

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
CICLOFOSFAMIDA E IFOSFAMIDA - ENVOLVIMENTO
DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO NA PATOGÊNESE
DA LESÃO INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

TERESA NEUMA ALBUQUERQUE GOMES

Dissertação submetida à coordenação do curso
de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará como requisito parcial para a
obtenção do grau de mestre.

Orientador: RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO

FORTALEZA
1995

FC-00002600-5

BIBLIOTECA CENTRAL
483729
03 1 05 196

G633c
1995

Gomes, Teresa Neuma Albuquerque
Cistite Hemorrágica Induzida por
Ciclofosfamida Ifosfamida - Envolvimento de
Citocinas e Óxido Nítrico na Patogênese da
Lesão Induzida por Ciclofosfamida / Teresa
Neuma Albuquerque Gomes. - Fortaleza, 1995.

116p. :il.

Orientador: Prof. Ronaldo de Albuquerque
Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e
Farmacologia.

1. Cistite Hemorrágica 2. Ciclofosfamida
3. Ifosfamida I. Título

CDD 616.623

CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
CICLOFOSFAMIDA E IFOSFAMIDA - ENVOLVIMENTO DE CITOCINAS E
ÓXIDO NÍTRICO NA PATOGÊNESE DA LESÃO INDUZIDA POR
CICLOFOSFAMIDA

Teresa Neuma Albuquerque Gomes

Aprovada em 22.12.1995

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)
Depto. de Fisiologia e Farmacologia - CCS-UFC

Prof. Fernando de Queiroz Cunha
Depto. de Farmacologia da FMRP-USP

Prof. Francisco Dário Rocha Filho
Depto. de Patologia e Medicina Legal - CCS-UFC

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

Aos professores Carlos Alberto Flores, Francisco Airton Castro da Rocha, Manoel Odorico de Moraes, Marcus Vale e Fernando de Queiroz Cunha.

Aos bolsistas Márcio E. F. Moreira, Marcus V. P. Souza Filho e, em especial, ao Cláudio C. Santos.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação e Câncer do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Ao secretário da pós-graduação, Vasco Diógenes Bastos.

Aos professores Geraldo de Sousa Tomé, Margarida Maria de Lima Pompeu e Talapala Govindaswamy Naidu.

Aos demais colegas do setor de Patologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará.

Ao Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Ceará.

A minha família e, em particular, ao José Gerardo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
I. INTRODUÇÃO	1
1. Oxazafosforinas	1
1.1. Ciclofosfamida	2
1.2. Ifosfamida	4
2. Cistite Hemorrágica	7
2.1. Considerações gerais	7
2.2. Mesna	10
3. Inflamação aguda	11
3.1. Eventos vasculares	12
3.2. Eventos celulares	12
3.3. Mediadores químicos	14
3.4. Citocinas e a resposta inflamatória	18
4. O modelo experimental de Cistite Hemorrágica induzida por Oxazafosforinas	25
5. Objetivos	26
II. MATERIAIS E MÉTODOS	28
1. Animais	28
2. Aparelhos e instrumentos de laboratórios	28
3. Drogas e dissoluções	29
4. Soluções e corantes	30
5. Indução de Cistite Hemorrágica	31
5.1. Determinação do peso vesical úmido	31
5.2. Determinação da permeabilidade vascular vesical ..	31
5.3. Análise Histopatológica	32
6. Avaliação da citoproteção vesical exercida pelo Mesna na Cistite Hemorrágica	33
7. Papel de citocinas na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	33
7.1. Avaliação do efeito do soro anti-TNF- α	33

7.2	Avaliação do efeito do soro anti-IL-1 β	33
7.3.	Avaliação do efeito do soro anti-IL-6	34
7.4.	Avaliação do efeito do soro anti-IL-8	34
8.	Efeito de Dexametasona, Pentoxifilina e Talidomida na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida .	34
8.1.	Avaliação do efeito de doses crescentes de Dexametasona sobre a lesão	34
8.1.1.	Avaliação do efeito de Dexametasona no curso temporal da lesão	35
8.2.	Avaliação do efeito de doses crescentes de Pentoxifilina sobre a lesão	35
8.2.1.	Avaliação do efeito de Pentoxifilina no curso temporal da lesão	35
8.3.	Avaliação do efeito de doses crescentes de Talidomida sobre a lesão	36
8.3.1.	Avaliação do efeito de Talidomida no curso temporal da lesão	36
9.	Avaliação do efeito da associação de Dexametasona, Pentoxifilina e Talidomida na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	36
10.	Efeito do composto BN-52021 na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	37
10.1.	Avaliação do efeito de doses crescentes de BN-52021 sobre a lesão	37
10.2.	Avaliação do efeito do BN-52021 no curso temporal da lesão	37
11.	Efeito do L-NAME na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	37
12.	Efeito de L-arginina e D-arginina na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida em animais pré-tratados com L-NAME	38
13.	Análise estatística	38
III.	RESULTADOS	39
1.	Modelo Experimental com Ciclofosfamida	39

1.1. Efeito de doses crescentes de Ciclofosfamida em bexigas de camundongos em 12 horas	39
1.2. Cinética da Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	39
2. Modelo Experimental com Ifosfamida	45
2.1. Efeito de doses crescentes de Ifosfamida em bexigas de camundongos em 12 horas	45
2.2. Cinética da Cistite Hemorrágica induzida por Ifosfamida	45
3. Avaliação da citoproteção vesical exercida pelo Mesna na Cistite Hemorrágica	46
3.1. Efeito do Mesna na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	46
3.2. Efeito do Mesna na Cistite Hemorrágica induzida por Ifosfamida	46
4. Papel de Citocinas na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	51
4.1. Efeito do soro anti-TNF- α na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	51
4.2. Efeito do soro anti-IL-1 β na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	54
4.3. Efeito do soro anti-IL-6 na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	58
4.4. Efeito do soro anti-IL-8 na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	59
5. Efeito de Dexametasona, Pentoxifilina e Talidomida na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida .	63
6. Efeito da associação de Dexametasona, Pentoxifilina e Talidomida na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	72
7. Efeito do composto BN-52021 na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	74
8. Efeito do L-NAME na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida	77
9. Efeito de doses crescentes de L-arginina na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida em animais	

pré-tratados com L-NAME	77
IV. DISCUSSÃO	81
V. CONCLUSÕES	96
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

ABREVIATURAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

AA	- Ácido aracdônico
C3a	- Terceiro componente do complemento ativado
C5a	- Quinto componente do complemento ativado
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
RNA	- Ácido Ribonucleico
IFS	- Ifosfamida
CFS	- Ciclofosfamida
SNC	- Sistema Nervoso Central
g	- Grama(s)
m	- Metro(s)
iv	- Intravenoso
ip	- Intraperitonal
CH	- Cistite Hemorrágica
LPS	- Lipopolissacarídeo de Bactérias
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
IL-1	- Interleucina 1
IL-2	- Interleucina 2
IL-4	- Interleucina 4
IL-6	- Interleucina 6
IL-8	- Interleucina 8
ELAM-1	- Endothelial leucocyte adhesion molecule-1
LAM-1	- Leucocyte adhesion molecule-1
ICAM-1	- Intercellular adhesion molecule-1
IFN- γ	- Interferon gama
VCAM-1	- Vascular cell adhesion molecule-1
PAF	- Fator ativador de plaquetas
LTB4	- Leucotrieno B4
LTC4	- Leucotrieno C4
LTD4	- Leucotrieno D4

NO	- Óxido nítrico
NADPH	- Forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NOS	- Óxido nítrico sintase
GN-CSF	- Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	- Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
h	- horas
HE	- Hematoxilina e Eosina
HPETE	- Ácido hidroxiperoxieicosatetranóico
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
PGD ₂	- Prostaglandina D ₂
PGI ₂	- Protaciclina
RNAM	- Ácido ribonucleico mensageiro
FMLP	- N-Formil-L-Metionil-L-Leucil-L-Fenil-Alanina
PBS	- Solução salina tamponada
L-NAME	- L-nitro arginina metil éter
MESNA	- 2-mercaptoetanosulfonato sódico
EPM	- Erro padrão da média
mg	- Miligrama
kg	- Quilograma
μl	- Microlitro
μm	- micrômetro
R	- Coeficiente de correlação
sc	- Subcutâneo
SRS-A	- Substância de reação lenta da anafilaxia
TXA ₂	- Tromboxano A ₂

RESUMO

CISTITE HEMARRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA E IFOSFAMIDA - ENVOLVIMENTO DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO NA PATOGÊNESE DA LESÃO INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

A cistite hemorrágica (CH) surge como um efeito adverso do uso clínico de ciclofosfamida (CFS) e ifosfamida (IFS). No presente estudo avaliou-se o envolvimento de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) e de óxido nítrico (NO) nos eventos inflamatórios da CH. Para tanto produziu-se CH através da administração de CFS e IFS (100-400 mg/kg, ip) em camundongos Swiss machos que foram sacrificados após 6, 12, 24, 48 e 72 horas e tiveram suas bexigas avaliadas quanto ao peso úmido, extravasamento vascular pela técnica do azul de Evans (25 mg/kg, iv, 1 hora antes do sacrifício) e análise histopatológica com classificação efetuada segundo os critérios de Gray (descamação urotelial, úlcera, edema, congestão, hemorragia e infiltração leucocitária).

Observou-se que CFS e IFS induziu de forma dose e tempo dependente significativo aumento do extravasamento vascular e do peso úmido vesical, com efeito máximo em 12 horas, onde há severas alterações à histopatologia. A utilização de 2-mercaptoetanosulfonato sódico (mesna), um uroprotetor de comprovada eficácia clínica, conferiu proteção vesical tanto na CH induzida por CFS, quanto na induzida por IFS.

O pré-tratamento dos animais com soros anti-TNF- α reduziu significativamente os eventos inflamatórios da CH induzida por CFS nos tempos de 6 e 12 horas. O pré-tratamento com soros anti-IL-1 β , anti-IL-6 e anti-IL-8 também resultou em atenuação da lesão, contudo sendo significativa somente em 12 horas, sugerindo que TNF- α já participe dos eventos inflamatórios que ocorrem na cistite hemorrágica em etapa mais precoce.

RESUMO

CISTITE HEMARRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA E IFOSFAMIDA - ENVOLVIMENTO DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO NA PATOGÊNESE DA LESÃO INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

A cistite hemorrágica (CH) surge como um efeito adverso do uso clínico de ciclofosfamida (CFS) e ifosfamida (IFS). No presente estudo avaliou-se o envolvimento de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) e de óxido nítrico (NO) nos eventos inflamatórios da CH. Para tanto produziu-se CH através da administração de CFS e IFS (100-400 mg/kg, ip) em camundongos Swiss machos que foram sacrificados após 6, 12, 24, 48 e 72 horas e tiveram suas bexigas avaliadas quanto ao peso úmido, extravasamento vascular pela técnica do azul de Evans (25 mg/kg, iv, 1 hora antes do sacrifício) e análise histopatológica com classificação efetuada segundo os critérios de Gray (descamação urotelial, úlcera, edema, congestão, hemorragia e infiltração leucocitária).

Observou-se que CFS e IFS induziu de forma dose e tempo dependente significativo aumento do extravasamento vascular e do peso úmido vesical, com efeito máximo em 12 horas, onde há severas alterações à histopatologia. A utilização de 2-mercaptoetanosulfonato sódico (mesna), um uroprotetor de comprovada eficácia clínica, conferiu proteção vesical tanto na CH induzida por CFS, quanto na induzida por IFS.

O pré-tratamento dos animais com soros anti-TNF- α reduziu significativamente os eventos inflamatórios da CH induzida por CFS nos tempos de 6 e 12 horas. O pré-tratamento com soros anti-IL-1 β , anti-IL-6 e anti-IL-8 também resultou em atenuação da lesão, contudo sendo significativa somente em 12 horas, sugerindo que TNF- α já participe dos eventos inflamatórios que ocorrem na cistite hemorrágica em etapa mais precoce.

O pré-tratamento dos animais com os inibidores da síntese de TNF- α , dexametasona (0,5-2,0 mg/kg), pentoxifilina (15-45mg/kg) ou talidomida (10-40 mg/kg), resultou em redução significativa e dose dependente da lesão vesical induzida por CFS.

A associação de dexametasona, pentoxifilina e talidomida nas menores doses resultou em marcante redução da lesão vesical, possivelmente por ação sinérgica, uma vez que elas afetam a síntese de TNF- α em pontos distintos da via biossintética dessa citocina.

Em adição, o pré-tratamento dos animais com L-NAME, inibidor da síntese de NO, induziu um bloqueio significativo e dose dependente dos eventos inflamatórios da CH induzida por CFS, sendo tal efeito revertido pelo co-tratamento com L-arginina.

Os dados acima indicam ser expressiva a participação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) e de NO na CH induzida por CFS e sugerem que TNF- α possa ser o mediador inicial que desencadeia a cascata de outros mediadores envolvidos na lesão da CH.

HEMORRHAGIC CYSTITIS INDUCED BY CYCLOPHOSPHAMIDE AND IFOSFAMIDE - THE INVOLVEMENT OF CYTOKINES AND NITRIC OXIDE IN THE PATHOGENESIS OF THE LESION INDUCED BY CYCLOPHOSPHAMIDE

Hemorrhagic cystitis (HC) develops as an adverse side effect of the clinical use of cyclophosphamide (CYP) and ifosfamide (IFS). In the present study, the involvement of cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8) and nitric oxide (NO) in the inflammatory events of HC was evaluated. HC was induced by injecting CYP and IFS (100-400 mg/Kg, i.p.) in male Swiss mice. The animals were sacrificed after 6,12,24,48 and 72 hours and their urinary bladders were evaluated for wet weight and vascular leakage by Evans blue leakage method (25 mg/Kg, i.v., 1 hour before sacrifice), as well as histopathological analysis using Gray's criteria (urothelial shedding, ulcer, edema, congestion, hemorrhage and leukocyte infiltration).

It was observed that CYP and IFS induced, in a dose and time-dependent manner, a significant increase in vascular leakage and wet bladder weight, with maximum effect at 12 hours, when severe histopathological alterations occurred. The use of 2-sodium mercaptoethanosulfonate (mesna)- a proven, clinically-efficient uroprotector - conferred urinary bladder protection against HC induced by both CYP and IFS.

The pretreatment of animals with antisera against TNF- α significantly diminished the inflammatory events of HC induced by CYP, in 6 and 12 hour periods. Pretreatment with antisera against IL-1 β , IL-6 and IL-8, also resulted in the attenuation of the lesion, but the result was significant only at 12 hour period, thus suggesting that TNF- α participated in the early stages of inflammatory events occurring in HC.

The pretreatment of animals with TNF- α synthesis inhibitors - dexamethasone (0.5 -2.0 mg/KG), pentoxyphillin (15 - 45 mg/Kg) or thalidomide (10 -40 mg/Kg) - resulted in a significant and dose-dependent reduction of the bladder lesion caused by CYP.

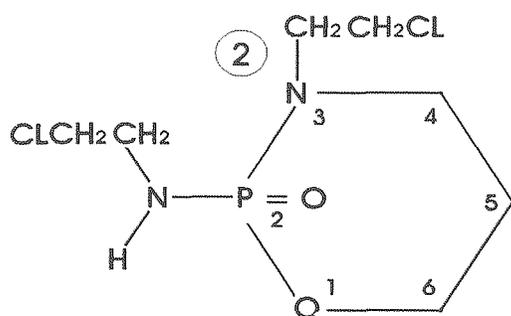
Dexamethasone, pentoxyphillin and thalidomide association, in smaller doses, caused a marked reduction in the vesical lesion, possibly by synergistic action, as they interfere with the synthesis of TNF- α at different stages of the biosynthesis of this cytokine.

In addition, pretreatment of the animals with L-NAME, an inhibitor of the synthesis of NO, induced a significant and dose-dependent blockade of inflammatory events of HC induced by CYP, with the effect being reversed by co-treatment with L-arginine.

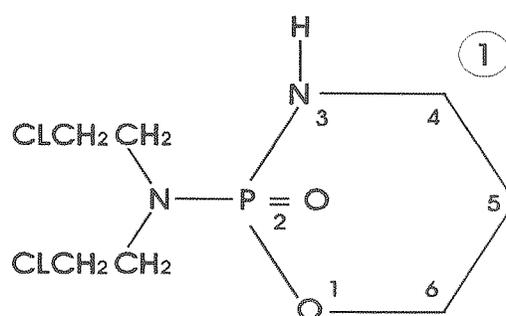
I-INTRODUÇÃO

1- OXAZAFOSFORINAS

As oxazafosforinas, Ciclofosfamida e Ifosfamida, são fármacos alquilantes que têm a capacidade de estabelecer ligações covalentes com bases nitrogenadas do ácido desoxiribonucleico (DNA), através de grupos alquilas, ou seja, através de radicais de hidrocarbonetos que se ligam a cadeias principais de compostos orgânicos. O resultado dessa alquilação é a produção de quebra na molécula do DNA e da ligação cruzada em seu duplo filamento. Como consequência, há interferência com a duplicação do DNA e transcrição do RNA impedindo, dentre outras coisas, a ocorrência da divisão celular. Nesses fármacos, as frações alquilantes ativas são geradas *in vivo*, após reações degradativas complexas, muitas das quais, enzimáticas. A ativação metabólica inicial ocorre no sistema de oxidase de função mista do citocromo P450, no retículo endoplasmático liso, sendo seguida pela liberação na circulação de metabólitos ativados que, muito embora possam causar regressão tumoral, também são responsáveis pelo aparecimento de efeitos colaterais citotóxicos, dose-limitantes, comprometendo tecidos importantes do hospedeiro, tais como a medula óssea e os rins (CALABRESI & CHABNER, 1992). Elas são, portanto, pró-drogas terapeuticamente inativas, que precisam ser primeiro biotransformadas pelo metabolismo hepático, para tornarem-se citotóxicas.



Ifosfamida



Ciclofosfamida

Estrutura da Ifosfamida e Ciclofosfamida

Sítios 1 e 2 indicam as posições do metabolismo primário

1.1- CICLOFOSFAMIDA

A ciclofosfamida é inicialmente convertida em 4-hidroxíciclofosfamida, que está em estado de equilíbrio dinâmico com a aldofosfamida, um tautômero acíclico. Esses compostos podem ser depois oxidados pela aldeído-oxidase hepática e por outras enzimas, produzindo os metabólitos 4-cetociclofosfamida e carboxifosfamida, sendo que estes não têm atividade biológica significativa e representam produtos inativos excretados na urina, equivalendo a 80% da ciclofosfamida administrada (COLVIN, 1982). Nas células suscetíveis à citólise, a aldofosfamida pode ser clivada por uma reação de β -eliminação, resultando na produção dos compostos alquilantes ativos, que são a mostarda de fosforamida e a acroleína. A mostarda de fosforamida forma ligações covalentes com as bases nitrogenadas do DNA, por alquilação, com sequente inibição da divisão celular. A acroleína, por sua vez, um aldeído altamente citotóxico, é o responsável pelo desenvolvimento de cistite hemorrágica (KOLB, HUNSAKER & VANDER, 1994).

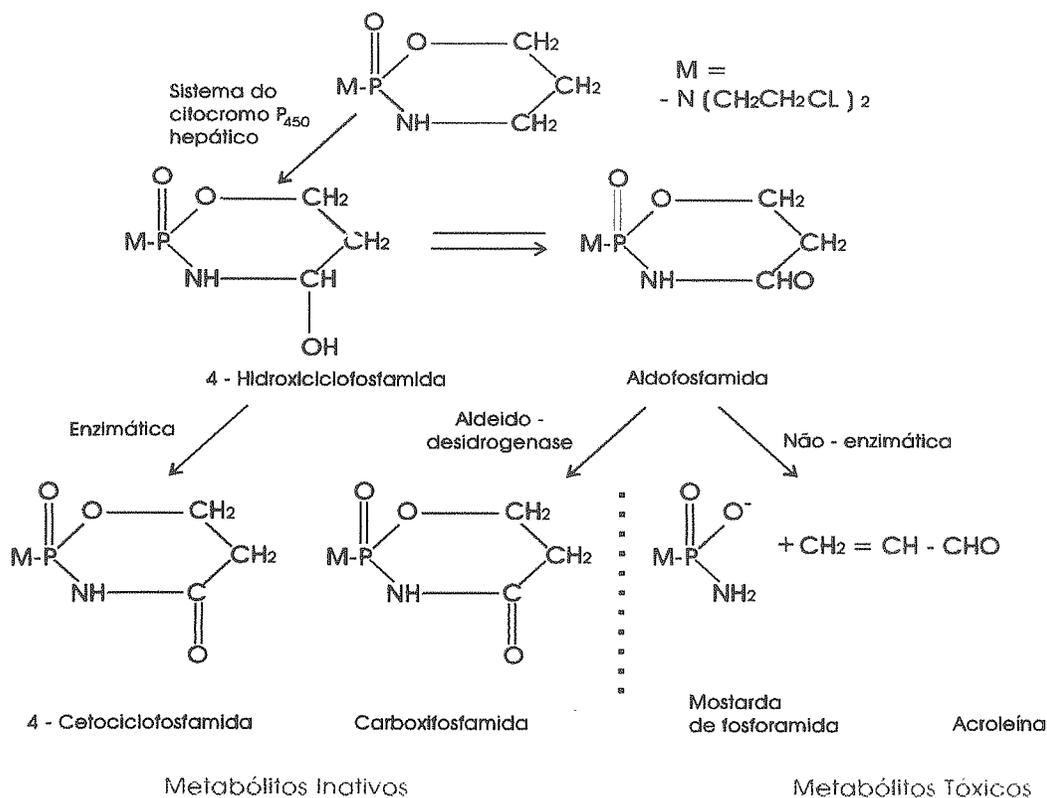
A ciclofosfamida pode ser administrada por via oral, intramuscular, intravenosa, intrapleural e intraperitoneal, sendo mais utilizadas as vias oral e intravenosa. Observam-se concentrações plasmáticas máximas uma hora após a administração oral, e quantidades significativas do composto

in natura são encontradas nas fezes quando esta via é empregada (BAGLEY, BOSTIK & DeVITA, 1973). Após a administração intravenosa, há uma meia-vida bifásica com um $t_{1/2\beta}$ variando de 6 a 9 horas. Menos de 20% do fármaco *in natura* são encontrados na urina, o que sugere importante reabsorção tubular (BROCK & HORHORST, 1967).

A ciclofosfamida apresenta um amplo espectro de atividade clínica, sendo um componente essencial de numerosas associações eficazes de drogas e usada com bons resultados em doenças linfoproliferativas, nos carcinomas de mama, pulmão, colo uterino e ovário, no neuroblastoma e retinoblastoma, dentre outras (FRAISER, KANEKAL & KEHRER, 1991). Por serem os linfócitos muito sensíveis à sua ação destrutiva, exerce efeito imunossupressor sendo, então, indicada no controle da rejeição de órgãos após transplantes, no preparo de pacientes para transplante de medula óssea e em doenças auto-imunes tais como artrite reumatóide e Granulomatose de Wegener (GRINBERG-FUNES, SHELDON & WEISS, 1990).

Os efeitos colaterais mais comuns são alopecia, náuseas e vômitos, mielossupressão, sendo a leucopenia mais importante, quando comparada à trombocitopenia e anemia e cistite hemorrágica estéril. A incidência de carcinoma de células transicionais na bexiga é aumentada em relação à população normal, representando um risco relativo de 6.8%, risco acumulado de 3.5% em oito anos e de 10.7% após doze anos do uso desta droga (STILLWELL & BENSON, 1988). Cardiotoxicidade e síndrome de secreção inadequada do hormônio antidiurético podem também ocorrer face ao uso de doses elevadas (FRAISER, KANEKAL & KEHRER, 1991).

Metabolismo da Ciclofosfamida



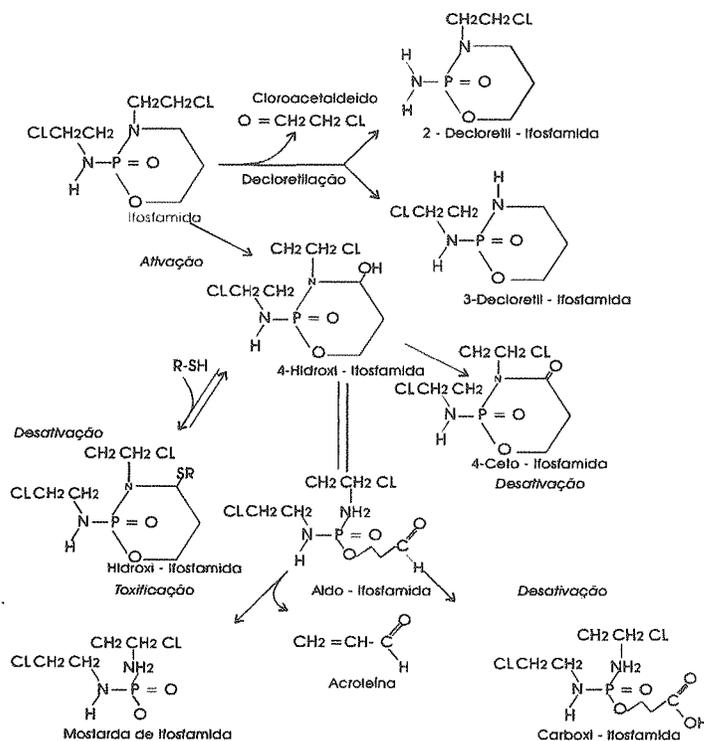
1.2 - IFOSFAMIDA

A ifosfamida é um isômero estrutural da ciclofosfamida. Enquanto que a ciclofosfamida possui dois grupos cloroetil sobre o átomo de nitrogênio exocíclico, um dos dois grupos cloroetil da ifosfamida situa-se sobre o nitrogênio fosfamídico cíclico do anel de oxazafosforina. Isso causa uma mudança considerável no metabolismo inicial, muito embora o metabolismo como um todo permaneça o mesmo (WAGNER, 1994).

A ifosfamida é também ativada no fígado, por oxidação, em 4-hidroxiifosfamida, que está em equilíbrio com a aldofosfamida. A aldofosfamida sofre, então, transformação espontânea em mostarda de ifosfamida e acroleína. O composto antitumoral ativo é a mostarda de ifosfamida, ao passo que a acroleína é a responsável pela urotoxicidade. Além da formação da 4-hidroxiifosfamida, existe uma segunda via, com liberação de cloroacetaldeído. Portanto, a quantidade de

metabólitos ativos formada durante o metabolismo da ifosfamida é menor comparativamente ao que ocorre durante o metabolismo da ciclofosfamida. Esse fato pode talvez explicar porque doses mais elevadas de ifosfamida são necessárias durante o tratamento (WAGNER, 1994).

METABOLISMO DA IFOSFAMIDA



Depois de uma única injeção em bolus ou curta infusão intravenosa de IFS, a meia-vida de eliminação terminal ($t_{1/2\beta}$) no soro, plasma ou sangue varia de 4 a 8 horas, tendo sido descrita uma larga variação interindividual (WAGNER, 1994). Possivelmente, a dependência de ativação metabólica da IFS no sistema do citocromo P450 possa explicar a grande variabilidade interindividual do $t_{1/2\beta}$ relatada em muitos estudos farmacocinéticos.

No que diz respeito à excreção, não há, até o momento, nenhum relato sobre a excreção fecal de IFS e, com base na excreção fecal de CFS (BAGLEY et alii, 1973; BROCK & HORHORST, 1967), pode ser suposto que essa rota de excreção não exceda a 1% da dose de IFS administrada (WAGNER, 1994). Desse modo, em comum com a CFS, o clearance total da IFS é principalmente via metabolismo, que consiste na ativação da

IFS por oxidases de função mista (via citocromo P450), predominantemente no fígado e, em menor extensão, no pulmão (BROCK & HORHORST, 1967).

IFS é usualmente administrada via i.v., em doses divididas, por um período de vários dias (BRADE, HERDRICH & VARINI, 1985). Quanto à administração oral, em comum com a CFS, tem sido visto que a biodisponibilidade da administração oral de IFS é próxima de 100% (KUROWSKI et alii, 1991; WAGNER & DRINGS, 1986). A tolerância gastrointestinal é boa, contudo, a alta incidência de toxicidade (cerca de 50%) no Sistema Nervoso Central (SNC) foi inaceitável (LIND et alii, 1989). Essa incidência de toxicidade sobre o SNC é incomum quando doses convencionais da droga (1.3 a 2.0 g/m²) são administradas intravenosamente (BRADE, HERDRICH & VARINI, 1985). A administração oral de IFS resulta em concentrações de cloroacetaldeído mais elevadas que as obtidas após administração i.v. e é sugerido ser essa a causa da elevada incidência dos efeitos neurotóxicos (KUROWSKI et alii, 1991).

Ifosfamida apresenta um amplo espectro de atividade antitumoral quando usada só ou em combinação com outras drogas, no tratamento de carcinomas de colo uterino e pulmão, de certos tipos de sarcomas e em linfomas Hodgkin e não-Hodgkin. Quanto aos seus efeitos adversos, observam-se toxicidade sobre o SNC, especialmente sonolência ou confusão, náuseas, vômitos e mielossupressão, sendo inexpressiva a trombocitopenia, e toxicidade sobre o trato urinário, manifestada por disfunção tubular proximal (síndrome de Fanconi), decorrente de ação do cloroacetaldeído (ZAMLAUSKI et alii, 1994) e cistite hemorrágica estéril causada pela acroleína (WAGNER, 1994).

2 - CISTITE HEMORRÁGICA

2.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os pacientes que receberam ou estão em uso de CFS ou IFS podem apresentar uma emergência urológica com risco para a vida - a cistite hemorrágica (CH).

CFS foi introduzida como agente antitumoral em 1958 (COX, 1979) e desde que seu uso clínico começou a ser revisto, já no final da década de 50 e no princípio da de 60, ficou claro que CH era causa importante de morbidade (BETHELL et alii, 1960; HOST & NISSEN-MELYER, 1960). Nas duas últimas décadas, a incidência de CH induzida por CFS tem sido estimada em torno de 68% (FOAD et alii, 1976) e em estudo retrospectivo mais recente há relato de que 78% dos pacientes revistos desenvolveram CH após receberem CFS (STILLWELL & BENSON, 1988; GRINBERG-FUNES et alii, 1990).

Quanto à IFS, essa é mais urotóxica que CFS (BRADE, HERDRICH & VARINI, 1985). Em modelos pré-clínicos e logo após sua instituição na clínica, ficou claro que para o tratamento de algumas neoplasias malignas, como, por exemplo, o carcinoma de pequenas células do pulmão e os sarcomas de partes moles, IFS era mais efetiva que CFS (BRADE et alii, 1985; GOLDIN, 1982; BRAMWELL et alii, 1987).

O agente tido como responsável pelo desenvolvimento de CH induzida por CFS e IFS é a acroleína (COX, 1979; BROCK et alii, 1979; KOLB et alii, 1994; WAGNER, 1994). As seguintes informações sugerem a afirmação de que a acroleína que induz CH é formada dentro da própria bexiga por quebra da aldofosfamida: (i) acroleína tem pequena meia vida biológica por ser muito reativa, (ii) quando liberada por metabolismo de CFS e de IFS, é largamente excretada na urina, como ácido 3-hidroxipropilmercaptúrico (COX, 1979).

Particularmente em relação à IFS, há na literatura sugestão de que a urotoxicidade sequente ao seu uso possa ser multifatorial em sua etiologia resultando não só da ação da acroleína, como também da ação de 4-hidroxi-IFS e do

cloroacetaldeído (WAGNER et alii, 1981; COLVIN, 1982; NORPOTH, 1976). A possibilidade de que 4-hidroxi-IFS possa contribuir diretamente com os efeitos urotóxicos decorre da observação de que sua concentração na urina é 50 vezes maior do que sua concentração plasmática (WAGNER et alii, 1981). Quanto ao cloroacetaldeído, ele já tem sido associado à lesão tubular renal induzida por IFS (MONCRIEFF & FOOT, 1989; ZAMLAUSKI et alii, 1994).

O quadro clínico da CH sequente ao uso de oxazafosforinas inclui desde hematúria microscópica, presente em pacientes assintomáticos, até episódios recorrentes de hematúria maciça associada a disúria, hipertermia, dor supra-púbica, incontinência urinária e nictúria, essas últimas decorrentes da diminuição da capacidade vesical por espasmo do músculo detrussor da bexiga (STILLWELL & BENSON, 1988). O diagnóstico é sugerido pelo quadro clínico, tendo sua confirmação pela cistoscopia, seguida de biópsia.

À macroscopia de bexigas com CH completamente desenvolvida, observam-se hiperemia e edema acentuados, áreas de hemorragia puntiformes, erosões e úlceras, podendo haver inclusive coágulos intravesicais. Pode ocorrer também hemorragia ureteral se houver obstrução do colo vesical (THEMANN et alii, 1987). As alterações histopatológicas, à microscopia óptica, compreendem descamação quase que completa do urotélio, úlceras, edema submucoso severo e infiltrado leucocitário, depósito de fibrina e hemorragia (STILLWELL & BENSON, 1988; GRAY et alii, 1986). Em casos severos, o processo inflamatório pode evoluir para necrose de todas as camadas da parede, com perfuração vesical secundária (STILLWELL & BENSON, 1988). Observações feitas à microscopia eletrônica, em bexigas de ratos com lesão induzida por CFS indicam que a agressão primária dos agentes urotóxicos parece envolver inicialmente a membrana citoplasmática apical, sendo o complexo unitivo lesado secundariamente (HICKS, 1966; LEESON, 1962; THEMANN et alii,

1987). Foi visto que as alterações que ocorrem nas células superficiais incluem degeneração hidrópica, com vacuolização de mitocôndrias, reorientação dos tonofilamentos apicais e desintegração do citoplasma. O escape dos agentes nocivos para o espaço intercelular das camadas mais profundas decorre de ruptura de membrana nas células superficiais (BROCK, POHL & STEKAR, 1981). O edema intercelular acentuado e a coesão celular reduzida devido a desintegração dos desmossomas causa, durante as primeiras 6 horas após a administração de CFS, progressiva descamação das células epiteliais degeneradas resultando em exposição da membrana basal. O núcleo de muitas células epiteliais exhibe marginação da cromatina e pequenos grânulos centrais, que podem ser interpretados como sinais de lesão do DNA (FUKUSHIMA et alii, 1981). A membrana basal, por sua vez, nas áreas desnudas, está alterada e os capilares subepiteliais exibem alterações endoteliais mais severas do que os situados sob membrana basal que ainda contem urotélio. As alterações endoteliais envolvem tanto capilares quanto vênulas, enquanto que o endotélio arteriolar encontra-se menos afetado. Telangiectasia é vista muito precocemente e edema submucoso acentuado desenvolve-se já a partir da terceira hora após a administração de CFS. Esse edema tem como bases morfológicas o aparecimento de "gaps" nas células interendoteliais, sempre acompanhados de redução do sistema de microfilamentos (THEMANN et alii, 1987).

Ao longo dos anos, vários métodos, tanto de tratamento, quanto de profilaxia da CH têm sido desenvolvidos e esses variam de pouco invasivos a muito radicais. A prevenção é, obviamente, o melhor tratamento, efetuada através da manutenção de uma diurese volumosa, a fim de diminuir as concentrações dos metabólitos na bexiga e da correção de qualquer distúrbio da coagulação (DROLLER, SARAL & SANTOS, 1982). Atenções têm se voltado no sentido de detoxificar a acroleína com agentes tais como N-acetilcisteína e o 2-mercaptoetanosulfonato sódico (mesna) (BROCK et alii, 1981;

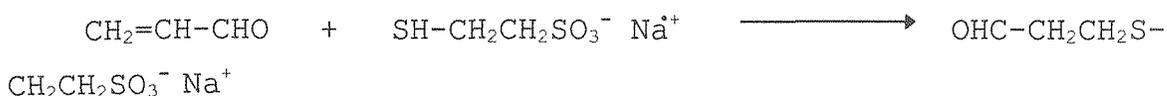
BROCK & POHL, 1983; BLACKLOCK et alii, 1983; WAGNER, 1994). O tratamento conservador, com cuidado de assegurar uma excelente diurese é, com frequência, adequado depois que ocorre CH. Pode ser necessária a infusão de hemoderivados. O uso de cateteres uretrais para remover os metabólitos e deixar a bexiga em repouso é controvertido, uma vez que podem provocar espasmo e impedir a eliminação de coágulos (FRAISER, KANEKAL & KEHRER, 1991). É também indicada a irrigação vesical com solução de formol a 0.37% ou 0.74% durante 10 minutos, por sustar em cerca de 85% dos casos o sangramento (KLEIN et alii, 1984). Pode ser necessária a ligadura das artérias hipogástricas com derivação ureteral e, em casos extremos, a cistectomia, se a formalina não conseguir controlar a hemorragia (ELIAS et alii, 1990).

2.2 - MESNA

As informações disponíveis sobre a reatividade química dos metabólitos urotóxicos das oxazafosforinas conduziu ao estudo dos tio compostos como agentes detoxificantes regionais (BROCK et alii, 1984). O grupo sulfidrilado dos tióis serve como pares nucleofílicos que são preferencialmente alquilados (CONNORS, 1966). Apenas poucos dentre os tio- compostos testados são eliminados por via renal em tempo suficientemente rápido para detoxificar os metabólitos tóxicos das oxazafosforinas presentes na urina e, dentre esses, o mesna ocupa um lugar especial, por ser um exemplo de agente uroprotetor de sucesso. A administração sistêmica de mesna resulta em detoxificação regional do trato urinário (ELIAS et alii, 1990; SCHEULEN et alii, 1983). Comparação entre a eficácia da acetilcisteína e do mesna como agentes uroprotetores revelou que mesna oferece melhor proteção urotelial e é melhor tolerado que a acetilcisteína (MUNSHI et alii, 1992). Resultados obtidos em trabalhos experimentais e em estudos clínicos têm indicado que não há efeito sobre a eficácia citostática das

oxazafosforinas (MILLAR et alii, 1983; ARAUJO & TESSLER, 1983). A eliminação relativamente rápida do mesna na urina, comparada com a eliminação urinária prolongada dos metabólitos das oxazafosforinas (GOREN, 1991) impõe administrações repetidas do mesna, a serem dadas em intervalos de 4 horas por, no mínimo, 8 horas após a administração de oxazafosforinas.

