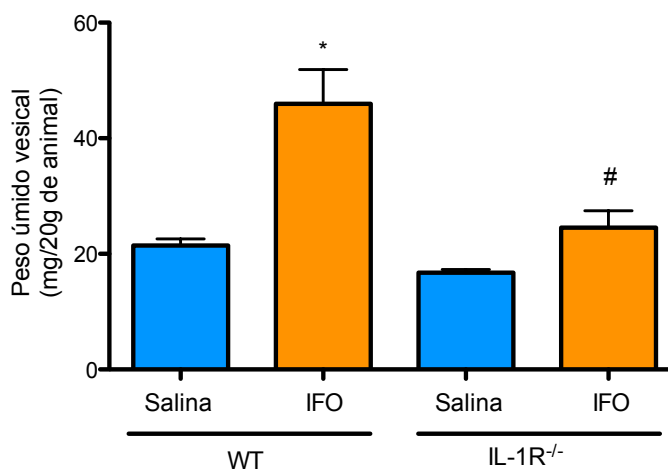
Animal	Grupos	Escore macroscópico	
		Edema	Hemorragia
WT	Salina	0 (0-0)	0 (0-0)
	Ifosfamida	2 (1-2)*	2 (1-2)*
Caspase-1 <sup>-/-</sup>	Salina	0 (0-0)	0 (0-0)
	Ifosfamida	1 (1-2)#	1 (1-2)#

\* p<0,05 quando comparado ao grupo WT salina e # p<0,05 quando comparado ao grupo Caspase 1<sup>-/-</sup> salina por Kruskal-Wallis e teste de Dunn.

O receptor de IL-1, por sua vez, depende do estímulo de IL-1 $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  para dar início à transdução intracelular. Assim, os efeitos advindos da sua deleção podem estar relacionados a ausência de sinalização por uma dessas citocinas ou ambas. Como mostrado na figura 22, os animais *knockout* para IL-1R tem uma prevenção completa do aumento do PUV ( $24,52 \pm 2,95$  mg/ 20 g de animal) e dos parâmetros de hemorragia 0[0-1] e edema 0[0-1], de forma semelhante aos animais *knockout* que não receberam IFO, e significativamente menor que o PUV ( $45,95 \pm$

5,95 mg/ 20 g de animal), a hemorragia 2[1-2] e o edema 3[2-3] dos animais WT que receberam IFO.

Figura 22 – Efeito da injeção de ifosfamida no PUV de animais WT e IL-1R<sup>-/-</sup>



Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do PUV após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: WT Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), WT IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.), IL-1R<sup>-/-</sup> Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IL-1R<sup>-/-</sup> IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=6/grupo. Os valores significativos tinham \*p< 0,05 IFO WT vs Salina WT. #IFO KO vs IFO WT.

Tabela 4. Escores macroscópicas de bexigas em modelo de CH induzida por IFO em camundongos WT e IL-1R<sup>-/-</sup>

Animal	Grupos	Escores macroscópicos	
		Edema	Hemorragia
WT	Salina	0 (0-0)	0 (0-0)
	Ifosfamida	3 (2-3)*	2 (1-2)*
IL-1R <sup>-/-</sup>	Salina	0 (0-0)	0 (0-0)
	Ifosfamida	0 (0-1)#	0 (0-1)#

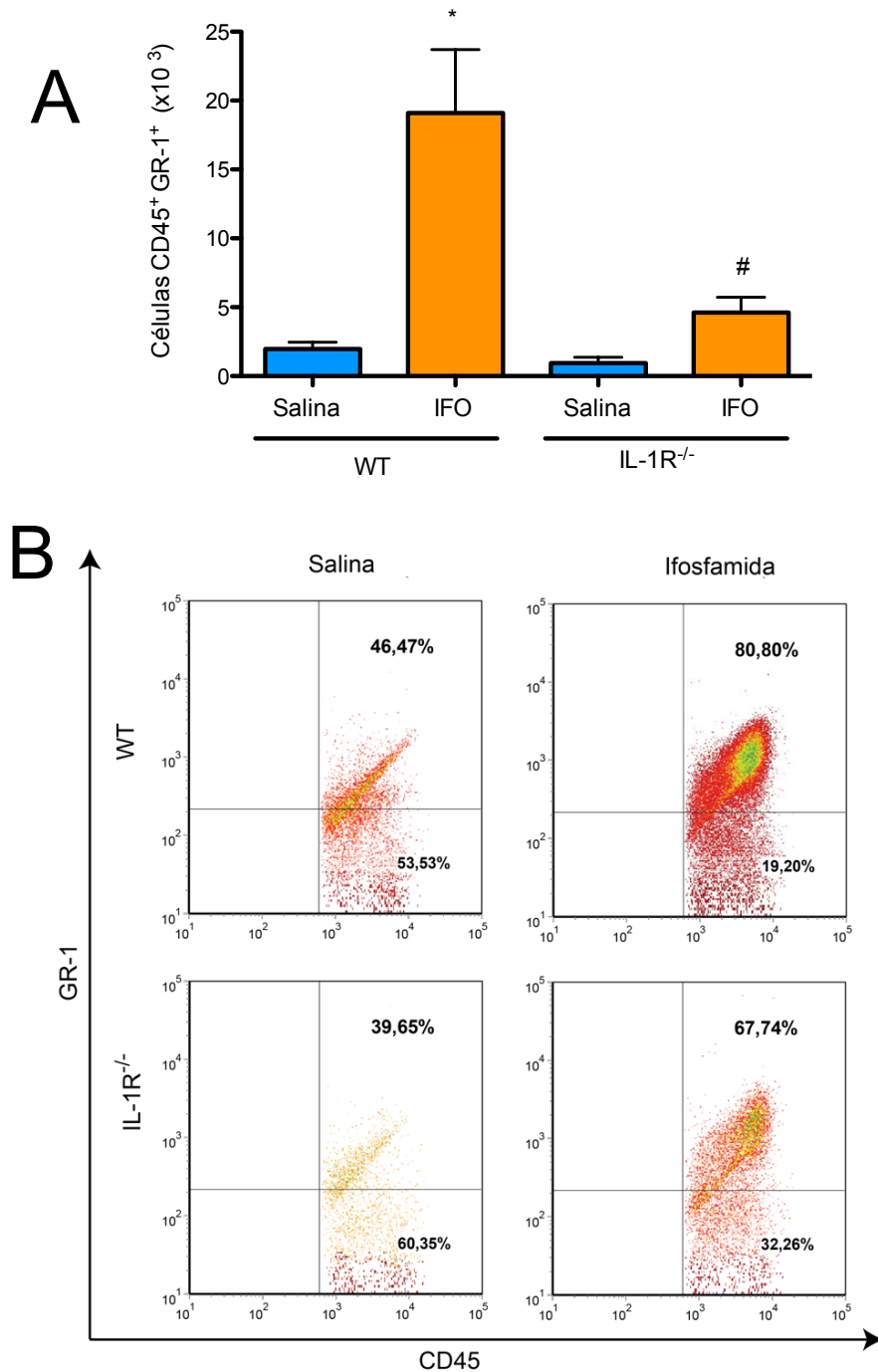
\* p<0,05 quando comparado ao grupo WT salina e # p<0,05 quando comparado ao grupo IL-1R<sup>-/-</sup> salina e WT ifosfamida por Kruskal-Wallis e teste de Dunn.

### 5.1.7 Efeito da administração de ifosfamida na quantidade de neutrófilos e macrófagos nas bexigas de camundongos C57BL/6 WT e IL-1R<sup>-/-</sup>

Como o tratamento prévio com Anakinra preveniu o aumento de MPO induzido por ifosfamida, investigamos através de citometria de fluxo a quantidade de neutrófilos presentes na bexiga em animais WT ou IL-1R<sup>-/-</sup>, buscando identificar se esse receptor estaria interferindo no infiltrado neutrofílico vesical induzido por IFO. Os camundongos WT e IL-1R<sup>-/-</sup> tratados com IFO apresentaram um aumento significativo no número de neutrófilos ( $19,09 \pm 4,61 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup>) e ( $4,61 \pm 1,11 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup>), respectivamente, quando comparado aos animais WT e IL-1R<sup>-/-</sup> tratados com salina ( $1,96 \pm 0,50 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup>) e ( $0,94 \pm 0,43 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup>), respectivamente. No entanto, houve um aumento significativo no número de neutrófilos nas bexigas de animais WT tratados com IFO quando comparado aos animais IL-1R<sup>-/-</sup> tratados com IFO (FIGURA 23).

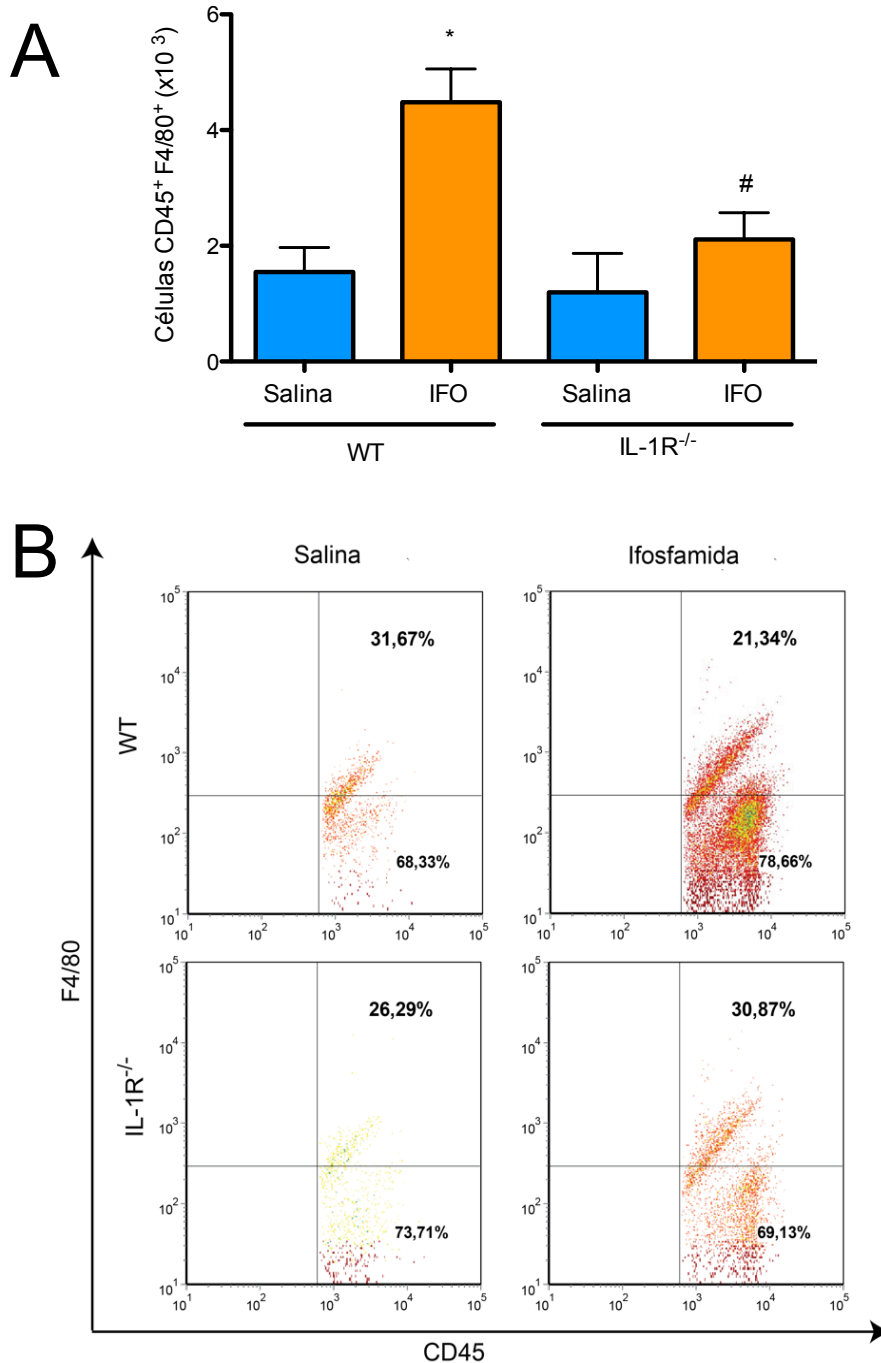
A quantidade de macrófagos, por sua vez, nos animais WT tratados com IFO ( $4,48 \pm 0,58 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) está significativamente aumentada quando comparado ao grupo WT tratado com salina ( $1,54 \pm 0,42 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>). Por outro lado, não houve diferença significativa entre o número de macrófagos presentes nas bexigas de animais IL-1R<sup>-/-</sup> tratados com IFO ( $2,11 \pm 0,46 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) e animais IL-1R<sup>-/-</sup> tratados com salina ( $1,20 \pm 0,67 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>). Além disso, observou-se um número significativamente maior de macrófagos no grupo WT tratado com IFO comparado ao grupo IL-1R<sup>-/-</sup> tratado com IFO (FIGURA 24).

Figura 23 – Efeito da injeção de ifosfamida no número de neutrófilos nas bexigas de animais WT e IL-1R<sup>-/-</sup>



Os valores da figura (A) representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de células CD45<sup>+</sup>GR1<sup>+</sup> presentes na bexiga após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: WT Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), WT IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.), IL-1R<sup>-/-</sup> Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IL-1R<sup>-/-</sup> IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \* $p < 0,05$ .  $n=6$ /grupo. Os valores da figura (B) estão representados em *Dot Plot*, mostrando a porcentagem de células CD45<sup>+</sup> que são GR1<sup>+</sup> ou GR1<sup>-</sup>.

Figura 24 – Efeito da injeção de ifosfamida no número de macrófagos nas bexigas de animais WT e IL-1R<sup>-/-</sup>



Os valores da figura (A) representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> presentes na bexiga após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: WT Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), WT IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.), IL-1R<sup>-/-</sup> Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IL-1R<sup>-/-</sup> IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \*p< 0,05. n=6/grupo. Os valores da figura (B) estão representados em *Dot Plot*, mostrando a porcentagem de células CD45<sup>+</sup> que são F4/80<sup>+</sup> ou F4/80<sup>-</sup>.

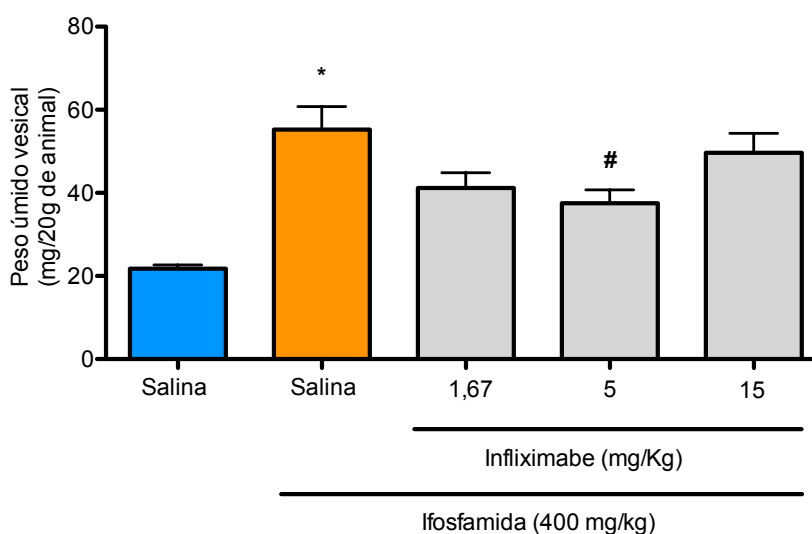
## 5.2 Efeito do pré-tratamento com Infiximabe e papel da deleção genética dos receptor TNFR1 e TNFR2 na CH induzida por IFO

### 5.2.1 Efeito do pré-tratamento com infliximabe sobre o PUV e a permeabilidade na CH induzida por IFO

Para avaliar os possíveis benefícios do Infiximabe nos animais submetidos à CH induzida por IFO, inicialmente, realizou-se o pré-tratamento com Infiximabe nas doses de 1,67, 5 e 15 mg/kg. 1 hora antes da administração de IFO. Foi observado que apenas a dose de 5 mg/kg ( $37,49 \pm 3,26$  mg/ 20 g de animal) foi capaz de prevenir significativamente o aumento de PUV induzido por IFO ( $55,26 \pm 5,50$  mg/ 20 g de animal (FIGURA 25).

