



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

**CRISTINA KELMA LOIOLA PONTE BATISTA**

**EFEITO PROTETOR DA AMIFOSTINA E DA VIA SULFETO DE HIDROGÊNIO /  
CANALIS DE POTÁSSIO ATP- DEPENDENTES NA CISTITE HEMORRÁGICA  
EXPERIMENTAL**

**FORTALEZA**

**2016**

**CRISTINA KELMA LOIOLA PONTE BATISTA**

**EFEITO PROTETOR DA AMIFOSTINA E DA VIA SULFETO DE HIDROGÊNIO /  
CANALIS DE POTÁSSIO ATP- DEPENDENTES NA CISTITE HEMORRÁGICA  
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal do Ceará como pré-requisito  
para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientadores:

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

*(in memoriam)*

**FORTALEZA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- B336e Batista, Cristina Kelma Loiola Ponte.  
Efeito protetor da amifostina e da via sulfeto de hidrogênio / canais de potássio atp-  
dependentes na cistite hemorrágica experimental / Cristina Kelma Loiola Ponte Batista. –  
2016.  
165 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.  
Coorientação: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.
1. Cistite hemorrágica. 2. Acroleína. 3. Amifostina. 4. Ifosfamida. 5. Sulfeto de Hidrogênio.  
I. Título.

---

CDD 615.1

**CRISTINA KELMA LOIOLA PONTE BATISTA**

**EFEITO PROTETOR DA AMIFOSTINA E DA VIA SULFETO DE HIDROGÊNIO /  
CANALIS DE POTÁSSIO ATP- DEPENDENTES NA CISTITE HEMORRÁGICA  
EXPERIMENTAL**

Aprovada em: 02/ 12 / 2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior**  
**(Orientador)**  
Universidade Federal do Ceará

---

**Profa. Dra. Adriana Rolim Campos Barros**  
Universidade de Fortaleza

---

**Profa. Dra. Larisse Tavares Lucetti**  
Universidade Federal do Ceará

---

**Prof. Dr. Marcos Venício Alves Lima**  
Universidade Estadual do Ceará / Instituto do Câncer do Ceará

---

**Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar**  
Universidade Federal do Ceará

## DEDICATÓRIAS ESPECIAIS

Ao meu paizinho, Marcus Vinícius, de saudosa memória, que tanto esperou e torceu por esse momento. Meu muito obrigada por toda a sua sabedoria, paciência, resignação e incentivo. Nós conseguimos meu pai!

À Norma, minha mãe e mãe de muitos doutores, por toda sua alegria, disposição competência e eficiência na difícil e nobre arte da maternidade. Meu eterno exemplo em tudo nessa vida.

Às minhas quatro filhas, quatro pedras preciosas que Deus me concedeu, cada uma com seu brilho e cor própria. Quem dera eu pudesse ter um pouco de cada uma de vocês...

Sua determinação e dedicação Gabi, minha companheira desde sempre, hoje "ajudante" eficiente e perfeccionista, e em um futuro próximo, colega. Sua disciplina e determinação Gigi, sempre tão firme, doce e apaixonada por tudo que faz, você me motiva e inspira a seguir em frente em busca dos meus ideais. Carlinha, quisera eu ter a sua resolubilidade, força e praticidade para enfrentar os obstáculos que a vida me impõe, além do seu grande prazer em ser útil e ajudar ao próximo. E você Cece, minha bebê grande, sua inteligência, curiosidade e perspicácia certamente me seriam bem úteis na Ciência, mas é a sua alegria e a sua leveza que me são fundamentais na vida.

Ao Carlos, meu marido, a metade melhor de mim, por estar ao meu lado, me incentivando e me mostrando que tudo pode ser "maravilhoso" quando se faz o que se gosta ao lado de quem se ama.

Felizmente eu tenho vocês e são vocês que realmente fazem TUDO valer a pena!

## AGRADECIMENTOS

A Deus," fonte de toda sabedoria, pai amável, compreensível, generoso e cheio de misericórdia que não escolhe os capacitados, mas capacita os os escolhidos..."

Ao muito querido amigo, professor e orientador Roberto César Pereira Lima Júnior pela grande parceria, colaboração, empenho e enorme generosidade em me acolher entre os seus quando eu muito precisei.

Ao prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*), meu orientador, amigo e compadre, por sempre acreditar no meu potencial, por todo o estímulo e principalmente por nunca desistir de mim ao longo desses anos.

Aos meus irmãos, Marcus, Marcellus, Maximiliano e Moysés que, apesar de mais novos, sempre foram os "meus exemplos" neste fascinante e tortuoso caminho de fazer ciência.

A Cynthia, minha irmã, por todo apoio e por me ensinar que nunca é tarde pra se perseguir um sonho e tentar ser feliz, que nem sempre é fácil, mas que é sempre recompensador.

Ao Mauricio, meu sobrinho, e ao François, meu irmãozinho caçula, que embalei, cuidei e que hoje já homens feitos trilham comigo os caminhos da Medicina.

A minha bolsista de Iniciação Científica, hoje já em fase de conclusão do seu doutorado, Livia Talita Cajaseiras Mourão, pela colaboração e estímulo .

A pós- doutoranda Deysi Wong, que juntamente com o Roberto tão carinhosamente me recebeu. Muito obrigada pela colaboração, orientação e cuidado com a nossa "Gabizinha".

Aos amigos que estão ou estiveram presentes no LAFICA, pelas horas agradáveis que passamos juntos.

Aos colegas da pós-graduação pelo companheirismo, troca de conhecimentos e ajuda nos experimentos.

A Professora Gerly Anne de Castro Brito pela realização das análises das lâminas.

Às professoras Adriana Nunes Correia e Paula Homem-de-Melo, pela inestimável colaboração nos estudos de Química computacional.

A Silvandira, nossa Vandinha, pela disponibilidade, estímulo e toda ajuda nos experimentos.

Ao funcionário da Morfologia José Ivan pela confecção das lâminas com todo empenho e simpatia.

À secretaria da Pós-graduação colaboração.

Aos meus animais de experimentação por sempre estarem disponíveis em ceder sua vida a ciência.

Às minhas "filhas de quatro patas", Dakini e Chanel, companheiras fieis e incansáveis no silêncio das madrugadas.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos, que de uma forma ou de outra, se fizeram presentes, participaram ou simplesmente compreenderam toda essa jornada ..meu muito obrigada .

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> -----	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> -----	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> -----	xii
<b>RESUMO</b> -----	xiii
<b>ABSTRACT</b> -----	xv
<b>I. INTRODUÇÃO</b> -----	1
1.Oxazafosforinas-----	3
1.1. Metabolismo das oxazafosforinas-----	5
1.2. Aplicações clínicas das oxazafosforinas-----	7
2. Cistite hemorrágica-----	8
2.1. Fisiopatologia da Cistite Hemorrágica-----	11
3. Citoprotetores na oncologia clínica-----	19
3.1. Mesna - Citoproteção vesical -----	21
3.2. Amifostina - Citoproteção de amplo espectro-----	25
4. Sulfeto de Hidrogênio (H <sub>2</sub> S): Química, toxicidade e síntese-----	33
4.1. Sulfeto de Hidrogênio (H <sub>2</sub> S): Ações no trato urinário-----	37
5. Justificativa-----	39
<b>II- OBJETIVOS</b> -----	41
<b>III – MATERIAIS E MÉTODOS</b> -----	43
1. Animais -----	44
2. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais -----	44
3. Drogas, soluções , Líquidos e Corantes utilizados -----	45
4. Protocolo experimental -----	47
4.1. Indução da cistite hemorrágica -----	47
4.1.1. Cistite hemorrágica por injeção intravesical de acroleína -----	47
4.1.2. Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida-----	49



4.2. Parâmetros para avaliação da cistite hemorrágica -----	50
4.2.1. Determinação do Edema -----	50
4.2.2. Determinação da Permeabilidade Vascular (PV)-----	50
4.2.3. Análise Macroscópica -----	51
4.2.4. Análise Histopatológica-----	52
5. Delineamentos Experimentais -----	54
5.1. Efeito da amifostina na cistite hemorrágica induzida acroleína ou por ifosfamida – Avaliação da variação do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histológicas-----	54
5.2. Avaliação da possível interação entre os compostos acroleína e amifostina, via métodos de química computacional-----	55
5.3. Avaliação do efeito da AM na imunexpressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1) e das enzimas(NOS-i e COX-2), na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida-----	55
5.4. Avaliação do efeito da amifostina sobre a atividade de NOS induzida na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida -----	57
5.5. Ação da ifosfamida na indução de apoptose em células de bexigas de camundongos - Técnica de imunistoquímica – TUNEL ( <i>TdT – mediated dUTP nick and labeling</i> ) -----	59
5.6. Ação da ACR na indução de apoptose em bexigas de camundongos Técnica de imunistoquímica-TUNEL( <i>TdT–mediated dUTP nick and labeling</i> )--	60
5.7. Avaliação do efeito da amifostina na inibição da apoptose induzida por ifosfamida e por acroleína em bexigas de camundongos Técnica de imunistoquímica – TUNEL ( <i>TdT – mediated dUTP nick and labeling</i> )-----	61
5.8. Papel da amifostina nas alterações dos parâmetros funcionais nas bexigas de camundongos anestesiados. Estudo “ <i>in vivo</i> ”-----	62
5.9. Papel da amifostina na alteração dos parâmetros funcionais em tiras de bexigas de camundongos. Estudos “ <i>in vitro</i> ” -----	64
5.10. PCR em Tempo Real -----	67
5.11. Estudo da atividade uroprotetora do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S)-----	68

5.11.1. Efeito uroprotetor do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos : curva dose-resposta-----	68
5.11.2. Efeito do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) na dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos-----	69
5.11.3. Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K <sub>ATP</sub> ) no efeito uroprotetor do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S)-----	70
5.11.4. Avaliação do efeito do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) na contralilidade de tiras de bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida-----	71
6. Análise Estatística-----	73
<b>III. RESULTADOS</b> -----	74
1. Efeito da amifostina na cistite hemorrágica induzida por acroleína e ifosfamida em camundongos - Avaliação da variação do peso úmido vesical – Análises macroscópica e Histológica -----	75
2. Avaliação da possível interação entre os compostos acroleína e amifostina, via métodos de química computacional -----	81
3. Avaliação do efeito da amifostina na imunoexpressão de citocinas (TNF- α e IL-1) e das enzimas(NOS-i e COX-2), na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida -----	84
3.1. Avaliação do efeito da amifostina na imunoexpressão da enzima óxido Nítrico-sintase-induzida (NOS-i) na Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida --	84
3.2. Avaliação do efeito da amifostina na imunoexpressão da enzima Ciclooxigenase-2 (COX-2) na Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida-----	87
3.3. Avaliação do efeito da amifostina na imunoexpressão da citocina TNF α na Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida-----	89
3.4. Avaliação do efeito da amifostina na imunoexpressão da citocina Interleucina-1 (IL-1) na Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida-----	91

4. Avaliação do efeito da amifostina na atividade da enzima Óxido Nítrico-sintase-induzida (NOS-i) na Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida-----	93
5. Ação da ifosfamida na indução de apoptose em bexigas de camundongos. Efeito uroprotetor da amifostina. Técnica de imunistoquímica – TUNEL ( <i>TdT – mediated dUTP nick and labeling</i> ) -----	94
6. Ação da acroleína na indução de apoptose em bexigas de camundongos. Efeito uroprotetor da amifostina. Técnica de imunistoquímica – TUNEL ( <i>TdT – mediated dUTP nick and labeling</i> ) -----	97
7. Papel da amifostina nas alterações dos parâmetros funcionais nas bexigas de camundongos anestesiados. Estudo “ <i>in vivo</i> ” -----	99
8. Papel da amifostina na alteração dos parâmetros funcionais em tiras de bexigas de camundongos. Estudos “ <i>in vitro</i> ”-----	102
9. Real time PCR para CBS e CSE -----	103
10. Efeito uroprotetor do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) na cistite hemorrágica induzida por IFO em camundongos – Avaliação da variação do peso úmido vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas : curva dose-resposta----	105
11. Efeito do tratamento com doses crescentes de L-cisteína e doador de H <sub>2</sub> S, Reagente de Lawesson nas variações da permeabilidade vascular de bexigas de camundongos tratados com ifosfamida -----	110
12. Efeito do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) na atividade da enzima mieloperoxidase na cistite hemorrágica induzida por IFO em camundongos-----	112
13. Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K <sub>ATP</sub> ) no efeito uroprotetor do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) -----	113
14. Avaliação do efeito do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) na contratilidade de tiras de bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida-----	116
<b>IV-DISCUSSÃO</b> -----	118
<b>V- CONCLUSÕES</b> -----	132
<b>VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	134

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACR	Acroleína
AD	Água destilada
AE	Azul de Evans
AMF	Amifostina
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Fator ativador da proteína-1
$\alpha$	Alfa
BSA	Soro Albumina Bovina
$\beta$	Beta
CAA	Cloroacetaldéido
CH	Cistite hemorrágica
cm	Centímetro
CMF/CICLO	Ciclofosfamida
DIMESNA	Ditiodietanosulfonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão da média
ev	Via endovenosa
FA	Fosfatase alcalina
g	Gramas
h	Hora

HE	Hematoxilina-Eosina
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
IFO	Ifosfamida
IL1	Interleucina-1
IL2	Interleucina-2
IL4	Interleucina-4
IL6	Interleucina-6
IL8	Interleucina-8
IL10	Interleucina-10
<i>ip</i>	Via intra-peritoneal
<i>ive</i>	Via intravesical
kg	Quilogramas
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
L-CIS	L-Cisteína
L-GLU	L-Glutamato
L-NAME	Éster metil L-N <sup>G</sup> -nitroarginina
L-NOARG	L-N <sup>G</sup> -Nitroarginina
m <sup>2</sup>	metros quadrados
MESNA	2-mercarptoetano-sulfonato de sódio
mg	Miligramas
min	Minutos
ml	Mililitro
NAC	N-Acetilcisteína

NADPH	Forma reduzida de Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear-Kappa B
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico sintase
NOS-i	Óxido Nítrico sintase induzida
PAF	Fator de ativação plaquetária
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandina F <sub>2</sub>
PPG	Propargilglicina
PUV	Peso Úmido Vesical
PV	Permeabilidade vascular
SNC	Sistema Nervoso Central
T <sub>1/2<math>\alpha</math></sub>	Meia vida de distribuição
T <sub>1/2<math>\beta</math></sub>	Meia vida de eliminação
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TXA	Tromboxano A <sub>2</sub>
vo	Via oral
$\mu$ g	Microgramas
$\mu$ m	Micrômetro

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estruturas químicas da Ciclofosfamida e da ifosfamida-----	4
FIGURA 2. Metabolismo da ifosfamida -----	6
FIGURA 3. Estrutura química da acroleína -----	11
FIGURA 4. Representação esquemática da participação de mediadores inflamatórios na patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas -	18
FIGURA 5. Estrutura química do MESNA -----	21
FIGURA 6. Estrutura química do dimesna -----	22
FIGURA 7. Representação esquemática da oxidação do mesna (M-SH) em Dimesna (M-S-S-M) no plasma, seguido de sua redução de Dimesna em Mesna nos rins e a excreção urinária do mesna -----	23
FIGURA 8. Quebra da hidroxíciclofosfamida (I) para formar a acroleína e a mostarda de fosforamida, reação da ACR com o mesna (II) A reação da 4 – hidroxíciclofosfamida com o mesna (III) ( ASTA Z7557 ) -----	24
FIGURA 9. Estrutura química da amifostina -----	25
FIGURA 10. Mecanismo proposto para a seletividade da amifostina -----	27
FIGURA 11 . Principais vias de produção endógena do sulfeto de hidrogênio----	35
FIGURA 12. Etapas do Modelo de cistite hemorrágica induzida pela injeção intravesical de acroleína -----	48
FIGURA 13. Injeção intraperitoneal de ifosfamida -----	49
FIGURA 14. Aspecto Macroscópico de Bexigas tratadas com salina <i>ive</i> , com ACR <i>ive</i> e com IFO <i>ip</i> -----	51
FIGURA 15. Aspecto Microscópico de Bexigas tratadas com salina <i>ive</i> , com ACR <i>ive</i> e com IFO <i>ip</i> -----	53
FIGURA 16. Sistema para análise de cistometrograma contínuo -----	63
FIGURA 17. Parâmetros avaliados na cistometrografia-----	64
FIGURA 18. Detalhe da montagem da tira de bexiga para registro de contração “in vitro” -----	66

FIGURA 19. Sistema para registros de contração em tecido isolado-----	67
FIGURA 20. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) na variação do Peso Úmido Vesical (PUV) induzido pela injeção intravesical de acroleína (ACR) - avaliado após 3 horas -----	76
FIGURA 21. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) nas alterações macroscópicas induzidas pela injeção intravesical de acroleína 75µg avaliado após 3 horas-----	76
FIGURA 22. Efeito da amifostina (AMF) nas variações do peso úmido vesical de animais tratados com ifosfamida (IFO)-----	78
FIGURA 23. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) nas alterações macroscópicas induzidas por ifosfamida (IFO) -----	78
FIGURA 24. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) nas alterações histopatológicas induzidas por ifosfamida (IFO) -----	79
FIGURA 25. Amifostina inibe aumento da expressão da enzima Óxido-Nítrico-Sintase induzida (NOS-i) em bexigas de camundongos por imunohistoquímica--	86
FIGURA 26. Amifostina inibe aumento da expressão da enzima Cicloxigenase 2 (COX-2) em bexigas de camundongos por imunohistoquímica-----	88
FIGURA 27. Amifostina inibe aumento da expressão da citocina Fator de Necrose tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) em bexigas de camundongos por imunohistoquímica-----	90
FIGURA 28. Amifostina inibe aumento da expressão da citocina Interleucina-1 (IL-1) em bexigas de camundongos por imunohistoquímica-----	92
FIGURA 29. A amifostina (50 mg/Kg, <i>ip</i> ) reduziu a atividade da enzima NOSi induzida, em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida-----	93
FIGURA 30. Análise histomorfométrica, após imunohistoquímica pela técnica do TUNEL - Amifostina inibe apoptose induzida por ifosfamida -----	95
FIGURA 31. Efeito da amifostina na imunomarcação, pela técnica do TUNEL, nas bexigas de animais tratados com ifosfamida-----	96
FIGURA 32. Análise histomorfométrica, após imunohistoquímica pela técnica do TUNEL - Amifostina inibe apoptose induzida por acroleína -----	98



FIGURA 33. Efeito do tratamento com a ifosfamida na amplitude de contração de bexigas de camundongos anestesiados-----	100
FIGURA 34. Efeito do tratamento com a ifosfamida na frequência de micção de camundongos anestesiados-----	100
FIGURA 35. Efeito do tratamento com amifostina na variação na amplitude e frequência de contração e de bexigas de camundongos anestesiados tratados com ifosfamida-----	101
FIGURA 36. Efeito da amifostina (AMF) na alteração da contratilidade ao K <sup>+</sup> induzida pela ifosfamida (IFS) em tiras de bexigas de camundongos-----	102
FIGURA 37. Efeito da amifostina (AMF) na alteração da contratilidade ao Carbacol (CCh) induzida pela ifosfamida (IFS) em tiras de bexigas de camundongos-----	103
FIGURA 38. Expressão do RNA-m de CBS e CSE 12 horas após a administração de ifosfamida em camundongos-----	104
FIGURA 39. Efeito do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) (L-cisteína) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Avaliação da variação do peso úmido vesical -----	107
FIGURA 40. Efeito do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) (Reagente de Lawessen) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Avaliação da variação do peso úmido vesical -----	107
FIGURA 41. Efeito do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos - Fotomicrografias de bexigas de camundongos-----	109
FIGURA 42. Efeito do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) (L-cisteína) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Avaliação da permeabilidade vascular-----	111
FIGURA 43. Efeito do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) (Reagente de Lawessen) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Avaliação da permeabilidade vascular -----	111

FIGURA 44. Efeito do Sulfeto de Hidrogênio (H <sub>2</sub> S) (L-cisteína) na dosagem da enzima mieloperoxidase na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos-----	112
FIGURA 45. Efeito do Sulfeto de Hidrogênio (H <sub>2</sub> S) (Reagente de Lawesson) na dosagem da enzima mieloperoxidase na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos-----	113
FIGURA 46. Efeito do sulfeto de hidrogênio (L-cisteína) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos pré tratados com glibenclamida - peso úmido vesical-----	114
FIGURA 47. Efeito do sulfeto de hidrogênio (L-cisteína) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos pré tratados com glibenclamida permeabilidade vascular-----	114
FIGURA 48. Efeito do sulfeto de hidrogênio (Reagente de Lawessen) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos pré tratados com glibenclamida - Peso úmido vesical-----	115
FIGURA 49. Efeito do sulfeto de hidrogênio (Reagente de Lawessen) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos pré tratados com glibenclamida- Permeabilidade vascular-----	115
FIGURA 50 . Efeito do H <sub>2</sub> S na alteração da contratilidade ao Carbacol (CCh) induzida pela ifosfamida em tiras de bexigas de camundongos-----	117

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Citoprotetores aprovados pelo FDA e disponíveis no Brasil ---	20
TABELA 2 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da amifostina (AMF) na cistite hemorrágica induzida pela administração ( <i>ive</i> ) da acroleína (ACR) avaliadas após 3 horas-----	77
TABELA 3 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da administração de amifostina (AMF) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (IFO) em camundongos-----	80
TABELA 4: Possível interação entre os compostos acroleína e amifostina, via métodos de química computacional -----	83
TABELA 5 – Análise semiquantitativa, baseada em escores, do efeito da amifostina sobre a imunexpressão da enzima Óxido-Nítrico-Sintase induzida (NOS-i) em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida ---	85
TABELA 6 – Análise semiquantitativa, baseada em escores, do efeito da amifostina na imunexpressão da enzima Cicloxigenase-2 (COX-2) em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida -----	87
TABELA 7 – Análise semiquantitativa, baseada em escores, do efeito da amifostina na expressão da citocina Fator de Necrose tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida -----	89
TABELA 8 – Análise semiquantitativa, baseada em escores, do efeito da amifostina na expressão da citocina Interleucina-1 (IL-1) em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida por imunohistoquímica-----	91
TABELA 9: Efeito do precursor da síntese do sulfeto de hidrogênio (L-cisteína) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Análise macroscópica e microscópica-----	108
-TABELA 10: Efeito do doador de sulfeto de hidrogênio (Reagente de Lawessen) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Análise macroscópica e microscópica-----	108

## **RESUMO**

## RESUMO

### Efeito protetor da amifostina e da via sulfeto de hidrogênio / canais de potássio atp- dependentes na cistite hemorrágica experimental

A cistite hemorrágica (CH) é um importante efeito adverso das oxazafosforinas atribuído ao seu metabólito urinário Acroleína (ACR). A Amifostina (AMF), é um agente que protege tecidos normais contra uma grande variedade de efeitos tóxicos induzidos pela quimioterapia anticâncer. O envolvimento Sulfeto de Hidrogênio ( $H_2S$ ) em diversas funções fisiológicas e patológicas, bem como sua produção pelos tecidos dos mamíferos tem sido demonstrado em estudos recentes. Assim, o presente estudo objetivou avaliar efeito protetor da Amifostina e do  $H_2S$  na CH induzida por ifosfamida (IFO) em camundongos. Para tanto, a CH foi induzida em camundongos Swiss machos com ACR (75  $\mu g$ , *ive*) e com IFO (400 mg/Kg, *ip*) e, após 3 e 12 horas, respectivamente, foram sacrificados e tiveram suas bexigas analisadas, grupos receberam administração sistêmica (*ip*) de AMF (50mg/Kg), 30 minutos antes da ACR ou IFO. Analisamos o efeito da AMF na apoptose, nas alterações motoras funcionais no trato urinário inferior, *in vivo* e *in vitro*, na expressão de mediadores e citocinas e na atividade da NOS induzida presentes nas bexigas dos animais com CH. Para avaliar o efeito do  $H_2S$  os animais foram tratados com L-cisteína (25, 50 ou 100 mg/Kg, *vo*) ou reagente de Lawesson (9, 27 ou 81  $\mu mol/Kg$ , *vo*), num outro grupo os animais foram tratados com glibenclamida (10 mg/Kg, *vo*) 1 hora antes da L-cisteína (50 mg/Kg, *vo*) ou do reagente de Lawesson ( 27  $\mu mol/Kg$ , *vo*), após quarenta minutos foi induzida CH com IFO e 6 horas depois da IFO a L-cisteína e o reagente de Lawesson foram readministrados. Verificamos por modelagem computacional que a AMF tem probabilidade de interação química com a acroleína. Em estudos *in vivo*, detectamos que a ifosfamida induziu significativo ( $P < 0,05$ ) aumento do peso úmido vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas, imunoexpressão de citocinas TNF-alfa, IL-1beta, e das enzimas iNOS e COX-2, além de aumentar o índice de apoptose e disfunção vesical. De forma interessante, o pré-tratamento com AMF significativamente preveniu todas estas alterações ( $P < 0,05$  versus ifosfamida), sugerindo seu potencial efeito uroprotetor. Em outra abordagem experimental, o  $H_2S$  exerceu uroproteção ( $P < 0,05$  vs IFO) contra na lesão vesical induzida pela IFO em camundongos, avaliando-se o peso úmido vesical, a permeabilidade vascular, análises macroscópicas e microscópicas, dosagem da atividade de mieloperoxidase, bem como as alterações funcionais *in vitro*. Tal proteção foi revertida com o pré-tratamento dos animais com glibenclamida ( $P < 0,05$  vs L-cisteína+IFO). Portanto, o presente estudo evidenciou o efeito uroprotetor da amifostina, provavelmente por um efeito quelante de acroleína e pela modulação de eventos vasculares e inflamatórios da cistite hemorrágica. Adicionalmente, o sulfeto de hidrogênio também demonstrou efeito uroprotetor de forma dependente de canais de potássio ATP-dependentes.

**Palavras-chaves:** Cistite Hemorrágica. Acroleína. Amifostina. Ifosfamida. Sulfeto de Hidrogênio.

# **ABSTRACT**

## ABSTRACT

### Protective effect of amifostine and hydrogen sulfide pathway / ATP-dependent potassium channel in experimental hemorrhagic cystitis

Hemorrhagic cystitis (HC) is an important side effect of acrolein (ACR), a metabolite of the anticancer agents oxazaphosphorines. Amifostine (AMF) is a cytoprotective agent, which protects normal tissues from anticancer chemotherapy-associated toxic effects. Recent studies reported the involvement of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in various physiological and pathological conditions, as well as the constitutive production in mammalian tissues. This study aimed to investigate the protective effect of Amifostine and H<sub>2</sub>S in IFO-induced HC in mice. Swiss male mice were injected with either ACR (75 mcg, *ive*) or IFO (400 mg/kg, *ip*), and were killed 3 or 12 hours, respectively. Another group of animals received Amifostine (AMF, 50mg/kg) 30 minutes before the ACR or IFO. Cell apoptosis, *in vivo* and *in vitro* bladder motor function, expression of pro-inflammatory cytokines and enzymes were measured. To investigate the protective effect of H<sub>2</sub>S, the mice were treated with L-cysteine (25, 50 or 100 mg/kg, *po*) or Lawesson's reagent (9, 27 or 81 mmol/kg, *po*) or glibenclamide (10 mg/kg, *po*) + L-cysteine (50 mg/kg, *po*). The *in silico* analysis showed the likely chemical interaction between AMF and acrolein. In *in vivo* studies, ifosfamide induced significant ( $P < 0.05$ ) increase in bladder wet weight, gross and histopathological changes, immunostaining of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and iNOS and COX-2, as well as increased apoptotic index and bladder dysfunction. Interestingly, AMF pretreatment significantly prevented all these changes ( $P < 0.05$  versus ifosfamide), suggesting its potential uroprotective effect. In another experimental approach, the uroprotective activity of H<sub>2</sub>S was showed by the reduction of bladder wet weight, vascular permeability, macroscopic and microscopic injury, myeloperoxidase activity as well as *in vitro* bladder dysfunction ( $P < 0.05$  vs IFO). Such protection was reversed by pretreatment of animals with glibenclamide ( $P < 0.05$  vs L-cysteine + IFO). Therefore, the present study showed the protective effect of amifostine on IFO-induced HC, probably by a chelate effect on acrolein and the modulation of vascular and inflammatory events. Additionally, hydrogen sulfide also demonstrated uroprotective effect by an ATP-dependent potassium channel dependent manner.

**Keywords:** Hemorrhagic cystitis. Acrolein. Amifostine. Hydrogen sulfide. Ifosfamide.

# **INTRODUÇÃO**



## I – INTRODUÇÃO

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações. No Brasil, de acordo com um relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) as neoplasias malignas constituem-se importante causa de morte na população, representando quase 16% dos óbitos de causa conhecida (OMS, 2011).

Não menos relevante é o impacto global do câncer, que segundo recente estimativa da GLOBOCAN 2012, a incidência de neoplasias malignas mais que dobrou nos últimos 30 anos, tendo sido notificados em 2012 cerca de 14.1 milhões de novos casos de câncer com 8.2 milhões de óbitos. Adicionalmente, tem-se expectativa de 32,6 milhões de pessoas vivendo, em todo o mundo, com diagnóstico de câncer, após 5 anos do diagnóstico. O contínuo crescimento das populações, bem como seu envelhecimento afetará ainda mais significativamente a importância do câncer no mundo, sobretudo nos países de médio e baixo desenvolvimento, bem como adoção de estilos de vida que poderiam propiciar o aparecimento de câncer (JEMAL et al, 2011; GLOBOCAN, 2012).

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2016 , serão válidas também para o ano de 2017 que apontaram para a ocorrência de aproximadamente 596.000 casos novos de câncer, sendo os mais incidentes os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago, no sexo masculino e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e tireoide, no

sexo feminino. Confirma-se a estimativa que o câncer de pele do tipo não melanoma (175.760 novos casos) será o mais incidente na população brasileira (INCA, 2015).

Considerando que os sobreviventes ao câncer estão ou estarão em tratamento, tem-se a expectativa de que estes sofram as consequências tóxicas dessa terapêutica, o que constitui fator, muitas vezes, limitante para a obtenção de adequadas respostas clínicas aos fármacos antitumorais.

Muitos dos efeitos colaterais decorrentes do uso de antineoplásicos se iniciam a partir do momento em que a renovação de tecidos normais é comprometida. Algumas destas substâncias, mesmo em doses terapêuticas, podem apresentar grande toxicidade e alguns órgãos podem ser afetados de forma precoce ou tardia, aguda ou crônica e em menor ou maior escala (BLIJHAN, 1993).

Existem alguns efeitos adversos que são mais específicos de algumas classes de antineoplásicos, como a cardiotoxicidade induzida pela doxirubicina, a nefrotoxicidade dos derivados da platina, a neurotoxicidade da vincristina, a ototoxicidade da Cisplatina e a cistite hemorrágica induzida pelas oxazafosforinas, ciclofosfamida e ifosfamida, a qual nos deteremos de forma mais detalhada a seguir (CASCIATO; LOWITZ, 1995).

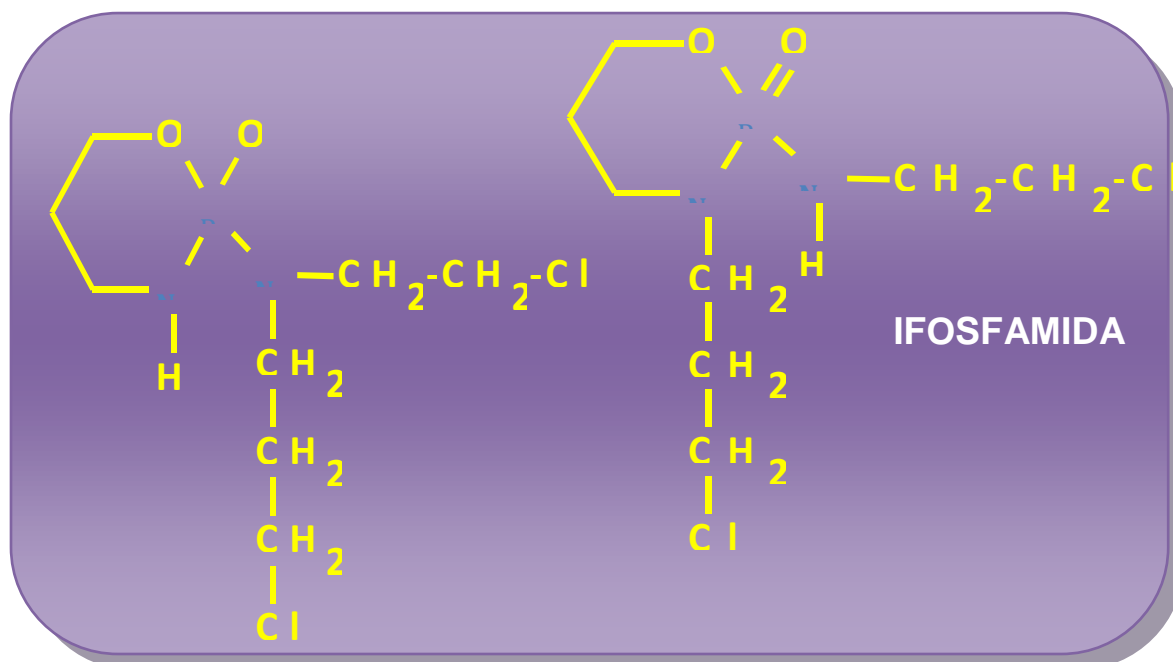
### **1. Oxazafosforinas**

As oxazafosforinas, ciclofosfamida (CFM) e ifosfamida (IFO), são ésteres fosforamidídicos, quimioterápicos do grupo dos alquilantes. Através dos seus

grupos alquila estabelecem ligações covalentes com as bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico (DNA), ou seja, através de radicais de hidrocarbonetos que se ligam a cadeias principais de compostos orgânicos. Esta alquilação leva então a quebra da molécula de DNA e a ligação cruzada em seu duplo filamento (HASKELL, 1990; CALABRESI ; CHABNER, 1990).

A ifosfamida é um isômero estrutural da ciclofosfamida que difere dela por esta conter ambos os grupos cloroetil ligados ao mesmo nitrogênio do exociclo e já a ifosfamida apresenta um destes grupos cloroetil ligados ao nitrogênio do endociclo (FIGURA 1) (SAROSY, 1989). Estas diferenças na estrutura molecular da ifosfamida se relacionam diretamente com suas propriedades físico-químicas, como maior solubilidade em água da ifosfamida em relação a ciclofosfamida, bem como com diferentes propriedades farmacológicas e toxicológicas (CREAVEN et al., 1974; WAGNER et al., 1981; BROCK,1977 apud BRADE et al., 1986;).

**FIGURA 1.** Estruturas químicas da ciclofosfamida e da ifosfamida



(SAROSY, 1989)

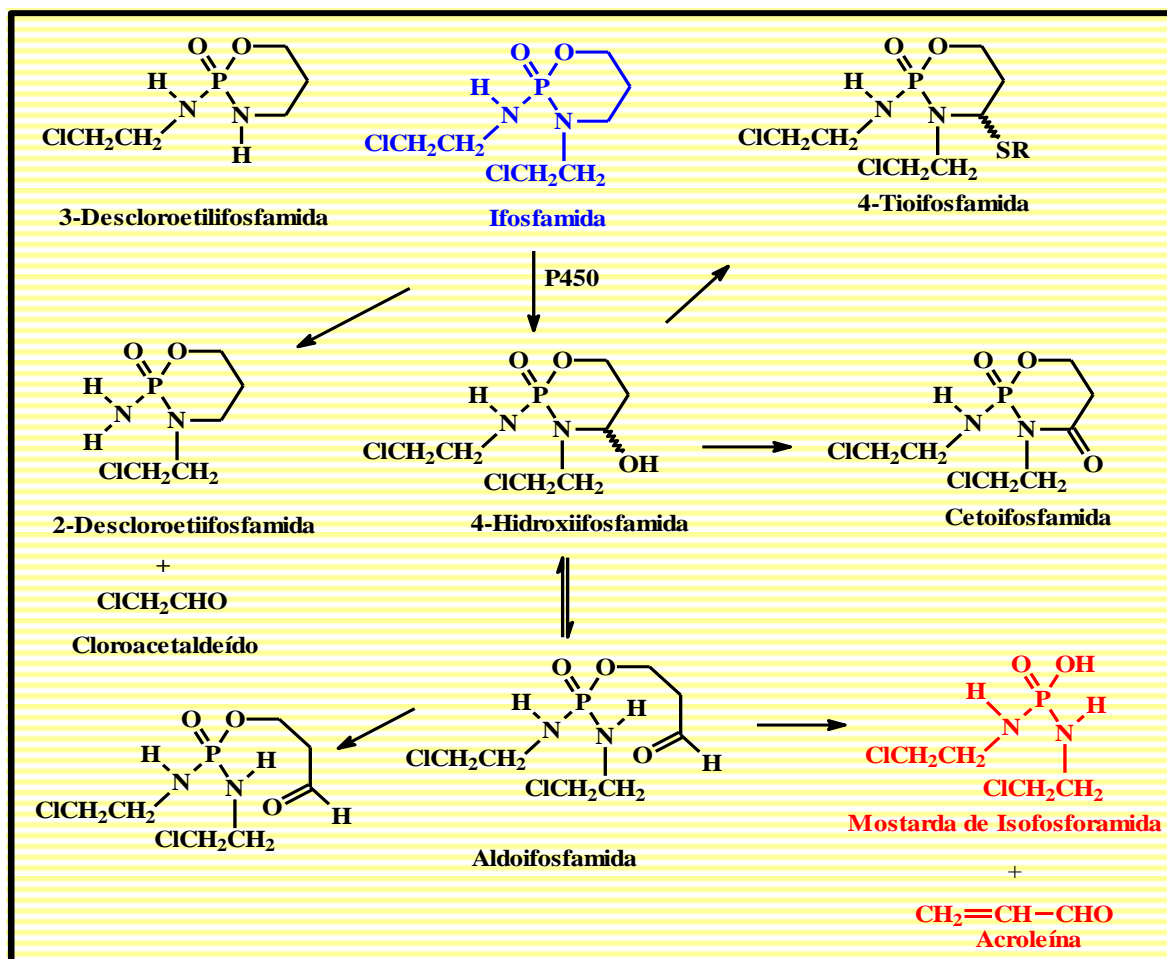
### 1.1. Metabolismo das oxazafosforinas

As oxazafosforinas são pró-drogas, terapeuticamente inativas, ou seja, precisam ser primeiramente biotransformadas para se tornarem citotóxicas. Os metabólitos ativos tanto da ciclofosfamida como da ifosfamida são originados preferencialmente no fígado, (CONNORS et al., 1974 ; FRAISER et al, 1991) , pelo sistema de oxidases de função mista do citocromo P450.

Inicialmente ocorre a hidroxilação do carbono 4 do anel resultando em 4-hidroioxazafosforinas que se encontram em equilíbrio dinâmico com seus tautômeros de anel aberto a aldofosfamida e a aldoifosfamida. Estes são transportados pela circulação até os tecidos susceptíveis onde são clivados por reação de  $\beta$ -eliminação para mostarda de fosforamida ou mostarda de isofosforamida (mostardas nitrogenadas) e acroleína (ACR) (CONNORS et al., 1974 ; LOW et al., 1983; CALABRESI ; CHABNER, 1990). As mostardas são responsáveis pelos efeitos terapêuticos citotóxicos (FISCHER, 1982 ; FRAISER et al., 1991), enquanto que a acroleína responderia pelo dano ao epitélio vesical (COX, 1979 ; BROCK et al., 1979 apud BRADE et al., 1986 ).

A figura a seguir descreve o metabolismo da ifosfamida. (FIGURA 2)

**FIGURA 2.** Metabolismo da ifosfamida



(CONNORS et al., 1974; LOW et al., 1983)

A desativação deste complexo metabolismo ocorre através da desidrogenação irreversível das 4-hidroxiazafosforinas a cetoazafosforinas ou ainda da aldofosfamida e da aldofosfamida a carboxifosfamida / carboxifosfamida. Estas reações de desidrogenação enzimática são catalisadas pela aldeído desidrogenase e/ou aldeído oxidases, enzimas estas que se apresentam nas células tumorais em níveis inferiores aos das células normais, sendo esta uma das razões da ação citotóxica ser mais seletiva nos tumores. Tumores que

demonstrem uma atividade maior da aldeído desidrogenase podem apresentar-se resistentes a oxazafosforinas (BROCK, 1989; LIND ; ROBERTS, 1990).

## **1.2. Aplicações clínicas da ifosfamida e efeitos colaterais**

A ifosfamida é utilizada no tratamento de grande variedade de tumores, como: câncer de testículo, sarcomas de partes moles, câncer de pulmão, osteossarcomas, câncer de ovário e linfomas. Também pode ser utilizada como agente imunossupressor (BRADE et al., 1985 ; BROCK et al., 1988 ZALUPSKI; BAKER, 1988 ; LOEHRER, 1990. DECHANT et al., 1991). Em alguns casos tumores resistentes a ciclofosfamida apresentam-se sensíveis a ifosfamida. A ifosfamida proporciona baixa mielossupressão e apresenta baixa resistência tumoral, quando comparada a ciclofosfamida, sendo portanto uma droga bem indicada para ser incluída em regimes combinados de quimioterapia antineoplásica (HIGGS et al., 1989).