A interação entre a acroleína e o mesna, resultando em um composto inativo, ocorre do seguinte modo (WAGNER, 1994):



Mesna é um tiol muito polar e em virtude dessa polaridade, ele não atravessa passivamente as membranas lipídicas solúveis, não penetrando, portanto, em muitas células, com exceção das tubulares renais e das intestinais (SHAW, 1987). Essa polaridade pode muito bem explicar porque ele não interfere com a eficácia citostática dos metabólitos ativos da CFS e IFS.

Mesna, portanto, é indicado para prevenir a ocorrência de CH, não sendo útil quando a lesão já está estabelecida.

3 - INFLAMAÇÃO AGUDA

A inflamação aguda é uma resposta imediata e precoce ao agente lesivo, na qual os fenômenos vasculares desempenham um papel maior. Ela tem, portanto, três componentes: (i) alterações no calibre vascular, que levam a um aumento no fluxo sanguíneo, (ii) alterações estruturais na microvasculatura, que permitem que as proteínas plasmáticas e os leucócitos deixem a circulação e (iii) migração dos leucócitos da microcirculação com subsequente acúmulo no foco lesado (WEISSMAN, 1992).

3.1 - EVENTOS VASCULARES

As alterações no calibre e fluxo vascular começam muito cedo após o estímulo lesivo e se desenvolvem com velocidade variada na dependência da severidade da lesão. Após uma vasoconstrição arteriolar inconstante e transitória que dura poucos segundos, ocorre vasodilatação. Esta envolve primeiro arteríolas, resulta na abertura de novos leitos capilares e é seguida de estase. A medida que a estase se desenvolve, os leucócitos, principalmente os neutrófilos, começam a se dispor na periferia do vaso ao longo do endotélio, um processo denominado marginação neutrofílica. Eles, então, aderem ao endotélio, primeiro transitoriamente (*rolling*), depois mais avidamente e, em seguida migram através da parede vascular para o interstício (SPRINGER, 1994).

As condições normais de permeabilidade do leito microvascular são dependentes de um endotélio intacto e, na inflamação aguda, podem ser citados pelo menos quatro mecanismos que contribuem para o aumento da permeabilidade: (i) contração das células endoteliais levando à formação de "gaps" intercelulares (MAJNO, 1992); (ii) reorganização do citoesqueleto endotelial e alterações no complexo unitivo levando à retração endotelial (BRETT et alii, 1989); (iii) lesão endotelial direta, resultando em descamação e necrose da célula e (iv) lesão endotelial mediada por leucócitos que, quando ativados, liberam enzimas proteolíticas e radicais tóxicos do oxigênio (McEVER, 1992).

3.2- EVENTOS CELULARES

Nos estágios iniciais da maioria dos processos inflamatórios agudos, a célula leucocitária que predomina no sítio da lesão é o neutrófilo. A sequência de eventos na jornada dos leucócitos da luz para o interstício compreende as seguintes etapas: na luz há marginação, *rolling* (deslizamento) e adesão. Em seguida, as células migram

através do endotélio e, uma vez no interstício, migram em direção a um estímulo quimiotático.

A adesão e a migração na parede vascular são determinadas pela ligação de moléculas de adesão complementares presentes nos leucócitos, à superfície endotelial. Os receptores de adesão envolvidos pertencem a três famílias moleculares que são as selectinas, as imunoglobulinas e as integrinas (SPRINGER, 1994). As selectinas são compostas por E-selectina (ELAM-1: Endothelial leucocyte adhesion molecule-1), que é encontrada somente no endotélio e expressa após ativação com LPS, TNF ou IL-1; P-selectina, também chamada GMP 140, presente no endotélio após ativação com trombina, histamina e substância P, e em plaquetas; e L-selectina, também chamada LAM-1, expressa constitutivamente por todos os leucócitos e desaparecendo destes logo que se inicia a firme adesão ao endotélio (MACKAY et alii, 1993). As moléculas da família das imunoglobulinas incluem ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1) e VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1). Ambas interagem com as integrinas, são expressas no endotélio e podem ser induzidas por IFN- γ , IL-1, TNF e LPS (McEVER, 1992). As integrinas participam da interação do neutrófilo com o endotélio e são divididas em três subfamílias principais: β_1 , β_2 e β_3 , sendo as β_2 exclusivas dos leucócitos e desempenhando papel importante na sua interação com o endotélio (McEVER, 1992).

Com base nos estudos sobre as moléculas de adesão, postula-se atualmente que, por ocasião da adesão e migração dos leucócitos, primeiro há uma adesão rápida e relativamente frouxa, que contribui para o "rolling", envolvendo principalmente as P- e L-selectinas de ocorrência natural e, no endotélio, as E-selectinas induzidas por citocinas; os leucócitos são então ativados por agentes produzidos pelo endotélio ou oriundos do sítio da lesão, o que aumenta a avidéz de suas integrinas, possibilitando ligação mais estável ao endotélio, sobretudo via β_2

integrina, com subsequente migração através da parede vascular (BUTCHER, 1991). Depois de atravessar as junções endoteliais, os leucócitos são transitoriamente retardados na sua jornada, pela membrana basal, mas perfuram-na, provavelmente através da secreção de colagenase, que degrada a membrana basal (BUTCHER, 1991). Em seguida, eles migram para o sítio da lesão sob a influência de agentes quimiotáticos.

3.3 - MEDIADORES QUÍMICOS

Os mediadores químicos da inflamação são substâncias que contribuem para a ocorrência dos eventos vasculares e da exsudação leucocitária anteriormente descritos. A histamina e a serotonina, por exemplo, são mediadores que determinam vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular imediata, causando contração endotelial venular e alargamento nas junções interendoteliais. Histamina atua na microcirculação principalmente via receptores H_1 , é estocada pré-formada em grânulos citoplasmáticos dos mastócitos, basófilos e plaquetas e liberada em resposta a vários estímulos, tais como: reações imunes envolvendo a ligação de anticorpos aos mastócitos; fragmentos do complemento denominados anafilatoxinas (C3a e C5a); e citocinas (IL-1 e IL-8) (SERAFIN & AUSTEN, 1987).

Fatores derivados do complemento estão relacionados a uma variedade de fenômenos na inflamação aguda, sendo que C3 e C5 são, dentre os componentes do complemento, considerados os mediadores mais importantes. C3a, e C5a aumentam a permeabilidade vascular e causam vasodilatação, não só através da liberação de histamina dos mastócitos, como também através da ativação dos neutrófilos, possivelmente por indução da liberação de PAF dos neutrófilos (BRAQUET et alii, 1987). C5a é um poderoso agente quimiotático para neutrófilos, monócitos e eosinófilos, aumenta a adesão dos

leucócitos ao endotélio através da ativação dos leucócitos e aumenta a avidéz das integrinas de superfície ao endotélio (SPRINGER, 1994).

O ácido araquidônico (AA), um ácido graxo poliinsaturado, é liberado dos fosfolipídios da membrana celular em virtude de ativação de fosfolipases celulares por estímulos inflamatórios ou por outros mediadores químicos, tais como C5a (LEWIS, AUSTEN & SOBERMAN, 1990). O metabolismo do AA prossegue ao longo de uma de duas principais vias, cujo nome é o das enzimas que iniciam as reações. Há, portanto, a via das ciclooxigenases e a via das lipoxigenases.

A via das ciclooxigenases leva, de início, à formação de prostaglandina G_2 (PGG_2) que é convertida em PGH_2 . PGH_2 é precursora dos produtos finais biologicamente ativos da via das ciclooxigenases, quais sejam: PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 (prostaciclina) e tromboxano (TXA_2). Cada um desses produtos é derivado de PGH_2 por ação de uma enzima específica. As plaquetas contém tromboxano-sintetase, sendo, portanto, o TXA_2 o principal produto da PGH_2 nessas células. TXA_2 é um poderoso agregador plaquetário e vasoconstritor. O endotélio possui prostaciclina-sintetase, que leva à formação de PGI_2 , sendo esta vasodilatadora e potente inibidora da agregação plaquetária. PGD_2 é o principal metabólito dessa via nos mastócitos; juntamente com PGE_2 e PGF_2 , causa vasodilatação e potencializa a formação de edema (SPRINGER, 1994).

A 5-lipoxigenase, uma das enzimas responsáveis pelo metabolismo do AA na via da lipoxigenase, é predominante em neutrófilos. Seu derivado inicial, o 5-hidroperoxi de AA (5-HEPTE), ou é reduzido para 5-HETE, que é quimiotáxico para neutrófilos, ou é convertido em leucotrienos. O primeiro leucotrieno gerado é o leucotrieno A_4 (LTA_4), que origina o LTB_4 ou o LTC_4 . O LTC_4 é convertido em LTD_4 , que por sua vez é convertido em LTE_4 . O LTB_4 , que é um potente agente quimiotáxico, promove a adesão de leucócitos ao endotélio venular, estimula também a liberação de enzimas lisossomiais

e aumenta a produção de espécies reativas de O₂ dos neutrófilos humanos. LTC₄, LTD₄ e LTE₄ causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular. Os neutrófilos também produzem triidroximetabólitos do AA denominados lipoxinas, que possuem potentes efeitos pró-inflamatórios. No entanto, seu papel "in vivo" ainda não parece claro (LEWIS, AUSTEN & SOBERMAN, 1990).

O fator ativador de plaquetas (PAF) é produzido por uma variedade de tipos celulares, incluindo basófilos, neutrófilos, monócitos e células endoteliais. Sua estrutura química é o acetil-glicerol-éter-fosfocolina, sintetizado a partir de fosfolipídios de membrana por ativação da fosfolipase A₂. Atua diretamente nas células alvo, via receptores específicos, promovendo o aumento da adesão leucocitária ao endotélio e a síntese de outros mediadores, particularmente eicosanóides. PAF, em concentrações extremamente baixas, induz vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular com uma potência de 100 a 10.000 vezes maior do que a histamina (BRAQUET et alii, 1987).

O óxido nítrico (NO) foi por um longo período de tempo considerado apenas um gás tóxico de péssima reputação: destruidor da camada de ozônio, precursor da chuva ácida, além de ser um carcinógeno potencial. A estrutura de radical livre dessa molécula a torna altamente reativa e lábil, com uma meia-vida em torno de 5 a 10 segundos (STAMLER et alii, 1992). Nos últimos oito anos, entretanto, uma série de evidências têm apontado o NO como um mediador endógeno envolvido em funções importantes no cérebro, artérias, sistema imune, fígado, pulmão e outras partes do corpo (STAMLER et alii, 1992).

A biossíntese do NO a partir da L-arginina é hoje considerada uma via de regulação de funções celulares e da comunicação intercelular. Em todos os tipos celulares estudados, o NO é gerado após a oxidação e clivagem do grupo amino terminal da L-arginina por uma enzima, a NO-sintase (MONCADA, PALMER & HIGGS, 1991). Pelo menos dois tipos de

NO-sintase foram identificados. A enzima encontrada no endotélio e cérebro é constitutiva, Ca^{++} -dependente e libera quantidades picomoláres de NO por curtos períodos de tempo, seguindo-se à estimulação de receptores. Em contraste, a enzima encontrada em macrófagos é induzida por estímulos tipo LPS e citocinas, é cálcio-independente e libera NO em concentrações nanomoláres e por períodos de tempo prolongados (ASSREUY et alii, 1993).

O NO produzido pela enzima constitutiva modula várias funções tais como tônus vascular e neurotransmissão no sistema nervoso central, via ativação de guanilato ciclase solúvel. A produção de NO pela enzima induzida tem sido identificada como o principal mecanismo de ação citostático e citotóxico de macrófagos ativados (HIBBS, 1990). Essa enzima é regulada de maneira importante por citocinas, quais sejam $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6 e $IFN-\gamma$ (MONCADA, 1994).

Estudos recentes demonstraram que o NO participa de diversos eventos da resposta inflamatória aguda: controle do fluxo arterial através do relaxamento da microvasculatura (PERSON et alii, 1990; FORTES et alii, 1990), inibição da adesão e agragação plaquetária "in vitro" (SNEDDON & VANE, 1988) e "in vivo" (MAY et alii, 1991), controle da permeabilidade vascular induzida por diversos estímulos como PAF e bradicinina, controle da migração de neutrófilos (MONCADA, 1992; TAVARES-MURTA et alii, 1994) e da dor inflamatória (FERREIRA, DUARTE & LORENZETTI, 1991).

A conversão de L-arginina em NO é específica, uma vez que análogos, inclusive D-enantiômeros, não são substratos para a NO-sintase. Dessa maneira, começou-se a desenvolver inibidores da síntese de NO, sendo o primeiro deles o L-N-monometil arginina (L-NMMA) (HIBBS et alii, 1967). A partir daí, outros análogos da L-arginina foram descritos como inibidores da síntese de NO, dentre eles o N-nitro-L-arginina (L-NOarg), o N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e o N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) (REES et alii, 1990).

3.4 - CITOCINAS E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Citocinas são polipeptídeos envolvidos em vários eventos da resposta inflamatória e já há muito conhecidas por seu papel na imunorregulação e hematopoese (ARAI et alii, 1990). Inicialmente, pensou-se que as citocinas eram específicas nas suas funções. No entanto, tem sido visto que muitas das citocinas são multifuncionais e mais de uma citocina age sobre as mesmas células-alvo e mediam funções similares. Além disso, tem sido demonstrado que essas citocinas são produzidas não apenas por células imunocompetentes, mas também por vários outros tecidos e células, tais como fibroblastos, ceratinócitos epidérmicos, células endoteliais, células do estroma da medula óssea e astrócitos (AKIRA et alii, 1990).

No contexto da resposta inflamatória, ocupam um papel de destaque o fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$), a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 8 (IL-8).

O $\text{TNF-}\alpha$ é o principal mediador da resposta do hospedeiro a bactérias gram-negativas e pode também desempenhar papel importante em resposta a outros agentes infecciosos (ABBAS, LICHTMAN & POBER, 1994).

$\text{TNF-}\alpha$ foi originalmente identificado como um mediador de necrose tumoral presente no soro de animais tratados com LPS. Em baixas concentrações, LPS estimula as funções dos fagócitos mononucleares e age como um ativador policlonal de células B, respostas do hospedeiro que contribuem para a eliminação de bactérias invasoras. Contudo, altas concentrações de LPS causam lesões tissulares, coagulação intravascular disseminada (CID), e choque, sempre resultando em morte (FONG & LOWRY, 1990).

A principal fonte celular de $\text{TNF-}\alpha$ é o fagócito mononuclear estimulado por LPS, muito embora células T estimuladas por antígeno, células NK ativadas, e mastócitos ativados também possam secretar essa proteína. $\text{IFN-}\gamma$,

produzido por células T, aumenta a síntese de TNF- α por fagócitos mononucleares estimulados por LPS. Desse modo, TNF- α é um mediador tanto da imunidade natural como da adquirida e um importante elo de ligação entre a resposta imune específica e a inflamação aguda (TRACEY & CERAMI, 1994). Monócitos e macrófagos produzem TNF- α após serem estimulados também com: IL-1, GN-CSF, o próprio TNF- α , enterotoxinas, fator corda de micobactérias, vírus, antígenos fúngicos ou parasitários e C5a (BEUTLER & CERAMI, 1988). Nos fagócitos mononucleares, TNF- α é inicialmente sintetizado como uma proteína transmembrana não glicosilada de aproximadamente 25 kD. O TNF- α ativo assume uma forma piramidal triangular de tal modo que, cada lado da pirâmide é formado por uma subunidade monomérica diferente. Os sítios de ligação a receptores estão situados na base da pirâmide, permitindo ligação simultânea a mais de um receptor (TRACEY & CERAMI, 1994).

As ações do TNF- α são iniciadas através da ligação do trímero solúvel a receptores de superfície celular. Existem dois receptores distintos para o TNF- α : de 55 e 75kD, respectivamente, cada um codificado por um gene diferente. A afinidade do TNF- α por seus receptores é excepcionalmente baixa para uma citocina. No entanto, TNF- α é sintetizado em grandes quantidades e pode facilmente saturar seus receptores. Receptores para o TNF- α estão presentes em quase todos os tipos celulares examinados. Células ativadas liberam seus receptores para o TNF- α ; tais receptores solúveis podem agir como inibidores competitivos dos receptores de superfície celular (ADERKA et alii, 1991).

As ações biológicas do TNF- α são divididas em endócrinas ou sistêmicas, parácrinas ou tecido-específicas e autócrinas. Como exemplos das ações parácrinas ou tecido-específicas do TNF- α , as mais estudadas são aquelas relacionadas à sua participação na mediação de vários dos

eventos que ocorrem nos processos inflamatórios agudos e crônicos, entre as quais, destacam-se: ativação de neutrófilos, com conseqüente degranulação, produção de intermediários reativos de oxigênio, aumento de citotoxicidade para certos patógenos e aumento de atividade fagocítica (KLEBANOFF et alii, 1986; TSUJIMOTO et alii, 1986); quimiotaxia de neutrófilos e de monócitos; aumento da adesão de neutrófilos ao endotélio; estimulação da produção de prostaglandina E₂ e de colagenase por células sinoviais e condrócitos; proliferação de fibroblastos; aumento da reabsorção óssea por osteoclastos e diminuição da síntese óssea por osteoblastos; indução de proteínas de fase aguda no fígado; produção de IL-1, IL-6, do próprio TNF e IL-8 por células endoteliais e por macrófagos; produção de GM-CSF e G-CSF por células endoteliais (BEUTLER & CERAMI, 1988; LARRICK & KUNKEL, 1988). Vários dos efeitos descritos acima podem se dar por estimulação direta sobre as células ou tecidos-alvo. Entretanto, o TNF- α pode exercer alguns desses efeitos indiretamente, iniciando uma intensa resposta inflamatória, com participação de outros mediadores secundários, como leucotrienos e PAF, além de uma série de outras citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER & CERAMI, 1988).

As principais ações sistêmicas do TNF- α são as seguintes: (i) TNF- α é um pirógeno endógeno que age nas células em regiões regulatórias hipotalâmicas para produzir febre. Ele divide essa propriedade com IL-1, e ambas as citocinas são encontradas no soro de animais ou pessoas expostas a LPS, que funciona como um pirógeno exógeno. Produção de febre em resposta a TNF- α ou IL-1 é mediada por aumento na síntese de prostaglandinas pelas células hipotalâmicas estimuladas por citocinas (TRACEY & CERAMI, 1994; DINARELLO & WOLFF, 1993). Inibidores da síntese de prostaglandinas, como a aspirina por exemplo, reduz a febre bloqueando essa ação do TNF- α ou IL-1. (ii) TNF- α age sobre os fagócitos mononucleares e células endoteliais estimulando

a secreção de IL-1 e IL-6. Esse é um exemplo de uma cascata de citocinas que dividem muitas atividades biológicas. (iii) TNF- α age sobre os hepatócitos aumentando a síntese de determinadas proteínas séricas, tais como o amilóide A sérico (TRACEY, 1991). O espectro de proteínas produzidas pelos hepatócitos e induzidas por TNF- α é idêntico ao induzido por IL-1 mas difere do induzido por IL-6 (ARAI et alii, 1990). A combinação de proteínas plasmáticas derivadas dos hepatócitos e induzidas por TNF- α ou IL-1 somadas às induzidas por IL-6 constitui a resposta da fase aguda a estímulo inflamatório. (iv) TNF- α ativa o sistema de coagulação, alterando o equilíbrio entre a atividade pró-coagulante e anti-coagulante do endotélio vascular. (v) TNF- α suprime as divisões da célula fonte da medula óssea. Administração crônica de TNF- α pode levar a linfopenia e imunodeficiência. (vi) Administração sistêmica prolongada de TNF- α a animais experimentais causa as alterações metabólicas da caquexia (TRACEY, 1992).

Muito embora IL-1 tenha sido descoberta como uma co-estimuladora da ativação de células T, agora está claro que sua principal função, semelhante ao que ocorre com TNF, é atuar como um mediador da resposta inflamatória na imunidade natural (DINARELLO & WOLFF, 1993).

Entre os vários tipos celulares capazes de sintetizar e liberar moléculas de IL-1, são citados: macrófagos, ceratinócitos, células endoteliais, células T, células B, astrócitos, micróglia e fibroblastos (AKIRA et alii, 1990).

Várias substâncias são capazes de induzir a produção de IL-1 em monócitos e macrófagos, tais como fatores exógenos como as endotóxicas, exotóxicas, hemaglutininas de vírus, protozoários (DURUM & OPPENHEIM, 1989) e substâncias endógenas como C5a, fator estimulador de colônia-1 (CSF-1), TNF- α , a própria IL-1 (AKIRA et alii, 1990), além de opióides endógenos como a β -endorfina (APTE, DURUM & OPPENHEIM, 1990).

Purificação bioquímica de IL-1 secretada por fagócitos mononucleares revelou que a atividade biológica dessa citocina residia em dois grandes polipeptídeos, cada um com cerca de 17kD mas com pontos isoelétricos distintos (ARAI et alii, 1990). Sabe-se atualmente que essas duas formas, denominadas IL-1 α e IL-1 β , são produtos de dois genes diferentes. Elas apresentam menos de 30% de homologia estrutural, mas ambas ligam-se aos mesmos receptores de superfície celular e suas atividades biológicas são essencialmente idênticas. As moléculas de IL-1 são também estruturalmente relacionadas às várias formas do fator de crescimento fibroblástico. Ambos os polipeptídeos de IL-1 são sintetizados na forma precursora com cerca de 33kD que são proteoliticamente clivados para gerar proteínas maduras com 17kD. A forma precursora de IL-1 α com 33kD é biologicamente ativa, mas IL-1 β precisa ser processada a forma com 17 kD antes que possa exercer efeitos biológicos. Uma protease IL-1 específica tem sido identificada em fagócitos mononucleares e é responsável por grande parte da conversão de IL-1 β a sua forma ativa (WOOD, 1994).

As atividades biológicas da IL-1 são múltiplas e diversificadas tanto no que diz respeito ao tipo de efeito, como em relação ao sítio celular envolvido (DINARELLO & WOLF, 1993). Entre estes sítios celulares destacam-se os envolvidos no processo inflamatório, tais como: neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos e osteoclastos, bem como os participantes da resposta imune: linfócitos T, linfócitos B e macrófagos (MIZEL, 1989).

IL-1 induz febre, como o resultado de sua ação direta sobre o centro termorregulador hipotalâmico, mediada por aumento de síntese e liberação de prostaglandinas E₂; aumenta a síntese e secreção de proteínas de fase aguda (ceruloplasmina, haptoglobulina, α -2-macroglobulina, amilóide A e P, proteína C reativa) pelos hepatócitos; promove o acúmulo de neutrófilos nos sítios de inflamação,

através do aumento da expressão de moléculas ICAM-1; causa edema; induz secreção de outras citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-8; estimula a proliferação de fibroblastos, a reabsorção óssea, a síntese de colagenase e o crescimento e diferenciação de células T e B (DINARELLO, 1988; DINARELLO & WOLFF, 1993; MIZEL, 1989; AKIRA et alii, 1990).

IL-1 é a única citocina para qual inibidores de ocorrência natural têm sido descritos. Esses são produzidos por fagócitos mononucleares, sendo estruturalmente homólogos a IL-1 e portanto ligando-se a receptores para IL-1, contudo são biologicamente inativos, de tal modo que funcionam como inibidores competitivos para IL-1 (ABBAS, LICHTMAN & POBER, 1994).

A IL-6 é uma citocina de aproximadamente 26 kD produzida por uma grande variedade de células incluindo macrófagos, células T e B, ceratinócitos, células endoteliais, fibroblastos, astrócitos, células mesangiais, células do estroma da medula óssea e por inúmeros tipos de células tumorais. Com exceção das células tumorais que constitutivamente produzem IL-6, células normais não produzem IL-6 sem a presença de estímulos apropriados, quais sejam: IL-1, TNF- α , fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento da epiderme (EGF), fatores estimuladores de colônias (CSF), IL-2, IL-4 e a própria IL-6 (MIZEL, 1989; SEHGAL, 1990).

No que diz respeito às atividades biológicas, IL-6 induz a diferenciação de células B, a diferenciação e ativação de células T, o crescimento de células fonte hematopoéticas, a maturação de megacariócitos, a diferenciação de célula neural e a proliferação de mesângio. A IL-6 é talvez o mais importante mediador na resposta de fase aguda desencadeada pelos hepatócitos. Tem sido demonstrado que a injeção de IL-6 em ratos, induz uma típica reação de fase aguda com rápida expressão de RNAs-m para várias proteínas de fase aguda (AKIRA et alii, 1990). Como a administração *in vivo* de IL-1 e TNF- α pode induzir a

produção de IL-6, tem sido proposto que, pelo menos em parte, os efeitos dessas duas citocinas na indução de proteínas de fase aguda podem ser mediados via liberação de IL-6 (AKIRA, et alii, 1990).

IL-8 foi identificada com base em dois efeitos biológicos sobre neutrófilos humanos, que são a quimiotaxia e a liberação das enzimas dos grânulos dos neutrófilos (SCHRODER et alii, 1987). A quimiotaxia é seletiva para os neutrófilos, uma vez que monócitos e eosinófilos não respondem (YOSHIMURA, MATSUSHIMA & TANAKA, 1987). Essa citocina foi, portanto, extensamente estudada por seus efeitos sobre neutrófilos e foi comparada com quimiotaxinas já bem conhecidas, tais como C5a (FERNANDEZ et alii, 1978), FMLP, PAF e leucotrieno B4 (BAGGIOLINI, DEWALD, THELEN, 1988), os quais elicitam um padrão característico de respostas biológicas incluindo ativação da motilidade, exocitose e burst respiratório.

Produzem e secretam IL-8 não só monócitos e macrofágos, mas também células endoteliais, linfócitos T e fibroblastos. Linhagens de hepatócitos humanos são também capazes de expressar RNAm e atividade biológica para IL-8, em resposta a mediadores inflamatórios tais como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α (THORNTON et alii, 1990). IL-8 tem sido implicada, por diversos pesquisadores como importante mediador pró-inflamatório. Nesse sentido, tem sido detectada em exsudatos inflamatórios (FINCHAM et alii, 1988) e parece desencadear eventos inflamatórios tais como hiperalgesia (CUNHA et alii, 1991), febre (ZAMPRONIO et alii, 1991), liberação de histamina, degranulação de neutrófilos, ativação do burst respiratório, quimiotaxia de neutrófilos (SCHRODER et alii, 1987) e, ainda, migração de neutrófilos *in vivo*, em pele de coelhos (COLDITZ et alii, 1989) e em cavidades peritoneais de ratos (RIBEIRO et alii, 1991).

produção de IL-6, tem sido proposto que, pelo menos em parte, os efeitos dessas duas citocinas na indução de proteínas de fase aguda podem ser mediados via liberação de IL-6 (AKIRA, et alii, 1990).

IL-8 foi identificada com base em dois efeitos biológicos sobre neutrófilos humanos, que são a quimiotaxia e a liberação das enzimas dos grânulos dos neutrófilos (SCHRODER et alii, 1987). A quimiotaxia é seletiva para os neutrófilos, uma vez que monócitos e eosinófilos não respondem (YOSHIMURA, MATSUSHIMA & TANAKA, 1987). Essa citocina foi, portanto, extensamente estudada por seus efeitos sobre neutrófilos e foi comparada com quimiotaxinas já bem conhecidas, tais como C5a (FERNANDEZ et alii, 1978), FMLP, PAF e leucotrieno B₄ (BAGGIOLINI, DEWALD, THELEN, 1988), os quais elicitam um padrão característico de respostas biológicas incluindo ativação da motilidade, exocitose e burst respiratório.

Produzem e secretam IL-8 não só monócitos e macrofágos, mas também células endoteliais, linfócitos T e fibroblastos. Linhagens de hepatócitos humanos são também capazes de expressar RNAm e atividade biológica para IL-8, em resposta a mediadores inflamatórios tais como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α (THORNTON et alii, 1990). IL-8 tem sido implicada, por diversos pesquisadores como importante mediador pró-inflamatório. Nesse sentido, tem sido detectada em exsudatos inflamatórios (FINCHAM et alii, 1988) e parece desencadear eventos inflamatórios tais como hiperalgesia (CUNHA et alii, 1991), febre (ZAMPRONIO et alii, 1991), liberação de histamina, degranulação de neutrófilos, ativação do burst respiratório, quimiotaxia de neutrófilos (SCHRODER et alii, 1987) e, ainda, migração de neutrófilos *in vivo*, em pele de coelhos (COLDITZ et alii, 1989) e em cavidades peritoneais de ratos (RIBEIRO et alii, 1991).

produção de IL-6, tem sido proposto que, pelo menos em parte, os efeitos dessas duas citocinas na indução de proteínas de fase aguda podem ser mediados via liberação de IL-6 (AKIRA, et alii, 1990).

IL-8 foi identificada com base em dois efeitos biológicos sobre neutrófilos humanos, que são a quimiotaxia e a liberação das enzimas dos grânulos dos neutrófilos (SCHRODER et alii, 1987). A quimiotaxia é seletiva para os neutrófilos, uma vez que monócitos e eosinófilos não respondem (YOSHIMURA, MATSUSHIMA & TANAKA, 1987). Essa citocina foi, portanto, extensamente estudada por seus efeitos sobre neutrófilos e foi comparada com quimiotaxinas já bem conhecidas, tais como C5a (FERNANDEZ et alii, 1978), FMLP, PAF e leucotrieno B4 (BAGGIOLINI, DEWALD, THELEN, 1988), os quais elicitam um padrão característico de respostas biológicas incluindo ativação da motilidade, exocitose e burst respiratório.

Produzem e secretam IL-8 não só monócitos e macrófagos, mas também células endoteliais, linfócitos T e fibroblastos. Linhagens de hepatócitos humanos são também capazes de expressar RNAm e atividade biológica para IL-8, em resposta a mediadores inflamatórios tais como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α (THORNTON et alii, 1990). IL-8 tem sido implicada, por diversos pesquisadores como importante mediador pró-inflamatório. Nesse sentido, tem sido detectada em exsudatos inflamatórios (FINCHAM et alii, 1988) e parece desencadear eventos inflamatórios tais como hiperalgesia (CUNHA et alii, 1991), febre (ZAMPRONIO et alii, 1991), liberação de histamina, degranulação de neutrófilos, ativação do burst respiratório, quimiotaxia de neutrófilos (SCHRODER et alii, 1987) e, ainda, migração de neutrófilos *in vivo*, em pele de coelhos (COLDITZ et alii, 1989) e em cavidades peritoneais de ratos (RIBEIRO et alii, 1991).

4 - O MODELO EXPERIMENTAL DE CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR OXAZAFOSFORINAS

O modelo experimental de cistite hemorrágica foi idealizado por Phillips et alii (1961), tendo sido bem caracterizada em bexigas de ratos a sequência de eventos após única administração (i.p.) de CFS (200 - 400 mg/kg). Os animais que receberam 100 mg/kg desenvolveram cistite, não se observando mortalidade neste grupo, e o edema, hemorragia e úlceras eram vistos do primeiro ao quarto dia, sendo que também no quarto dia já havia sinais de regeneração incipiente.

O desenvolvimento de um modelo experimental padronizado no rato tornou possível estudar as origens da urotoxicidade dos compostos oxazafosforinas e identificar os "carreadores" desse severo efeito colateral (COX, 1979; ALARCON & MEIENHOFER, 1971). Os "carreadores" dessa urotoxicidade são as 4-hidroxioxazafosforinas, sendo a acroleína espontaneamente formada a partir desses metabólitos.

Ao longo do tempo, foram desenvolvidos trabalhos experimentais tendo como base o modelo em ratos e a partir desses trabalhos foram elaborados critérios histopatológicos a fim de que, à microscopia óptica, cistite hemorrágica pudesse ser diagnosticada (GRAY et alii, 1986). Estudos à microscopia eletrônica também foram efetuados, fato que possibilitou a ampliação das informações já disponíveis acerca das alterações pelas quais passam as diversas camadas do urotélio por acasião da agressão pela acroleína, resultando, em última instância, em exposição da lâmina própria (THEMANN et alii, 1987).

Outros trabalhos desenvolvidos no modelo em ratos tinham como objetivo básico avaliar a proteção vesical exercida por determinados compostos. Seguindo essa abordagem, há relatos de que prostaglandinas podem ser úteis na profilaxia de CH induzida por CFS, particularmente prostaglandina F2a (GRINBERG-FUNES et alii, 1990; KRANC et alii, 1992). O regime profilático através da adoção do uso

de diuréticos acidificantes, uma vez que reduzem a liberação da acroleína, também foi recomendado (DROLLER et alii, 1982; SLADEK et alii, 1982). Várias substâncias têm sido estudadas a fim de que sejam identificadas aquelas com ação detoxificante sobre os metabólitos urotóxicos da CFS e IFS e cuja ação seja, mesmo após administração sistêmica, limitada, tanto quanto possível, aos rins e ao trato urinário eferente, tais como N-acetilcisteína (TOLLEY, 1977; BROCK et alii, 1981), dissulfiram, e neste caso a CH foi desenvolvida em camundongos (HACKER, NEWMAN & ERSHLER, 1982) e mesna (2-mercaptoetanosulfonato sódico) (BROCK et alii, 1981).

No que diz respeito aos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na inflamação vesical sequente ao uso de CFS e IFS, estes ainda não foram elucidados. Entretanto, a reprodução do modelo de CH induzida por CFS em ratos permitiu que fosse demonstrado o envolvimento do NO, PAF e metabólitos da ciclo e lipoxigenase na patogênese dessa lesão (LIMA et alii, 1994).

Dado que a maioria dos anticorpos contra citocinas disponíveis são específicos para material humano ou o são para camundongos, decidimos avaliar, nesse trabalho, a possibilidade de provocar CH nestes animais a fim de dar continuidade à investigação dos mecanismos operativos na cinética do processo inflamatório vesical sequente ao uso de oxazafosforinas.

5 - OBJETIVOS

No que diz respeito à fisiopatogênese do processo inflamatório vesical por uso de oxazafosforinas, até onde pesquisamos, nada há na literatura além do descrito anteriormente. Tendo como perspectiva principal investigar a possibilidade de que citocinas pró-inflamatórias atuem nesse processo, nossos objetivos foram os que se seguem:

1- Avaliar a exequibilidade de indução de CH por CFS e por IFS em modelo murino.

2- Tendo em vista validar o modelo, verificar se mesna, um protetor do urotélio, previne a lesão vesical induzida por CFS e IFS em camundongos, tal como ocorre com sucesso na clínica.

3- Utilizar o modelo para verificar se há envolvimento de citocinas tais como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 na patogênese da lesão, além de verificarmos também se, à semelhança do observado em ratos, há participação de PAF e NO no processo inflamatório.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - ANIMAIS

Foram usados camundongos Swiss, machos, pesando de 25 a 30 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

Todos os animais foram mantidos em caixas apropriadas, em número máximo de seis, recebendo água e ração balanceada tipo purina "ad libitum".

2 - APARELHOS E INSTRUMENTOS DE LABORATÓRIO

- Autoclave vertical PHOENIX;
- Agitador modelo 4721-20 - Cole-Parmer;
- Balança analítica modelo AE 240 - Mettler Instrument Corporation;
- Beckers de 5, 10 e 50 ml (Pyrex);
- Centrífuga modelo 5415 - Brinkmann Instruments, Inc. USA;
- Capela de fluxo laminar modelo NU - 425-400 - NUAIRE;
- Espectrofotômetro (aus JENA - GERMANY DDR.);
- Grau e pistilo de porcelana;
- Histotécnico modelo 2A - Technicon Company - New York, USA;
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Material Cirúrgico: pinças, bisturi e tesouras;
- Micrótomo modelo 820 SPENCER - American Optical Corporation;
- Microscópio óptico (aus JENA - GERMANY DDR);
- Medidor de pH micronal (pH - metro B374);
- Pipetas, micropipetas e ponteiras;
- Seringas de 1 e 3 ml e agulhas 29 G e 25 G; Tubos Falcon (50 ml) de plástico;

- Tubos de ensaio de vidro, capacidade de 10 ml (Pyrex);
- Tubo Capilar para microhematócrito (Perfecta).

3 - DROGAS E DISSOLUÇÕES

- a) Ciclofosfamida (ENDUXAN® - Abbott) - dissolvida em água destilada.
- b) Ifosfamida (HOLOXANE® - Asta Medica) - dissolvida em água destilada.
- c) Mesna (MITEXAN® - Labofarma) - diluído em água destilada.
- d) Soro de carneiro anti-TNF- α murino - diluído em salina a 0,9%.
- e) Soro de carneiro anti-IL 1 β humano - diluído em salina a 0,9%.
- f) Soro de carneiro anti-IL 6 humano - diluído em salina a 0,9%.
- g) Soro de carneiro anti-IL 8 humano - diluído em salina a 0,9%.
- Todos os soros foram gentilmente cedidos pelo Dr. T. Meager e Dr. Steeve Poole, obtidos do National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Herts, U.K., através do Prof. Dr. Fernando Cunha do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP-SP.ghg
- h) Dexametasona (DECADRONAL® - Prodrôme) - dissolvida em água destilada.
- i) Pentoxifilina (TRENTAL® - Hoechst) - diluída em água destilada.
- j) Talidomida (Fundação Ezequiel Dias - FUNED - CEME) - dissolvida em água destilada.
- k) Composto BN 52021 (Instituto Pasteur - Paris) - liofilizado de 10 mg que foi adicionado ao diluente específico e, em seguida, rediluído em solução tampão (PBS).