Estabeleceu-se, assim, a dose de 5 mg/ Kg como padrão para os demais protocolos do modelo de CH induzida por IFO. Utilizando essa dose foi possível também evidenciar uma inibição significativa do aumento da permeabilidade vascular vesical induzida por IFO ( $4,17 \pm 0,33$   $\mu$ g/mL vs  $9,33 \pm 1,49$   $\mu$ g/mL). (FIGURA 26)

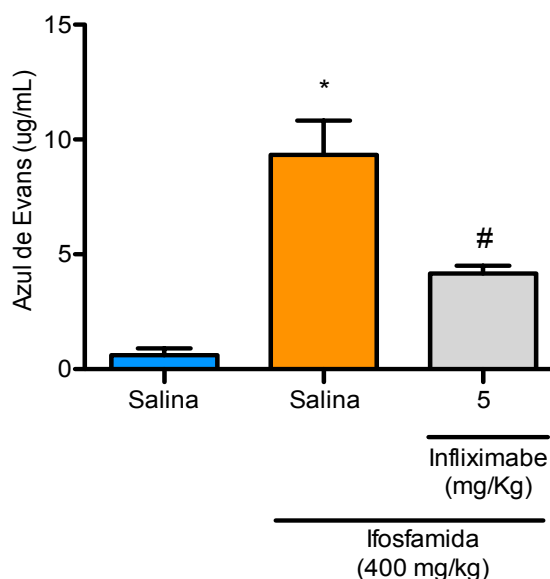
Figura 25 – Efeito do pré-tratamento com múltiplas doses de Infiximabe sobre o aumento de PUV induzido por IFO



Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do PUV após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Infiximabe (Infiximabe 1,67, 5 ou 15 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=6/grupo. Os valores significativos tinham \*p< 0,05.



Figura 26 – Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre o aumento de permeabilidade vesical induzido por IFO



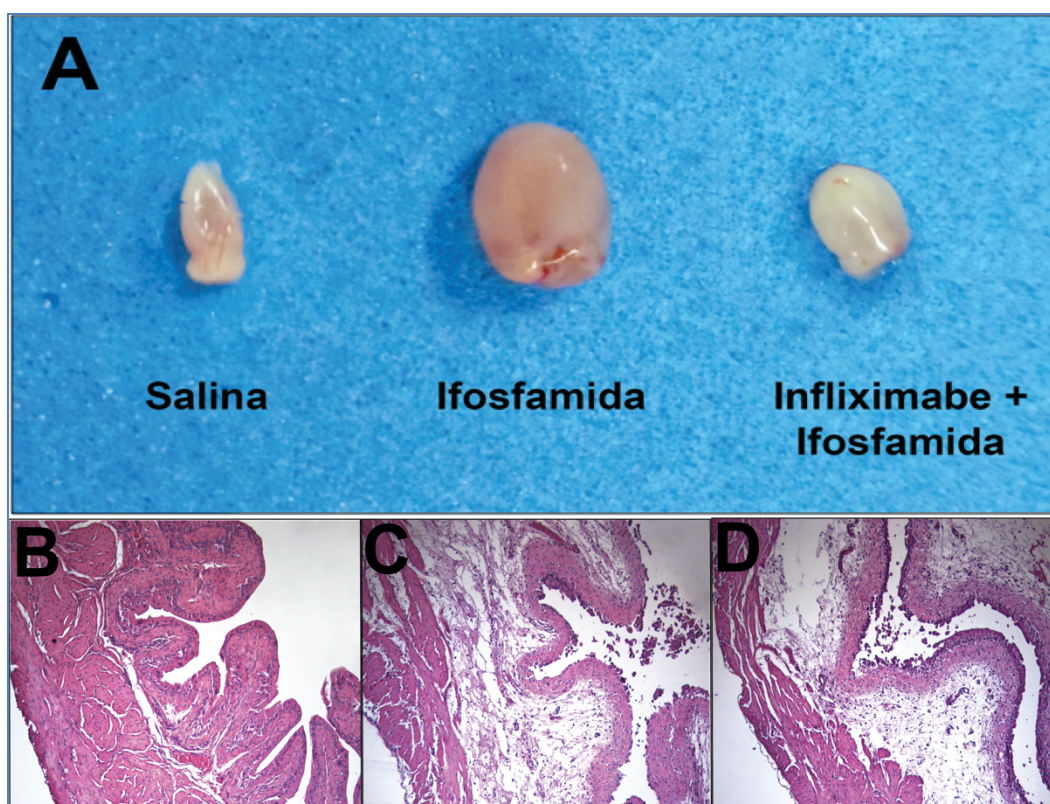
Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do extravasamento de azul de Evans vesical após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Infliximabe (Infliximabe 5 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.  $n=6$ /grupo. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$ .

### 5.2.2 Efeito da administração prévia de Infliximabe sobre as alterações macroscópicas e microscópicas na CH induzida por IFO

Na figura 27A, ao centro, observa-se uma bexiga de animal submetido à injeção de IFO, apresentando hemorragia e edema macroscópicos, os quais foram avaliados pelos escores de Gray *et al.*, (1986) mostrados na tabela 5, com hemorragia 2[1-3] e edema 3[2-3] evidentes, contrastando com os escores de bexigas de animais tratados com salina que tiveram suas bexigas macroscopicamente normais. Por outro lado, o pré-tratamento com Infliximabe atenuou significativamente o edema vesical 1[1-2], sem no entanto melhorar a efeito hemorragia 1[1-2].

A análise histopatológica evidenciou mais uma vez CH nos animais submetidos ao tratamento com IFO (FIGURA 27C), no entanto, o uso de Infliximabe como pré-tratamento, diferentemente do que se preconizou no início da investigação, não foi capaz de atenuar os escores histopatológicos 2[1-2] quando comparado aos animais tratados apenas com IFO 2[2-2] (FIGURA 27D).

Figura 27 – Efeito do pré-tratamento com Infiximabe nas alterações macroscópicas e microscópicas na bexiga induzidas por IFO



(A) Macroscopicamente, foi observado aumento do volume da bexiga com hemorragia induzido por IFO (meio), em comparação com a bexiga do animal tratado com salina (esquerda). Por outro lado, alterações induzidas por IFO foram atenuadas com o pré-tratamento com Infiximabe (à direita), (B, C, D) fotomicrografias de bexigas, HE, x40. (B) bexiga de animal que recebeu salina com urotélio intacto; (C) descamação do urotélio, edema, hemorragia induzida por IFO, sem atenuação com o pré-tratamento com Infiximabe 5 mg/kg i.p.

Tabela 5. Escores macroscópicas e microscópicas de bexigas em modelo de CH induzida por IFO e pré-tratamento com Infiximabe

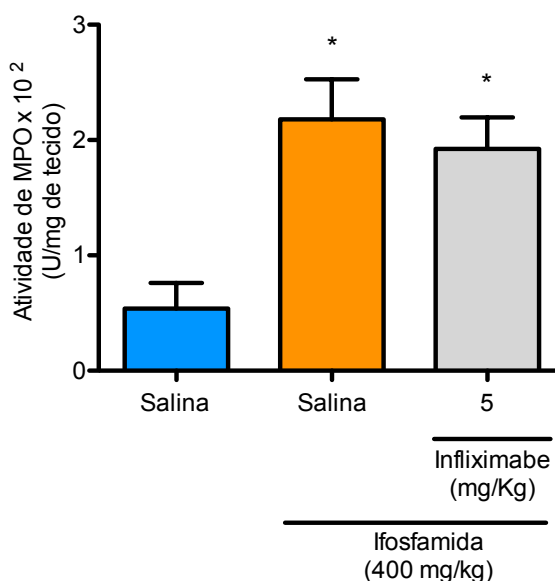
Grupos	Escore macroscópico		Escore microscópico
	Edema	Hemorragia	
Salina	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Ifosfamida	3(2-3)*	2(1-3)*	2(1-2)*
Infiximabe + Ifosfamida	1(1-2)#	1(1-2)*	2(1-2)*

\*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo salina e #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com ifosfamida por Kruskal-Wallis e teste de Dunn.

### 5.2.3 Efeito da administração prévia de Infiximabe sobre o infiltrado neutrofílico vesical e a hipernociceção visceral na CH induzida por IFO

Como mostrado na figura 28, os níveis de MPO aumentaram significativamente nas bexigas dos animais tratados com IFO ( $2,18 \pm 0,35$  U/ mg de tecido) quando comparado ao grupo controle ( $0,54 \pm 0,22$  U/ mg de tecido), e o pré-tratamento com Infiximabe não foi capaz de prevenir esse aumento do nível de MPO, ou seja, não evitou infiltrado neutrofílico vesical induzido por IFO ( $1,92 \pm 0,27$  U/ mg de tecido), corroborando com os resultados anteriores da avaliação histopatológica.

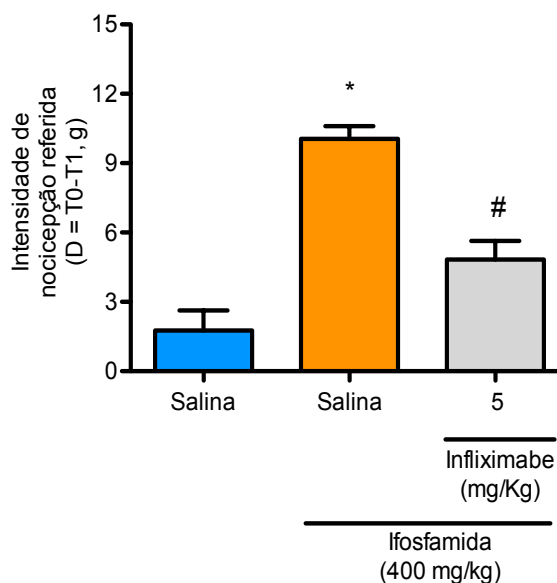
Figura 28 – Efeito do pré-tratamento com Infiximabe sobre o infiltrado neutrofílico vesical induzido por IFO



Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de mieloperoxidase vesical após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Infiximabe (Infiximabe 5 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). n=6/grupo. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \* $p < 0,05$ .

Por outro lado, a redução no limiar de nociceção após 12 horas da injeção de IFO ( $10,05 \pm 0,55$  g) quando comparado aos animais controle ( $1,76 \pm 0,87$  g) foi significativamente melhorado com o pré-tratamento com Infiximabe ( $4,83 \pm 0,80$  g) (FIGURA 29).

Figura 29 – Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre hipernocicepção visceral induzida por IFO



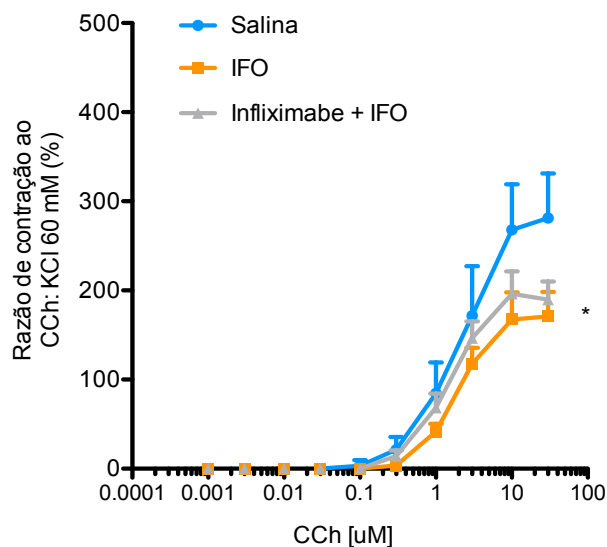
Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de intensidade de nocicepção visceral após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p.), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Infliximabe (Infliximabe 5 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=6/grupo. Os valores significativos tinham \*p < 0,05.

#### 5.2.4 Efeito da administração prévia de Infliximabe sobre a disfunção vesical “in vitro” na CH induzida por IFO

Ao avaliar a contratilidade *in vitro* das bexigas de animais tratados com IFO, foi possível, mais uma vez, evidenciar uma hiporresponsividade ao estímulo com CCh, com uma contração máxima de  $170,84 \pm 27,64$  % da razão contração máxima ao CCh pela contração com 60 mM de KCl, significativamente menor que a contração máxima dos músculos lisos das bexigas dos animais controle  $281,18 \pm 50,12$  %. Os animais que foram pré-tratados com Infliximabe, por sua vez, apresentaram hiporresponsividade semelhante aos animais tratados com IFO, com  $189,67 \pm 20,32$  % (FIGURA 30).

Com isso, um novo grupo experimental não foi submetido ao protocolo de cistometrografia, uma vez que o Infliximabe não foi capaz de prevenir a hiporresponsividade do músculo liso vesical induzida por IFO.

Figura 30 – Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre a hiporresponsividade do músculo liso vesical induzida por IFO

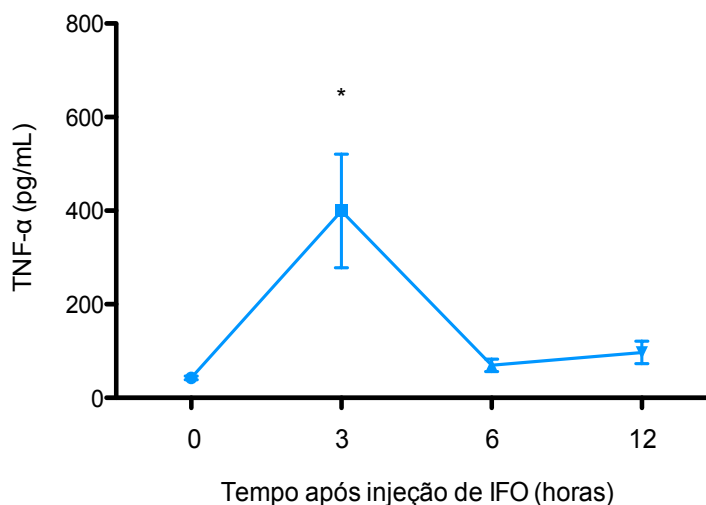


Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de % da contração muscular máxima induzida por CCh dividido pela contração muscular induzida por 60mM de KCl após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Infliximabe (Infliximabe 5 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). n=5/grupo. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \* $p < 0,05$ .

### 5.2.5 Efeito da administração de Ifosfamida nos níveis vesicais de TNF- $\alpha$

Com o objetivo de identificar o momento no qual a quantidade de TNF- $\alpha$  poderia estar alterada nas bexigas, IFO foi injetada em 4 grupos de animais, os quais foram sacrificados em tempo diferentes, e quantificados os níveis de TNF- $\alpha$ . Esse experimento mostrou que houve um aumento significativo de TNF- $\alpha$  3 horas após a injeção de IFO ( $399,60 \pm 121,40$  pg/mL) quando comparado ao tempo de 0h ( $42,73 \pm 4,10$  pg/mL) (FIGURA 31).

Figura 31 – Dosagem de TNF- $\alpha$  vesical 0, 3, 6 e 12 h após a injeção de ifosfamida

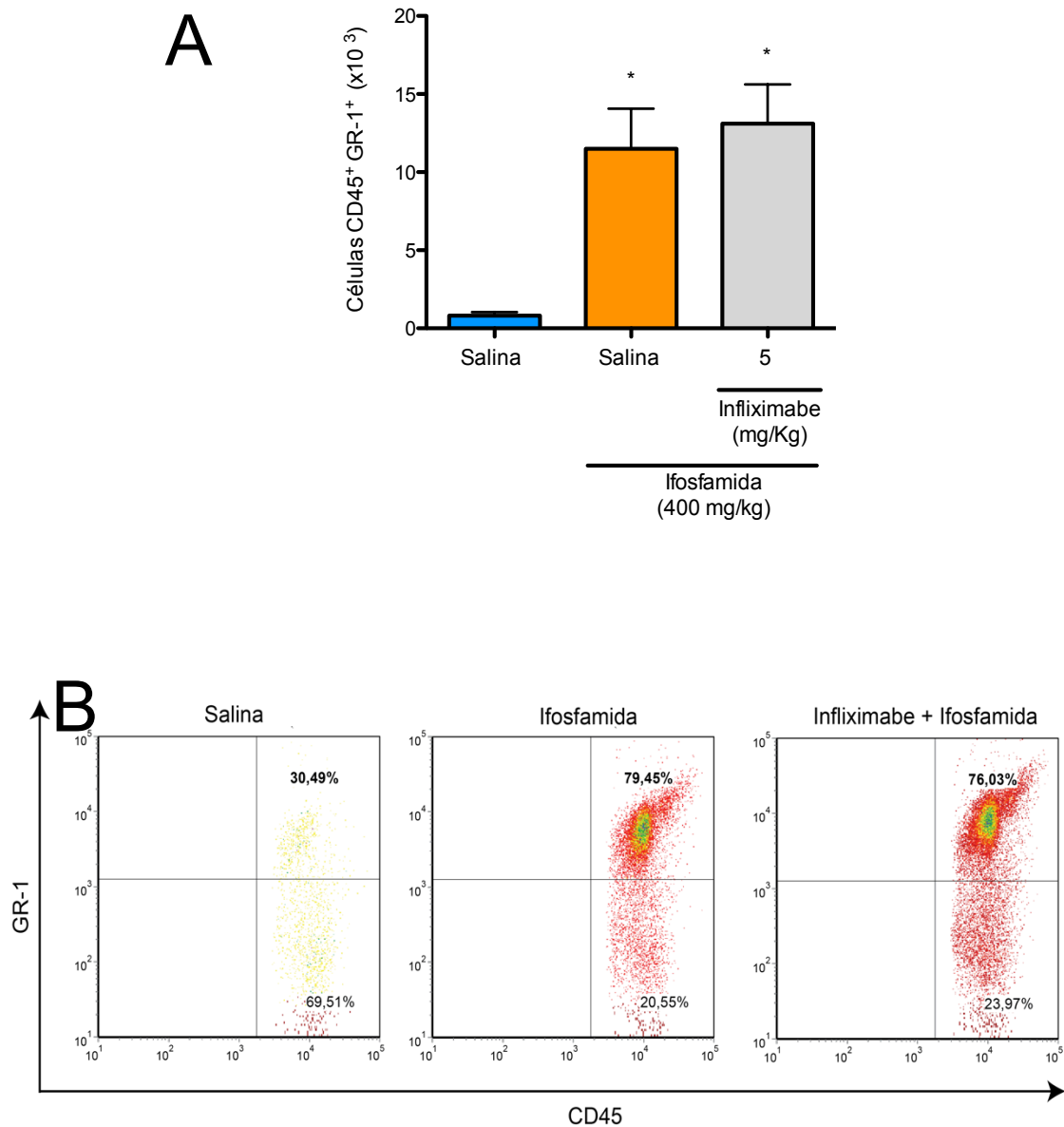


Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de TNF- $\alpha$  (pg/mL) após 0, 3, 6 e 12 h de injeção de Ifosfamida 400 mg/kg i.p. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=5/grupo. Os valores significativos tinham \*p< 0,05.