A administração de oxazafosforinas tem sido associada a diversos efeitos tóxicos gerais que são comuns a outros quimioterápicos antineoplásicos como alopecia, náuseas e vômitos e mielossupressão relacionada à dose, manifestando-se por neutropenia ou trombocitopenia (KLASTERSKY, 2003). A mielossupressão representa uma toxicidade dose-limitante (DE PAS et al, 2002) que pode ser reduzida quando é utilizado um esquema com doses fracionadas (MORGAN et al., 1982).

As oxazafosforinas também são reponsáveis por outras toxicidades mais específicas que são potencialmente ameaçadoras da vida como: cistite hemorrágica, nefropatia, neuropatia e cardiopatia (KLASTERSKY, 2003).

O aparecimento de cistite hemorrágica (CH) é bastante comum com o uso de ciclofosfamida e de ifosfamida, podendo este efeito urotóxico ser limitante para o seu uso (MOY, 2012). Essa complicação potencialmente grave é vista coma tendência maior com o uso da ifosfamida, possivelmente devido ao fato de serem usadas doses maiores que resultariam em quantidades também maiores de acroleína, metabólito urotóxico das oxazafosforinas, além da ifosfamida em seu metabolismo, também produzir cloroacetaldeído. As manifestações deste efeito urotóxico são agrupadas em um conjunto de sintomas denominados genericamente de “LUTS” (Lower urinary tract symptoms) que vão desde sensação transitória de esvaziamento e irritação com frequência e urgência urinária, disúria, noctúria, desconforto suprapúbico, microhematúria até cistite hemorrágica com hematúria (BENNETT, 1974; SHROM et al., 1976; MOY, 2012).

## **2. Cistite hemorrágica**

Trata-se de um processo inflamatório vesical associado à hemorragia, que pode ser causada por diversas patologias como carcinomas, amiloidose, artrite reumatoide e doença do enxerto x hospedeiro; por vírus, como adenovírus, vírus BK, citomegalovírus, vírus do herpes simples, vírus da influenza A, vírus JP e papovavírus; por radiação ionizante, por toxinas, como corantes e inseticidas e

principalmente por algumas drogas, como esteróides anabolizantes, ela acontece mais frequentemente seguindo-se ao uso de agentes antineoplásicos como as oxazafosforinas (ciclofosfamida ou ifosfamida) (DEVRIES ; FREIHA, 1990: WEST, 1997; SEBER et al., 1999).

Cogins relatou pela primeira vez em 1959 a cistite hemorrágica induzida pelo uso de Ciclofosfamida (COGINS et al., 1959). Este importante efeito tóxico das oxazafosforinas é observado em mais de 40% dos pacientes quando são utilizados esquemas com altas doses para tratamento de tumores sólidos, sem medidas profiláticas, e foram relatadas taxas de mortalidade entre 2 a 4% quando ocorria hemorragia vesical maciça (PHILIPS et al.,1961 ; WATSON and NOTLEY,1973) e esta incidência de CH ocorria em mais de 70% dos pacientes pós transplante de medula óssea (SHEPHER et al., 1991). Crianças apresentam CH com doses menores quando comparadas com adultos (COGGINS et al., 1959 ; STIELLWELL; BENSON, 1988), bem como ocorre com maior frequência quando são feitas infusões rápidas de ifosfamida (BISOGNO et al., 2001).

O metabólito final tanto da ciclofosfamida como da ifosfamida, a acroleína , um aldeído altamente reativo e tóxico, é apontado como o agente causal da cistite hemorrágica. (COX, 1979 ; BROCK et al., 1979 ; KOLB et al., 1994 ; WAGNER, 1994) A acroleína é formada pela quebra da aldofosfamida ou aldofosfamida, no metabolismo das oxazafosforinas. Esta formação ocorre provavelmente dentro da bexiga, uma vez que a acroleína é muito reativa, com pequena meia vida biológica, além de que uma vez liberada pelo metabolismo



das oxazafosforinas é amplamente excretada, na urina, como ácido 3 – hidroxipropilmercaptúrico (COX, 1979).

Estudos de Cox sugeriram a acroleína como o metabólito das oxazafosforinas responsável pela cistite hemorrágica (aumento do peso das bexigas) (COX, 1979).

Chaviano e colaboradores infundiram acroleína na bexiga de ratos e demonstraram que esta infusão vesical provocava efeitos inflamatórios mais pronunciados do que aqueles induzidos pela injeção de ciclofosfamida *ip*, caracterizados por maior peso das bexigas e por maior absorção de azul de metileno, um indicador de dano tecidual (CHAVIANO et al., 1985). Estes dados dão consistência à hipótese inicial proposta por Cox de que a acroleína é a substância promotora da cistite hemorrágica.

Batista e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, um modelo de cistite hemorrágica induzida por acroleína em camundongos usando curva dose-resposta farmacológica (25,75 e 225 µg/ bexiga) (BATISTA et al., 2006). Este estudo demonstrou que a administração intravesical de acroleína induziu, de maneira dose e tempo-dependente (3, 6, 12, 24 horas), a aumento da permeabilidade vascular e peso úmido vesical, confirmados pelos critério histopatológicos de Gray. Neste modelo, o pré tratamento com MESNA inibiu todas as alterações induzidas pela acroleína (BATISTA et al., 2006). Este modelo possui como vantagem potencial sobre a administração sistêmica de ciclofosfamida ou ifosfamida o fato de não exigir o metabolismo hepático para

formação da acroleína, além poder ser um modelo simples e útil para a avaliação da patogênese da CH e de novas drogas uroprotetoras (RIBEIRO et al., 2012).

### 2.1. Fisiopatologia da Cistite Hemorrágica

Até recentemente o único fato reconhecido na patogênese da Cistite Hemorrágica era que o metabólito urinário das oxazafosforinas, a acroleína (FIGURA 3), seria o principal responsável pelos eventos inflamatórios da inflamação vesical (COX, 1979).

**FIGURA 3.** Estrutura química da acroleína



(COX, 1979)

No entanto, um conhecimento mais detalhado da patogênese da CH induzida pelas oxazafosforinas é um ponto fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e de tratamento que sejam mais eficientes do que as disponíveis atualmente (RIBEIRO et al. 2012). No intuito de estudar dos mecanismos envolvidos na patogênese da CH foram desenvolvidos modelos animais. Basicamente existem dois modelos experimentais de cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas em ratos ou camundongos: injeções sistêmicas de ciclofosfamida (PHILIPS et al., 1961; CAMPOBASSO ; BERRINO, 1972; TOLLEY ; CASTRO, 1975) ou ifosfamida (RIBEIRO et al., 2002; VIEIRA et

al., 2003) e injeção intravesical de acroleína (CHAVIANO et al. 1985; BATISTA et al., 2006 ). A escolha de um modelo animal depende de vários fatores, tais como acessibilidade ao animal, custos, via de administração além do que se deseja investigar. Nos modelos animais a CH é avaliados através de um sistema de escores macroscópicos de edema e hemorragia e também escores de alterações histológicas definidos por Gray e colaboradores (GRAY et al., 1986). O edema vesical também pode ser avaliado na CH experimental através da medida do peso úmido vesical e da permeabilidade vascular pelo extravasamento do Azul de Evans (SOUZA-FILHO et al., 1997).

As hipóteses mais recentes indicam a participação de vários fatores de transcrição, citocinas e enzimas induzidas. Os pesquisadores de Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará vêm estudando o envolvimento de mediadores inflamatórios na patogênese da CH induzida por oxazafosforinas. Passaremos agora, então a descrever as vias e mediadores implicados na geração da cistite hemorrágica.

A acroleína, uma vez dentro da célula, é capaz de depletar de forma fugaz as reservas de agentes nucleófilos como a glutathione bem como reagir com proteínas e ácidos nucleicos. Também, em altas concentrações da substância, possui um potencial citotóxico direto. Estudos de monitoração das concentrações urinárias de acroleína de pacientes submetidos a tratamento antineoplásico não evidenciaram concentrações tão elevadas deste metabólito urinário das oxazafosforinas.(TAKAMOTO et al., 2004) Este fato fortalece a ideia de que o

dano urotelial promovido pela acroleína não decorre somente do seu efeito tóxico direto, mas também de outros efeito biológicos que têm sido comprovados em ensaios experimentais com cistite hemorrágica, eventos estes que potencializam ou amplificam o dano urotelial, envolvendo, principalmente os mediadores da resposta inflamatória.

O estudo pioneiro do LAFICA em cistite Hemorrágica induzida por oxazafosforinas foi realizado em 1994 por Lima que evidenciou o envolvimento de prostaglandinas, leucotrienos, PAF e NO em sua patogênese. (LIMA, 1994)

Considerado como primeiro trabalho sobre a patogênese da cistite hemorrágica, o papel essencial de citocinas pró inflamatórias, como Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina-1 (IL-1) na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida, foi realizado no LAFICA por Gomes e colaboradores com a inibição das manifestações inflamatórias da cistite hemorrágica pela prévia neutralização do TNF- $\alpha$  ou da IL1 endógena com soro anti TNF- $\alpha$  ou anti IL (GOMES et al., 1995).

O TNF- $\alpha$  regula várias funções celulares incluindo proliferação, sobrevivência, diferenciação e apoptose. Desempenha papel central na orquestração de cascata das citocinas em diversas doenças inflamatórias e exatamente por isso tem sido utilizado como alvo terapêutico nessas patologias (PARAMESWARAN – PATIAL, 2010). Os receptores de TNF- $\alpha$  tanto são expressos constitutivamente na maioria dos tecidos dos mamíferos como são altamente regulados e expressos nas células do sistema imune (LOGAN et al., 2007).

O papel do TNF- $\alpha$  na CH que foi demonstrado inicialmente por Gomes e colaboradores foi confirmado pelo fato de que a Talidomida, que aumenta a degradação do RNAm inibindo a produção de TNF- $\alpha$  (SAMPAIO et al., 1991), também preveniu a lesão vesical induzida pela ifosfamida (RIBEIRO et al., 2002). Já a IL-1 $\beta$  é uma citocina altamente próinflamatória que afeta quase todos os tipos celulares e que geralmente trabalha em conjunto com outras citocinas ou pequenas moléculas mediadoras. Os receptores de IL-1 fazem parte de uma família de receptores que incluem correceptores, proteínas de ligação e receptores inibitórios (DINARELLO, 2009). A IL-1 $\beta$  também tem sido implicada na patogênese de várias doenças (DINARELLO, 2011a; DINARELLO, 2011b). Com base nesse conhecimento, agentes que reduzem a produção ou atividade da IL-1 devem ter importância no manuseio de patologias inflamatórias como CH (RIBEIRO et al., 2012). Então assim, a Pentoxifilina, que possui diversos efeitos imuno-moduladores, entre estes fazer a *down-regulation* da síntese de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (KRETH et al., 2010), também se mostrou eficaz em inibir a o edema vesical e alterações microscópicas induzidas pela administração de ifosfamida (RIBEIRO et al., 2002). De fato, a IL-1 $\beta$  é altamente expressa, por imunohistoquímica, nas células epiteliais e subepiteliais de camundongos que foram tratados com ifosfamida (MACEDO et al., 2011a).

Uma grande contribuição dos pesquisadores do LAFICA foi a primeira demonstração descrita da participação do óxido Nítrico (NO) como provável mediador final dos danos uroteliais da cistite hemorrágica. Souza-Filho e colaboradores evidenciaram o bloqueio dos eventos inflamatórios e hemorrágicos

da cistite hemorrágica por inibidores da óxido nítrico sintase (NOS), como Éster Metil L-N<sup>G</sup>-Niitroarginina (L-NAME) e L-N<sup>G</sup>-Nitroarginina (L-NOARG). Neste estudo, adicionalmente, demonstraram por histoquímica para NADPH (Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) diaforase, que as células epiteliais das bexigas dos ratos controle exibiam grandes quantidades da enzima NOS constitutiva e que após o desenvolvimento da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida, esta marcação desaparecia com a descamação e que passava a apresentar níveis mais altos de NOS induzida em células que surgiram na lâmina própria, semelhantes a células inflamatórias (LIMA , 1994; SOUZA-FILHO et al., 1997).

O óxido nítrico é sintetizado por uma família de enzimas conhecidas por óxido nítrico sintases (NOSs). Foram descritas três isoformas distintas de NOSs: a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzida (iNOS), esta distinção se baseia no tipo celular na qual foram primeiramente identificadas, purificadas e clonadas (FORSTERMANN et al., 2011).

Estes primeiros estudos, que indicavam a participação da NOS induzida e não a constitutiva, foram confirmados por estudos posteriores de Oter e colaboradores com a uroproteção demonstrada com utilização de um inibidor seletivo da iNOS, na lesão vesical devido a injeção de ciclofosfamida (OTER et al., 2004) e por Alfieri e colaboradores que demonstrou que a inibição seletiva da NOS neuronal não resultava em efeito uroprotetor (ALFIERI et al., 2001).

Ribeiro e colaboradores que já haviam confirmado a participação do TNF- $\alpha$  e do óxido nítrico produzido pela NOS induzida (NOSi) no dano urotelial e

eventos inflamatórios da cistite hemorrágica, também indicaram a ação do TNF- $\alpha$  para a indução da NOS, bem como concluíram que a indução da NOSi no urotélio parece depender de efeito sinérgico de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . (RIBEIRO, et al., 1998; RIBEIRO, 2002)

Após duas décadas o óxido nítrico tem sido cada vez mais reconhecido como um importante neurotransmissor e mediador celular com um grande espectro de funções no trato urinário inferior (RIBEIRO et al., 2012)

A utilização de lectinas de plantas em estudos no LAFICA, que provavelmente competiam com as selectinas, inibiram a migração de leucócitos para o sítio inflamatório e diminuíram de forma significativa o dano urotelial demonstrando a importância deste evento no desenvolvimento da cistite hemorrágica (ASSREUY et al., 1999).

E desde esses primeiros estudos um progresso notável tem sido feito no que diz respeito a compreensão da patogênese da CH.

Uma outra via da inflamação também tem sido estudada na patogênese da CH induzida por oxazafosforinas, a via da ciclo-oxigenase-2 (COX-2). A COX é um grupo de enzimas com dupla atividade, de cicloxigenase e peroxidase. As COXs catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos que possuem efeitos biológicos que desencadeiam diversas respostas fisiológicas e fisiopatológicas (JAWABRAH AL-HOURANI et al., 2011; DANNENBERG et al., 2001). Das três isoformas existentes da COX, a COX-2 é expressa durante os processos inflamatórios. No que diz respeito a CH induzida por oxazafosforinas a expressão de COX-2 foi demonstrada após tratamento com

ciclofosfamida (HU et al., 2003), ifosfamida (MACEDO et al., 2008a) e acroleína (MACEDO et al., 2008b).

Em estudo publicado por grupo do LAFICA, Macedo e colaboradores demonstraram que o etoricoxibe inibiu parcialmente a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, além de mostrar a diminuição da expressão de COX-2 por imunistoquímica em bexigas de ratos pré tratados com ifosfamida. (MACEDO et al., 2008a).

Em outra publicação do mesmo grupo foi verificada a mediação parcial do aumento da expressão de COX-2 no modelo de CH induzida pela injeção intravesical de acroleína, onde esse aumento dessa expressão só ocorria após 12 horas da indução da cistite, mesmo com a presença de importantes manifestações inflamatórias, sugerindo que nas primeiras horas da CH induzida por acroleína houvesse a participação de outros mediadores inflamatórios. De maneira semelhante o inibidor de COX-2, etoricoxibe, só demonstrou atividade uroprotetora após 12 horas da injeção da acroleína (MACEDO et al., 2008b).

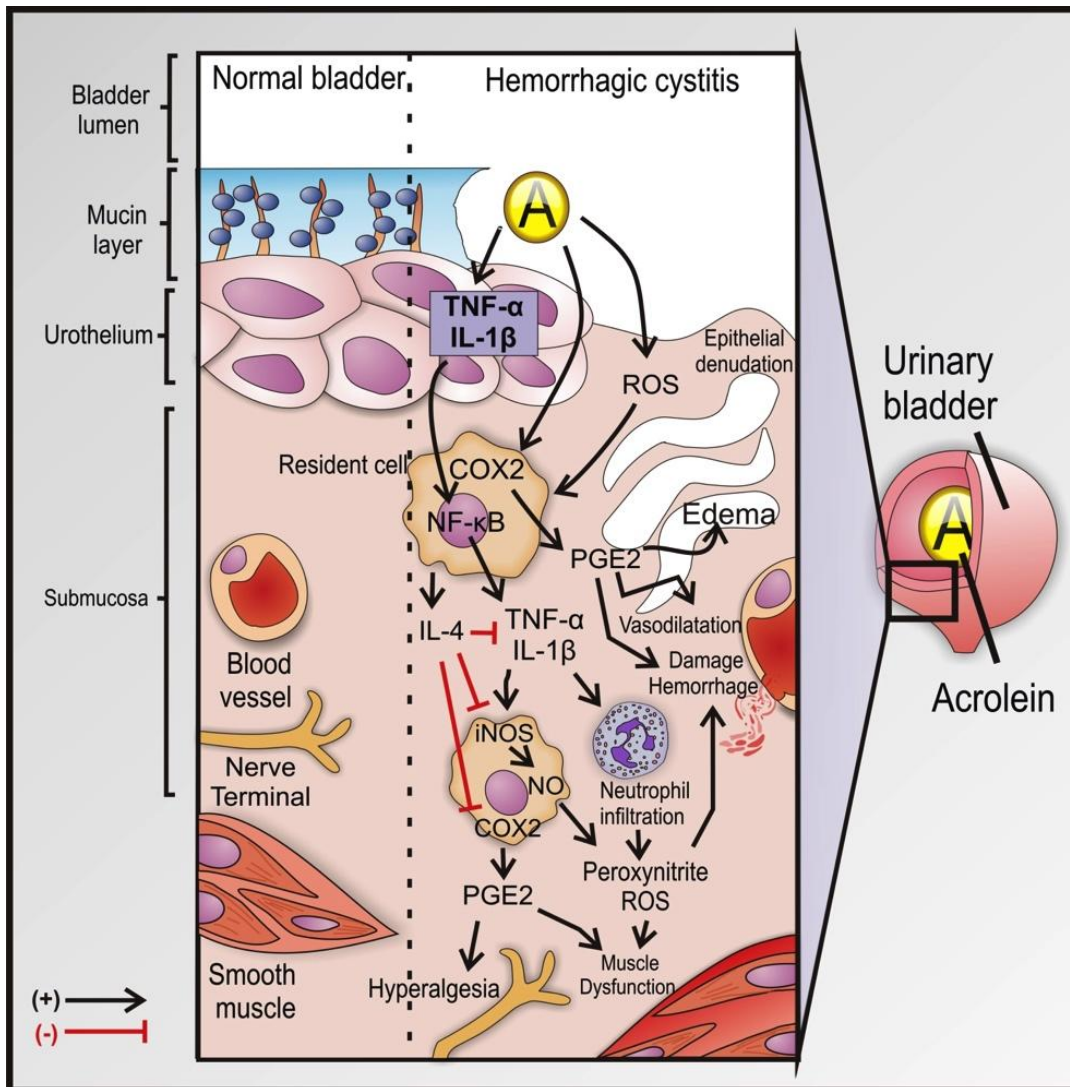
Os eventos inflamatórios induzidos pela COX-2 na bexiga durante a CH induzida pelas oxazafosforinas e seus metabólitos são parcialmente responsáveis pelas alterações funcionais encontradas na CH *in vivo* (HU et al., 2003 ; MACEDO et al., 2011) e *in vitro* (MACEDO et al., 2011a).

Na cascata de eventos inflamatórios que acontecem da cistite hemorrágica o óxido nítrico (NO) é aceito como sendo o mediador final, no entanto o mecanismo molecular intracelular através do qual exerceria seus efeitos ainda é alvo de investigação.



A FIGURA 4 demonstra esquematicamente a participação de mediadores inflamatórios na cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.

**FIGURA 4.** Representação esquemática da participação de mediadores inflamatórios na patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas



(RIBEIRO et al., 2012).

### 3. Citoprotetores na oncologia clínica

A toxicidade dos quimioterápicos utilizados na oncologia clínica pode ser um fator limitante primário do seu uso, uma vez que afetam inúmeros órgãos e tecidos, em especial: a medula óssea, as mucosas intestinais e da bexiga, os rins, o sistema nervoso central, o pulmão, o coração e as gônadas.

Em alguns casos existe a necessidade de se intensificar as doses de quimioterapia / radioterapia para se otimizar as respostas, no entanto ocasionalmente os efeitos adversos destas não permitem este procedimento e como consequência do uso de doses menores do que as planejadas no plano terapêutico inicial pode alterar a qualidade de vida do paciente oncológico ou ainda, mais importante, na sua sobrevivência. (DE VITA; KELLMAN; ROSENBERG, 1994).

Três drogas, que detêm atividade citoprotetora, são aprovadas, atualmente pela Food and Drug Administration (FDA) e estão disponíveis no Brasil. Duas dessas drogas possuem atividade específica: o Dexzarazone, agente quelante intracelular utilizado para reduzir a incidência e a severidade da cardiomiopatia associada ao uso da doxorubicina, o MESNA, utilizado como uroprotetor na cistite hemorrágica induzido pelas oxazafosforinas e a amifostina, outra droga que apresenta amplo espectro (RODRIGUES ., 2010). A TABELA 1 apresenta as principais ações e aplicações na oncologia clínica. (PHYSICIANS' DESK REFERENCE, 1998)

**TABELA 1.** Citoprotetores aprovados pelo FDA disponíveis no Brasil

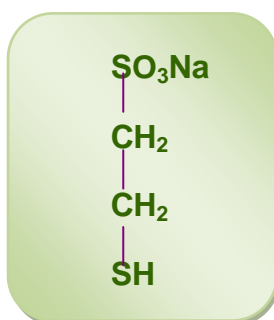
AGENTE	NOME COMERCIAL	INDICAÇÃO CLÍNICA
Dexrazoxane	Cardioxane®	Redução da incidência e severidade da cardiotoxicidade associada ao uso da doxorubicina.
Mesna	Mitexan®	Profilaxia da cistite hemorrágica decorrente do uso da ciclofosfamida e da ifosfamida.
Amifostina	Ethyol®	Redução da toxicidade renal cumulativa relacionada ao uso da cisplatina e de agentes alquilantes. Redução da xerostomia decorrente do tratamento radioterápico

### 3.1. MESNA - Citoproteção vesical

Quando ficou bem estabelecida a relação entre o uso das oxazafosforinas e o aparecimento de cistite hemorrágica diversos procedimentos passaram a ser propostos para prevenir ou tratar este importante efeito adverso. Dentre estas medidas iniciais podemos destacar práticas que visavam diminuir o tempo de contato dos metabólitos urotóxicos com a mucosa vesical bem como que tentavam acelerar sua eliminação como: a hiperidratação, associada ou não ao uso de diuréticos de alça, a irrigação da bexiga, esvaziamento freqüente e drenagem com cateter ureteral. (PHILIPS et al., 1961; REYNOLDS et al., 1969; GOLIN ; BENSON, 1977; DROLLER et al., 1982;; HASELBERGER ; SCHWINGHAMMER, 1995). Estas medidas muitas vezes podem não ser eficazes, já que a ciclofosfamida age diretamente no túbulo renal levando a uma retenção inapropriada de água com risco de hipervolemia com sobrecarga de líquidos, principalmente em idosos e cardiopatas, aonde o quadro pode complicar-se com convulsões e morte (DE FRONZO et al., 1973).

No importante estudo de Brock o composto tiol selecionado foi o 2-mercaptano-sulfonato de sódio (MESNA) (BROCK et al., 1981) (FIGURA 5)

FIGURA 5: Estrutura química do MESNA

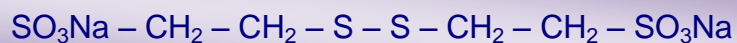


BROCK et al., 1981

Para que um composto tiol seja selecionado como citoprotetor vesical durante a quimioterapia com oxazafosforinas, é essencial a escolha de uma droga que não penetre nas células tumorais e, portanto interfira na ação alquilante dos antineoplásicos, diminuindo assim sua eficácia terapêutica (SHAW & GRAHAM, 1987). O MESNA não entra na maioria das células, pois é muito hidrofílico para atravessar a membrana lipídica passivamente (SHAW, GRAHAM & JONES, 1986) (BROCK, 1980) (ORMSTAD et al., 1983), e seu uso clínico tem demonstrado que não interfere com a resposta tumoral a oxazafosforinas (BRYANT et al., 1980).

Ao entrar na circulação sanguínea, quase que imediatamente o MESNA é oxidado a sua forma dimérica, o ditiodietanosulfonato (diMESNA), (BROCK, 1989) pela formação de pontes dissulfeto entre duas unidades monoméricas (FIGURA 6). O diMESNA é menos reativo que o MESNA. Esta propriedade química é relevante, pois como os metabólitos das oxazafosforinas circulam pela corrente sanguínea poderiam ser inativados caso ali se encontrasse altas concentrações de MESNA (SHAW ; GRAHAM, 1987).

**FIGURA 6.** Estrutura química do diMESNA



(SHAW ; GRAHAM, 1987).

Tanto o MESNA como o diMESNA apresentam alta solubilidade o que facilita seu rápido clearance do plasma para o rim, refletindo-se em meias-vidas plasmáticas (em torno de 1,5 horas) muito mais curtas do que a da ifosfamida

(entre 6-8 horas) (BROCK et al., 1981; SHAW ; GRAHAM, 1987. SAROSY,1989). A excreção urinária rápida do MESNA é importante para a detoxificação dos metabólitos urinários das oxazafosforinas.

Este composto tiol livre é excretado na urina devido a presença de enzimas renais, a tiotransferase e glutathione redutase, capazes de realizar a redução do diMESNA em MESNA (ORMSTAD ; UEHARA, 1982). A FIGURA 7 representa oxidação do MESNA (M-SH) em diMESNA (M-S-S-M) no plasma, seguido de sua redução de diMESNA em MESNA nos rins e a excreção urinária do MESNA.

**FIGURA 7 .** Representação esquemática da oxidação do MESNA (M-SH) em diMESNA (M-S-S-M) no plasma, seguido de sua redução de diMESNA em MESNA nos rins e a excreção urinária do MESNA

**Absorção → 2M-SH → Circulação → M-S-S-M → Rins → 2M-SH → Excreção urinária**

(ORMSTAD;UEHARA, 1982)

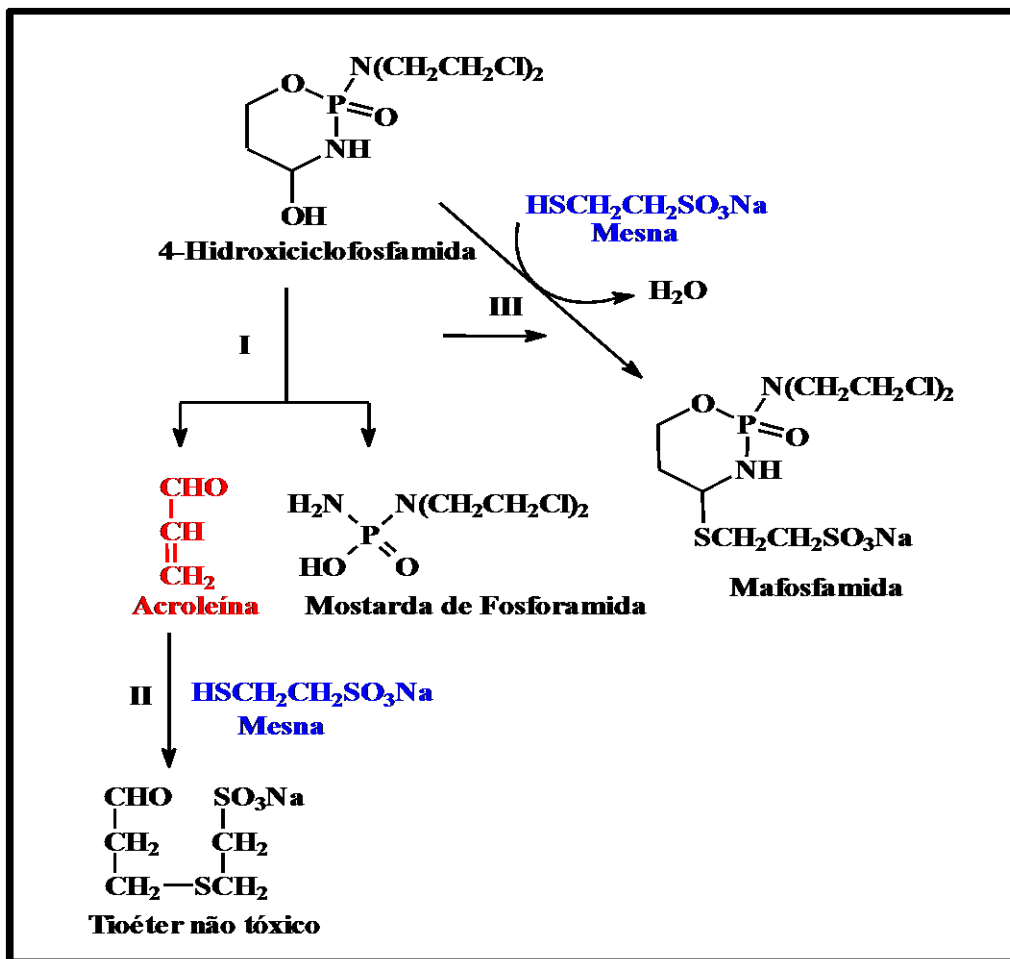
Quando o MESNA reage com metabólitos das oxazafosforinas pode resultar ou não na sua inativação, como a já conhecida interação entre o MESNA e as 4-hidroxioxazafosforinas resultando na formação de um composto com atividade antineoplásica alquilante, denominada de malfosfamida (BROCK, 1980) (FIGURA 8).

A administração do MESNA pode ser feita pelas vias intravenosa (ev) e oral (vo), sendo por esta última via citada, bem absorvido e tolerado. Como a meia vida do MESNA é menor do que das oxazafosforinas, ele deve ser repetido para que se obtenha uma uroproteção adequada. A administração do MESNA em

geral é feita *ev*, em bolus ou em infusão contínua imediatamente antes da ciclofosfamida ou ifosfamida com dose inicial de 20% da dose da oxazafosforina, a seguir doses semelhantes são administradas após 2 e 6 horas (na administração oral), ou após 4 e 8 horas na (administração intravenosa) (KATZ et al., 1995 ; GOREN et al., 1997).

**FIGURA 8.** Quebra da hidroxíciclofosfamida (I) para formar a acroleína e a mostarda de fosforamida, reação da acroleína com o MESNA (II) A reação da 4 – hidroxíciclofosfamida com o MESNA (III)

( ASTA Z7557 )



( ASTA Z7557 )

Na sua avaliação pré-clínica, o mesna apresentou baixa toxicidade aguda e crônica. Não apresentou mutagenicidade ou teratogenicidade. (SHAW-GRAHAM, 1987) Clinicamente foram descritos efeitos colaterais foram descritos como diarreia, dores nas pernas e cefaléia (SHAW;GRAHAM, 1987).

O mecanismo de ação do MESNA na CH induzida por agentes alquilantes está relacionada, conforme descrevemos anteriormente, a sua capacidade de se ligar a acroieína, o metabolito final urotóxico, formando um produto não tóxico, desta forma então, prevenindo a iniciação da cascata inflamatória (LINKS ; LEWIS, 1999). No entanto levando em consideração que o MESNA também é um composto que possui um grupamento sulfidril, não se pode descartar a possibilidade de que a sua uroproteção possa ser devido a capacidade de atuar como *scavenger* de radicais livres (BATISTA et al, 2007), uma vez que esta propriedade já foi demonstrada quando em estudos de lesão de isquemia-reperfusão o MESNA atuou como tal (SENER et al. 2005).

O uso do MESNA profilaticamente reduziu a incidência de CH por oxazafosforinas, que girava em torno dos 40% (HOEFER ; JANKER et al., 1975), para cerca de 4% (SCHEEF ; SOEMER, 1980).

### 3.2. Amifostina - Citoproteção de amplo espectro

**FIGURA 9.** Estrutura química da amifostina



(SWEENEY, 1979).



A amifostina (AMF) ( FIGURA 9) é um tiofosfato orgânico conhecido quimicamente como 2-[(3-aminopropil)amino]-etilsulfanil ácido fosfônico, que foi desenvolvido num programa iniciado em 1959, pelo Exército dos Estados Unidos da América, foi testado dentre mais de 4000 compostos. Este programa tinha como objetivos identificar e sintetizar drogas que fossem capazes de proteger os indivíduos que trabalhassem em ambientes radioativos. Foi codificada com o nome WR-2721 (SWEENEY, 1979).

Um agente citoprotetor para ser considerado como ideal deve possuir três propriedades: (a) Seletividade – proteger os tecidos normais enquanto as células tumorais continuam vulneráveis aos efeitos tóxicos da radio ou quimioterapia. (b) Amplo espectro de atividade – um citoprotetor de amplo espectro poderia proteger vários tipos de tecidos contra a toxicidade induzida por diversos agentes citotóxicos. (c) Poucos ou nenhum efeitos adversos – o citoprotetor deve ser bem tolerado pelos pacientes (GRIGGS, 1998).

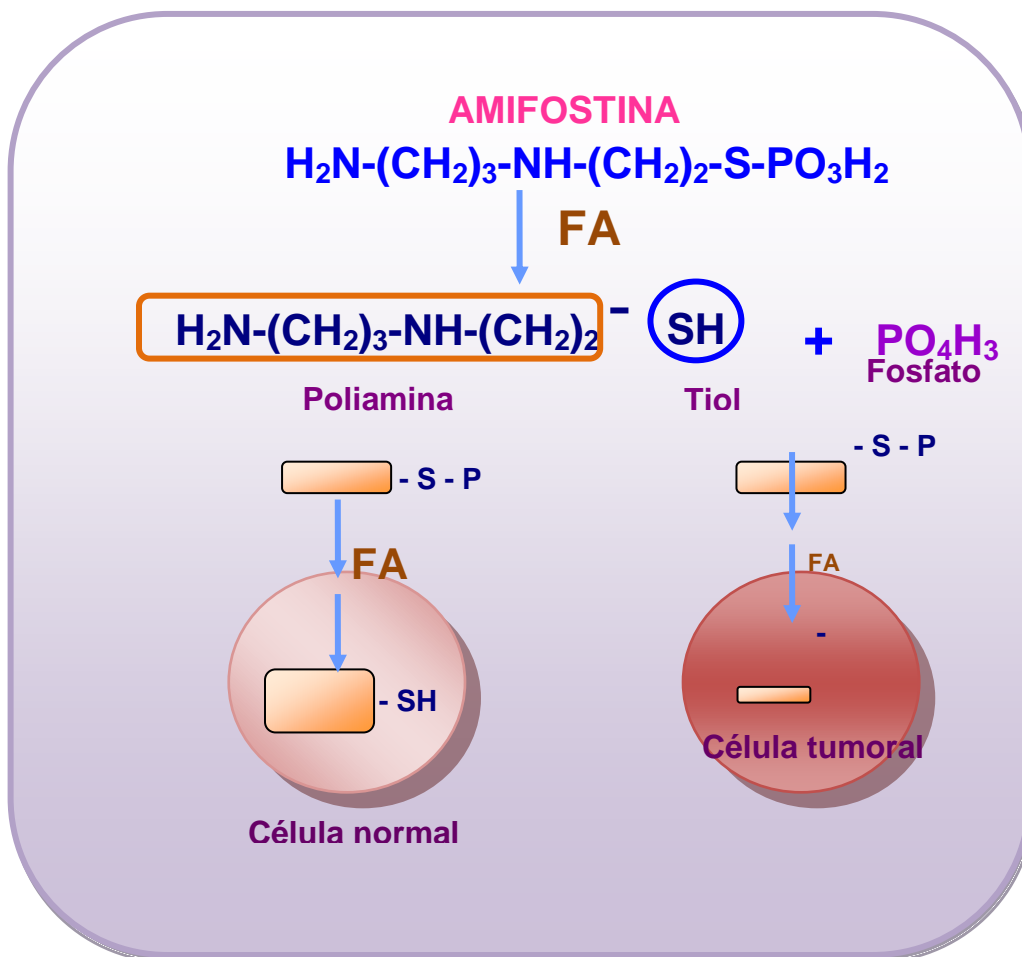
Ao contrário do mesna e do dexrazoxane que possuem efeitos protetores direcionados para órgãos específicos, a amifostina tem sido estudada como agente citoprotetor de amplo espectro sendo capaz de proteger todos os tecidos normais, exceto o sistema nervoso central contra os efeitos citotóxicos de alguns quimioterápicos e da radioterapia (VIEIRA ; LOPES.,2011).

A amifostina é uma pró-droga que quando é desfosforilada, por uma fosfatase alcalina ligada a membrana, adquire atividade por conter um grupamento tiol livre (SH), recebendo então o código WR-1065 (NAKAMURA et al., 1987). (FIGURA 10)

A amifostina protege seletivamente os tecidos normais, esta característica explica-se, em parte, pelo fato de que nessas células a concentração da fosfatase alcalina ligada a membrana é aproximadamente 275 vezes maior do que nos tecidos neoplásicos fazendo com que a conversão da amifostina em seu metabólito ativo lá ocorra preferencialmente e com grande diferença (YANG et al., 1995).

Os tecidos normais também apresentam pH neutro o que favorece o metabolismo da amifostina, em contrapartida o ambiente dos tecidos tumorais é relativamente ácido dificultando esta conversão (CALABRO-JONES et al., 1988; McCULLOCH et al., 1991;). (FIGURA 10)

**FIGURA 10.** Mecanismo proposto para a seletividade da amifostina



Apenas o metabólito ativo, o composto com um grupamento tiol livre (**SH**), entra nas células. Este é formado nos tecidos por uma fosfatase alcalina (**FA**) ligada à membrana; Células tumorais têm atividade reduzida desta enzima comparada à células normais.

A concentração da forma ativa da amifostina nas células normais também sofre interferência do seu modo de transporte. Nestas células a droga entra por difusão facilitada, no entanto nas células tumorais este transporte ocorre por difusão passiva (YUHAS, 1980). Todas estas diferenças levam a uma concentração do composto tiol livre 50 a 100 vezes superior nos tecidos normais, mesmo após múltiplas e consecutivas doses (CAPIZZI, 1996).

Alguns estudos experimentais, *in vivo* e *in vitro*, demonstraram o efeito protetor da amifostina em células normais expostas a diversos esquemas terapêuticos anticâncer, sem, no entanto interferir na ação citotóxica antitumoral destes compostos (ALBERTS et al., 1996; YUHAS, 1979; PAINE et al., 1996). Dentre estes estudos citamos o uso da amifostina como protetor na mielotoxicidade induzida por ciclofosfamida (DOUAY et al., 1995) e na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina (YUHAS ; CULO, 1980 ).

Batista e colaboradores demonstraram que a amifostina e glutathione, ambos agentes antioxidantes, foram capazes de proteger contra a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e por acroleína. Os efeitos protetores no modelo de CH induzida por acroleína estiveram presentes tanto com a administração sistêmica (*i.p.*) como local (*i.v.e.*) (BATISTA et al., 2007).

Ao longo dos anos vários estudos divergentes sobre a eficácia deste agente têm sido publicados na literatura. A amifostina tem sido utilizada em diversos estudos clínicos como citoprotetor contra diversos agentes tóxicos em pacientes com neoplasias de diferentes tipos e origens (CAPIZZI ; OSTER, 1995; SCHILLER et al., 1996; WAGNER et al., 1998). O uso de maior experiência da amifostina, até o momento, é como protetor contra os derivados da platina. Estes compostos são excretados pelos rins com diversos mecanismos de toxicidade, onde uma insuficiência renal ocorre de forma dose dependente, dose cumulativa e geralmente permanente, limitando não só o uso dos derivados da platina como também de outros tratamentos (VOGELZANG et al., 1985). A amifostina reduziu a incidência tanto da nefrotoxicidade como da neurotoxicidade e mielossupressão causadas pelos compostos da platina (GLOVER et al., 1986; WADLER, et al., 1996).

A proteção contra toxicidade cumulativa da platina à medula óssea foi demonstrada em estudo randomizado, em pacientes portadoras de câncer de ovário. Pacientes protegidas tiveram redução dos eventos de febre neutropênica (62% a menos), e significativa redução das transfusões de plaquetas e hemácias, dias de internação e uso de antibióticos sem afetar a atividade tumoral (HILPERT et al., 2004).

Pacientes em uso de esquema combinado de cisplatina e ciclofosfamida que usaram amifostina apresentaram redução significativa na incidência de neutropenia, febre, infecções, dias de internação, dias de antibioticoterapia,

transfusões de plaquetas e hemácias, demonstrando que a amifostina possui também importante atividade mieloprotetora ( KEMP et al., 1996).

Ainda em relação à proteção contra agentes alquilantes, a Amifostina foi utilizada em um estudo de fase II, como protetor contra alta dose de ciclofosfamida ( $7 \text{ g/m}^2$ ) que é utilizada para mobilizar célula progenitora periférica e reduzir a massa tumoral antes da realização de transplante autólogo. Os principais resultados foram a redução da intensidade da toxicidade cardíaca, pulmonar, e hepática e uma significativa redução da frequência e severidade da mucosite (HWANG et al, 2004).