- l) L-nitro-arginina metil éster - L-NAME (Sigma Chemical Co.)
- dissolvida em água destilada.
- m) L-arginina (Sigma Chemical Co.) - dissolvida em água destilada.
- n) D-arginina (Sigma Chemical Co.) - dissolvida em água destilada.
- o) Aldeído Fórmico (Reagen) - dissolvido em água destilada, com obtenção de solução aquosa a 10% e, em seguida, tamponado.
- p) Formamida (Vetec).

4- SOLUÇÕES E CORANTES

a) Salina tamponada com fosfato (PBS)

Cloreto de sódio P.A. (Merck) 8,00 g
 Cloreto de potássio P.A. (Merck) 0,20 g
 Fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck) 1,15 g
 Fosfato de sódio monobásico P.A. (Merck) 0,20 g
 Água destilada q.s.p. 1,001 ml
 O pH foi elevado para 7,4 com NaOH 0,1M e a solução autoclavada antes do uso.

b) Solução tampão de aldeído fórmico

Formol a 40% 100,0 ml
 Fosfato de sódio monobásico P.A. (Merck) 4,0 g
 Fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck) 6,5 g
 Água destilada q.s.p. 900,0 ml

c) Azul de Evans

Azul de Evans 2,5 g
 Água destilada 100,0 ml

d) Hematoxilina de Harris

Hematoxilina 0,5 g
 Álcool absoluto 5,0 ml
 Alúmen de potássio ou amônio 10,0 g
 Óxido vermelho de mercúrio 0,25 g
 Água destilada 100,0 ml

e) *Eosina*

Eosina Y (amarela hidrossolúvel)0,5 g
Água destilada10,0 ml
Álcool a 95%90,0 ml
Ácido acético1 gota

5 - INDUÇÃO DE CISTITE HEMORRÁGICA

Camundongos Swiss machos (25-30 g) foram submetidos à injeção intraperitoneal de CFS ou IFS nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. Sacrificados, por deslocamento cervical, após 6, 12, 24, 48 e 72 horas da administração da droga. Em seguida, através de uma incisão abdominal mediana, realizamos cuidadosa dissecação vesical, sendo as bexigas seccionadas junto ao colo e abertas, desprezando-se o conteúdo urinário.

Os resultados têm como base observações feitas sobre os seguintes parâmetros: o peso vesical úmido, a permeabilidade vascular vesical e a histopatologia das bexigas, efetuada conforme descrição que se segue.

5.1 - DETERMINAÇÃO DO PESO VESICAL ÚMIDO

Após secção e abertura das bexigas, essas foram pesadas e o peso úmido vesical expresso em mg/20g de peso do animal, visando, sobretudo a correção em função da variação de peso dos animais no grupo.

5.2 - DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR VESICAL

A metodologia empregada para medir o aumento da permeabilidade vascular foi baseada naquela utilizada por Garcia-Leme e Wilhelm (1975). Contudo, seguimos adaptações feitas a fim de adequar o seu uso para o modelo da cistite hemorrágica (LIMA et alii, 1994).

Uma hora antes do sacrifício, os animais foram submetidos à injeção endovenosa, via plexo venoso retroorbitário, de uma solução a 2.5% de Azul de Evans, na

dose de 3,75 mg/kg de peso. Posteriormente, os animais foram sacrificados e, no mínimo seis animais por grupo, tiveram suas bexigas retiradas, pesadas, conforme descrito anteriormente, e imersas em 1,0 ml de formamida. Os tubos de ensaio contendo formamida e as bexigas foram mantidos à temperatura ambiente por um período de 24 horas. Em seguida, procedemos à leitura da formamida tinta pelo azul de Evans extraído dos tecidos vesicais, em espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda de 600 nm. Os dados obtidos em absorbância foram convertidos em micrograma (μg) de azul de Evans através da utilização de uma curva padrão que resultou em uma função matemática. Os resultados foram dados em μg de azul de Evans/bexiga e expressos em média \pm EPM.

5.3 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Bexigas de cinco animais de cada grupo, após ressecção, foram fixadas em formol a 10%, desidratadas, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes com espessura de 5 μm foram obtidos, corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) e analisados à microscopia óptica. As alterações histológicas foram enquadradas de acordo com os critérios estabelecidos por Gray et alii (1986), que são os seguintes:

(0) - **histologia normal** - caracterizada por epitélio urotelial normal, ausência de infiltrado inflamatório, ausência de úlceras.

(1+)- **alterações discretas** - caracterizadas por redução no número de células epiteliais uroteliais em decorrência de descamação, apagamento das dobras de mucosa habituais em virtude do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras.

(2+)- **alterações intensas** - caracterizadas por exulceração da mucosa, múltiplas úlceras, edema acentuado, infiltrado inflamatório, depósito de fibrina e hemorragia.

6 - AVALIAÇÃO DA CITOPROTEÇÃO VESICAL EXERCIDA PELO MESNA NA CISTITE HEMORRÁGICA

Cistite hemorrágica foi induzida com CFS ou IFS na dose de 200 mg/kg, via ip, nos animais do grupo controle. Outros animais foram tratados com mesna, sendo a quantidade administrada correspondente a 20% da dose de CFS ou IFS e dada, via ip, concomitantemente, 4 e 8 horas depois, em relação à injeção de CFS ou IFS. A um outro grupo de animais administramos apenas salina a 0,9%. Os sacrifícios foram feitos 6 e 12 horas após a administração das drogas ou de água destilada.

7 - PAPEL DE CITOCINAS NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

7.1 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SORO ANTI-TNF- α

Cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, nos animais do grupo controle. Outros animais receberam, 30 minutos antes da administração de CFS (200 mg/kg, via ip), injeção intraperitoneal de soro anti-TNF- α murino de carneiro (25 ou 50 μ l diluídos em 500 μ l de salina a 0,9%). A outros grupos foi administrado soro pré-imune de carneiro (soro controle; 50 μ l diluídos em 500 μ l de salina a 0,9%). Os sacrifícios foram feitos 6 e 12 horas após a injeção de CFS.

7.2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SORO ANTI-IL-1 β

Cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, nos animais do grupo controle. Outros animais receberam, 30 minutos antes da administração de CFS (200 mg/kg, via ip), injeção intraperitoneal de soro anti-IL-1 β humano de carneiro (25 ou 50 μ l diluídos em 500 μ l de salina a 0,9%). A outros grupos foi administrado soro pré-imune de carneiro (soro controle; 50 μ l diluídos em 500 μ l

de salina a 0,9%). Os sacrifícios foram feitos 6 e 12 horas após a injeção de CFS.

7.3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SORO ANTI-IL-6

Cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, nos animais do grupo controle. Outros animais receberam, 30 minutos antes da administração de CFS (200 mg/kg, via ip), injeção intraperitoneal de soro anti-IL-6 humano de carneiro (25 ou 50 µl diluídos em 500 µl de salina a 0,9%). A outros grupos foi administrado soro pré-imune de carneiro (soro controle; 50 µl diluídos em 500 µl de salina a 0,9%). Os sacrifícios foram feitos 6 e 12 horas após a injeção de CFS.

7.4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SORO ANTI-IL-8

Cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, nos animais do grupo controle. Outros animais receberam, 30 minutos antes da administração de CFS (200 mg/kg, via ip), injeção intraperitoneal de soro anti-IL-8 humano de carneiro (25 ou 50 µl diluídos em 500 µl de salina a 0,9%). A outros grupos foi administrado soro pré-imune de carneiro (soro controle; 50 µl diluídos em 500 µl de salina a 0,9%). Os sacrifícios foram feitos 6 e 12 horas após a injeção de CFS.

8 - EFEITO DE DEXAMETASONA, PENTOXIFILINA E TALIDOMIDA NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLÓFOSFAMIDA

8.1 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE DEXAMETASONA SOBRE A LESÃO

Cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, nos animais do grupo controle. Outros

grupos de camundongos tratados 12 horas antes com CFS (200 mg/kg, via ip) também foram submetidos à injeção intraperitoneal de dexametasona, nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg, 30 minutos antes da administração de CFS. Os sacrifícios foram feitos 12 horas após a injeção de CFS.

8.1.1 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DEXAMETASONA NO CURSO TEMPORAL DA LESÃO

Nos grupos controle, cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip e os animais sacrificados 6, 12, 24 e 48 horas após o estímulo. Outros grupos de camundongos tratados antes com CFS (200 mg/kg, via ip) também foram submetidos à injeção intraperitoneal de dexametasona, na dose de 2,0 mg/kg, 30 minutos antes da administração de CFS. Os sacrifícios foram feitos 6, 12, 24 e 48 horas após a injeção de CFS.

8.2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE PENTOXIFILINA SOBRE A LESÃO

Cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, nos animais do grupo controle. Outros grupos de camundongos tratados 12 horas antes com CFS (200 mg/kg, via ip) também foram submetidos à injeção intraperitoneal de pentoxifilina, nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg, 30 minutos antes da administração de CFS. Os sacrifícios foram feitos 12 horas após a injeção de CFS.

8.2.1 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PENTOXIFILINA NO CURSO TEMPORAL DA LESÃO

Nos grupos controle, cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, e os animais sacrificados 6, 12, 24 e 48 horas após o estímulo. Outros grupos de camundongos tratados antes com CFS (200 mg/kg, via ip) também foram submetidos à injeção intraperitoneal de pentoxifilina, na dose de 45 mg/kg, 30 minutos antes da

administração de CFS. Os sacrifícios foram feitos 6, 12, 24 e 48 horas após a injeção de CFS.

8.3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE TALIDOMIDA SOBRE A LESÃO

Cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, nos animais do grupo controle. Outros grupos de camundongos tratados 12 horas antes com CFS (200 mg/kg, via ip) também foram submetidos à injeção intraperitoneal de talidomida, nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg, 30 minutos antes da administração de CFS. Os sacrifícios foram feitos 12 horas após a injeção de CFS.

8.3.1 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE TALIDOMIDA NO CURSO TEMPORAL DA LESÃO

Nos grupos controle, cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, e os animais sacrificados 6, 12, 24 e 48 horas após o estímulo. Outros grupos de camundongos tratados antes com CFS (200 mg/kg, via ip) também foram submetidos à injeção intraperitoneal de talidomida, na dose de 40 mg/kg, 30 minutos antes da administração de CFS. Os sacrifícios foram feitos 6, 12, 24 e 48 horas após a injeção de CFS.

9- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE DEXAMETASONA, PENTOXIFILINA E TALIDOMIDA NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA.

Nos grupos controle, cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, e os animais sacrificados 6, 12 horas após o estímulo. Dois outros grupos de camundongos tratados com CFS (200 mg/kg, via ip) também foram submetidos à injeção intraperitoneal de dexametasona (0,5 mg/kg), pentoxifilina (5 mg/kg) e talidomida (10 mg/kg), 30 minutos antes da administração de CFS. Os

sacrifícios foram feitos 6 e 12, respectivamente para cada um dos grupos.

10 - EFEITO DO COMPOSTO BN-52021 NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

10.1 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE BN-52021 SOBRE A LESÃO

Cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, nos animais do grupo controle. Outros grupos de camundongos tratados 12 horas antes com CFS (200 mg/kg, via ip) também foram submetidos à injeção subcutânea de BN-52021, um antagonista do PAF, nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg, 30 minutos antes da administração de CFS. Os sacrifícios foram feitos 12 horas após a injeção de CFS.

10.2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BN-52021 NO CURSO TEMPORAL DA LESÃO

Nos grupos controle, cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, e os animais sacrificados 6 e 12 horas após o estímulo. Outros grupos de camundongos tratados antes com CFS (200 mg/kg, via ip) também foram submetidos à injeção subcutânea do composto BN-52021, na dose de 10 mg/kg, 30 minutos antes da administração de CFS. Os sacrifícios foram feitos 6 e 12 horas após a injeção de CFS.

11 - EFEITO DO L-NAME NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

Cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, nos animais do grupo controle. Outros grupos de camundongos tratados 12 horas antes com CFS (200 mg/kg, via ip) também foram submetidos à injeção intraperitonel de L-NAME, um antagonista da síntese de NO,

nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg, 30 minutos antes da administração de CFS. Os sacrifícios foram feitos 12 horas após a injeção de CFS.

12 - EFEITO DE L-ARGININA E D-ARGININA NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM L-NAME

Cistite hemorrágica foi induzida com CFS na dose de 200 mg/kg, via ip, nos animais do grupo controle. Quatro grupos de camundongos tratados 12 horas antes com CFS (200 mg/kg, via ip) também foram submetidos à injeção intraperitoneal de L-NAME, 20 mg/kg, 30 minutos antes da administração de CFS, tendo sido também administrado a três dos grupos L-arginina nas doses de 150, 300 e 600 mg/kg, via ip, e, a um dos grupos, D-arginina na dose de 600 mg/kg, via ip. Os sacrifício foram feitos 12 horas após a injeção de CFS.

13 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos foram expressos como média \pm EPM ou mediana, acompanhado pelo número de observações (n).

Para comparações entre grupos, os seguintes testes estatísticos foram utilizados, tendo sido considerado como significativo $p < 0,05$:

a) Análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste de Fisher, utilizando níveis de significância maior que 95% (FISHER, 1966).

b) Teste de Mann-Whitney-U para comparação das alterações histológicas entre os grupos (GRINBERG-FUNES, SHELDON & WEISS, 1990).

III - RESULTADOS

1 - MODELO EXPERIMENTAL COM CICLOFOSFAMIDA

1.1- Efeito de doses crescentes de ciclofosfamida em bexigas de camundongos em 12 horas.

A injeção intraperitoneal de CFS induziu aumento de 118% e de 136% no peso úmido vesical, com as doses de 200 e 400 mg/kg respectivamente, sendo tais aumentos estatisticamente significativos, quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). O aumento do peso úmido com a dose de 100 mg/kg não foi significativo, sendo de apenas 21% em relação ao grupo controle.

Quanto à permeabilidade vascular, essa foi expressivamente aumentada com as três doses, sendo o aumento de 274%, 827% e 898%, respectivamente, para 100, 200 e 400 mg/kg ($p < 0,05$) (figura 1).

À análise histopatológica, observamos alterações vesicais discretas nos animais que receberam 100 mg/kg, e cistite hemorrágica completamente desenvolvida nos que receberam as demais doses. Nesses, as bexigas tinham urotélio extensamente exulcerado, sendo freqüente a ocorrência de úlceras, acentuado o edema, presente o exsudato leucocitário, no qual predominavam os neutrófilos e, em meio a esses, múltiplos os depósitos de fibrina e as áreas de hemorragia. As alterações vistas nos grupos que receberam 200 e 400 mg/kg foram classificadas como intensas, segundo os critérios de Gray et alii (1986).

1.2- Cinética da Cistite Hemorrágica induzida por ciclofosfamida.

A administração intraperitoneal de CFS, na dose de 200 mg/kg, induziu aumento estatisticamente significativo no peso úmido vesical e na permeabilidade vascular já na sexta hora após a indução da cistite (61% e 576%). Valores máximos foram alcançados doze horas após a administração da droga (118% e 827%) e, a partir daí, observamos decréscimo

progressivo destes valores, muito embora permanecessem significativamente elevados até 48 horas ($p < 0,05$) (figura 2).

Verificamos ser direta a correlação entre o peso úmido vesical e a permeabilidade vascular, sendo positivo o coeficiente de correlação entre estas variáveis ($r = 0,99$).

O estudo histopatológico revelou, no grupo sacrificado 6 horas após, CH intensa em três das bexigas e discreta nas demais, sendo vistas, comumente, áreas hemorrágicas. No grupo sacrificado 12 horas após, encontramos CH intensa em todos os animais, sendo freqüente a ocorrência de vasculite, muito embora não considerada pelos critérios que adotamos. No tempo de 24 horas as bexigas, muito embora ainda exibissem úlceras, edema e infiltrado histioneutrofílico, estes eram menos intensos quando comparados com as alterações dos grupos sacrificados com 12 horas, sendo particularmente reduzidas a vasculite e as áreas hemorrágicas (prancha 1). A partir de 24 horas da injeção de CFS, as alterações presentes foram progressivamente menos intensas, restando apenas discretos edema e congestão no terceiro dia.

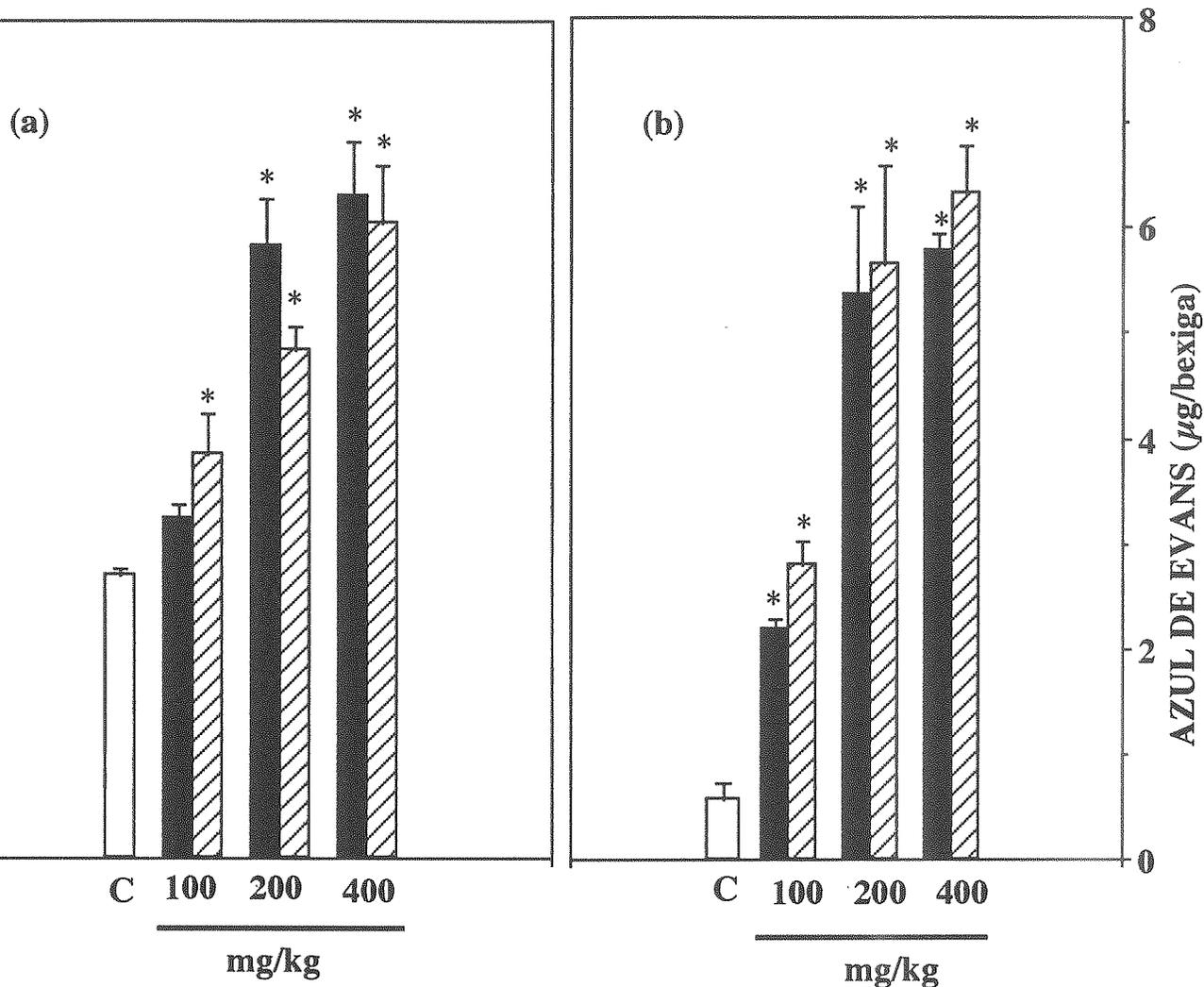


Figura 01. Ciclofosfamida e Ifosfamida induzem de forma dose dependente um aumento no peso úmido e permeabilidade vascular de bexigas de camundongos. Os painéis (a) e (b) mostram, respectivamente, o peso úmido e a permeabilidade vascular de bexigas de camundongos tratados 12 h antes com Ciclofosfamida (■) e Ifosfamida (▨) nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 6$). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle (bexigas normais); ANOVA-teste de Fisher.

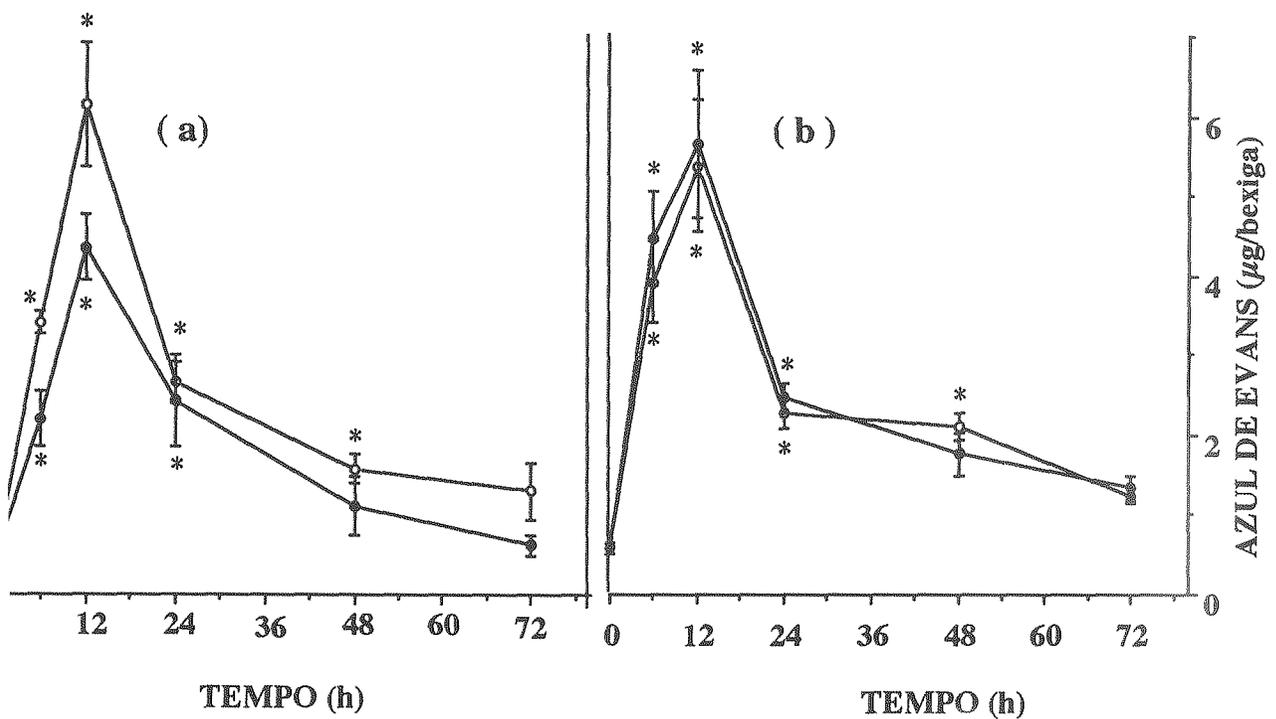


Figura 02. Cinética do aumento do peso úmido vesical e da permeabilidade vascular na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida e ifosfamida. Os gráficos (a) e (b) mostram, respectivamente o peso úmido e a permeabilidade vascular de bexigas de camundongos tratados 6, 12, 24, 48, ou 72 h antes com ciclofosfamida (○ - 200 mg/Kg, via ip) ou Ifosfamida (● - 200mg/Kg, via ip). Os resultados são expressos como média \pm EPM (n \geq 6). (*) p < 0.05 comparado com o grupo controle (bexigas normais); ANOVA - teste de Fisher.

PRANCHA 1

PRANCHA 1.

A- Bexiga normal.

B- Cistite hemorrágica(2 +) induzida por ciclofosfamida(6 h)

C- Cistite hemorrágica(2 +) induzida por ciclofosfamida(12 h)

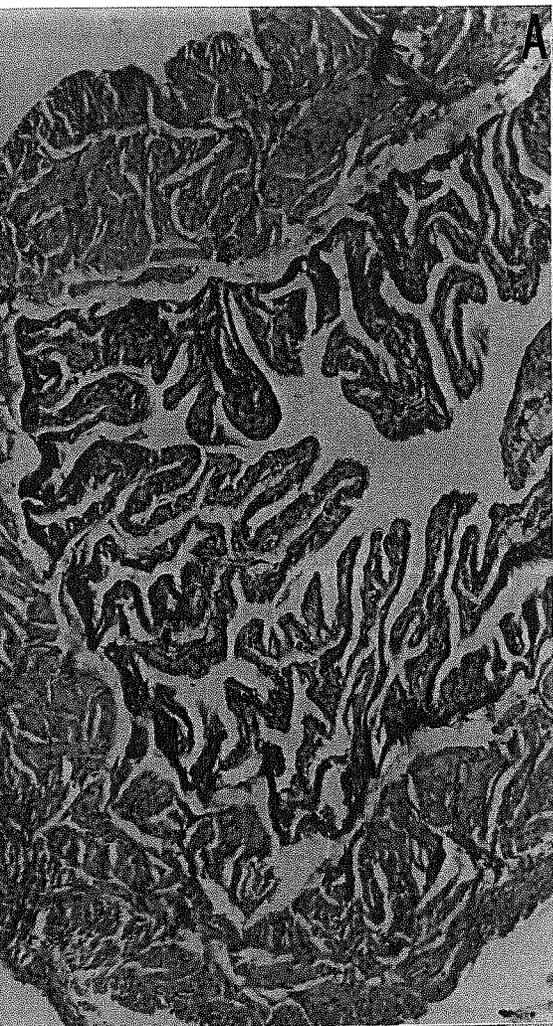
D- Cistite hemorrágica(2 +) induzida por ciclofosfamida(24 h)

Classificação de Gray. Coloração H & E. Aumento 40x.

B



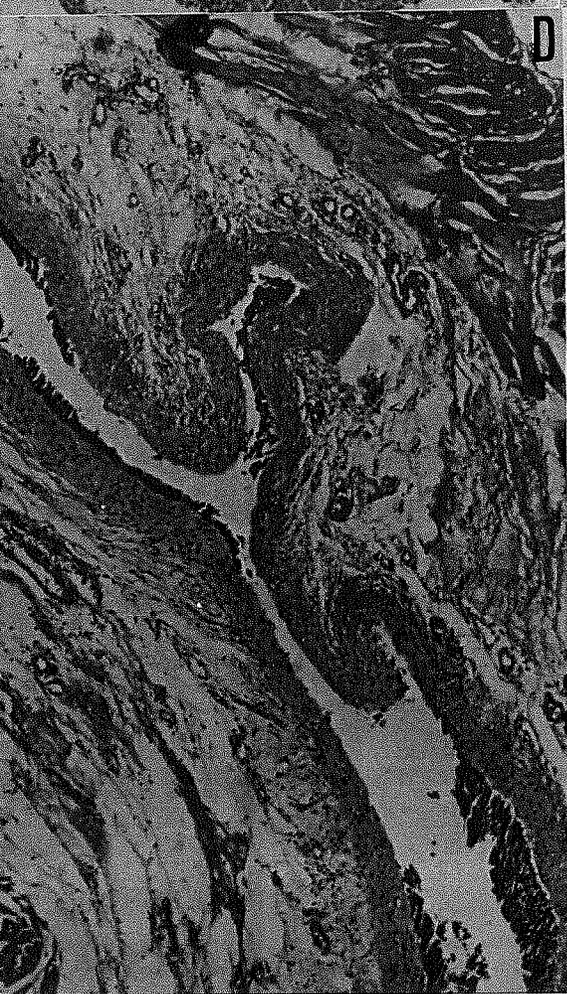
A



C



D



PRANCHA 2

PRANCHA 2.

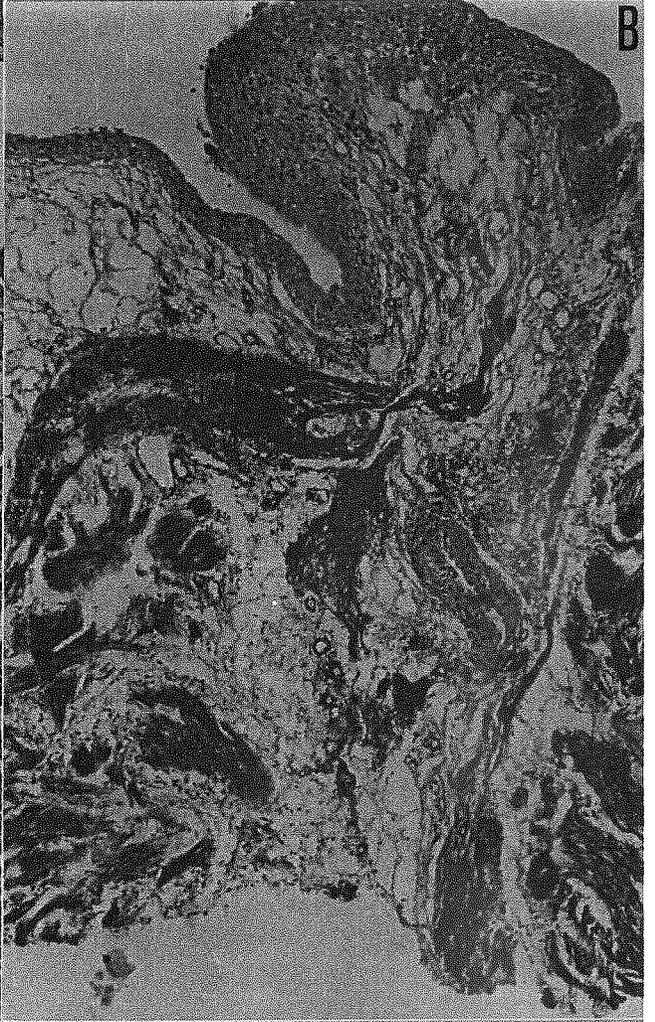
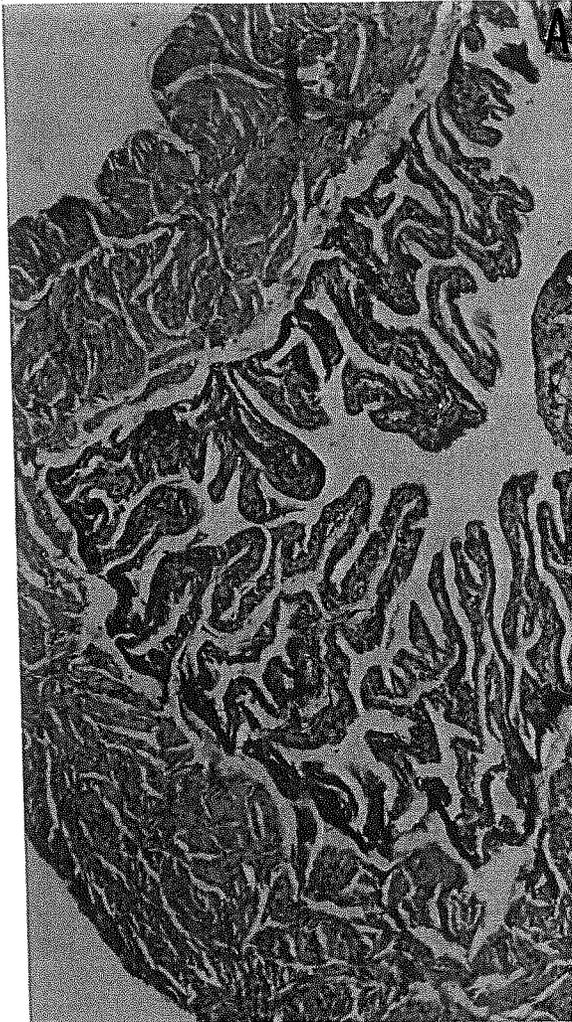
A- Bexiga normal.

B- Cistite hemorrágica (2 +) induzida por ifosfamida (6 h)

C- Cistite hemorrágica (2 +) induzida por ifosfamida (12 h)

D- Cistite hemorrágica (2 +) induzida por ifosfamida (24 h)

Classificação de Gray. Coloração H & E. Aumento 40x.



ifosfami
ifosfami
ifosfami
umento 40

2 - MODELO EXPERIMENTAL COM IFOSFAMIDA

2.1- Efeito de doses crescentes de ifosfamida em bexigas de camundongos em 12 horas.

A injeção intraperitoneal de IFS induziu aumento significativo no peso úmido vesical, sendo de 44%, 81% e 126%, respectivamente, para 100, 200 e 400 mg/kg.

A permeabilidade vascular, aumentou acentuadamente e o aumento também foi dose dependente, sendo de 379%, 874% e 990%, respectivamente, para 100, 200 e 400 mg/kg (figura 1).

As alterações histológicas observadas permitiram classificação de cistite hemorrágica discreta em três dentre os cinco animais que receberam a menor dose de IFS, e cistite hemorrágica intensa nos demais animais desse grupo. Cistite hemorrágica completamente desenvolvida foi vista em todos os animais que receberam 200 e 400 mg/kg.

2.2- Cinética da Cistite Hemorrágica induzida por ifosfamida.

As alterações vesicais relacionadas ao peso, à permeabilidade vascular e à histologia, observadas nos tempos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas por ocasião de indução de cistite com IFS na dose de 200 mg/kg, foram semelhantes às vistas com CFS. Ou seja, na sexta hora já houve aumento significativo no peso vesical e na permeabilidade vascular (36% e 670%), com ocorrência de valores máximos no tempo de 12 horas (81% e 874%). A partir daí, houve redução crescente destas variáveis, sendo que a tendência à retomada de medidas próximas às vistas em bexigas do grupo controle deu-se em tempo mais rápido que o observado com CFS, de modo que no segundo dia os aumentos eram discretos e não significantes (figura 2).

O estudo de interdependência entre o peso úmido e a permeabilidade vascular, mostrou haver uma correlação positiva entre elas ($r=0,96$).

Os achados histopatológicos nos tempos de 6, 12 e 24 horas foram semelhantes aos vistos nos animais em que foi

administrada CFS. As bexigas dos grupos sacrificados no segundo e terceiro dia apresentavam apenas edema e congestão que variou de discreta a moderada (prancha 2).

3- AVALIAÇÃO DA CITOPROTEÇÃO VESICAL EXERCIDA PELO MESNA NA CISTITE HEMORRÁGICA

3.1- Efeito do mesna na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida.

O tratamento dos animais com mesna inibiu de forma significativa o aumento do peso úmido vesical e da permeabilidade vascular nos tempos de 6 e 12 horas após a injeção de CFS. Com 6 horas, a inibição do peso e da permeabilidade foi, respectivamente, de 91% e 77%, e com 12 horas foi de 69% e 78%, respectivamente para o peso e permeabilidade vascular (figura 3).

A análise histopatológica revelou ausência de CH em praticamente todos os animais, cujas bexigas exibiam urotélio íntegro e apenas congestão discreta confinada à lâmina própria (tabela 1) (prancha 3). Observamos CH discreta em um dos animais sacrificados no tempo de 6 horas e em dois no tempo de 12 horas.

3.2- Efeito do mesna na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

O tratamento dos animais com mesna inibiu de forma significativa o aumento do peso úmido vesical e da permeabilidade vascular nos tempos de 6 e 12 horas após a indução de cistite por IFS, sendo os resultados comparáveis aos vistos após a indução de cistite por CFS. Com 6 horas, a inibição do peso e da permeabilidade foi, respectivamente, de 92% e 87%, e com 12 horas, foi de 86% e 83%, respectivamente para o peso e permeabilidade vascular (figura 4).

O resultado da histopatologia foi muito semelhante ao visto nos animais tratados com mesna e cuja cistite foi induzida com CFS, ou seja, ausência de CH em quase todos os

animais, com bexigas exibindo urotélio íntegro e apenas congestão discreta da lâmina própria (tabela 1) (prancha 3). CH discreta foi observada em apenas um animal de cada grupo.