### **5.2.6 Efeito do pré-tratamento com Infiximabe sobre a quantidade de neutrófilos e macrófagos nas bexigas de camundongos com CH induzida por IFO**

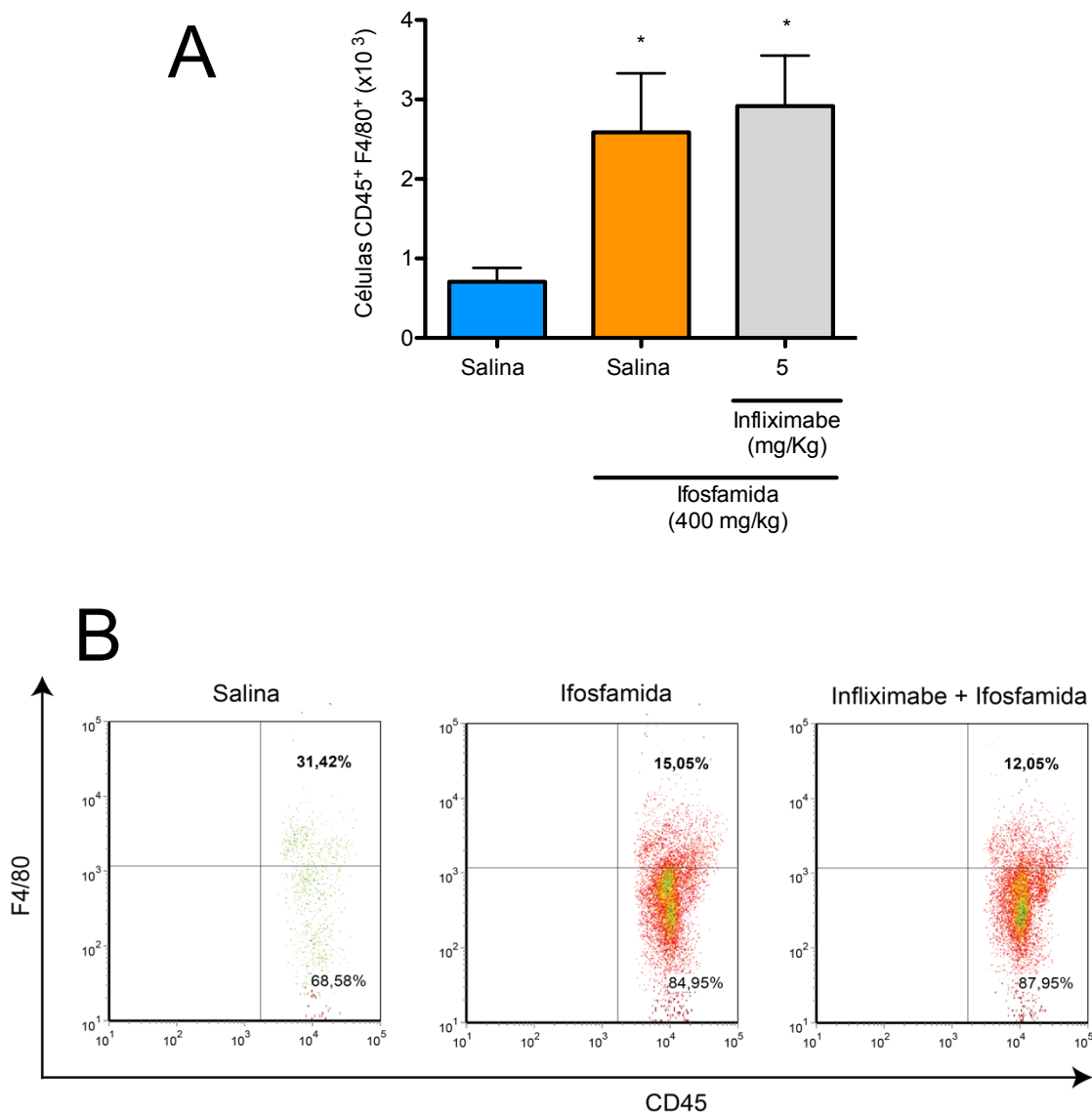
Com o intuito de investigar se algumas das principais células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, estariam envolvidas na patogênese da CH, foi realizada citometria de fluxo, através da qual foi evidenciado um aumento vesical significativo no número de neutrófilos ( $11,50 \pm 2,56 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup>) (FIGURA 32) e macrófagos ( $2,59 \pm 0,17 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) (FIGURA 33) quando comparado ao grupo controle ( $0,82 \pm 0,22 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup>) e ( $0,71 \pm 0,17 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), respectivamente. Contudo, o pré-tratamento com infliximabe não foi capaz de prevenir a infiltração vesical de neutrófilos ( $13,11 \pm 2,51 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup>) e macrófagos ( $2,92 \pm 0,64 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>).

Figura 32 – Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre o aumento de neutrófilos na bexiga de animais tratados com IFO



Os valores da figura (A) representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de células CD45<sup>+</sup>GR1<sup>+</sup> presentes na bexiga após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Infliximabe (Infliximabe 5 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=6/grupo. Os valores significativos tinham \*p< 0,05. Os valores da figura (B) estão representados em *Dot Plot*, mostrando a porcentagem de células CD45<sup>+</sup> que são GR1<sup>+</sup> ou GR1<sup>-</sup>

Figura 33 – Efeito do pré-tratamento com Infliximabe sobre o aumento de macrófagos na bexiga de animais tratados com IFO



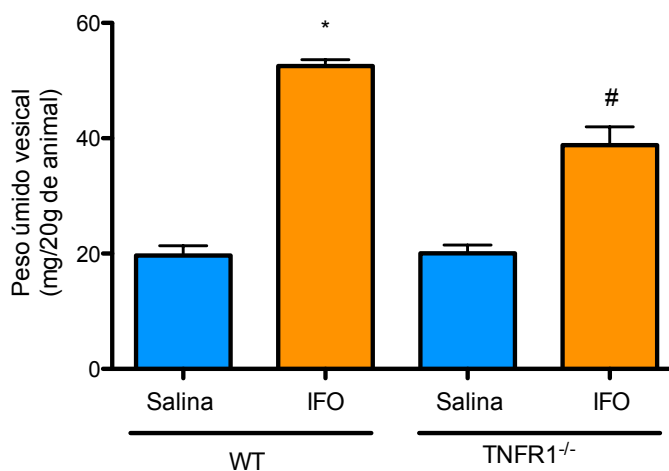
Os valores da figura (A) representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> presentes na bexiga após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.) Infliximabe (Infliximabe 5 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=6/grupo. Os valores significativos tinham \*p< 0,05. Os valores da figura (B) estão representados em *Dot Plot*, mostrando a porcentagem de células CD45<sup>+</sup> que são F4/80<sup>+</sup> ou F4/80<sup>-</sup>



### 5.2.7 Efeito da administração de Ifosfamida no peso úmido vesical e parâmetros macroscópicos em camundongos C57BL/6 WT e TNFR1<sup>-/-</sup> ou TNFR1/R2<sup>-/-</sup>

Para investigar qual dos receptores de TNF poderia estar envolvido na patogênese da CH induzida por IFO, animais *knockout* para TNFR1 foram submetidos ao protocolo de indução de CH por IFO. Assim, foi observado que os animais TNFR1<sup>-/-</sup> que foram submetidos ao uso de IFO desenvolveram hemorragia 2[1-2] e edema 1[1-2] (TABELA 6), com aumento de PUV (38,79 ± 3,21 mg/ 20 g de animal) em comparação ao animal TNFR1<sup>-/-</sup> que recebeu salina, (20,06 ± 1,43 mg/ 20 g de animal), contudo o valor observado para o PUV foi significativamente menor quando comparado aos animais WT que receberam IFO (52,51 ± 1,13 mg/ 20 g de animal) (FIGURA 34).

Figura 34 – Efeito da injeção de IFO no PUV de animais WT e TNFR1<sup>-/-</sup>



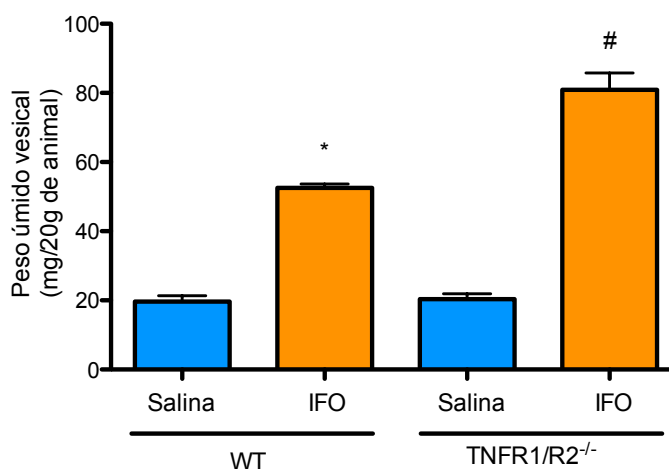
Os valores da figura representam a média ± E.P.M. dos valores do PUV após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: WT Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), WT IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.), TNFR1<sup>-/-</sup> Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), TNFR1<sup>-/-</sup> IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). n=6/grupo. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \*p< 0,05.

Tabela 6. Escores macroscópicas de bexigas em modelo de CH induzida por IFO em camundongos C57BL/6 selvagens e TNFR1<sup>-/-</sup>

Animal	Grupos	Escores macroscópicos	
		Edema	Hemorragia
WT	Salina	0 (0-0)	0 (0-0)
	Ifosfamida	1 (1-2)*	2 (2-2)*
TNFR1 <sup>-/-</sup>	Salina	0 (0-0)	0 (0-0)
	Ifosfamida	1 (1-2)#	2 (1-2)#

\* p<0,05 quando comparado ao grupo WT salina e # p<0,05 quando comparado ao grupo TNFR1<sup>-/-</sup> salina por Kruskal-Wallis e teste de Dunn.

Ao utilizar animais *knockout* para TNFR1 e TNFR2, intrigantemente, foi evidenciado que os animais TNFR1/R2<sup>-/-</sup> tratados com IFO apresentavam hemorragia 3[3-3] e edema 3[3-3] significativamente mais intensos que os animais WT tratados com IFO, os quais apresentaram hemorragia de 2[2-2] e edema de 1[1-2] (TABELA 7). Além disso, os animais TNFR1/R2<sup>-/-</sup> tratados com IFO apresentaram um aumento de PUV ( $80,89 \pm 4,91$  mg/ 20 g de animal) em comparação ao animal TNFR1<sup>-/-</sup> que recebeu salina, ( $20,36 \pm 1,54$  mg/ 20 g de animal), e aos animais WT que receberam IFO ( $52,51 \pm 1,13$  mg/ 20 g de animal) (FIGURA 35).

Figura 35 – Efeito da ifosfamida no PUV de animais WT e TNFR1/R2<sup>-/-</sup>

Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do PUV após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: WT Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), WT IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.), TNFR1/R2<sup>-/-</sup> Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), TNFR1/R2<sup>-/-</sup> IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=6/grupo. Os valores significativos tinham \*p< 0,05.

Tabela 7. Escores macroscópicas de bexigas em modelo de CH induzida por IFO em camundongos C57BL/6 selvagens e TNFR1/R2<sup>-/-</sup>

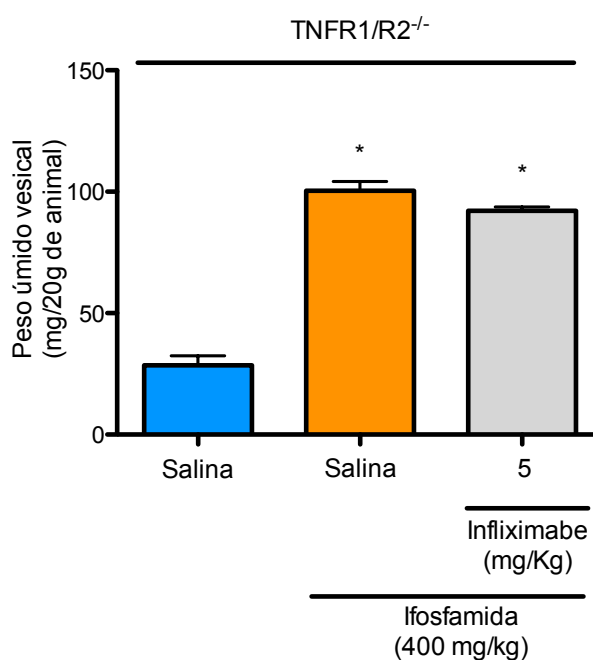
Animal	Grupos	Escore macroscópico	
		Edema	Hemorragia
WT	Salina	0 (0-0)	0 (0-0)
	Ifosfamida	1 (1-2)*	2 (2-2)*
TNFR1/R2 <sup>-/-</sup>	Salina	0 (0-0)	0 (0-0)
	Ifosfamida	3 (3-3)#	3 (3-3)#

\* p<0,05 quando comparado ao grupo WT salina e # p<0,05 quando comparado ao grupo TNFR1/R2<sup>-/-</sup> salina e WT ifosfamida por Kruskal-Wallis e teste de Dunn.

### 5.2.8 Efeito da administração prévia de Infiximabe sobre o peso úmido vesical camundongos $TNFR1/R2^{-/-}$

Com o intuito de investigar se o aumento no PUV nos animais  $TNFR1/R2^{-/-}$  seria dependente da ligação do TNF a outros receptores, realizamos um pré-tratamento com Infiximabe nos animais  $TNFR1/R2^{-/-}$  que seriam submetidos a injeção de IFO. Contudo, não evidenciamos prevenção no aumento do PUV do grupo pré-tratado com Infiximabe ( $92,20 \pm 1,58$  mg/ 20 g de animal) versus o grupo tratado com IFO ( $100,40 \pm 3,78$  mg/ 20 g de animal) (FIGURA 36).