Outro fármaco, com atividade citotóxica, onde a amifostina demonstrou atividade citoprotetora é o paclitaxel. A utilização prévia de amifostina (30 minutos antes), seguida do uso conjunto do paclitaxel e amifostina, demonstrou uma diminuição da citotoxicidade em pacientes portadores de neoplasias avançadas, bem como demonstrou redução da ação lesiva sobre os fibroblastos normais do pulmão e uma significativa melhora da citotoxicidade em pacientes afetados de câncer pulmonar, não de pequenas de células (HILPERT et al.2004 ; MOVSAS et al., 2005).

A utilização da amifostina como protetor da radioterapia também foi estudada por vários autores. A variação da dose que deve ser utilizada antes da irradiação diária foi estabelecida entre 200 a  $340 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ , administrada em infusão de 5 a 7 minutos, 15 a 30 minutos antes da radiação. Os pacientes devem ser adequadamente hidratados e devem receber antieméticos antes do seu uso e mantido em decúbito dorsal em posição supina (SOUZA et al., 2000). A

toxicidade gastrointestinal induzida por radioterapia ou quimioterapia pode ter sua incidência e severidade reduzidas com o pré-tratamento com a amifostina, conforme demonstrado em alguns estudos clínicos (SHAW et al., 1988; KOUKOURAKIS et al., 2000; SINGH et al., 2006).

Atualmente a prevenção da xerostomia induzida por radiação é uma das principais indicações da amifostina, uma vez que resultados de vários estudos randomizados demonstraram esta proteção em pacientes irradiados portadores de câncer de cabeça e pescoço (SASSE et al., 2006).

A amifostina é geralmente bem tolerada, porém não isenta de efeitos adversos. Náuseas e vômitos ocorrem principalmente quando os tempos de infusão são superiores a 15 minutos (TURRISI et al., 1986). Recomenda-se o uso de medicação antiemética, 1 hora antes da amifostina, incluindo dexametazona e antagonistas dos receptores 5-HT<sub>3</sub> (ondasetron 32 mg ev ou granisetron 1 mg ev). O lorazepan pode também ser útil no controle de náuseas refratárias (SCHUCHTER, 1996).

Hipotensão transitória ocorre em mais de 60% dos pacientes que usam amifostina e agentes antihipertensivos devem ser temporariamente descontinuados um dia antes do tratamento (SCHUCHTER, 1996) e os pacientes não devem estar hipovolêmicos antes do início da infusão da amifostina. A hidratação com pelo menos 1 litro de solução salina atenua a hipotensão que geralmente ocorre no final da infusão ou um pouco antes (BUKOWSKI, 1996).

Coriza e espirros são comuns, ocorrendo em aproximadamente 25% dos pacientes (TURRISI et al., 1986). A inibição da liberação dos hormônios das

paratireóides resultando em hipocalcemia é comum no entanto raramente possui significância clínica (SCHUCHTER, 1996).

A amifostina protege as células normais através de mecanismos que ainda estão sob investigação, no entanto esta citoproteção possivelmente inclui os mecanismos descritos a seguir:

a) “*Scavenger*” de radicais livres: Sua forma ativa, o tiol livre WR-1065 faz uma “varredura” das espécies reativas de oxigênio geradas a partir de agentes quimioterápicos, radiação ionizante e drogas eletrofílicas reativas como os agentes alquilantes (SHAW et al., 1986; TRESKES et al., 1994; CAPIZZI, 1996; FOSTER-NORA ; SIDDEN, 1997;; GRIGGS, 1998).

b) Neutralização dos agentes quimioterápicos: Através de seu componente tiol se liga aos agentes quimioterápicos impedindo assim sua ligação com o DNA (VALERIOTE ; TOLEN, 1982; VAN DER VIJGH ; PETERS, 1994; TANNEHILL ; MEHTA, 1996; LIST et al., 1996; MCCAULEY, 1997)

c) Modulação dos níveis de glutathiona(UMA DEVI ; PRASANNA, 1990).

d) Reparo do DNA: Durante a formação do segundo metabólito da amifostina, o componente WR-1065 ocorre a liberação de íons hidrogênio que facilitam diretamente o reparo químico nos locais de destruição do DNA (VAN DER VIJGH ; PETERS, 1994; CAPIZZI, 1996; FOSTER-NORA & SIDEN, 1997; GRIGGS, 1998).

e) Condensação do DNA: Altas concentrações do componente WR-33278 poderiam condensar o DNA e limitar os alvos potenciais dos radicais livres,

reduzindo assim o número de quebras do DNA após radioterapia (RUBIN et al., 1996).

A diminuição no dano do DNA promovido pela amifostina pode ter importante papel na recuperação do endotélio e da mucosa irradiados uma vez esta redução pode levar a um aumento na proliferação celular (RUBIN et al., 1996; KOUKOURAKIS et al., 1999).

Adicionalmente, alguns estudos têm descrito que a amifostina é capaz de aumentar a expressão de uma variedade de proteínas envolvidas com o reparo do DNA e inibição da apoptose, tais como Bcl-2 e HIF-1 (CARMELIET et al., 1998; KAJSTURA et al. 1996, SHIMIZU et al., 1996).

O envolvimento de espécies reativas de oxigênio e peroxinitrito na cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas tem sido sugerido (KORKMAZ et al., 2005; TOPAL et al., 2005). Desta forma também pode ser sugerido que os efeitos da amifostina na cistite hemorrágica, pelo menos em parte, se deva em consequência da inativação dos radicais livres liberados na bexiga devido ao tratamento com ciclofosfamida ou ifosfamida.

#### **4. Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S): Química, toxicidade e síntese.**

O termo gasotransmissor foi introduzido para denominar gases de baixo peso molecular que atuam como neurotransmissores neuronais (WANG, 2002).

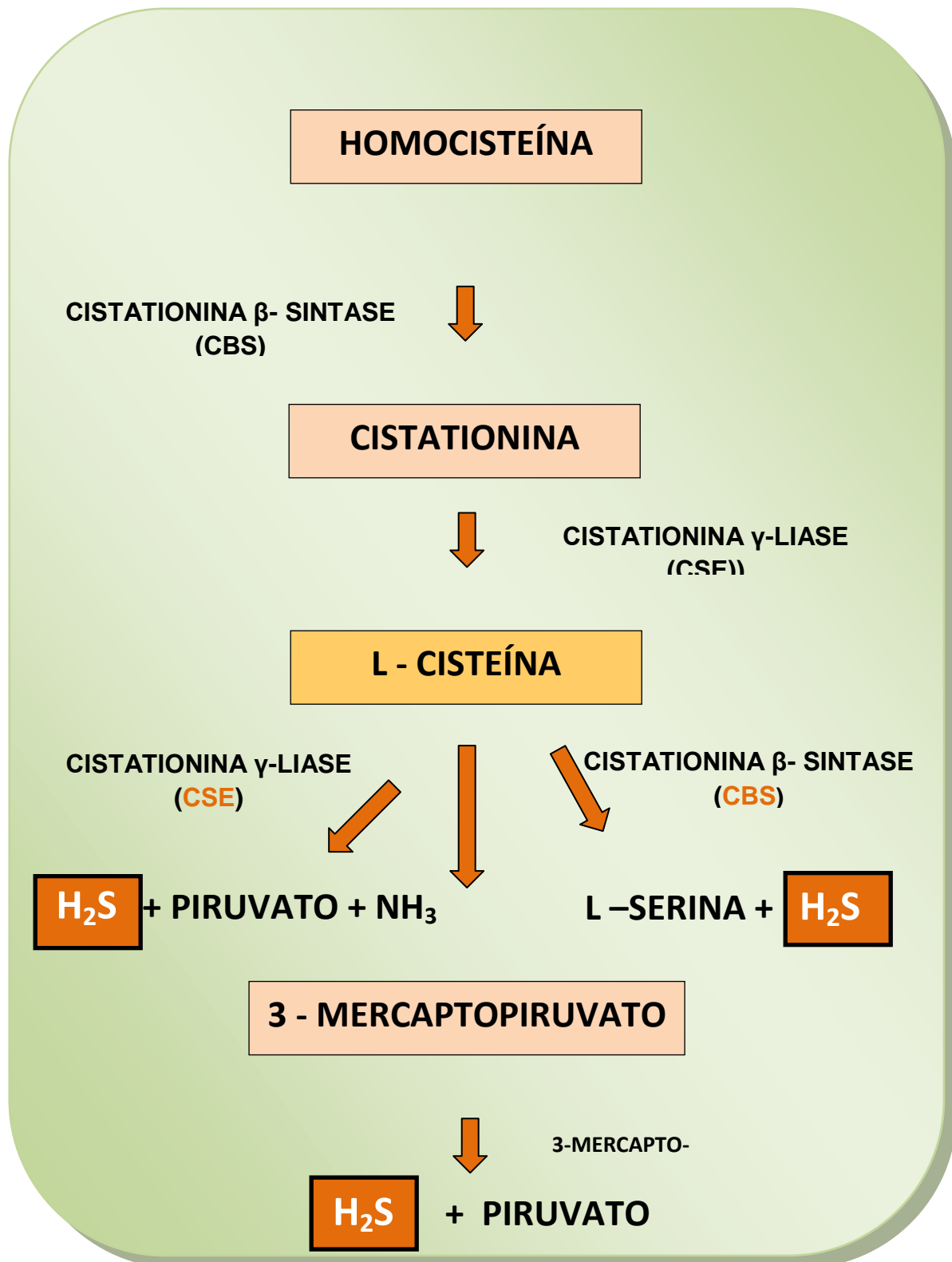


O conhecimento de que a transdução de sinais entre as células poderia ser feita especificamente através da liberação de um gás, o óxido nítrico (NO), pelos neurônios, levando a estimulação neural, foi uma descoberta que modificou o entendimento dessa sinalização nos anos noventa (KASPAREK et al, 2008). Posteriormente o monóxido de carbono (CO) e o H<sub>2</sub>S também foram reconhecidos como neurotransmissores gasosos (ABE; KIMURA, 1996).

O H<sub>2</sub>S é um gás com odor característico de ovo podre que é tradicionalmente bem conhecido por ser um gás tóxico para o SNC e inibidor do Sistema respiratório (BEUCHAMPS et al, 1984; GUIDOTTI, 1996). Já tem sido investigado há muito tempo em estudos de poluição ambiental associado às indústrias de mineração, derivados do petróleo e de celulose e papel (MILBY; BASSELT, 1999). Estudos sugerem ser produzido endogenamente nos tecidos dos mamíferos por três enzimas (FIGURA 11), a cistationina β-synthetase (CBS), cistationina γ-lyase (CSE), e 3-mercaptosulfurtransferase e que desempenha importante papel em condições fisiológicas ou fisiopatológicas HOSOKI et al, 1997; MOORE et al, 2003; KIMURA et al, 2005; TANG et al, 2006).

Quimicamente, o H<sub>2</sub>S é uma pequena molécula que atravessa livremente as membranas plasmáticas das células. Um terço do H<sub>2</sub>S permanece não-dissociado em solução aquosa enquanto sua solubilidade em solventes lipofílicos é 5 vezes maior do que em água (WANG, 2002). O H<sub>2</sub>S queima em extensa faixa de inflamabilidade no ar e sendo misturado ao ácido nítrico ou outros oxidantes fortes, como ácido sulfúrico, se torna perigosamente reativo. (MAINIER; VIOLA, 2005).

**FIGURA 11:** Principais vias de produção endógena do sulfeto de hidrogênio



O sulfeto de hidrogênio é metabolizado, principalmente, a sulfato e a tiosulfato através de metabolismo de oxidação nas mitocôndrias e reação com a glutathione. Apenas uma pequena parte do  $H_2S$  pode ser convertido, através de metabolismo de metilação no citosol, em metilmercaptano e dimetil sulfato, compostos menos tóxicos, podendo ser eliminados como metahemoglobina ou glutathione oxidada (WANG, 2002). Os produtos metabólicos podem ser excretados através dos rins, trato intestinal e pulmões em 24 horas, deste modo o  $H_2S$  gerado endogenamente, sob condições fisiológicas, dificilmente se acumulará ou terá efeitos tóxicos para as células (FURNE et al, 2001).

Uma possível interação entre os gasotransmissores tem sido sugerida, uma vez que todos interagem com a Hemoglobina (FIORUCCI et al, 2006) e de maneira semelhante aos outros gasotransmissores, NO e CO, o  $H_2S$  não atua sobre receptor específico de membrana e devido a sua alta reatividade não é armazenado em vesículas pré sinápticas, mas sim produzido enzimaticamente sob demanda e com produção regulada (KASPAREK et al, 2008).

A toxicidade do  $H_2S$ , em concentrações muito acima das fisiológicas, é uma propriedade comum dos neurotransmissores gasosos, especificamente por esse motivo a princípio foram identificados como toxinas ou poluentes (WU et al, 2005; BECKMAN et al, 1993).

A via enzimática para produção do sulfeto de hidrogênio é específica de cada tecido, por exemplo, enquanto a CBS é a enzima que gera predominantemente o  $H_2S$  no sistema nervoso central a CSE o faz no sistema

vascular (WANG, 2002; ZAHO et al, 2003). Ambas as enzimas têm sido descritas serem encontradas nos rins, principalmente nos túbulos renais proximais (HOUSE et al., 1997; ISHII et al., 2004; LI et al., 2006).

O  $H_2S$ , assim como os outros gasotransmissores, tem sido relacionado a ações fisiológicas bem diversificadas. Essas funções vão desde respostas imunes e inflamatórias, percepção e mediação da dor até proteção da mucosa gástrica, controle da motilidade gastrointestinal e tônus vascular (FIORUCCI et al., 2006).

#### **4.1. Sulfeto de Hidrogênio ( $H_2S$ ): Ações no trato urinário**

Em contraste ao seu efeito vasorelaxante o NaHS, doador de  $H_2S$ , produz resposta contrátil dose-dependente no músculo detrusor de bexigas de ratos (PATACCHINI et al., 2005). Esses resultados demonstram evidências farmacológicas de que o  $H_2S$  estimula os terminais nervosos aferentes primários sensíveis à capsaicina, via ativação dos receptores TRPV1, com consequente liberação de taquicininas que por sua vez produzem respostas contráteis no músculo detrusor (MAGGI et al., 1986; BIRDER et al., 1998; MAGGI et al., 1997). Uma vez que um bloqueador inespecífico de canais catiônicos, o vermelho de Rutênio, se mostrou ser capaz de praticamente abolir as contrações induzidas pelo  $H_2S$  levou a formulação de 2 hipóteses: primeiro, o  $H_2S$  estimularia o receptor TRPV1 de um modo de outros

ativadores conhecidos; segundo, o H<sub>2</sub>S deve estimular outros receptores presentes no terminal dos neurônios sensoriais sensíveis a capsaicina (PATACCHINI et al., 2005).

Em 1997 o TRPV1 foi clonado de neurônios sensoriais de ratos (CATERINA et al., 1997). Este trata-se de um canal catiônico inespecífico com alta permeabilidade ao Ca<sup>+2</sup> e que pode ser ativado por diversos estímulos químicos e físicos como capsaicina, baixo pH (TOMINAGA et al., 2004) e calor (ZYGMUNT et al., 2000), entre outros. O influxo de Ca<sup>+2</sup> resulta em liberação local de neuropeptídeos incluindo taquicininas e substância P. Já a entrada de Na<sup>+</sup> causa despolarização primária dos neurônios sensoriais com iniciação de potencial de ação.

Os neurônios que possuem receptores TRPV1 não são apenas neurônios aferentes envolvidos na percepção da dor somática e visceral, mas também possuem função sensorial efetora (WIMALAWANSA et al., 1993).

Estudos também demonstraram que TRPV1 são expressos em diversas células não neuronais, incluindo células epiteliais do urotélio (BIRDER et al., 2002) ,queratinócitos (INOUE et al., 2002) e músculos esqueléticos (XIN et al., 2005). Esses achados do TRPV1 indicam suas amplas e variadas funções fisiológicas e fisiopatológicas.

Apesar da descrição de Patacchini e colaboradores do mecanismo através do qual o H<sub>2</sub>S afeta o tônus do músculo liso em bexigas isoladas de ratos, inclusive funcionais, de que o H<sub>2</sub>S estimula os terminais nervosos aferentes sensíveis a capsaicina, com concentrações do H<sub>2</sub>S superiores àquelas

presentes nos fluidos corporais sob condições fisiológicas, os alvos moleculares através dos quais o H<sub>2</sub>S atua nos neurônios sensoriais dos ratos ainda merecem maior investigação (PATACCHINI et al., 2004; CHAHL, 2004; PATACCHINI et al., 2005).

## 5. Justificativa

O uso do mesna, um composto tiol, é eficaz para prevenir a cistite hemorrágica, porém uma proteção completa nem sempre é alcançada, o que foi demonstrado em estudo clínico randomizado controlado de pacientes submetidos à quimioterapia baseada em ifosfamida (LIMA et al., 2007), apresentando então um novo conceito de "cistite hemorrágica subclínica".

Dados preliminares da literatura já citavam a amifostina, outro composto tiol, como sendo eficaz na prevenção da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (SRIVASTAVA et al, 1999).

A investigação dos mecanismos envolvidos nos efeitos protetores da amifostina na cistite hemorrágica poderá trazer contribuições importantes na descoberta de novas ações antiinflamatórias próprias desse fármaco que não sejam aquelas consequentes ao seu único e reconhecido efeito “ *scavenger*” de radicais livres. Tal elucidação poderá colocar a amifostina no rol das muito eficientes drogas antiinflamatórias, o que também a tornará uma droga com um enorme potencial de utilização clínica.

Adicionalmente, o sulfeto de hidrogênio tem sido apontado como sendo uma substância gasosa bioativa que é produzida em diferentes células dos mamíferos (KIMURA, 2002; WANG, 2002). Diversos estudos têm indicado que o H<sub>2</sub>S desempenha importante papel tanto em condições fisiológicas como em diversas patologias, como na hipertensão arterial, isquemia miocárdica e choque (CHEN et al., 2007). Também já foi demonstrado que animais tratados com um doador de H<sub>2</sub>S, o NaSH, apresentaram respostas contráteis no músculo detrusor (PATACCHINI et al., 2005) afetando o tônus muscular vesical (PATACCHINI et al., 2004; CHAHL, 2004), esta ação através da atuação do H<sub>2</sub>S a receptores ligados a canais catiônicos TRPV1 (PATACCHINI et al., 2005) e TRPA1 (STRENG et al., 2008) nos neurônios sensoriais.

Portanto, o presente estudo abre perspectivas, a partir dos estudos dos mecanismos e mediadores envolvidos no efeito da amifostina e do sulfeto de hidrogênio na cistite hemorrágica, de transladar o potencial citoprotetor por eles conferidos para diversos outros efeitos adversos associados a drogas antineoplásicas.

## **OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS:

### A. Gerais:

- Avaliar o efeito protetor da amifostina e do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos.

### B. Específico

- Avaliar via métodos de química computacional a possível interação entre compostos acroleína e a amifostina.
- Avaliar o efeito uroprotetor da amifostina na CH na expressão de citocinas e mediadores inflamatórios (IL-1, TNF- $\alpha$ , NOSi e COX-2), atividade de enzimas, na apoptose e nas alterações funcionais (*in vitro* e *in vivo*).
- Avaliar o efeito uroprotetor do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na cistite hemorrágica induzida pela ifosfamida nas variações do PUV, PV, atividade de MPO, alterações macroscópicas, histopatológicas e funcionais, bem como avaliar a participação de canais de K<sup>+</sup>-ATP dependentes no possível mecanismo uroprotetor do H<sub>2</sub>S.

## MATERIAIS E MÉTODOS

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 25 a 40 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará-UFC e do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC (n: 5 - 6).

Os animais que foram utilizados no modelo de injeção intravesical de acroleína foram mantidos em jejum de água por 18 horas antes do experimento, recebendo ração comercial balanceada à vontade. Todos foram acondicionados em gaiolas apropriadas, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

Todos os experimentos realizados seguiram rigorosamente as normas estabelecidas pelos princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará.

### 2. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais.

- Agulhas 29G e 25 G;
- Amplificador Dataq (PM-1000, WCE, USA)
- Aparelho Vortex,
- Balança analítica, digital modelo 260 (MARTE);
- Balança para pesagem dos animais, mod. ID-1500 (FILIZOLA);

- Banho -maria modelo 100 (FANEN)
- Base emborrachada para permanência do animal;
- Bomba de circulação Haake FJ
- Catéter de polietileno (PE-50, Clay Adams, USA)
- Fio de sutura em Algodão 3-0
- Geladeira e freezer;
- Leitor de ELISA;
- Luvas descartáveis;
- Material cirúrgico (pinças, tesouras, agulhas, etc);
- Microscópio óptico binocular (OLYMPUS CX 40);
- Micrótomo modelo 820 SPENCER - American Optical Corporation;
- Programa Chart v 4.0 (ADInstruments□).
- Seringas de insulina 0,5 cc com agulha 29G ultrafina (13 x 3,3), de 1 e de 5 ml ( BECTON - DICKINSON);
- Sistema de aquisição de sinais biológicos (PowerLab/8sp, ADInstruments□).
- Transdutores de força Grass, modelo FT03C (Quincy, Mass., EUA)
- Tubos plásticos de 15 ml (FALCON)
- Vidrarias em geral

### **3. Drogas, soluções , Líquidos e Corantes utilizados**

- Acroleína ( densidade =0,84 mg/ml) – (SIGMA Brasil)

- Água destilada (AD)
- Alcool etílico 70% (Reagen)
- Alcool iodado
- Amifostina (Ethyol 200mg – Gentilmente cedido pela Schering do Brasil):dissolvida em solução salina 0,9%
- Anticorpos primários (cabra para TNF, coelho para IL-1 e iNOS e para COX2)
- Azul de Evans (AE) - (SIGMA da Brasil) : 2,5 g em 100 mL de AD
- Eosina (Reagen)
- Formamida ( Vetec)
- Formol 10% (Formol concentrado - Merck - 10mL  
Água destilada q.s.p. - 100,0 mL)
- Hematoxilina (Reagen)
- Ifosfamida (HOLOXANE 1g- Asta Médica, AG Frankfurt, Alemanha): dissolvida em solução salina 0,9%
- Kit de Imunoistoquímica (ABC Staining System da Santa Cruz Biotechnology®)
- PBS (Tampão Citrato Salino)
- Peróxido de oxigênio a 3%
- Proteinase K (Sigma, NY, USA)
- Solução nutritora de Tyrode
- Soroalbumina Bovina 5%
- Soro fisiológico 0,9%
- Tampão Citrato
- Xilol

## **4. Protocolo experimental.**

### **4.1. Indução da cistite hemorrágica.**

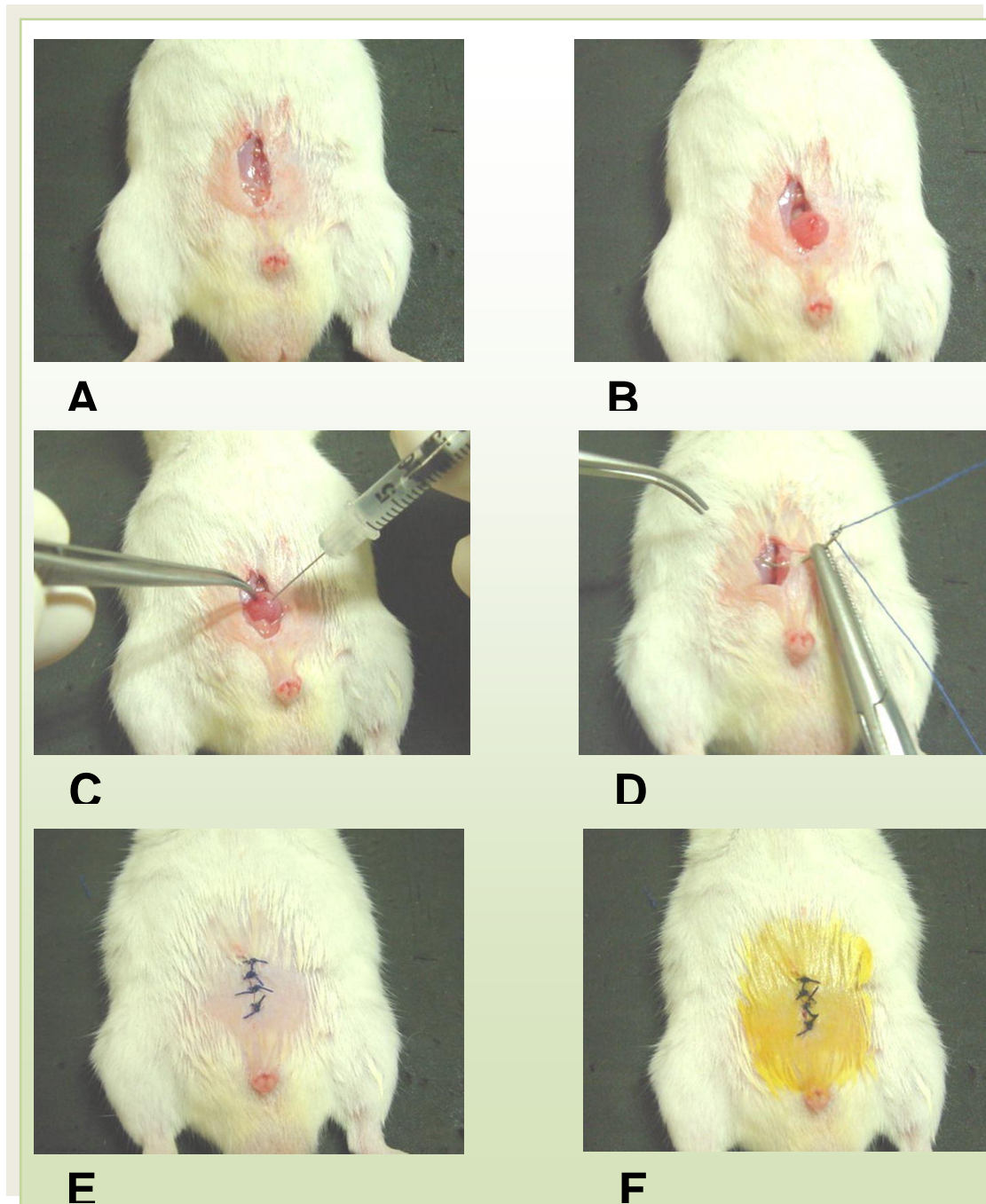
#### **4.1.1. Cistite hemorrágica induzida por injeção intravesical de acroleína**

Utilizamos o modelo de cistite hemorrágica induzida por acroleína em camundongos desenvolvido pelo nosso grupo e publicado posteriormente (BATISTA et .al, 2006). Neste modelo, os animais são anestesiados e posteriormente realizada, sob condições estéreis, pequena incisão abdominal na linha média, com aproximadamente 1 cm.

A bexiga é exposta através desta incisão e após seu esvaziamento, um volume de 0,1 ml de acroleína, na dose de 85 µg/bexiga, ou de salina como controle (sham), são injetados no polo superior e no lúmen vesical com agulha curta (13 x 3,3), ultra fina, de calibre 29. Após a injeção intravesical, a bexiga é recolocada com cautela na sua posição anatômica e a parede abdominal é fechada em um único plano com fio de algodão 3-0 com pontos separados (FIGURA 12).

Os animais são então sacrificados por deslocamento cervical após 3, horas da injeção da acroleína, e em seguida são reabertos e, após cuidadosa dissecação vesical, as bexigas são seccionadas junto ao colo, tendo seus conteúdos desprezados. As bexigas são colocadas em contato com papel absorvente para retirar o excesso de líquidos e posteriormente submetidas à análise das alterações macroscópicas, do peso úmido vesical, da permeabilidade vascular e histopatologia, conforme descrição a seguir.

**FIGURA 12.** Etapas do Modelo de Indução de cistite hemorrágica induzida por injeção intravesical de acroleína.



**A-** Abertura da Cavidade Abdominal; **B-** Exposição da Bexiga; **C-** Injeção Intravesical de acroleína, **D-** Fechamento em plano único da incisão cirúrgica, **E-** Parede abdominal suturada; **F-** Assepsia da Sutura com Álcool Iodado. (BATISTA et al., 2006)

#### 4.1.2. Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

Os animais receberam injeção intraperitoneal de ifosfamida (400 mg/Kg), foram sacrificados por deslocamento cervical após 12 horas e a seguir suas bexigas foram retiradas após cuidadosa dissecação. As bexigas foram submetidas a análise macroscópica, do peso úmido vesical e avaliação histopatológica, para em seguida serem direcionadas para o seu respectivo delineamento experimental.

**FIGURA 13.** Injeção intraperitoneal de ifosfamida.





## **4.2. Variáveis para avaliação da cistite hemorrágica**

### **4.2.1. Determinação do Edema**

O edema vesical foi avaliado e quantificado pelo Peso Úmido Vesical (PUV).

Após a dissecação das bexigas, estas foram pesadas e os resultados do PUV foram expresso como Média  $\pm$  EPM de mg de bexiga/20g de peso do animal, visando principalmente a correção devido a variação das massas corpóreas dos animais.

### **4.2.2. Determinação da Permeabilidade Vascular (PV)**

Trinta minutos antes do sacrifício os animais receberam injeção endovenosa, via plexo retroorbitário, de solução de azul de Evans (AE) a 2,5% na dose de 25 mg/Kg. De acordo com o descrito anteriormente, após serem sacrificados, os animais tiveram suas bexigas retiradas, pesadas e colocadas em tubos com 1 ml de formamida, os quais foram incubados a 56° C durante toda a noite. A absorvância do corante extraído da bexiga pela formamida, foi lida em 600nm, realizada em um espectrofotômetro. Através da utilização de uma curva padrão de AE estes resultados foram convertidos em ( $\mu$ g de AE). Nossos dados foram expressos como Média  $\pm$  EPM de ( $\mu$ g de AE/ bexiga).

### 4.2.3. Análise Macroscópica

As bexigas foram cuidadosamente dissecadas e examinadas macroscopicamente, logo após sua retirada e esvaziamento do conteúdo. De acordo com os critérios de Gray (GRAY et al., 1986) foram avaliadas quanto a edema e hemorragia, conforme o descrito a seguir: (FIGURA 14)

#### Edema:

Grave (3+): edema interno e externo;

Moderado(2+): edema interno (mucosa);

Leve(1+): intermediário;

Normal(0): nenhum.

#### Hemorragia:

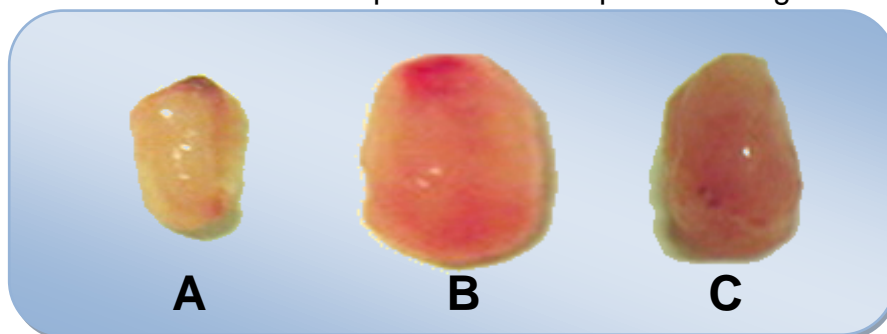
( 3+): coágulo intravesical;

( 2+): Hematomas na mucosa;

( 1+): telangiectasia ou dilatação dos vasos da bexiga;

( 0 ): Normal.

**FIGURA 14.** Aspecto Macroscópico de Bexigas



(A) Tratadas com salina *ive* (B) com acroleína 75µg *ive* e (C).com ifosfamida 400mg/Kg *ip*

#### 4.2.4. Análise Histopatológica

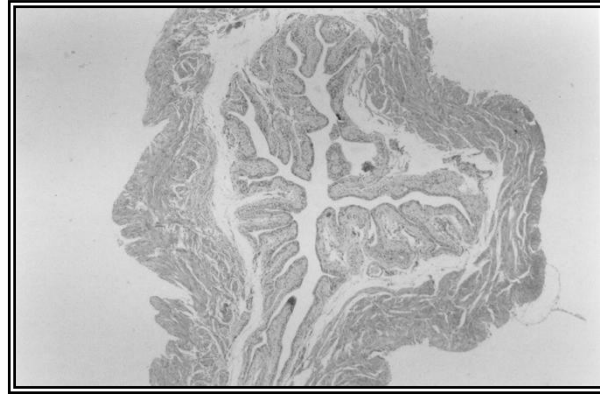
As bexigas após serem dissecadas, pesadas e analisadas macroscopicamente, conforme o descrito, foram fixadas em Formol 10%, em seguida desidratadas em álcool 70%, imersas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos assim formados foram cortados em micrótomo calibrado para 5 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). O material resultante foi corado pela técnica da Hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia óptica em estudo simples-cego, feito por histopatologista. As alterações microscópicas foram determinadas pelos critérios de Gray (GRAY et al., 1986), que se seguem: (FIGURA 15)

**(0) - Histologia normal:** Caracterizada por urotélio normal, bem como ausência de ulcera e infiltrado inflamatório.

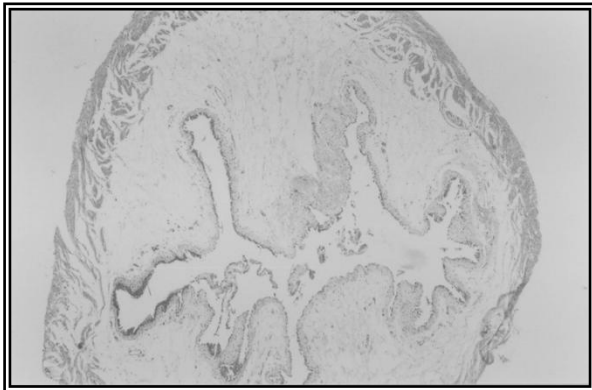
**(1+) - Alterações discretas:** Caracterizada por número de células epiteliais uroteliais diminuídos pela descamação, apagamento das dobras habituais da mucosa em decorrência do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras

**(+2) - Alterações intensas:** Caracterizada por ulceração da mucosa, múltiplas úlceras, edema intenso, infiltrado inflamatório importante. Depósito de fibrina e hemorragia.

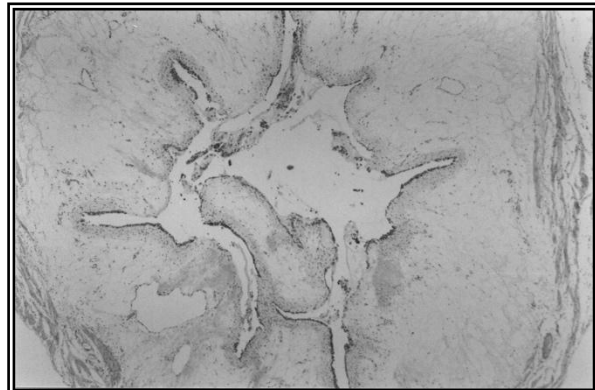
**FIGURA 15.** Aspecto Microscópico de Bexigas



**A**



**B**



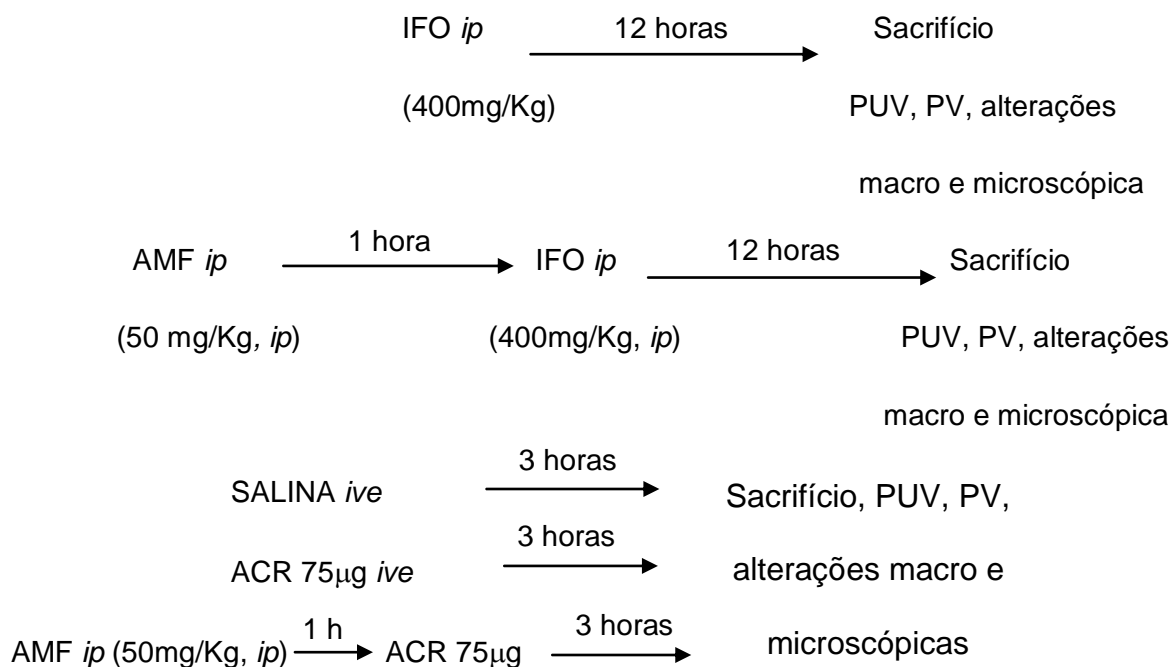
**C**

(A) Bexigas tratadas com salina *ipe* (B) com acroleína 75µg *ipe* e (C) com ifosfamida 400mg/Kg *ip*. (BATISTA et al., 2007)

## 5. Delineamentos Experimentais

### 5.1. Efeito da amifostina na cistite hemorrágica induzida por acroleína ou por ifosfamida – Avaliação da variação do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histológicas.

Em camundongos *Swiss* machos foi induzida cistite hemorrágica com acroleína (75 µg, *ive*) ou com ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*) (n:5-6). Para cada modelo de cistite hemorrágica tivemos um grupo controle que recebeu apenas solução salina (*ive* ou *ip*). Uma hora antes da indução da cistite, em ambos os modelos, outros grupos foram submetidos a injeções intraperitoneais de amifostina (AMF) na dose de 50 mg/kg. A cistite hemorrágica induzida por acroleína ou ifosfamida foi avaliada após 3 ou 12 horas, respectivamente, pela determinação das variações do PUV, análise macroscópica e avaliação histopatológica e PV, conforme descrito anteriormente.



## **5.2. Avaliação da possível interação entre os compostos acroleína e amifostina, via métodos de química computacional**

Foram realizados cálculos de mecânica quântica, baseados na teoria do funcional da densidade, com o funcional B3LYP e a base 6-311g(d,p), utilizando o software Gaussian 09, no intuito de avaliar propriedades eletrônicas e estruturais dos compostos. Simulações de mecanismos de reação são bastante complexas e demoradas, assim, realizamos nossas análises partindo das propriedades obtidas para os compostos individualmente.

Inicialmente, foram obtidas as estruturas para os compostos a partir do cálculo de otimização de geometria. Em seguida, calculados o momento de dipolo, as energias e os formatos dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO. O momento de dipolo permite avaliar a interação entre os compostos considerando os tipos de interações intermoleculares. O HOMO é o último orbital molecular preenchido (Highest Occupied Molecular Orbital), ou seja, em um processo de oxidação, é deste orbital que o elétron vai ser removido. Já o LUMO é o orbital molecular desocupado de mais baixa energia (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), logo, num processo de redução, é este orbital que receberá o elétron. (Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará e da Universidade Federal do ABC).

## **5.3. Avaliação do efeito da amifostina na imunoexpressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1) e das enzimas (NOS-i e COX-2), na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**

A cistite hemorrágica foi induzida com a injeção intraperitoneal de ifosfamida na dose de 400 mg/Kg. Um grupo recebeu pré tratamento com amifostina (50 mg/Kg *ip*) uma hora antes da ifosfamida. Após 12 horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, suas bexigas, após cautelosa dissecação, foram retiradas, fixadas em formol 10%, transferidas para álcool 70% após 24 horas e enviadas para inclusão em parafina com o objetivo do estudo da expressão de mediadores e citocinas pelo método imunistoquímico. O protocolo incluiu realização de cortes de 4µm de espessura e montagem em lâminas específicas para processamento posterior.

Para a desparafinização procedeu-se previamente o aquecimento em estufa por 3 horas a 60°C e a imersão em solução de xilol, aquecido igualmente durante o mesmo período, durante 10 minutos. Seguiu-se então a imersão em Xilol a temperatura ambiente e a hidratação em soluções alcoólicas sucessivas. As lâminas foram lavadas com água destilada corrente e depois imersas em tampão Citrato (pH = 6,0), diluído em volume 1:10, sucedendo-se o aquecimento por 15 minutos em microondas em potência máxima para recuperação antigênica. Para a inativação da peroxidase endógena utilizamos o peróxido de oxigênio a 3% (volume) por 10 minutos. O bloqueio antigênico inespecífico foi realizado com o soro específico de acordo com as recomendações do fabricante (ABC Staining System da Santa Cruz Biotechnology®). Foram utilizados em diluição específica em albumina bovina 5% os anticorpos primários (cabra para TNF, coelho para IL-1 e iNOS e para COX2) que ficaram em banho por 12 horas. As lâminas controles receberam apenas a BSA 5% sem anticorpos.