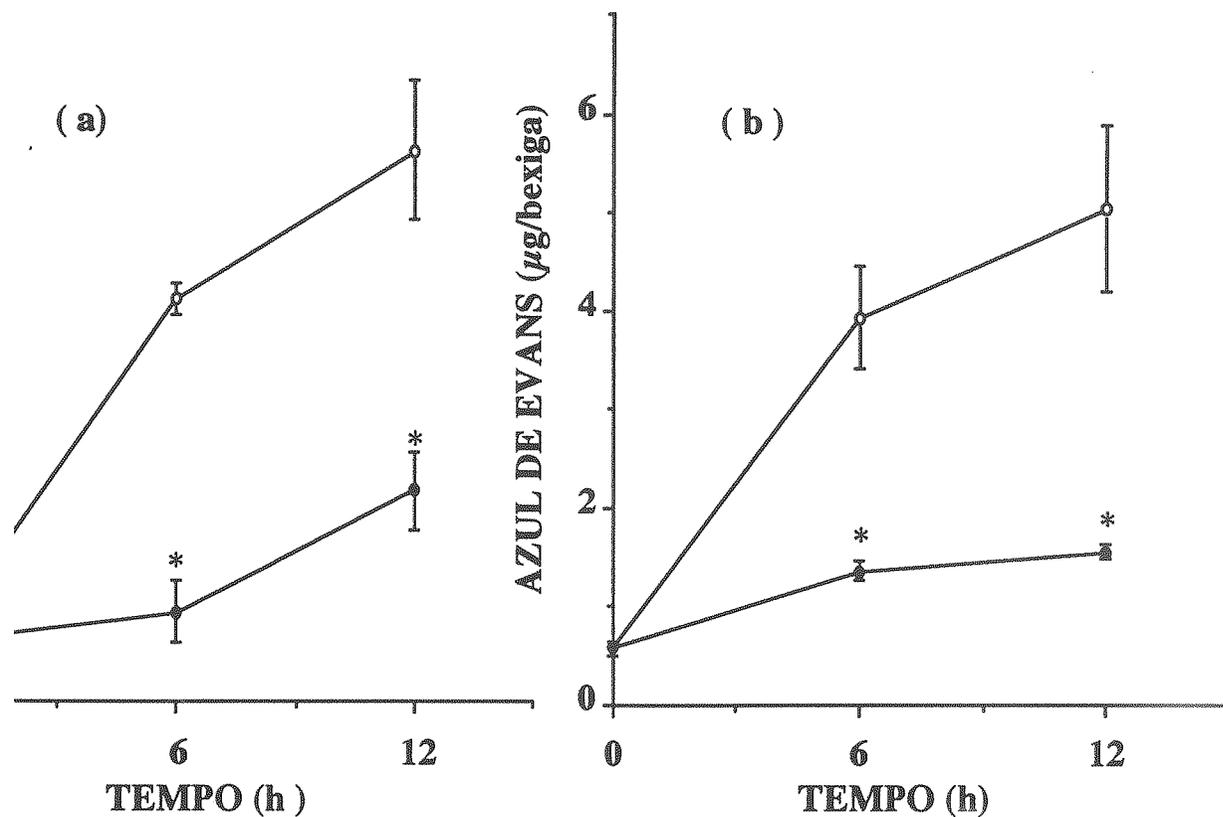
TABELA 1. Comparação das alterações histológicas¹ entre o grupo controle e o grupo tratado com Mesna na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida e por Ifosfamida².

Tempo (h)	Controle CFS	Mesna CFS	Controle IFS	Mesna IFS
06	2 (1,2)	0 (0,1)*	2 (1,2)	0 (0,1)*
12	2 (2,2)	0 (0,1)*	2 (2,2)	0 (0,1)*

1- De acordo com os critérios de Gray.

2- Cada número representa a mediana dos valores obtidos de 5 bexigas de camundongos, comparado com o grupo controle e o grupo tratado com mesna.

* Teste Mann-Whitney-U, $p < 0,05$.



A 03. Efeito protetor do MESNA na Cistite Hemorrágica induzida por ciclofosfamida. Os painéis (a) e (b) mostram, respectivamente, o peso úmido e a permeabilidade vascular de bexigas de camundongos injetados com Ciclofosfamida (10 mg/kg, via ip) e tratados com MESNA (• - 20% da dose de CFS antes, 4 e 8 h após CFS, via ip). Os resultados são expressos como média \pm \pm 6). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle específico (grupo não com MESNA); ANOVA-teste de Fisher.

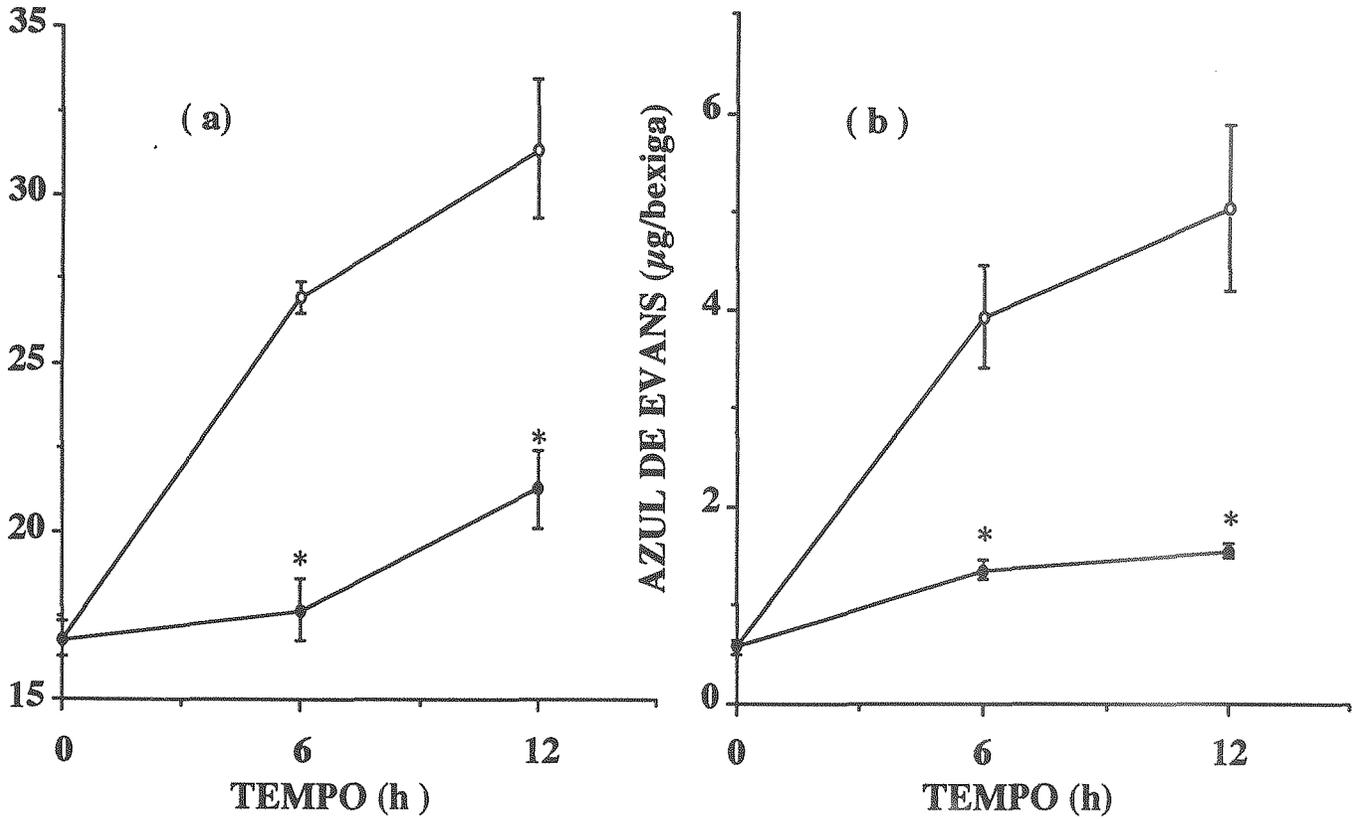


FIGURA 03. Efeito protetor do MESNA na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida . Os painéis (a) e (b) mostram, respectivamente, o peso úmido e a permeabilidade vascular de bexigas de camundongos injetados com Ciclofosfamida (° - 200 mg/ kg, via ip) e tratados com MESNA (• - 20% da dose de CFS juntamente, 4 e 8 h após CFS, via ip). Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=6). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle específico (grupo não tratado com MESNA); ANOVA-teste de Fisher.

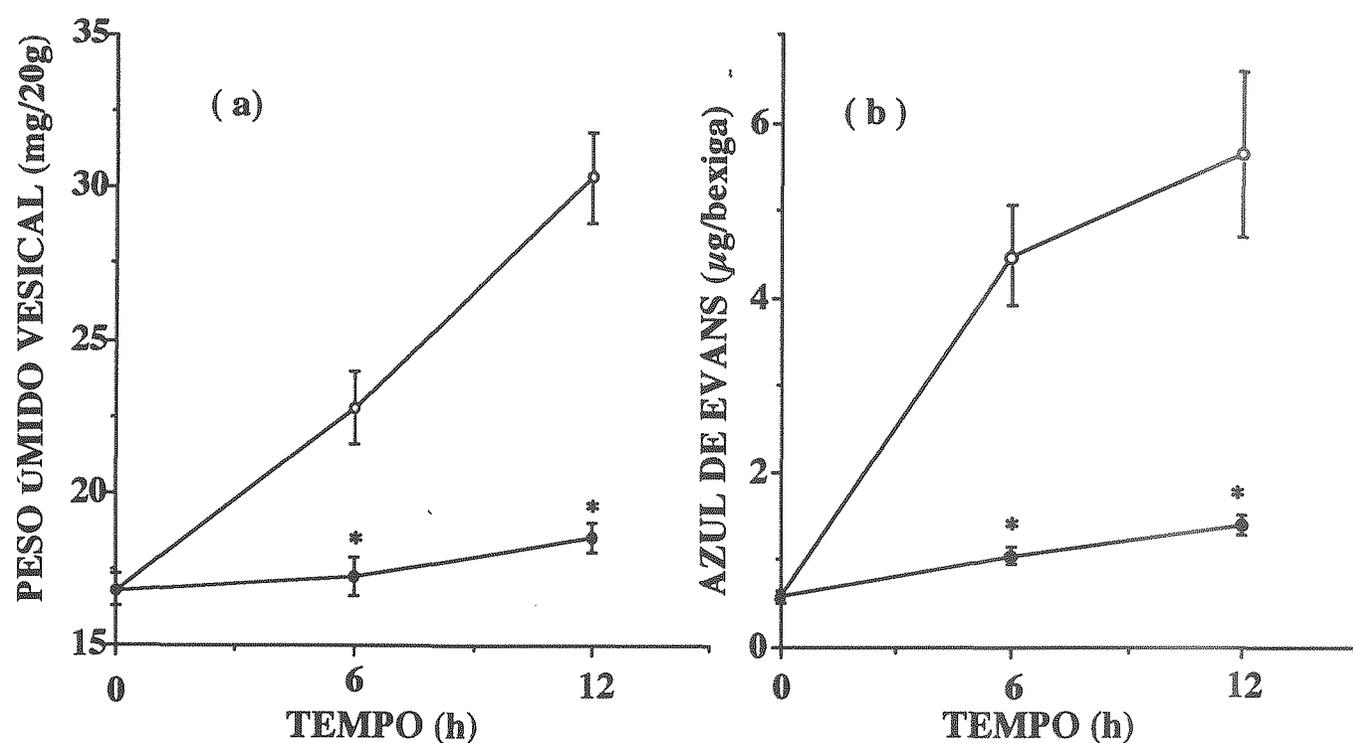


FIGURA 04. Efeito protetor do MESNA na Cistite Hemorrágica induzida por Ifofosfamida . Os painéis (a) e (b) mostram, respectivamente, o peso úmido e a permeabilidade vascular de bexigas de camundongos injetados com Ifofosfamida (° - 200 mg/ kg, via ip) e tratados com MESNA (• - 20% da dose de IFS ,juntamente, 4 e 8 h após IFS, via ip).Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=6). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle específico (grupo não tratado com MESNA); ANOVA-teste de Fisher.

PRANCHA 3

PRANCHA 3.

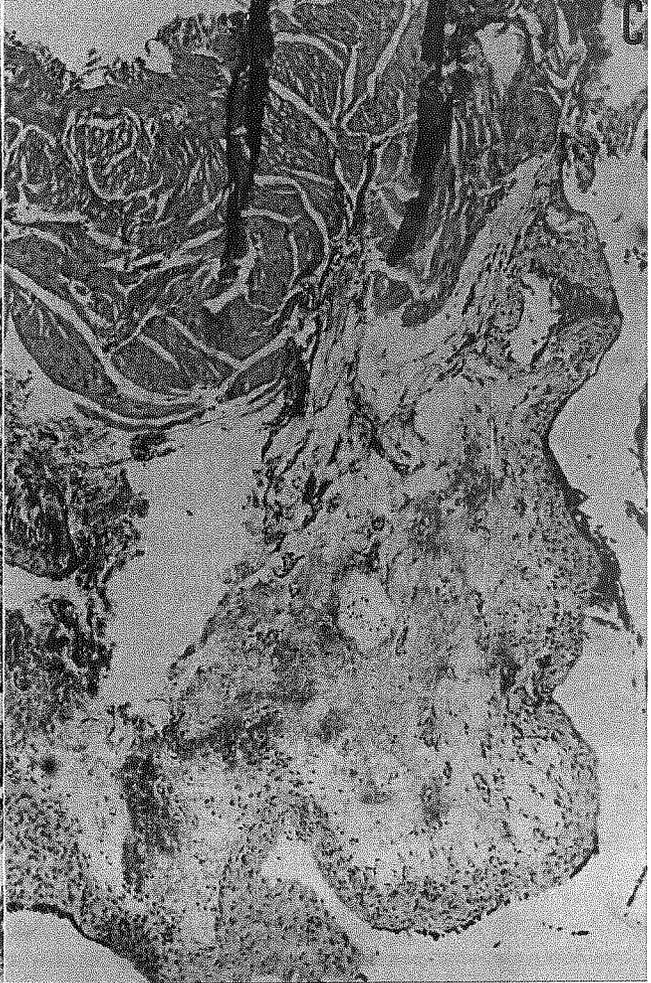
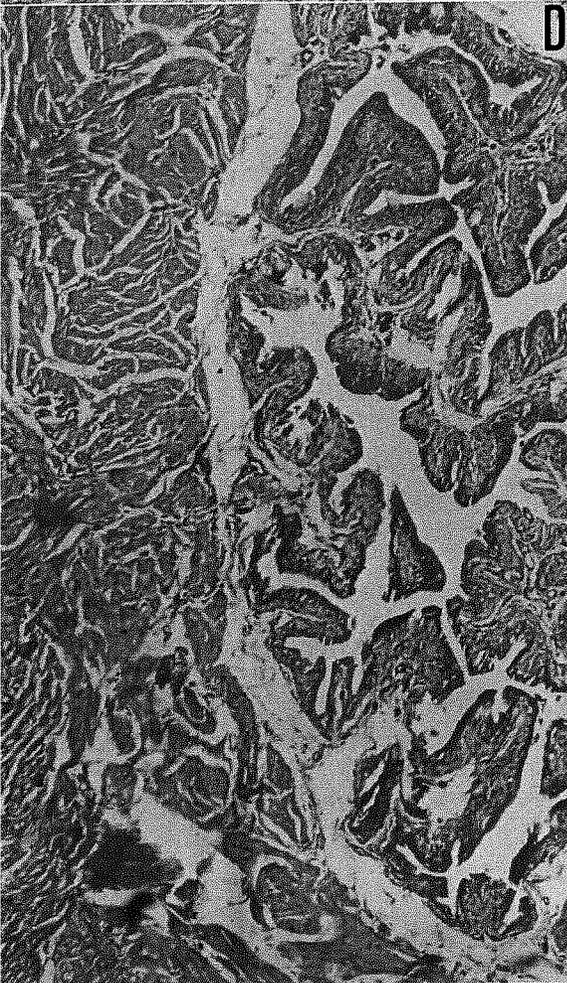
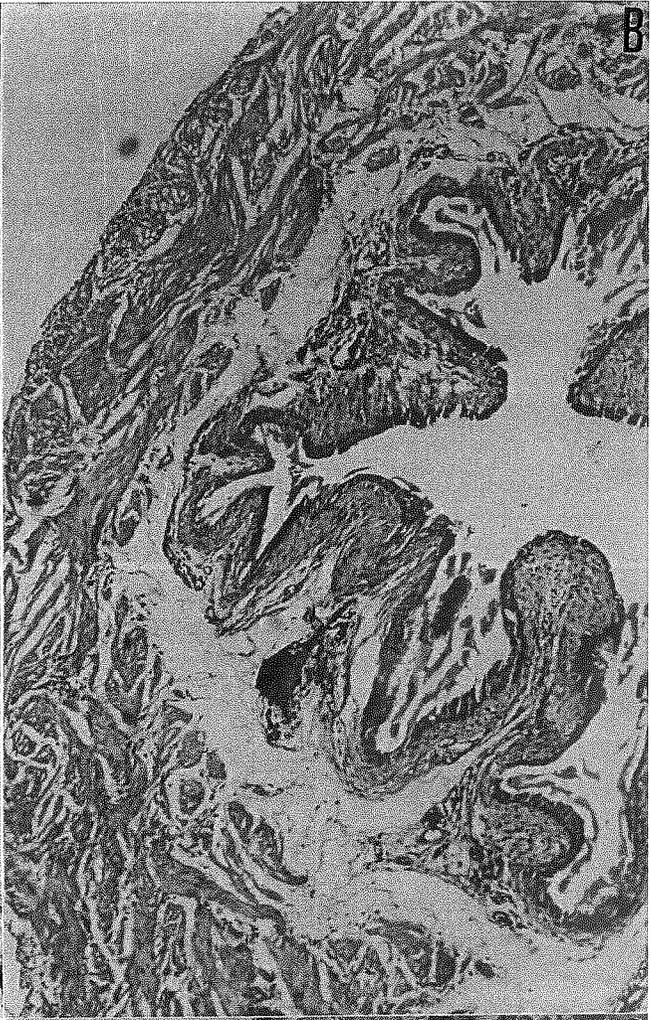
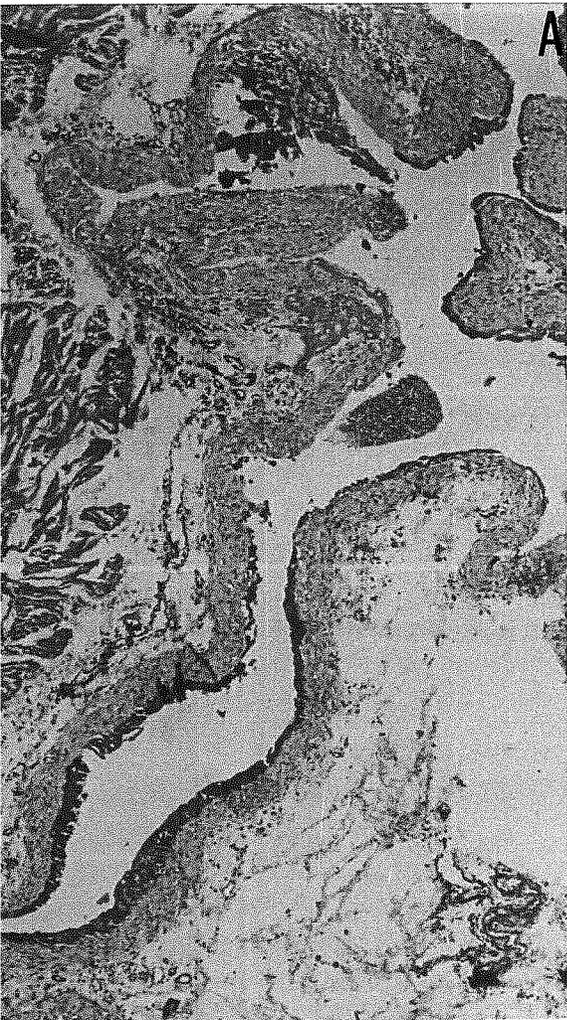
A- Cistite hemorrágica (2 +) induzida por ciclofosfamida (12 h)

B- Bexiga de camundongo que recebeu mesna e ciclofosfamida (12 h). Observa-se discreta descamação de células uroteliais das camadas mais superficiais, e discreto edema. Ausência de cistite.

C- Cistite hemorrágica (2 +) induzida por ifosfamida (12 h)

D- Bexiga de camundongo que recebeu mesna e ifosfamida (12h). Observa-se urotélio preservado e, apenas, leve edema. Ausência de cistite.

Classificação de Gray. Coloração H & E. Aumento 40x.



4- PAPEL DE CITOCINAS NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

4.1- Efeito do soro anti-TNF- α na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida.

As alterações vesicais, do ponto de vista do peso úmido, permeabilidade vascular e histopatologia, induzidas por CFS na dose de 200 mg/kg, foram significativamente menores quando os camundongos foram pré-tratados com soro anti-TNF- α nas duas diluições usadas.

A redução, 6 e 12 horas após a administração de CFS, foi de 82% e 60% e 87% e 61%, respectivamente, para o peso e permeabilidade vascular, com o soro anti-TNF- α na maior concentração (figura 5).

À análise histopatológica, observamos, em quase todos os animais submetidos ao pré-tratamento com o soro anti-TNF- α , nos dois tempos de avaliação, urotélio preservado em área mais extensa, menores edema, exsudação neutrofílica e áreas hemorrágicas, em comparação com os vistos nos animais dos grupos não tratados (tabela 2) (prancha 4).

—○— VEÍCULO
 —●— SORO CONTROLE (50 μ l) —△— ANTI-TNF- α (25 μ l)
 —▽— ANTI-TNF- α (50 μ l)

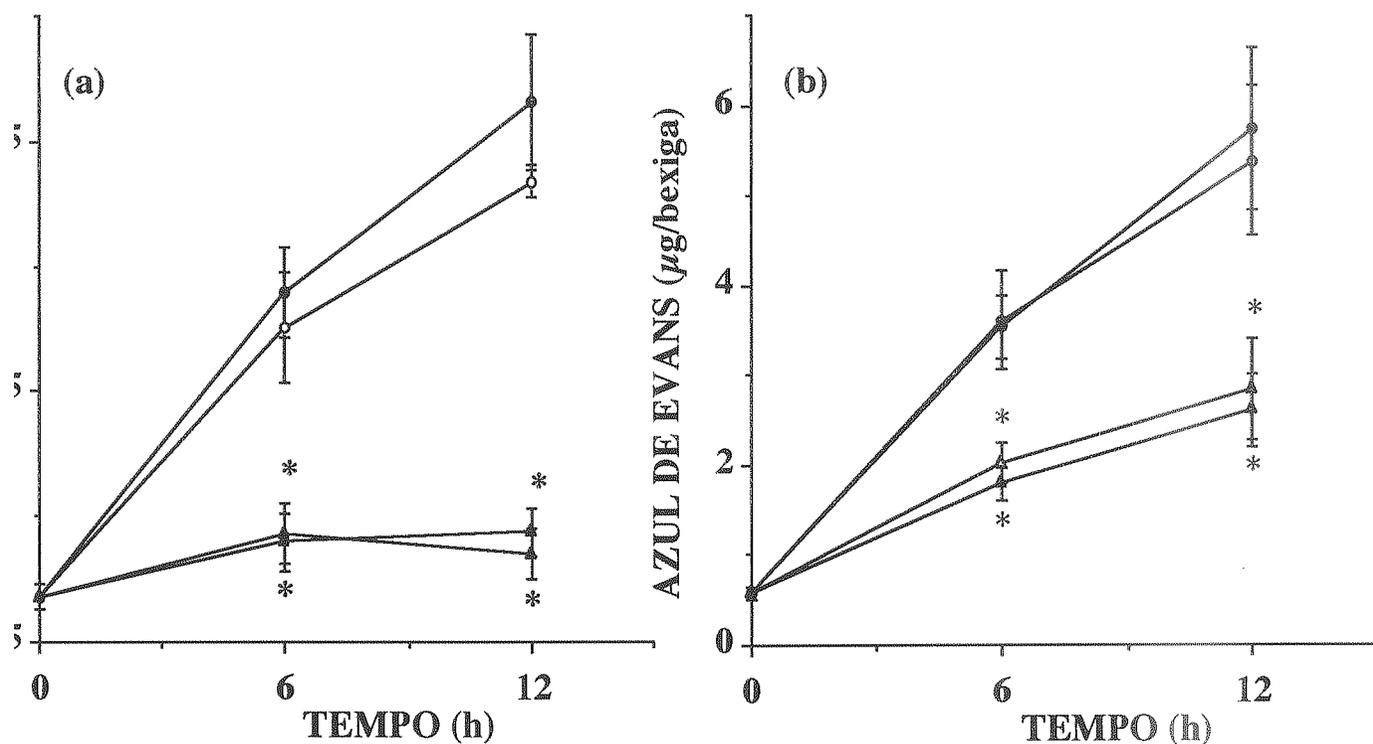


Figura 05. O pré-tratamento com soro anti-TNF- α inibe o aumento do peso vesical e da permeabilidade vascular na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. Os painéis (a) e (b) mostram, respectivamente, o peso úmido e a permeabilidade vascular de bexigas de camundongos injetados com Ciclofosfamida (200 mg/Kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com veículo, soro controle (50 μ l) ou soro anti-TNF- α (25 e 50 μ l). Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 6$). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle (veículo); ANOVA - teste de Fisher.

PRANCHA 4

PRANCHA 4.

- A- Cistite hemorrágica (2 +) induzida por ciclofosfamida (6 h)
- B- Cistite hemorrágica (1 +) induzida por ciclofosfamida (6 h)
em camundongo pré-tratado com soro anti-TNF- α .
- C- Cistite hemorrágica (2 +) induzida por ciclofosfamida (12 h)
- D- Cistite hemorrágica (1 +) induzida por ciclofosfamida (12 h)
em camundongo pré-tratado com soro anti-TNF- α .

Classificação de Gray. Coloração H & E. Aumento 40x.

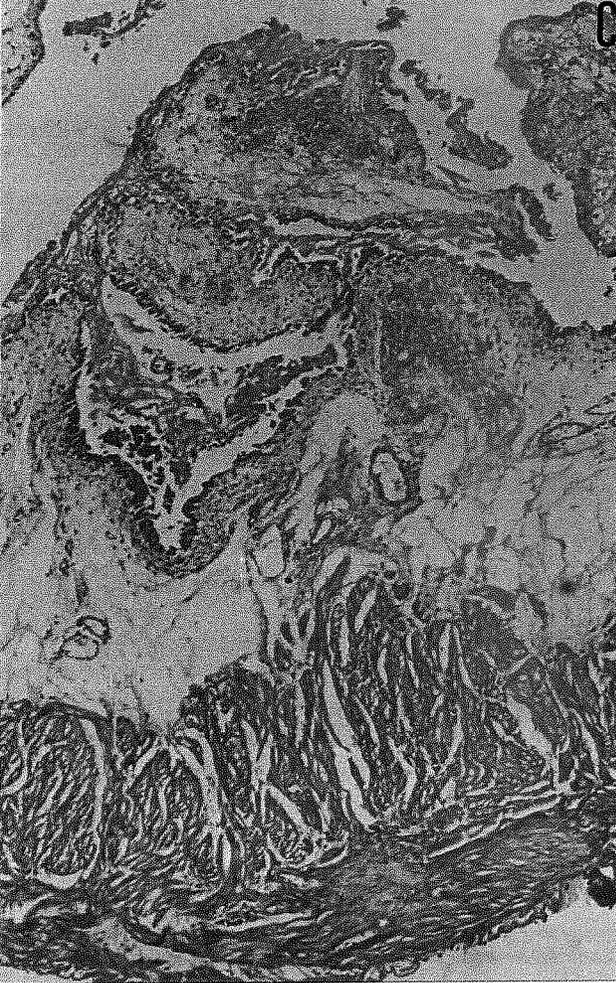
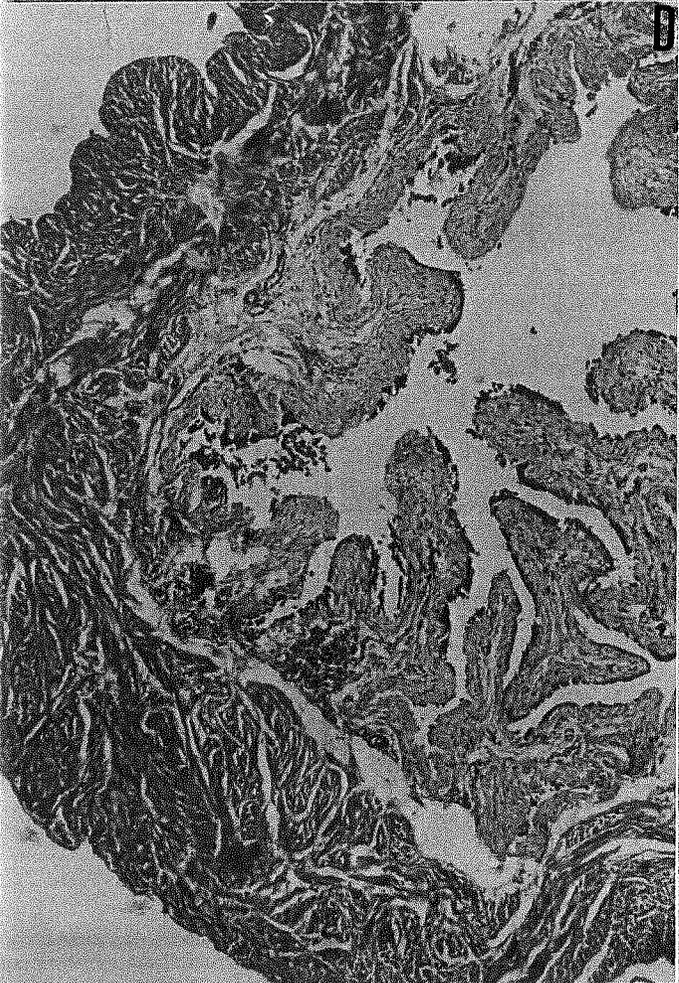
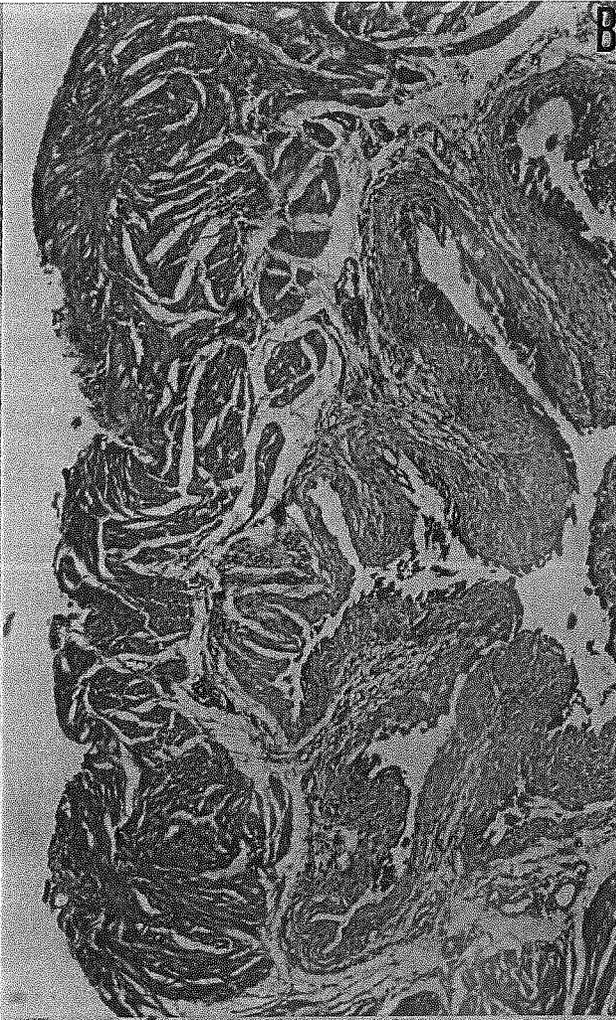


TABELA 2. Comparação das alterações histológicas¹ entre o grupo controle e o grupo pré-tratado com soro anti-TNF- α ² na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida³.

Tempo (h)	Controle (PS)	Pré-tratamentos	
		Soro controle	Soro anti-TNF- α
06	2 (1, 2)	2 (1, 2)	1 (1, 1)*
12	2 (2, 2)	2 (2, 2)	1 (1, 2)*

1- De acordo com os critérios de Gray.

2- Na diluição de 50 μ l em 500 μ l de salina a 0,9%.

3- Cada número representa a mediana dos valores obtidos de 5 bexigas de camundongos comparados com o grupo controle e o grupo pré-tratado com soro controle.

PS- Pré-tratamento com salina.

* Teste Mann-Whitney-U, $p < 0,05$.

4.2- Efeito do soro anti-IL-1 β na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida.

A redução do peso úmido vesical, permeabilidade vascular e da intensidade das alterações histopatológicas, na CH induzida por CFS na dose de 200 mg/kg, também foi observada quando os animais foram pré-tratados com soro anti-IL-1 β nas duas diluições usadas, contudo apenas no tempo de 12 horas os resultados foram significantes quando comparados com os grupos não tratados.

Com 12 horas, a inibição do aumento do peso úmido vesical foi de 46% e da permeabilidade vascular de 50% com o soro anti-IL-1 β na maior concentração. Quando o soro foi usado na menor concentração a inibição foi de 45% e 43%, respectivamente, para o peso e permeabilidade vascular (figura 6).

respectivamente, para o peso e permeabilidade vascular (figura 6).

À histopatologia, pudemos observar cistite hemorrágica intensa em apenas um dos animais dentre os submetidos ao pré-tratamento com o soro anti-IL-1 β , 12 horas após a injeção de CFS. Os demais animais deste grupo exibiam cistite discreta. Quanto ao grupo dos pré-tratados com o soro contendo o anticorpo e sacrificados 6 horas após, neste vimos cistite intensa em dois dos animais (tabela 3) (prancha 5).

TABELA 3. Comparação das alterações histológicas¹ entre o grupo controle e o grupo pré-tratado com soro anti-IL-1 β ² na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida³.

Tempo (h)	Controle (PS)	Pré-tratamentos	
		Soro controle	Soro anti-IL1 β
06	2 (1, 2)	2 (1, 2)	1 (1, 2)
12	2 (2, 2)	2 (2, 2)	1 (1, 2)*

1- De acordo com os critérios de Gray.

2- Na diluição de 50 μ l em 500 μ l de salina a 0,9%.

3- Cada número representa a mediana dos valores obtidos de 5 bexigas de camundongos comparado com o grupo controle e o grupo pré-tratado com soro controle.

PS- Pré-tratamento com salina.

* Teste Mann-Whitney-U, $p < 0,05$

—○— VEÍCULO
 —●— SORO CONTROLE (50 μ l)
 —△— ANTI-IL-1 β (25 μ l)
 —▲— ANTI-IL-1 β (50 μ l)

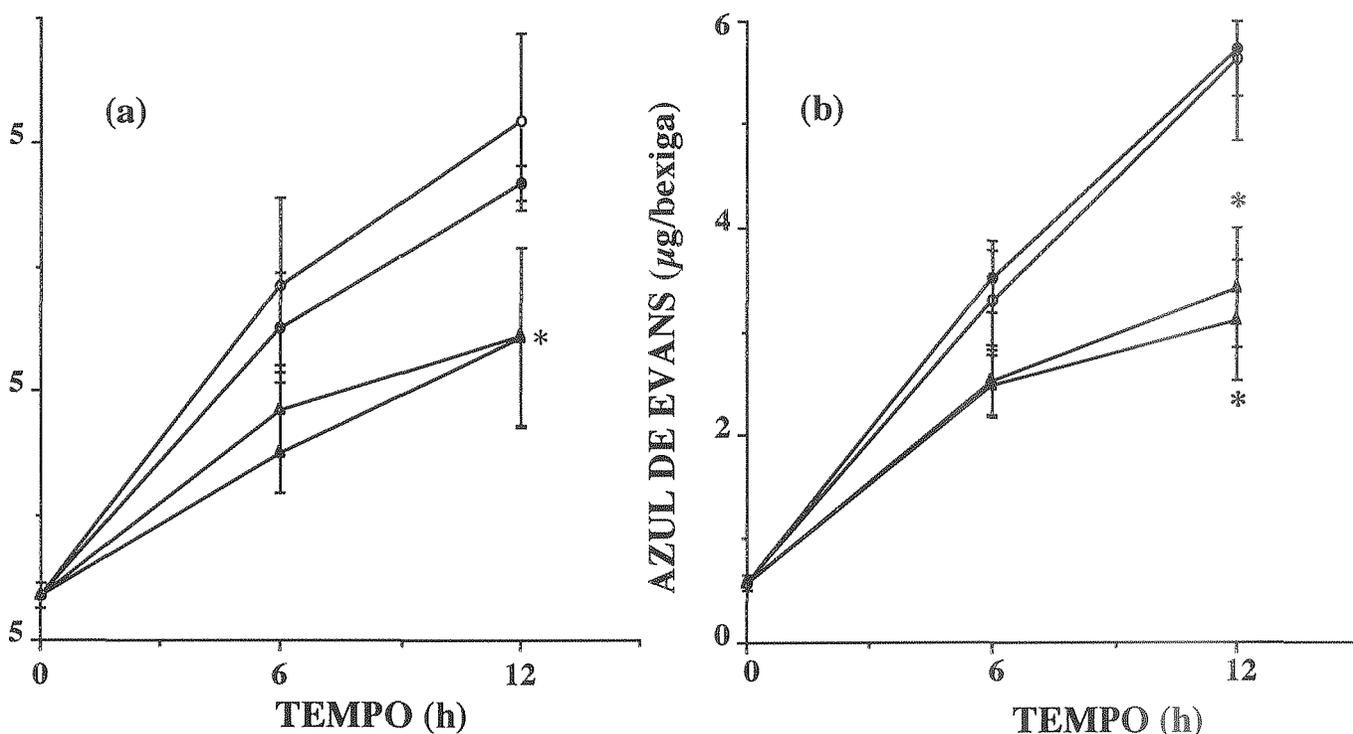


Figura 06. O pré-tratamento com soro anti-IL-1 β inibe o aumento do peso vesical e a permeabilidade vascular na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. Os painéis (a) e (b) mostram, respectivamente, o peso úmido e a permeabilidade vascular de bexigas de camundongos injetados com Ciclofosfamida (200 mg/Kg, via ip) pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com veículo, soro controle (50 μ l) ou soro anti-IL-1 β (25 e 50 μ l). Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 5$). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle (veículo); ANOVA - teste de Fisher.

PRANCHA 5

PRANCHA 5.