Figura 36 – Efeito do pré-tratamento com Infiximabe sobre o aumento do PUV de animais  $TNFR1/R2^{-/-}$  tratados com IFO



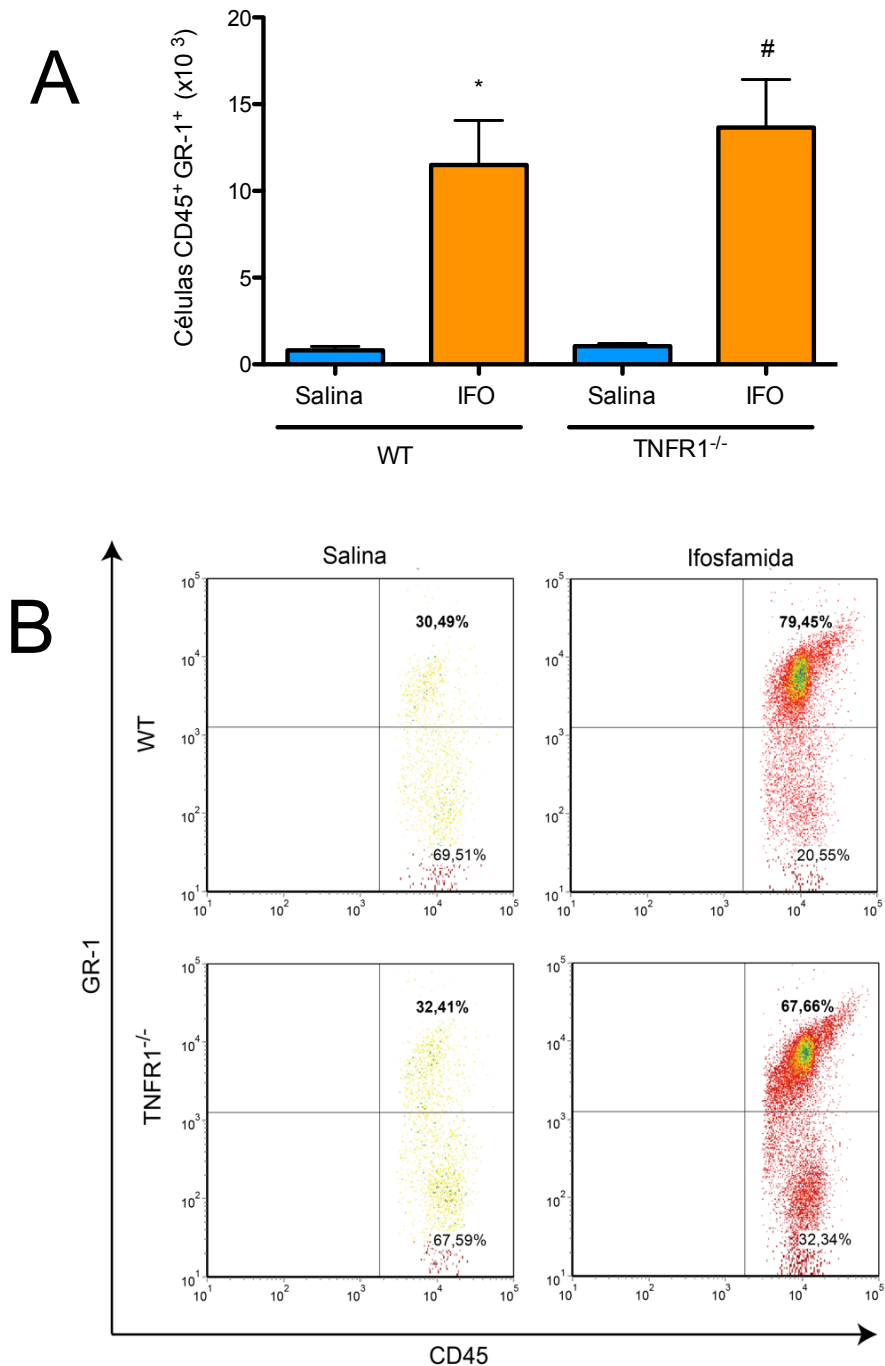
Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do PUV após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos:  $TNFR1/R2^{-/-}$  Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p.),  $TNFR1/R2^{-/-}$  IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.)  $TNFR1/R2^{-/-}$  Infiximabe (Infiximabe 5 mg/kg, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). n=6/grupo. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=4/grupo. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$ .

### **5.2.9 Efeito da administração de Ifosfamida na quantidade de neutrófilos e macrófagos em bexigas de camundongos C57BL/6 selvagens e TNFR1<sup>-/-</sup> ou TNFR1/R2<sup>-/-</sup>**

A despeito de não ter sido encontrada interferência do Infiximabe no infiltrado vesical de neutrófilos induzidos por IFO através do ensaio de MPO, realizamos citometria de fluxo de bexigas de animais WT ou TNFR1<sup>-/-</sup> ou TNFR1/R2<sup>-/-</sup> na tentativa de evidenciar se algum desses receptores estaria interferindo especificamente na infiltração neutrofílica induzida por IFO. Os camundongos TNFR1<sup>-/-</sup> e TNFR1/R2<sup>-/-</sup> tratados com IFO apresentaram um aumento no número de neutrófilos ( $13,65 \pm 2,76 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup>) (FIGURA 37) e ( $17,35 \pm 0,82 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup>) (FIGURA 39), respectivamente, quando comparado aos animais TNFR1<sup>-/-</sup> e TNFR1/R2<sup>-/-</sup> tratados com salina ( $1,05 \pm 0,16 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup>) e ( $4,51 \pm 1,40 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup>), respectivamente. Contudo, quando comparado os animais WT e *knockout* tratados com IFO, não houve diferença significativa do número de neutrófilos por bexiga.

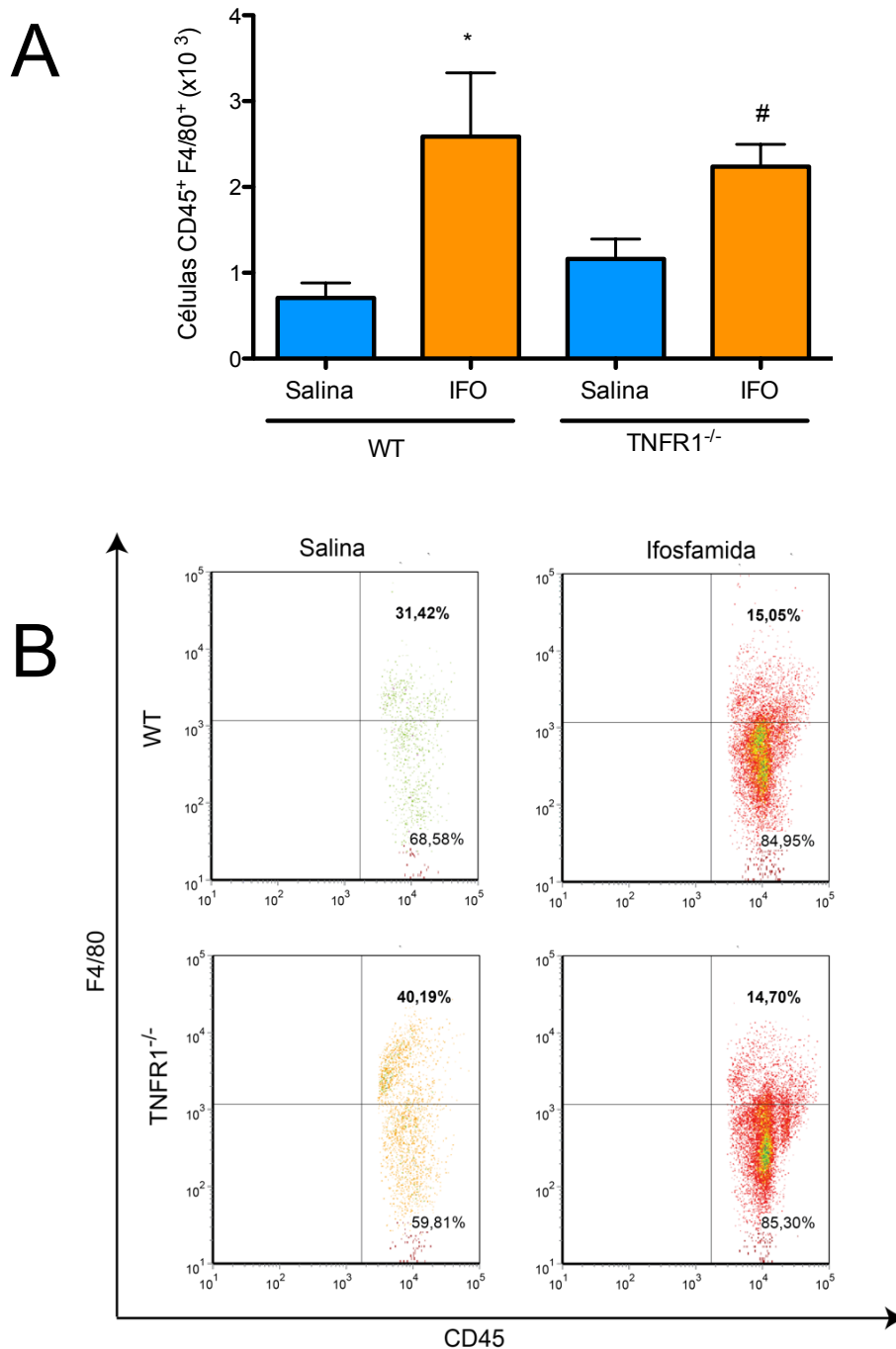
A quantidade de macrófagos nos animais TNFR1<sup>-/-</sup> tratados com IFO ( $2,24 \pm 0,26 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) está aumentada quando comparado ao grupo *knockout* tratado com salina ( $1,16 \pm 0,23 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), porém sem diferença significativa quando comparado com o número de macrófagos nas bexigas dos animais WT tratados com IFO ( $2,59 \pm 0,74 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) (FIGURA 38). Já os animais TNFR1/R2<sup>-/-</sup> tratados ou não com IFO apresentaram quantidades semelhantes de macrófagos vesicais ( $4,57 \pm 0,70 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) e ( $4,24 \pm 1,59 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), respectivamente, e essas quantidades não tiveram diferença significativa quando comparado ao grupo WT tratado com IFO ( $2,59 \pm 0,74 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), contudo com aumento significativo quando comparado aos animais WT tratados com salina ( $0,71 \pm 0,17 \times 10^3$  células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) (FIGURA 40).

Figura 37 – Efeito da injeção de ifosfamida no número de neutrófilos nas bexigas de animais WT e TNFR1<sup>-/-</sup>



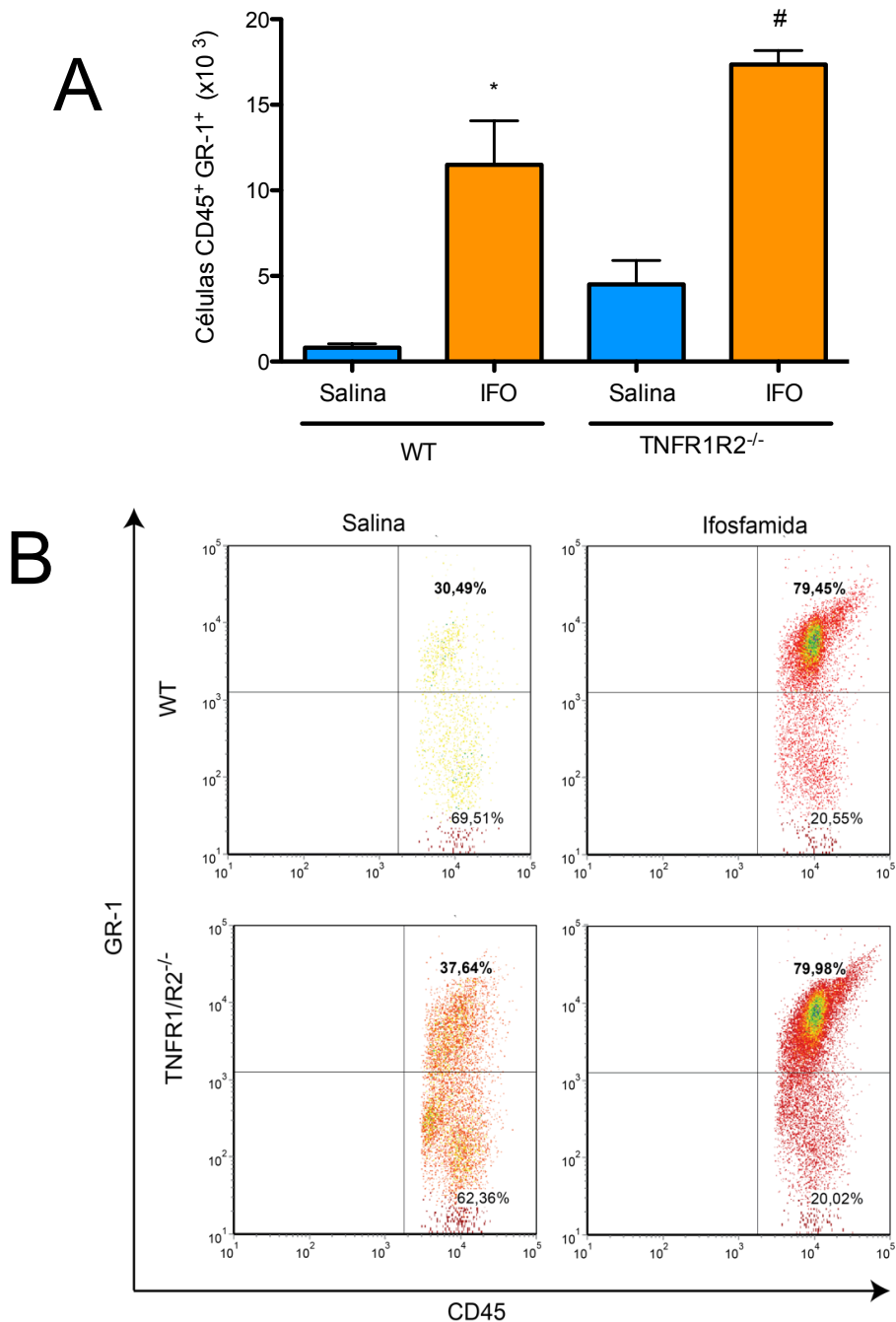
Os valores da figura (A) representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de células CD45<sup>+</sup>GR1<sup>+</sup> presentes na bexiga após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: WT Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), WT IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.), TNFR1<sup>-/-</sup> Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), TNFR1<sup>-/-</sup> IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \*p < 0,05. n=6/grupo. Os valores da figura (B) estão representados em *Dot Plot*, mostrando a porcentagem de células CD45<sup>+</sup> que são GR1<sup>+</sup> ou GR1<sup>-</sup>.

Figura 38 – Efeito da injeção de ifosfamida no número de macrófagos nas bexigas de animais WT e TNFR1<sup>-/-</sup>



Os valores da figura (A) representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> presentes na bexiga após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: WT Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), WT IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.), TNFR1<sup>-/-</sup> Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), TNFR1<sup>-/-</sup> IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \*p< 0,05. n=6/grupo. Os valores da figura (B) estão representados em *Dot Plot*, mostrando a porcentagem de células CD45<sup>+</sup> que são F4/80<sup>+</sup> ou F4/80<sup>-</sup>.

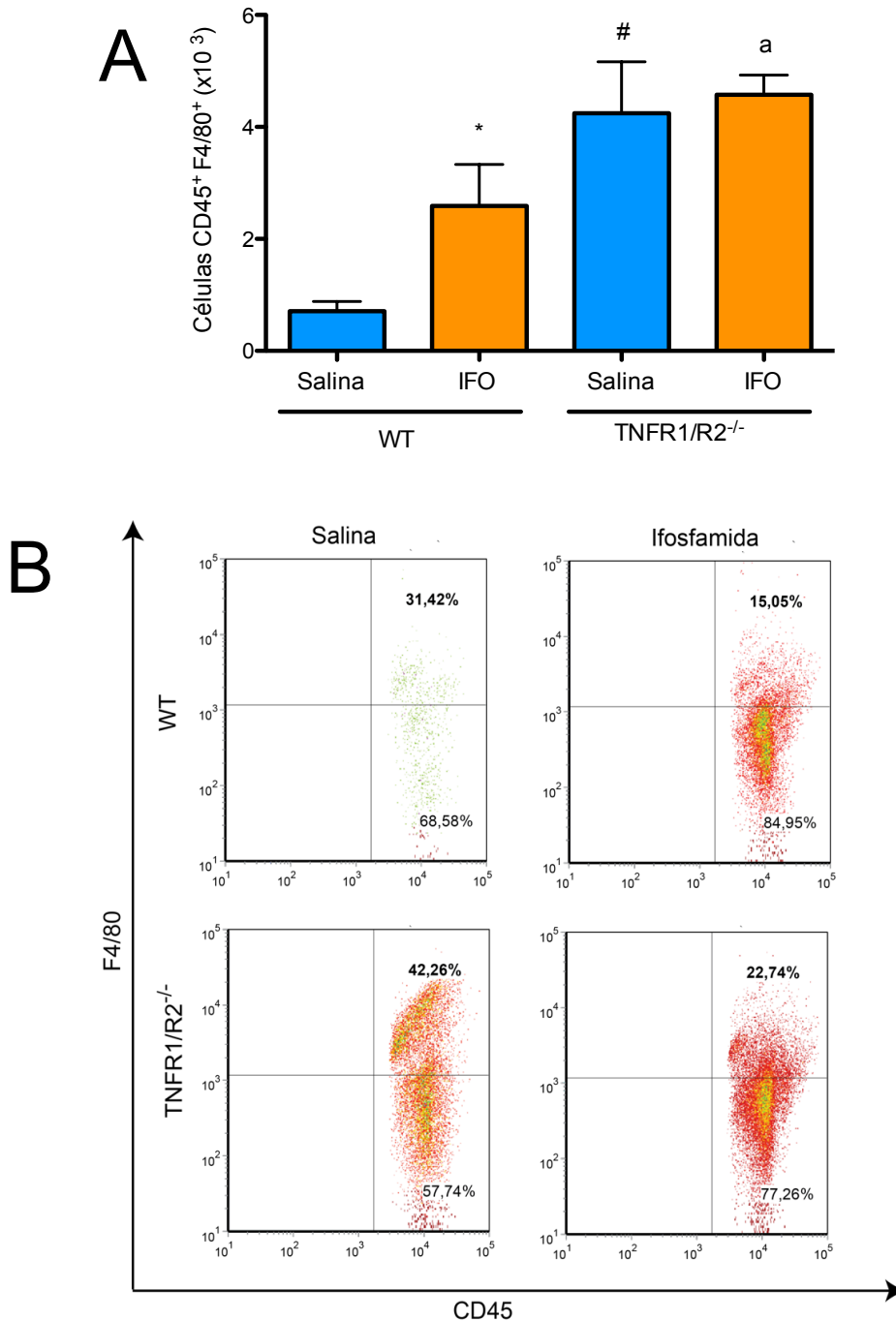
Figura 39 – Efeito da injeção de ifosfamida no número de neutrófilos nas bexigas de animais WT e TNFR1/R2<sup>-/-</sup>



Os valores da figura (A) representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de células CD45<sup>+</sup>GR1<sup>+</sup> presentes na bexiga após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: WT Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), WT IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.), TNFR1/R2<sup>-/-</sup> Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), TNFR1/R2<sup>-/-</sup> IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p).. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \*p< 0,05. n=6/grupo. Os valores da figura (B) estão representados em *Dot Plot*, mostrando a porcentagem de células CD45<sup>+</sup> que são GR1<sup>+</sup> ou GR1<sup>-</sup>.