Decorrido o período de incubação as lâminas foram lavadas com PBS para a amplificação com o anticorpo secundário em diluições específicas, inclusive as lâminas controle.

Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com o complexo conjugado avidina-biotina-peroxidase (Complexo Strep ABC por Vectastain® ABC reagente e solução substrato de peroxidase) por 30 min, de acordo com o protocolo Vectastain. A imunexpressão das enzimas e mediadores pôde ser visualizada com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harry, desidratadas em uma série de álcoois graduados, apuradas em xileno e lamínulas.

A coloração pôde ser observada por microscopia de luz, e a imunexpressão de iNOS, COX2, IL1 ou TNF $\alpha$  realizada com base na intensidade da coloração. A imunoistoquímica qualitativa foi então realizada, sendo as lâminas analisadas, epitélio e tecido conjuntivo, por microscopia em estudo simples cego atribuindo-se escores de acordo com a intensidade de marcação, de 0 (ausência de expressão) a 3 (intensa expressão).

#### **5.4. Avaliação do efeito da amifostina sobre a atividade de NOS induzida na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e por acroleína.**

As medidas de atividade da NOS, foram realizadas a partir das amostras de bexigas, utilizando método previamente descrito (GOMES et al., 2004). Doze



horas após a administração de IFO (400mg/kg, *ip*) ou 3 horas após a injeção intravesical de acroleína (75µg), os animais foram sacrificados e suas bexigas foram coletadas, e mantidas em *freezer* a -70° C até realização do ensaio.

As amostras foram homogeneizadas (Polytron- PT 3100) em 0,3 mL de tampão de extração pH=7 (320mM sucrose; 50mM Tris; 1mM EDTA; 1mM DTT; 10µg/mL leupeptina; 10µg/mL soybean trypsin inhibitor; 2µg/mL aprotinina; 2mM PMSF) e centrifugados (9.000 g/10min/4°C). A seguir, 40 µL de cada sobrenadante foram incubados com 100 µL do tampão de ensaio pH=7,4 (50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,25mM CaCl<sub>2</sub>; 0,12mM β-NADPH; 60mM L-valina; 1mM L-citrulina; 50µM BH<sub>4</sub>; 4µM FAD; 1mM DTT) por 1 hora.

As amostras foram preparadas em triplicata. Tubo 1: sem inibidores de NOS; Tubo 2: L-NAME (inibidor não-específico de NOS) e aminoguanidina (inibidor específico de iNOS); Tubo 3: EGTA (quelante de cálcio para as isoformas constitutivas). L-arginina-<sup>14</sup>C (270 µCi/mmol) foi adicionada à razão de 5,4 µL para cada 1mL de tampão de ensaio.

Em seguida, 1mL de resina Dowex AG-50X8 sódica (1:1 em água, pH 6,0) foi adicionado aos tubos de ensaio, homogeneizados e centrifugados (9.000 g/10min/4°C). Foram colocados 400 µL do sobrenadante destes tubos em 3 mL de líquido de cintilação e, após agitação, a radioatividade foi quantificada por contador beta por 1 minuto para cada tubo. Também foi realizada a quantificação das proteínas totais de cada amostra pelo método de Comassie Blue (Comassie Blue Reagent; Pierce Chemical, Rockford, IL). Os resultados foram expressos como pmol de citrulina/hora/mg de proteína.

Como controles do ensaio, quatro grupos foram preparados: grupo 1: tubos para avaliar o background (este tubo não continha amostra); grupo 2: tubos para quantificar o total de cpm - contas por minuto (neste tubo não foi adicionado o Dowex nem as amostras); grupo 3: tubos com  $7 \times 10^6$  macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$  (controle NOS induzida); grupo 4: tubos com homogenato de cerebelo (controle NOS neuronal).

### **5.5. Ação da ifosfamida na indução de apoptose em células de bexigas de camundongos - Técnica de imunistoquímica – TUNEL (TdT – mediated dUTP nick and labeling)**

Cistite hemorrágica foi induzida por IFO (400 mg/Kg *ip*). Os animais foram sacrificados e tiveram suas bexigas retiradas, fixadas em formol 10%, incluídas em parafina e feitos cortes de 5  $\mu$ m em lâminas cobertas com L-polilisina, próprias para imunistoquímica. Utilizamos a técnica de imunistoquímica para apoptose o kit Apoptag<sup>®</sup> S 7100 (Chemical International). Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e reidratados com concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 95% e 70%). Em seguida, foram lavados com solução tampão fosfato (PBS) e incubados a temperatura ambiente com proteinase K por 15 minutos para promover a recuperação antigênica. Depois de lavado com água destilada (AD), o material foi tratado com peróxido de hidrogênio 3% volume por volume (v/v) em PBS por 5 minutos para bloquear a peroxidase endógena. Seguiu-se nova lavagem com PBS, após o que os cortes histológicos foram incubados com o *Equilibration Buffer* por 10s e imediatamente depois com a enzima TdT (desoxinucleotidil transferase) associada aos nucleotídeos marcados

com digoxigenina (*reaction buffer*) que iriam se ligar as hidroxilas livres do DNA fragmentado das células apoptóticas. O controle negativo não recebeu enzima. O material permaneceu em estufa a 37°C por 1 hora e a reação foi terminada com a solução *stop*. Lavagem com PBS, em seguida adição do conjugado antidigoxigenina e incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Outra lavagem com PBS e adicionado o DAB (diaminobenzidina), o substrato da peroxidase, incubando o material por 3 a 6 minutos, para desenvolver a coloração da reação. Lavagens com água destilada e as lâminas foram contracoradas com *methlyl green*. Nova lavagem com AD, imersão em N-butanol 100% e xilol e, em seguida procedeu-se a montagem das lâminas.

Para se quantificar a intensidade de coloração das estruturas, foram feitas fotomicrografias das bexigas dos camundongos com aumentos de 100x e 400x através de sistema de captura digital Leica DFC 320. Utilizando-se o sistema de Análises Histomorfométricas (SAHM 1.0) uma área de bexiga, compreendendo urotélio e tecido conjuntivo, foi selecionada e avaliada a relação área corada sobre área não corada (pixels/pixels). O programa IMAGE J 1.4 seleciona uma coloração prédefinida que se quer avaliar e quantifica a área ocupada por essa coloração, essa quantificação foi posteriormente utilizada para verificar a ação da ifosfamida na indução da apoptose em bexigas de camundongos.

#### **5.6. Ação da acroleína na indução de apoptose em bexigas de camundongos Técnica de imunistoquímica – TUNEL (TdT – mediated dUTP nick and labeling)**

Induzimos cistite hemorrágica em camundongos Swiss por injeção intravesical de acroleína (75µg *ive*), conforme descrição anterior. O grupo controle recebeu apenas solução salina injetada *ive* (0,1 ml). Após o sacrifício dos animais, que ocorreu após 3 horas da indução da cistite, as bexigas foram retiradas, fixadas em formol 10%, incluídas em parafina, feitos cortes de 5 µm e montadas em lâminas próprias para imunistoquímica.

Estes cortes, conforme protocolo, foram hidratados e incubados com 20µg/L de proteinase K por 15 minutos em temperatura ambiente. Usamos o peróxido de Hidrogênio 3% (v/v) em PBS por 5 minutos em temperatura ambiente para bloquear a peroxidase endógena. Os cortes foram lavados, incubados câmara umidificada a 37°C por 1 hora com Tampão TdT, com enzima e tampão para reação. As amostras foram novamente incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente com um tampão de lavagem e então foram reincubadas câmara umidificada por 30 minutos com conjugado de peroxidase anti-digoxigenina em temperatura ambiente. Foi feita uma série de lavagens em PBS e os cortes foram cobertos com substrato da peroxidase para conferir coloração. Foram feitas três lavagens com água destilada e as lâminas foram contracoradas com *methyl green* 5% (v/v) por 10 minutos em temperatura ambiente. Foi feita então a avaliação do efeito da acroleína na indução de apoptose em bexigas de camundongos pela análise da coloração das lâminas.

**5.7. Avaliação do efeito da amifostina na inibição da apoptose induzida por ifosfamida e por acroleína em bexigas de camundongos Técnica de imunistoquímica – TUNEL (TdT – mediated dUTP nick and labeling)**

Uma hora antes da indução da cistite por IFO (400 mg/Kg *ip*) ou por acroleína (84 µg *ive*), os animais foram tratados com amifostina (50 mg/Kg). Os animais controle receberam somente solução salina. Após 3 horas da ACR a e 12 horas da ifosfamida todos os animais foram sacrificados e tiveram suas bexigas preparadas para imunistoquímica conforme descrição anterior e foi analisado o efeito da amifostina na apoptose induzida por acroleína e por ifosfamida.

#### **5.8. Papel da amifostina nas alterações dos parâmetros funcionais nas bexigas de camundongos anestesiados. Estudo “*in vivo*”.**

Esta série de experimentos foi totalmente realizada no Laboratório Escola Luiz Capelo sob a supervisão do Prof. Armenio Aguiar dos Santos.

Camundongos Swiss machos pesando entre 30 e 40g receberam injeção intraperitoneal de ifosfamida (400mg/kg). Um grupo de animais recebeu amifostina (50 mg/kg – *i.p.*) uma hora antes da indução da cistite.

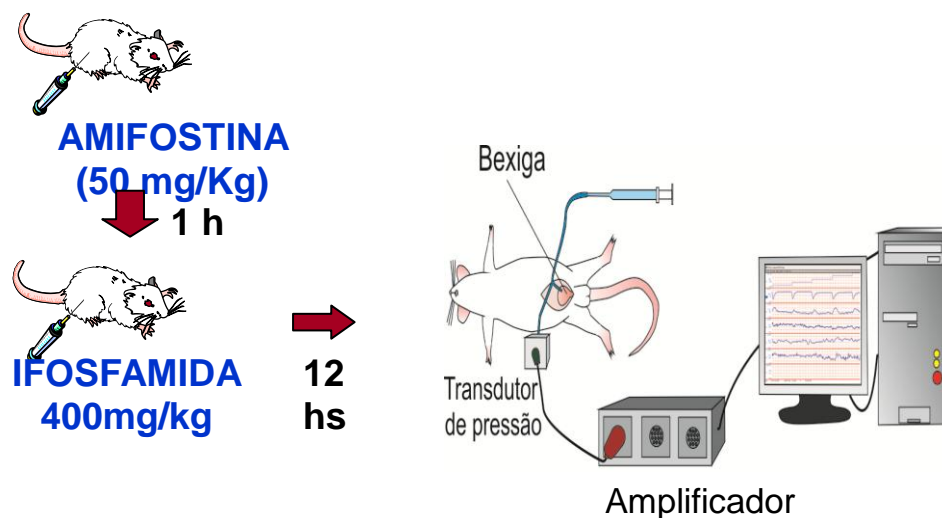
Após 12 horas da administração da ifosfamida, os animais foram anestesiados com uretana 50% na dose de 1.2 g/kg por via subcutânea (*s.c.*).

Para o registro da pressão intravesical através da técnica do cistometrograma contínuo, foi realizada laparotomia e através de pequena incisão no ápice da bexiga foi introduzido um catéter de polietileno (PE-50, Clay Adams, USA) com comprimento suficiente para que o extremo distal alcançasse o lúmen vesical. O catéter foi fixado à bexiga por meio de sutura realizada com fio de

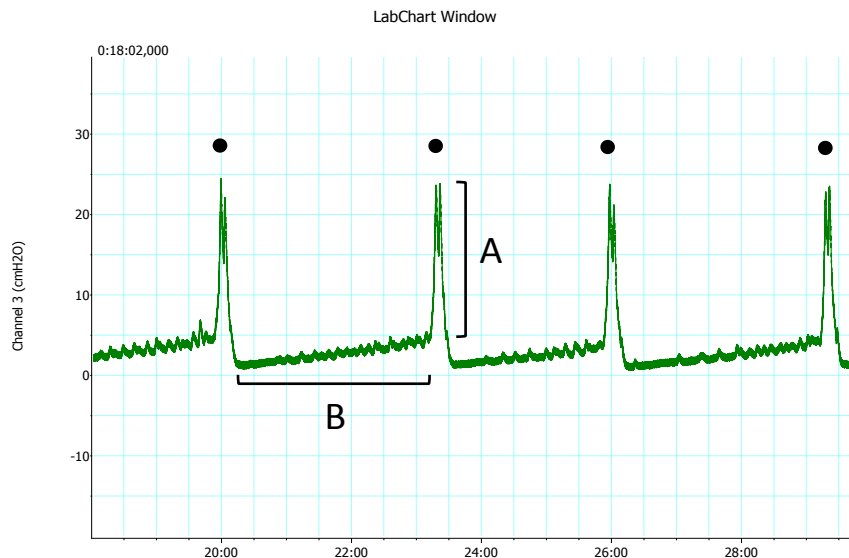
nylon 4-0 e a extremidade livre era exteriorizada pela região abdominal. A parede abdominal foi fechada em plano único com fio de algodão 3-0.

Os registros urodinâmicos foram realizados mediante a conexão do catéter exteriorizado a uma chave em T que se unia de forma linear a uma seringa pela qual era infundida solução salina continuamente e a um transdutor de pressão, por sua vez acoplado a um sistema de aquisição de sinais biológicos (PowerLab/8sp, ADInstruments<sup>®</sup>). Os registros foram gravados em um computador e analisados no programa Chart v 4.0 (ADInstruments<sup>®</sup>).

**FIGURA 16.** Sistema para análise de cistometrograma contínuo.



**FIGURA 17.** – Parâmetros avaliados na cistometrografia.



**Amplitude de contração** – intervalo A (cmH2O)  
**Pressão basal de enchimento** – Média dos valores de pressão do intervalo B (cmH2O)  
**Frequência de micção** – quantidade de eventos<sup>•</sup> associados ao esvaziamento/15min

### **5.9. Papel da amifostina na alteração dos parâmetros funcionais em tiras de bexigas de camundongos. Estudos “in ex vivo”.**

Esta série de experimentos foi totalmente realizada no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso sob a supervisão do Prof. Pedro Jorge Caldas Magalhães. Foram avaliadas bexigas de camundongos Swiss machos pesando entre 30 e 40g com cistite induzida por ifosfamida (400 mg/kg) injetada intraperitonealmente, bem como grupo de animais pré-tratados uma hora antes da indução da cistite com amifostina (50 mg/kg, *ip*).

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, após 12 horas da injeção da ifosfamida, suas bexigas foram dissecadas e transferidas para uma placa de Petri com solução nutritiva de Tyrode (composição em mM: NaCl= 136; KCl= 5; MgCl<sub>2</sub> = 0,98; CaCl<sub>2</sub> = 2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0,36; NaHCO<sub>3</sub> = 11,9; glicose= 5,5). Cada bexiga foi limpa de seus tecidos adjacentes e dividida em 2 pedaços de dimensões semelhantes que eram montados em câmaras de 5ml contendo solução de Tyrode, aerada continuamente e aquecida com bomba de circulação Haake FJ para manutenção da temperatura constante a 37°C.

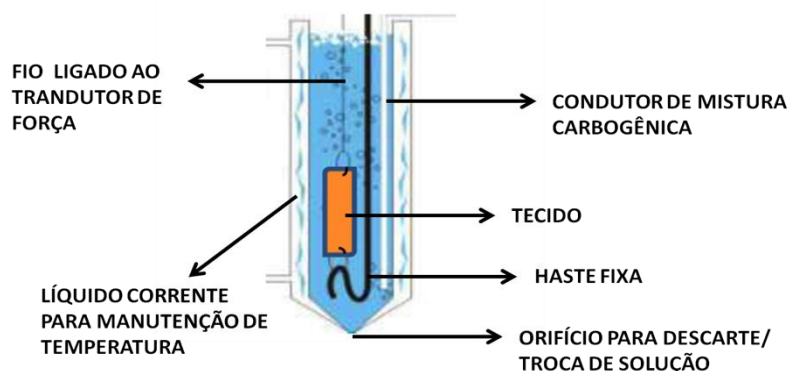
O sistema de registro isométrico consistiu de um amplificador Dataq (PM-1000, WCE, USA), ao qual foram conectados transdutores de força Grass, modelo FT03C (Quincy, Mass., EUA). O tempo de equilíbrio da preparação foi de 30 minutos e a tensão de repouso de 1 g.

As soluções com os fármacos foram preparadas pela adição da substância pura diretamente na solução fisiológica e armazenadas em freezer em concentrações 100 a 1000 vezes maiores que aquelas usadas na câmara durante os experimentos. As soluções dos constituintes que foram estudados eram frescas e agitadas em aparelho Vortex, imediatamente antes do uso. Para avaliar a viabilidade do tecido no início dos experimentos, as preparações foram expostas a soluções despolarizantes com 60 mM de K<sup>+</sup> até que fossem obtidas duas respostas de mesma amplitude (este período era de aproximadamente 30 a 60 minutos além do tempo necessário para o equilíbrio da preparação). A maior parte dos resultados apresentados será expressa como percentual da média destas duas últimas contrações.



Para a realização do estudo foram utilizados protocolos em que a contração foi induzida com K<sup>+</sup> e carbacol. As respostas experimentalmente observadas foram consideradas através das deflexões dos traçados originais obtidos pelo sistema de aquisição de dados e analisadas conforme cada situação apropriada, sendo então expressas em valores absolutos e valores percentuais em relação às respostas obtidas em períodos ou experimentos controle, conforme o tratamento especificado para cada protocolo experimental. Após a realização das curvas as tiras de bexiga foram pesadas em balança de precisão. A maior parte dos valores será dada pelas médias aritméticas  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), com a representação do número de observações experimentais (n). Alguns parâmetros, como os valores de concentração inibitória ou efetiva medianas (CI50 ou CE50, respectivamente) calculados por interpolação semi-logarítmica, foram expressos como a média geométrica e o intervalo de confiança 95%. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ , pela análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de múltipla comparação.

**FIGURA 18.** Detalhe da montagem da tira de bexiga para registro de contração “in ex vivo”



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso – UFC (Adaptado:Dissertação de Mestrado Lívia Talita Cajaseiras Mourão, 2013).

**FIGURA 19.** Sistema para registros de contração em tecido isolado.



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso – UFC.

### **5.10. PCR em Tempo Real:**

A cistite hemorrágica foi induzida com a administração intraperitoneal de ifosfamida, 400 mg/Kg. Um grupo de animais recebeu somente solução salina.

Todos os animais foram sacrificados após 12 horas e tiveram suas bexigas retiradas, homogeneizadas e preparadas para realização do ensaio de PCR em tempo real.

Os Primers para os genes CSE, CBS e  $\beta$ -actina foram projetados com base em sequências de RNAm obtidas a partir do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ensaio de PCR em tempo real foram realizadas em um volume final de 20  $\mu$ L contendo 10  $\mu$ L de supermix iQTM SYBR® Green, 2  $\mu$ L de cada primer (200 nM), 1  $\mu$ L de cDNA das

amostras e 5  $\mu$ L de água livre de RNAase. Controles negativos também foram testados, com o cDNA sendo substituídos por água livre de RNAase. Todas as amostras foram processadas em duplicata. As condições de PCR foram as seguintes: um período de desnaturação inicial a 95°C/7min, seguido por 45 ciclos de amplificação gênica. Cada ciclo consistiu de uma fase de desnaturação inicial a 95°C/20s, seguida por uma fase de anelamento a 60°C/20s e por fim uma fase de extensão a 72°C/45s. As amostras foram então submetidos a uma etapa de extensão a 72°C/3min. Para garantir a especificidade do produto de PCR, foi realizada a curva de Melting, após cada reação, em que a temperatura da reação foi posteriormente aumentada 0,5°C a cada 15s, com início na temperatura de anelamento de um primer e terminando em 95°C. Foi utilizada como gene de referência a  $\beta$ -actina. Todas as amplificações foram analisadas pelo sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch™ (Bio-Rad). A expressão gênica relativa foi determinada usando o método 2- $\Delta\Delta$ Ct (Livak).

### **5.11. Estudo da atividade uroprotetora do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S)**

#### **5.11.1. Efeito uroprotetor do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos : curva dose-resposta.**

Os camundongos foram tratados, por gavagem, com L-cisteína (precursor da síntese de H<sub>2</sub>S, 25, 50 ou 100 mg/Kg), administrada sozinha ou com DL-propargilglicina (inibidor da síntese de CSE, 100 mg/Kg) ou reagente de

Lawesson's (doador de  $H_2S$ , 9, 27 ou 81  $\mu\text{mol/Kg}$ ). Após quarenta minutos foi induzida cistite hemorrágica com a administração de Ifosfamida 400 mg/Kg intraperitonealmente. Tanto a L-cisteína como o reagente de Lawesson foram novamente administrados após 6 horas da ifosfamida. Os grupos controles receberam somente solução salina ou solução salina + ifosfamida. Os animais foram sacrificados após 12 horas por deslocamento cervical e as bexigas cuidadosamente dissecadas, retiradas, pesadas, homogeneizadas ou fixadas e incluídas posteriormente em parafina a fim de serem submetidas a análise dos efeitos das drogas na cistite hemorrágica, através do Peso Úmido vesical (PUV), permeabilidade vascular (PV) e análises macroscópicas e microscópicas, conforme já descrito anteriormente.

#### **5.11.2. Efeito do sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos**

A atividade de mieloperoxidase (MPO), é utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado, esta trata-se de uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos. Sua presença foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de placas. As bexigas dos animais, que receberam solução salina, ifosfamida (400mg/Kg, *ip*) ou que foram prétratados com doses crescente de precursor de  $H_2S$ , L-cisteína (25, 50 e 100 mg/Kg, *vo*) ou doador de  $H_2S$ , reagente de Lawesson (9, 27 e 81 mg/Kg, *vo*), após 12 horas da indução da cistite, foram coletadas e incubadas em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50mg de

tecido por mL, homogeneizadas e centrifugadas (1500 g/15 min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um eppendorf e novamente centrifugado (10min) para melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 7µL do sobrenadante (placas de 96 wells), 200 µL da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H<sub>2</sub>O) foram adicionados e lidos a 460nm (t<sub>0</sub>=0 min e t<sub>1</sub>=1 min). A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de mieloperoxidase e expressa em termos de atividade de MPO (U/mg de tecido) (BRADLEY et al., 1982).

### **5.11.3. Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>) no efeito uroprotetor do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S)**

Para avaliar a participação dos canais de potássio ATP-dependentes no efeito uroprotetor do precursor do H<sub>2</sub>S, a L-cisteína, ou do doador de H<sub>2</sub>S, o reagente de Lawesson, os camundongos foram pré tratados, por via intraperitoneal, com glibenclamida ( droga bloqueadora seletiva dos canais de potássio ATP dependentes) na dose de 10 mg/Kg. Após 1 hora os animais receberam vo, por gavagem, L-cisteína (50 mg/Kg), ou reagente de Lawesson ( 27 µmol/Kg). Quarenta minutos depois os animais receberam 400 mg/Kg, *ip*, para indução da cistite hemorrágica, as doses da L-cisteína e do reagente de Lawesson, que foram repetidas após 6 horas da ifosfamida. Os grupos controles receberam somente solução salina, solução salina + ifosfamida ou ainda outro

grupo controle recebeu somente glibenclamida, 10 mg/Kg + ifosfamida, sem L-cisteína ou reagente de Lawesson. A uroproteção foi avaliada através do Peso úmido vesical e permeabilidade vascular, conforme já descrito anteriormente.

#### **5.11.4. Avaliação do efeito do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na contralilidade de tiras de bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**

Foram avaliadas bexigas de camundongos Swiss machos pesando entre 30 e 40g com cistite induzida por ifosfamida (400 mg/kg) injetada intraperitonealmente, bem como grupo de animais pré-tratados quarenta minutos antes da indução da cistite por gavagem, com L-cisteína (50 mg/Kg), ou reagente de Lawesson ( 27 µmol/Kg).

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, após 12 horas da injeção da ifosfamida, suas bexigas foram dissecadas e transferidas para uma placa de Petri com solução nutritiva de Tyrode (composição em mM: NaCl= 136; KCl= 5; MgCl<sub>2</sub> = 0,98; CaCl<sub>2</sub> = 2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0,36; NaHCO<sub>3</sub> = 11,9; glicose= 5,5). Cada bexiga foi limpa de seus tecidos adjacentes e dividida em 2 pedaços de dimensões semelhantes que eram montados em câmaras de 5ml contendo solução de Tyrode, aerada continuamente e aquecida com bomba de circulação Haake FJ para manutenção da temperatura constante a 37°C.

O sistema de registro isométrico consistiu de um amplificador Dataq (PM-1000, WCE, USA), ao qual foram conectados transdutores de força Grass, modelo FT03C (Quincy, Mass., EUA). O tempo de equilíbrio da preparação foi de 30 minutos e a tensão de repouso de 1 g.

As soluções com os fármacos foram preparadas pela adição da substância pura diretamente na solução fisiológica e armazenadas em freezer em concentrações 100 a 1000 vezes maiores que aquelas usadas na câmara durante os experimentos. As soluções dos constituintes que foram estudados eram frescas e agitadas em aparelho Vortex, imediatamente antes do uso. Para avaliar a viabilidade do tecido no início dos experimentos, as preparações foram expostas a soluções despolarizantes com 60 mM de K<sup>+</sup> até que fossem obtidas duas respostas de mesma amplitude (este período era de aproximadamente 30 a 60 minutos além do tempo necessário para o equilíbrio da preparação). A maior parte dos resultados apresentados será expressa como percentual da média destas duas últimas contrações.

Para a realização do estudo foi utilizado protocolo em que a contração foi induzida co carbacol. As respostas experimentalmente observadas foram consideradas através das deflexões dos traçados originais obtidos pelo sistema de aquisição de dados e analisadas conforme cada situação apropriada, sendo então expressas em valores absolutos e valores percentuais em relação às respostas obtidas em períodos ou experimentos controle, conforme o tratamento especificado para cada protocolo experimental. Após a realização das curvas as tiras de bexigas foram pesadas em balança de precisão. A maior parte

dos valores será dada pelas médias aritméticas  $\pm$  erro padrão da média (EPM), com a representação do número de observações experimentais (n). Alguns parâmetros, como os valores de concentração inibitória ou efetiva medianas (CI50 ou CE50, respectivamente) calculados por interpolação semi-logarítmica, foram expressos como a média geométrica e o intervalo de confiança 95%. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ , pela análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de múltipla comparação.

## 6. Análise Estatística

Foi utilizado, para confecção dos gráficos e análises estatísticas, o programa GraphPad Prism 6. Os dados estão expressos com Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) (variáveis com distribuição normal) ou mediana (mínimo e máximo) para variáveis sem distribuição normal. Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. Para os dados não paramétricos foram aplicados o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido de Dunns.

A análise dos resultados da imunoistoquímica valorizou uma abordagem qualitativa, levando em consideração o número de células marcadas e a intensidade da marcação, sendo realizada uma amostra selecionada dos grupos a partir do escore microscópico da lesão que se aproximasse do escore mediano do grupo.

Para todas as análises foi considerado significativo  $p < 0,05$ .



## **RESULTADOS**

### III. RESULTADOS

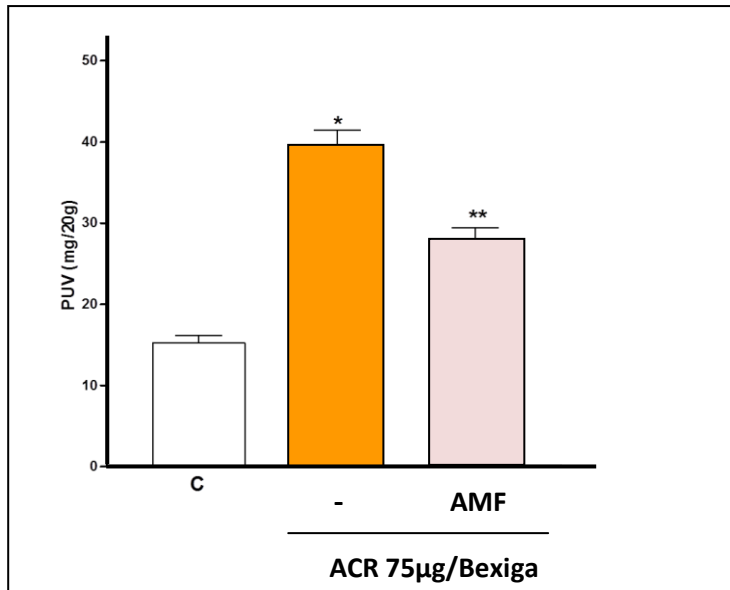
#### **1. Efeito da amifostina na cistite hemorrágica induzida por acroleína e ifosfamida em camundongos - Avaliação da variação do Peso úmido Vesical – Análises macroscópica e Histológica**

A injeção intravesical de acroleína (75µg/ Bexiga) bem como o tratamento dos animais com ifosfamida (400 mg/kg, *ip*) induziu um aumento do peso úmido vesical avaliado após 3 e 12 horas, respectivamente. O pré-tratamento dos animais com amifostina *ip*, na dose de 50 mg/Kg, reduziu este aumento, o que foi estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ). (FIGURAS 20; 22)

As análises macroscópicas evidenciaram que as bexigas dos camundongos tratados com amifostina apresentaram-se com edema e hemorragia mais discretos, sendo estes estatisticamente diferentes dos animais que desenvolveram cistite hemorrágica pela acroleína ou pela ifosfamida, analisados no mesmo tempo ( $p < 0,05$ ). (FIGURAS 21; 23) Os escores macroscópicos estão representados nas TABELAS 2 e 3.

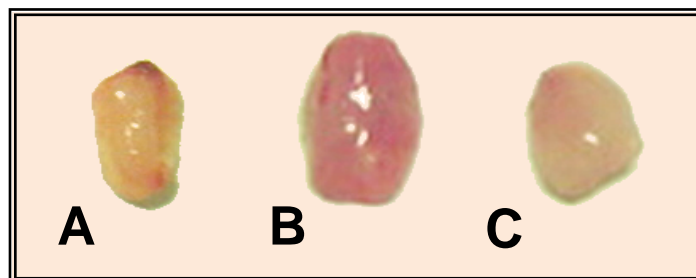
Na avaliação histopatológica, os animais que receberam AMF apresentaram bexigas com hemorragia, edema e infiltrados leucocitários menores do que os controles lesão, que receberam somente injeção *ive* de ACR ou que foram tratados somente com IFO, isto examinados após 3 e 12 horas, respectivamente, sendo esta inibição estatisticamente significativa (FIGURA 24) e demonstrado nas TABELAS 2 e 3.

**FIGURA 20. Efeito do tratamento com amifostina na variação do Peso Úmido Vesical induzido pela injeção intravesical de acroleína-3horas**



As barras representam a média  $\pm$  EPM do Peso Úmido Vesical de animais que receberam apenas acroleína (75 $\mu$ g) ou que foram tratados com amifostina, por via *ip* (50 mg/Kg) 1 hora antes da indução da cistite. Os animais foram sacrificados após 3 horas da injeção da ACR. ( \*) representa diferença estatisticamente significativa quando comparadas com o grupo controle ( C ) , que recebeu salina *ive* e ( \*\* ) quando comparadas ao grupo que recebeu apenas ACR.  $p < 0,05$  ( ANOVA , teste de Bonferroni )

**FIGURA 21. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) nas alterações macroscópicas induzidas pela injeção intravesical de acroleína 75 $\mu$ g avaliado após 3 horas.**



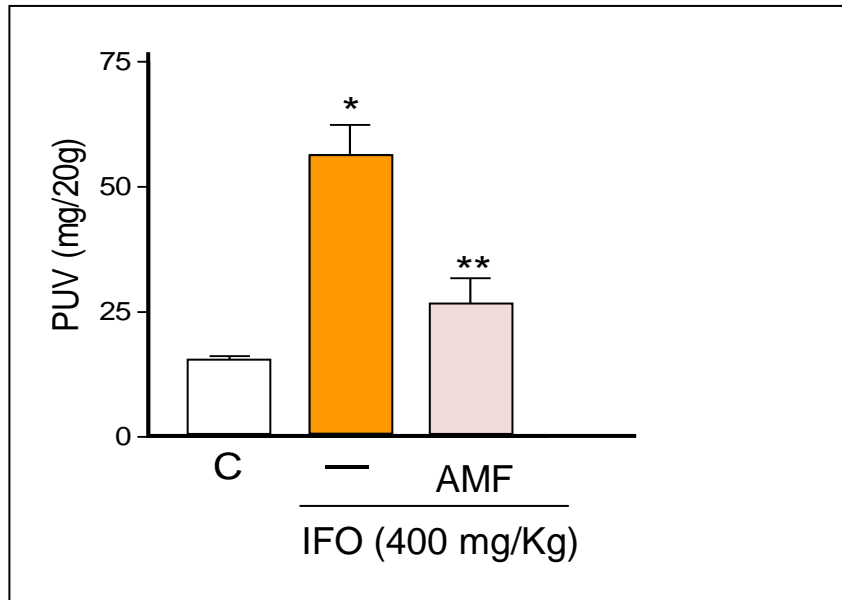
(A) Controle; (B) ACR 75 $\mu$ g *ive* ; (C) AMF+ ACR.

**TABELA 2 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da amifostina (AMF) na cistite hemorrágica induzida pela administração (*ive*) da acroleína (ACR) avaliadas após 3 horas**

<b>Grupos</b>	<b>Análise macroscópica (Edema)</b>	<b>Análise macroscópica (Hemorragia)</b>	<b>Análise Microscópica</b>
<b>C</b>	<b>0 (0-0)</b>	<b>0 (0-0)</b>	<b>0 (0-0)</b>
<b>ACR 75 µg</b>	<b>2(2-3)*</b>	<b>3(2-3)*</b>	<b>2(1-2)*</b>
<b>AMF</b>	<b>1(1-2)**</b>	<b>1(0-2)**</b>	<b>1(1-2)**</b>

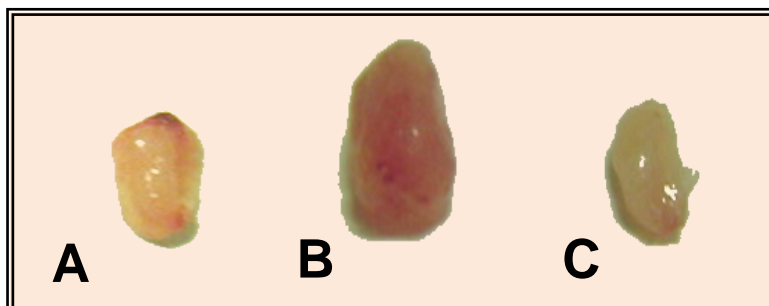
A injeção de 75µg de ACR *ive* induziu a cistite hemorrágica com alterações macroscópicas e histológicas que foram estatisticamente diferentes do controle (C), que recebeu solução salina, quando analisadas após 3 horas. As alterações vesicais induzidas pela ACR foram inibidas, significativamente, pelo tratamento com a amifostina (50 mg/Kg, *ip*). Os dados desta tabela estão relatados como medianas e variações (n=6). \* p< 0,05 em relação ao grupo controle (C) e \*\* p< 0,05 em relação ao grupo tratado apenas com ACR, pelo teste de Kruskal Wallis (seguido de Dunns).

**FIGURA 22. Efeito da amifostina (AMF) nas variações do Peso Úmido Vesical de animais tratados com ifosfamida (IFO).**



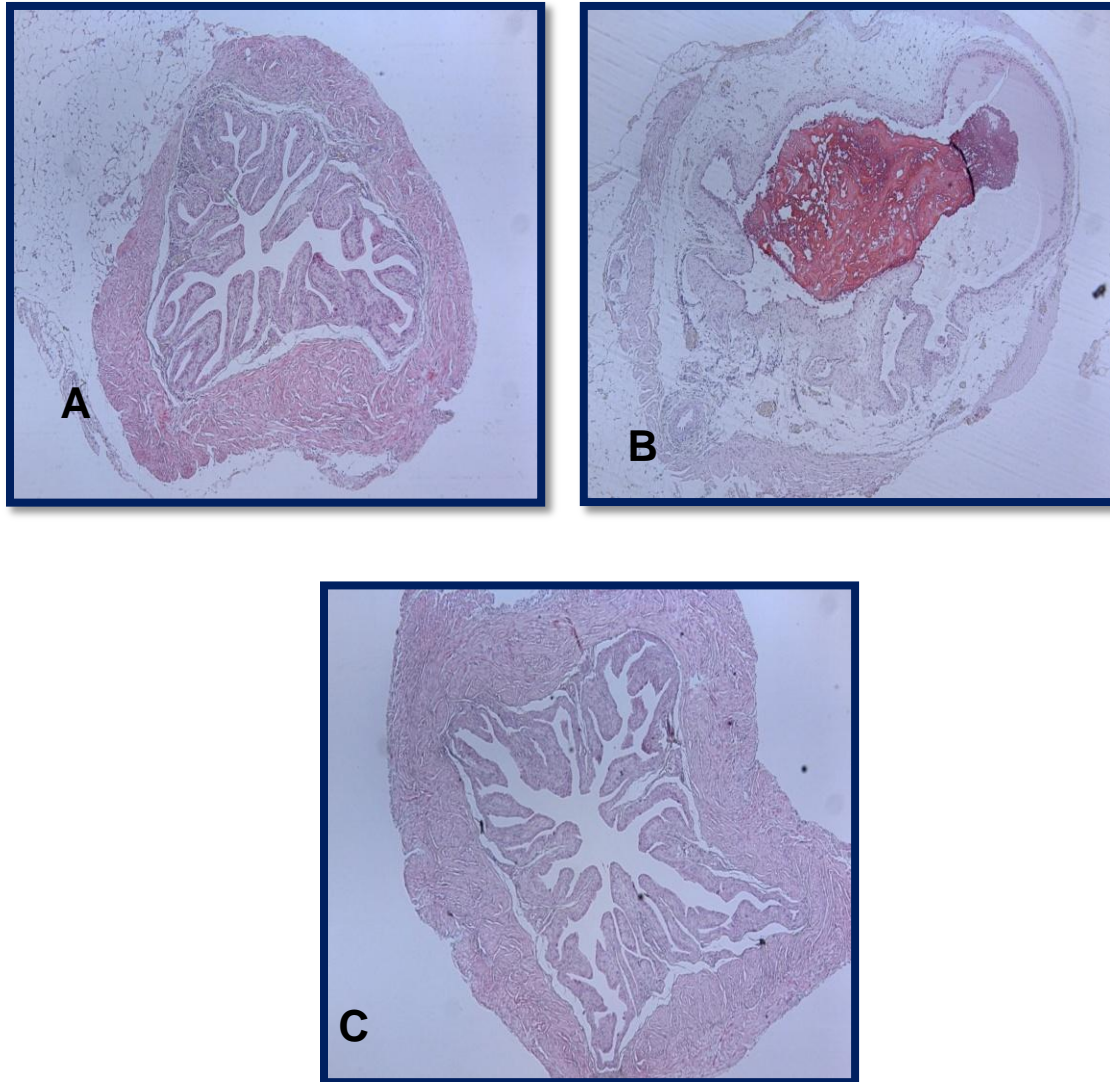
A amifostina foi administrada na dose 50 mg /Kg de peso, por via *ip*, 1 hora antes da ifosfamida (400 mg/Kg *ip*). Os animais foram sacrificados após 12 horas. As barras representam médias  $\pm$  EPM referentes a seis animais cada grupo. ( \* ) e ( \*\* ) indicam respectivamente diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle (C), que recebeu apenas salina *ip*, e em relação ao grupo que recebeu apenas IFO, com  $p < 0,05$ . ( ANOVA, teste de Bonferroni )

**FIGURA 23. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) nas alterações macroscópicas induzidas por ifosfamida (IFO).**



(A) Bexiga Controle; (B) IFO 400mg/kg; (C) AMF 50mg/kg + IFO.

**FIGURA 24. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) nas alterações histopatológicas induzidas por ifosfamida (IFO).**



(A) Bexiga Controle; (B) IFO 400mg/kg; (C) AMF 50mg/kg + IFO. 40x. Coloração HE.

**TABELA 3 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da administração de amifostina (AMF) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (IFO) em camundongos.**

<b>Grupos</b>	<b>Análise Macroscópica (Edema)</b>	<b>Análise Macroscópica (Hemorragia)</b>	<b>Análise Microscópica</b>
<b>C</b>	<b>0 ( 0 – 0 )</b>	<b>0 ( 0 – 0 )</b>	<b>0 ( 0 – 0 )</b>
<b>IFO</b>	<b>3 ( 3 – 3 ) *</b>	<b>2 ( 2 – 3 ) *</b>	<b>2 ( 2 – 2 ) *</b>
<b>AMF 50</b>	<b>0 ( 0 – 1 ) **</b>	<b>0 ( 0 – 1 ) **</b>	<b>0 ( 0 – 1 ) **</b>

A IFO (400 mg/Kg *ip*) induziu a alterações macro e microscópicas, que, avaliadas 12 h após sua administração, foram estatisticamente diferentes do grupo que recebeu salina *ip* (C). Em todos os animais que receberam AMF, houve inibição dos achados macroscópicos, de maneira significativa. Os resultados estão reportados por medianas e variações (n=6). \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (C) e \*\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo tratado somente com ifosfamida, utilizando-se o teste de Kruskal Wallis (seguido de Dunns).