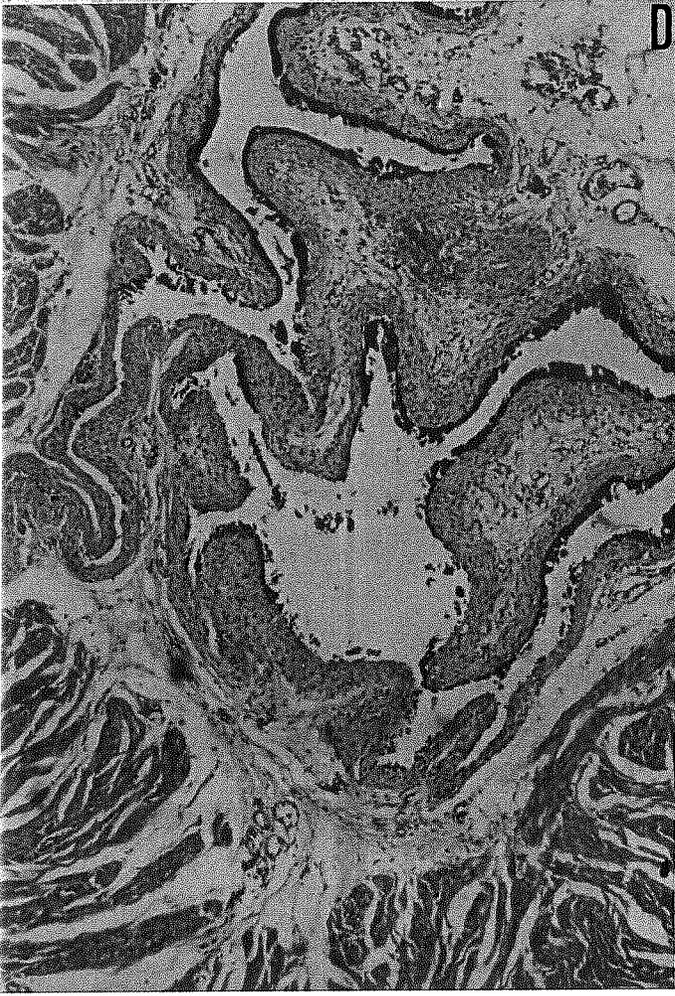
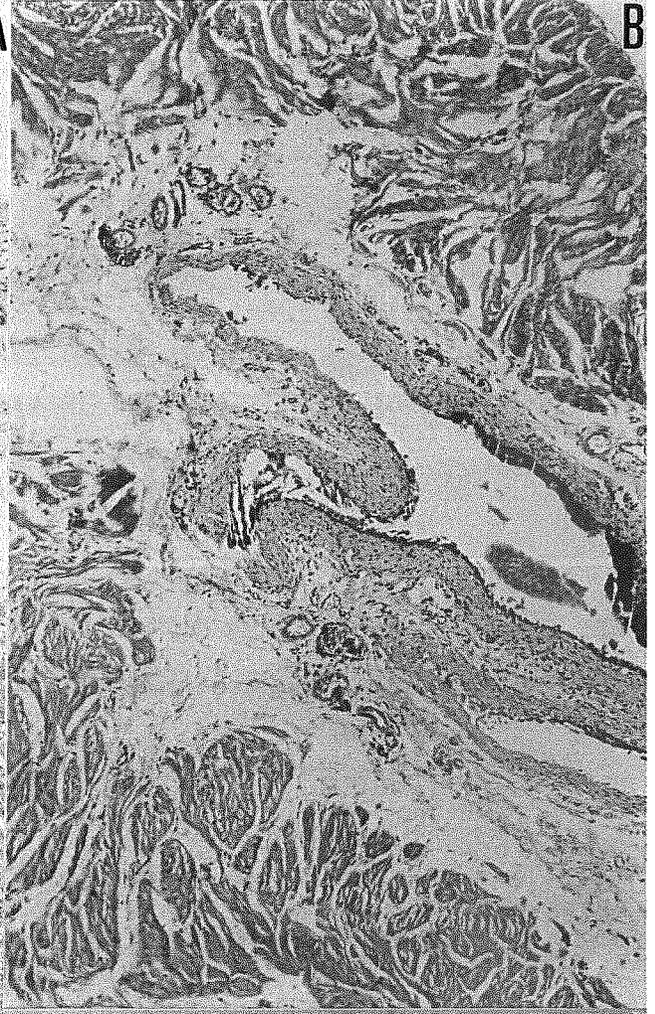
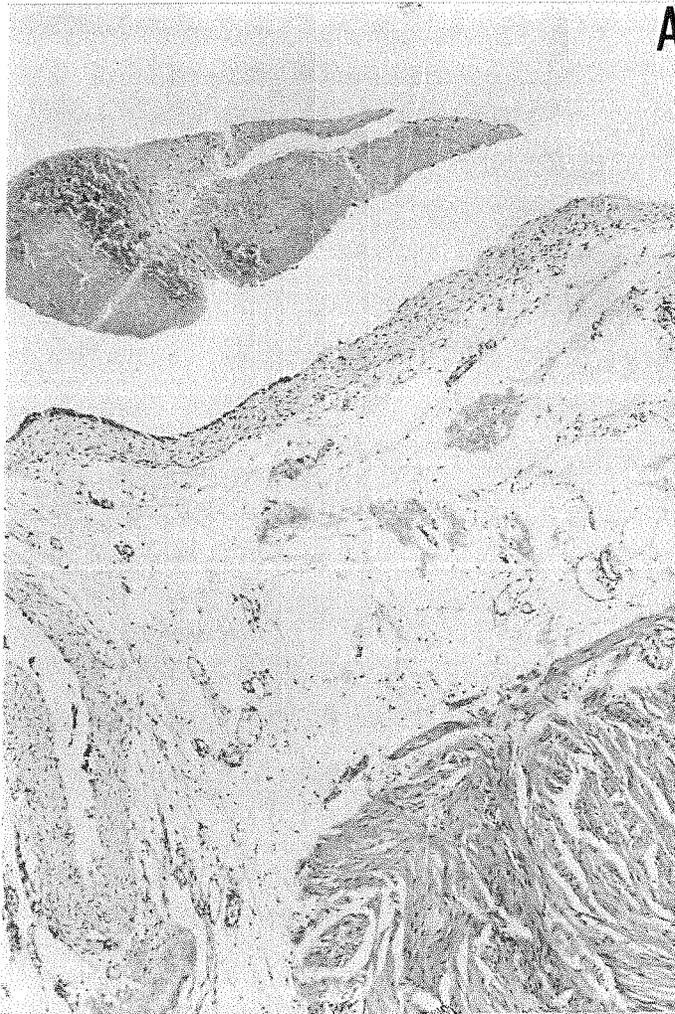
A- Cistite hemorrágica (2 +) induzida por ciclofosfamida (6 h)

B- Cistite hemorrágica (1 +) induzida por ciclofosfamida (6 h)
em camundngo pré-tratado com soro anti-IL-1 β .

C- Cistite hemorrágica (2 +) induzida por ciclofosfamida (12 h)

D- Cistite hemorrágica (1 +) induzida por ciclofosfamida (12 h)
em camundongo pré-tratado com soro anti-IL-1 β .

Classificação de Gray. Coloração H & E. Aumento 40x.



4.3- Efeito do soro anti-IL-6 na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida.

As alterações vesicais, do ponto de vista do peso úmido, permeabilidade vascular e histopatologia, induzidas por CFS na dose de 200 mg/kg, foram menores quando os camundongos foram pré-tratados com soro anti-IL-6. No entanto, a redução foi significativa no tempo de 6 horas apenas com o soro anti-IL-6 na maior concentração e quanto ao peso e permeabilidade vascular, não havendo diferença estatisticamente significativa quando avaliamos as alterações histológicas em relação ao grupo não tratado.

A redução, 6 horas após a administração de CFS, foi de 51% e 39%, respectivamente, para o peso e permeabilidade vascular com o soro anti-IL-6 na maior concentração. No tempo de 12 horas ela foi de 69% e 48%, respectivamente, para o peso e permeabilidade com o soro contendo o anticorpo na maior concentração e de 58% e 40% com o referido soro na menor concentração (figura 7).

À análise histopatológica, observamos, no tempo de 12 horas, cistite discreta em 60% dos animais pré-tratados com o soro contendo o anticorpo, ao passo que todos os animais do grupo controle apresentavam cistite hemorrágica intensa (tabela 4) (prancha 6).

TABELA 4. Comparação das alterações histológicas¹ entre o grupo controle e os grupos pré-tratados com soros² anti-IL-6 e anti-IL-8 na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida³.

Tempo(h)	Controle(PS)	Pré-tratamentos		
		Soro controle	Soro anti-IL-6	Soro anti-IL-8
06	2 (1, 2)	2 (1, 2)	1 (1, 2)	2 (1, 2)
12	2 (2, 2)	2 (2, 2)	1 (1, 2)*	1 (1, 2)*

1- De acordo com os critérios de Gray.

2- Na diluição de 50 µl em 500 µl de salina a 0,9%.

3- Cada número representa a mediana dos valores obtidos de 5 bexigas de camundongos comparado com o grupo controle e o grupo pré-tratado com soro controle.

PS- Pré-tratamento com salina.

* Teste Mann-Whitney-U, $p < 0,05$.

4.4- Efeito do soro anti-IL-8 na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida.

Redução significativa do peso úmido vesical, permeabilidade vascular e da intensidade das alterações histopatológicas, na CH induzidas por CFS na dose de 200 mg/kg, foi observada quando os animais foram pré-tratados com soro anti-IL-8 no tempo de 12 horas e com as duas diluições. Nesse tempo, a inibição do aumento do peso úmido vesical foi de 57% e da permeabilidade vascular de 48% com o soro anti-IL-8 na maior concentração. Quando o soro foi usado na menor concentração, a inibição foi de 38% e 27%, respectivamente, para o peso e permeabilidade vascular (figura 8).

A histopatologia revelou cistite hemorrágica discreta em 60% dos animais pré-tratados com soro contendo o anticorpo e nos quais CFS foi administrado 12 horas antes do sacrifício. Todos os animais do grupo controle apresentavam cistite intensa (tabela 4) (prancha 6).

—○— VEÍCULO
—●— SORO CONTROLE (50 μ l)

—△— ANTI-IL-6 (25 μ l)
—▽— ANTI-IL-6 (50 μ l)

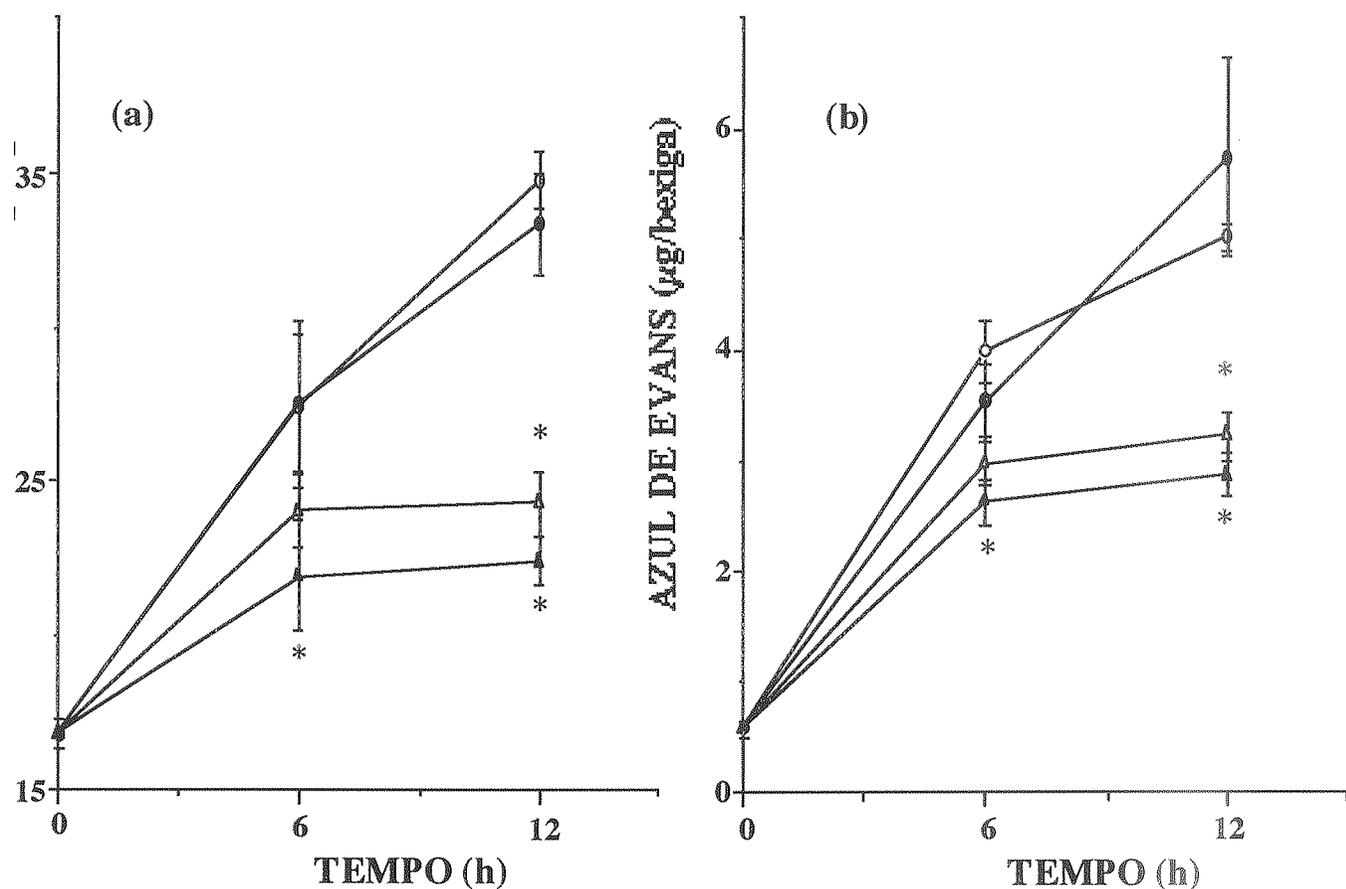
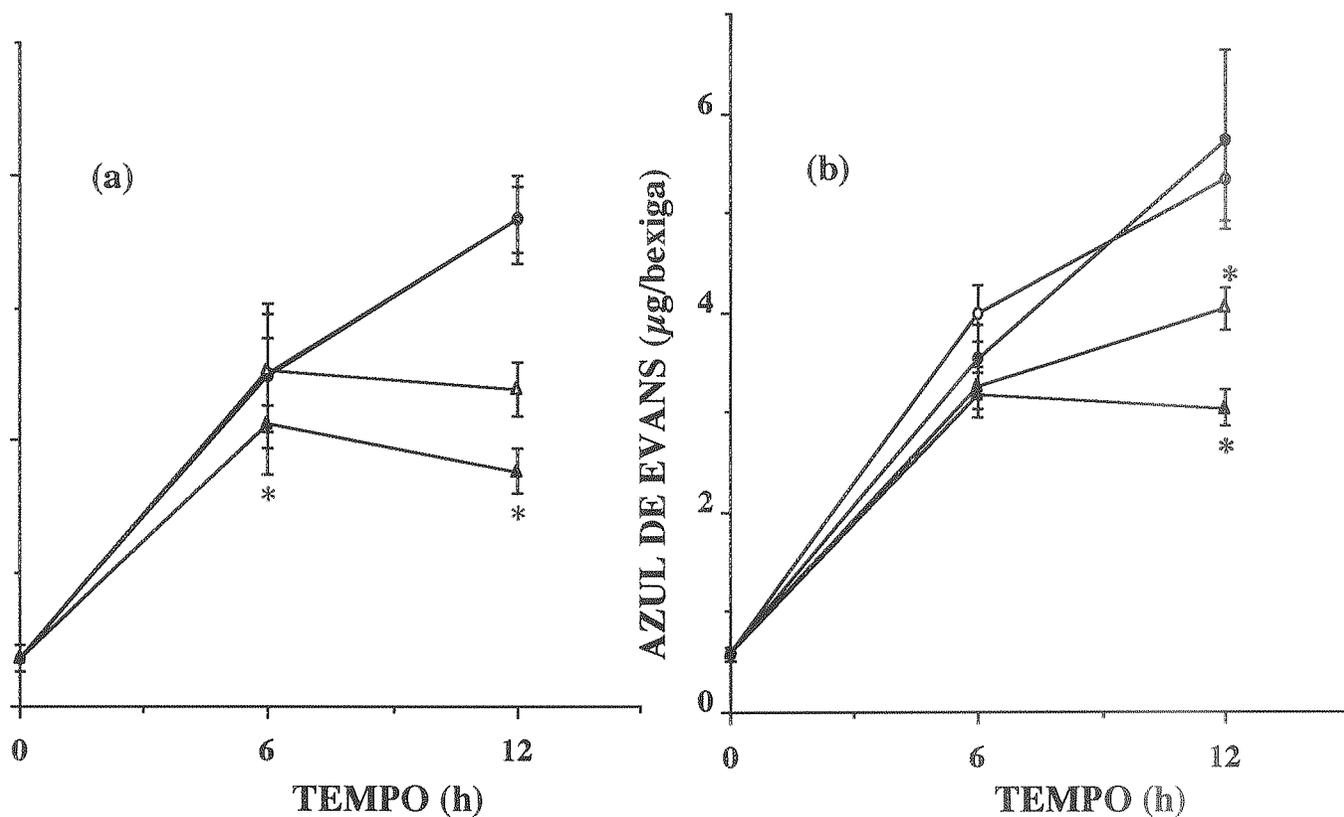


Figura 07. O pré-tratamento com soro anti-IL-6 inibe o aumento do peso vesical e da permeabilidade vascular na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. Os painéis (a) e (b) mostram, respectivamente, o peso úmido e a permeabilidade vascular de bexigas de camundongos injetados com Ciclofosfamida (200 mg/Kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com veículo, soro controle (50 μ l) ou soro anti-IL-6 (25 e 50 μ l). Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 6$). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle (veículo); ANOVA - teste de Fisher.

—○— VEÍCULO
 —●— SORO CONTROLE (50 μ l)
 —△— ANTI-IL-8 (25 μ l)
 —▲— ANTI-IL-8 (50 μ l)



gura 08. O pré-tratamento com soro anti-IL-8 inibe o aumento do peso vesical e a permeabilidade vascular na Cistite Hemorrágica inuzida por Ciclofosfamida. Os gráficos (a) e (b) mostram, respectivamente, o peso úmido e a permeabilidade vascular de bexigas de animais injetados com Ciclofosfamida (200 mg/Kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com veículo, soro controle (50 μ l) ou soro anti-IL-8 (25 e 50 μ l). Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 6$). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle (veículo); ANOVA - teste de Fisher.

PRANCHA 6

PRANCHA 6.

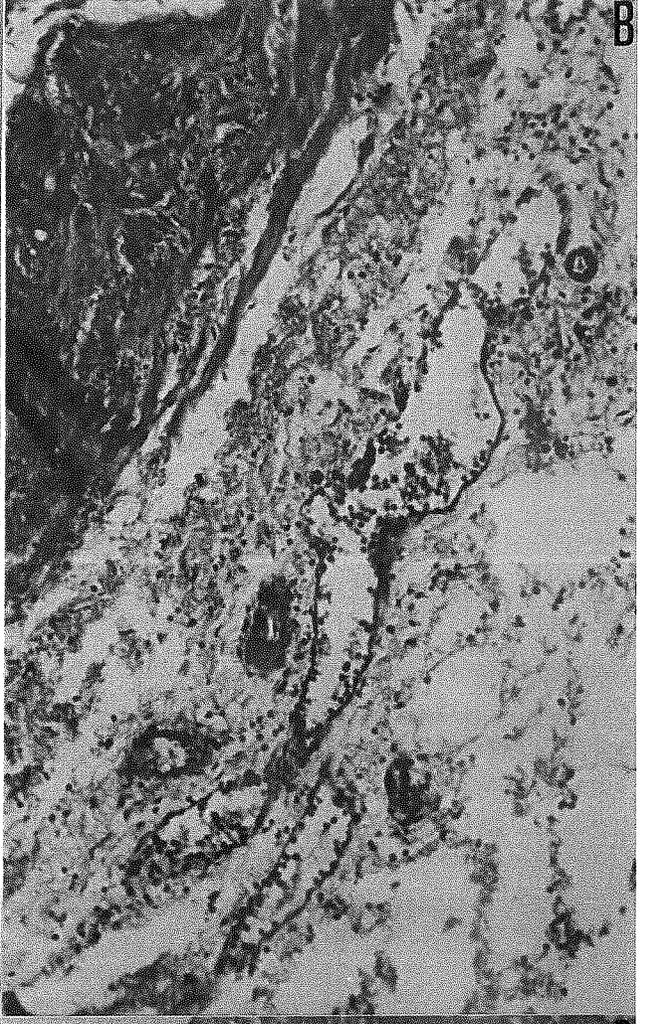
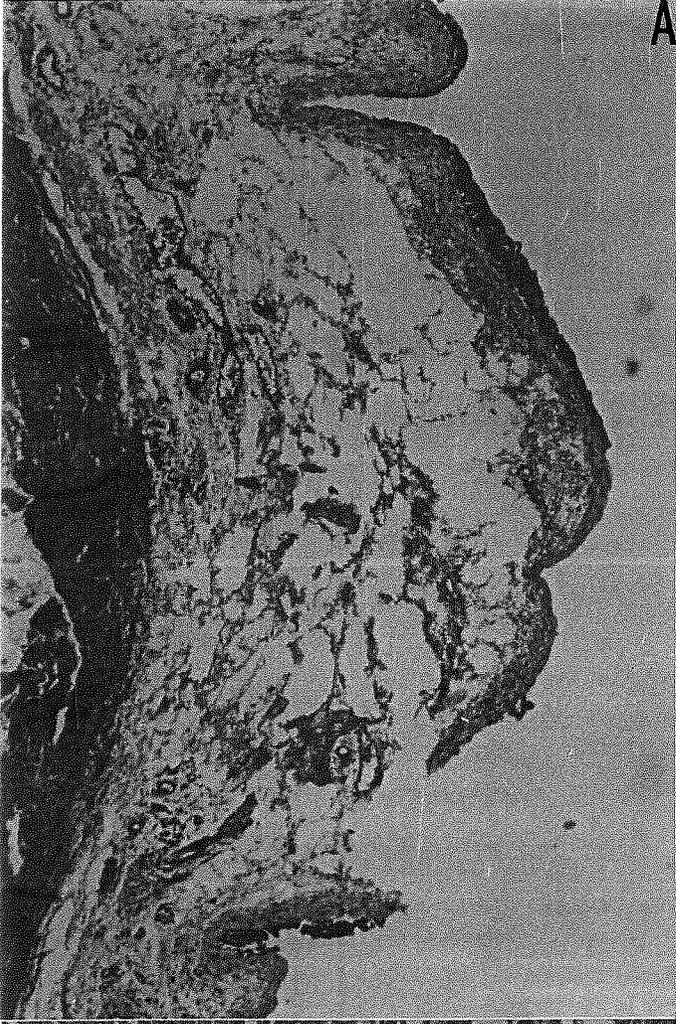
A- Cistite hemorrágica (2 +) induzida por ciclofosfamida (12 h)

B- Maior aumento de **A** - Observam-se vasos congestos, com marginação neutrofílica, circundados por exsudato fibrinoneutrofílico em meio a edema.

C- Cistite hemorrágica (1+) induzida por ciclofosfamida (12 h) em camundongo pré-tratado com soro anti-IL-6. Observam-se menor marginação neutrofílica e redução dos fenômenos hemorrágicos.

D- Cistite hemorrágica (1+) induzida por ciclofosfamida (12 h) em camundongo pré-tratado com soro anti-IL-8. Observa-se menor exsudação neutrofílica, apesar dos depósitos de fibrina.

Classificação de Gray. Coloração H & E. Aumento 40x em **A**, **C** e **D**. Aumento 100x em **B**.



5- EFEITO DE DEXAMETASONA, PENTOXIFILINA E TALIDOMIDA NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

O pré-tratamento com dexametasona produziu inibição significativa, tanto do peso quanto da permeabilidade vascular, de forma dose dependente, sendo tal inibição observada em 6, 12, 24 e 48 horas após a indução da cistite (figuras 9 e 10)

Quando o pré-tratamento foi feito com pentoxifilina, o peso e a permeabilidade vascular foram inibidos significativamente com as doses de 15 e 45 mg/kg, observando-se, com essa última dose, redução de até 82% e 72%, respectivamente, para o peso e a permeabilidade e no tempo de 12 horas. A administração de uma única dose de pentoxifilina (45 mg/kg) 30 minutos antes da indução de cistite com CFS foi capaz de impedir o aumento do peso e permeabilidade até o tempo de 24 horas, de modo significativo quando comparado com o grupo controle (figuras 11 e 12).

O pré-tratamento com talidomida também resultou em inibição significativa do aumento de peso úmido vesical e da permeabilidade vascular, com as doses de 20 e 40 mg/kg, sendo tal inibição máxima com a última dose (52% e 48%, respectivamente, para o peso e permeabilidade). Vimos que a administração de única dose de talidomida (40 mg/kg) 30 minutos antes da injeção de CFS foi capaz de impedir o aumento do peso e da permeabilidade nos tempos de 6 e 12 horas (figuras 13 e 14).

À análise histopatológica vimos, em todos os grupos submetidos a pré-tratamento e cujo sacrifício foi feito 12 horas após a administração de CFS, edema mais reduzido, infiltrado histioneutrofílico menor, redução importante dos depósitos de fibrina e das áreas hemorrágicas, quando comparados com o grupo controle (tabela 5) (prancha 7).

TABELA 5. Comparação das alterações histológicas¹ entre o grupo controle e os grupos pré-tratados² com Dexametasona, Pentoxifilina e Talidomida na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida³.

Tempo (h)	Controle (PS)	Pré-tratamentos		
		Dexametasona	Pentoxifilina	Talidomida
06	2 (1, 2)	1 (1, 2)	1 (1, 2)	1 (1, 2)
12	2 (2, 2)	1 (1, 2)*	1 (1, 1)*	2 (1, 2)*

1- De acordo com os critérios de Gray.

2- Nas doses de 2, 45 e 40 mg/kg, respectivamente para, dexametasona, pentoxifilina e talidomida.

3- Cada número representa a mediana dos valores obtidos de 5 bexigas de camundongos comparado com o grupo controle.

PS- Pré-tratamento com salina.

* Teste Mann-Whitney-U, $p < 0,05$.

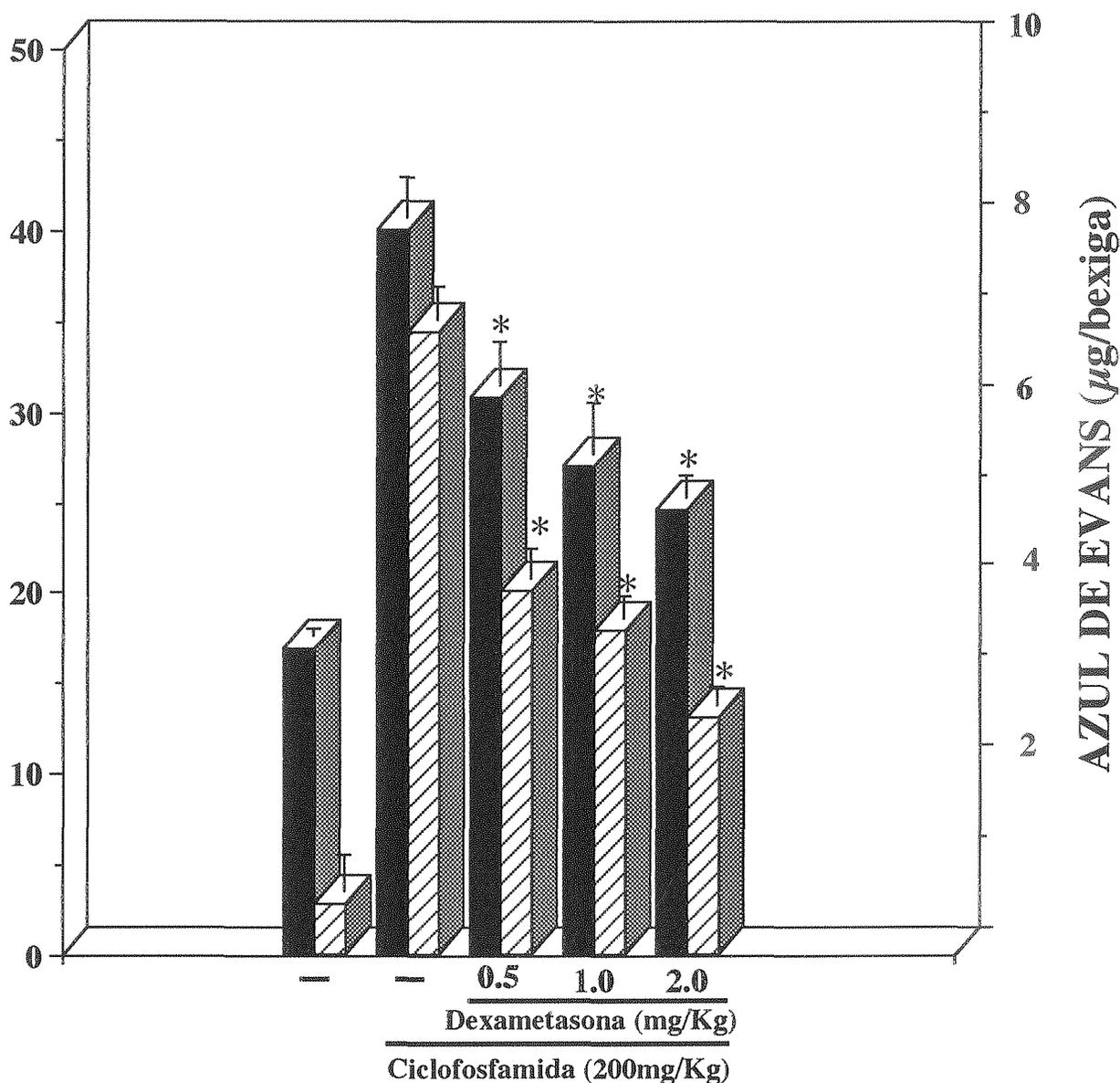


Figura 09. Efeito dose-resposta no aumento do peso úmido vesical e da permeabilidade vascular na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. As barras mostram o peso úmido (■) e a permeabilidade vascular (▨) de bexigas de camundongos injetados com Ciclofosfamida (200 mg/Kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com Dexametasona (0.5, 1.0 e 2.0 mg/kg). Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 5$). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo específico grupo não tratado com Dexametasona); ANOVA - teste de Fisher.

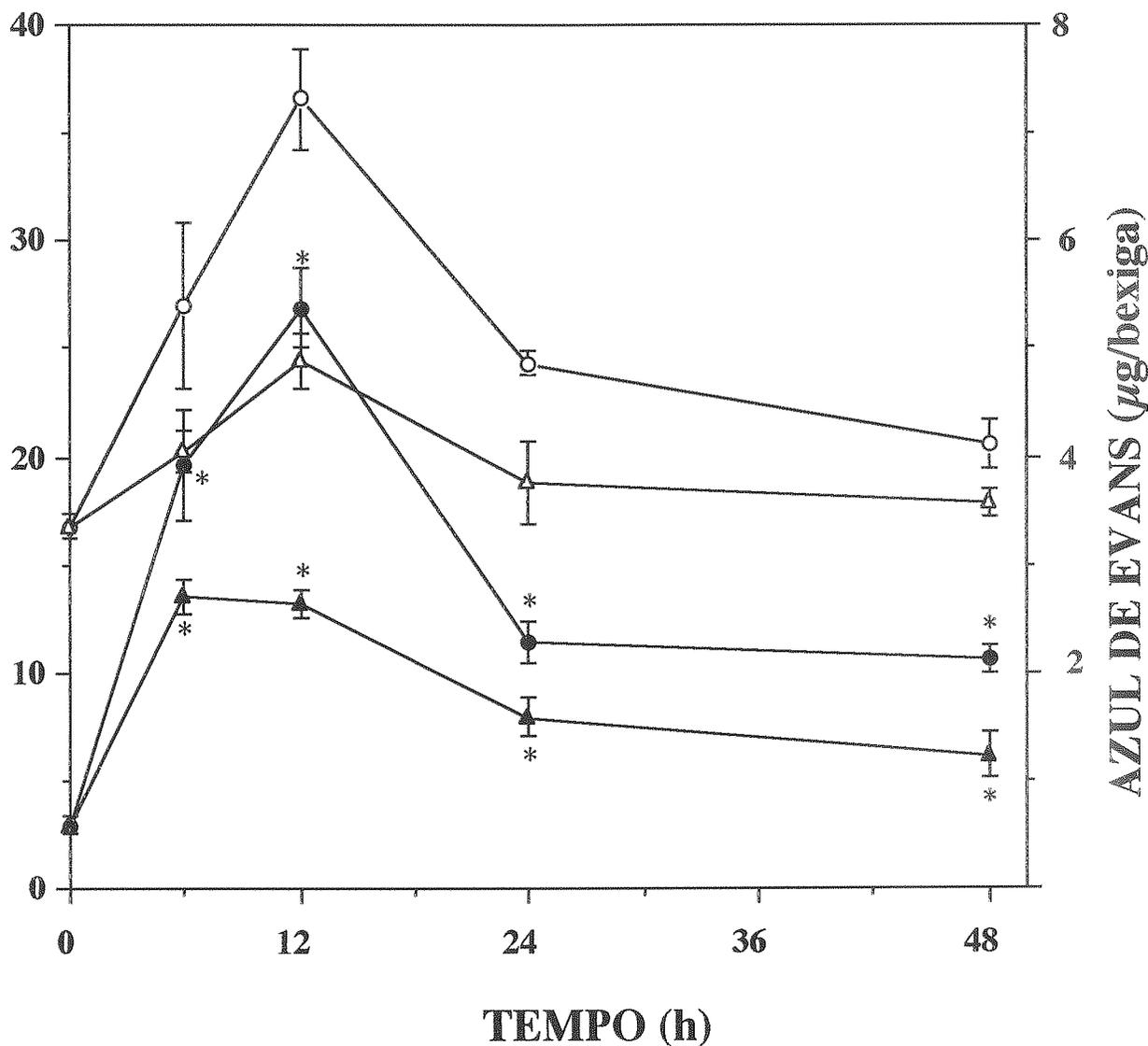


figura 10. Efeito da Dexametasona no curso temporal da Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. Os símbolos representam o peso úmido (○ -CFS; △ -DEX) e a permeabilidade vascular (● -CFS; ▲ -DEX) de bexigas de animais injetados com ciclofosfamida (200 mg/Kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com dexametasona (2.0 mg/kg). Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 6$). (*) < 0.05 comparado com o grupo específico (grupo não tratado com Dexametasona); NOVA - teste de Fisher.

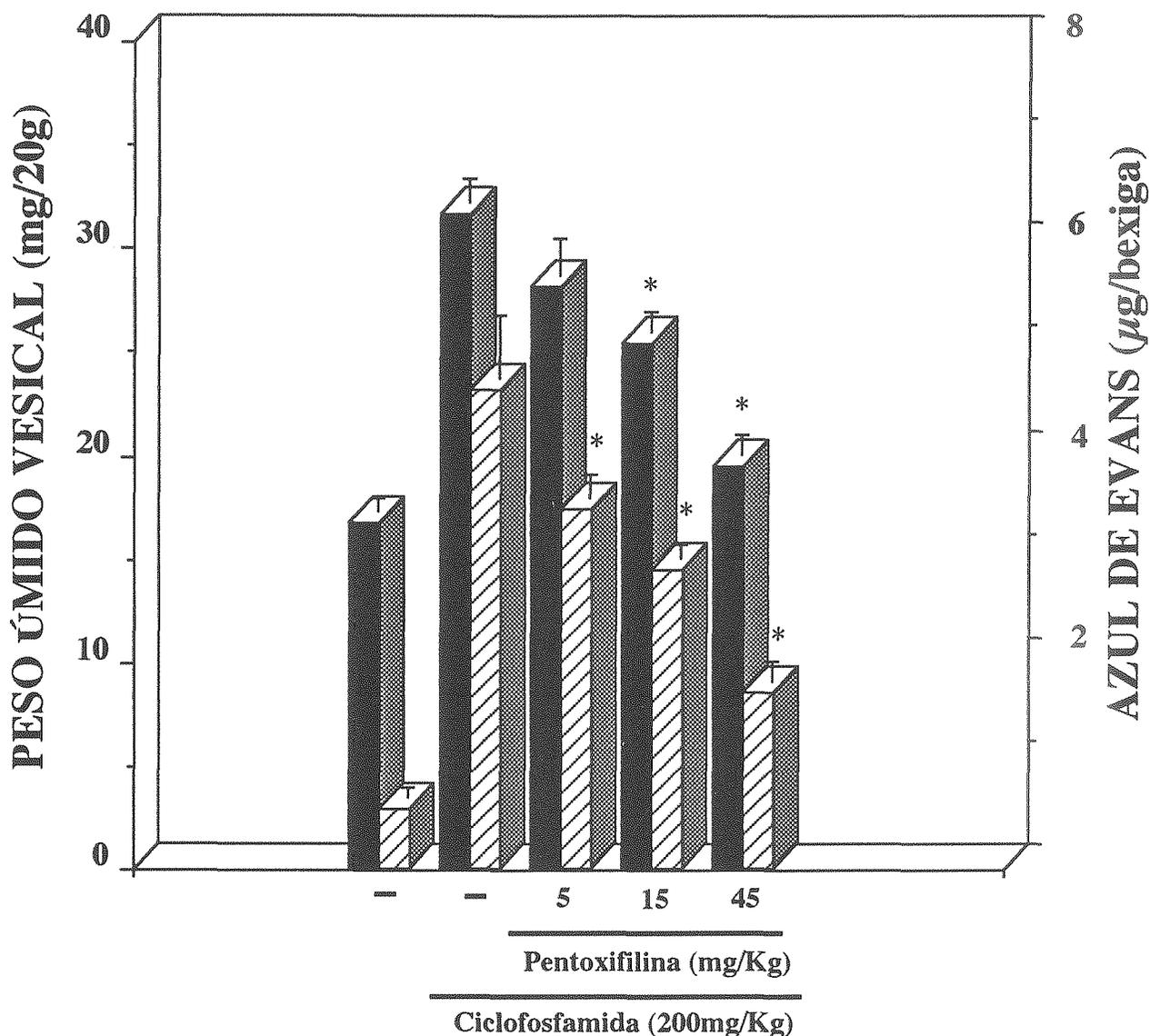


Figura 11. Efeito dose-resposta da Pentoxifilina no aumento do peso úmido vesical e da permeabilidade vascular na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. As barras mostram, respectivamente, o peso úmido (■) e a permeabilidade vascular (▨) de bexigas de camundongos injetados com Ciclofosfamida (200 mg/Kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com Pentoxifilina (5, 15 e 45 mg/kg). Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 6$). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle específico (grupo não tratado com Pentoxifilina); ANOVA - teste de Fisher.