Figura 40 – Efeito da injeção de ifosfamida no número de macrófagos nas bexigas de animais WT e TNFR1/R2<sup>-/-</sup>



Os valores da figura (A) representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> presentes na bexiga após 12 h de injeção de Ifosfamida. Grupos: WT Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), WT IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.), TNFR1/R2<sup>-/-</sup> Salina (NaCl 0,9%, i.p.+ NaCl 0,9%, i.p), TNFR1/R2<sup>-/-</sup> IFO (NaCl 0,9%, i.p. + Ifosfamida 400 mg/kg, i.p.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \*p< 0,05. n=6/grupo. Os valores da figura (B) estão representados em *Dot Plot*, mostrando a porcentagem de células CD45<sup>+</sup> que são F4/80<sup>+</sup> ou F4/80<sup>-</sup>.

## 6 DISCUSSÃO

Clinicamente, a inflamação aguda é caracterizada por cinco sinais cardinais: rubor, calor, inchaço, dor e perda de função. Os quatro primeiros foram descritos por Celsius (cerca de 30 a.C. a 38 d.C.), o quinto foi posteriormente adicionado por Virchow, no século XIX (PLYTYCZ; SELJELID, 2003). Sendo a cistite hemorrágica consequente ao uso clínico das oxazafosforinas uma doença inflamatória aguda, há a presença de características semelhantes às descritas há séculos, com disúria (dor ao urinar), dor suprapúbica, hematúria, edema vesical e polaciúria (WEIN *et al.*, 2012). Desde algum tempo, assume-se que esse processo inflamatório vesical é desencadeado pelo contato entre a acroleína, metabólito urotóxico das oxazafosforinas, e as células do urotélio (COX, 1979). A partir de então, ocorre a participação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), as quais parecem ser os pivôs da patogênese da cistite hemorrágica (GOMES *et al.*, 1995; RIBEIRO *et al.*, 2002).

O Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará foi, sem dúvida, o pioneiro na investigação dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica. Dessa forma, em 1995, Gomes *et al.* evidenciaram, pela primeira vez, a participação de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , na patogênese da CH induzida por ciclofosfamida. Essa evidência experimental foi baseada no fato de que eventos inflamatórios associados à CH de camundongos foram atenuados através do pré-tratamento dos animais com antissoros anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$ . Posteriormente, o mesmo grupo viria a reiterar tal evidência, por sua vez, com um modelo experimental de CH induzida por ifosfamida em camundongos, em que, além do pré-tratamento com anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$ , os autores lançaram mão de ferramentas farmacológicas, tais como inibidores não seletivos da síntese de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (pentoxifilina) ou seletivos da síntese de TNF- $\alpha$  (talidomida), os quais foram capazes de atenuar significativamente a CH (RIBEIRO *et al.*, 2002).

Corroborando com esses estudos, o presente trabalho forneceu evidências experimentais as quais mostram que o antagonista do receptor de IL-1 (anakinra) foi capaz de inibir os parâmetros inflamatórios, a hipernocicepção e também a disfunção vesical, que se seguem à injeção de ifosfamida. Além disso, o

anticorpo monoclonal anti-TNF (Infliximabe) foi capaz de inibir o edema vesical e a hipernocicepção induzidos por ifosfamida. Finalmente, com o intuito de estudar quais receptores estariam envolvidos na patogênese da CH, o presente trabalho evidenciou também a importância do receptor de IL-1 (IL-1R), e dos receptores de TNF (TNFR1 e TNFR2) na CH, através do uso de animais geneticamente modificados com deleção dos genes responsáveis pela produção desses receptores.

IL-1 é pertencente a uma família de citocinas inflamatórias composta por 9 membros, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-18 e IL-33. IL-1 $\beta$  pode ser produzida por macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas, e está envolvida na resposta inflamatória aguda (DINARELLO 2011b). Em experimentos *in vitro*, utilizando cultura de células endoteliais, a adição de IL-1 $\beta$  é capaz de causar aumento de permeabilidade de forma dose dependente (PUHLMANN *et al.*, 2005). Esse aumento de permeabilidade vascular *in vitro* inicia-se com 15 minutos após o acréscimo de IL-1 $\beta$  no meio de cultura, e é mediado por proteínas da via de sinalização dependente de IL-1R-MyD88-NF- $\kappa$ B (ZHU *et al.*, 2012). Similarmente, IL-1 $\alpha$  é capaz de promover aumento de permeabilidade vascular, de forma dose-dependente, em experimentos *in vitro* utilizando células endoteliais (ROYALL *et al.*, 1989).

Em experimentos *in vivo*, utilizando coelhos, Goldblum *et al.* (1989) realizaram infusões endovenosas de IL-1 $\beta$  ou IL-1 $\alpha$  recombinantes humanas, e 5 horas depois evidenciaram nos pulmões dos animais que receberam qualquer uma das citocinas, edema perivascular, lesão endotelial e extravasamento de líquido. Corroborando com esse trabalho, Ganter *et al.* (2008), utilizando modelo experimental de lesão aguda pulmonar por adenovírus em camundongos, evidenciaram um aumento de permeabilidade vascular e edema nos pulmões de animais que receberam adenovírus geneticamente modificado para expressar IL-1 $\beta$  humano, quando comparado aos animais que receberam o adenovírus selvagem. Adicionalmente, em modelo de artrite induzida por colágeno em camundongos, o qual cursa com edema articular, há um aumento de IL-1 $\beta$  (ZHU *et al.*, 2012), e o tratamento com anakinra é capaz de atenuar esse edema articular (LIU *et al.*, 2012).

Na presente investigação, foi mostrado aumento do edema vesical em animais submetidos à injeção de IFO, evidenciado através de parâmetros macroscópicos e microscópicos, aumento do peso úmido vesical e aumento do extravasamento vesical de azul de Evans. O pré-tratamento com anakinra 100

mg/kg, por sua vez, atenuou todos esses parâmetros de mensuração de edema vesical, apontando para a relevância de IL-1 $\beta$  e/ou IL-1 $\alpha$  na formação do edema vesical, bem como para a eficácia de anakinra em inibir esse processo.

Outra importante característica inflamatória relacionada à IL-1, é sua capacidade de induzir migração de neutrófilos. Em experimentos *in vitro*, utilizando monocamada de células endoteliais humanas, Moser *et al.* (1989) evidenciaram a migração de neutrófilos através da camada de células endoteliais quando o meio de cultura foi estimulado com IL-1. Em experimentos *in vivo*, Faccioli *et al.* (1990) demonstraram que injeções intraperitoneais de IL-1 $\beta$  ou IL-1 $\alpha$  eram capazes de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Tal efeito, entretanto, parecia ser absolutamente dependente da presença de células peritoneais residentes, uma vez que a depleção dessas células pela lavagem prévia da cavidade peritoneal dos animais e o aumento da população dessas células residentes, principalmente macrófagos, pelo tratamento prévio com tioglucolato, promoveram inibição e potenciação da migração de neutrófilos, respectivamente.

Posteriormente, Ribeiro *et al.* (1991) evidenciaram que a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por IL-1 era, de fato, dependente da presença de macrófagos residentes.

No trabalho ora em discussão, observou-se que nas bexigas de animais tratados com IFO houve um aumento de MPO, sugerindo ter ocorrido infiltração de neutrófilos. Quando utilizado o pré-tratamento com anakinra, houve uma clara diminuição na quantidade de MPO, demonstrando a importância da sinalização de IL-1, via seu receptor, na migração de neutrófilos para a bexiga urinária de animais tratados com IFO e a relevância do anakinra, como antagonista do receptor de IL-1, no bloqueio da CH.

IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  também estão historicamente relacionadas ao processo de dor. Apesar de atuarem no mesmo receptor e terem atividades biológicas semelhantes, a sequência de aminoácidos das duas moléculas tem apenas 26% de homologia. Assim sendo, Ferreira *et al.* (1988) evidenciaram que IL-1 $\beta$ , injetado sistemicamente em ratos, apresenta uma atividade hiperalgésica cerca de 3000 vezes maior que IL-1 $\alpha$ . Com isso, os autores investigaram qual a região da molécula de IL-1 $\beta$  seria capaz de induzir hiperalgesia e desenvolveram um tripeptídeo análogo capaz de antagonizar a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$  e por carragenina. O KdPT,

como foi chamado pelos autores, foi uma das primeiras terapias alvo direcionada a uma citocina.

Corroborando com o trabalho de Ferreira *et al.* (1988), Cunha *et al.* (1991) demonstraram que IL-1 $\beta$  quando injetada na pata de ratos era capaz de reduzir o limiar nociceptivo a estímulos mecânicos, e Cunha *et al.* (2000) observaram que IL-1ra injetado concomitantemente nas patas dos ratos era capaz de inibir a resposta hiperalgésica à IL-1 $\beta$  de forma dose-dependente, além de inibir a hiperalgesia plantar causada pela injeção intraplantar de LPS, carragenina, bradicinina ou TNF- $\alpha$ .

Há dados na literatura que dão conta de que a hipernocicepção associada à IL-1 pode estar associada ao aumento de expressão de ciclooxigenase-2 e consequentemente a níveis aumentados de prostaglandina E2 no sistema nervoso central (SAMAD *et al.*, 2001). O grupo do LAFICA acrescentou nova contribuição nesse mister, ao demonstrar que a enzima ciclooxigenase-2 encontrava-se expressa em níveis aumentados na CH, e parecia desempenhar um papel importante na patogênese da CH induzida por IFO, uma vez que inibidores seletivos dessa enzima são capazes de atenuar os eventos inflamatórios observados na CH (MACEDO *et al.*, 2008a). Além disso, Miki *et al.* (2011) evidenciaram que o uso de um inibidor do receptor EP1 de prostaglandinas (ONO-8130) foi capaz de atenuar a hipernocicepção visceral causada por ciclofosfamida.

Nessa perspectiva, diversos trabalhos demonstraram que a CH experimental induzida por oxazafosforinas está acompanhada de hipernocicepção visceral (DORNELLES *et al.*, 2014; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2007; MIKI *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2013). Seguindo essa lógica, o presente trabalho evidenciou a ocorrência de hipernocicepção visceral induzida por IFO e a eficácia do pré-tratamento com Anakinra na prevenção desse evento. Assim, é bem possível que o Anakinra, ao bloquear o receptor de IL-1, promova inibição da expressão de COX-2, com consequente inibição da liberação de PGE2 e da ativação de EP1.

Outro problema clínico proeminentemente presente na CH é a disfunção contrátil da bexiga, que culmina com sintomas clínicos de disúria e polaciúria. No sentido de melhor compreender os mecanismos envolvidos na disfunção contrátil como consequência do processo inflamatório da CH, a literatura registra diversos estudos que vão desde experimentos com cultura de células musculares lisas vesicais até experimentos de urodinâmica em animais anestesiados.

Nesse contexto, Johansson *et al.* (2002) realizaram experimentos com culturas primárias de células musculares de bexiga, e evidenciaram um aumento da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e de óxido nítrico (NO), quando essas células eram estimuladas com IL-1 $\beta$ . Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores (JOHANSSON *et al.*, 2003) estimulou tecidos musculares de bexigas com IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por 24 horas e avaliou a resposta contrátil a estímulos elétricos ou ao carbacol. Nesse estudo, foi evidenciado uma hiporresponsividade da musculatura lisa vesical aos estímulos elétricos nos tecidos pré-incubados com as citocinas, contudo, a resposta ao carbacol permaneceu inalterada (JOHANSSON *et al.*, 2003).

Considerando o importante papel de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  na CH induzida por oxazafosforinas (GOMES *et al.*, 1995; RIBEIRO *et al.*, 2002) e a capacidade de ambas em estimular iNOS (RIBEIRO *et al.*, 2002), esses trabalhos (JOHANSSON *et al.*, 2002; JOHANSSON *et al.*, 2003) estão em plena sintonia com o dados obtidos por Macedo *et al.* (2011), os quais demonstraram que o tratamento com ifosfamida 400 mg/kg leva a uma hiporresponsividade do músculo detrusor a estímulos como cloreto de potássio e carbacol. Em outro estudo, no qual se utilizou o modelo experimental de cistite induzida por injeção intravesical de acroleína, observou-se uma hiporresponsividade do tecido muscular a estímulos elétricos, a qual era prevenida com inibidores de iNOS (WANG *et al.*, 2013).

O presente estudo, por sua vez, mostrou uma hiporresponsividade vesical nos animais tratados com IFO, detectada através de estímulo vesical com carbacol. Provavelmente, as diferenças entre os resultados aqui apresentados e aqueles de Johansson *et al.* (2003), os quais realizaram pré-incubação de tecido vesical com IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , sejam consequentes a uma maior quantidade de mediadores envolvidos na CH induzida por IFO, os quais podem agir com sinergismo na produção da hiporresponsividade. Outra possibilidade seria que o tempo e a concentração das citocinas na pré-incubação produzida por Johansson *et al.* (2003) poderiam não ser suficientes para modificar o tecido muscular vesical.

Além disso, intrigantemente, Haddad *et al.* (1996), em um estudo *in vitro* utilizando fibroblastos, evidenciou que a adição de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi capaz de induzir *downregulation* dos receptores muscarínicos M2. Em outro trabalho, foi evidenciado *downregulation* dos receptores M2 e M3 no modelo de CH induzida por ciclofosfamida (KAGEYAMA *et al.*, 2008), mostrando que é possível que essa

redução de receptores seja consequente à liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  na patogênese da CH. Esses trabalhos corroboram com a investigação ora apresentada, uma vez que essa redução nos receptores pode se relacionar à hiporresponsividade do músculo detrusor em resposta ao estímulo com carbacol, e o pré-tratamento com anakinra, por sua vez, foi capaz de prevenir a disfunção do músculo vesical, provavelmente por prevenir o *downregulation* dos receptores muscarínicos.

A hiperatividade do músculo detrusor induzida por IFO repercute com a urodinâmica dos animais. No presente trabalho, observou-se aumento da pressão intravesical nos animais tratados com IFO, com aumento da frequência de micção. Corroborando com esse resultado, Macedo *et al.* (2011) evidenciaram semelhantes alterações, utilizando modelo experimental de CH induzida por IFO em ratos Wistar. Adicionalmente, observou-se uma melhora dos padrões urodinâmicos dos animais com pré-tratamento com inibidores da cicloxigenase, indometacina e etoricoxibe (MACEDO *et al.*, 2011). Alguns outros trabalhos realizaram avaliação urodinâmica dias após a injeção de outra oxazafosforina, a ciclofosfamida (CHUANG *et al.*, 2009; KIUCHI *et al.*, 2009), e evidenciaram uma hiperatividade do músculo detrusor.

Além disso, o pré-tratamento com anakinra foi capaz de atenuar as alterações presentes à cistometrografia quando comparado aos animais tratados com IFO. Apesar dessa avaliação urodinâmica tardia, Kiuchi *et al.* (2009) evidenciaram melhora da função vesical ao fazer um tratamento com um inibidor de NF-kB, corroborando com o resultado do presente trabalho, uma vez que a via de sinalização desencadeada por IL-1 regula positivamente NF-kB (DINARELLO, 2011a).

O mecanismo de ação do anakinra consiste no antagonismo do receptor IL-1R, inibindo a ligação entre o receptor e os ligantes IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , a qual desencadeia uma via de sinalização à jusante responsável pelos efeitos biológicos da IL-1 (DINARELLO, 2011a). Com isso, a identificação do momento no qual os níveis dessas citocinas estão aumentados na patogênese da CH induzida por oxazafosforinas é essencial. Em experimento de CH induzida por ciclofosfamida em ratos, observou-se um aumento da expressão de RNAm vesical de IL-1 $\beta$  a partir da quarta hora, o qual se manteve aumentado até o décimo dia após a injeção de ciclofosfamida 150 mg/kg i.p. A IL-1 $\alpha$ , por outro lado, não apresentou aumento de RNAm vesical nos momentos avaliados (4h, 48h e 10 dias após a injeção de IFO)

(MALLEY; VIZZARD, 2002). Em outro trabalho, o qual utilizou o mesmo protocolo de indução de cistite do anterior, foi avaliado os níveis de citocinas presentes na urina dos animais nos tempos 0, 2, 4, 6 e 10 horas após a injeção de ciclofosfamida. Observou-se um aumento nos níveis de IL-1 $\alpha$  a partir da quarta hora, o qual se manteve até a décima hora, e os níveis de IL-1 $\beta$  aumentaram significativamente apenas na quarta hora avaliada (SMALDONE *et al.*, 2009).