## **2. Avaliação da possível interação entre os compostos acroleína e amifostina, via métodos de química computacional.**

Previamente, foram avaliados os mecanismos de reação já conhecidos para a acroleína e não foram encontrados mecanismos nos quais a amifostina, somente avaliando sua composição química, se enquadraria já de antemão.

As estruturas dos compostos, cálculo dos momentos dipolo, das energias e formatos dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO são apresentados na TABELA 4.

As duas moléculas são polares e um alinhamento entre seu momentos de dipolo pode levar à interação entre os grupos amina da amifostina e o átomo de oxigênio da acroleína. Esta aproximação entre as moléculas induziria à formação de uma ligação de hidrogênio (antigamente conhecida como “ponte” de hidrogênio) entre os dois compostos.

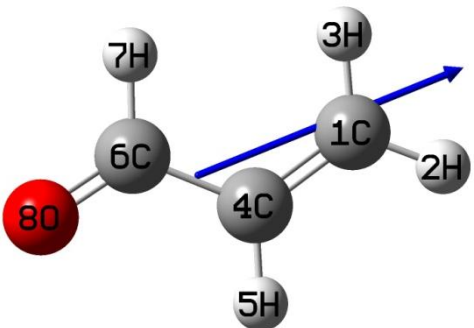
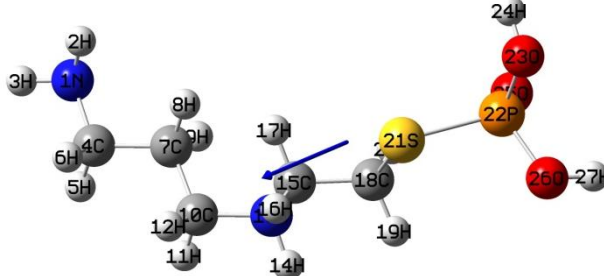

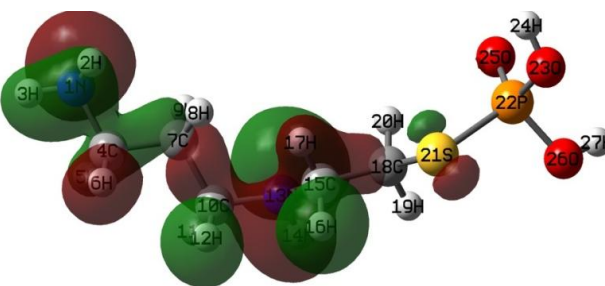
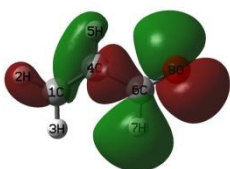
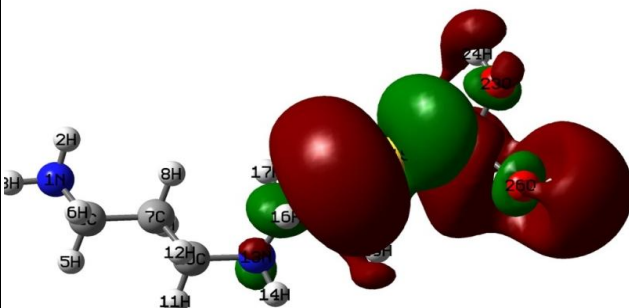
A análise dos orbitais de fronteira indica que, uma vez que o LUMO da acroleína tem energia bem mais negativa do que o LUMO da amifostina, e num processo de excitação eletrônica, seria possível a transferência de um elétron da amifostina para a acroleína. Tanto o HOMO quanto o LUMO da acroleína contam com grande participação do oxigênio.

Já na amifostina esses orbitais concentram-se em lados opostos da molécula. Numa possível ligação de hidrogênio entre as moléculas, justamente os átomos que participam do HOMO da amifostina, estariam interagindo com a acroleína, favorecendo a transferência de carga entre as moléculas.



Dessa forma, a redução da acroleína poderia ocorrer. A reação de adição também parece ser possível, já que a amifostina apresenta um caráter mais nucleófilo e a acroleína eletrófilo.

**TABELA 4: Possível interação entre os compostos acroleína e amifostina, via métodos de química computacional.**

	Acroleína	Amifostina
Dipolo (Debye)	 <p>3,1487</p>	 <p>2,2190</p>
Energia de HOMO (u.a.)	-0,26492	-0,23198
Superfície HOMO		
Energia de LUMO (u.a.)	-0,07345	-0,00742
Superfície de LUMO		

### **3. Avaliação do efeito da amifostina na imunexpressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1) e das enzimas (NOS-i e COX-2), na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**

Na Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*) houve aumento da expressão de citocinas e mediadores inflamatórios (TNF-  $\alpha$ , IL-1 e NOS-i) de maneira semelhante nos tecidos epitelial e conjuntivo, com exceção da expressão da COX-2, que se mostrou aumentada apenas no tecido conjuntivo.

O tratamento prévio com amifostina (50 mg/Kg, *ip*) mostrou-se capaz de inibir o aumento da expressão de mediadores e citocinas inflamatórias induzidas pela ifosfamida.

#### **3.1. Avaliação do efeito da amifostina na imunexpressão da enzima Óxido Nítrico-sintase-induzida (NOS-i) na Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**

A FIGURA 25 mostra, através de microscopia óptica, o aumento da imunexpressão da enzima Óxido Nítrico-sintase-induzida (NOS-i) nas bexigas dos animais que receberam tratamento com ifosfamida, bem como o efeito da amifostina na inibição deste efeito.

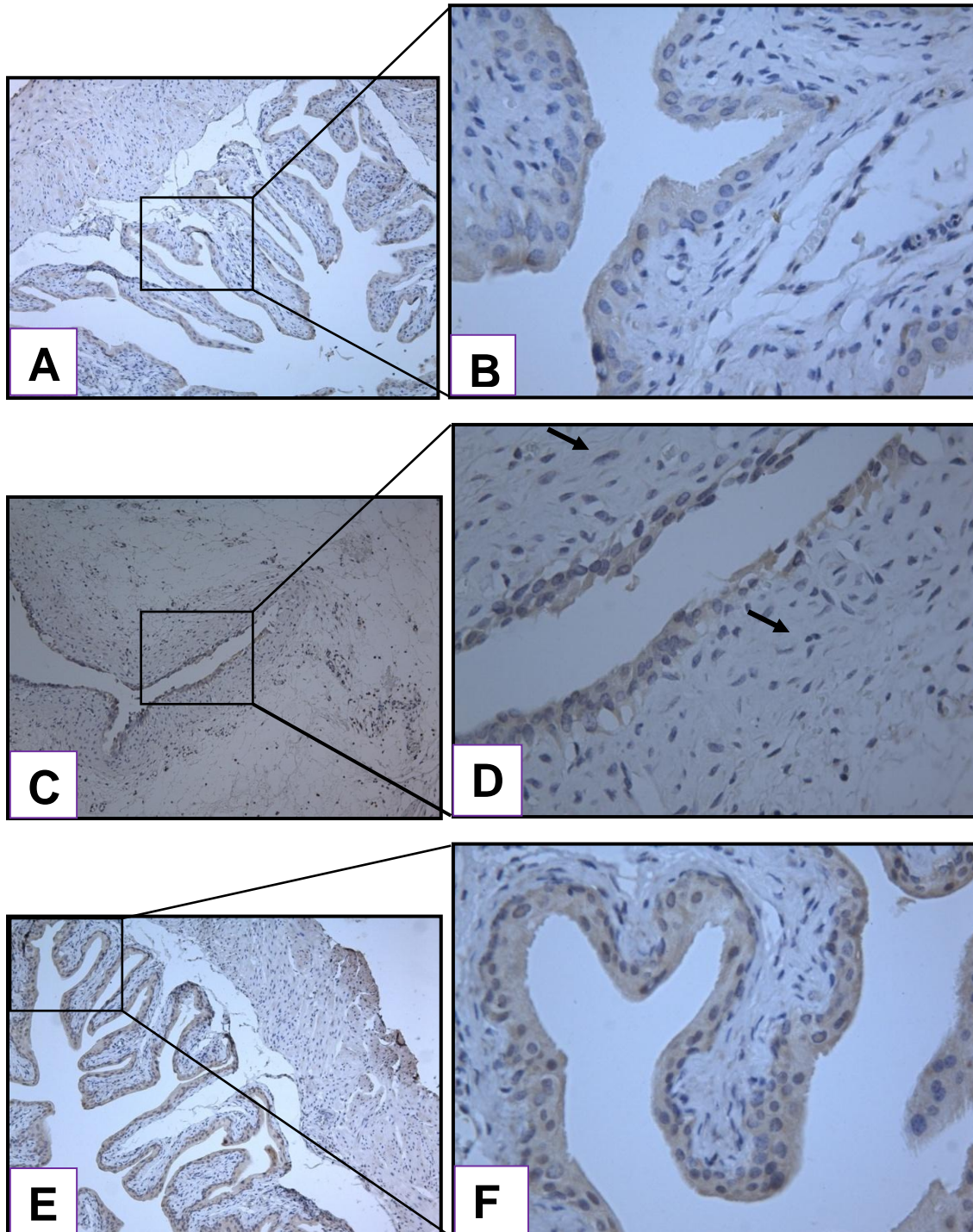
Os escores desta análise estão mostrados na TABELA 5.

**TABELA 5 – Análise semiquantitativa, baseada em escores, do efeito da amifostina sobre a imunexpressão da enzima Óxido-Nítrico-Sintase induzida (NOS-i) em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida:**

<b>Grupos</b>	<b>Epitélio</b>	<b>Conjuntivo</b>
<b>Salina</b>	<b>1 (1 -1)</b>	<b>1 (1 -1)</b>
<b>IFO</b>	<b>2 (2 – 2)<sup>#</sup></b>	<b>2 (2- 2)<sup>#</sup></b>
<b>AMF + IFO</b>	<b>1 (1 – 1)<sup>*</sup></b>	<b>0 (0 – 0)<sup>*</sup></b>

A administração de amifostina (50 mg/Kg, *ip*) inibiu, significativamente, o aumento da expressão da enzima Óxido-Nítrico-Sintase induzida (NOS-i) em bexigas de camundongos induzido pelo tratamento com ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*) , por imunohistoquímica. <sup>#</sup>p<0,05 em relação ao grupo salina; \* p< 0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO, pelo teste de Kruskal Wallis (seguido de Dunns).

**FIGURA 25. Amifostina inibe aumento da expressão da enzima Óxido-Nítrico-Sintase induzida (NOS-i) em bexigas de camundongos por imunohistoquímica.**



**(A)** Salina *ip* 100x; **(B)** Salina *ip* 400x; **(C)** IFO *ip* 100x; **(D)** IFO *ip* 400x; **(E)** AMF + IFO *ip* 100x; **(F)** AMF + IFO *ip* 400x. → Células com forte marcação pelo cromógeno.

### **3.2. Avaliação do efeito da amifostina na imunexpressão da enzima Ciclooxigenase-2 (COX-2) na Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**

Os animais que foram tratados com ifosfamida apresentaram aumento da expressão da enzima Ciclooxigenase-2 (COX-2) em relação aos camundongos que receberam somente solução salina. O pré tratamento destes animais com amifostina se demonstrou capaz de inibir este aumento da expressão (FIGURA 26). A imunomarcção para COX-2 foi detectada apenas no tecido conjuntivo.

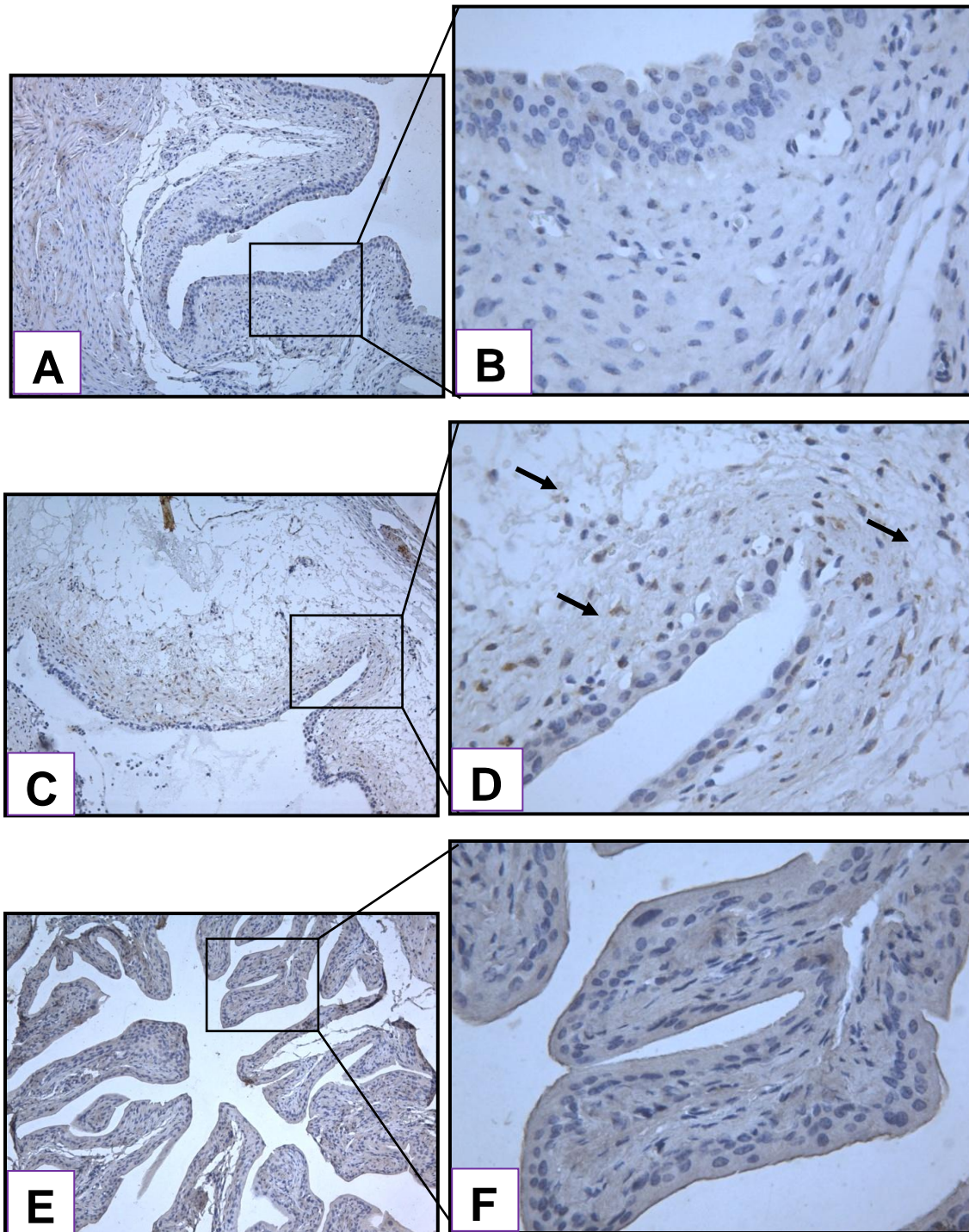
A TABELA 6 exibe os escores desta análise.

**TABELA 6 – Análise semiquantitativa, baseada em escores, do efeito da amifostina na imunexpressão da enzima Ciclooxigenase-2 (COX-2) em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida:**

<b>Grupos</b>	<b>Epitélio</b>	<b>Conjuntivo</b>
<b>Salina</b>	<b>0 (0 – 0)</b>	<b>0 (0 – 0)</b>
<b>IFO</b>	<b>0 (0 – 0)</b>	<b>2 (2 -2)<sup>#</sup></b>
<b>AMF + IFO</b>	<b>0 (0 – 0)</b>	<b>0 (0 – 0)<sup>*</sup></b>

A administração de ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*) induziu o aumento da expressão da enzima Ciclooxigenase-2 (COX-2) no tecido conjuntivo de bexigas de camundongos, por imunohistoquímica. A amifostina (50 mg/Kg, *ip*) inibiu, de modo significativo, este aumento de expressão. <sup>#</sup> $p < 0,05$  versus grupo salina. <sup>\*</sup> $p < 0,05$  em relação ao grupo tratado apenas com IFO, pelo teste de Kruskal Wallis (seguido de Dunns).

**FIGURA 26. Amifostina inibe aumento da expressão da enzima Cicloxigenase 2 (COX-2) em bexigas de camundongos por imunohistoquímica.**



**(A)** Salina *ip* 100x; **(B)** Salina *ip* 400x; **(C)** IFO *ip* 100x; **(D)** IFO *ip* 400x; **(E)** AMF + IFO *ip* 100x; **(F)** AMF + IFO *ip* 400x. → Células com forte marcação pelo cromógeno.

### **3.3. Avaliação do efeito da amifostina na imunoexpressão da citocina Fator de Necrose tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) na Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**

As bexigas de camundongos com Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*) apresentaram intensa marcação, demonstrando grande expressão do Fator de Necrose tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) no epitélio e tecido conjuntivo quando comparado as bexigas de animais controle. Os animais tratados com amifostina (50 mg/Kg, *ip*) não expressaram a citocina em suas bexigas, conforme podemos observar na FIGURA 27 e na TABELA 7.

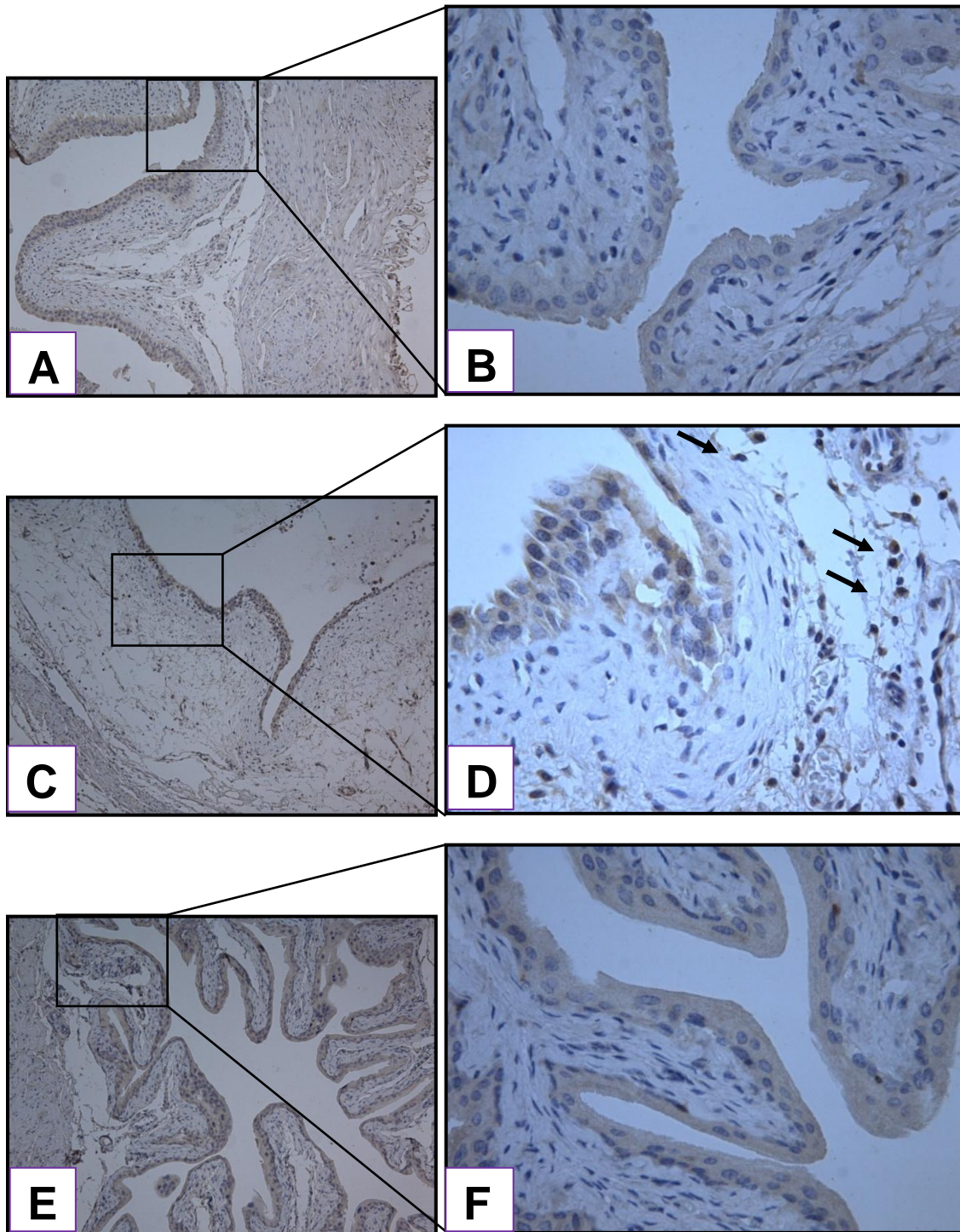
**TABELA 7 – Análise semiquantitativa, baseada em escores, do efeito da amifostina na expressão da citocina Fator de Necrose tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida:**

<b>Grupos</b>	<b>Epitélio</b>	<b>Conjuntivo</b>
<b>Salina</b>	<b>0 (0 – 0)</b>	<b>0 (0 – 0)</b>
<b>IFO</b>	<b>3 (3 – 3)<sup>#</sup></b>	<b>3 (3 – 3)<sup>#</sup></b>
<b>AMF + IFO</b>	<b>0 (0 – 0)<sup>*</sup></b>	<b>0 (0 – 0)<sup>*</sup></b>

A administração de ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*) induziu a importante expressão da citocina Fator de Necrose tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) no tecido epitelial e conjuntivo de bexigas de camundongos, por imunohistoquímica. A amifostina (50 mg/Kg, *ip*) inibiu este aumento de expressão, significativamente. <sup>#</sup> $p < 0,05$  versus salina. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo tratado apenas com IFO, pelo teste de Kruskal Wallis (seguido de Dunns).



**FIGURA 27. Amifostina inibe aumento da expressão da citocina Fator de Necrose tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) em bexigas de camundongos por imunohistoquímica.**



**(A)** Salina *ip* 100x; **(B)** Salina *ip* 400x; **(C)** IFO *ip* 100x; **(D)** IFO *ip* 400x; **(E)** AMF + IFO *ip* 100x; **(F)** AMF + IFO *ip* 400x. → Células com forte marcação pelo cromógeno.

### **3.4. Avaliação do efeito da amifostina na imunexpressão da citocina Interleucina-1 (IL-1) na Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**

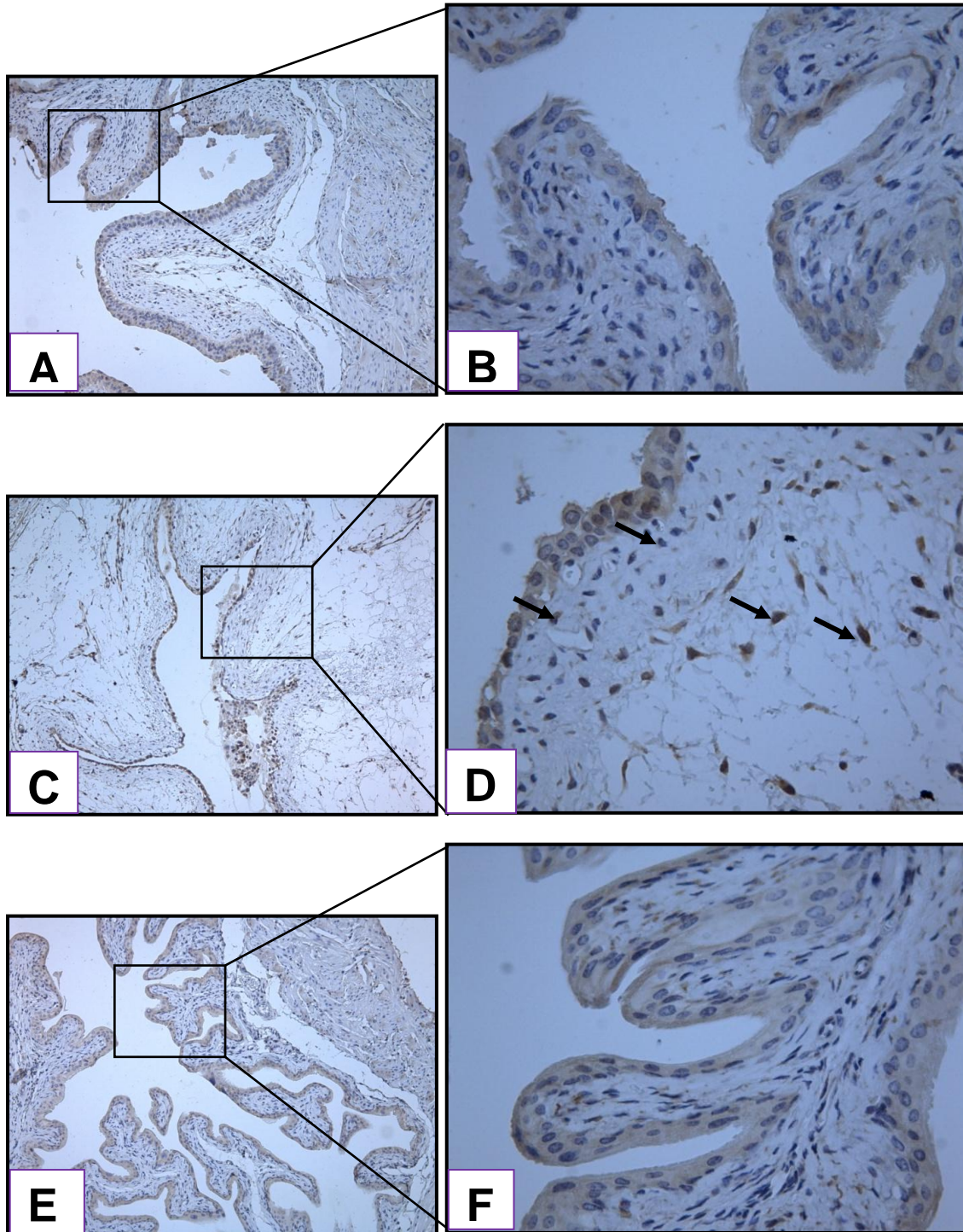
A FIGURA 28 demonstra que o tratamento de animais com amifostina (50 mg/Kg, *ip*) inibiu o aumento da expressão da citocina Interleucina-1 (IL-1) evidenciado tanto no epitélio como tecido conjuntivo de bexigas de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*). Os escores desta análise estão na TABELA 8.

**TABELA 8 – Análise semiquantitativa, baseada em escores, do efeito da amifostina na expressão da citocina Interleucina-1 (IL-1) em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida por imunohistoquímica :**

<b>Grupos</b>	<b>Epitélio</b>	<b>Conjuntivo</b>
<b>Salina</b>	<b>1 (1 – 1)</b>	<b>1 (1 – 1)</b>
<b>IFO</b>	<b>3 (3 – 3)<sup>#</sup></b>	<b>3 (3 – 3)<sup>#</sup></b>
<b>AMF + IFO</b>	<b>1 (1 – 1)<sup>*</sup></b>	<b>1 (1 – 1)<sup>*</sup></b>

A amifostina (50 mg/Kg, *ip*) inibiu, de maneira significativa o aumento da expressão da citocina Interleucina-1 (IL-1) no tecido epitelial e conjuntivo de bexigas de camundongos, induzido pela administração de ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*) , por imunohistoquímica. <sup>#</sup>p<0,05 versus salina; \* p< 0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO, pelo teste de Kruskal Wallis (seguido de Dunns).

**FIGURA 30. Amifostina inibe aumento da expressão da citocina Interleucina-1 (IL-1) em bexigas de camundongos por imunohistoquímica.**

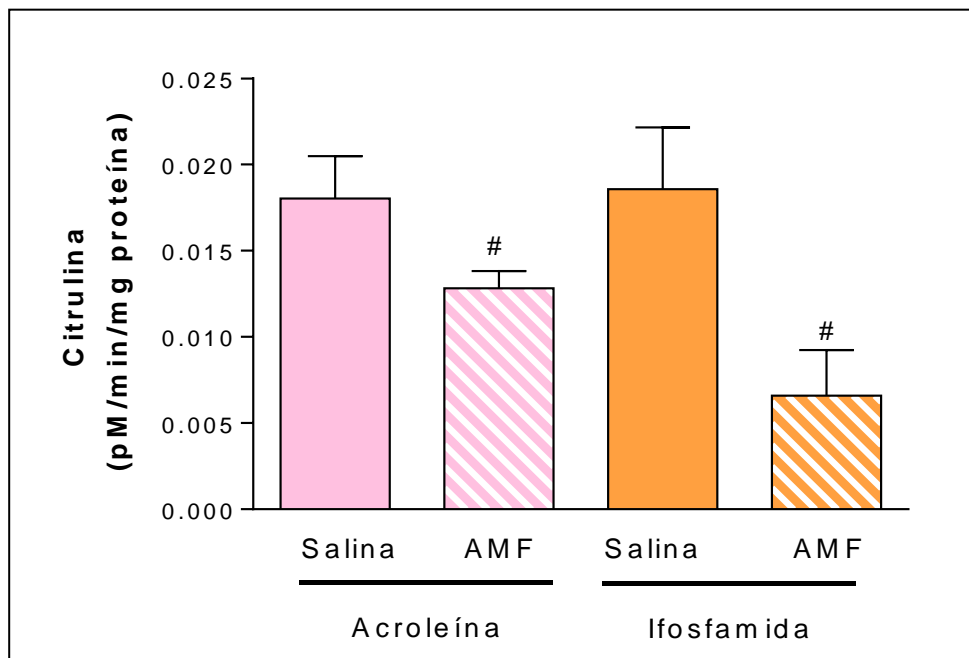


**(A)** Salina *ip* 100x; **(B)** Salina *ip* 400x; **(C)** IFO *ip* 100x; **(D)** IFO *ip* 400x; **(E)** AMF + IFO *ip* 100x; **(F)** AMF + IFO *ip* 400x. → Células com forte marcação pelo cromógeno.

#### **4. Avaliação do efeito da amifostina na atividade da enzima Óxido Nítrico-sintase-induzida (NOS-i) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**

A amifostina (50 mg/Kg, *ip*) reduziu a atividade da enzima NOSi induzida, em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*), conforme podemos observar na FIGURA 29.

**FIGURA 29. Efeito da amifostina no aumento da atividade da NOSi induzida pela acroleína e pela ifosfamida.**



A amifostina (50 mg/Kg, *ip*) reduziu a atividade da enzima NOSi induzida, em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*). #  $p < 0,05$  em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida.

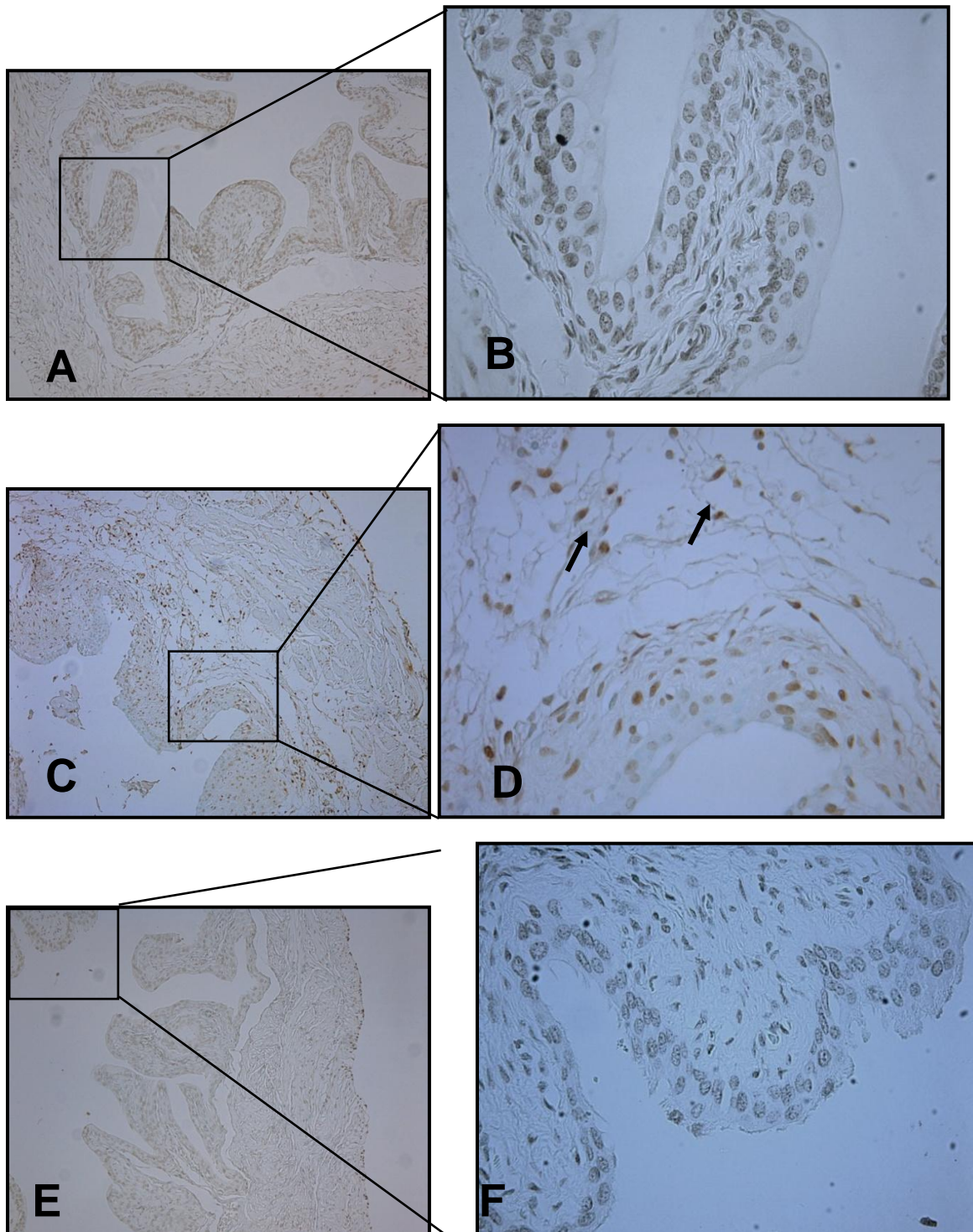
**5. Ação da ifosfamida na indução de apoptose em bexigas de camundongos. Efeito uroprotetor da Amifostina. Técnica de imunohistoquímica – TUNEL (TdT – mediated dUTP nick and labeling)**

Evidenciamos coloração castanha, indicativa de apoptose, nas células das bexigas dos animais tratados com ifosfamida (400 mg/Kg *ip*) e sacrificados após 12 horas. Esta marcação foi mais intensa no epitélio vesical e lâmina própria (setas, FIGURA 30 C - D). Nas células dos animais controle, tratados somente com solução salina *ip*, não evidenciamos a coloração castanha característica de morte celular, mas apenas a coloração esverdeada do contracolorante (*metyl Green*) (FIGURA 30 A - D)

O pré tratamento com amifostina (50mg/kg *ip*) inibiu a marcação característica de apoptose nas células das bexigas dos animais tratados com ifosfamida (400 mg/kg, *ip*) (FIGURA 30 E - F).

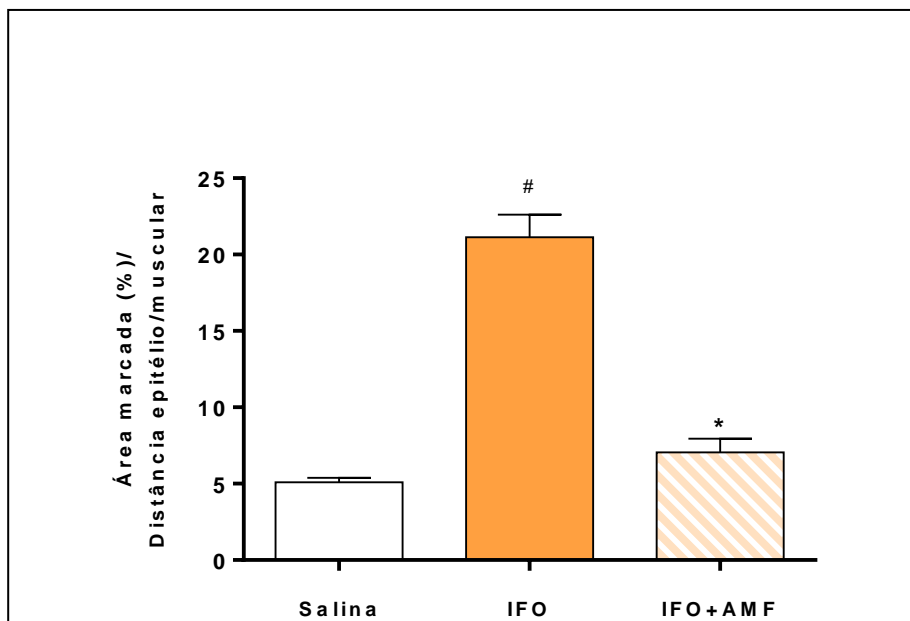
A quantificação desses achados está expressa na FIGURA 31.

**FIGURA 30: Análise histomorfométrica, após imunistoquímica pela técnica do TUNEL.**



**A** (100x); **B** (400x): Salina, não se evidencia coloração castanha indicativa de morte celular; **C** (100x); **D** (400x): IFO (400mg/kg, *ip*) A coloração castanha indica morte celular. **E** (100x); **F** (400x): AMF (50 mg/Kg *ip*) 1 hora antes da indução de cistite hemorrágica por IFO (400 mg/kg, *ip*). Não evidenciamos a marcação castanha

**FIGURA 31: Efeito da amifostina na imunomarcção, pela técnica do TUNEL, nas bexigas de animais tratados com ifosfamida.**



A amifostina (AMF) inibiu de modo significativo a imunomarcção, em bexigas de camundongos, induzida pela ifosfamida (IFO). # $p < 0,05$  versus salina; \* $p < 0,05$  versus ifosfamida

**6. Ação da acroleína na indução de apoptose em bexigas de camundongos.**  
**Efeito uroprotetor da amifostina. Técnica de imunistoquímica – TUNEL**  
**(TdT – mediated dUTP nick and labeling)**

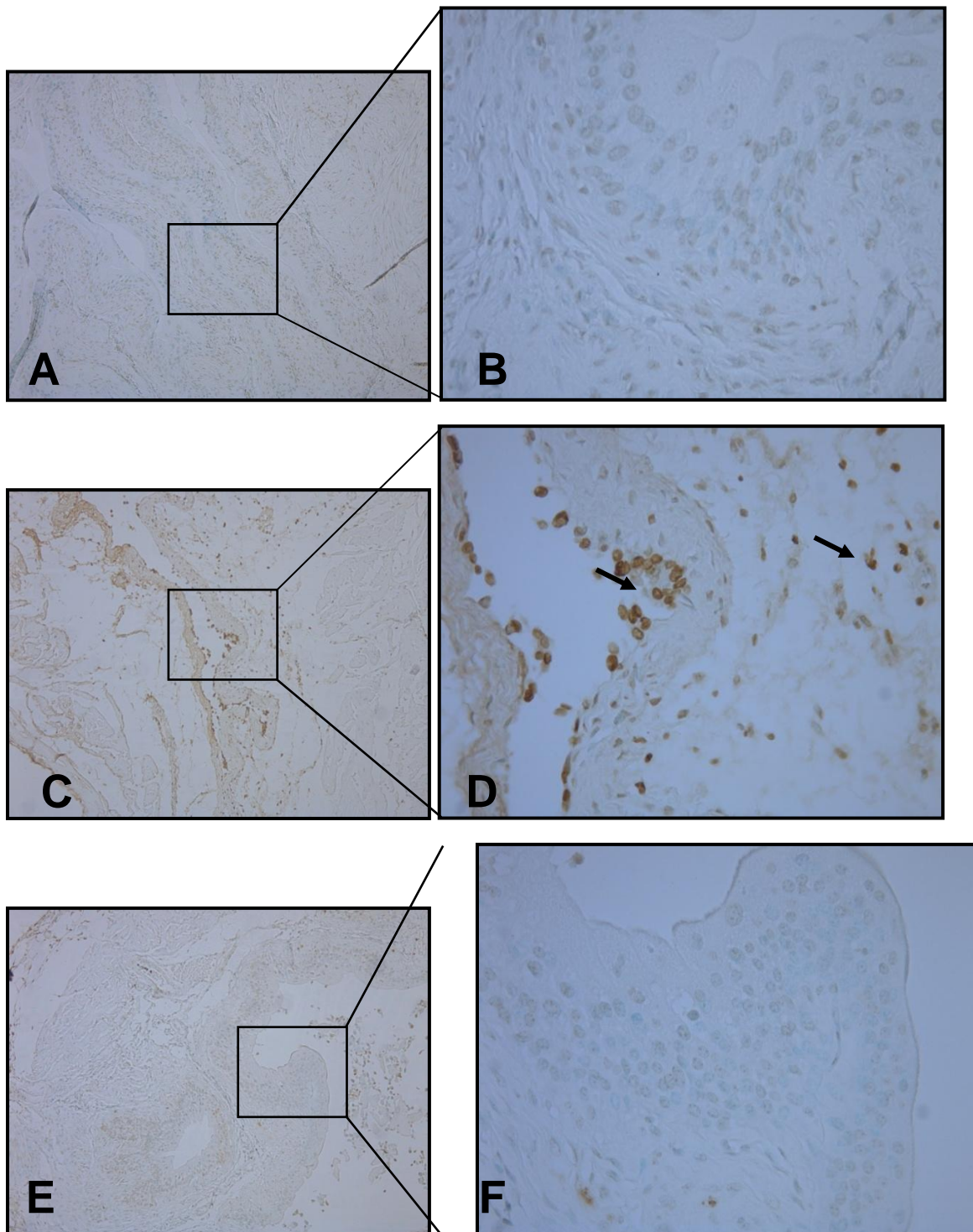
A análise das bexigas dos camundongos nas quais foi induzida cistite hemorrágica pela injeção intravesical (*ive*) de acroleína (75µg), e sacrificados após 3 horas da indução, apresentaram-se com importante marcação castanha (setas) em relação ao grupo controle que somente recebeu solução salina *ive*.