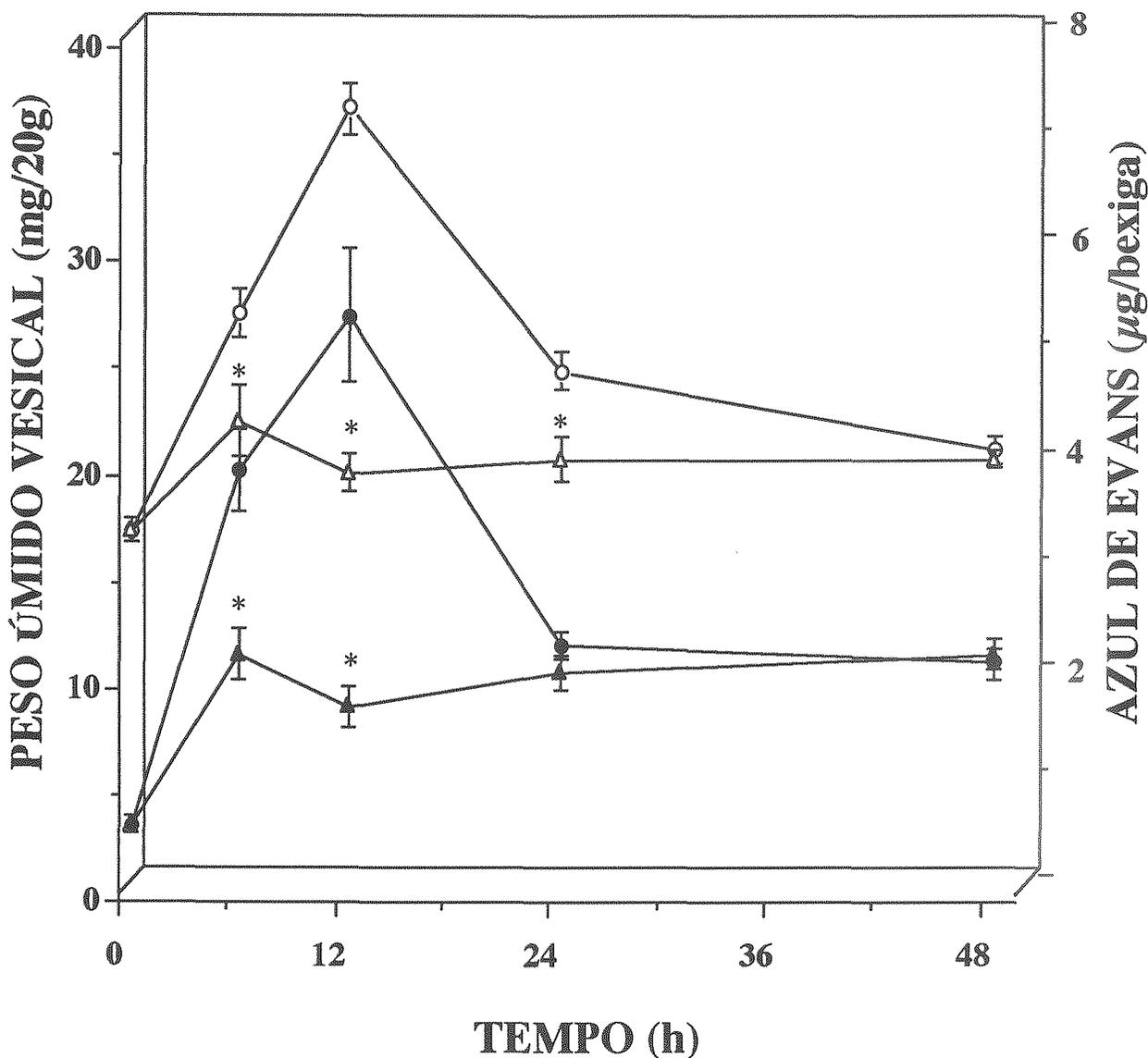


Figura 12. Efeito da Pentoxifilina no curso temporal da Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. Os símbolos representam o peso úmido (○ -CFS; △ -PTX) e a permeabilidade vascular (● -CFS; ▲ -PTX) de bexigas de animais injetados com Ciclofosfamida (200 mg/Kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com Pentoxifilina (45 mg/kg). Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 6$). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle específico (grupo não tratado com Dexametasona); ANOVA - teste de Fisher.

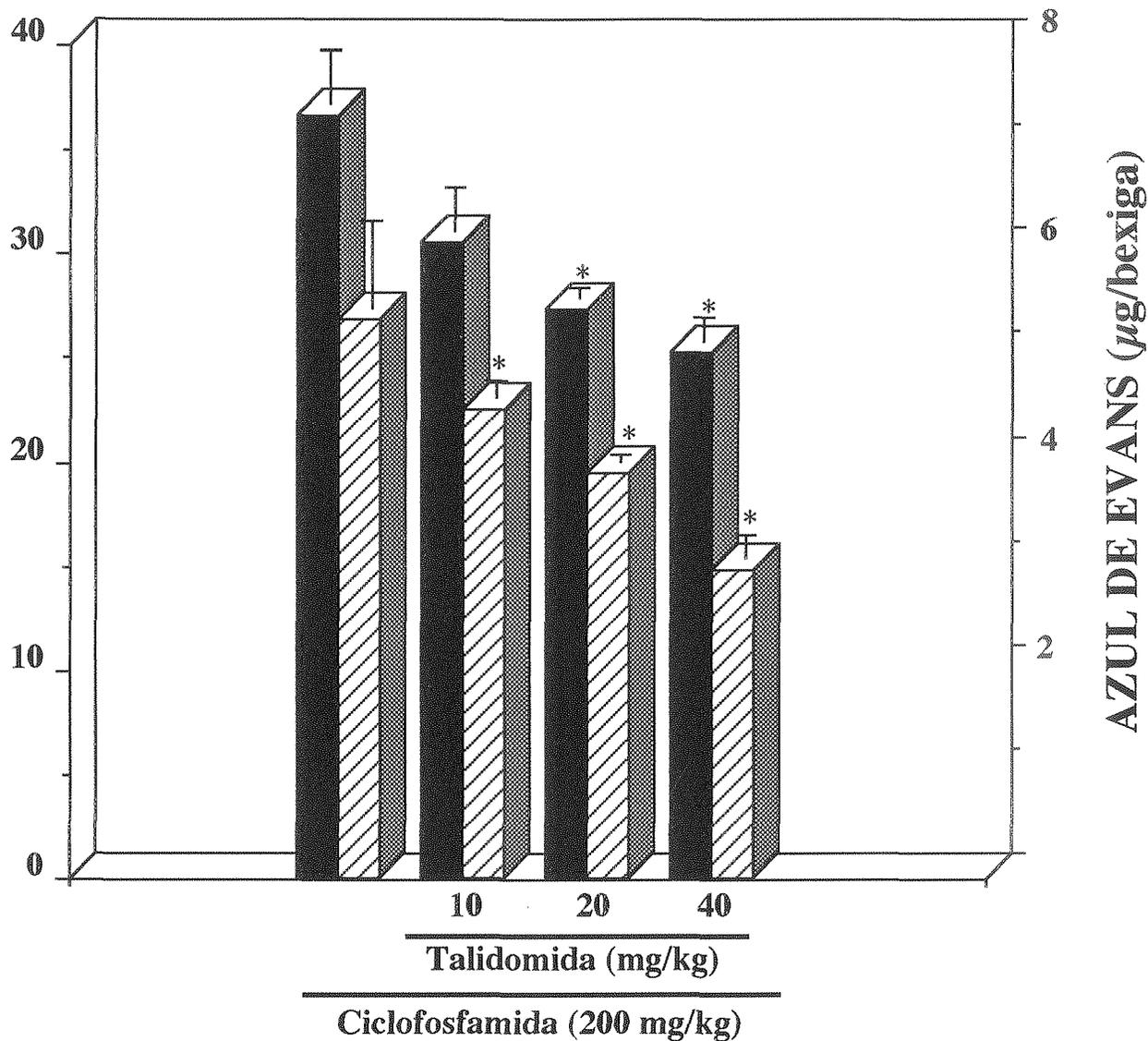


Figura 13. Efeito dose-resposta da Talidomida no aumento do peso úmido vesical e na permeabilidade vascular na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. As barras mostram o peso úmido (■) e a permeabilidade vascular (▨) de bexigas de amundongos injetados com Ciclofosfamida (200 mg/Kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com talidomida (10, 20 e 40 mg/kg). Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 6$). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo específico (grupo não tratado com Talidomida); ANOVA - teste de Fisher.

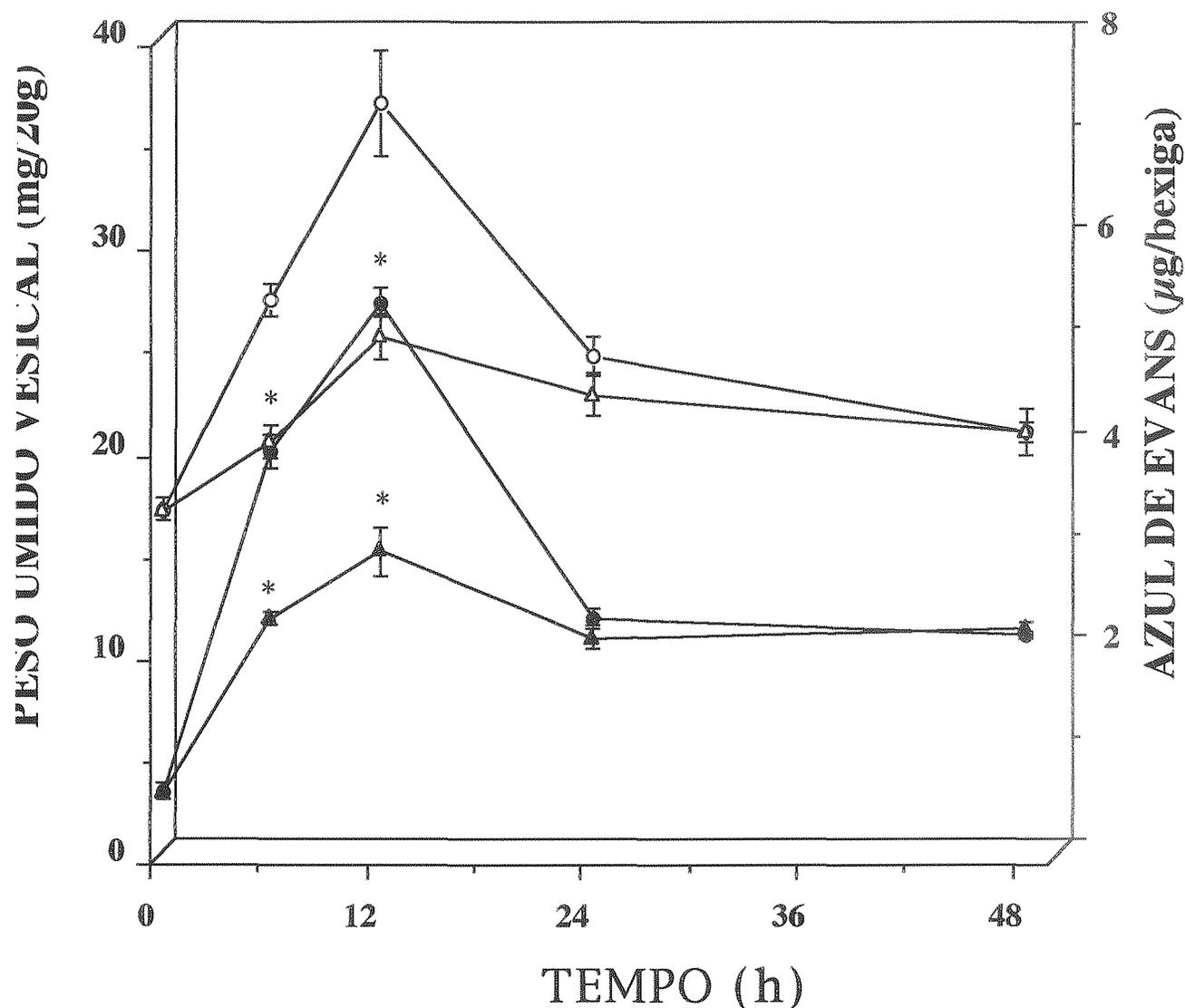


Figura 14. Efeito da Talidomida no curso temporal da Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. Os símbolos representam o peso úmido (○ -CFS; △ -TAL) e a permeabilidade vascular (● -CFS; ▲ -TAL) de bexigas de camundongos injetados com Ciclofosfamida (200 mg/Kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com Talidomida (40 mg/kg). Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 6$). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle específico (grupo não tratado com Talidomida); ANOVA - teste de Fisher.

PRANCHA 7

PRANCHA 7.

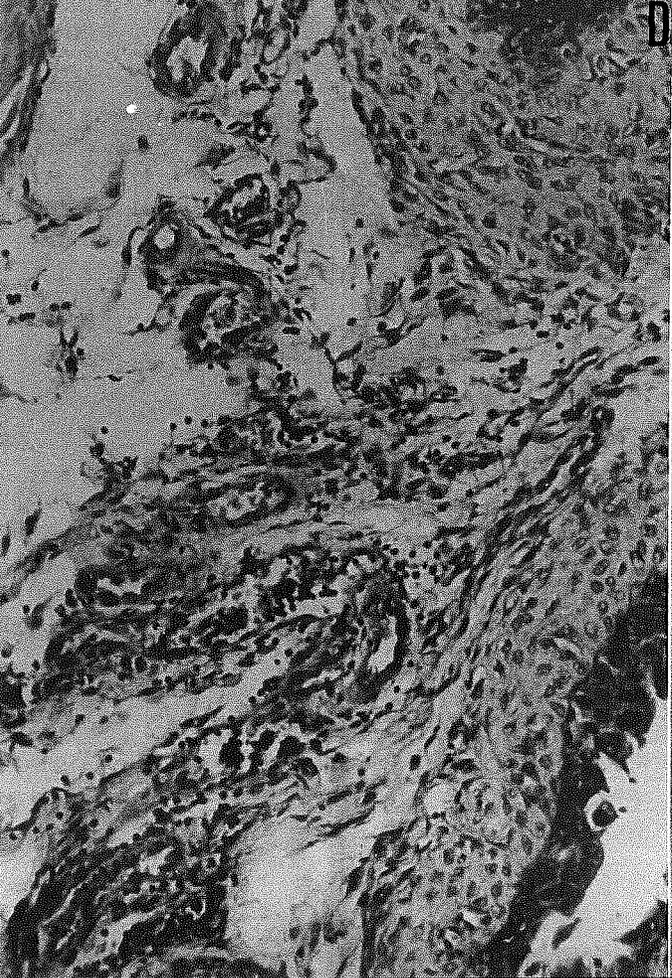
A- Cistite hemorrágica (1 +) induzida por ciclofosfamida (12 h) em camundongo pré-tratado com dexametasona.

B- Cistite hemorrágica (1 +) induzida por ciclofosfamida (12 h) em camundongo pré-tratado com pentoxifilina.

C- Cistite hemorrágica (1 +) induzida por ciclofosfamida (12 h) em camundongo pré-tratado com talidomida.

D- Maior aumento de **C** - Observam-se vasos contendo neutrófilos, contudo, com menor marginação.

Classificação de Gray. Coloração H & E. Aumento 40x em **A**, **B** e **C**. Aumento 100x em **D**.



6- EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE DEXAMETASONA, PENTOXIFILINA E TALIDOMIDA NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA.

O pré-tratamento com a associação de dexametasona, pentoxifilina e talidomida resultou em inibição marcante do aumento do peso úmido vesical e do extravasamento vascular nos tempos de 6 e 12 horas após a injeção de CFS. Com 6 horas a inibição do peso e da permeabilidade foi, respectivamente, de 93% e 76%, e com 12 horas foi de 94% e 71% (figura 15).

Na histopatologia, observamos sensível preservação da mucosa, sendo poucas as áreas de descamação, tendo sido diagnosticada cistite discreta em apenas dois dos animais sacrificados no tempo de 6 horas e em três dentre os sacrificados no tempo de 12 horas (tabela 6).

TABELA 6. Comparação das alterações histológicas¹ entre o grupo controle e o grupo pré-tratado com a associação de Dexametasona, Pentoxifilina e Talidomida² na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida³.

Tempo (h)	Controle (PS)	Associação de drogas
06	2 (1, 2)	0 (0, 1)*
12	2 (2, 2)	1 (0, 1)*

1- De acordo com os critérios de Gray.

2- Nas doses de 0,5, 5 e 10 mg/kg, respectivamente.

3- Cada número representa a mediana dos valores obtidos de 5 bexigas de camundongos comparado com o grupo controle.

PS- Pré-tratamento com salina.

* Teste Mann-Whitney-U $p < 0,05$.

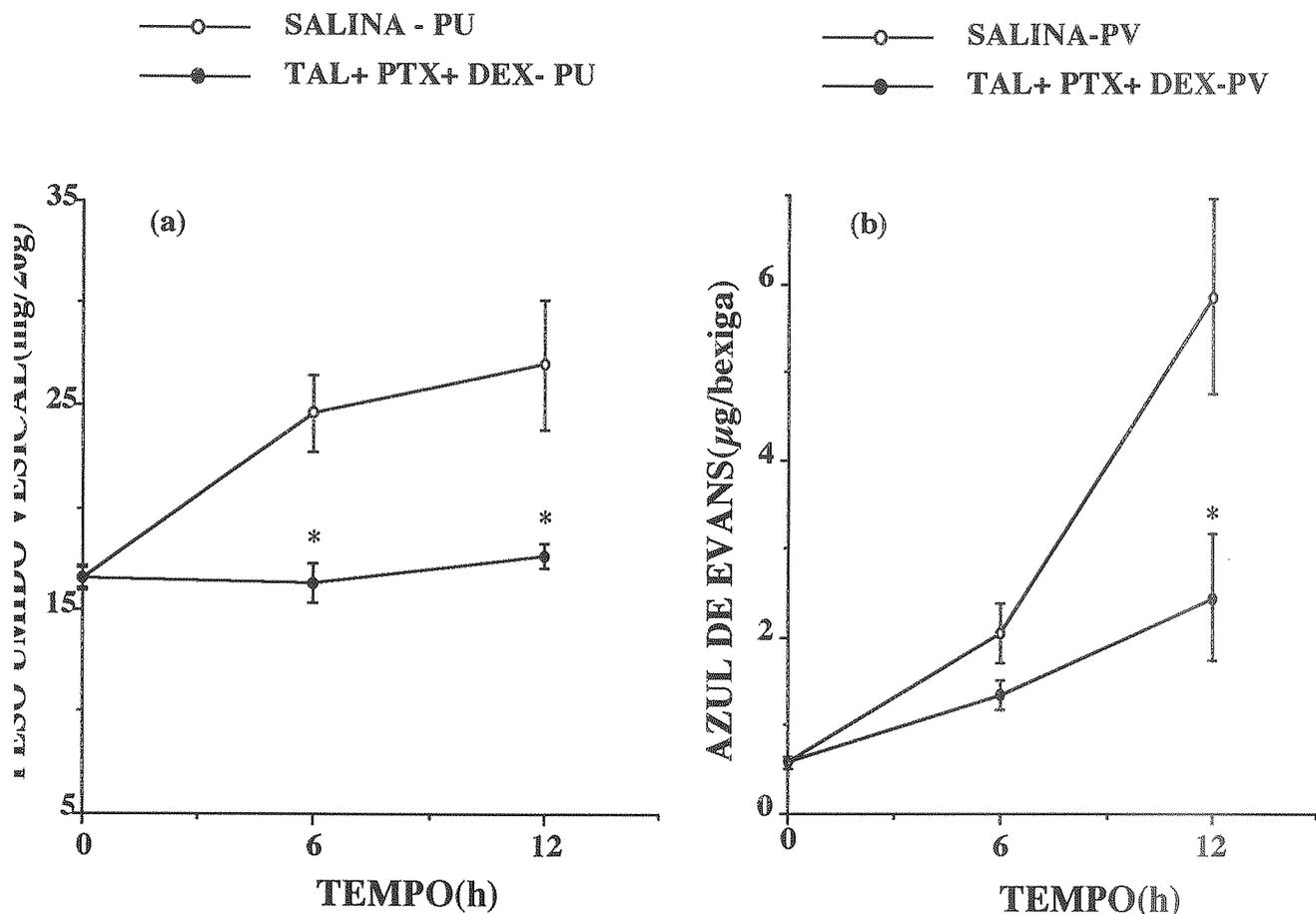


Figura 15. O pré-tratamento com a associação de talidomida (TAL), pentoxifilina (PTX) e dexametasona (DEX) inibe o aumento do peso vesical e da permeabilidade vascular na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. Os painéis (a) e (b) mostram, respectivamente, o peso úmido e a permeabilidade vascular de bexigas de amundongos injetados com Ciclofosfamida (200 mg/kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com TAL (10 mg/kg), PTX (5mg/kg) e DEX (0.5mg/kg). Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n \geq 6$). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo controle específico (grupo não tratado com a associação de drogas); ANOVA - teste de Fisher.

7- EFEITO DO COMPOSTO BN-52021 NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

O pré-tratamento com o composto BN-52021, um antagonista de PAF, foi capaz de inibir significativamente o aumento do peso úmido vesical e da permeabilidade vascular, com as doses de 5 e 10 mg/kg. Os animais que receberam 2,5 mg/kg exibiram inibição significativa do aumento da permeabilidade mas não do peso, quando comparado com o grupo controle. A inibição observada, em 6 e 12 horas após a indução da cistite, para o aumento do peso e permeabilidade quando a maior dose do composto foi usada foi de, 53% e 35% e 67% e 41%, respectivamente para o peso e permeabilidade (figuras 16 e 17).

À histopatologia, observamos cistite classificada como discreta, de acordo com os critérios de Gray, em 60% dos animais submetidos ao pré-tratamento e sacrificados 12 horas após a administração de CFS. No grupo controle, cistite intensa foi vista em todos os animais (tabela 7).

TABELA 7. Comparação das alterações histológicas¹ entre o grupo controle e o grupo pré-tratado com o composto BN-52021² na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida³.

Tempo (h)	Controle (PS)	BN-52021
06	2 (1, 2)	2 (1, 2)
12	2 (2, 2)	1 (1, 2)*

1- De acordo com os critérios de Gray.

2- Na dose de 10 mg/kg.

3- Cada número representa a mediana dos valores obtidos de 5 bexigas de camundongos comparado com o grupo controle.

PS- Pré-tratamento com salina.

* Teste Mann-Whitney-U $p < 0,05$.

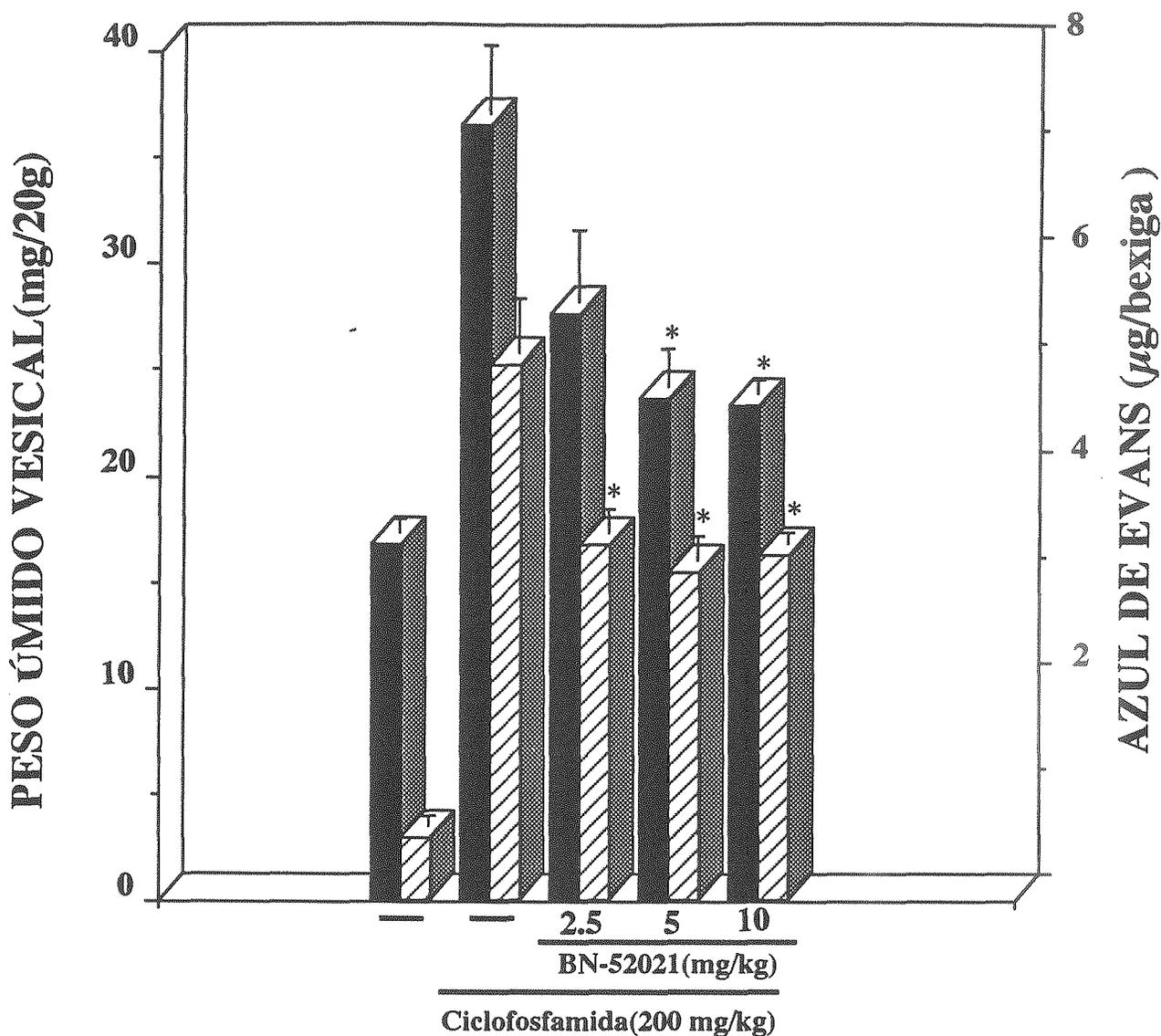


Figura 16. Efeito do composto BN-52021 no aumento do peso úmido vesical e permeabilidade vascular na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. As barras mostram o peso úmido (■) e a permeabilidade vascular (▨) de bexigas de camundongos tratados 12 horas antes com Ciclofosfamida (200 mg/kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via sc) com BN-52021 (2.5, 5, e 10 mg/kg). Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=6). (*) $p < 0.05$ comparado com o controle específico (grupo não tratado com BN-52021); ANOVA-teste de Fisher.

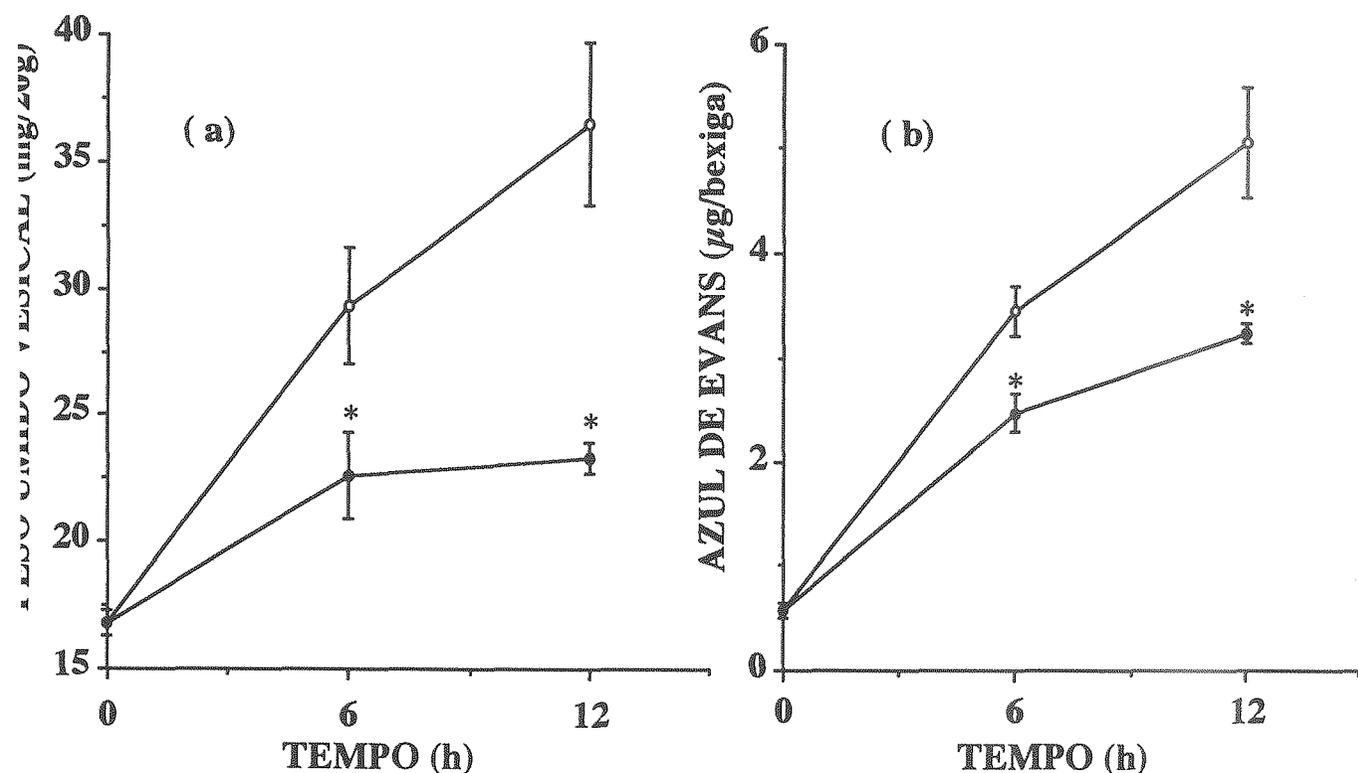


Figura 17. Efeito do composto BN-52021 na cinética da Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. Os painéis (a) e (b) mostram, respectivamente, o peso úmido e a permeabilidade vascular de bexigas de camundongos tratados com Ciclofosfamida (200 mg/kg, via ip) e pré-tratados com BN-52021 (10mg/kg, via sc, 30 minutos antes). Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=6). (*) $p < 0.05$ comparado com o controle específico (grupo não tratado com BN-52021); ANOVA-teste de Fisher.

8- EFEITO DO L-NAME NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

O L-NAME produziu inibição significativa do aumento do peso e da permeabilidade vascular, de forma dose dependente, nas bexigas dos animais sacrificados 12 horas após o tratamento com CFS. A inibição máxima foi obtida com a dose de 20 mg/kg e foi de 82% e 69%, respectivamente para o peso e permeabilidade (figura 18).

À histopatologia, observamos, no grupo pré-tratado, ausência de lesão vesical em dois dos animais e cistite discreta nos demais [valor mediano: controle = 2(2, 2); L-NAME = 1(0, 1)*; $p < 0,05$ - $n = 5$; teste Mann-Whitney-U] (prancha 8).

9- EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE L-ARGININA NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM L-NAME

A inibição do aumento do peso úmido vesical e da permeabilidade vascular resultante do pré-tratamento com L-NAME (20 mg/kg) foi revertida parcialmente, de forma dose dependente, com a administração de L-arginina (figura 19).

Os achados histopatológicos foram de cistite hemorrágica intensa em até 60% dos animais que receberam a maior dose de L-arginina. Conforme já citamos, nos que receberam apenas L-NAME, 12 horas após a administração de CFS, dois dos animais exibiam bexigas comparáveis às normais e nos demais havia cistite discreta [valor mediano: controle = 2(2, 2); L-NAME = 1 (0, 1)*; L-NAME+L-arginina, 600 mg/kg = 2(1, 2); L-NAME+D-arginina = 1(1, 1)*; $p < 0,05$ - $n=5$, teste Mann-Whitney-U] (prancha 8).

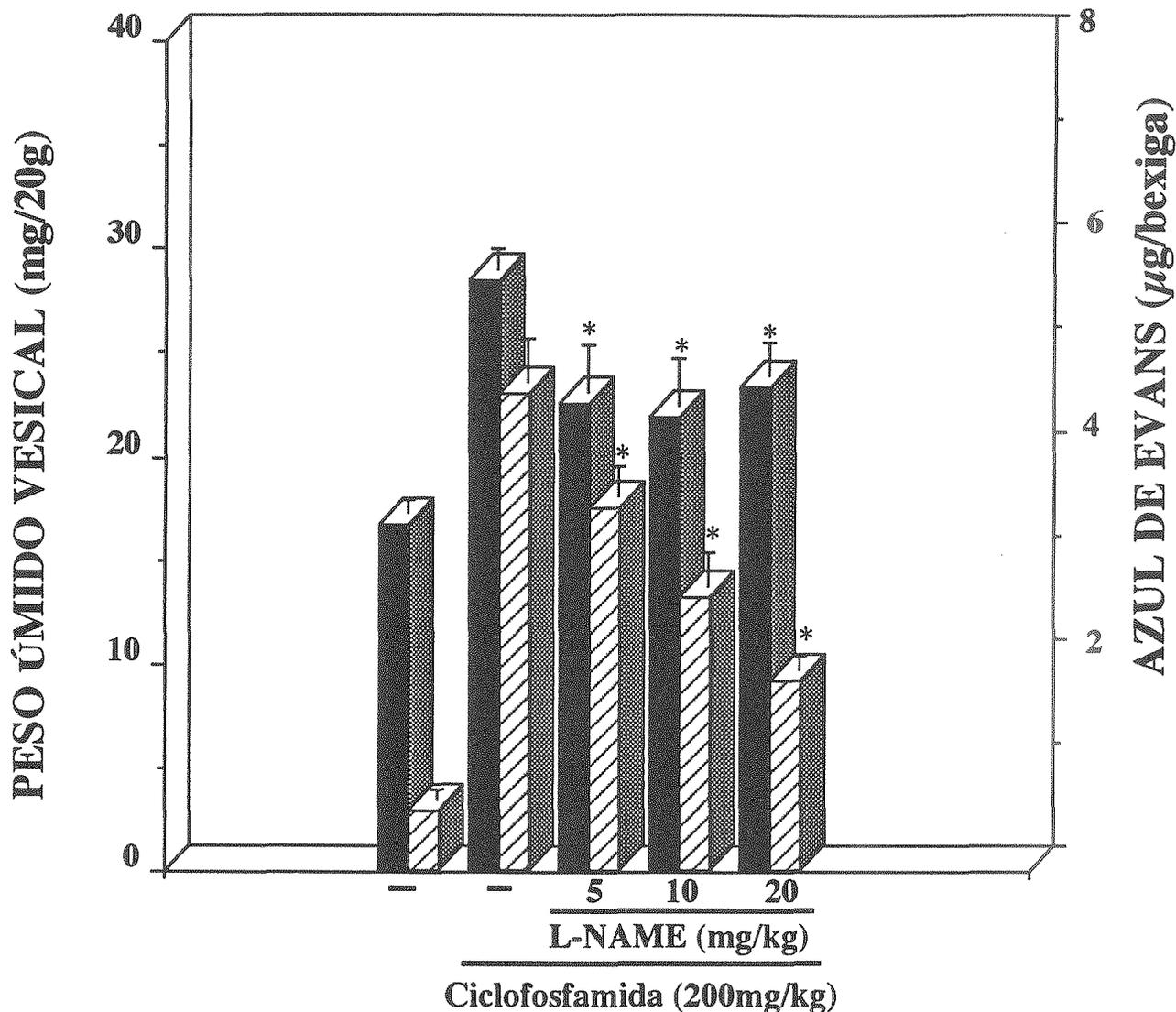


Figura 18. Efeito do L-NAME no aumento do peso úmido vesical e permeabilidade vascular na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. As barras mostram o peso úmido (■) e a permeabilidade vascular (▨) de bexigas de camundongos tratados 12 horas antes com Ciclofosfamida (200 mg/kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com L-NAME (5, 10 e 20 mg/kg). Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=6). (*) $p < 0.05$ comparado com o controle específico (grupo não tratado com L-NAME); ANOVA-teste de Fisher.