O precursor de IL-1 $\alpha$  está constitutivamente presente nas células epiteliais que revestem a mucosa vesical, assim como nas células endoteliais (DINARELLO *et al.*, 2012), com isso, a lesão vesical induzida pela acroleína no modelo de CH induzida por oxazafosforina pode cursar com morte celular, como mostrado por Zupancic *et al.* (2008), com a consequente liberação de IL-1 $\alpha$  na urina. Em concordância com esse fato, foi mostrado por Chen *et al.* (2007) que células em necrose injetadas na cavidade peritoneal eram capazes de induzir migração de neutrófilos, e esta migração era inibida por anticorpo anti-IL-1 $\alpha$ , mas não por anti-IL-1 $\beta$ , sugerindo, portanto, que as células em necrose liberam IL-1 $\alpha$  e não  $\alpha$  IL-1 $\beta$ .

Outro estudo realizou experimento *in vivo* com injeções subcutâneas de matrigel contendo lisados de células necróticas e apoptóticas para avaliar a migração celular. Foi evidenciado que células necróticas presentes no matrigel eram capazes de recrutar células de linhagem mielóide, e quando se utilizou anticorpo anti-IL-1 $\alpha$ , as células necróticas eram incapazes de recrutar tais células. Em contrapartida, os lisados de células apoptóticas, as quais não liberam seu conteúdo intracelular quando morrem, eram incapazes de recrutar células (COHEN *et al.*, 2010). Assim, sugeriu-se que o conteúdo intracelular liberado pelas células necróticas era capaz de recrutar células por um mecanismo dependente de IL-1 $\alpha$ . Este mesmo grupo evidenciou posteriormente que, a despeito de IL-1 $\alpha$  ser pivô na iniciação da inflamação com estímulo de células necróticas, a IL-1 $\beta$  é importante na manutenção da inflamação através do recrutamento constante de macrófagos (RIDER *et al.*, 2011).

A IL-1 $\beta$  precisa de uma reação catalisada pela caspase-1 para que haja a sua formação a partir da pró-IL-1 $\beta$ . Essa reação deve estar ocorrendo, sobretudo na camada submucosa, por isso, pode estar havendo uma menor concentração urinária dessa proteína, quando comparado à IL-1 $\alpha$  (SMALDONE *et al.*, 2009). Por outro lado, quando se atenta para a expressão de RNAm, ocorre um aumento de expressão de IL-1 $\beta$  já na quarta hora, algo não observado com a IL-1 $\alpha$  (MALLEY;



VIZZARD, 2002), talvez pelo constante estímulo da produção de IL-1 $\beta$  no processo inflamatório (DINARELLO *et al.*, 2012). No presente estudo, avaliou-se os níveis de IL-1 $\beta$  no tecido vesical nas horas 0, 3, 6 e 12, e observou-se o aumento de seus níveis ocorrem apenas na terceira hora após a injeção de IFO, fato este, em sintonia com a literatura.

Com o intuito de avaliar especificamente a importância do IL-1 $\beta$  na patogênese da CH induzida por IFO, utilizou-se animais geneticamente modificados com deleção do gene responsável pela produção de caspase-1. Assim, os animais *knockout* para caspase-1 não apresentaram prevenção ou mesmo atenuação do edema e/ou da hemorragia quando comparados aos animais selvagens. Com isso, os eventos vesicais protegidos com o uso de anakinra parecem não depender apenas de IL-1 $\beta$ , mas também da ação de IL-1 $\alpha$ .

Foram utilizados também animais *knockout* para o gene que codifica a proteína IL-1R, para estudar se os efeitos advindos do anakinra seriam compatíveis com a ausência desse receptor. Com isso, observou-se que os animais IL-1R<sup>-/-</sup> apresentaram uma prevenção completa da lesão vesical, no tocante aos parâmetros de edema e hemorragia. Esses animais também obtiveram uma inibição no infiltrado vesical de neutrófilos e macrófagos, fato este que corrobora com a literatura (COHEN *et al.*, 2010; RIDER *et al.*, 2011) no tocante a inibição do infiltrado celular ao se inibir a via de IL-1, e acentua a possibilidade da participação de IL-1 $\alpha$  como um gatilho para a ativação da cascata inflamatória na CH induzida por IFO.

Ainda remetendo-se aos trabalhos desenvolvidos pelo grupo do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), GOMES *et al.*, (1995) e RIBEIRO *et al.*, (2002) demonstraram que o TNF- $\alpha$  desempenha um importante papel na gênese da CH induzida por oxazafosforinas.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina que regula vários processos da resposta imune e faz parte de uma família de citocinas, dentre elas, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  ou linfotoxina- $\alpha$ , e linfotoxina- $\beta$ . A sinalização do TNF ocorre através da ativação de dois receptores (TNFR1 e TNFR2) (ZELOVÁ; HOŠEK, 2013).

Assim como a IL-1, o TNF- $\alpha$  é capaz de produzir aumento de permeabilidade vascular em modelos *in vitro* utilizando células endoteliais (HOFMANN *et al.*, 2002; ROYALL *et al.*, 1989). As células polimorfonucleares quando adicionadas ao meio de cultura de células endoteliais também induzem aumento de permeabilidade, o qual é intensificado quando as células endoteliais

ficam em contato prévio com TNF- $\alpha$  (GIBBS *et al.*, 1990). Em experimentos *in vivo*, a injeção endovenosa de TNF- $\alpha$  foi capaz de aumentar a permeabilidade vascular em pulmões de ovelhas (REDL *et al.*, 1990) e pulmões de ratos, e nesses últimos induz também um processo inflamatório pulmonar (BARTON-PAI *et al.*, 2011). Em outro estudo, foi realizado um modelo experimental de otite média em ratos, o qual cursa com inflamação e aumento de permeabilidade vascular na orelha média, e foi testada a eficácia do tratamento com infliximabe, mostrando uma redução da permeabilidade vascular (LEE *et al.*, 2008).

Gomes *et al.* (1995), por sua vez, evidenciou redução de permeabilidade vascular nas bexigas de camundongos submetidos à CH por ciclofosfamida de animais que eram pré-tratados com antissoro anti-TNF- $\alpha$ , e, corroborando com esse achado, Ribeiro *et al.* (2002) encontraram resultado semelhante de redução da permeabilidade vesical em modelo de CH induzida por IFO ao realizar o pré-tratamento com anticorpo anti-TNF- $\alpha$  e talidomida (inibidor da síntese de TNF- $\alpha$ ). Similarmente, o presente estudo investigou o efeito do pré-tratamento com o infliximabe no edema vesical induzido por IFO, e observou-se que, quando utilizada a dose de 5 mg/kg de infliximabe, houve uma redução do peso úmido vesical, redução nos parâmetros macroscópicos de edema e do extravasamento vascular por azul de Evans.

Assim como a IL-1, o TNF possui a característica de induzir migração de neutrófilos. Esse fato foi demonstrado *in vitro*, através da indução de migração de neutrófilos quando se adicionava TNF em ao meio de cultura contendo células endoteliais humanas (MOSER *et al.*, 1989). Tal efeito foi observado também em ratos, através da injeção intraperitoneal de TNF- $\alpha$  ou TNF- $\beta$ , os quais induzem migração de neutrófilos. Da mesma forma que com IL-1, esse efeito parecia ser absolutamente dependente da presença de células peritoneais residentes (FACCIOLI *et al.* 1990). No presente trabalho, foi possível observar um aumento no infiltrado neutrofílico vesical nos animais tratados com IFO, através da observação de um aumento na mensuração do MPO e na presença de células CD45<sup>+</sup>GR-1<sup>+</sup> nas bexigas, quando comparado aos animais controle. O pré-tratamento com infliximabe, no entanto, foi incapaz de prevenir esse infiltrado. Além disso, foi observado também por citometria de fluxo um aumento na quantidade de monócitos (células CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) nas bexigas dos animais tratados com IFO, quando comparado aos animais controle, e esse aumento também não foi inibido com o uso do infliximabe.

Como destacado anteriormente, é possível que o IL-1 $\alpha$  seja o mediador inflamatório gatilho na patogênese da CH, com liberação de TNF- $\alpha$  após o infiltrado celular já ter sido deflagrado.

No final da década de 1980, já se sabia que IL-1 $\beta$  era capaz de causar hiperalgesia quando aplicada na região intraplantar de ratos (FERREIRA *et al.*, 1988). Pouco tempo depois, Cunha *et al.* (1992) demonstraram que a injeção intraplantar de TNF- $\alpha$  também causava hiperalgesia, a qual era atenuada com uso de inibidores da cicloxigenase e antissoros anti-IL-1, anti-IL-6 e anti-IL-8. Nesse mesmo estudo, foi evidenciado que a inflamação da pata de ratos induzida por carragenina era inibida com pré-tratamento com antissoro anti-TNF- $\alpha$ . Em concordância com esses resultados, Ribeiro *et al.* (2000) demonstraram que o pré-tratamento com talidomida era capaz de inibir a hipernocicepção apresentada por ratos que foram submetidos a injeções intraplantares de carragenina e bradicinina, as quais eram relacionadas a um aumento de TNF intraplantar. Contudo, talidomida não foi capaz de reduzir o edema promovido pela carragenina. Ainda nesse trabalho, foi observado que o pré-tratamento com talidomida promovia uma redução no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético ou zimozam intraperitoneal. Ribeiro *et al.* (2000) relacionaram a resposta analgésica da talidomida a uma redução na expressão de RNAm da proteína TNF- $\alpha$ . Além disso, descartaram a possibilidade de analgesia por mecanismos centrais, uma vez que, diferentemente da morfina, a talidomida não apresentou alteração na resposta do animal ao experimento de placa quente.

Similarmente, no presente trabalho, foi evidenciada uma prevenção à redução do limiar nociceptivo com o pré-tratamento com infliximabe, a despeito da pequena resposta benéfica a nível de edema e da ausência de inibição no infiltrado celular vesical.

O quinto elemento da resposta inflamatória, ou perda de função, por sua vez, foi avaliado no presente estudo através da contratilidade do músculo vesical. Como mostrado anteriormente, a injeção de IFO induz uma hiporresponsividade ao estímulo muscular com carbacol, e o anakinra foi capaz de prevenir essa disfunção. Por outro lado, o pré-tratamento com infliximabe não foi suficiente para promover inibição da disfunção vesical. Provavelmente, esse fato ocorra devido a cascata inflamatória já estar deflagrada antes do TNF exercer seu papel.

O mecanismo de ação do infliximabe consiste na ligação específica do anticorpo ao TNF- $\alpha$ , evitando a ligação entre ligante e receptor (KNIGHT *et al.*, 1993). Com isso, a identificação do momento no qual os níveis dessa citocina estão aumentados na patogênese da CH induzida por oxazafosforinas parece ser fundamental. Em experimento de CH induzida por ciclofosfamida em ratos, observou-se um aumento da expressão de RNAm vesical de TNF- $\alpha$  apenas na quarta hora após a injeção de ciclofosfamida 150 mg/kg i.p. (MALLEY; VIZZARD, 2002). Em um outro trabalho, utilizando o mesmo protocolo do anterior, foi avaliado os níveis de citocinas presentes na urina dos animais nos tempos 0, 2, 4, 6 e 10 horas após a injeção de ciclofosfamida, sendo observado apenas uma tendência a aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  a partir da quarta hora (SMALDONE *et al.*, 2009). No presente estudo, avaliou-se os níveis de TNF- $\alpha$  no tecido vesical nas horas 0, 3, 6 e 12, e observou-se o aumento de seus níveis apenas na terceira hora após a injeção de IFO, fato este, pouco diferente da literatura, muito embora diferentemente de Smaldone *et al.* (2009), aqui a matéria prima avaliada foi o tecido vesical e não a urina.

Na tentativa de procurar entender se algum dos receptores do TNF, TNFR1 ou TNFR2, participam do processo inflamatório da CH, foram realizados experimentos com animais geneticamente modificados para os genes que codificam a proteína TNFR1 ou ambas TNFR1 e TNFR2.

Nessa questão, em modelo de lesão pulmonar induzida por ventilação forçada durante duas horas, foi observada a presença de edema e infiltrado neutrofílico nos pulmões. Em estudo para identificar o papel dos receptores de TNF, foi observado que animais *knockout* para o receptor TNFR1 apresentam menor edema pulmonar sem menor infiltrado neutrofílico, quando comparado aos animais selvagens, contudo, ao se analisar os animais *knockout* para TNFR2, observou-se aumento no edema e na mortalidade desses animais. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que os animais selvagens submetidos à ventilação forçada apresentaram os receptores solúveis de TNFR1 e TNFR2 no lavado broncoalveolar, contudo a quantidade de TNFR2 foi, pelo menos, duas vezes maior que a quantidade de TNFR1 (WILSON *et al.*, 2007).

Em modelo de sepse polimicrobiana com ligação e perfuração do ceco, Ebach *et al.* (2005) demonstraram que os animais TNFR1<sup>-/-</sup> apresentam melhor sobrevida, enquanto os animais TNFR2<sup>-/-</sup> tinham pior sobrevida quando comparados

aos animais selvagens. Em modelo de lesão na retina por isquemia e reperfusão, foi evidenciado que animais TNFR1<sup>-/-</sup> tinham menores índices de neurodegeneração morfológica da retina em comparação aos animais selvagens. Por outro lado, os animais TNFR2<sup>-/-</sup> mostravam piores índices (FONTAINE *et al.*, 2002).

Similarmente, observou-se, no presente estudo, que os animais TNFR1<sup>-/-</sup> submetidos à CH induzida por IFO apresentaram menor peso úmido vesical em comparação aos animais selvagens, contudo sem alterar a quantidade de infiltrado de neutrófilos e macrófagos. Em contrapartida, os animais TNFR1/R2<sup>-/-</sup> submetidos à injeção de IFO apresentaram maior peso úmido vesical, e tendência a apresentar um número maior de neutrófilos e macrófagos quando confrontados com os animais selvagens tratados com IFO.

Uma primeira hipótese advinda da análise dos dados supramencionados, seria a possibilidade de que o TNF pudesse estar atuando em algum outro receptor, contudo ao se pré-tratar os animais TNFR1/R2<sup>-/-</sup> que receberam IFO com infliximabe, não houve diferença no peso úmido vesical ou no aspecto das bexigas avaliadas macroscopicamente.

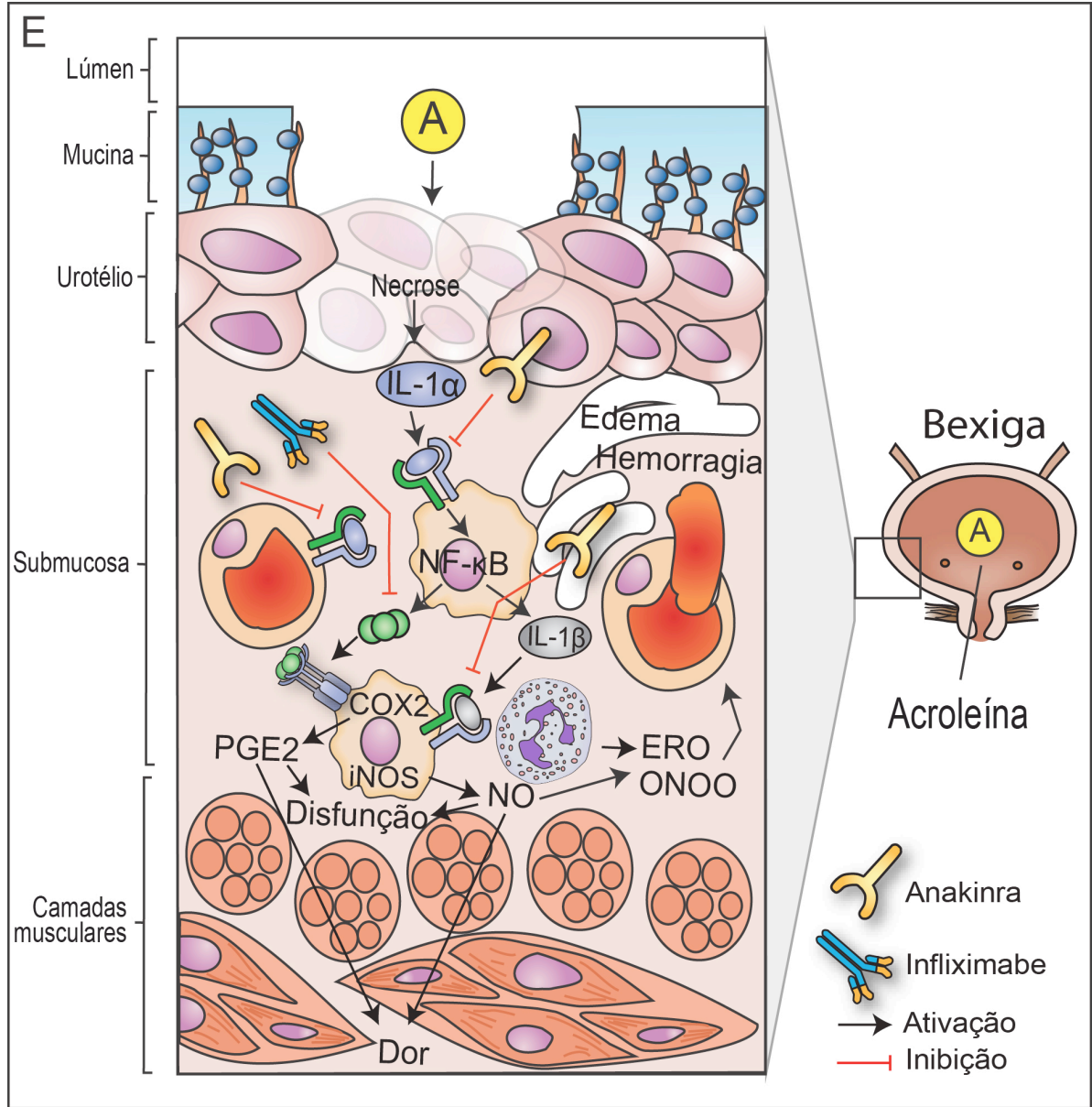
Ao analisar as bexigas dos animais TNFR1/R2<sup>-/-</sup> normais, verificou-se uma maior quantidade de macrófagos, e isso pode estar influenciando no pior fenótipo desses animais quando tratados com IFO.