Este experimento demonstra que a acroleína (75µg *ive*) induz a apoptose das células do epitélio vesical em camundongos, e que a marcação característica da morte celular foi evidenciada em todas as áreas das bexigas dos animais como células do urotélio, membrana basal e tecido conjuntivo. (FIGURA 32 C - D)

O tratamento com amifostina (50mg/kg *ip*) inibiu a apoptose induzida nas células das bexigas dos animais tratados com acroleína (75µg *ive*), portanto não apresentaram marcação castanha característica da apoptose. (FIGURA 32 E - F)



**FIGURA 32: Análise histomorfométrica, após imunohistoquímica - TUNEL.**

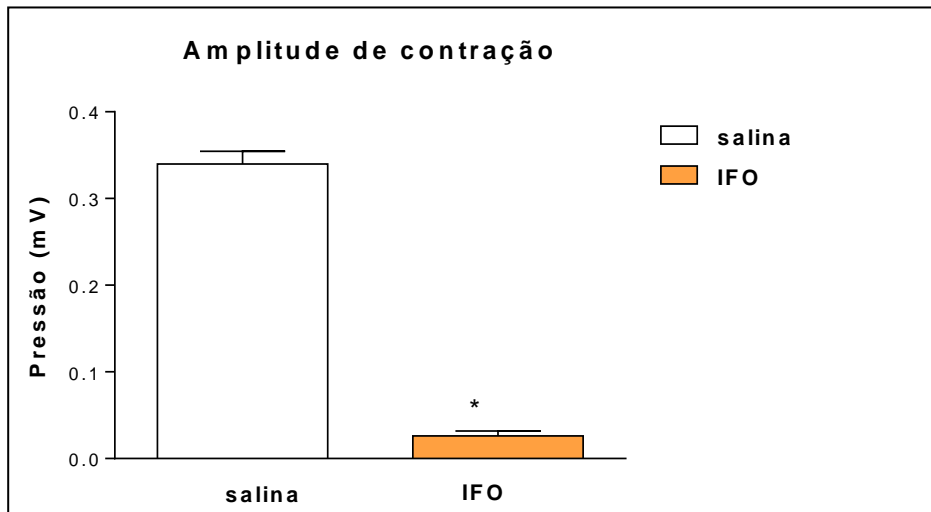


**A** (100x); **B** (400x): Salina, não se evidencia coloração castanha indicativa de morte celular; **C** (100x); **D** (400x): IFO (400mg/kg, *ip*) A coloração castanha indica morte celular. **E** (100x); **F** (400x): AMF (50 mg/Kg *ip*) 1 hora antes da indução de cistite hemorrágica por IFO (400 mg/kg, *ip*). Não evidenciamos a marcação castanha

## **7. Papel da amifostina nas alterações dos parâmetros funcionais nas bexigas de camundongos anestesiados. Estudo “*in vivo*”.**

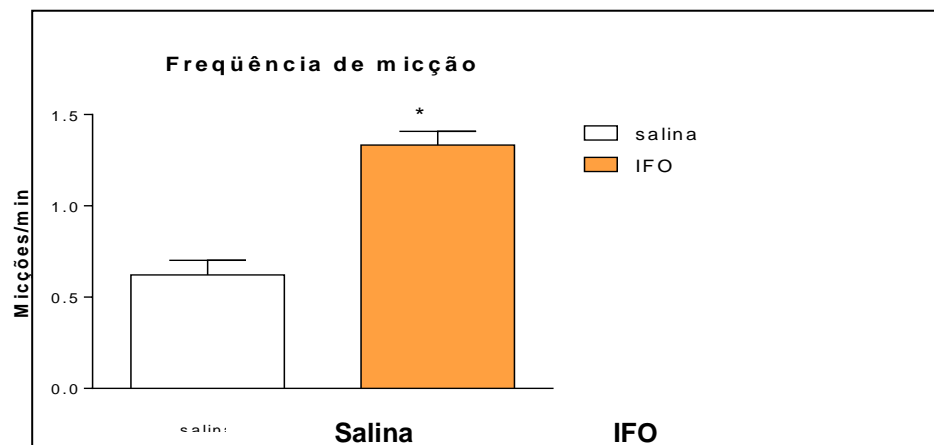
A ifosfamida provocou uma diminuição da amplitude de contração (pressão máxima durante a micção) e o aumento da frequência de micção em relação ao grupo controle. (FIGURAS 33 e 34). Adicionalmente, a amifostina (50 mg/Kg *ip*) reverteu parcialmente estas alterações nos parâmetros funcionais provocadas pela ifosfamida em bexigas de camundongos anestesiados, conforme podemos evidenciar no registro urodinâmico (FIGURA 35). O traçado das contrações das bexigas dos animais tratados com ifosfamida apresentaram deflexões de menor amplitude e maior frequência e o pré-tratamento com amifostina reverteu estas alterações funcionais apresentando traçados muito semelhantes ao dos animais controle que receberam apenas solução salina (FIGURA 35).

**FIGURA 33. Efeito do tratamento com a ifosfamida na amplitude de contração de bexigas de camundongos anestesiados.**



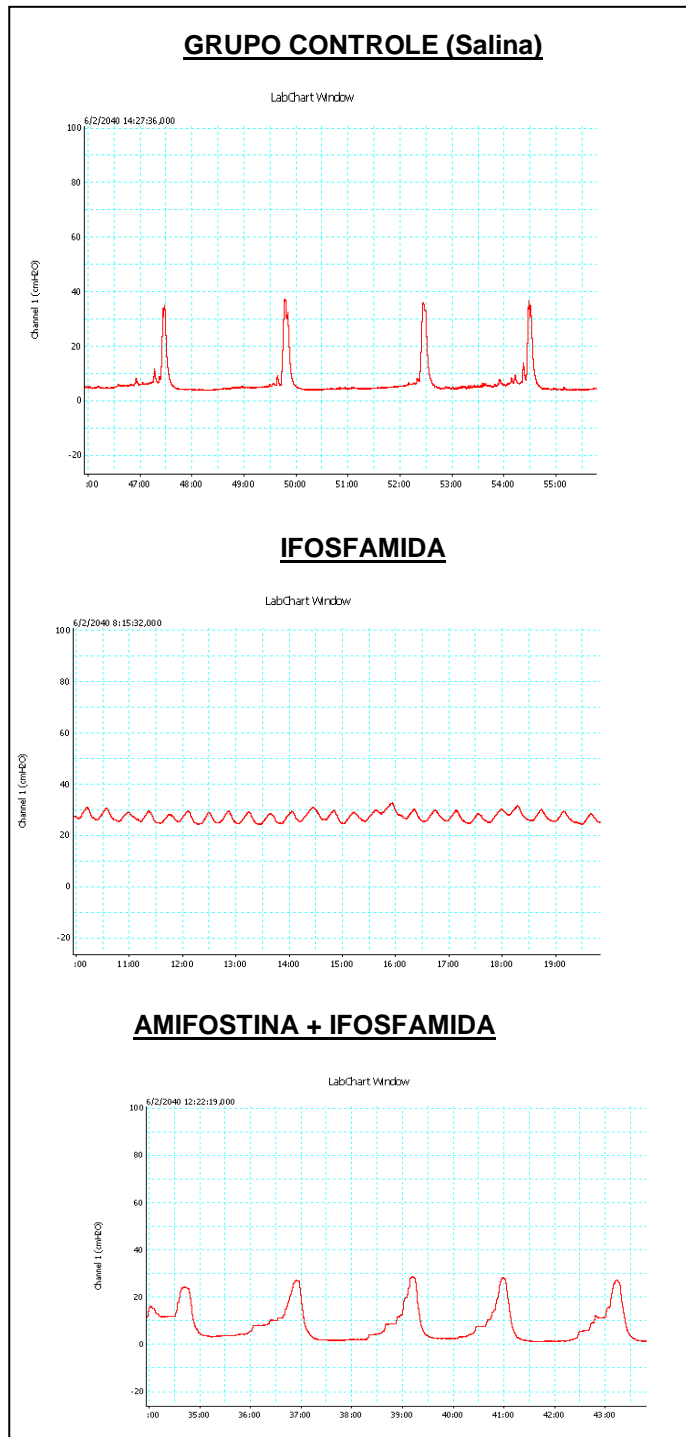
Os animais tratados com ifosfamida (400 mg/Kg *ip*) apresentaram uma diminuição da amplitude de contração (pressão máxima durante a micção) significativamente diferente dos animais do grupo controle que receberam apenas solução salina (\*  $p < 0,01$ )

**FIGURA 34. Efeito do tratamento com a ifosfamida na frequência de micção de camundongos anestesiados.**



Os animais tratados com ifosfamida (400 mg/Kg *ip*) apresentaram aumento na frequência de micção (micções por minuto) diferente dos animais do grupo controle que receberam apenas solução salina (\*  $p < 0,01$ )

**FIGURA 35. Efeito do tratamento com amifostina na variação na amplitude e frequência de contração e de bexigas de camundongos anestesiados tratados com ifosfamida.**

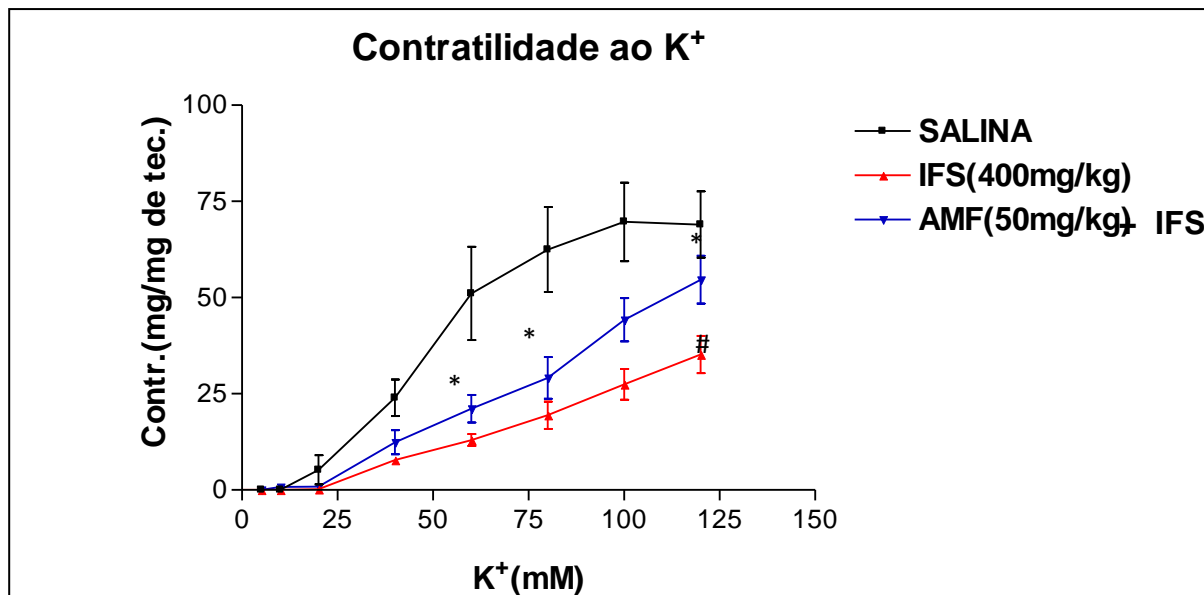


A amifostina reverteu parcialmente as alterações funcionais nas bexigas de camundongos anestesiados induzidas pela IFO

### **8. Papel da amifostina na alteração dos parâmetros funcionais em tiras de bexigas de camundongos. Estudos "in vitro".**

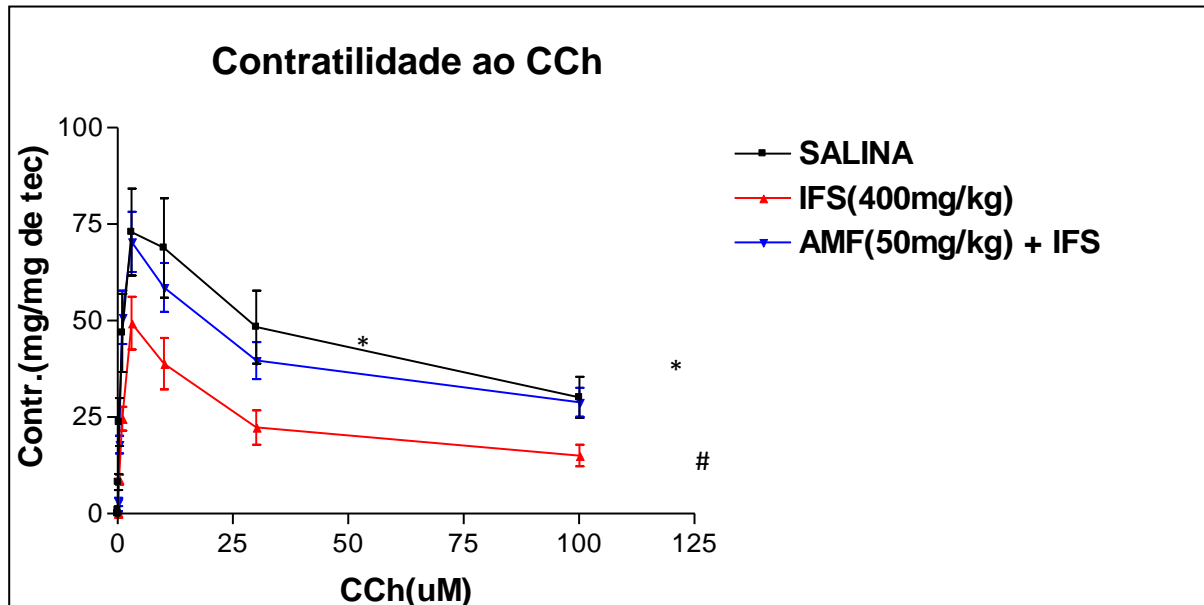
As tiras de bexigas dos animais tratados com ifosfamida (400 mg/Kg *ip*) apresentaram diminuição de contrações induzidas por  $K^+$  e carbacol (CCh) quando comparada com as bexigas dos animais do grupo controle que recebeu apenas solução salina. (FIGURAS 36 e 37) A administração de AMF na dose de 50 mg/Kg *ip* uma hora antes da indução da cistite pela IFO mostrou-se capaz de inibir as alterações funcionais por esta provocada tanto nas contrações induzidas por  $K^+$  e carbacol. (FIGURAS 36 e 37)

**FIGURA 36. Efeito da amifostina (AMF) na alteração da contratilidade ao  $K^+$  induzida pela ifosfamida (IFS) em tiras de bexigas de camundongos.**



A amifostina demonstrou-se capaz de inibir as alterações contráteis ao  $K^+$  de bexigas de camundongos tratados com ifosfamida. \*  $p < 0,05$  versus salina; #  $p < 0,05$  versus ifosfamida.

**FIGURA 37. Efeito da amifostina (AMF) na alteração da contratilidade ao Carbacol (CCh) induzida pela ifosfamida (IFS) em tiras de bexigas de camundongos.**

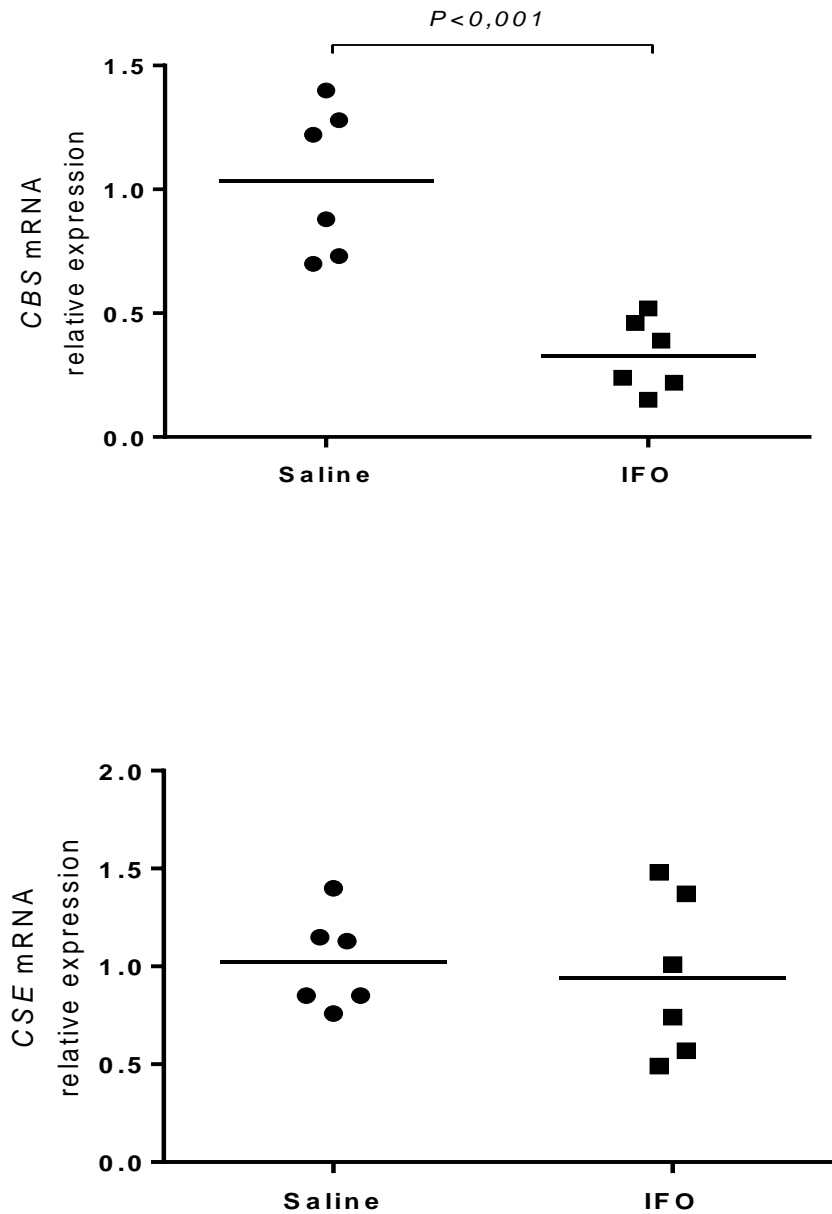


A amifostina inibiu de forma significativa as alterações contráteis ao carbacol (CCh) de bexigas de camundongos tratados com ifosfamida. # $p < 0,05$  versus salina; \* $p < 0,05$  versus ifosfamida.

## 9. Real time PCR para CBS e CSE

Por qPCR foi possível demonstrar a diferença de expressão de RNA-m de CBS entre o grupo controle que recebeu somente solução salina e o grupo tratado com Ifosfamida 400 mg/Kg intraperitoneal, o que não foi demonstrado com a expressão da CSE (FIGURA 38). Esta diferença chega a ser 3,66x a do grupo controle para CBS, com significância estatística ( $p < 0,001$ ).

**FIGURA 38: Expressão do RNA-m de CBS e CSE 12 horas após a administração de ifosfamida em camundongos.**



Demonstra-se a diferença de expressão de RNA-m de CBS entre o grupo controle que recebeu solução salina e o grupo tratado com ifosfamida 400 mg/Kg, ip ( $p < 0,001$ ). A expressão do RNA-m da CSE não foi influenciada pelo tratamento com a ifosfamida.

**10. Efeito uroprotetor do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Avaliação da variação do peso úmido vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas : curva dose-resposta.**

Nas FIGURAS 39 e 40 podemos evidenciar que as bexigas dos animais tratados com 400 mg/Kg de ifosfamida *ip* apresentaram aumento do peso úmido vesical (PUV) , 12 horas após a sua administração quando comparado ao grupo controle ,  $p < 0.001$ . O tratamento com diferentes doses da L-cisteína (50 e 100 mg/Kg *vo*), precursor da síntese de H<sub>2</sub>S, e do reagente de Lawessen (9, 27 e 81  $\mu$ mol/Kg *vo*), doador de H<sub>2</sub>S, inibiram este aumento do peso úmido vesical induzido pela IFO, sendo esta inibição estatisticamente significativa, o que pode ser observado nas mesmas figuras. Na FIGURA 39 também foi verificado que a administração de PPG, que bloqueia a atividade da enzima CSE, reverteu a uroproteção induzida pela L-cisteína.

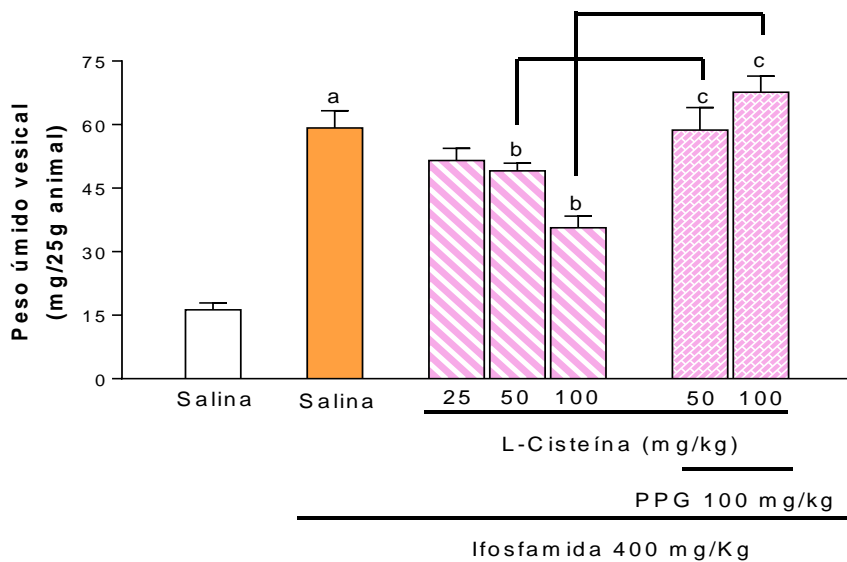
Macroscopicamente, a cistite hemorrágica observada 12 horas após a administração da IFO (400 mg/Kg *ip*) foi caracterizada pela presença de severo edema, com escores 3 (2 - 3) e por acentuada hemorragia sendo evidenciados hematomas de mucosa e coágulos na luz vesical, recebendo escores de 3 (1 - 3) o que foi significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes do controle que recebeu solução salina, com escores 0 (0 - 0), TABELA 9.



A análise macroscópica demonstrou, ainda, que o tratamento com a doses de 50mg /Kg de L-cisteína foi capaz de inibir significativamente o edema vesical enquanto a dose de 100 mg/Kg inibiu também os eventos hemorrágicos induzido pela ifosfamida, de maneira estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), conforme indicado na TABELA 9. Já a administração das 3 doses do reagente de Lawessen inibiu os parâmetros de edema e hemorragia como pode ser visualizado na TABELA 10.

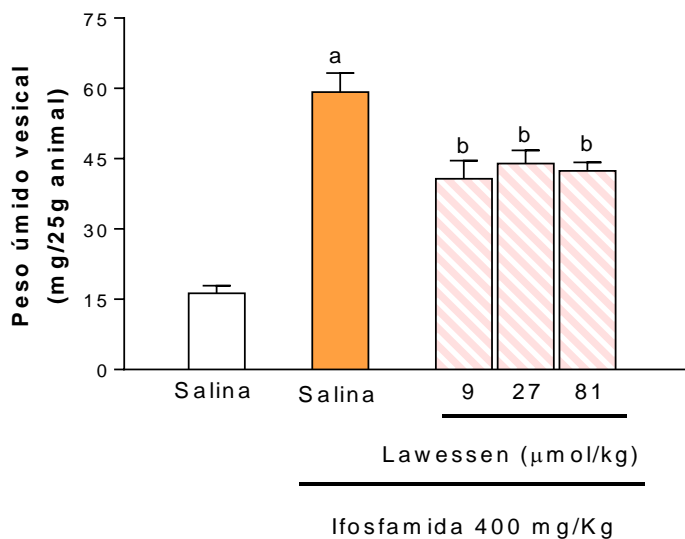
Utilizando os critérios histopatológicos de Gray, após 12 horas da administração da ifosfamida, já são evidenciadas alterações histológicas de cistite, como importante erosão da mucosa, ulceração, hemorragia, edema intenso, depósitos de fibrina e acentuado infiltrado leucocitário, recebendo escores 2 (2 - 2). Estas alterações foram inibidas estatisticamente ( $p < 0,05$ ) somente pela dose de 100 mg/Kg vo da L-cisteína. Os escores para os parâmetros de Gray destes resultados são encontrados nas TABELAS 9 e 10 e também estão demonstrados na FIGURA 41.

**FIGURA 39: Efeito do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Peso úmido vesical.**



Os animais foram tratados com L-cisteína 40 minutos antes da IFO; controle recebeu somente salina. Média  $\pm$ EPM. <sup>a</sup>p<0,001 vs salina, <sup>b</sup>p<0,05 vs grupo Ifosfamida e <sup>c</sup>p<0,05 vs L-cisteína não tratado com Propargilglicina (PPG) 10mg/kg.

**FIGURA 40: Efeito do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na cistite hemorrágica induzida por IFO em camundongos – Peso úmido vesical.**



Tratamento com Reagente de Lawessen 40 minutos antes da IFO; controle com salina. Média  $\pm$ EPM. <sup>a</sup>p<0,001 vs salina e <sup>b</sup>p<0,05 vs grupo ifosfamida.

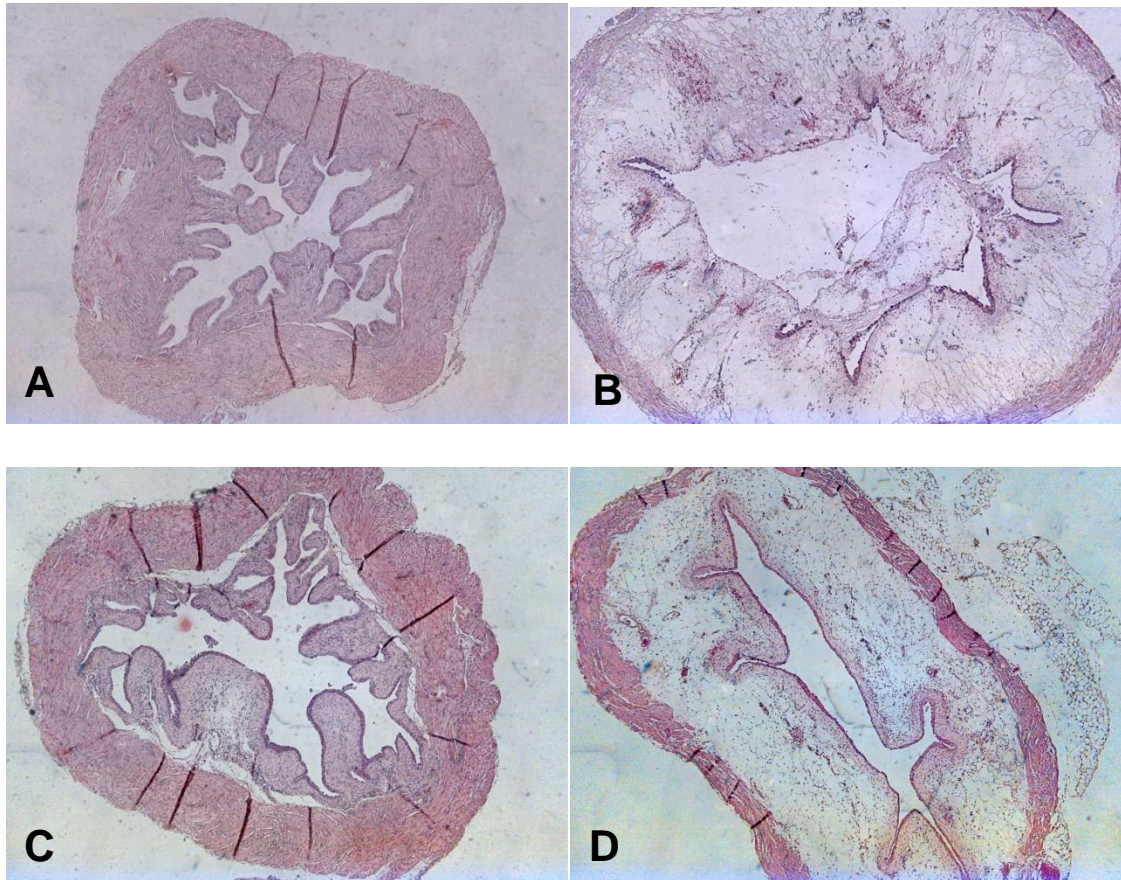
**TABELA 9: Efeito do precursor da síntese do sulfeto de hidrogênio(L-cisteína) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Análise macroscópica e microscópica.**

Grupos	Análise Macroscópica (Hemorragia)	Análise Macroscópica (Edema)	Análise Microscópica
Salina	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
IFO	3 (2 – 3) <sup>a</sup>	3 (1 – 3) <sup>a</sup>	2 (2 – 2) <sup>a</sup>
L-Cisteína 25 + IFO	3 (1 – 3)	3 (2 – 3)	2 (2 – 2)
L-Cisteína 50 + IFO	1 (1 – 2) <sup>b</sup>	2 (0 – 3)	2 (1 – 2)
L-Cisteína 100 + IFO	1 (0 – 2) <sup>b</sup>	1 (0 – 3) <sup>b</sup>	1 (0 – 2) <sup>b</sup>

**TABELA 10: Efeito do doador de sulfeto de hidrogênio (Reagente de Lawesson) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Análise macroscópica e microscópica.**

Grupos	Análise Macroscópica (Edema)	Análise Macroscópica (Hemorragia)	Análise Microscópica
Salina	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
IFO	3 (2 – 3) <sup>a</sup>	3 (1 – 3) <sup>a</sup>	2 (2 – 2) <sup>a</sup>
Lawesson 9 + IFO	1 (1 – 2) <sup>b</sup>	1 (1 – 2) <sup>b</sup>	2 (2 – 2)
Lawesson 27 + IFO	1 (0 – 2) <sup>b</sup>	1 (0 – 3) <sup>b</sup>	2 (2 – 2)
Lawesson 81 + IFO	1 (0 – 3) <sup>b</sup>	1 (0 – 2) <sup>b</sup>	2 (2 – 2)

Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. <sup>a</sup>p<0,001vs salina e <sup>b</sup>p<0,001 vs ifosfamida.

**FIGURA 41: Fotomicrografias de bexigas de camundongos (100x)**

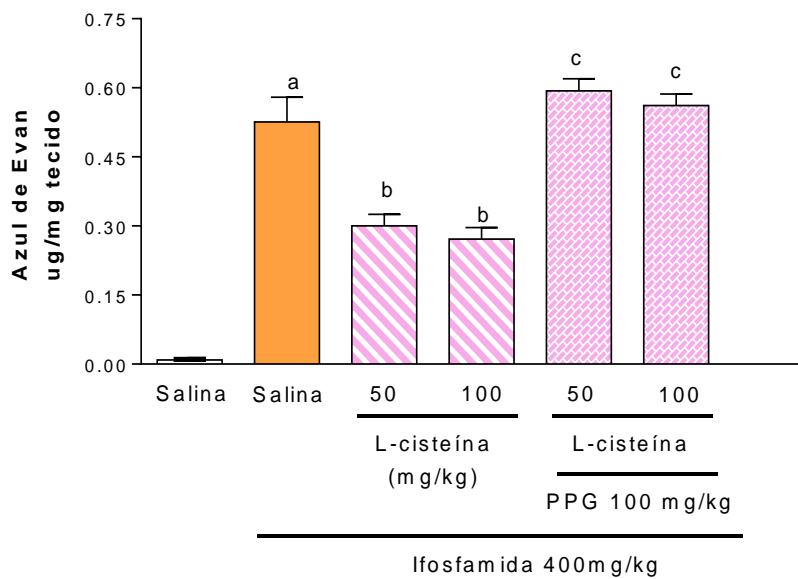
Grupo controle salina **A.**; Cistite hemorrágica induzida por ifosfamida **B** com importante edema, erosão do urotélio e hemorragia, o pré tratamento com L-cisteína **C** ou Reagente de Lawessen **D**, mostrando diminuição dos efeitos microscópicos induzidos pela ifosfamida.

**11. Efeito do tratamento com doses crescentes de L-cisteína e doador de H<sub>2</sub>S, Reagente de Lawessen nas variações da permeabilidade vascular de bexigas de camundongos tratados com ifosfamida.**

A administração de ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*) levou a um aumento importante da permeabilidade vascular, que foi estatisticamente significativa em relação ao controle, que recebeu somente solução salina, com  $p < 0,001$ . Observando as FIGURAS 42 e 43 tanto a L-cisteína como o reagente de Lawessen, precursor e doador de H<sub>2</sub>S respectivamente, foram capazes de produzir uma inibição do aumento da permeabilidade vascular induzida pela injeção intraperitoneal de IFO (400 mg/Kg) com todas as doses utilizadas. Este bloqueio foi estatisticamente diferente dos camundongos que receberam apenas a injeção *ip* de ifosfamida. A inibição do aumento da permeabilidade vascular induzida pela L-cisteína foi revertida pela administração de PPG, que bloqueia a atividade da enzima CSE. (FIGURA 42)

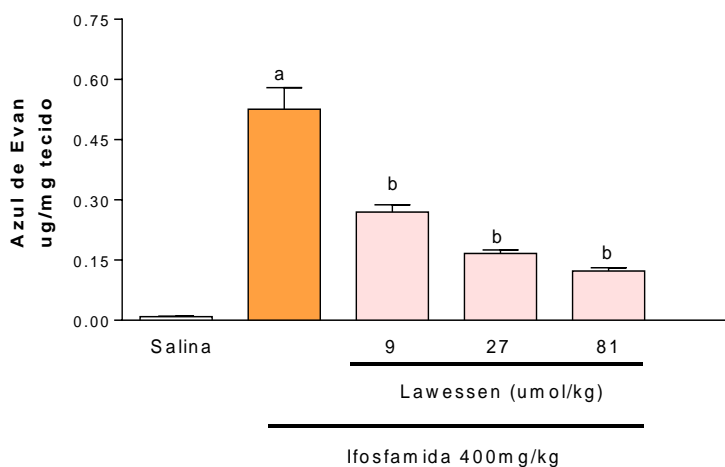
O resultado do corante extraído das bexigas foi expresso como  $\mu\text{g}$  de Azul de Evans / mg de Bexiga, sendo reportados como médias  $\pm$  EPM de cada grupo. Utilizamos o teste de ANOVA seguido do teste de Bonferroni para as análises estatísticas.

**FIGURA 42: Efeito do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Permeabilidade vascular.**



Os animais foram tratados com L-cisteína 40 minutos antes da IFO; controle recebeu somente salina. Média  $\pm$ EPM. <sup>a</sup> $p < 0,001$  vs salina, <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs grupo ifosfamida e <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs L-cisteína não tratado com propargilglicina (PPG) 10mg/kg.

**FIGURA 43: Efeito do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos – Permeabilidade vascular**

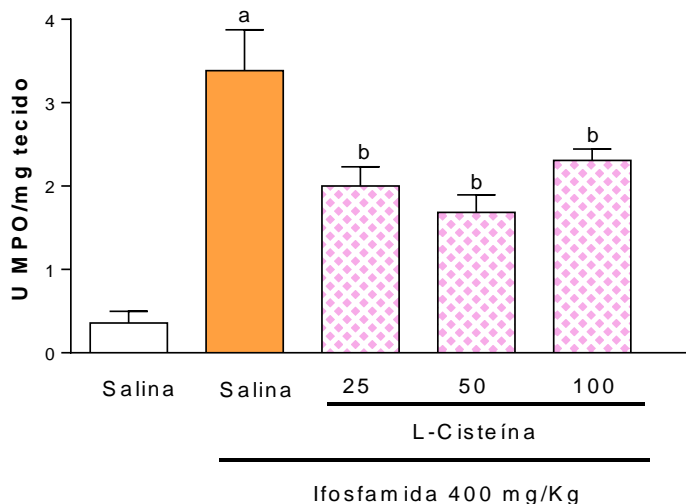


Tratamento com Reagente de Lawessen 40 minutos antes da IFO; controle com salina. Média  $\pm$ EPM. <sup>a</sup> $p < 0,001$  vs salina e <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs grupo ifosfamida.

**12. Efeito do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na atividade da enzima mieloperoxidase na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos.**

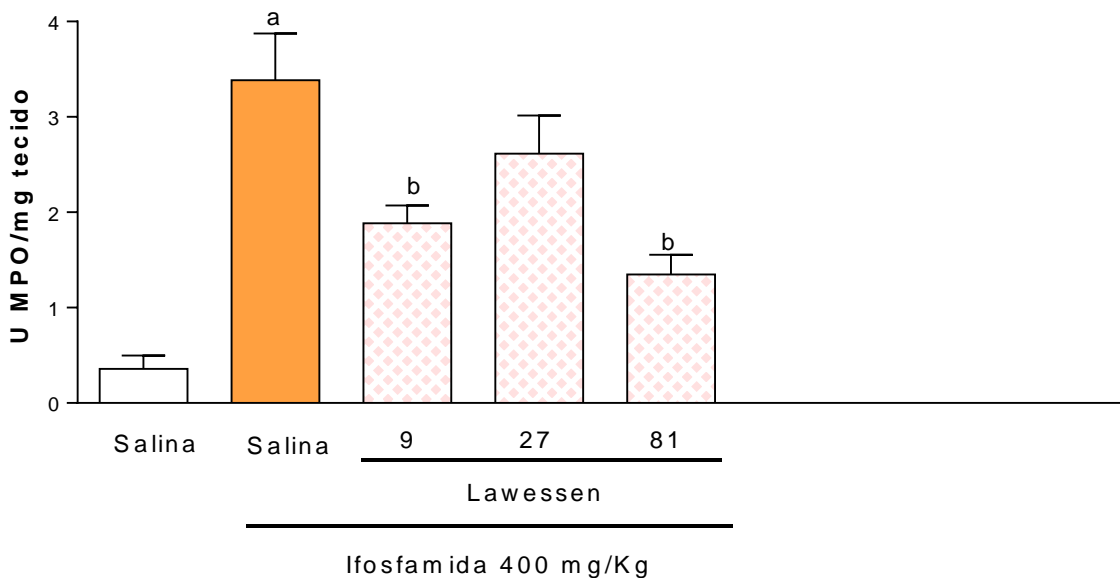
A análise bioquímica do tecido vesical de camundongos tratados com ifosfamida, 400 mg/Kg, *ip*, demonstrou aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO) quando comparado ao controle que recebeu somente solução salina. O pré tratamento dos animais com doses crescente de precursor de H<sub>2</sub>S, L-cisteína (25, 50 e 100 mg/Kg, *vo*) ou doador de H<sub>2</sub>S, reagente de Lawessen (9, 27 e 81 µmol/Kg, *vo*) inibiu esse aumento da mieloperoxidase induzida pela ifosfamida. (FIGURAS 44 e 45)

**FIGURA 44: Efeito do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na dosagem da enzima mieloperoxidase na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



Os animais foram tratados com L-cisteína 40 minutos antes da IFO; controle recebeu somente salina. Média  $\pm$  EPM <sup>a</sup>p<0,001 vs salina e <sup>b</sup>p<0,001 vs grupo ifosfamida

**FIGURA 45: Efeito do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na dosagem da enzima mieloperoxidase na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos.**



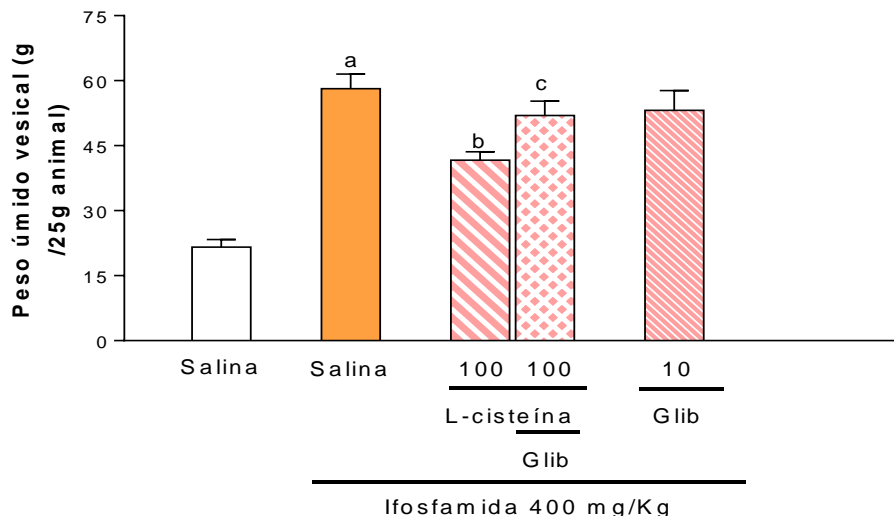
Os animais foram tratados com Reagente de Lawessen, 40 minutos antes da IFO; controle recebeu somente salina. Média  $\pm$  EPM <sup>a</sup>p<0,001 vs salina e <sup>b</sup>p<0,001 vs grupo ifosfamida

### **13. Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>) no efeito uroprotetor do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S)**

Para avaliar o envolvimento do K<sub>ATP</sub> no efeitos protetores da L-cisteína ou do doador de H<sub>2</sub>S, reagente de Lawessen, na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, os animais foram pré tratados com glibenclamida (10 mg/Kg). Nas FIGURAS 46, 47, 48 e 49 observamos que esse pré tratamento aboliu os efeitos uroprotetores da L-cisteína (100 mg/Kg) e do reagente de Lawessen (27  $\mu$ mol/Kg), considerando tanto as variações do peso úmido vesical, bem como da permeabilidade vascular.