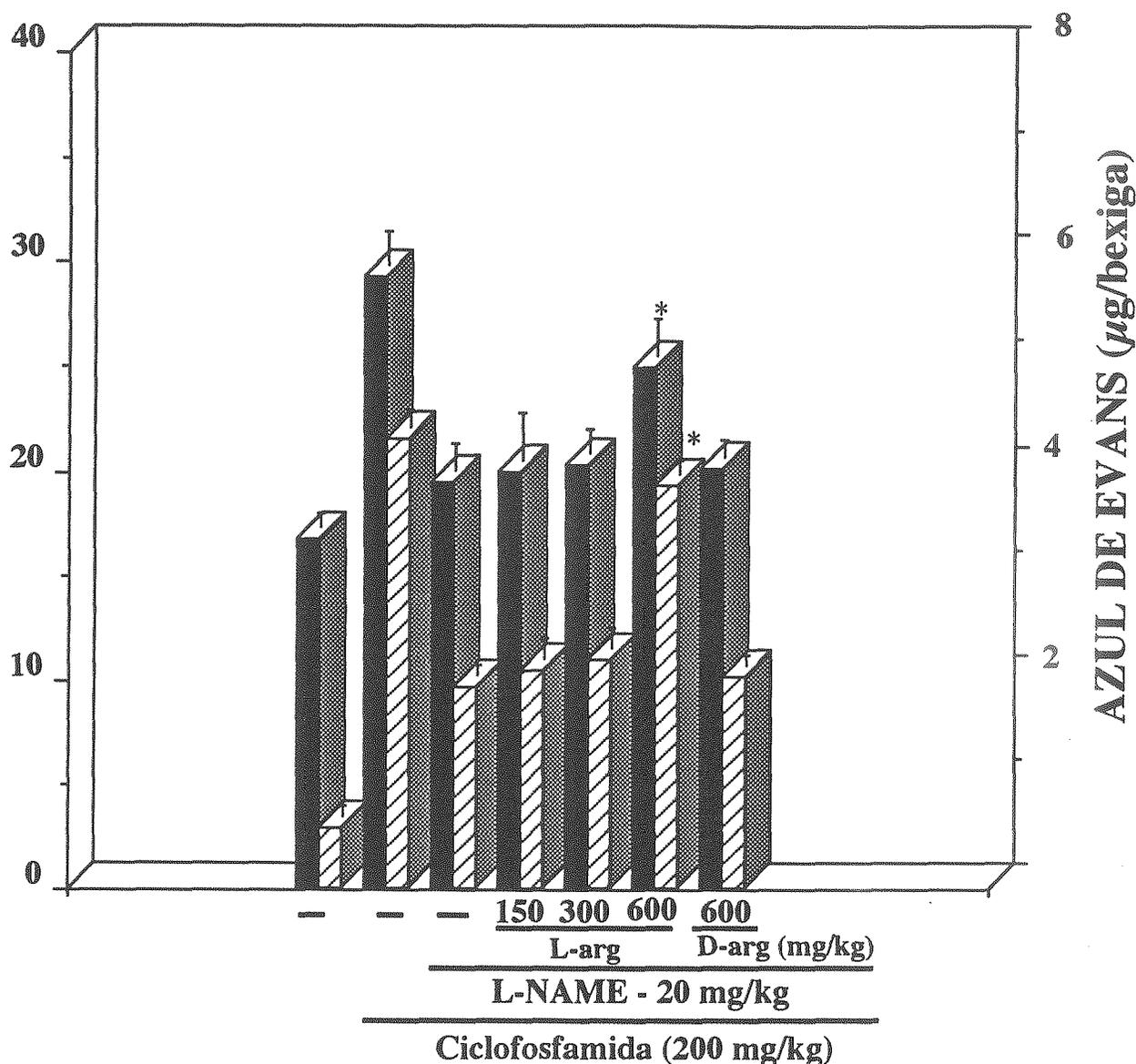


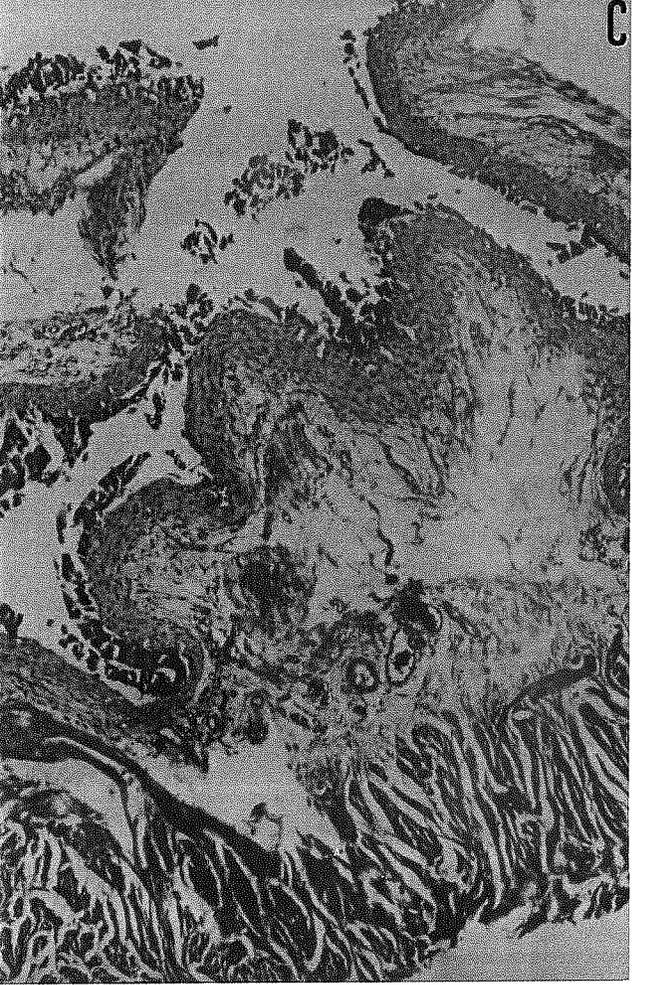
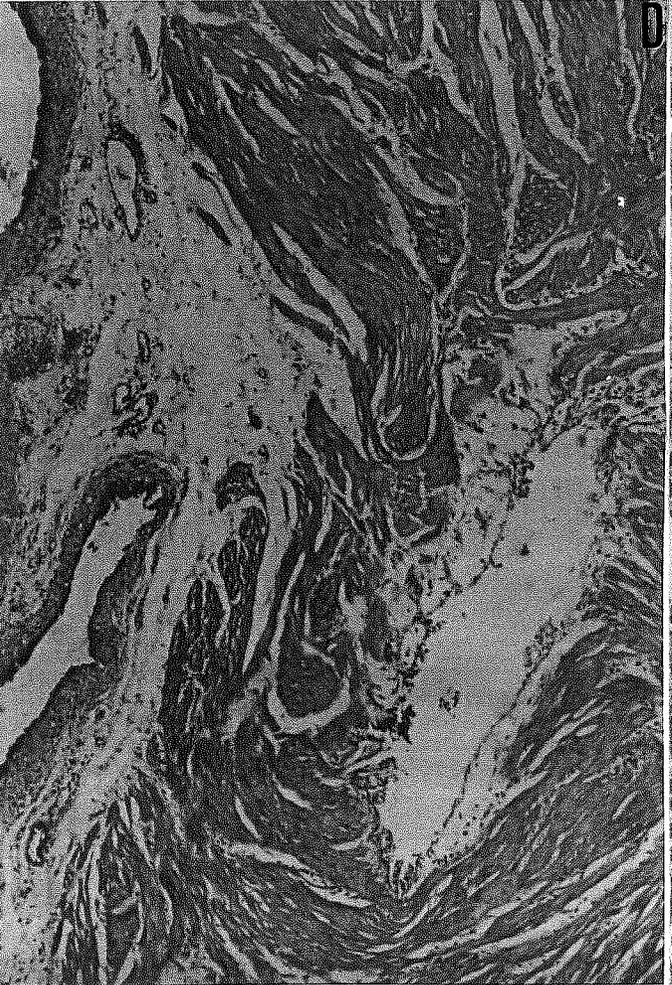
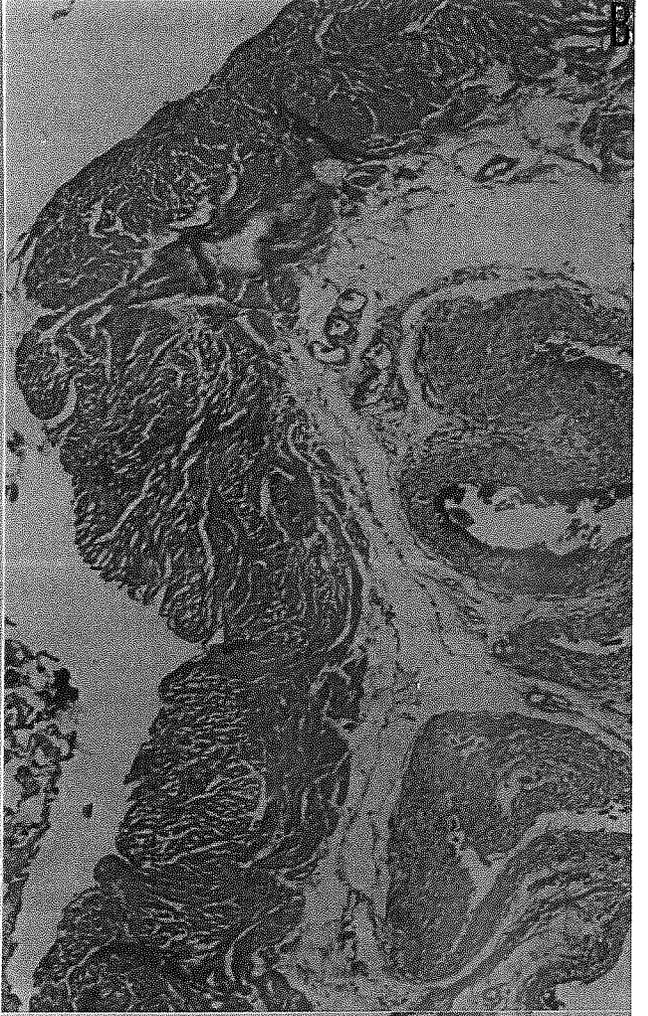
Figura 19. Efeito da L-arginina na reversão do aumento do peso úmido vesical e permeabilidade vascular produzidos pelo L-NAME na Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida. As barras mostram o peso úmido (■) e a permeabilidade vascular (▨) de bexigas de camundongos tratados 12 horas antes com Ciclofosfamida (200 mg/kg, via ip) e pré-tratados (30 minutos antes, via ip) com L-NAME (20 mg/kg) juntamente com L-arginina (150, 300 ou 600 mg/kg, via ip) ou D-arginina (600 mg/kg, via ip). Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=6). (*) $p < 0.05$ comparado com o grupo tratado apenas com L-NAME; ANOVA-teste de Fisher.

PRANCHA 8

PRANCHA 8.

- A-** Cistite hemorrágica (2 +) induzida por ciclofosfamida (12 h)
- B-** Cistite hemorrágica (1 +) induzida por ciclofosfamida (12 h) em camundongo pré-tratado com L-NAME.
- C-** Cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (12 h) em camundongo pré-tratado com L-NAME e que também recebeu L-arginina.
- D-** Cistite hemorrágica (1 +) induzida por ciclofosfamida (12 h) em camundongo pré-tratado com L-NAME e que também recebeu D-arginina.

Classificação de Gray. Coloração H & E. Aumento 40x.



IV- DISCUSSÃO

As oxazafosforinas CFS e IFS, classificadas como agentes alquilantes, são importantes na terapia de pacientes com doenças malignas. Os agentes alquilantes têm sido usados ao longo de vários anos, estando as mostardas nitrogenadas já no seu quinquagésimo ano desde o aparecimento de resumos de pesquisas clínicas feitas por Goodman e colaboradores (1946). Apesar da potencial toxicidade inerente, os agentes alquilantes permanecem parte do bem sucedido e algumas vezes curativo, regime terapêutico de multidrogas para o tratamento de pacientes com linfomas, câncer de mama, tumor de células germinativas e alguns sarcomas.

CFS, clinicamente introduzida em 1958, tornou-se o agente alquilante mais largamente usado pelo fato de não causar lesão no trato gastrointestinal, mesmo em doses elevadas, e por poupar, relativamente, a medula óssea. A mielossupressão induzida por CFS consiste primariamente de leucopenia e a recuperação é relativamente rápida, comparada com outros agentes antineoplásicos (FRAISER, KANEKAL & KEHRER, 1991).

IFS, um análogo isomérico da CFS, foi primeiro introduzida clinicamente na década de setenta. Desde então, IFS tem sido usada crescentemente com base na premissa de que é mais efetiva em certas doenças, tais como nos tumores testiculares (LOEHRER et alii, 1988).

Muito embora ocorra com IFS um metabolismo qualitativamente similar ao que ocorre com CFS, a oxidação das cadeias laterais de cloroetil da CFS contribui com aproximadamente 10% do metabolismo total do composto, ao passo que a proporção de IFS metabolizada por essa via pode ser tão elevada quanto 50%, sendo variável de paciente para paciente. Tal fato, possivelmente, explique porque, para uma mesma situação terapêutica, usa-se três a quatro vezes mais IFS do que CFS (FIELDS et alii, 1995; IBRAHIM et alii, 1993).

A urotoxicidade vesical, manifestada por cistite hemorrágica estéril, é, com frequência, fator dose-limitante, comum às duas drogas, cujos sintomas variam desde irritação transitória até lesão vesical hemorrágica que ameaça a vida (BROCK et alii, 1982).

Em modelo murino, há relatos de variação da sensibilidade entre as diversas cepas de camundongos, quanto à toxicidade secundária ao uso de CFS. O C57BL/6N (C-57), por exemplo, é resistente ao desenvolvimento de fibrose pulmonar por uso de CFS, enquanto que essa fibrose desenvolve-se com frequência no camundongo Balb/c sendo sugerido que tal distinção resulte de diferenças nos processos de reparo (HOYT & LAZO, 1989).

CH induzida por CFS foi encontrada em intensidade significativamente maior no camundongo ICR em comparação ao C-57 (FRAISER & KEHRER, 1992). A variação nas cepas murinas quanto à susceptibilidade para o desenvolvimento de CH induzida por CFS pode ser modulada por vários processos "in vivo". Por exemplo, diferenças nas cepas quanto ao metabolismo oxidativo da droga pelo fígado; quanto à distribuição dos metabólitos ativos para os órgãos alvo; quanto à permeabilidade dos metabólitos ativos nas células dos órgãos alvo ou ainda quanto à resposta citotóxica das células dos órgãos alvo (HASHMI, VAMVAKAS & ANDERS, 1992). Fatores intrínsecos vesicais podem também ser responsáveis por parte da resistência ao desenvolvimento de CH vista no C-57. Apoio a essa hipótese tem como base a resposta hemorrágica aumentada e a maior permeabilidade das bexigas dos ICR expostas à acroleína por instilação direta (FRAISER & KEHRER, 1992).

A decisão de avaliar a possibilidade de reproduzir modelo experimental de CH em camundongo induzida tanto por CFS como por IFS teve como base o que se segue: (a) a importância ocupada pela CFS dentro do arsenal terapêutico e, na última década, a crescente difusão do uso de IFS; (b) o interesse em estabelecer comparação entre as duas drogas

quanto ao potencial urotóxico em uma determinada cepa murina, uma vez que há diferenças terapêuticas entre CFS e IFS, assim como relatos de diferenças entre cepas murinas quanto ao metabolismo e toxicidade vesical induzida por CFS (FRAISER & KEHRER, 1992).

No presente estudo, observou-se que, em camundongos Swiss, CFS e IFS induziram o desenvolvimento de CH de forma dose dependente, com resultados praticamente equiparáveis, inclusive quando o curso temporal da lesão foi avaliado, tendo sido máxima no tempo de 12 horas após a administração de CFS ou IFS. Destacamos que CFS na dose de 100 mg/kg não produziu lesão vesical significativa em relação ao grupo controle, ao passo que IFS na dose de 100mg/kg produziu e, quanto à cinética da lesão, a recuperação vesical foi mais rápida quando a lesão foi induzida por IFS comparada à induzida por CFS na mesma dose (200 mg/kg). Possivelmente, por haver níveis mais baixos de acroleína na bexiga, 48 horas após a administração de IFS em comparação aos níveis presentes no mesmo tempo após a administração de CFS (figuras 1 e 2).

A microscopia óptica, verificou-se que, seis horas após a administração quer de CFS como de IFS, já havia áreas extensas de descamação das células uroteliais superficiais, áreas de exulceração e áreas ulceradas, recobertas por induto fibrinogranulocitário. Nos trechos em que persistia urotélio, era frequente a existência de células tumefeitas, assim como de microvacúolos intercelulares correspondendo, provavelmente, a edema intercelular por lesão do complexo unitivo. Na lâmina própria, a densidade capilar estava nitidamente aumentada, havia congestão e edema importante, que dissociava os elementos do conjuntivo. Nos vasos, a marginação neutrofílica era comumente vista, havia tumefação endotelial, vasculite em alguns vasos, assim como necrose transmural coagulativa em pequenos vasos circundados por material fibrinóide.

Áreas com depósito de fibrina e hemorragia também estavam presentes. Observou-se que, no tempo de doze horas, as lesões descritas anteriormente haviam se intensificado, com extensão do edema para a camada muscular própria. A partir do segundo dia da indução da lesão, as alterações histológicas tornaram-se progressivamente menos graves, sendo vistas áreas de urotélio com aspecto regenerativo e, no terceiro dia, recomposição do pregueado mucoso característico, restando apenas leves congestão e edema (pranchas 1 e 2). Vale salientar a ocorrência de faixa de células fusiformes, fibroblasto-símiles, em meio a colágeno, situada sob o epitélio e ausente em bexigas normais, contudo, presente no modelo em estudo. Tal camada de células foi observada nas bexigas em todos os tempos de sacrifício após a indução da lesão, sendo mais conspícua no tempo de doze horas e mais delgada no tempo de setenta e duas horas.

Com o propósito de conferir validade ao modelo experimental reproduzido, os animais tratados com CFS e IFS, também o foram com mesna que, do ponto de vista clínico, é a droga por meio da qual a urotoxicidade das oxazafosforinas tem sido prevenida com segurança. Em nosso modelo experimental, mesna, à semelhança do que ocorre no uso clínico, conferiu uroproteção tanto quando CFS foi usada quanto IFS, conforme vemos nas figuras 3 e 4, na tabela 1 e na prancha 3.

Considerando que a reprodução de cistite hemorrágica no camundongo Swiss foi obtida com CFS e com IFS em condições equiparáveis do ponto de vista da dose e do comportamento temporal da lesão, passou-se a estudar, no modelo de CH induzida por CFS, no referido camundongo, a possível participação de algumas citocinas nos mecanismos envolvidos na inflamação vesical.

Aliado ao fato de que algumas citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 participam direta ou indiretamente na gênese dos eventos da resposta inflamatória aguda (edema, marginação e migração neutrofílica, dor, febre, dentre

outros), o reconhecido efeito do TNF- α na indução de fenômenos hemorrágicos nos enxertos tumorais tornou-se um outro atrativo para se imaginar que tais citocinas pudessem estar envolvidas na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida.

TNF- α , IL-1 e IL-6 são exemplos típicos de citocinas multifuncionais envolvidas na resposta inflamatória e, as duas primeiras, consideradas protótipos de citocinas pró-inflamatórias. A produção de TNF- α , IL-1 e IL-6 não é constitutiva, mas induzida transitoriamente numa variedade de células e por estímulos diversos (DINARELLO, 1992). A constatação da existência de uma rede de citocinas na qual a expressão dessas citocinas influenciam umas às outras, é um aspecto importante nesse campo. Por exemplo, IL-1 e TNF- α são potentes indutores de IL-6, e IL-6, por sua vez, regula a expressão de TNF- α . Muito embora essas citocinas sejam pleotrópicas, elas são capazes de participar da reação inflamatória de modo específico "in vivo", talvez através da regulação da expressão de receptores e ligantes (AKIRA et alii, 1990).

Em nosso trabalho, vimos que a administração de soro anti-TNF- α , como pré-tratamento de CH induzida por CFS, reduziu significativamente a lesão, bloqueando tanto a permeabilidade vascular como o peso (figura 5). O exame histológico revelou menor edema, menor número de vasos exibindo marginação neutrofílica, vasos mais preservados no que diz respeito às alterações degenerativas endoteliais e mesmo à necrose, além de significativa redução dos fenômenos hemorrágicos e maior preservação urotelial.

O pré-tratamento com soro anti-IL-1 também resultou em atenuação da lesão. A inibição do aumento do peso, do aumento da permeabilidade vascular e alterações histológicas menos intensas ocorreram de maneira significativa nos animais sacrificados doze horas após a indução de CH, muito embora tenhamos observado, à microscopia óptica, áreas hemorrágicas

mais reduzidas e menor intensidade de fibrina na lâmina própria das bexigas dos animais sacrificados no tempo de seis horas, em relação ao grupo pré-tratado com o soro controle.

Atenuação da lesão também foi vista quando os animais foram pré-tratados com os soros anti-IL-6 e anti-IL-8, sendo esse efeito significativo em doze horas conforme mostram as figuras 7 e 8, a tabela 4 e a prancha 6. Devemos ressaltar que, com ambos os anticorpos, observamos menor marginação neutrofílica, com evidente redução da exsudação neutrofílica, particularmente nos pré-tratados com anti-IL-8.

Os resultados obtidos nesse estudo compõem fortes evidências indicativas de que as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 desempenham um papel importante na patogênese da CH induzida por CFS. É importante notar que nos tempos em que a lesão é máxima (6 e 12 horas após a administração de CFS), dentre os anti-soros usados o soro anti-TNF- α foi o que conferiu maior proteção vesical. A atenuação da lesão vesical vista com os demais anti-soros, quando levamos em consideração todos os parâmetros aqui utilizados para avaliar a CH (peso vesical, permeabilidade vascular, alterações histológicas com base nos critérios de Gray) foi significativa apenas no tempo de 12 horas. Essa observação é importante uma vez que ela pode sugerir uma participação do TNF- α em etapa mais precoce dos eventos inflamatórios que ocorrem na CH.

Brett et alii (1989), demonstraram que a exposição de monocamadas de endotélio ao TNF resulta em alterações progressivas e marcantes na disposição da actina, que compõe o citoesqueleto celular, levando à ruptura da continuidade da monocamada por retração celular, com formação de fendas intercelulares. Tais alterações estruturais estão correlacionadas com um aumento na permeabilidade endotelial a macromoléculas e, portanto, a alteração importante na função de barreira da célula endotelial.

Themann et alii (1987), em estudo à microscopia eletrônica efetuado em bexigas de ratos com CH induzida por CFS, verificou que, sobretudo os capilares situados sobre as áreas exulceradas, exibiam células endoteliais destacadas da membrana basal, protruindo para a luz, tendo verificado também acentuada degeneração nas organelas dessas células, além de redução de seus microfilamentos.

Conforme já descrito, a agressão primária do metabólito urotóxico das oxazafosforinas se faz sobre as células do epitélio transicional vesical, resultando em destruição da barreira existente entre a urina hipertônica e o tecido isotônico que compõe a lâmina própria havendo, portanto, exposição de macrófagos residentes, fibroblastos e endotélio aos elementos irritantes presentes na urina. Nesse sentido, é lícito especular que, após a lesão inicial descrita acima, haveria a ativação de macrófagos presentes no tecido, com seqüente liberação de TNF- α que atuaria nos vasos circunvizinhos resultando nos seguintes efeitos: (i) alteração do citoesqueleto do endotélio com retração celular e formação de fendas, levando a descontinuidade do endotélio e, por conseguinte, ao edema. (ii) Aumento da adesão dos neutrófilos ao endotélio por induzir a síntese e expressão de moléculas de adesão tanto no endotélio como nos neutrófilos, ativando os neutrófilos e facilitando sua degranulação, o que resulta em liberação de espécies de oxigênio tóxicas e de enzimas proteolíticas que podem causar lesão grave ou descolamento endotelial. (iii) Estimulação da produção de IL-1 e IL-6 pelo endotélio. TNF- α também atuaria sobre os próprios macrófagos do microambiente vesical resultando em maior liberação de TNF- α , IL-1 e IL-6, e ainda estimularia a proliferação fibroblástica.

Os fibroblastos, uma vez em franca atividade de síntese, também são capazes de produzir IL-1, IL-6 e IL-8. A presença de TNF- α e de IL-1, provavelmente também estimularia maior produção e liberação de IL-8 por macrófagos e por células endoteliais. Baggiolini et alii,

1992, relatam a ocorrência de liberação de níveis elevados de IL-8 por células sinoviais de pacientes com artrite reumatóide quando estimuladas por IL-1 ou TNF. Os mesmos autores também sugerem que a detecção de níveis mais elevados de IL-8 juntamente com IL-1 em pacientes com psoríase, pode ser indicativo de que IL-1 atue localmente como indutora da produção e liberação de IL-8.

No que diz respeito à sobreposição de atividades biológicas observadas entre TNF- α e IL-1, podemos citar que, em culturas de células endoteliais tratadas com IL-1 ou com TNF- α , há aumento na expressão de moléculas de adesão, na produção de PGI₂, PAF, IL-1 e IL-6, além de elementos que estimulam a atividade pró-coagulante, como o inibidor do ativador do plasminogênio e trombina (DINARELLO, 1992).

Vemos a lesão sobre o endotélio como evento importante para a compreensão das alterações morfológicas observadas no curso da CH induzida por CFS. O endotélio serve como uma barreira celular retendo os componentes do sangue dentro do espaço intravascular. Ademais, as células endoteliais intactas são multifuncionais, ou seja, se por um lado possuem propriedades antiplaquetária, anticoagulante e fibrinolítica, por outro, exercem funções pró-coagulantes. Portanto, quanto mais severa a lesão endotelial, maior o desequilíbrio nos mecanismos hemostáticos associados ao endotélio, uma vez que essas células modulam vários aspectos da seqüência hemostasia-coagulação. Essa pode ser a base morfológica dos fenômenos hemorrágicos que são tão particulares da lesão vesical induzida por CFS e IFS.

Muito embora TNF- α e IL-1 estimulem a atividade pró-coagulante, em determinadas situações, quando administrados juntos, induzem hemorragia pulmonar (OKUSAWA et alii, 1988) e TNF- α sozinho é capaz de produzir acentuada necrose hemorrágica tumoral (OLD, 1985).

No modelo de CH induzida por CFS, a lesão endotelial pode decorrer não só de ação direta dessas citocinas, como também indireta, uma vez que elas propiciam a ocorrência de

vários outros fatores que resultam em resposta pró-inflamatória cooperativa. Por exemplo, a maior produção de PGI₂ e de PAF decorrente da ação sinérgica dessas citocinas sobre o endotélio, comporia elemento amplificador do edema por aumento da vasodilatação, e da hemorragia por inibição da agregação plaquetária. O aumento na adesão leucocitária e na ativação neutrofílica resultaria não só em maior liberação de radicais livres derivados do oxigênio, como também na liberação de enzimas lisossômicas. Essas últimas, por sua vez, ativam o complemento gerando C3a e C5a, que por seu turno, ativariam a via da lipoxigenase do metabolismo do AA causando maior liberação de mediadores inflamatórios. Além do mais, os tecidos vesicais destituídos de urotélio estão expostos a componentes da urina, como por exemplo a uroquinase que, por ser ativadora do plasminogênio, pode ser vista como contribuinte adicional para a ocorrência da hemorragia.

Tem sido descrito que algumas prostaglandinas e seus análogos são agentes efetivos no tratamento da CH induzida por CFS, em animais e no homem (GRAY et alii, 1986; GRINBERG-FUNES et alii, 1990 & FRAISER et alii, 1991). Por outro lado é sabido que PGE₂ exógena suprime a liberação "in vitro" de TNF- α assim como a expressão do gene de TNF- α de modo dose-dependente, indicando que produtos da ciclooxigenase podem atuar como parte da alça de "feedback" inibitório que limita a produção de TNF por parte de monócitos-macrófagos (MARCINKIEWICZ, 1991). Portanto, o efeito benéfico de prostaglandinas no controle da CH poderia ser explicado por essa ação inibitória sobre a síntese de TNF- α , dado que reforça ainda mais o papel dessa citocina na patogênese da CH induzida por CFS.

A observação do envolvimento de TNF- α na patogênese da CH induzida por CFS, somado ao fato de que dexametasona, pentoxifilina e talidomida inibem sua produção, nos motivou a pré-tratar os animais com essas drogas a fim de verificar seu efeito no modelo em estudo.

Vimos que quando cada uma dessas drogas foi administrada houve redução significativa do peso úmido vesical, do extravasamento vascular e das alterações vistas à microscopia óptica, sendo tal efeito dose dependente e máximo nos tempos de seis e doze horas (figuras 9-14, tabela 5, prancha 7).

Os glicocorticóides representam a classe de droga mais efetiva na terapêutica das doenças inflamatórias. Sua ação se processa através de várias etapas que se iniciam com sua difusão pela membrana plasmática, seguida de ligação a receptor esteroideal citoplasmático, formando um complexo que atravessa a membrana nuclear, ligando-se a um sítio específico da cromatina. Esse último passo desencadeia a produção de RNAm específicos que resultarão na produção de novas proteínas responsáveis pela ação propriamente dita dos corticóides. A dexametasona, um dos mais potentes componentes do grupo dos glicocorticóides, inibe a produção dos derivados do AA pelas vias da ciclo e lipoxigenase, através de mecanismo que parece ser condicionado a indução de produção de uma proteína, a lipocortina 1, que tem atividade inibitória sobre a fosfolipase A2 (BARNES & ADCOCK, 1993).

Dexametasona tem também marcante efeito inibitório sobre a transcrição de diversas citocinas, tais como TNF- α , IL-1 e IL-8, devendo ser destacado que, além de inibir sua produção, também bloqueia seus efeitos de diversas formas, como é o caso da diminuição da expressão de receptores para IL-8, por exemplo (BARNES & ADCOCK, 1993).

Estudos recentes têm demonstrado que a pentoxifilina [3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)xantina], que é usada no tratamento de doenças circulatórias cerebrais e arteriovenosas periféricas, é capaz de inibir o aparecimento de TNF no soro de camundongos, de ratos e do homem, quando tratados com LPS (SCHADE, 1990; NOEL et alii, 1990 & ZABEL et alii, 1989).

Essa droga age principalmente melhorando a deformabilidade das hemácias e reduzindo a viscosidade sanguínea, a agregação plaquetária e as concentrações de fibrinogênio plasmático (SANTUCCI et alii, 1994). Estudos que apontam para suas propriedades antiinflamatórias indicam que ela inibe a ativação de neutrófilos (SCHADE, 1990), a adesão neutrofílica ao endotélio mediada por IL-2 (SJOLIN et alii, 1990) e reduz também a síntese e liberação de TNF- α , IL-6 e IL-2, tanto "in vivo" quanto "in vitro" (FLORES et alii, 1989). Santucci et alii (1994) em modelo de gastrite aguda induzida por indometacina, viram que pentoxifilina previnía a lesão gástrica aguda por inibir a marginação neutrofílica e nesses animais havia redução na liberação de TNF- α .

Em nosso trabalho, vimos que as bexigas dos camundongos pré-tratados com pentoxifilina, apresentavam significativa redução do edema, da marginação neutrofílica e das áreas hemorrágicas. A redução da marginação neutrofílica na microcirculação, associada a menor ativação dos neutrófilos, resulta em maior preservação endotelial.

A talidomida (α -N-ptalimidoglutarimida) tem sido usada ao longo do tempo como agente sedativo, como antiinflamatório e como agente imunossupressor. Atualmente é usada na terapia do eritema nodoso leproso, ou reação do tipo II, um estado inflamatório agudo que ocorre na lepra lepromatosa, caracterizado por sintomas sistêmicos severos incluindo febre, lesões cutâneas dolorosas, artrite, glomerulonefrite e presença de imunocomplexos circulantes. Nessa grave complicação da lepra, a talidomida tem um efeito benéfico muito importante, permanecendo por isso a droga de escolha para o tratamento do eritema nodoso leproso (BARNHILL & McDOUGALL, 1982). Recentemente, foram detectados níveis séricos elevados de TNF- α e IL-1 β nos pacientes com eritema nodoso leproso, tendo sido detectado também redução dessas citocinas após o tratamento com talidomida (SARNO, E. N., GRAU, G. E., VIEIRA, L. M. M. & NERY, A. C., 1990).

Sampaio et alii (1991) observaram que talidomida inibe seletivamente a produção de TNF- α por monócitos humanos quando essas células são estimuladas por LPS e por outros agonistas em cultura. Nessa situação, as quantidades de IL-1 β , IL-6 e GM-CSF produzidos por monócitos permaneceram inalteradas.

Em trabalho posterior, Sampaio et alii (1993), examinando o mecanismo de inibição da talidomida sobre a produção do TNF- α , constataram que a inibição decorre de maior degradação de RNAm para a síntese do TNF. Pentoxifilina, por sua vez, reduz a transcrição do gene do TNF e dexametasona atua a nível pós-transcricional reduzindo a síntese dessa citocina.

A redução da lesão vesical induzida por CFS vista nos animais pré-tratados com talidomida, somado ao fato de que essa droga inibe seletivamente a produção de TNF- α , confere a ela a condição de boa candidata para o tratamento dessa e de outras condições inflamatórias nas quais a imunidade precisa permanecer intacta. Deve ser enfatizado que essa inibição seletiva não significa que talidomida não tenha impacto sobre outras citocinas inflamatórias. Como vimos, TNF é conhecido como modulador da síntese de citocinas e de outras moléculas inflamatórias, de modo que sua inibição resultaria em redução de IL-1 β , IL-6, IL-8, PAF, PGI₂, dentre outros.

Uma vez que talidomida, pentoxifilina e dexametasona afetam a síntese de TNF- α em pontos distintos da via biossintética dessa citocina, é possível supor que elas atuem sinergicamente.

Os resultados obtidos no experimento em que os animais foram pré-tratados com a associação das três drogas em doses mais baixas sugeriram fortemente a ocorrência de sinergismo. A inibição do aumento do peso úmido vesical, do extravasamento vascular e a marcante preservação vesical do ponto de vista da observação histológica foi vista tanto em

seis como em doze horas após a administração de CFS (figura 19).

Como já citamos, TNF- α e IL-1 induzem aumento na produção de PAF pelas células endoteliais (DINARELLO, 1992). PAF é conhecido por uma diversidade de efeitos pró-inflamatórios, com papel relevante na capacidade de aumentar a permeabilidade microvascular. Com o objetivo de estudar a participação desse mediador na CH induzida por CFS em camundongo, utilizamos o composto BN-52021

Como podemos ver na figura 16 e 17 tabela 7, o BN-52021 inibiu a CH induzida por CFS, sugerindo que PAF tem um papel importante na patogênese dessa lesão. Participação importante de PAF também foi demonstrada no modelo de CH induzida por CFS em ratos (LIMA et alii, 1994).

No presente trabalho, são demonstrados dados experimentais que indicam o envolvimento do NO na patogênese da CH induzida por CFS. Duas linhas de evidências dão suporte a essa afirmativa: (i) o pré-tratamento dos animais com L-NAME, um antagonista de NO, bloqueou de forma significativa e dose-dependente tanto o aumento do peso vesical como da permeabilidade vascular; além disso, a histopatologia das bexigas tratadas com L-NAME revelou redução importante do edema, da migração neutrofílica e da erosão urotelial; (ii) o co-tratamento com o precursor da síntese de NO, L-arginina, mas não com seu enantiômero inativo, D-arginina, reverteu, de forma significativa e dose-dependente, o efeito inibidor do L-NAME sobre os eventos inflamatórios da CH induzida por CFS descritos acima.

Recentemente, foi demonstrado que o PAF estimula a formação de NO por ativação e/ou indução da NO-sintase in vivo (SZABÓ et alii, 1993). Em adição, estudos anteriores haviam mostrado que o PAF é um dos mediadores envolvidos na patogênese da CH induzida por CFS em ratos, já que um antagonista de PAF, BN52021, foi capaz de bloquear todos os eventos inflamatórios ocorridos no curso da mesma (LIMA et

alii, 1994). É possível, portanto, sugerir que durante a CH induzida por CFS, o PAF deve ser um dos mediadores iniciais capaz de desencadear a cascata de eventos pró-inflamatórios, via ativação de NO-sintase, gerando NO.

O presente trabalho, associado aos dados da literatura anteriormente citados, sugerem que a acroleína lese inicialmente o urotélio, resultando em exposição dos elementos da lâmina própria (macrófagos, endotélio, fibroblastos) à urina. Como consequência, macrófagos liberariam TNF- α que, por seu turno, ativaria a liberação de IL-1 β , IL-6, IL-8, além de NO e PAF. Esses mediadores causariam cistite hemorrágica tanto por sua ação sobre os componentes da lâmina própria, quanto por agravarem a lesão urotelial. A atenuação do edema, da exsudação neutrofílica, dos fenômenos hemorrágicos e a maior preservação urotelial vista quando bloqueadores desses mediadores foram usados, são consistentes com essa proposição (figura 20).