Outra hipótese levantada a partir dos dados de Wilson *et al.* (2007), seria a de que poderia estar havendo na CH induzida por IFO uma liberação de receptores solúveis TNFR1 e TNFR2, os quais podem ser importantes para a proteção da cistite. Outra hipótese aventada a partir dos dados de Fontaine *et al.* (2002), seria uma transativação intracelular entre os receptores, em que a via PI3K/Akt seria uma via de proteção ativada pelo TNFR2.

Em suma, os dados da presente investigação sustentam a idéia de que na cistite hemorrágica consequente ao uso de agentes antineoplásicos do grupo das oxazofosforinas, a cascata de mediadores se inicia com a agressão urotelial pela acroleína levando à morte celular e consequente liberação de IL-1 $\alpha$ , a qual por sua vez promove ativação do receptor de IL-1 com transdução de sinais intracelulares, que culminam com a liberação de outras citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além de quimiocinas capazes de atrair neutrófilos e macrófagos. A partir de então, há uma amplificação da cascata inflamatória, com aumento de expressão de iNOS e COX-2, os quais são responsáveis pela produção de óxido nítrico e prostaglandinas,

respectivamente. Esses produtos participam então da promoção de edema, hemorragia, dor e disfunção muscular, caracterizando, assim, a cistite hemorrágica (FIGURA 41).

Figura 41 – Modelo hipotético sequencial da participação de IL-1, TNF, neutrófilos e macrófagos na cascata inflamatória da CH induzida por IFO



Fonte: Elaborado pelos autores.

Legenda: Parede urotelial normal dividido por camadas. O metabolismo da ifosfamida desencadeia a presença de acroleína na bexiga, a qual pode ser relacionada com a morte das células uroteliais, que liberam IL-1 $\alpha$  do seu conteúdo intracelular. IL-1 $\alpha$ , por sua vez é responsável pelo recrutamento inicial de neutrófilos e macrófagos, os quais liberam TNF, IL-1 e outras citocinas e quimiocinas que amplificam o processo patológico. Há então o aumento da expressão de cicloxigenase-2, com produção de PGE2 e estímulos álgicos, além de disfunção do músculo detrusor. Ocorre ainda o aumento da expressão de iNOS, com produção de óxido nítrico e peroxinitrito, responsáveis pelos danos vesicais, no tocante a inflamação e disfunção. O uso de terapias alvo direcionadas ao IL-1R e TNF são capazes de interferir na patogênese da CH. COX2, cicloxigenase 2; ERO, espécies reativas de oxigênio; NO, óxido nítrico; ONOO, peroxinitrito; PGE2, prostaglandina E2; QC, quimiocinas.

## 7 CONCLUSÕES

Os dados apresentados nos permitem concluir que:

- a) O bloqueio do receptor de IL-1 com um antagonista seletivo, anakinra, atenua de forma expressiva todos os eventos associados ao processo inflamatório (edema, hemorragia, aumento de permeabilidade vascular, infiltração neutrofílica, hipernocicepção e disfunção vesical) da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida;
- b) A Interleucina-1 $\alpha$  parece ser o pivô da iniciação do processo inflamatório da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida;
- c) A Interleucina-1 $\beta$  produzida pela caspase-1 parece ter menor importância na deflagração da patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida;
- d) Por outro lado, o bloqueio seletivo de TNF, com um anticorpo, infliximabe, foi capaz de atenuar apenas o aumento de permeabilidade vascular e a hipernocicepção presentes na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida sem inibir, contudo, o infiltrado inflamatório e disfunção vesical;
- e) O receptor TNFR1 parece ter um papel deletério no edema da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida;
- f) O TNFR2 parece ter uma papel protetor fisiológico na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B.B.; GUPTA, S.C.; KIM, J.H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 651-65, 2011.
- ALARCON, R.A.; MEIENHOFER, J. Formation of the cytotoxic aldehyde acrolein during in vitro degradation of cyclophosphamide. **Nat New Biol**, v. 233, p. 250-2, 1971.
- ALENCAR, N.M.; FIGUEIREDO, I.S.; VALE, M.R., BITENCURT F.S., OLIVEIRA J.S.; RIBEIRO R.A., RAMOS M.V. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. **Planta Med**, v. 70, p. 1144-9, 2004.
- ARNOLD, H.; BOURSEAUX, F.; BROCK, N. Neuartige Krebs-Chemotherapeutika aus der Gruppe der zyklischen N-Lost-Phosphamidester. **Naturwiss**, v. 45, p. 64-6, 1958.
- BARTON-PAI, A.; FELEDER, C.; JOHNSON, A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces increased lung vascular permeability: a role for GSK3 $\alpha/\beta$ . **Eur J Pharmacol**, v. 657, n. 1-3, p. 159-66, 2011.
- BATISTA, C.K.; MOTA, J.M.; SOUZA, M.L.; LEITAO, B.T.; SOUZA, M.H.; BRITO, G.A.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Amifostine and glutathione prevent ifosfamide- and acrolein-induced hemorrhagic cystitis. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 59, p. 71-7, 2007.
- BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-22, 1982.
- BRAY, F.; REN, J.S.; MASUYER, E.; FERLAY, J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **Int J Cancer**, v. 132, n. 5, p. 1133-45, 2013.
- BROCK, N. The history of the oxazaphosphorine cytostatics. **Cancer**, v. 78, n. 3, p. 542-7, 1996.
- CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 72, n. 9, p.3666-70, 1975.

CHEN, C.J.; KONO, H.; GOLENBOCK, D.; REED, G.; AKIRA, S.; ROCK, K.L. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. **Nature Med**, v. 13, p. 851-6, 2007.

CHUANG, Y.C.; YOSHIMURA, N.; HUANG, C.C.; WU, M.; CHIANG, P.H.; CHANCELLOR, M.B. Intravesical botulinum toxin A administration inhibits COX-2 and EP4 expression and suppresses bladder hyperactivity in cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **Eur Urol**, v. 56, p. 159–66, 2009.

COGGINS, P.R.; RAVDIN, R.G.; EISMAN, S.H. Clinical evaluation of a new alkylating agent: cytoxan (cyclophosphamide). **Cancer**, v. 13, p. 1254-60, 1960.

COHEN, I.; RIDER, P.; CARMİ, Y.; BRAİMAN, A.; DOTAN, S.; WHITE, M.R.; VORONOV, E.; MARTIN, M.U.; DINARELLO, C.A.; APTE, R.N. Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 6, p. 2574-9, 2010.

COLEY, W.B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases 1893. **Clin Orthop Relat Res**, v. 262, p. 3-11, 1991.

COX, P.J. Cyclophosphamide cystitis--identification of acrolein as the causative agent. **Biochem Pharmacol**, v. 28, n. 13, p. 2045-9, 1979.

CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol**, v. 104, n. 3, p. 765-7, 1991.

CUNHA, J.M.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **Br J Pharmacol**, v. 130, n. 6, p. 1418-24, 2000.

DEGREGORI, J. Challenging the axiom: does the occurrence of oncogenic mutations truly limit cancer development with age? **Oncogene**, v. 32, n. 15, p. 1869-75, 2013.

DINARELLO, C.A.; GOLDIN, N.P.; WOLFF, S.M. Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. **J Exp Med**, v. 139, n. 6, p.1369-81, 1974.

DINARELLO, C.A.; RENFER, L.; WOLFF, S.M. Human leukocytic pyrogen: purification and development of a radioimmunoassay. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 10, p. 4624-7, 1977.

DINARELLO, C.A.; SIMON, A.; VAN DER MEER, J.W. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 8, p. 633-52, 2012.

DINARELLO, C.A. IL-1: discoveries, controversies and future directions. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 3, p. 599-606, 2010.

DINARELLO, C.A. Blocking interleukin-1 $\beta$  in acute and chronic autoinflammatory diseases. (Key Symposium). **J Intern Med**, v. 269, p.16–28, 2011b.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720-32, 2011a.

DORNELLES, F.N.; ANDRADE, E.L.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Role of CXCR2 and TRPV1 in functional, inflammatory and behavioural changes in the rat model of cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 2, p. 452-67, 2014.

EBACH, D.R.; RIEHL, T.E.; STENSON, W.F. Opposing effects of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in sepsis due to cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 23, n. 4, p. 311-8, 2005.

EL-ZIMAITY, M.; SALIBA, R.; CHAN, K.; SHAHJAHAN, M.; CARRASCO, A.; KHORSHID, O.; CALDERA, H.; COURIEL, D.; GIRALT, S.; KHOURI, I.; IPPOLITI, C.; CHAMPLIN, R.; DE LIMA, M. Hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: donor type matters. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4674-80, 2004.

ELIAS, A.D.; EDER, J.P.; SHEA, T.; BEGG, C.B.; FREI-3RD, E.; ANTMAN KH. High-dose ifosfamide with mesna uroprotection: a phase I study. **J Clin Oncol**, v. 8, n. 1, p. 170-8, 1990.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v.107, n. 3, p. 660–664, 1992.

FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions**, v. 30, n. 3-4, p. 344-9, 1990.

FAUSTMAN, D.; DAVIS, M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 6, p. 482-93, 2010.

FELDMANN, M. Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. **J Clin Invest**, v. 118, n. 11, p. 3533-6, 2008.

FELDMANN, M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 5, p. 364-71, 2002.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, DM.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon: GLOBOCAN 2012 v1.0, 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acessado em 25 de outubro de 2013.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, n. 6184, p. 698-700, 1988.

FONTAINE, V.; MOHAND-SAID, S.; HANOTEAU, N.; FUCHS, C.; PFIZENMAIER, K.; EISEL, U. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. **J Neurosci**, v. 22, n. 7, p. RC216, 2002.

FURLANUT, M.; FRANCESCHI, L. Pharmacology of ifosfamide. **Oncology**, v. 65, Suppl 2, p. 2-6, 2003.

GANTER, M.T.; ROUX, J.; MIYAZAWA, B.; HOWARD, M.; FRANK, J.A.; SU, G.; SHEPPARD, D.; VIOLETTE, SM.; WEINREB, PH.; HORAN, G.S.; MATTHAY, M.A.; PITTET, J.F. Interleukin-1beta causes acute lung injury via alphavbeta5 and alphavbeta6 integrin-dependent mechanisms. **Circ Res**, v. 102, n. 7, p. 804-12, 2008.

GIBBS, L.S.; LAI, L.; MALIK, A.B. Tumor necrosis factor enhances the neutrophil-dependent increase in endothelial permeability. **J Cell Physiol**, v. 3, p. 496-500, 1990.

GILMAN, A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. **Am J Surg**, v. 105, p. 574-8, 1963.

GINÉ, E.; ROVIRA, M.; REAL, I.; BURREL, M.; MONTAÑA, J.; CARRERAS, E.; MONTSERRAT, E. Successful treatment of severe hemorrhagic cystitis after hemopoietic cell transplantation by selective embolization of the vesical arteries. **Bone Marrow Transplant**, v. 31, n. 10, p. 923-5, 2003.

GOLDBLUM, S.E.; YONEDA, K.; COHEN, D.A.; MCCLAIN, C.J. Provocation of pulmonary vascular endothelial injury in rabbits by human recombinant interleukin-1 beta. **Infect Immun**, v. 56, n. 9, p. 2255-63, 1988.

GOMES, T.N.; SANTOS, C.C.; SOUZA-FILHO, M.V.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Participation of TNF-alpha and IL-1 in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Braz J Med Biol Res**, v. 28, n. 10, p. 1103-8, 1995.

GRAY, K.J.; ENGELMANN U.H.; JOHNSON E.H.; FISHMAN I.J. Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (Cytosan) therapy. **J Urol**, v. 136, p. 497-500, 1986.

GRIVENNIKOV, S.I.; TUMANOV, A.V.; LIEPINSH, D.J.; KRUGLOV, A.A.; MARAKUSHA, B.I.; SHAKHOV, A.N.; MURAKAMI, T.; DRUTSKAYA, L.N.; FÖRSTER, I.; CLAUSEN, B.E.; TESSAROLLO, L.; RYFFEL, B.; KUPRASH, D.V.; NEDOSPASOV, S.A. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. **Immunity**, v. 22, n. 1, p. 93-104, 2005.

LIPP, H-P. **Anticancer Drug Toxicity: Prevention, Management, and Clinical Pharmacokinetics**. New York: Marcel Dekker, 1999.

HADDAD, E.B.; ROUSELL, J.; LINDSAY, M.A.; BARNES, P.J. Synergy between tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta in inducing transcriptional down-regulation of muscarinic M2 receptor gene expression. Involvement of protein kinase A and ceramide pathways. **J Biol Chem**, v. 271, n. 51, p. 32586-92, 1996.

HADJIBABAIE, M.; ALIMOGHADDAM, K.; SHAMSHIRI, A.R.; IRAVANI, M.; BAHAR, B.; MOUSAVI, A.; JAHANI, M.; KHODABANDEH, A.; ANVARI, Y.; GHOLAMI, K.; GHAVAMZADEH, A. Continuous bladder irrigation prevents hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Urol Oncol**, v. 26, p. 43-6, 2008.

HOFMANN, S.; GRASBERGER, H.; JUNG, P.; BIDLINGMAIER, M.; VLOTIDES, J.; JANSSEN, O.E.; LANDGRAF, R. The tumour necrosis factor-alpha induced vascular permeability is associated with a reduction of VE-cadherin expression. **Eur J Med Res**, v. 7, n. 4, p. 171-6, 2002.

IFOSFAMIDE: DRUG INFORMATION. Waltham: UpToDate, 2013. Disponível em <http://www.uptodate.com/contents/ifosfamide-drug-information>. Acessado em 25 de outubro de 2013.

INMAN, R.D.; MAKSYMOWYCH, W.P.; CANDLE Study Group. A double-blind, placebo-controlled trial of low dose infliximab in ankylosing spondylitis. **J Rheumatol**, v. 37, n. 6, p.1203-10, 2010.

JOHANSSON, R.; ANDERSSON, K.E.; PERSSON, K. Nerve-mediated bladder contraction is impaired by cytokines: involvement of inducible nitric oxide synthase. **Eur J Pharmacol**, v. 476, n. 3, p. 221-7, 2003.

JOHANSSON, R.K.; POLJAKOVIC, M.; ANDERSSON, K.E.; PERSSON, K. Expression of nitric oxide synthase in bladder smooth muscle cells: regulation by cytokines and L-arginine. **J Urol**, v. 168, n. 5, p. 2280-5, 2002.

KAGEYAMA, A.; FUJINO, T.; TAKI, Y.; KATO, Y.; NOZAWA, Y.; ITO, Y.; YAMADA, S. Alteration of muscarinic and purinergic receptors in urinary bladder of rats with cyclophosphamide-induced interstitial cystitis. **Neurosci Lett**, v. 436, n. 1, p. 81-4, 2008.

KIUCHI, H.; TAKAO, T.; YAMAMOTO, K.; NAKAYAMA, J.; MIYAGAWA, Y.; TSUJIMURA, A.; NONOMURA, N.; OKUYAMA, A. Sesquiterpene lactone parthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model by inhibiting nuclear factor-kappaB phosphorylation. **J Urol**, v. 181, p. 2339-48, 2009.