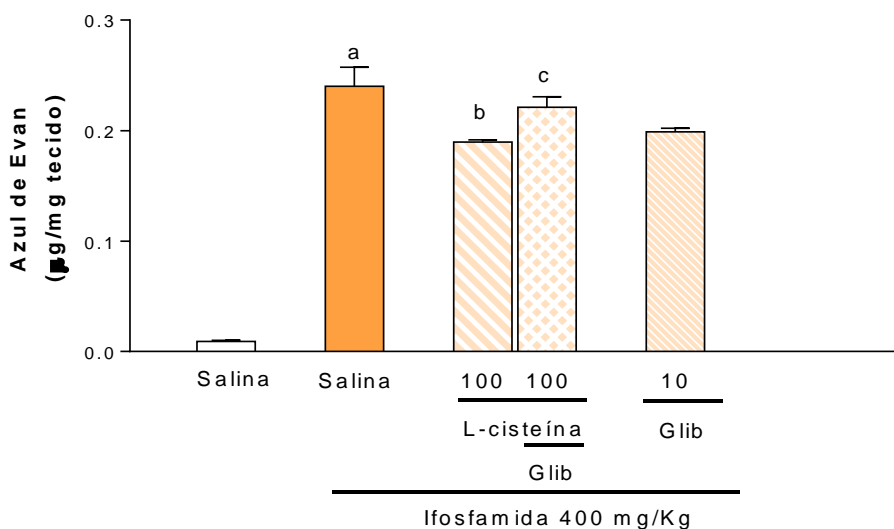


**FIGURA 46: Efeito do sulfeto de hidrogênio na CH induzida por ifosfamida em camundongos pré tratados com glibenclamida - peso úmido vesical.**



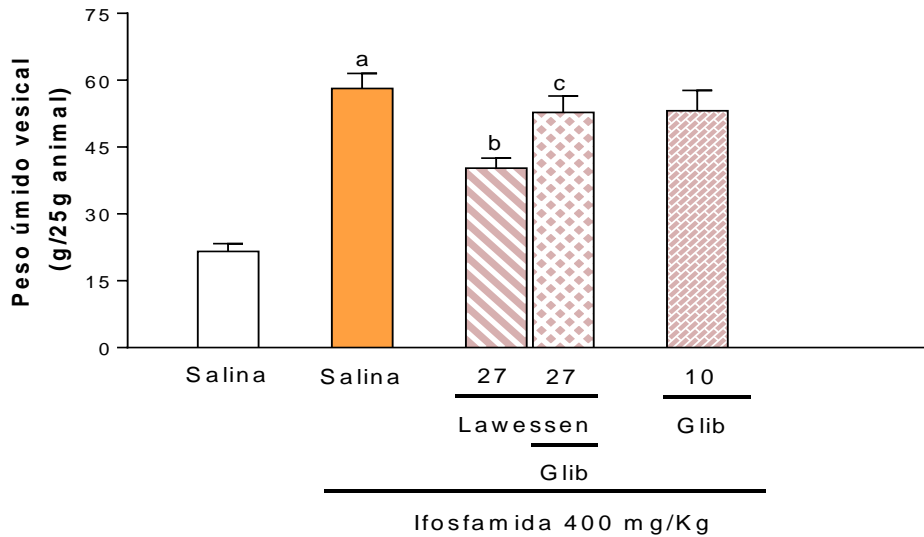
Os animais receberam glibenclamida (10 mg/Kg, vo). Após 1h foram tratados com L-cisteína (100 mg/Kg, vo). 40 minutos após foi induzida CH com ifosfamida (400 mg/Kg, ip). A administração de glibenclamida reverteu o efeito protetor da L-cisteína. Média  $\pm$ EPM. <sup>a</sup>p<0,001 vs salina, <sup>b</sup>p<0,05 vs grupo IFO e <sup>c</sup>p<0,05 vs L-cisteína.

**FIGURA 47: Efeito do sulfeto de hidrogênio na CH induzida por ifosfamida em camundongos pré tratados com glibenclamida permeabilidade vascular.**



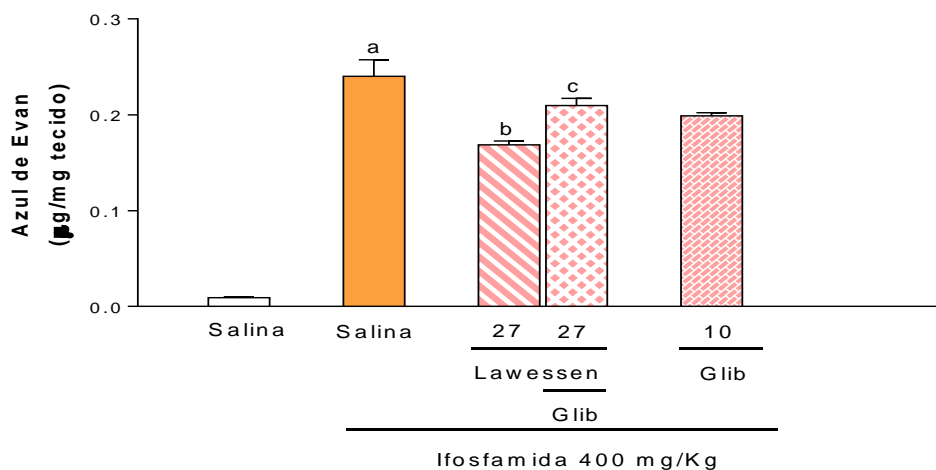
A administração de glibenclamida reverteu o efeito protetor da L-cisteína. Média  $\pm$ EPM. <sup>a</sup>p<0,001 vs salina, <sup>b</sup>p<0,05 vs grupo IFO e <sup>c</sup>p<0,05 vs L-cisteína.

**FIGURA 48: Efeito do sulfeto de hidrogênio na CH induzida por ifosfamida em camundongos pré tratados com glibenclamida - Peso Úmido Vesical.**



Os animais receberam glibenclamida (10 mg/Kg, vo). Após 1h foram tratados com Reagente de Lawessen (27  $\mu$ mol/Kg, vo). 40 minutos após foi induzida CH com Ifosfamida (400 mg/Kg, ip). A administração de glibenclamida reverteu o efeito protetor do reagente de Lawessen. Média  $\pm$ EPM. <sup>a</sup>p<0,001 vs salina, <sup>b</sup>p<0,05 vs grupo IFO e <sup>c</sup>p<0,05 vs Lawesson.

**FIGURA 49: Efeito do sulfeto de hidrogênio na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos pré tratados com glibenclamida permeabilidade vascular.**



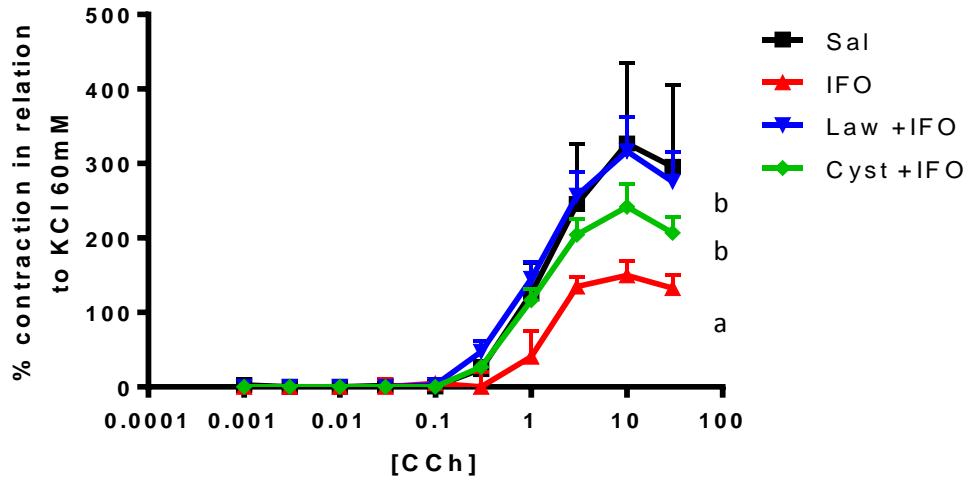
A administração de glibenclamida reverteu o efeito protetor do Reagente de Lawessen. Média  $\pm$ EPM. <sup>a</sup>p<0,001 vs salina, <sup>b</sup>p<0,05 vs grupo IFO e <sup>c</sup>p<0,05 vs Lawessen.

**14. Avaliação do efeito do sulfeto de hidrogênio na contratilidade de tiras de bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por IFO.**

Doze horas após receberem ifosfamida (400 mg/Kg *ip*), foram preparadas tiras de bexiga de camundongos para estudo de contratilidade *in vitro*, conforme protocolo descrito anteriormente. As tiras de bexiga de animais injetados com ifosfamida apresentaram diminuição das contrações induzidas por carbacol (CCh) quando comparada com as bexigas dos animais do grupo controle que receberam apenas solução salina. (FIGURA 50)

O tratamento com L-cisteína, precursor do H<sub>2</sub>S, na dose de 100 mg/Kg *vo* e reagente de Lawessen, doador de H<sub>2</sub>S, na dose de 27 µmol/Kg, *vo*, ambos administrados quarenta minutos antes da indução da cistite pela ifosfamida e 6 horas depois, mostrou-se capaz de inibir as alterações funcionais provocada pela ifosfamida nas contrações associadas ao carbacol. (FIGURA 50)

**FIGURA 50 . Efeito do sulfeto de hidrogênio na alteração da contratilidade ao Carbacol (CCh) induzida pela ifosfamida em tiras de bexigas de camundongos.**



A L-cisteína e o Reagente de Lawessen inibiram de forma significativa as alterações contráteis ao carbacol (CCh) de bexigas de camundongos tratados com ifosfamida.

<sup>a</sup>p<0,001 vs salina, <sup>b</sup>p<0,05 vs grupo IFO.

## DISCUSSÃO

#### IV. DISCUSSÃO

No presente trabalho, verificamos que a amifostina e o sulfeto de hidrogênio exercem efeito protetor sobre a cistite hemorrágica. Tal efeito foi evidenciado pela atenuação de eventos inflamatórios vasculares (permeabilidade vascular e peso úmido vesical), celulares (diminuição da atividade de mieloperoxidase), reduzida produção de mediadores inflamatórios e de mecanismos de apoptose, além de melhora de parâmetros funcionais vesicais. Um aspecto relevante e inédito nesse trabalho, foi a investigação da potencial interação química direta entre a amifostina e a acroleína. Tal proposta foi investigada previamente para outros compostos tióis, como a N-acetil-cisteína (NAC) e o Mesna (BROCK *et al.*, 1981). Esse raciocínio ficou bem estabelecido ao se estudar a relação entre o uso das oxazafosforinas, a geração de acroleína, acumulação desta na bexiga e o aparecimento de cistite hemorrágica. Dados da literatura sugerem que a maioria das células possui mecanismos endógenos adequados de proteção contra a toxicidade induzida por químicos reativos como a acroleína. A NAC mostrou-se capaz de se ligar a acroleína formando um tioéster não tóxico (BROCK *et al.*, 1981), prevenindo algumas manifestações da cistite hemorrágica induzidas pelo uso de oxazafosforinas, sendo porém ineficaz no quadro já instalado (PRIMACK, 1971; TOLLEY, 1977; BOTTA *et al.*, 1973).

Outro composto tiol testado foi o 2- mercaptano-sulfonato de sódio (MESNA) (BROCK *et al.*, 1981), cuja excreção urinária rápida é importante para a detoxificação dos metabólitos urinários das oxazafosforinas por interações químicas. O mecanismo de ação do mesna na cistite hemorrágica induzida por agentes alquilantes está relacionada a sua capacidade de se ligar a acroleína, o metabolito final urotóxico, formando um produto não tóxico, desta forma então, prevenindo a iniciação da cascata inflamatória

(LINKS & LEWIS, 1999). No entanto levando em consideração que o mesna também é um composto que possui um grupamento sulfidril, não se pode descartar a possibilidade de que a sua uroproteção possa ser devido à capacidade de atuar como *scavenger* de radicais livres (BATISTA *et al*, 2007), uma vez que esta propriedade do mesna já foi demonstrada quando em estudos de lesão de isquemia-reperfusão (SENER *et al*. 2005). Em nosso estudo, a baixa energia de interação entre amifostina e acroleína sugere a possibilidade de reação entre essas substâncias, o que poderia contribuir para a atenuação da cistite hemorrágica. Esse raciocínio é reforçado pela presença, de forma análoga ao NAC e ao mesna, de um grupamento tiol livre na amifostina quando metabolizada pela fosfatase alcalina de membrana celular (RENNER *et al.*, 1999).

Vários outros mecanismos podem estar associados ao efeito protetor da amifostina. Fu *et al* (2009) destacaram o potencial efeito anti-inflamatório da amifostina em modelo de lesão pulmonar induzida por Lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. No modelo de Fu e colaboradores (2009) o desenvolvimento de uma resposta lesiva associada ao LPS cursa com a ativação de espécies reativas de oxigênio, ativação de fatores de transcrição, como o p38 e NF- $\kappa$ B, que sinalizam para a produção de citocinas, incluindo a IL-6, e intensa permeabilidade vascular, refletindo uma disfunção de barreira endotelial. Todos esses mecanismos, inclusive a migração de neutrófilos, foram atenuados pela prévia administração de amifostina (FU *et al.*, 2009).

Não está claro se a inibição da síntese de mediadores inflamatórios seria decorrente de um efeito anti-inflamatório direto ou conseqüente ao provável efeito quelante da amifostina sobre a acroleína. Entretanto, o efeito anti-inflamatório direto foi avaliado por Kumar e colaboradores (2003). Células Raw 264.7, tratadas ou não com o metabólito ativo da amifostina, o WR-1065, foram incubadas com LPS e avaliadas quanto à produção de óxido nítrico. De forma interessante, esse composto exerceu um

potente efeito inibitório sobre a produção *in vitro* desse mediador (KUMAR *et al.*, 2003), sugerindo que o efeito anti-inflamatório pode ser em parte independente da ação quelante da droga. Esses achados são reforçados, no presente estudo, pelo fato de animais tratados com AMF terem reduzida imunexpressão de vários marcadores de inflamação, como TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , COX-2, além de reduzida atividade de iNOS.

Outros mediadores podem ter sua ativação modulada pela amifostina, como bradicinina, histamina e substância P. A bradicinina e seus homólogos, conhecidos genericamente por cininas, tem origem de fatores sanguíneos e exercem seus inúmeros efeitos através da ligação com dois tipos de receptores, o B1 e o B2. Em condições patológicas é responsável por inflamação e dor (MARCEAU – REGOLI, 2004), além de ter papel fundamental na regulação de mecanismos vasculares da inflamação (OSCHATZ *et al.*, 2011). De acordo com Oschatz e colaboradores (2011), mastócitos podem liberar heparina, que contribui para a ativação do fator XII da coagulação, levando à formação de bradicinina em modelos de anafilaxia. De forma análoga, mastócitos têm sido relatados contribuir para o desenvolvimento de cistite infecciosa (RUDICK *et al.*, 2008). A substância P, agindo nos receptores NK1, aumenta a produção do óxido nítrico, induzindo a inflamação (MAGGI *et al.*, 1997 b). A literatura também relata que o antagonista destes receptores atenua a permeabilidade vascular e alterações histológicas nas bexigas de animais tratados com ciclofosfamida (ALFIERI – GARDNER, 1997). Apesar de não termos testado o envolvimento de mastócitos, histamina, bradicinina ou substância P no presente modelo, acreditamos que a amifostina possa modular os eventos vasculares da inflamação, detectado pela redução da peso úmido vesical, em parte por impedir a ativação dessas células e desses mediadores.



A morte celular por apoptose é um fator que pode contribuir para a reduzida densidade celular na bexiga de animais injetados com ifosfamida, como evidenciado pelo método de TUNEL. Nota-se, claramente, que há uma diminuição de células epiteliais em animais com cistite hemorrágica. Esse aspecto pode expor o tecido conjuntivo subjacente a constituintes luminiais vesicais e facilitar o acesso da acroleína a essa porção do tecido. O estímulo de células residentes é um reconhecido mecanismo de produção e ativação de mediadores inflamatórios (RIBEIRO *et al.*, 2000). Ribeiro e colaboradores (2000) demonstraram que a injeção de zymosan ou ácido acético em cavidades peritoneais de ratos induz a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por células residentes. A comprovação desse mecanismo foi evidenciada pela lavagem peritoneal para depleção dessas células, o que reduziu a produção dos referidos mediadores (RIBEIRO *et al.*, 2000). Provavelmente, mecanismo análogo de estímulo esteja sendo conduzido pela acroleína no contexto da cistite hemorrágica. De forma relevante, a amifostina reduziu significativamente a marcação para apoptose induzida por ifosfamida e por acroleína. Esse mecanismo modulador não está claro. Contudo, Lv *et al* (2013) demonstraram que células da medula óssea irradiadas e tratadas com amifostina apresentaram reduzida produção de espécies reativas de oxigênio, preservação mitocondrial, reduzida apoptose e aumento da proliferação celular. Este efeito anti-apoptótico da amifostina já havia sido demonstrado quando esta inibiu a apoptose de linfócitos induzida pela idarrubicina. A atividade da amifostina na apoptose se deu pela inibição do potencial de lesão do DNA e é justamente o acúmulo de DNA lesionado, irreparavelmente, que pode induzir ao processo de morte celular por apoptose (WOZNIAC *et al.*, 2008). Não mensuramos, por ocasião do presente estudo, marcadores específicos de apoptose, como ativação de caspases iniciadoras (caspase-8, -9 ou -10) ou executoras (caspase-3 ou -6), nem o envolvimento de moléculas pró-apoptóticas, como Bax e Bak, ou anti-apoptóticas (Bcl-2) (LIU *et al.*, 2011). Contudo, o

mecanismo de preservação mitocondrial mediado pela amifostina, como evidenciado por Lv e colaboradores (2013), reforça o papel protetor desse fármaco na cistite hemorrágica.

Dentre as vias de ativação da apoptose, tem-se a via intrínseca, regulada por Bax e Bak, controladores da permeabilidade mitocondrial, e a via extrínseca, mediada por receptores de morte, como TNF- $\alpha$  e Fas (SAYERS, 2011).

O TNF $\alpha$  regula várias funções como proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, além de apoptose. Ele parece exercer um importante papel orquestrando a cascata de citocinas em várias doenças inflamatórias e, por este motivo, tem sido proposto como alvo terapêutico nestes casos (PARAMESWARAN *et al*, 2010). Os receptores de TNF $\alpha$  tanto são expressos constitutivamente em diversos tecidos dos mamíferos bem como são altamente regulados e expressos nas células do tecido imune (LOGAN *et al*, 2007). Uma vez reagindo com seus receptores, TNF-R1, o TNF $\alpha$  provoca vários eventos celulares, incluindo a ativação da cascata das caspases o que leva a apoptose e também leva ativação do NF- $\kappa$ B (LOGAN *et al*, 2007).

Diversos estudos investigaram o papel do TNF- $\alpha$  na cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas quando suas alterações histológicas foram inibidas pelo uso de soro anti-TNF- $\alpha$  (GOMES *et al*, 1995) e pela Talidomida, um ativador da degradação do mRNA de TNF- $\alpha$  (RIBEIRO *et al*, 2002). Mais recentemente, Leite e colaboradores (2015) demonstraram que o infliximabe, um anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  ou animais *knockout* para TNFR1 (receptor para TNF) inibem o edema vesical e a hiperalgesia associadas à cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

O epitélio e o tecido conjuntivo adjacente das bexigas dos camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (400 mg/Kg, *ip*) apresentaram grande

expressão do TNF- $\alpha$ , quando comparado as bexigas de animais controle. Esta expressão foi inibida nas bexigas dos animais pré-tratados com amifostina (50 mg/Kg, *ip*) as quais não expressaram a citocina. Considerando que a AMF reduziu a imunoexpressão para TNF- $\alpha$ , sugere-se que a redução dos mecanismos de apoptose por este fármaco, em parte, pode ser devida à inibição da sinalização apoptótica extrínseca regulada por esta citocina.

A interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) foi outra citocina com imunoexpressão inibida por amifostina. Trata-se de uma citocina altamente inflamatória que afeta praticamente todos os tipos celulares e que trabalha de forma sinérgica com outras citocinas.

A participação do IL-1 $\beta$  na cistite hemorrágica foi comprovada, uma vez que a utilização do soro anti-IL-1 $\beta$  e da pentoxifilina inibiram as alterações vesicais (GOMES *et al*, 1995; RIBEIRO *et al*, 2002), bem como também foi demonstrado que esta citocina é extremamente expressa nas células epiteliais e subepiteliais das bexigas de animais tratados com ifosfamida (MACEDO *et al*, 2011 a). LEITE e colaboradores (2015) demonstraram que o anakinra, um antagonista de receptores da IL-1 (IL-1ra), previne o estabelecimento de vários parâmetros da cistite hemorrágica, como hemorragia, edema, infiltração neutrofílica, hiperalgesia visceral e disfunção vesical. Esses achados foram confirmados em animais *knockout* para o receptor de IL-1 (IL-1R-/-) (LEITE *et al.*, 2015). Tais achados colocam a IL-1 no topo da cascata reguladora da resposta inflamatória da cistite hemorrágica. De maneira bastante relevante, a amifostina inibiu o aumento da imunoexpressão dessa citocina, evidenciado tanto no epitélio como tecido conjuntivo de bexigas de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Esse aspecto, parcialmente, justifica o amplo efeito protetor da amifostina. A ligação da IL-1 $\beta$  com seus receptores induz a fosforilação de quinases levando a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo com a expressão de diversos genes inflamatórios, como iNOS e COX-2.

(DINARELLO, 2011). Levando-se em consideração esse papel regulador da IL-1, investigamos o efeito da AMF sobre a imunexpressão dessas enzimas.

A cicloxigenase (COX) é um grupo de enzimas que catalizam a complexa conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos, que agem como autacóides com efeitos biológicos autócrinos e parácrinos (RIBEIRO *et al.*, 2012). Existem três isoformas de COX, mas é a expressão da COX-2 que é aumentada durante os processos inflamatórios, exercendo então importante papel na dor (KAWABATA, 2011), na ativação tumoral (DANNENBERG *et al.*, 2001), inflamação e doenças neurodegenerativas (DUBOIS *et al.*, 1998), bem como também já foi demonstrada na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (HU *et al.*, 2003), por ifosfamida (MACEDO *et al.*, 2008 a) e por acroleína (MACEDO *et al.*, 2008 b).

A COX-2 é observada apenas algumas horas após a indução da cistite hemorrágica, sugerindo que nas primeiras horas após a administração da ifosfamida ocorra a participação de outros mediadores (SOUZA –FILHO *et al.*, 1997; RIBEIRO *et al.*, 2002) o que foi confirmado por Macedo, Ribeiro e colaboradores (MACEDO *et al.*, 2008 a; RIBEIRO *et al.*, 2002).

No presente estudo, a amifostina também se demonstrou capaz de inibir a expressão de COX-2 em bexigas de camundongos que receberam ifosfamida. É lícito mencionar que na cistite hemorrágica, induzida experimentalmente por ifosfamida em ratos anestesiados, ocorrem alterações motoras funcionais no trato urinário inferior, no esvaziamento vesical bem como alterações no comportamento contrátil em estudos *in vitro*, e que a inibição de COX-2 com anti-inflamatórios não-esteroidais, como etoricoxibe e indometacina, previne o estabelecimento da disfunção vesical (MACEDO *et al.*, 2011a). Adicionalmente, Hu e colaboradores demonstraram, através de cistometrografia

em ratos conscientes, alterações nos reflexos miccionais e na pressão intravesical na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (HU *et al*, 2003). A PGE-2, por sua vez, ativa os aferentes vesicais levando a liberação de taquicinininas, como a substância P, dentro ou logo abaixo do urotélio, alterando o limiar do reflexo miccional levando a hiperatividade vesical observada nas condições inflamatórias do trato urinário inferior (MAGGI *et al* 1993; ISHIZUKA *et al*, 1995). Portanto, podemos sugerir que uma vez que a amifostina reduziu a imunexpressão para COX-2, esse mecanismo tenha prevenido o estabelecimento da disfunção vesical induzida pela ifosfamida.

A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida também foi inibida pela amifostina. O óxido nítrico é sintetizado por uma família de enzimas conhecidas como NO sintases (NOS), tendo sido descritas três isoformas de NOS, a endotelial (NOSe), a neuronal (NOSn) e a induzida (NOSi). Nas últimas décadas, o óxido nítrico tem tido cada vez mais relevância como um importante neurotransmissor e como um mediador celular com diversas funções no trato urinário inferior. Na patogênese da cistite hemorrágica, a produção de óxido nítrico parece depender da produção de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  através da ativação da NOS induzida (RIBEIRO *et al*, 2002; GOMES *et al*, 1995), uma vez que o uso de soro anti-TNF- $\alpha$  ou anti-IL-1 $\beta$  reduziu a expressão de NOSi no urotélio (GOMES *et al*, 1995).

Considerando que o óxido nítrico é um radical livre e que espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio afetam muitos processo fisiológicos e patológicos, incluindo morte celular por apoptose, mediante a regulação da expressão de fatores de transcrição, p53, e cascatas que quinases celulares (KAMINSKY *et al.*, 2014), pode-se sugerir que a amifostina, em parte, esteja modulando a morte de células da bexiga urinária por apoptose via a inibição da NOS induzida (NOSi).

Levando-se em consideração que a forma ativa da amifostina apresenta um grupamento tiol e que NAC, glutathiona e mesna exercem efeitos protetores na cistite hemorrágica exatamente por meio desse grupamento funcional molecular, questionou-se se o tiocomposto, sulfeto de hidrogênio, que possui ações fisiológicas diversas, exerceria efeito protetor sobre esta condição patológica.

De forma a se avaliar o papel do sulfeto de hidrogênio na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, utilizamos a L-cisteína, um substrato para a síntese desse mediador gasoso, e o reagente de Lawesson, um doador direto de sulfeto de hidrogênio.

Trabalhos anteriores sugerem que as enzimas cistationina beta-sintase (CBS) e cistationina gama-liase (CSE) são expressas em bexigas normais (FUSCO *et al.*, 2012; GAI *et al.*, 2013). Essa expressão é sugestiva de que ambas possam apresentar papel funcional na regulação da contração e esvaziamento urinário (FERNANDES *et al.*, 2014), ter importância na hemodinâmica do tecido subjacente (FIORUCCI *et al.*, 2006) ou, ainda, serem reguladoras do tráfego celular vascular-tecidual (SHIMIZU *et al.*, 2013).

Fato interessante observado nesse trabalho foi a expressão reduzida de CBS, mas normal de CSE, na vigência do tratamento com ifosfamida. Esse achado sugere que ocorre uma depleção da síntese de sulfeto de hidrogênio durante a cistite hemorrágica, justificando a realização da suplementação desse mediador gasoso como possível abordagem para a prevenção da lesão vesical. Esta, portanto, foi uma hipótese testada neste estudo, como discutido a seguir.

A expressão na bexiga urinária dessas enzimas e a produção de sulfeto de hidrogênio foram descritas em humanos e em ratos (FUSCO *et al.*, 2012; GAI *et al.*, 2013), tanto no tecido conjuntivo, como no músculo detrusor.

A não variação da expressão da CSE entre os grupos ifosfamida e controle, não exclui o papel desta no contexto da cistite. Certamente, ambas, CSE e CBS, contribuem para a patogênese de forma relevante, visto que evidenciamos que a inibição da CSE com L-propargilglicina reverteu o efeito protetor associado à administração do substrato para síntese do sulfeto de hidrogênio, a L-cisteína. Considerar o parâmetro de expressão por PCR quantitativo como referência experimental única é limitante nesse estudo, uma vez que a tradução do mRNA em proteína sofre influência de vários mecanismos pós-transcricionais (ZELTZ & GULLBERG, 2014). Nesse contexto, a atividade da CSE precisaria ser mensurada de forma a se determinar a real contribuição desta isoforma para o estabelecimento o dano vesical.

Curiosamente, a administração de L-cisteína e do reagente de Lawesson preveniram o aumento do peso úmido vesical e a permeabilidade vascular, as alterações macroscópicas e microscópicas, o acúmulo de neutrófilos (observado pela redução da atividade de MPO) e prevenção da disfunção vesical.

Apesar de não termos evidenciado uma diferença estatística entre o grupo ifosfamida e o tratado com o reagente de Lawesson em termos histopatológicos, alguns achados microscópicos, como a distância entre a camada mucosa e a muscular é maior no grupo ifosfamida que no grupo tratado com o reagente de Lawesson. Além disso, a camada epitelial apresenta-se parcialmente preservada no grupo tratado com o doador de sulfeto de hidrogênio se comparado ao grupo ifosfamida. Tais achados denotam uma preservação, mesmo que parcial, da arquitetura da bexiga nos animais tratados com o doador de sulfeto de hidrogênio. Haveria, assim, necessidade de se revisar o parâmetro de dano histopatológico utilizado neste trabalho (critérios de Gray), de forma a se mensurar quais critérios efetivamente apresentaram maior gravidade. Gray e colaboradores (1986) agruparam em cada índice de escore de lesão a intensidade de

edema, infiltrado celular, hemorragia e ulceração de mucosa. Uma análise estratificada dos parâmetros foi empregada em uma abordagem clínica da cistite hemorrágica (Lima *et al.*, 2007). Lima e colaboradores (2007) demonstraram que o protocolo padrão de prevenção de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida baseado em três doses de mesna não protege completamente da cistite, sugerindo que, a despeito do protocolo de uroproteção, os pacientes apresentavam uma cistite subclínica. Essa observação pode ser relevante no estabelecimento de repercussões tardias tóxicas consequentes ao tratamento oncológico com oxazafosforinas, como disfunção de bexiga.

Um efeito importante modulado pelo sulfeto de hidrogênio no presente estudo foi o edema inflamatório. É relatado na literatura que a lesão de barreira hematoencefálica decorrente de parada cardíaca, a qual leva ao extravasamento de albumina sérica, além de outras macromoléculas proteicas para o espaço extracelular cerebral, resultando em edema, apoptose e morte celular neuronal, pode ser adequadamente prevenida pela administração de sulfeto de hidrogênio (GENG *et al.*, 2015). Adicionalmente, Wang e colaboradores (2014) demonstraram efeito similar desse mediador gasoso em modelo de isquemia cerebral. Um componente inflamatório importante para o estabelecimento de edema é a infiltração de neutrófilos (CUNHA *et al.*, 2008; ZARPELON *et al.*, 2013). Cunha e colaboradores (2008) demonstraram que a inibição da migração de neutrófilos com fucoidina em modelo de edema de pata induzida por carragenina previne a hipernocicepção e o desenvolvimento do edema. Mais recentemente, Dornelles *et al* (2014) sugeriram que o antagonista de receptores CXCR1/CXCR2, importantes para o efeito quimiotático mediado pela interleucina-8, previne o acúmulo de neutrófilos durante a cistite induzida por ciclofosfamida, resultando na inibição do edema. No presente trabalho, o uso do doador de sulfeto de hidrogênio ou do substrato para a síntese desse mediador atenuou de forma significativa a atividade de mieloperoxidase, indicando a



inibição da acumulação de neutrófilos na cistite induzida por ifosfamida. Desta maneira, podemos afirmar que esse efeito sobre a migração de leucócitos pode ter contribuído para a redução da magnitude do edema. Um possível mecanismo pelo qual esse mediador gasoso pode regular o tráfico de leucócitos para o tecido pode envolver a modulação da expressão de moléculas de rolamento (P- e L-selectinas) e adesão (ICAM e integrinas) (SHIMIZU *et al.*, 2013).

Como discutido anteriormente, Macedo *et al* (2011a) demonstraram que a administração de ifosfamida induz uma importante disfunção vesical em ratos. Considerando que a doação de sulfeto de hidrogênio preveniu a resposta inflamatória, parte do efeito modulador desse mediador sobre a disfunção pode ser atribuído a esse papel. Adicionalmente, a expressão de CSE também foi demonstrada em fibras neurais distribuídas na camada muscular de ureteres de porcos (FERNANDES *et al.*, 2014). A localização dessa enzima, em parte, pode explicar a capacidade da L-cisteína e do reagente de Lawesson de reestabelecerem a contratilidade vesical normal.

O mecanismo protetor do sulfeto de hidrogênio tem sido associado à capacidade deste em abrir canais de potássio ATP-dependentes (MEDEIROS *et al.*, 2009). Medeiros e colaboradores (2009) evidenciaram o efeito gastroprotetor desse mediador gasoso no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol mediante uso de doadores. Ainda, com o pré-tratamento dos animais com glibenclamida, um bloqueador de canais K<sup>+</sup>-ATP-dependentes, verificaram uma reversão do efeito gastroprotetor (MEDEIROS *et al.*, 2009). Tal abordagem também foi utilizada no presente estudo, apresentando resultados similares. De forma interessante, Fernandes & Assreuy (2004) sugeriram que o efeito anti-inflamatórios de outro mediador gasoso, o óxido nítrico, também pode ser mediado pela ativação desses canais, visto que o bloqueador não seletivo de canais de potássio,

o tetrametilamonio, restabelecia o edema de pata induzido por carragenina (FERNANDES & ASSREUY , 2004).

O uso concomitante da propargilglicina com a L-cisteína, somente, e não com o reagente de Lawesson, justifica-se por este último ser um doador direto de sulfeto de hidrogênio, subvertendo, portanto, o mecanismo inibitório da enzima pelo inibidor.

O efeito do Lawesson, verificado no presente estudo, sobre os eventos vasculares e, em menor proporção, sobre os eventos celulares da resposta inflamatória, contrasta com a melhor eficácia da L-cisteína, a qual apresentou bons resultados em ambos os fenômenos e também sobre a disfunção vesical. Essa observação pode ser explicada pelo fato de a L-cisteína ser também substrato para outras vias metabólicas além da síntese de sulfeto de hidrogênio (FIORUCCI *et al.*, 2006). Por exemplo, cita-se a geração de glutatona reduzida (FIORUCCI *et al.*, 2006), cujo papel protetor na cistite hemorrágica já foi plenamente demonstrado (BATISTA *et al.*, 2007).

Portanto, com base nas observações ora apresentadas demonstramos de forma inédita os mecanismos envolvidos no papel protetor da amifostina e do sulfeto de hidrogênio sobre a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Esse trabalho abre perspectivas para a realização de estudos clínicos visando a translação desses achados para o melhor manuseio desse efeito colateral, o qual ainda continua limitante da terapêutica associada ao preparo dos pacientes para o transplante de medula óssea.

## **CONCLUSÕES**

## V - CONCLUSÕES

◆ Através métodos de química computacional, demonstramos a possibilidade de reação (de redução e / ou de adição) entre a amifostina e a acroleína.

◆ Os resultados deste trabalho comprovam que o efeito uroprotetor da amifostina se dá através de diversos mecanismos distintos, uma vez que inibe expressão e atividade de citocinas e mediadores inflamatórios, inibe apoptose e inibe alterações funcionais (*in vitro* e *in vivo*).

◆ Este estudo também comprova o efeito uroprotetor do sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) na cistite hemorrágica induzida pela ifosfamida, uma vez que a L-cisteína (substrato para a síntese de  $H_2S$ ) e o doador de  $H_2S$  (reagente de Lawessen), revertem as variações do PUV, PV, atividade de MPO, alterações macroscópicas, histopatológicas e funcionais, com mecanismo que se deve a ativação dos canais de  $K^+$ -ATP dependentes.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE K, KIMURA H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. **J Neurosci**; 16: 1066–71, 1996.
- ALBERTS D. S., SPEICHER L. A, KRUTZSCH M., WYMER J., CAPIZZI R. L., CONLON J., BARRETT A, AICKIN M. WR-1065, the active metabolite of amifostine (Ethyol), does not inhibit the cytotoxic effects of a broad range of standard anticancer drugs against human ovarian and breast cancer cells. **Eur. J. Cancer**, 32 A (Suppl 4):17, 1996.
- ALFIERI A., GARDNER C. The NK1 antagonist GR203040 inhibits cyclophosphamide-induced damage in the rat and ferret bladder. **Gen Pharmacol**; 29:245-50, 1997.
- ALFIERI A.B., MALAVE A., CUBEDDU L.X. Nitric oxide synthases and cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 363:353-7, 2001.
- ASSREUY, A. M. S., MARTINS, G. J., MOREIRA, M. E. F., BRITO, G. A. C., CAVADA, B. S., RIBEIRO, R. A., FLORES, C. A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J. Urol.**, v. 161, p. 1988-1993, 1999.
- BATISTA, C.K.; BRITO, G. A.; SOUZA, M. L.; LEITÃO, B. T.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A model of hemorrhagic cystitis induced with acrolein in mice. **Braz J Med Biol Res.**; 39(11):1475-81, 2006.

- BATISTA C.K., MOTA, J.M., LEITÃO 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.** Jan; 59 (1):71-7, 2007.
- BEAUCHAMPS R. J. , BUS J. S., POPP J. A., BOREIKO C. J., ANDJELKOVICH D. A. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. **Crit Rev Toxicol**;13: 25–97, 1984.
- BECKBAN, J.S.; SMITH, C.M.; KOPPENOL, W.H. SOD, and peroxyxynitrite. **Nature**, v. 364, p.584, 1993.
- BENNETT, A . H. Cyclophosphamide and hemorrhagic cystitis. **J. Urol.**, v. 111, p. 603, 1974.
- BIRDER L. A., APODACA G, DE GROAT W. C., KANAI A. J. Adrenergic- and capsaicin-evoked nitric oxide release from urothelium and afferent nerves in urinary bladder. **Am J Physiol** ; 275: 226–9, 1998.
- BIRDER L. A., NAKAMURA Y., KISS S., NEALEN M.L., BARRICK S., KANAI A. J. , *et al.* Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. **Nat Neurosci** ; 5: 856–60, 2002.
- BISOGNO G., DE BERNARDI B., CORDERO D.I. MONTEZEMOLO L., MANCINI A., DI TULLIO M.T., TAMARO P., DONFRANCESCO A., ARRIGHINI A., ZANETTI I., CARLI M.: A randomized comparison of ifosfamide administered as continuous or short infusion in children with soft tissue sarcoma. **Med Pediatr Oncol**;37:181, 2001.
- BLIJHAN, H. G. Prevention and treatment of organ toxicity during high-dose chemotherapy: an overview. **Anti-Cancer Drugs**, v. 4, p. 527-533, 1993.

- BOTTA Jr., J. A., NELSON, L., WEIKEL Jr., J. H. Acetylcystein in the prevention of cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 51, p. 1051, 1973.
- BRADE, W. P., HERDICH, K., VARINI, M. Ifosfamide – pharmacology, safety and therapeutic potencial. **Cancer Treat. Rev.**, v. 12, p. 1-47, 1985.
- BROCK, N. (1977) apud BRADE, W., SEEBER, S., HERDRICH, K. Comparative activity of ifosfamide and cyclophosphamide. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 18, suppl 2, p. S1-S9, 1986.
- BROCK, N. Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future. **Cancer Res.**, v. 49, p. 1-7, 1989 .
- BROCK, N. Uromitexan (mesna)- concept and mode of action. **Beiträge zur Onkologie**, v. 5, p. 1 –11, 1980
- BROCK, N., HILGARD, P., PEUKERT, M., POHL, J., SINDERMAN, H. Basis and new developments in the field of oxazaphosphorines. **Cancer Invest.**, v. 6, p. 513-532, 1988.
- BROCK, N., POHL, J. & STEKAR, J. Studies on the urotoxicity of oxazafosforine cytostatics and its prevention. II Comparative study on the uroprotective efficacy of thiols and other sulphur compounds. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v. 17, p. 1155 – 1163, 1981.
- BROCK, N., STEKAR, J., POHL, J., NIEMEYER, U., SCHEFFLER, G. Acrolein, the causative factor of urotoxic side-effects of cyclophosphamide, ifosfamide, trofosfamide and sufosfamide. **Arzneimittelforschung**, v. 29, p. 659-661, 1979.