KNIGHT, D.M.; TRINH, H.; LE, J.; SIEGEL, S.; SHEALY, D.; MCDONOUGH, M.; SCALLON, B.; MOORE, M.A.; VILCEK, J.; DADDONA, P.; GHRAYEB, J. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. **Mol Immunol**, v. 30, n. 16, p.1443-53, 1993.

KOC, S.; HAGGLUND, H.; IRETON, RC.; Perez-Simon, J.A.; Collins, S.J.; Appelbaum, F.R. Successful treatment of severe hemorrhagic cystitis with cystectomy following matched donor allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 26, n. 8, p. 899-901, 2000.

KORKMAZ, A.; TOPAL, T.; OTER, S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. **Cell Biol Toxicol**, v. 23, p. 303-12, 2007.

KORKMAZ, A.; OTER, S.; SADIR, S.; COSKUN, O.; TOPAL, T.; OZLER, M.; BILGIC, H. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. **J Urol**, v. 173, n. 5, p. 1793-6, 2005.

LAIRD, J.M.; MARTINEZ-CARO, L.; GARCIA-NICAS, E.; CERVERO, F. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. **Pain**, v. 92, n. 3, p. 335-342, 2001.

LEE, D.H.; YEO, S.W.; CHANG, K.H.; PARK, S.Y.; OH, J.H.; SEO, J.H. Effect of infliximab on experimentally induced otitis media in rats. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 117, n. 6, p. 470-6, 2008.

LIMA-JÚNIOR, R.C.; SOUSA, D.I.; BRITO, G.A.; CUNHA, G.M.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, alpha, beta-amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK(1)-receptors, and K(+)(ATP) channels. **Inflamm Res**, v. 56, n. 12, p. 487-94, 2007.

LIMA, M.V.; FERREIRA, F.V.; MACEDO, F.Y.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A. Histological changes in bladders of patients submitted to ifosfamide chemotherapy even with mesna prophylaxis. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 59, n. 5, p. 643-50, 2007.

LIU, D.; LON, H.K.; DUBOIS, D.C.; ALMON, R.R.; JUSKO, W.J. Population pharmacokinetic-pharmacodynamic-disease progression model for effects of anakinra in Lewis rats with collagen-induced arthritis. **J Pharmacokinetic Pharmacodyn**, v. 38, n. 6, p. 769-86, 2011.

LIVSHITS, Z.; RAO, R.B.; SMITH, S.W. An approach to chemotherapy-associated toxicity. **Emerg Med Clin North Am**, v. 32, n. 1, p. 167-203, 2014.

LOCKSLEY, R.M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487-501, 2001.

LYMAN, G.H. Impact of chemotherapy dose intensity on cancer patient outcomes. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 7, n. 1, p. 99-108, 2009.

MACEDO, F.Y.; MOURÃO, L.T.; FREITAS, H.C.; LIMA-JUNIOR, R.C.; WONG, D.V.; ORIÁ, R.B.; VALE, M.L.; BRITO, G.A.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Interleukin-4 modulates the inflammatory response in ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 297-307, 2012.

MACEDO, F.Y.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA, P.R.; TÁVORA, F.; FERREIRA, F.V.; SCHMITT, F.C.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A. Cyclooxygenase-2 expression on ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 134, n. 1, p.19-27, 2008.

MACEDO, F.Y.; BALTAZAR, F.; MOURÃO, L.C.; ALMEIDA, P.R.; MOTA, J.M.; SCHMITT, F.C.; RIBEIRO, R.A. Induction of COX-2 expression by acrolein in the rat model of hemorrhagic cystitis. **Exp Toxicol Pathol**, v. 59, n. 6, p. 425-30, 2008.

MACEDO, F.Y.; MOURÃO, L.T.; PALHETA, R.C.; JUCÁ, D.M.; LIMA-JUNIOR, R.C.; NETO, J.S.; MAGALHÃES, P.J.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.H.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A. Cyclooxygenase-2 contributes to functional changes seen on experimental hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide in rat urinary bladder. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 67, n. 4, p. 935-43, 2011.

MALLEY, S.E.; VIZZARD, M.A. Changes in urinary bladder cytokine mRNA and protein after cyclophosphamide-induced cystitis. **Physiol Genomics**, v. 9, n. 1, p. 5-13, 2002.

MANIKANDAN, R.; KUMAR, S.; DORAIRAJAN, L.N. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. **Indian J Urol**, v. 26, n. 2, p. 159-66, 2010.

MARINELLA, M.A. **Handbook of Cancer Emergencies**. 1 ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2009.

MARTINS, J.; SILVA, R.; COUTINHO-SILVA, R.; TAKIYA, C.; BATTASTINI, A.; MORRONE, F.; CAMPOS, M. The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. **Br J Pharmacol**, v. 165, p. 183-96, 2012.

MEISENBERG, B.; LASSITER, M.; HUSSEIN, A.; ROSS, M.; VREDENBURGH, J.J.; PETERS, W.P. Prevention of hemorrhagic cystitis after high-dose alkylating agent chemotherapy and autologous bone marrow support. **Bone Marrow Transplant**, v. 14, n. 2, p. 287-91, 1994.

MIKI, T.; MATSUNAMI, M.; NAKAMURA, S.; OKADA, H.; MATSUYA, H.; KAWABATA, A. ONO-8130, a selective prostanoid EP1 receptor antagonist, relieves bladder pain in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. **Pain**, v. 152, n. 6, p. 1373-81, 2011.

MOSER, R.; SCHLEIFFENBAUM, B.; GROSCURTH, P.; FEHR, J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. **J Clin Invest**, v. 83, n. 2, p. 444-55, 1989.

MOSSNER, R.; REICH, K. Management of severe psoriasis with TNF antagonists. Adalimumab, etanercept and infliximab. **Curr Probl Dermatol**, v. 38, p.107-36, 2009.

MOTA, J.M.; BRITO, G.A.; LOIOLA, R.T.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Interleukin-11 attenuates ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Int Braz J Urol**, v. 33, p. 704-10, 2007.

MOY, B.; DREWS, R.E. (Ed); KAVANAGH, B. (Ed). **Cistite em pacientes com câncer**. Waltham: UpToDate, 2013. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/cystitis-in-patients-with-cancer>. Acessado em 25 de outubro de 2013.

NASRIN, S.; MASUDA, E.; KUGAYA, H.; ITO, Y.; YAMADA, S. Improvement by phytotherapeutic agent of detrusor overactivity, down-regulation of pharmacological



receptors and urinary cytokines in rats with cyclophosphamide induced cystitis. **J Urol**, v. 189, n. 3, p. 1123-9, 2013.

NAUDÉ, P.J.; DEN BOER, J.A.; LUITEN, P.G.; EISEL, U.L. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. **FEBS J**, v. 278, n. 6, p. 888-98, 2011.

OLIVEIRA, S.H.; CANETTI, C.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. Neutrophil migration induced by IL-1beta depends upon LTB4 released by macrophages and upon TNF-alpha and IL-1beta released by mast cells. **Inflammation**, v. 31, n. 1, p. 36-46, 2008.

OTER, S.; KORKMAZ, A.; OZTAS, E.; YILDIRIM, I.; TOPAL, T.; BILGIC, H. Inducible nitric oxide synthase inhibition in cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. **Urol Res**, v. 32, n. 3, p. 185-9, 2004.

OUSSALAH, A.; DANESE, S.; PEYRIN-BIROULET, L. Efficacy of TNF antagonists beyond one year in adult and pediatric inflammatory bowel diseases: a systematic review. **Curr Drug Targets**, v. 11, n. 2, p. 156-75, 2010.

PENNICA, D.; HAYFLICK, J.S.; BRINGMAN, T.S.; PALLADINO, M.A.; GOED-DEL, D.V. Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 82, n. 18, p. 6060-4, 1985.

PEREIRA, L.M.; LIMA-JÚNIOR, R.C.; BEM, A.X.; TEIXEIRA, C.G.; GRASSI, L.S.; MEDEIROS, R.P.; MARQUES-NETO, R.D.; CALLADO, R.B.; ARAGÃO, K.S.; WONG, D.V.; VALE, M.L.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A. Blockade of TRPA1 with HC-030031 attenuates visceral nociception by a mechanism independent of inflammatory resident cells, nitric oxide and the opioid system. **Eur J Pain**, v. 17, n. 2, p. 223-33, 2013.

PEYRIN-BIROULET, L.; DELTENRE, P.; DE SURAY, N.; BRANCHE, J.; SANDBORN, W.J.; COLOMBEL, J.F. Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: meta-analysis of placebo-controlled trials. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 6, p. 644-53, 2008.

PHILIPS, F.S.; STERNBERG SS.; CRONIN AP.; VIDAL PM. Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. **Cancer Res**, v. 21, p. 1577-89, 1961.

PLYTYCZ, B.; SELJELID, R. From inflammation to sickness: historical perspective. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 51, n. 2, p. 105-9, 2003.

PUHLMANN, M.; WEINREICH, D.M.; FARMA, J.M.; CARROLL, N.M.; TURNER, E.M.; ALEXANDER-JR, H.R. Interleukin-1beta induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial tissue factor (TF) activity. **J Transl Med**, v. 3, n. 37, 2005.

REDL, H.; SCHLAG, G.; LAMCHE, H. TNF- and LPS-induced changes of lung vascular permeability: studies in unanesthetised sheep. **Circ Shock**, v. 31, n. 2, p. 183-92, 1990.

RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, n. 4, p. 472-7, 1991.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur J Pharmacol**, v. 391, n. 1-2, p. 97-103, 2000.

RIBEIRO, R.A.; FREITAS, H.C.; CAMPOS, M.C.; SANTOS, C.C.; FIGUEIREDO, F.C.; BRITO, G.A.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **J Urol**, v. 167, n. 5, p. 2229-34, 2002.

RIBEIRO, R.A.; LIMA-JUNIOR, R..C; LEITE, C.A.; MOTA, J.M.; MACEDO, F.Y.; LIMA, M.V.; BRITO, G.A. Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches and new insights. **J Exp Integr Med**, v. 2, n. 2, p. 95-112, 2012.

RICHTER, C.; MESSERSCHMIDT, S.; HOLEITER, G.; TEPPERINK, J.; OSSWALD, S.; ZAPPE, A.; BRANSCHÄDEL, M.; BOSCHERT, V.; MANN, D.A.; SCHEURICH, P.; KRIPPNER-HEIDENREICH, A. The tumor necrosis factor receptor stalk regions define responsiveness to soluble versus membrane-bound ligand. **Mol Cell Biol**, v. 32, n. 13, p. 2515-29, 2012.

RIDER, P.; CARMİ, Y.; GUTTMAN, O.; BRAİMAN, A.; COHEN, I.; VORONOV, E.; WHITE, M.R.; DINARELLO, C.A.; APTE RN. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. **J Immunol**, v. 187, n. 9, p. 4835-43, 2011.

RISBUD, M.V.; SHAPIRO, I.M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 1, p. 44-56, 2014.

ROYALL, J.A.; BERKOW, R.L.; BECKMAN, J.S.; CUNNINGHAM, M.K.; MATALON, S.; FREEMAN, B.A. Tumor necrosis factor and interleukin 1 alpha increase vascular endothelial permeability. **Am J Physiol**, v. 257, n. L399-L410, 1989.

RUDICK, C.N.; BRYCE, P.J.; GUICHELAAR, L.A.; BERRY, R.E.; KLUMPP, D.J. Mast cell-derived histamine mediates cystitis pain. **PLoS One**, v. 3, n. 5, p. e2096, 2008.

SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.N.; GALILLY, R.; COHN Z.A.; KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$  production by stimulated human monocytes. **J Exp Med**, v. 173, p. 699-703, 1991.

SEBER, A.; SHU, X.O.; DEFOR, T.; SENCER, S.; RAMSAY, N. Risk factors for severe hemorrhagic cystitis following BMT. **Bone Marrow Transplant**, v. 23, n. 1, p. 35-40, 1999.

SHEPHERD, J.D.; PRINGLE, L.E.; BARNETT, M.J.; KLINGEMANN, H.G.; REECE, D.E.; PHILLIPS, G.L. Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. **J Clin Oncol**, v. 9, n. 11, p. 2016-20, 1991.

SMALDONE, M.C.; VODOVOTZ, Y.; TYAGI, V.; BARCLAY, D.; PHILIPS, B.J.; YOSHIMURA, N.; CHANCELLOR, M.B.; TYAGI, P. Multiplex analysis of urinary cytokine levels in rat model of cyclophosphamide-induced cystitis. **Urology**, v. 73, n. 2, p. 421-6, 2009.

SONIS, S.T.; KEEFE, D.M. **Pathobiology of Cancer Regimen-Related Toxicities**. New York: Springer, 2013.

SOUZA-FIHO, M.V.; LIMA, M.V.; POMPEU, M.M.; BALLEJO, G.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am J Pathol**, v. 150, n. 1, p. 247-56, 1997.

STILLWELL, T.J.; BENSON, R.C. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis: a review of 100 patients. **Cancer**, v. 61, p. 451-7, 1988.

STONE, J.H.; FURST, D.E (Ed.); KAVANAGH, B. (Ed). **Inibidores do fator de necrose tumoral-alfa: uma visão geral dos efeitos adversos**. Waltham: UpToDate, 2013b. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/tumor-necrosis-factor-alpha-inhibitors-an-overview-of-adverse-effects>. Acessado em 25 de outubro de 2013.

STONE, J.H.; FURST, D.E. (Ed). **Visão geral dos agentes biológicos no tratamento da artrite reumatóide**. Waltham: UpToDate, 2013a. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/overview-of-biologic-agents-in-the-rheumatic-diseases>. Acessado em 25 de outubro de 2013.

SAMAD, T.A.; MOORE, K.A.; SAPIRSTEIN, A.; BILLET, S.; ALLCHORNE, A.; POOLE S.; BONVENTRE, J.V.; WOOLF, C.J. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, p. 471-5, 2001.

ULICH, T.R.; WHITCOMB, L.; TANG, W.; O'CONNER TRESSEL, P.; TARPLEY, J.; YI, ES.; LACEY, D. Keratinocyte growth factor ameliorates cyclophosphamide-induced ulcerative hemorrhagic cystitis. **Cancer Res**, v. 57, n. 3, p. 472-5, 1997.

VOSE, J.M.; REED, E.C.; PIPPERT, G.C.; ANDERSON, J.R.; BIERMAN, P.J.; KESSINGER, A.; SPINOLO, J.; ARMITAGE, J.O. Mesna compared with continuous bladder irrigation as uroprotection during high-dose chemotherapy and transplantation: a randomized trial. **J Clin Oncol**, v. 11, n. 7, p. 1306-10, 1993.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death Differ**, v. 1, p. 45-65, 2003.

WANG, C.C.; WENG, T.I.; WU, E.T.; WU, M.H.; YANG, R.S.; LIU, S.H. Involvement of interleukin-6-regulated nitric oxide synthase in hemorrhagic cystitis and impaired bladder contractions in young rats induced by acrolein, a urinary metabolite of cyclophosphamide. **Toxicol Sci**, v. 131, n. 1, p. 302-10, 2013.

WATSON, N.A.; NOTLEY, R.G. Urological complications of cyclophosphamide. **Br J Urol**, v.45, n. 6, p. 606-9, 1973.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Sci Signal**, v. 3, n. 105, 2010.

WEIN, A.J.; KAVOUSSI, L.R.; NOVICK, A.C.; PARTIN, A.W.; PETERS, C.A. **Campbell-Walsh Urology**. 10 Ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012.

WIENS, A.; VENSON, R.; CORRER, C.J.; OTUKI, M.F.; PONTAROLO, R. Meta-analysis of the efficacy and safety of adalimumab, etanercept, and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis. **Pharmacotherapy**, v. 30, n. 4, p. 339-53, 2010.

WILSON, M.R.; GODDARD, M.E.; O'DEA, K.P.; CHOUDHURY, S.; TAKATA, M. Differential roles of p55 and p75 tumor necrosis factor receptors on stretch-induced pulmonary edema in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 293, n. 1, p. L60-8, 2007.

ZELOVÁ, H.; HOŠEK, J. TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflamm Res**, 62, n. 7, p. 641-51, 2013.

ZHANG, J.; QUAN, T.; ZHOU, S.F. Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. **Current Drug Therapy**, v. 1, p. 55-84, 2006.

ZHU, W.; LONDON, N.R.; GIBSON, C.C.; DAVIS, C.T.; TONG, Z.; SORENSEN, L.K.; SHI, D.S.; GUO, J.; SMITH, M.C.; GROSSMANN AH.; THOMAS KR.; LI DY.

Interleukin receptor activates a MYD88-ARNO-ARF6 cascade to disrupt vascular stability. **Nature**, v. 492, n. 7428, p. 252-5, 2012.

ZUPANCIC, D.; JEZERNIK, K.; VIDMAR, G. Effect of melatonin on apoptosis, proliferation and differentiation of urothelial cells after cyclophosphamide treatment. **J Pineal Res**, v. 44, n. 3, p. 299-306, 2008.