- BRYANT, B:M., HARMAN, M. & FORD, H.T. Prevention of isophosphamide induced urothelial toxicity with 2-mercaptoethanosulphonate (mesna) in patients with avanced carcinoma. **Lancet**, v. 2, p. 657 –659,1980.
- BUKOWSKI R.M. Amifostine (Ethyol): dosing, administration and patient manegement guidelines. **Eur. J. Cancer**, 32 A(Suppl 4 ):46, 1996.
- CALABRESI, P., CHABNER, B. A. Antineoplastic agents. In: GILMAN, A. G., et al. (Ed) **Goodman and Gilman’s the pharmacological basis of therapeutics**. 8<sup>th</sup> ed. New York: Pergason Press, 1990. Chapt. 52, p. 1209-1263, 1990.
- CALABRO-JONES P,M., AGUILERA J.A, WARD J.F., SMOLUK G.D., FAHEY R.C. Uptake of WR-2721 derivates by cells in culture: identification of the transported form of the drug. **Cancer Res.**, v. 48, p.3634, 1988.
- CAMPOBASSO O, BERRINO F. Early effects of cyclophosphamide on mouse bladder epithelium. **Pathol Microbiol** (Basel); 38:144-57, 1972.
- CAPIZZI R. L.& OSTER W. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine: clinical experiences. **Eur. J. Cancer**, 31 A (Suppl 1):8, 1995.
- CAPIZZI R.L. The preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapies by amifostine (Ethyol). **Eur. J. Cancer**, 32 A (Suppl 4):5, 1996.

- CARMELIET, P.; DOR, Y.; HERBERT, J. M.; FUKUMURA, D.; BRUSSELMANN, K.; DEWERCHIN, M.; NEEMAN, M.; BONO, F.; ABRAMOVITCH, R.; MAXWELL, P.; KOCH, C. J.; RATCLIFFE, P.; MOONS, L.; JAIN, R. K.; COLLEN, D.; KESHERT, E. Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. **Nature** v. 394, p. 485 -490, 1998.
- CASCIATO, D. A.; LOWITZ, B. B. Manual of clinical oncology. 3. ed. Little, brown and company, 1995.
- CATERINA M. J., SCHUMACHER M. A., TOMINAGA M., ROSEN T. A., LEVINE J. D., JULIUS D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**; 389: 816–24, 1997.
- CHAHL L. A. Hydrogen sulphide: an endogenous stimulant of capsaicin-sensitive primary afferent neurons? **Br. J. Pharmacol.** 142, 1-2, 2004.
- CHAVIANO, A. H., GILL, W. B., RUGGIERO, K.J. et al. Experimental Cytoxan cystitis and prevention by acetilcisteine. **J. Urol.** V. 134(3), p. 598-600, 1985.
- CHEN C-Q., XIN H., ZHU Y-Z. Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential. **Acta Pharmacol Sin** Nov; 28 (11): 1709–1716, 2007.
- COGGINS, P. R., RAVDIN, R. G., EISMAN, S. H. Clinical pharmacology and preliminary evaluation of cytoxan (cyclophosphamide). **Cancer Chemother. Rep.**, v. 3, p. 9, 1959.

- CONNORS, T. A., COX, P. J., FARMER, F. B., FOSTER, A. B., JARMAN, M. Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 23, p. 115-129, 1974.
- COX, P. J. Cyclophosphamide cystitis: Identification of acrolein as the causative agent. **Biochem. Pharmacol.**, v. 28, p. 2045-2049, 1979.
- CUNHA TM, VERRI WA JR, SCHIVO IR, NAPIMOGA MH, PARADA CA, POOLE S, TEIXEIRA MM, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol.** Apr;83(4):824-32, 2008.
- DANNENBERG, A. J.; ALTORKI, N. K.; BOYLE, J. O.; DANG C.; HOWE, L. R.; WEKSLER, B. B.; SUBBARAMAIAH, H. Cyclo-oxygenase 2: A pharmacological target for the prevention of cancer. **Lancet Oncol.**; 2, 544–551, 2001.
- DE FRONZO, R. A., BRAINE, H., COLVIN, O. M., DAVIS, P. J. Water intoxication in man after cyclophosphamide therapy: time course and relation to drug activation. **Ann. Intern. Med.**, v. 78, p. 861, 1973.
- DE VITA, V T; KELLMAN, S; ROSENBERG, S A, (Eds) Cancer principles and practice of oncology. **Philadelphia: Lippincott-Raven**, p. 2714-2755, 1994.

- DE PAS, T., CURUGLIANO G., MASCI, G. CATANIA, C., COMANDONE, A., BONI, C., TUCCI, A., PAGANI, A., MARROCO, E., DE BRAUD, F.: Phase I study of twelve-day prolonged infusion of high-dose ifosfamide and doxorubicin as first-line chemotherapy in adult patients with advanced soft tissue sarcomas. **Ann Oncol**;13:161–166, 2002.
- DECHANT, K. L., BROGDEN, R. N., PILKINGTON, T., FAULDS, D. Ifosfamide/Mesna. A review of its antineoplastic activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cancer. **Drugs**, v. 42, p. 428-467, 1991.
- DEVRIES, C. R., FREIHA, F. S. Hemorrhagic cystitis: A review. **J. Urol.**, v. 143, p. 1-9, 1990.
- DINARELLO C.A. Blocking interleukin-1 $\beta$  in acute and chronic autoinflammatory diseases. **J Intern Med**; 269:16-28, 2011.
- DINARELLO C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Ann Rev Immunol**; 27:519-50, 2009.
- DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood.**; 117(14):3720-32, 2011.
- DORNELLES FN, ANDRADE EL, CAMPOS MM, CALIXTO JB. Role of CXCR2 and TRPV1 in functional, inflammatory and behavioural changes in the rat model of cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis. **Br J Pharmacol**. Jan;171(2):452-67, 2014.
- DOUAY L., Hu C., GIARRATANA M.C. et al., Amifostine improves the antileukemic therapeutic index of malfosfamide: implications for bone marrow purging. **Blood**, v. 86, p. 2849-2855, 1995.

- DOUAY L., HU C., GIARRATANA M.C., GORIN N.C. Amifostine (WR-2721) protects normal haematopoietic stem cells against cyclophosphamide derivatives' toxicity without compromising their antileukaemic effects. **Eur. J. Cancer**, 31 A (Suppl 1):14, 1995.
- DROLLER, M. J., SARAL, R., SANTOS, G. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Urology**, v. 20, p. 256, 1982.
- DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.**; 12(12):1063-73, 1998.
- FERNANDES D, ASSREUY J. Involvement of guanylate cyclase and potassium channels on the delayed phase of mouse carrageenan-induced paw oedema. **Eur J Pharmacol.** Oct 6;501(1-3):209-14, 2004.
- FERNANDES VS, RIBEIRO AS, MARTÍNEZ P, LÓPEZ-OLIVA ME, BARAHONA MV, ORENSANZ LM. Hydrogen sulfide plays a key role in the inhibitory neurotransmission to the pig intravesical ureter. **PLoS ONE** ;9:e113580, 2014.
- FIORUCCI, S.; DISTRUCCI, E.; CIRINO, G.; WALLACE, J.L. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. **Gastroenterology**, v. 131, p.259 – 271, 2006.
- FORSTERMANN U., SESSA W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**; doi:10.1093/eurheartj/ehr304, 2011.

- FOSTER-NORA, J.A.; SIDDEN, R. Amifostine for protection from antineoplásica drug toxicity. **Am J Health Syst Pham.** v. 54, p. 787 – 800, 1997.
- FRAISER, L. H., KANEKAL, S., KEHRER, J. P. Cyclophosphamide toxicity characterising and avoiding the problem. **Drugs,** v. 42, n. 5, p. 781-795, 1991.
- FU P, BIRUKOVA AA, XING J, SAMMANI S, MURLEY JS, GARCIA JG, GRDINA DJ, BIRUKOV KG. Amifostine reduces lung vascular permeability via suppression of inflammatory signalling. **Eur Respir J.** Mar;33(3):612-24, 2009.
- FURNE J, SPRINGFIELD J, KOENIG T, DEMASTER E, LEVITT M. D. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. **Biochem Pharmacol;** 62: 255–9, 2001.
- FUSCO F, DI VILLA BIANCA R, MITIDIERI E, CIRINO G, SORRENTINO R, MIRONE V. Sildenafil effect on the human bladder involves the L-cysteine/hydrogen sulfide pathway: a novel mechanism of action of phosphodiesterase type 5 inhibitors. **Eur Urol;** 62:1174–80, 2012.
- GAI JW, WAHAFU W, GUO H, LIU M, WANG XC, XIAO YX . Further evidence of endogenous hydrogen sulphide as a mediator of relaxation in human and rat bladder. **Asian J Androl;**15:692–6, 2013.

- GENG Y, LI E, MU Q, ZHANG Y, WEI X, LI H, CHENG L, ZHANG B. Hydrogen sulfide inhalation decreases early blood-brain barrier permeability and brain edema induced by cardiac arrest and resuscitation. **J Cereb Blood Flow Metab.** Mar;35(3):494-500, 2015.
- GLOBOCAN 2012. Estimated Cancer Incidence mortality and prevalence worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.
- GLOVER, D.; GLICK, J.H.; WEILER, C.; FOX, K.; TURRISI, A.; KLINGERMAN, M.M. Phase I/II trials of WR-2721 and cis-platinum. **Int J Radiat Oncol Bio Phys.**, v. 12, p. 1509 - 1512, 1986.
- GLOVER, D.; GLICK, J.H.; WEILER, C.; HUROWITZ, S.; KLINGERMAN, M.M. WR-2721 protects against the hematologic toxicity of cyclophosphamide: a controlled phase II Trial. **J Clin Oncol.** v. 4, p. 584 – 588, 1986.
- GOLIN, A. L., BENSON, R. C. Cyclophosphamide hemorrhagic cystitis requiring urinary diversion. **J. Urol.**, v. 118, p. 110, 1977.
- GOMES, T. N. A., SANTOS, C. C., SOUZA-FILHO, M. V. P., 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, p. 1103-1108, 1995.
- GOMES, T.N.A., 1995 - Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida e Ifosfamida – Envolvimento de Citocinas e óxido nítrico na patogênese da lesão induzida por Ciclofosfamida. Fortaleza, 1995. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará.

- GOREN, M. P., McKENNA, L. M., GOODMAN, T. L. Combined intravenous and oral mesna in outpatients treated with ifosfamide. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 40, p. 371-375, 1997.
- 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**; 136: 497-500, 1986.
- GRIGGS J. J. Reducing the toxicity of anticancer therapy: new strategies. **Leukemia Res.**, v. 1001, p. S27 – S33, 1998.
- GUIDOTTI T. L. Hydrogen sulphide. **Occup Med** (Lond); 46: 367–71, 1996.
- HASELBERGER, M. B., SCHWINGHAMMER, T. L. Efficacy of mesna for the prevention of hemorrhagic cystitis after high-dose cyclophosphamide therapy. **Ann. Pharmacother.**, v. 29, p. 919-921, 1995.
- HASKELL, M. H. Drugs used in cancer chemotherapy. In: M. HASKELL, M. (Ed.) **Cancer treatment**. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. Chapt.5, p. 44-51.
- HIGGS, D., NAGY, C., EINHARN, L. H. Ifosfamide: a clinical review. **Semin. Oncol. Nurs.**, v. 5, p. 70-77, 1989.
- HILPERT F., STÄHLE A., TOMÉ O., BURGESS A., ROSSNER D., SPÄTHE K., HEILMANN V., RICHTER B., DU BOIS A.; Neuroprotection with amifostine in the first-line treatment of advanced ovarian cancer with carboplatin/paclitaxel-based chemotherapy--a double-blind, placebo controlled, randomized phase II study from the Arbeitsgemeinschaft



Gynkologische Onkologoie (AGO) Ovarian Cancer Study Group. **Official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer.** New York, v.22,n.7,p.32-39, Aug.2004.

- HOEFER-JANKER, W., SCHEEF, W., GÜNTHER, U., HÜL, W., VAHLENSIECK, W. & BRÜHL, P. Erfahrungen mit der fraktionierten Ifosfamid-stosstherapie bei generalisierten malignen Tumoren. **Med. Welt.**, v. 26, p. 9972-9979, 1975.
- HOSOKI R, MATSUKI N, KIMURA H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. **Biochem Biophys Res Commun**; 237: 527–31, 1997.
- HOUSE J. D., BROSNAN M. E., BROSNAN J.T. Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney. *Biochem J* **328**:287–292. 1997.
- HU, V. Y.; MALLEY, S.; DATILLIO, A.; FOLSOM, J. B.; ZVARA, P.; VIZZARD, M. A. COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**; 284(2):R574-85, 2003.
- HWANG W .Y. K. , KOH L-P. , NG H. J., TAN P. H. C. , CHUAH C. T. H., FOOK S. C., CHOW H., TAN K. W., WONG C., TAN C. H., GOH Y-T. A randomized trial of amifostine as a cytoprotectant for patients receiving myeloablative therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, Orlando, v.34, n.6, p.1-6, jul. 2004.
- **Incidência de Câncer no Brasil 2016.** Estimativa 2015 – INCA

- INOUE K., KOIZUMI S., FUZUIWARA S., DENDA S., INOUE k., DENDA M. Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. **Biochem Biophys Res Commun**; 291: 124–9, 2002.
- ISHII I, AKAHOSHI N, YU X. N., KOBAYASHI Y, NAMEKATA K, KOMAKI G, KIMURA H Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. **Biochem J** **381**:113–123, 2004.
- ISHIZUKA, O.; MATTIASSON, A.; ANDERSON, K. E. Prostaglandin E2-induced bladder hyperactivity in normal, conscious rats: involvement of tachykinins? **J Urol.**; 153(6):2034-8, 1995.
- JAWABRAH AL-HOURANI B., SHARMA S.K., SURESH M., WUEST F. Cyclooxygenase-2 inhibitors: a literature and patent review (2009-2010). **Expert Opin Ther Pat**; 21:1339-432, 2011.
- JEMAL, A., BRAY, R., CENTER, M.M., FERLAY, J., WARD, E. FORMAN, D. **C. A. Cancer J. Clin.** 2011 mar-apr; 61 (2): 134, 2011.
- KAJSTURA, J.; CHENG, W.; REISS, K.; CLARK, W. A.; SONNENBLICK, E. H.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C.; OLIVETTI, J.; ANVERSA, P. Apoptotic and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarct size in rats. **Lab Invest** v. 74, p. 86 – 107, 1996
- KAMINSKYY VO, ZHIVOTOVSKY B. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. **Antioxid Redox Signal.** Jul 1;21(1):86-102, 2014.
- KASPAREK, M.S.; LINDEN, D.R.; KREIS, M.E.; SARR, M.G. Gasotransmitters in gastrointestinal tract. **Surgery**, v. 143, p. 455-9, 2008.

- KATZ, A., EPELMAN, S., ANELLI, A., GORENDER, E. F., CRUZ, S. M., OLIVEIRA, R. M., MARQUES, L. A. A prospective randomized evaluation of three schedules of Mesna administration in patients receiving ifosfamide-containing chemotherapy regimen: sustained efficiency and simplified administration. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 121, p. 128-131, 1995.
- KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and pain--an update. **Biol Pharm Bull.**; 34(8):1170-3, 2011.
- KEMP, G.; ROSE, P. LURAIN, J. BERMAN, M.; MANETTA, A.; ROULLET, B.; HOMESLEY, H.; BELPOMME, B.; GLICK, J. Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. **J. Clin. Oncol.** v. 14, p. 2101 – 2112, 1996.
- KIMURA H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Mol Neurobiol* **26**:13–19, 2002.
- KIMURA H, NAGAI Y, UMEMURA K, KIMURA Y. Physiological roles of hydrogen sulfide: synaptic modulation, neuroprotection, and smooth muscle relaxation. **Antioxid Redox Signal** 7: 795–803, 2005.
- KLASTERSKY, J. Side Effects of Ifosfamide **Oncology**; 65(suppl 2):7–10, 2003.
- KOLB, N. S., HUNSAKER, L. A., JAGT, D. L. V. Aldose reductase-catalysed reduction of acrolein: implications in cyclophosphamide toxicity. **Mol. Pharmacol.**, v. 45, p. 797-801, 1994.

- 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** 173(5):1793–1796, 2005.
- KOUKOURAKIS, M. I.; FLORDELLIS, C. S.; GIATROMANOLAKI, A.; KOUKOURAKI, S.; KAPSORITAKIS, A.; POTAMIANOS, S.; RETALIS, G.; SIVRIDIS, E.; SALSAA, B.; HARRIS, A. L.; MARAGOUDAKIS, M. I. Oral administration of recombinant human granulocyte macrophage colon-stimulating factor in the management of radiotherapy-induced esophagitis. **Clin Cancer Res.**, v. 5, p. 3970 – 3976, 1999.
- KOUKOURAKIS, M. I.; KYRIAS, G.; KAKOLYRIS, S.; KOUROUSSIS, C.; FRANGIADAKI, C.; GIATROMANOLAKI, A.; RETALIS, G.; GEORGOULIAS, V. Subcutaneous administration of amifostine during fractionated radiotherapy: a randomized phase II study. **J Clin Oncol.** v. 18, p. 2226 – 2233, 2000.
- KRETH S., LEDDEROSE C., LUCHTING B., WEIS F., THIEL M. Immunomodulatory properties of pentoxifylline are mediated via adenosine-dependent pathways. **Shock**; 34:10-6, 2010.
- KUMAR KS, SINGH VK, JACKSON W, SEED TM. Inhibition of LPS-induced nitric oxide production in RAW cells by radioprotective thiols. **Exp Mol Pathol.** Feb;74(1):68-73, 2003.
- LEITE CA, ALENCAR VT, MELO DL, MOTA JM, MELO PH, MOURÃO LT, WONG DV, MAGALHÃES PJ, SANTOS AA, BRITO GA, LIMA-JÚNIOR RC, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. Target Inhibition of IL-1 Receptor Prevents Ifosfamide Induced Hemorrhagic Cystitis in Mice. **J Urol.** Dec;194(6):1777-86, 2015.

- LI, L.; BHATIA, M.; MOORE, P.K. Hydrogen sulfide – a novel mediator of inflammation? **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 6, p. 125 -129, 2006.
- LI N, CHEN L, MUH R. W., LI P. L. Hyperhomocysteinemia associated with decreased renal transsulfuration activity in Dahl S rats. **Hypertension** **47**:1094–1100, 2006.
- LIMA, M. V.; FERREIRA, F. V.; MACEDO, F. Y.; DE CASTRO BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Histological changes in bladders of patients submitted to ifosfamide chemotherapy even with mesna prophylaxis. **Cancer Chemother Pharmacol.**; 59(5):643-50, 2007.
- LIMA, M. V. A. Estudo dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. Fortaleza, 1994. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará.
- LIND, M. J., ROBERTS, H. L. Thatcher N and Idle JR: The effect of route of administration and fractionation of dose on the metabolism of ifosfamide. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 26, p. 105-111, 1990.
- LINKS M, LEWIS C. Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. **Drugs** 57: 293-308, 1999.
- LIST, A. F.; HEATON, R.; GLINMANN-GIBSON, B.; CAPIZZI, R. L. Amifostine protects primitive hematopoietic progenitors against chemotherapy cytotoxicity. **Semin Oncol.** v. 23, p. 58 – 63, 1996.

- LIU JJ, LIN M, YU JY, LIU B, BAO JK. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. **Cancer Lett.** Jan 28;300(2):105-14, 2011.
- LOEHRER, P. J. (Chairman) Ifosfamide. **Semin. Oncol.**, v. 17, suppl. 4. P. 1-79, 1990.
- LOGAN R. M., STRINGER A. M., BOWEN J. M., YEOH A. S., GIBSON R. J., SONIS S. T., KEEFE D. M. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treat Rev.**; 33(5):448-60, 2007.
- LOW , J. E., BORCH, R. F., SLADEK, N. E. Futher studies on the conversion of 4- hydroyoazaphosphorines to reactive mustards and acrolein in inorganic buffers. **Cancer Res.**, v. 43, p. 5815-5820, 1983.
- LV W, ZHANG M, ZHANG Z, HUANG L, YANG S, YIN L, HONG J, HAN D, CHEN C, VIDYASAGAR S, OKUNIEFF P, ZHANG L. Amifostine acts upon mitochondria to stimulate growth of bone marrow and regulate cytokines. **Adv Exp Med Biol.**;789:195-201, 2013.
- MACEDO FY, BALTAZAR F, ALMEIDA PR, TAVORA F, FERREIRA FV, SCHMITT FC, BRITO GA, RIBEIRO RA. Cyclooxygenase-2 expression on ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **J Cancer Res Clin Oncol**; 134:19-27, 2008a.
- MACEDO F. Y., BALTAZAR F., MOURAO 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.**; 59(6):425-30, 2008b.

- MACEDO F.Y., MOURAO L.T., FREITAS H.C., LIMA-JUNIOR R.C., WONG D.V., ORIA 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**; doi:10.1007/s10753-011-9319-3, 2011a.
- MACEDO F. Y., MOURAO L. T., PALHETA R. C. Jr., JUCÁ D. M., LIMA R. C. Jr., NETO J. de 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.**; 67(4):935-43, 2011b.
- MAGGI C.A., CATALIOTO R.M., CRISCUOLI M., CUCCHI P., GIULIANI S., LECCI A., LIPPI A., MEINI S., PATACCHINI R., RENZETTI A.R., SANTICIOLI P., TRAMONTANA M., ZAGORODNYUK V., GIACHETTI A. Tachykinin receptors and intestinal motility. **Can J Physiol Pharmacol**; 75:696-703, 1997.
- MAGGI, C. A., PATACCHINI, R., GIACHETTI, A., MELI, A. Tachykinin receptors in the circular muscle of the guinea-pig ileum. **Br J Pharmacol**; 101: 996–1000, 1997.
- MAGGI ,C. A., SANTICIOLI, P., DEL BIANCO, E., LECCI, A., GUILIANI, S. Evidence for the involvement of bradykinin in chemically-evoked cystitis in anaesthetized rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**; 347(4):432-7, 1993.
- MAGGI, C. A., SANTIOCIOLI, P., GIULIANI, S., FURIO, M., MELI, A. The capsaicin sensitive innervation of the rat urinary bladder: further studies on mechanisms regulating micturition threshold. **J Urol** 1986;136: 696–700, 1986.

- MAINIER, F.B.; VIOLA, E.D.M. O sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e o meio ambiente. In: SIMPÓSIO DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO E TECNOLOGIA – SEGeT', 2., 2005.
- MARCEAU F., REGOLI D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nat Rev Drug Discov**; 3:845-52, 2004.
- McCAULEY, D.L. Amifostin. A novel cytoprotective agent. **Cancer Pract.** v. 5, p. 189 -181, 1997.
- McCULLOCH W., SCHEFFLER B.J., SCHEIN P.S. New protective agents for bone marrow in cancer therapy. **Cancer Invest.**, v. 9, p.279, 1991.
- MEDEIROS, J-V., R. Efeito do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na defesa da mucosa e controle da motilidade gástrica – papel dos neurônios aferentes, receptors vanilóides do tipo 1 (TRPV1) e canais de K ATP- dependents. Tese de doutorado – Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, 2009.
- MILBY, T.H.; BASELT, R.C. Hydrogen sulfide poisoning: clarification of some controversial issues. **Am. J. Ind. Med.**, v. 35, p. 192-195, 1999.
- MOORE P. K., BATHIA M., MOOCHALA S. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? **Trends Pharmacol Sci** 2003; 24: 609–11, 2003.
- MORGAN, L. R., HARRISON, E. F., HAWAKE, J. E., HUNTER, H. L., COSTANZI, J. J., PLOTKLIN, D., TUCKER, W. G., WORRALL, P. M.: Toxicity of single vs. fractioned dose ifosfamide in non-small cell lung cancer: A multi-center study. **Semin Oncol** ;9(suppl 1):66–70, 1982.



- MOVSAS B., SCOTT C., LANGER C., WERNER-WASIK M., NICOLAOU N., KOMAKI R., MACHTAY M., SMITH C., AXELROD R., SARNA L., WASSERMAN T., BYHARDT R. Randomized Trial of Amifostine in Locally Advanced Non Small-Cell Lung Cancer Patients Receiving Chemotherapy and Hyperfractionated Radiation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 98-01. **Journal of Clinical Oncology**. Philadelphia, v.23, n. 10, p. 2145- 2154, apr.2005.
- MOY B. Cystitis in patients with cancer. In: UpToDate version 20.3 via <http://www.uptodate.com/contents/cystitis-in-patients-with-cancer> (Accessed 15 February 2012).
- NAKAMURA J., SHAW C.M., BROWN D.Q. Hydrolysis of WR2721 by mouse liver cell fractions. **Radiat. Res.**, v. 109, p. 143-152, 1987.
- OMS, 2011. World Health Organization - NCD Country Profiles , 2011.
- ORMSTAD, K. & UEHARA, N. Renal transport and disposition of Na<sub>2</sub>-mercaptoethanosulphonate disulphide (dimesna) in the rat. **FEBS Lett.**, v. 150, p. 354-358, 1982
- ORMSTAD, K., ORHENIUS, S., LASTBON, T., UEHARA, N., POHL, J. & BROCK, N. Pharmacokinetics and metabolism of sodium 2-mercaptoethanosulphonate in the rat. **Cancer Res.**, v. 43, p. 333 –338, 1983.
- OSCHATZ C, MAAS C, LECHER B, JANSEN T, BJÖRVIST J, TRADLER T, SEDLMEIER R, BURFEIND P, CICHON S, HAMMERSCHMIDT S, MÜLLER-ESTERL W, WUILLEMIN WA, NILSSON G, RENNÉ T. Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. **Immunity**. Feb 25;34(2):258-68, 2011.

- 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.**; 32(3):185-9, 2004.
- PAINE G.D., TAYLOR C.W., LOPEZ M.H., JONHSON C.S., CAPIZZI R.L. Effects of amifostine and paclitaxel on growth of human ovarian carcinoma xenografts in the severe combined immune-deficient mouse: preliminary results. **Semin. Oncol.**, 23(Suppl 8):35, 1996.
- PARAMESWARAN N., PATIAL S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.**; 20(2):87-103, 2010.
- PATACCHINI, R., SANTICIOLI, P., GIULIANI, S., MAGGI, C. A. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. **Br. J. Pharmacol.** 142, 31–34, 2004.
- PATACCHINI, R., SANTICIOLI, P., GIULIANI, S., MAGGI, C. A.. Pharmacological investigation of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) contractile activity in rat detrusor muscle. **Eur J Pharmacol**; 509: 171–7, 2005.
- PHILIPS F. S., STERNBERG S. S., CRONIN A. P., VIDAL P. M. Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. **Cancer Res.**; 21:1577-89, 1961.
- PHYSICIANS' DESK REFERENCE, v.52, p. 2299-2302, 1998.
- PRIMACK, A. Amelioration of cyclophosphamide-induced cystitis. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 47, p. 223,1971.

- RENNER S, KLINGEBIEL T, NIETHAMMER D, BRUCHELT G, MEISSNER T, EISENBEISS F. Isotachophoretic determination of phosphate splitting from Amifostine and p-nitrophenyl phosphate in serum and neuroblastoma cells. **J Chromatogr A**. Apr 9;838(1-2):251-7, 1999.
- REYNOLDS, R. D., SIMMERVILLE, J. J., O'HARA, D. D., HART, J. B., PARKINSON, J. E. Hemorrhagic cystitis due to cyclophosphamide. **J Urol.**, v. 101, p. 45, 1969.
- 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.**; 167(5):2229-34, 2002.
- RIBEIRO R. A., LIMA- JUNIOR, R. C. P., LEITE, C. A. V. G., MOTA, J. M. S. C., MACEDO, F. Y., LIMA, M. V., BRITO, G..A. C . Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches and new insights. **J Exp Integr Med.**, 2(2): 95-112, 2012.
- RIBEIRO, R. A., SOUZA-FILHO, M. V. P., SANTOS, C. C., LIMA, M. V. A., LIMA, M. M. P., BALLEJO, G., CUNHA, F. Q. Involvement of nitric oxide and TNF $\alpha$  in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced cystitis. In: INTERNATIONAL CANCER CONGRESS, 17., Italy,. **Proceedings**, p. 227-231, 1998.
- RIBEIRO RA, VALE ML, THOMAZZI SM, PASCHOALATO AB, POOLE S, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol**. Jan 3;387(1):111-8, 2000.

- RODRIGUES A. A. S., Terapêutica quimioterápica e citoprotetora em pacientes oncológicos. **Rev Pesq Inov Farm** v. 2, n.1, PP 37-47, 2010.
- RUBIN, D. B.; DRAB, E. A.; KANG, H. J.; BAUMANN, F. E.; BLAZEC, E. R.; WR-1065 and radioprotection of vascular endothelial cells. I. Cell proliferation, DNA synthesis and damage. **Radiat Res**, v. 145, p. 210 – 216, 1996.
- RUBIN, J. S. & RUBIN, R. T. Cyclophosphamide hemorrhagic cystitis. **J. Urol.**, v. 96, p. 313, 1966.
- RUDICK CN, BRYCE PJ, GUICHELAAR LA, BERRY RE, KLUMPP DJ. Mast cell-derived histamine mediates cystitis pain. **PLoS One**. May 7;3(5):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**; 173:699-703, 1991.
- SAROSY, G. Ifosfamide – Pharmacologic overview. **Semin. Oncol.**, v. 16, p. 2-8, 1989.
- SASSE, A. D.; CLARK, L. G.; SASSE, E. C.; CLARK, O. A. Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy: results of a meta-analysis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. v. 64, p. 784 -791, 2006.
- SAYERS TJ. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother**. Aug;60(8):1173-80, 2011.

- SCHEEF, W. & SOEMER, G. Treatment of solid tumors with Holoxan and Uromitexan. **Joint Symposium Study Group for Oncology of the German Cancer Society and Asta-Werke AG**, Düsseldorf 29 February, p. 21-25, 1980.
- SCHILLER, J. H.; STORER, B.; BERLIN, J.; WITTENKELLER, J.; LARSON, M.; PHARO, L.; LARSON, M.; BERRY, W. Amifostine, cisplatin, and vinblastine in metastatic non-small-cell lung cancer: a report of high response rates and prolonged survival. **J Clin Oncol.**, v 14, p. 1913 – 1921, 1996.
- SCHUCHTER L. M. Guidelines for the administration of amifostine. **Semin. Oncol.**, 23(Suppl 8):40, 1996.
- SEBER A., SHU X.O., DEFOR T., SENCER S., RAMSAY N. Risk factors for severe hemorrhagic cystitis following BMT. **Bone Marrow Transplant**; 23:35-40, 1999.
- SENER G., SEHIRLI O., ERCAN F., SIRVANCI S., GEDIK N., KACMAZ A. Protective effect of MESNA (2-mercaptoethane sulfonate) against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. **Surg Today** 35(7):575–580, 2005.
- SHAW I. C., GRAHAM, M. I. Mesna a short review. **Cancer Treat. Rev.**, v. 14, p. 67 – 86, 1987.
- SHAW L. W., GLOVER D. J., TURRISI A. et al. Pharmacokinetics of WR-2127. **Pharmacol. Ther.**, v. 39, p. 195-201, 1988.
- SHAW, I. C., GRAHAM, M. I. & JONES, M. The fate of sodium [U<sup>14</sup>C]-mercaptoethanosulphonate in the rat. **Arzneim.-Forsch.**, v. 36, p. 487 – 489, 1986.

- SHEPHER J. D., PRINGLE L. E., BARNETT M. J., KLINGEMANN H. G., REECE D. E., PHILIPS G. L. Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. **J Clin Oncol.**; 9(11):2016-20, 1991.
- SHIMIZU, S.; EGUSHI, Y.; KAMIIKE, W.; ITOH, Y.; HAZEGAWA, J.; YAMABE, K.; OTSUKI, Y.; MATSUDA, H.; TSUJIMOTO, Y. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. **Cancer Res.** v. 6, p. 2161 – 2166, 1996.
- SHIMIZU K, OGAWA F, HARA T, YOSHIKAWA A, MUROI E, YANABA K, AKIYAMA Y, YAMAOKA T, SATO S. Exogenous application of hydrogen sulfide donor attenuates inflammatory reactions through the L-selectin-involved pathway in the cutaneous reverse passive Arthus reaction. **J Leukoc Biol.** Apr;93(4):573-84, 2013.
- SHROM, S. H., DONALDSON, M. H., DUCKETT, J. W., WEIN, A. J. Formalin treatment for intractable hemorrhagic cystitis. A review of the literature with 16 additional cases. **Cancer**, v. 38, p. 1785, 1976.
- SINGH, A. K.; MÉNARD, C.; GUION, P.; SIMONE, N. L.; CROUSE, N. S.; GODETTE, D. J.; COOLEY-ZGELA, T.; SCIUTO, L. C.; COLEMAN, J.; PINTO, P.; ALBERT, P. S.; CAMPHAUSEN, K.; COLEMAN, C. N. Intraretal amifostine suspension may protect against acute proctitis during radiation therapy for prostate cancer: a pilot study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 65, p. 1008 – 1013, 2006.

- SOUZA C.A., VIGORITO A.C., ARANHA F.J.P., OLIVEIRA G.B., KÁTIA A. B. EID K.A.B., RUIZ M.A. Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica. **Rev.bras.hematol.hemoter.**22(2): 123-128, 2000.
- SOUZA-FILHO, M. V. P., LIMA, M. V. A., POMPEU, M. M. L., 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, p. 247-256, 1997.
- SRIVASTAVA A., NAIR, S.C., SRIVASTAVA. V.M., BALAMURUGAN,A.N., JEYSEELAN,I.,CHANDY M.,GUNASEKARAN S. Evaluation of uroprotective efficacy of amifostine against cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis. **Bone Marrow Transplant**, v.23, p.463-467, 1999.
- STILLWELL T. J., BENSON R. C. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis: a review of 100 patients. **Cancer.**; 61: 451–457, 1988.
- STRENG T., AXELSSON H.E., HEDLUND P. , ANDERSSON D.A. , JORDT S., BEVAN S., ANDERSSON K-E. , HOGESTATT E.D., ZYGMUNT P.M. Distribution and Function of the Hydrogen Sulfide–Sensitive TRPA1 Ion Channel in Rat Urinary Bladder **European urology** 53, 391–400, 2008.
- SWEENEY T. R. A survey of compounds from the antiradiation drug development program of the US Army Medical Research and Development Command. Washington, DC. **Walter Reed Army Institute of Research**, 1979.

- TAKAMOTO S., SAKURA N., NAMERE A. *et al.* Monitoring of urinary acrolein concentration in patients receiving cyclophosphamide and ifosfamide . **J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 806: 59-63, 2004.
- TANG C.S., LI X.H., DU J.B. Hydrogen sulfide as a new endogenous gaseous transmitter in the cardiovascular system. **Curr Vasc Pharmacol**; 4: 17–22, 2006.
- TANNEHILL, S. P.; MEHTA, M. P. Amifostine and radiation therapy: past, present and future. **Semin Oncol.** v. 23, p. 69 – 77, 1996.
- TOLLEY, D. A. The effect of N-acetyl cysteine on cyclophosphamide cystitis. **Br. Urol.**, v. 49, p. 659, 1977.
- TOLLEY DA, CASTRO JE. Cyclophosphamide-induced cystitis of the urinary bladder of rats and its treatment. **Proc R Soc Med**; 68:169-70, 1975.
- TOMINAGA, M., NUMAZAKI, M., LIDA, T., MORIYAMA, T., TOGASHI, K., HIGASHI, T., *et al.* Regulation mechanisms of vanilloid receptors. *Novartis Found Symp*; 261: 4–12, 2004.
- TOPAL T, OZTAS Y, KORKMAZ A, SADIR S, OTER S, COSKUN O, BILGIC H Melatonin ameliorates bladder damage induced by cyclophosphamide in rats. **J Pineal Res** 38(4):272–277, 2005.
- TRESKES M. M, BOVEN E., VAN DR LOOSDRECHT A. A. *et al.* Effects of the modulating agent WR-2721 on mielotoxicity and antitumor activity in carboplatin-treated mice. **Eur. J. Cancer**, v.30, p. 183-187, 1994.



- TURRISI A. T., GLOVER D. J., HURWITZ S., GLICK J., NORFLEET A. L., WEILER C., YUHAS J. M., KLIGERMAN M. M. Final report of the phase I trial of single dose WR-2721 (s-2 (3aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid). **Cancer Treat. Rep.**, v.70, p.1389, 1986.
- UMA DEVI P., and PRASANA, P. G. S. Radioprotective effect of combinations of WR-2721 and mercaptopropionylglycine on mouse bone marrow chromossomes. **Radiat. Res.**, v. 124, p. 165-170, 1990.
- VALERIOTE, F.; TOLEN, S. Protection and potencionation of nitrogen mustard cytotoxicity by WR-2721. **Cancer Res.** v. 42, p. 4330 -4331, 1982.
- VAN DER VIJGH W. J., PETERS G. J. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine (Ethyol): preclinical aspects. **Semin. Oncol.**, 21 (Suppl 11):2, 1994.
- VIEIRA A.C.F.; LOPES F.F. EFEITOS DA RADIOIODOTERAPIA NAS GLÂNDULAS SALIVARES. **Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo** 22(3): 216-22, 2011.
- VIEIRA, M.M., BRITO, G.A., BELARMINO-FILHO, J.N., MACEDO, F.Y., NERY, E.A., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A. Use of dexamethasone with mesna for the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Int J Urol**; 10:595-602, 2003.
- VOGELZANG N. J.;TORKELSON, J. L.; KENNEDY, B. J. Hypomagnesemia, renal dysfunction, and Raynaud's phenomenon in patients treated with cisplatin, vinlastine and bleomycin. **Cancer** v. 56, p. 2765 – 2770, 1985.

- WADLER, S.; GOLDBERG, G.; FIELDS, A.; ANDERSON, P.; BEITLER, J.J.; SOOD, B.; HAYNES, H.; HUNOWICZ, C. The potencial role of amifostine in conjunction with cisplatin in the treatment of locally advanced carcinom of cervix. **Semin Oncol.** v. 23, p. 64 – 68, 1996.
- WAGNER, T. Ifosfamide clinical pharmacokinetics. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 26, p. 439-456, 1994.
- WAGNER, W.; PROTT, F. J.; SCHONEKAS, K. G. Amifostine: a radioprotector in locally advanced head and neck tumors. **Oncol Rep.**, v 5, p. 1255 – 1257, 1998.
- WANG R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? **FASEB J**; 16: 1792–8, 2002.
- WANG Y, JIA J, AO G, HU L, LIU H, XIAO Y, DU H, ALKAYED NJ, LIU CF, CHENG J. Hydrogen sulfide protects blood-brain barrier integrity following cerebral ischemia. **J Neurochem.** Jun;129(5):827-38, 2014.
- WATSON N. A., NOTLEY R. G. Urological complications of cyclophosphamide. **Br J Urol.**; 45(6):606-9, 1973.
- WEST, N. J. Prevenction and treatment of hemorrhagic cystitis. **Pharmacotherapy**, v. 17, p. 696-706, 1997.
- WIMALAWANSA, S. J. Antihypertensive effects of oral calcium supplementation may be mediated through the potent vasodilator CGRP. **Am J Hypertens**; 6: 996–1002, 1993.

- WOZIAC, K.; GLOC, E.; MORAWIEC, Z.; BLASIAC, J. Amifostine can differentially modulate DNA double-strand breaks and apoptosis induced by idarubicin in normal and cancer cells. **Exp. Oncol.** 30, 1, 22-28, 2008.
- WU, L.; WANG, R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. **Pharmacol. Rev.**, v.5, p. 585 – 630, 2005.
- XIN, H., TANAKA, H., YAMAGUCHI, M., TAKEMORI, S., NAKAMURA, A., KOHAMA, K. Vanilloid receptor expressed in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun**; 332: 756–62, 2005.
- YANG J.L., FERNANDES D.J., SPEICHER L. CAPIZZI R.L. Biochemical determinants of the cytoprotective effect of amifostine (meeting abstract). **Proc. Ann. Meet Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 36, p. 1725, 1995.
- YUHAS J.M. Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by S-2(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid. **Cancer Res.**, v. 40, p. 1519, 1980.
- YUHAS J.M. Differential protection of normal and malignant tissues against the cytotoxic effects of mechlorethamine. **Cancer Treat. Rep.**, v. 63, p. 971, 1979.
- YUHAS J.M., CULO F. Selective inhibition of the nephrotoxicity of *cis*-dichlorodiammineplatinum (ii) by WR-2721 without altering its antitumor properties. **Cancer Treat. Rep.**, v. 64, p.57, 1980.
- ZALUPSKI, M., BAKER, L. H., Ifosfamide. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 80, p. 556, 1988.

- ZARPELON AC, CUNHA TM, ALVES-FILHO JC, PINTO LG, FERREIRA SH, MCINNES IB, XU D, LIEW FY, CUNHA FQ, VERRI WA JR. IL-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E2. **Br J Pharmacol.** May;169(1):90-101, 2013.
- ZELTZ C, GULLBERG D. Post-translational modifications of integrin ligands as pathogenic mechanisms in disease. **Matrix Biol.** Nov;40:5-9, 2014.
- ZHAO W., NDISANG J. F. e WANG R Modulation of endogenous production of H<sub>2</sub>S in rat tissues. **Can J Physiol Pharmacol** 81:848–853, 2003.
- ZYGMUNT, P. M., JULIUS, I., DI MARZO, I., HOGESTATT, E. D. Anandamide– the other side of the coin. **Trends Pharmacol Sci**; 21: 43–4, 2000.