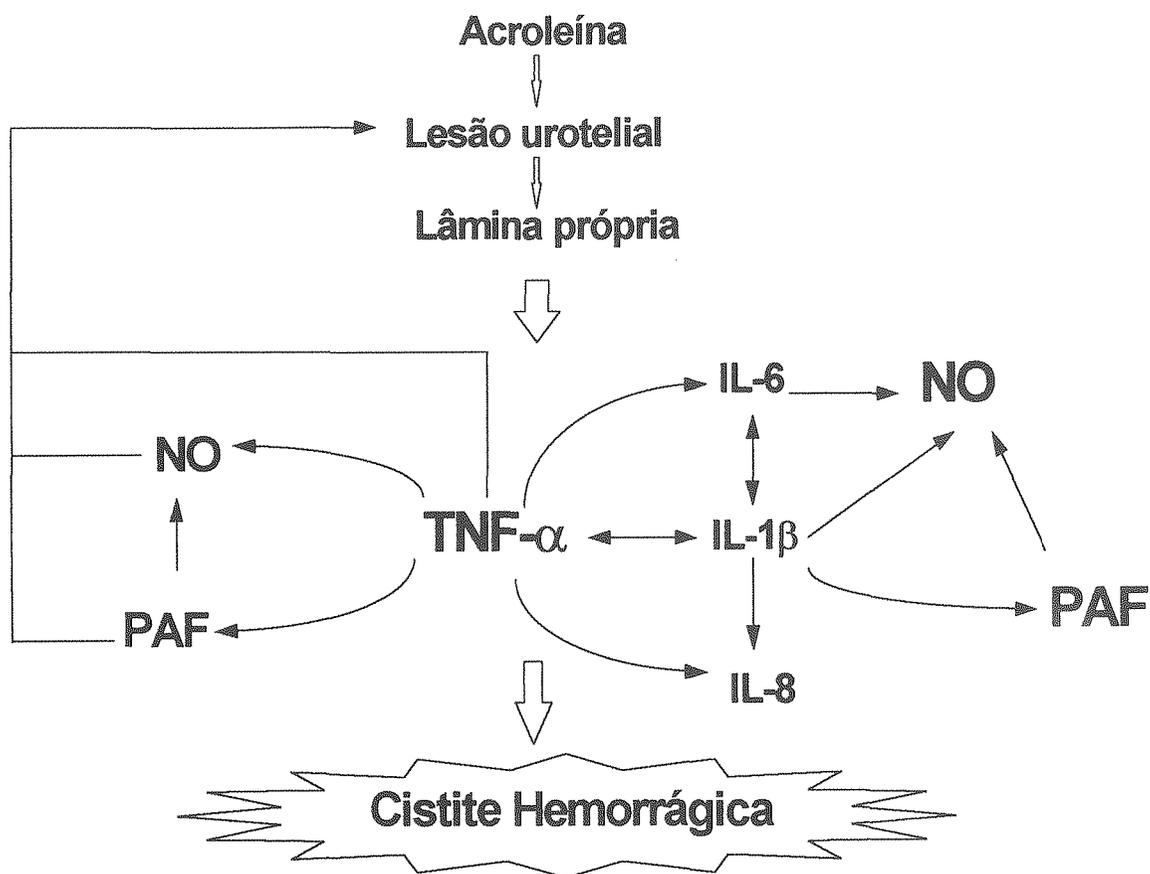


Figura 20. Esquema teórico proposto para a cascata de mediadores envolvidos nos eventos inflamatórios da Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida.

5- CONCLUSÕES

- Ciclofosfamida e ifosfamida induziram de forma dose-dependente o desenvolvimento de CH em camundongos Swiss, com resultados praticamente equiparáveis.
- Mesna atua como uroprotetor eficaz no modelo CH induzida por CFS e IFS em camundongos Swiss.
- A atenuação da CH induzida por CFS após o pré-tratamento dos camundongos com soros anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-IL-6 e anti-IL-8 compõe evidência indicativa de que essas citocinas pró-inflamatórias desempenham papel importante na patogênese dessa lesão.
- Dentre os anti-soros usados, o soro anti-TNF- α foi o que conferiu maior proteção vesical, com inibição significativa da lesão nos tempos de 6 e 12 horas. A atenuação da lesão vesical vista com os demais anti-soros foi significativa apenas no tempo de 12 horas. Tais dados sugerem uma participação do TNF- α em etapa mais precoce dos eventos inflamatórios que ocorrem na CH.
- Inibidores seletivos (Talidomida) ou não (Pentoxifilina e Dexametasona) da produção de TNF- α , isoladamente ou em associação, bloqueiam os eventos inflamatórios da CH.
- O pré-tratamento com o L-NAME, resultando em bloqueio significativo e dose-dependente das alterações inflamatórias vesicais induzidas por CFS, assim como a reversão desse bloqueio com o co-tratamento com a L-arginina, mas não com a D-arginina, são dados indicativos do envolvimento do NO na patogênese da CH induzida por CFS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, H. & POBER, J. S. Cytokines. Em: **Cellular and Molecular Immunology**, 2nd. edition, WB. Saunders, 239, 1994.
- ADERKA, D. ENGELMANN, H. & HORNIK, V. Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. **Cancer Res.**, 51: 5602, 1991.
- AKIRA, S., HIRANO, T., TAGA, T. & KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). **FASEB J.** 4: 2860, 1990.
- ALARCON, R.A., MEIENHOFER, J. Formation the cytotoxic aldehyde acrolein in vitro degradation of cyclophosphamide. **Nature New Biol**, 233: 250, 1971.
- APTE, R.N., DURUM, S.K. & OPPENHEIM, J.J. Opioids modulate interleukin-1 production and secretion by bone-marrow macrophages. **Imm. Letters**, 24:141, 1990.
- ARAI, K., LEE, F., MIYAJIMA, A. et alii. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. **Annu. Rev. Biochem.** 59: 783, 1990.
- ARAUJO, C.E., TESSLER J. Treatment of ifosfamide-induced urothelial toxicity by oral administration of sodium 2-mercaptoethane sulphonate(mesna) to patients with inoperable lung cancer. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology** 19: 195, 1983.
- ARNAOUT, A.M. Leukocyte-endothelial cell recognition: Three or more steps to diversity and sensitivity. **Cell**, 67: 1033, 1991.
- ASSREUY, J., CUNHA, F.Q., LIEW, F.Y. & MONCADA, S. Feedback inhibition of nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.** 108: 833, 1993.

- BAGLEY, C.M., BOSTIK, F.W., De VITA V.T. Clinical pharmacology of cyclophosphamide. **Cancer Research**, 33: 226, 1973.
- BAGGIOLINI, M., DEWALD, B. & WALZ, A. Interleukin-8 and Related Chemotactic Cytokines. Em: **Inflammation Basic Principles and Clinical Correlates**. Raven Press., 247, 1992.
- BARNES, P.J. & ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **TIPS Reviews**, 14: 436, 1993.
- BARNHILL, R. L., AND C. McDOUGALL. Thalidomide: Use and possible mode of action in reactional lepromatous leprosy and in various other conditions. **J. Am. Acad. Dermatol.** 7: 317, 1982.
- BETHELL, F., LOUIS, J., ROBBINS, A., DONNELLY, W.J., DESSEL, B.H., BATTLE, J.D., Jr., PISCIOTTA, A.V., WILL, J. and CLIFFORD, G.O. Phase II evaluation of cyclophosphamide - a study by the Midwest Cooperative Chemotherapy Group. **Can. Chemotr. Rep.**, 8: 112, 1960.
- BEUTLER, B., & CERAMI, A. The common mediator of shock, cachexia, and tumor necrosis. **Advances Immunol**, 42: 213, 1988.
- BEUTLER, B., N. KROCHIN, I.W. MITSARK, C. LUEDKE, & A. CERAMI. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanisms of endotoxin resistance. **Science (Wash. DC)**., 232: 977, 1986.
- BLASCHKE, G. Chromatographic resolution of chiral drugs on polyamides and cellulose triacetate. **J. Liq. Chromatogr.**, 9: 341, 1986.
- BRADY, W.P., HERDRICH K., VARINI, M. Ifosfamide-pharmacology, safety and therapeutic potential. **Cancer Treatment Reviews**, 12: 1, 1985.
- BRAQUET, P. TOUQUI, L. SHEN, T.Y. et alii. Perspectives in platelet activating factor research. **Pharmacol. Reviews**, 39: 97, 1987.

- BRAMWELL, V.H.C., MOURIDSEN, H.T., SANTORO, et alii. Cyclophosphamide versus ifosfamide. Final report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcoma. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, 23: 311, 1987.
- BRETT, J., GERLACH, H., NAYROTH, P. et alii. Tumor Necrosis Factor/Cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. **J. Exp. Med.**, 169: 1977, 1989.
- BREUILLÉ, D., FARGE, M.C., ROSÉ, F. et alii. Pentoxifylline decreases body weight loss muscle protein wasting characteristics of sepsis. **American Physiological Society**, 265, 660, 1993.
- BROCK, N., HILGARD, P., POHL, J. et alii. Pharmacokinetics and mechanism of action of detoxifying low-molecular-weight thiols. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology** 108: 87, 1984.
- BROCK, N., HOHORST, H. J. Metabolism of cyclophosphamide. **Cancer** 20: 900, 1967.
- BROCK N., POHL, J., STEKAR, J. AND SCHEEF, W.: Studies on the urotoxicity of oxazaphosphorine cytostatics and its prevention. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, 17: 1155, 1981.
- BROCK, N.; POHL, J.; STEKAR, J.: Studies on the urotoxicity of oxazaphosphorine cytostatics and its prevention. I. Experimental studies on the urotoxicity of alkylating compounds. **Eur. J. Cancer** 17: 595, 1981.
- BROCK, N.; POHL, J.; SCHEEF, W.: Studies on the urotoxicity of oxazaphosphorine cytostatics and its prevention. III. Profile of action of sodium 2-mercaptoethane sulfonate(mesna). **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** 18: 1377, 1982.
- BROCK, N., POHL, J. The development of mesna for regional detoxification. **Cancer Treatment Reviews**, 10: 33, 1983.
- BROCK, N., STEKAR, J. et alii. Acrolein, the causative factor of urotoxic side-effects of cyclophosphamide,

- ifosfamide, trofosfamide and sufosfamide. **Arzneimittel-Forschung**, 29: 659, 1979.
- BUTCHER, E.C. Leucocyte-endothelial cell recognition: Three or more steps to diversity and sensitivity. **Cell**, 67: 1033, 1991.
- CALABRESI, P. & CHABNER, B.A. Em: **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Goodman and Gilman's (eds), 8th ed., 1216, 1992.
- CASTELL, J. V., ANDUS, T., GÓMEZ-LECHÓN, M. et alii. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in rat and man. **Adv. Immunopharmacol**, 4: 191, 1988.
- COCHRANE, C.G., & GIMBRONE, M.A., Jr. (eds.). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Em: Cellular and molecular Mechanisms of inflammation. **San Diego, CA, Academic Press.**, 3: 1992.
- COLDITZ, I., ZWAHLEN, R., DEWALD, B. & BAGGLIOLINI, M. In vivo inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes. **Am. J. Pathol.**, 134: 755, 1989.
- COLVIN, M. The alkylating agents. Em: **Pharmacology Principles of Cancer Treatment**. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 276, 1982.
- COLVIN, M. The comparative pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. **Semin Oncol**, 9: 2, 1982.
- COLVIN, O.M., CHABNER, B.A. Alkylating agents. Em: Chabner, B.A., COLLINS, J.M.(eds). **Cancer Chemotherrapy: Principles and Praticce**. Philadelphia, PA, Lippincott, p 276, 1990.
- CONNORS, T.A. Protection against the toxicity of alkylating agents by thiols:the mechanism of protection and its relevance to cancer chemotherapy. **European Journal of Cancer**, 2: 293, 1966.

- COTRAN, R.S.: Endothelial cells. Em: Kelley, W.N., et alii. (eds.): **Textbook of Rheumatology**, 4th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 327, 1993.
- COX, P.J. Cyclophosphamide cystitis-Identification of acrolein as the causative agent. **Biochemical Pharmacology**, **28**: 2045, 1979.
- CUNHA, F. Q., TAMASSHIRO, W. M. S. C., FIGARI, I. & PALLADINO JR, M. Efeito da interleucina 8 e do fator de necrose tumoral sobre a migração de neutrófilos. Em: **VI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos. Legis Summa. Ribeirão Preto, 339, 1991.
- DINARELLO, C. A. Biology of interleukin-1. **FASEB J.**, **2**: 108, 1988.
- DINARELLO, C. A. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor in systemic responses to infection and inflammation. Em: **Basis Principles and Clinical Correlates**, 2nd. Edition (J.I. Gallin, I. M. Goldstein & R. Snyderman. Eds.), Raven Press, 211, 1992.
- DINARELLO, C.A. & WOLF, S.M. Mechanisms of disease: the role of interleukin in disease. **N. Eng. J. Med.**, **328**:106, 1993.
- DOHERTY, G.M., JENSEN, J.C., ALEXANDER, H.R., BURESH, C.M. & J.A. NORTON. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. **Surgery(St. Louis)**, **110**: 192, 1991.
- DROLLER M.J., SARAL R. & SANTOS G. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Urology**, **20**: 256, 1982.
- DURUM, S. K., SCHMIDT, J. A., & OPPENHEIM, J. Interleukin 1: an immunological perspective. **Annu. Rev. Immunol**, **3**: 263, 1985.
- DURUM, S. K. & OPPENHEIM, J. J. Macrophage-derived mediators: IL-1, TNF, IL-6, IFN and related cytokines. Em: Paul, W. E. (editor). **Fundamental Immunology**, Raven Press, 639, 1989.

- DUSTIN, M.L., SPRINGER, T.A. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature*, **341**: 619, 1989.
- EDWARDS, M.J., ABNEY, D.L., MILLER, F.N. Pentoxifylline inhibits interleukin-2-induced leukocyte-endothelial adherence and reduces systemic toxicity. *Surgery*, **110**: 199, 1991.
- ELIAS, A.D., EDER, J.P., SHEA, T. et alii. High dose ifosfamide with mesna uroprotection: a phase I study. *Journal of Clinical Oncology*, **8**: 170, 1990.
- ETZIONI, A., et alii. Brief Report: Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N. Engl. J. Med.*, **327**: 1789, 1992.
- FERNANDEZ, H. N., HENSON, P. M., OTANI, A. and HUGLI, T. E. Chemotactic response to C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis *in vitro* and under simulated *in vivo* conditions. *J. Immunol.*, **120**: 109, 1978.
- FERREIRA, S.H., DUARTE, I.D. & LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.* **201**: 121, 1991.
- FERRERI, N.R., SARR, T., ASKENASE, P.W. & RUDDLE, N.H. Molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin production in T cells. Inhibition by prostaglandin E₂. *F Biol Chem*, **267**: 9443, 1992.
- FIELDS, K.R., ELFENBEIN, G.J., LAZARUS H.M. et alii. Maximum-tolerated doses of ifosfamide, carboplatin, and etoposide given over 6 days followed by autologous stem-cell rescue: Toxicity profile. *J. Clin Oncol*, **13**: 323, 1995.
- FIEREN, M.W., VAN DEN BEMD, G.J., BEN-EFRAIM, S. & BONTA, I.L. Prostaglandin E₂ inhibits the release of tumor necrosis factor-alpha, rather than interleukin 1 beta, from human macrophages. *Immunol Lett.* **31**: 85, 1992.

- FINCHAM, N. J., CAMP, R. D. R., GEARING, A. J. H. et alii. Neutrophil chemoattractant and IL-1 like activity in samples from psoriatic skin lesions. *J. Immunol.*, **140**: 4294, 1988.
- FISHER, R. A. **Statistical Methods for Research Workers**, Ed Hafner Publishing Co., 10a ed., 1948.
- FLORES, E. A., B. R. BISTRAN, J. J. POMPOSELLI, C. A. DINARELLO, G. L. BLACKBURN, AND N. W. ISTFAN. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. *J. Clin. Invest.* **83**: 1614, 1989.
- FOAD, B. S. I. & HESS, E. V. Urinary bladder complications with cyclophosphamide therapy. *Arch. Intern. Med.* **136**: 616, 1976.
- FONG, Y. & LOWRY S.F. Tumor necrosis factor in pathophysiology of infection and sepsis. *Clinical Immunology and Immunopathology*, **55**: 157, 1990.
- FORTES, Z.B., OLIVEIRA, M.A., SCIVOLETTO, R. et alii. Nitric oxide release may be involved in microvasculatory response to aceylcoline. *Eur. J. Pharmacol.* **182**: 143, 1990.
- FRAISER, LH., KANEKAL, S. & KEHRER, JP. Cyclophosphamide toxicity. Characterising and avoiding the problem. *Drugs.*, **42**: 781, 1991.
- FRAISER, L. & KEHRER, J.P. Murine strain differences in metabolism and bladder toxicity of cyclophosphamide. *Toxicology*, **75**: 257, 1992.
- FUKUSHIMA, M. D.; ARAI, M.; COHEN, S. M.; JACOBS, J. B.; FRIEDEL, G. H.: Scanning electron microscopy of cyclophosphamide-induced hyperplasia of the rat urinary bladder. *Lab. Invest.* **44**: 89, 1981.
- FURCHGOTT, R.F., & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**: 373, 1980.

- GALLIN, J.I. (ed.) Disorders of phagocytic cells. Em: **Inflammation: Basic Principles and clinical correlates**, 2nd ed. New York, Raven Press, 859, 1992.
- GARCIA-LEME J. & WILHEM D.L. The effects of adrenalectomy and corticosterone on vascular permeability responses in the skin of the rat. **British Journal of Pathology**, **56**: 402, 1975.
- GIBSON, A., MIRZAZADEH, S., HOBBS, A.J. & MOORE, P.K. L-N^G-monomethyl arginine and L-N^G-nitro arginine inhibit non adrenergic, non-cholinergic relaxation of the mouse anococcygeus. **Br. J. Pharmacol.**, **99**: 602, 1990.
- GOODMAN, L.S., WINTROBE, M.M., DAMESHEK, W. et alii. Nitrogen mustard therapy: use of methylbis (B-chlorethyl) amino hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. **J. A. M. A.**, **132**: 126, 1946.
- GOLDIN, A. Ifosfamide in experimental systems. **Seminars in Oncology**, **9**: 14, 1982.
- GOREN, M.P. Determination of urinary 2-and 3-dechloroethylated metabolites of ifosfamide by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, **570**: 351, 1991.
- GOULDIE, J., & BAUMANN, H. Cytokines and acute phase protein expression. Em Kimball, E.S. (ed.): **Cytokines in inflammation**. Boca Raton, FL, CRC Press, 275, 1992.
- GRAY, KJ., ENGELMANN, UH., JOHNSON, EH. & FISHMAN, IJ. Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (cytoxan) therapy. **The journal of Urology**. **136**: 497, 1986.
- GRINBERG-FUNES, DJ., SHELDON, C. & WEISS, M. The use of prostaglandin F2 alpha for the prophylaxis of cyclophosphamide induced cystitis in rats. **The Journal of Urology**. **144**: 1500, 1990.
- HAN, J., G. HUEZ, & B. BEUTLER. Interactive effects of the tumor necrosis factor promoter and 3'-untranslated region. **J. Immunol.**, **146**: 1843, 1990.

- HAN, J., P. THOMPSON, & B. BEUTLER. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J. Exp. Med.*, **172**: 391, 1990.
- HAN, J., T. BROWN, & B. BLEUTER. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J. Exp. Med.*, **171**: 465, 1990.
- HASHMI, M., VAMVAKAS, S. and ANDERS, M. W. Bioactivation mechanism of S-(3-oxopropyl)-N-acetyl-L-cysteine, the mercapturic acid of acrolein. *Chem. Res. Toxicol.*, **5**: 360, 1992.
- HENSON, P.M., et al.: Phagocytosis. Em: Gallin, J.i., et alii. (eds.): **inflammation:Basic Principles and Clinical Correlates**, 2nd ed. New York, Raven Press, 511, 1992.
- HIBBS, J.B., TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z. et alii. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. Em Moncada, S. & Higgs, E.A. (eds.): **Nitric Oxide from L-Arginine: a Bioregulatory System**. Amsterdam: Elsevier, 189, 1990.
- HICKS, R. M. The permeability of rat transitional epithelium. Keratinization and the barrier to water. *J. Cell Biol.* **28**: 21, 1966.
- HINSHAW, L., OLSON, P. & KUO, G. Efficacy of post-treatment with anti-TNF monoclonal antibody in preventing the pathophysiology and lethality of sepsis in the baboon. *Circulatory Shock*, **27**: 362, 1989.
- HOST, H. and NISSEN-MELYER, R. A. A preliminary clinical study of cyclophosphamide. *Cancer chemother. Rep.* **9**: 47, 1960.
- HOYT, D. G. and LAZO, J. S. Early increases in pulmonary mRNA encoding procollagens and transforming growth factor- β in mice sensitive to cyclophosphamide-induced fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **249**: 38, 1989.

- IBRAHIM, A., ZAMBON, E., BOURHIS, J.H. et alii. High-dose chemotherapy with etoposide, cyclophosphamide and escalating dose of carboplatin followed by autologous bone marrow transplantation in cancer patients. **A pilot study. Eur J Cancer, 29: 1398, 1993.**
- KAIJUSER, GP., KORST, A., BEIJNEN, JH., BULT, A. & UNDERBERG, WJ. The analysis of ifosfamide and its metabolites (review). **Anticancer Res. 13: 1311, 1993.**
- KEVIN, J., TRACEY, M.D. & ANTHONY C. Tumor necrosis factor: A pleiotropic Cytokine and Therapeutic Target. **Anna Rev. Med. 45: 491, 1994.**
- KELVIN, D.J., et al.: Chemokines and serpentine. **J. Leukocyte Biol., 54: 605, 1993.**
- KISHIMOTO, T. The biology of interleukin 6. **Blood, 74: 1, 1989.**
- KLEBANOFF, S. J., VADAS, M. R. HARLAN, J. M. et alii. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. **J. Immunol. 136: 4220, 1986.**
- KLEBANOFF, S.J. Oxygen metabolites from phagocytes. Em: Gallin, J.L., et alii. (eds.): **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**, 2nd ed. New York, Raven Press, 541, 1992.
- KLEIN, O.H., WICKRAMANYAKE, P.D., CHRISTIAN, E. et alii. Therapeutic effects of single push or fractionated injections or continuous infusions of oxazaphosphorines (cyclophosphamide, ifosfamide, ASTA Z7557). **Cancer, 54: 1193, 1984.**
- KOLB, NS., HUNSAKER, LA. & VANDER-JAGT, DL. Aldose reductase-catalyzed reduction of acrolein: implications in cyclophosphamide toxicity. **Mol. Pharmacol., 45: 797, 1994.**
- KOZIK, F., & COCHRANE, C.G.: The contact activation system of plasma. Em: Gallin, J.I., et al. (eds.): **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**, 2nd ed. New York, Raven Press, 103, 1992.

- KUROWSKI, V., CERNY, T., KÜPFER, A. et alii. Metabolism and pharmacokinetics of oral and intravenous ifosfamide. *Journal of cancer Research and Clinical Oncology*, 117: 148, 1991.
- LARRICK, J.W. & KUNKEL, S.L. The role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in the immunoinflammatory response. *Pharmaceut. Res.*, 5:129, 1988.
- LEAF, A., & WEBER, P.C.: Cardiovascular effects of omega 3 fatty acids. *N. Engl. J. Med.*, 318: 549, 1988.
- LEESON, C. R. Histology, histochemistry and electron microscopy of the transitional epithelium of the rat urinary bladder in response to induced physiological changes. *Acta Anat.* 48: 297, 1962.
- LEHRER, R.J., et al. Defensins: Endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell*, 64: 229, 1991.
- LeMAY, L.G., VANDER, A.J., KLUGER, M.J. The effects of pentoxifyline on lipopolysaccharide (LPS) fever, plasma interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor (TNF) in the rat. *Cytokine*, 2: 300, 1990.
- LIMA, M.V.L., RIBEIRO, R.A. & SOUZA FILHO, M.V.P. Participação de PAF e de metabólitos do ácido aracdônico na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida. Em: **IX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos. Legis Summa. Caxambu, 238, 1994.
- LIND, M.J., MARGISON J.M., CERNY T. et alii. Comparative pharmacokinetics and alkylating activity of fractionated intravenous and oral ifosfamide in patients with bronchogenic carcinoma. *Cancer Research*, 49: 753, 1989.
- LINDSTEIN, T., C.H. JUNE, J.A. LEDBETTER, G. STELLA, & C.B. THOMPSON. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science (Wash. DC)*, 244: 339, 1989.
- LOEHER, P.J. Sr., LAUER, R., ROTH, B.J. et alii. Salvage therapy in recurrent germ cell cancer: Ifosfamide and cisplatin plus either vinblastine or etoposide. *Ann Intern Med*, 109: 540, 1988.

- LOWENSTEIN, C.J., & SNYDER, S. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*, 70: 705, 1992.
- MACKAY, C. R. & IMHOF, B. A. Cell adhesion in the immune system. *Immunology Today*, 14: 99, 1993.
- MAJNO, G., et alii. studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: A topographic study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11: 607, 1961.
- MAJNO, G., & PALADE, G.E. Studies on inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: An electron microscopic study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11: 571, 1961.
- MAJNO, G. The capillary then and now: An overview of capillary pathology. *Mod. Pathol.*, 5: 9, 1992.
- MARCINKIEWIEZ, J. *In vitro* cytokine release by activated murine peritoneal macrophages: role of prostaglandins in the differential regulation of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6. *Cytokine*, 3: 327, 1991.
- MAY, G.R., CROOCK, P., MOORE, P.K. & PAGE, C.P. The role of nitric oxide as an endogenous regulator of platelet and neutrophil activation within the pulmonary circulation of the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 102: 759, 1991.
- MAYADAS, T.N., et alii. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. *Cell*, 74: 541, 1993.
- McEVER, R.P. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4: 840, 1992.
- MILLAR, B.C., MILLAR J.L., CLUTTERBUCK, R. et alii. Studies on the toxicity of cyclophosphamide in combination with mesna and *in vivo*. *Cancer Treatment Reviews* 10: 63, 1983.
- MILLER, L.J., CHANDLER, SW. & IPPOLITI, CM. Treatment of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis with prostaglandins. *Ann. Pharmacother.*, 28: 590, 1994.

- MIZEL, S. B. The interleukins. *FASEB J.*, 3: 2379, 1989.
- MONCADA, S., PALMER, M. J., & HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43: 109, 1991.
- MONCADA, S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* 145: 201, 1992.
- MONCADA, S. La vía L-arginina: óxido nítrico. Em: *Óxido Nítrico endógeno y fármacos nitrovasodilatadores*. Universidad de Cantabria., 24, 1994.
- MONCRIEFF, M., FOTT, A. Fanconi syndrome after ifosfamide. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 23: 121, 1989.
- MULLER, W.A., et alii. PECAM-1 is required for a endothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.*, 178: 449, 1993.
- MUNSHI, N.C., LOEHRER, P.J., WILLIAMS, S.D. et alii. Comparison of N-acetylcysteine and mesna as uroprotectors with ifosfamide combination chemotherapy in refractory germ cell tumors. *Investigational New Drugs*, 10: 159, 1992.
- NOEL, P., S. NELSON, R. BOKULIC, G. BAGBY, H. LIPPTON, G. LIPSCOMB, and W. SUMMER. Pentoxifylline inhibits lipopolysaccharide-induced serum tumor necrosis factor and mortality. *Life Sci.* 47: 1023, 1990.
- NORPOTH, K. Studies on the metabolism of isophosphamide (NSC-109724) in man. *Cancer treatment Report*, 60: 437, 1976.
- OKA, Y., MURATA, A., NISHIJIMA, J. et alii. Inhibitory effect of pentoxifylline and prostaglandin. E1 on the release of neutrophil elastase from FMLP-stimulated neutrophils. *F Med Clin Exp Theor*, 22: 371, 1991.
- OKUSAWA, S., GELFAND, J. A., IKEJIMA, T., CONNOLLY, R. J. and DINARELLO, C. A. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J. Invest.* 81: 1162, 1988.

- OLD, L. J. Tumor necrosis factor (TNF). **Science**, 30: 630, 1985.
- PEPPEL, K., CRAWFORD, D. & BEUTLER, B. A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity. **Journal of Experimental medicine**, 174: 1483, 1991.
- PERSON, M.G., GUSTAFSSON, L.E., WIKLUND, N.P. et alii. Endogenous nitric oxide as a modulator of rabbit skeletal muscle microcirculation *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.** 100: 463, 1990.
- PHILIPS, F.S., STERNBERG S.S., CRONIN A.P. & VIDAL P.M. Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. **Cancer Research**, 21: 1577, 1961.
- POBER, J.S., & COTRAN, R.S. Overview: The role of endothelial cells in inflammation. **Transplantation.**, 50: 537, 1990.
- POHLMAN, T.H., STANNES, K.A., BEATTY, P. G., OCHS, H.D., HARLAN, J.M. An endothelial cell surface factor(s) induced *in vitro* by lypopolysaccharide, interleukin 1 and tumor necrosis factor- α increases neutrophil adherence by Cdw 18-dependent mechanism. **F Immunol**, 136: 4548, 1986.
- REES, D.D., SCHULZ, A., HODSON, H.F., PALMER, R.M.J. & MONCADA, S. Identification of some novel inhibitors of vascular nitric oxide synthase *in vivo* and *in vitro*. Em Moncada, S. & Higgs, E.A.(eds.): **Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System**. Amsterdam: Elsevier, 473, 1990.
- REMICK, D.G., KUNKEL, R.G., LARRICK, J.W., KUNKEL, S.L. Acute *in vivo* effects of human recombinant tumor necrosis factor. **Lab Invest**, 56: 583, 1987.
- RIBEIRO, R. A., FLORES, C. A. CUNHA, F. Q. & FERREIRA, F. H. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, 73: 472, 1991.

- ROSS, G.D. (ed.) Immunobiology of the complement System. San Diego, CA, **Academic Press**, 1986.
- SALTER, M., KNOWLES, R.G. & MONCADA, S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of calcium-dependent and calcium-independent nitric oxide synthase. **FESB Lett.** **291**: 145, 1991.
- SAMPAIO, E.P., A.L. MOREIRA, E.N. SARNO, A. M. MALTA, & G. KAPLAN. Prolonged treatment with recombinant interferon γ induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. **J. Exp. Med.**, **175**: 1729, 1992.
- SAMPAIO, E.P., SARNO E.N., GALILLY R. et alii. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor α production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.**, **173**: 699, 1991.
- SANTUCCI, L., FIORUCCI, S., GIANSAANTI, M. et alii. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. **Gut**, **35**: 909, 1994.
- SARIBAN, E., K. IMAMURA, R. LUELBERS, & D. KUFEL. Transcriptional and posttranscriptional regulation of necrosis factor gene expression in human monocytes. **J. Clin. Invest.**, **81**: 1506, 1988.
- SARNO, E.N., G.E. GRAU, L.M.M. VIEIRA, & A.C. NERY. Serum levels of TNF- α and IL-1 β during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol**, **84**: 103, 1991.
- SCHADE, U. F. Pentoxifylline increases survival in murine endotoxin shock and decreases formation of tumor necrosis factor. **Circ. Shock** **31**: 171, 1990.
- SCHEULEN, M.E., NIEDERLE, N., BREMER, K. et alii. Efficacy of ifosfamide in refractory malignant diseases and uroprotection by mesna: results of a clinical phase II study with 151 patients. **Cancer Treatment Reviews** ,**10**: 93, 1983.
- SCHRODER, J. M., MROWIETZ, U., MORITA, E. & CHRISTOPHERS, E. Purification and partial biochemical characterisation of a

- human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin-1 activity. *J. Immunol.*, **139**: 3474, 1987.
- SEHGAL, P. B., WALTHER, Z., & TAMM, I. Rapid enhancement of β 2-interferon/B-cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerols and the calcium ionophore A23187. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 3663, 1987.
- SEHGAL, P. B. Interleukin-6: Molecular pathophysiology. *The J. Invest. Dermatol.*, **94**(6): 2S, 1990.
- SEN, R., & D. BALTIMORE. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, **47**: 921, 1986.
- SERHAN, C.N. Lipoxin biosynthesis and impact on inflammatory and vascular events. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994.
- SERAFIN, W.E. & AUSTEN, K.F. Mediators of immediate hypersensitivity reactions. *N. Engl. J. Med.*, **317**: 31, 1987.
- SHAW, I.C. Mesna and oxazaphosphorine cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, **14**: 359, 1987.
- SHAW, G., & R. KAMEN. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF m-RNA mediates selective m-RNA degradation. *Cell*, **46**: 659, 1986.
- SHIRAKAWA, F., YAMASHITA, U., CHED, M., & MIZEL, S. B. Cyclic AMP- an intracellular second signal messenger for interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 8201, 1988.
- SJOLIN, J., H. STJERNSTROM, G. FRIMAN, J. LARSSON, and J. WAHREN. Total and net muscle protein breakdown in infection determined by amino acid effluxes. *Am. J. Physiol.* **285**(Endocrinol. Metab. 21): E856, 1990.
- SLADEK, N. E., SMITH, P. C., BRATT, J. E., LAW, J. F., BORCH, R. F. and COVENEY, J. R.: Influence of diuretics

on urinary general base catalytic activity and cyclophosphamide-induced bladder toxicity. **Cancer Treat. Rep.**, **66**: 1889, 1982.

SNEDDON, J.M. & VANE, J. Endothelial-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **85**: 2800, 1988.

SNYDERMAN, R., & UHUIG, R.J. Chemoattractant stimulus-response coupling. Em: Gallin, J.I., et al. (eds.): **inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**, 2nd ed. New York, Raven Press, 1992, pp. 421-441.

SPATAFORA, M., CHIAPPARA, G., D'AMICO, D., VOLPES, D. et alii. Effect of indomethacin on the kinetics of tumor necrosis factor alpha release and tumor necrosis factor alpha gene expression by human blood monocytes. **Pharmacol Res**, **23**: 247, 1991.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte circulation and leucocyte migration: The multistep paradigm. **Cell**, **76**: 301, 1994.

STAMBUCK, B.U. Science's 1992 "Molecule of the year": NO news!. **J. of the Brazilian Assoc. for the Advacem. of Sci**, **45**: 97, 1993.

STAMLER, J.S., JARAKI, O., OSBORNE, J. SIMON DI et alii. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. **Proc Natl Acad Sci USA**, **89**: 7674, 1992.

STILLWELL, T.J. & BENSON, R.C. Cyclophosphamide-Induced hemorrhagic cystitis-A review of 100 patients. **Cancer**, **61**: 451, 1988.

STOSSEL, T.P. On the crawling of animal cells. **Science**, **260**: 1045, 1993.

SUNG, S.S., & J.A. WALTERS. Increased cyclic AMP levels enhance IL-1 alpha IL-2 beta mRNA expression and protein production in human myelomonocytic cell lines and monocytes. **J. Clin. Invest.**, **88**: 1915, 1991.

- SZABÓ, C., WU, CC., MITCHELL, JA. et alii. Platelet-Activating Factor contributes to the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *Circulation Research*, **73**: 991, 1993.
- TAVARES-MURTA, B.M., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. Fator de necrose tumoral e interleucina 8 inibem o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório via liberação de óxido nítrico. Livro de resumos da **IX Reunião Anual da FESBE**, p LXVII, 1994.
- TAUB, D.D., & OPPENHEIM, J.J. Review of the chemokine. The Third International Meeting of Chemotactic Cytokines. *Cytokine*, **5**: 175, 1993.
- THEMANN, H., OBERDORF, E., BROCK, N. & POHL, J. Electron Microscopic Investigations of Cyclophosphamide-Induced Lesions of the Urinary Bladder of the Rat and Their Prevention by Mesna. *Urologia Internationalis*. **42**: 37, 1987.
- THORNTON, A. J., STRIETER, R. M., LINDLEY, I. et alii. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J. Immunol.*, **144**(7): 2609, 1990.
- TOLLEY, D. A.: The effect of N-acetyl cysteine on cyclophosphamide cystitis. *Br. J. Urol.*, **49**: 659, 1977.
- THIEL, M., BORDENHEUER, H., POCH, G. et alii. Pentoxifylline does not act via adenosine receptors in the inhibition of the superoxide anion production of human polymorphonuclear leukocyte. *Biochem Biophys Res Commun*, **180**: 53, 1991.
- TRACEY, K.J., BEUTLER, B., LOWREY, S.L., MERRYWEATHER, J., WOLPE, S., MILSARK, I.W. et alii. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, **234**: 470, 1986.
- TRACEY, K. J. Tumor necrosis factor (cachectin) in the biology of septic shock syndrome. *Circ. Shock*, **35**: 123, 1991.

- TRACEY, K. J. TNF and other cytokines in the metabolism of septic shock and cachexia. *Clin. Nutr.* 11: 1, 1992.
- TRACEY, K.J., & CERAMI, A.: Tumor necrosis factor, cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9: 317, 1993.
- TRACEY, K. J. & CERAMI, A. Tumor Necrosis Factor: A pleiotropic Cytokine and Therapeutic Target. *Anna. Rev. Med.*, 45: 491, 1994.
- TSUJIMOTO, M., YOKOTA, S., VILCEK, J. & WEISSMANN, G. Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137:1094, 1986.
- VENGE, P., et al. Neutrophils & eosinophils. Em Kelley, W.N., et al. (eds.): *Textbook of Rheumatology*, 4th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 269, 1993.
- WARD, P., & MULLIGAN, M.S. Leukocyte oxygen products and tissue damage. Em Jesaitis, A.J., and Dratz, E. A. (eds.): *Molecular Basis of Oxidation Damage by Leukocytes*. Boca Raton, FL, CRC Press, 139, 1992.
- WAGNER, T. Ifosfamide Clinical Pharmacokinetics. *Clin. Pharamacokinet.*, 26:399, 1994.
- WOOD, P. L. Differential Regulation of IL-1 α e TNF- α release from immortalized murine microglia. *Life Sciences*, 55: 661, 1994.
- WRIGHT, I. Complement receptors and the biology of phagocytosis. Em: Gallin, J.I., et al. (eds.): *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd ed. New York, Raven Press, 1992, pp. 730-754.
- YOSSHIMURA, T., MATSUSHIMA, K., TANAKA, S. et alii. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defence cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9233, 1987.

- ZABEL, P., M. M. SCHONHARTING, D. T. WOLTER, and U.F. SHADE. Oxpentifylline in endotoxaemia. **Lancet** 2: 1474, 1989.
- ZABEL, P., SCHONHARTING, M.M., SHADE, U.F., SCHLAAK, J.M. Effect of pentoxifylline in endotoxemia in human volunteers. **Prog Clin Biol Res**, 367: 207, 1991.
- ZAMLAUSKI-TUCKER, MJ., MORRIS, ME. & SPRINGATE, JE. Ifosfamide metabolite chloroacetaldehyde causes Fanconi syndrome in the perfused rat kidney. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 129: 170, 1994.
- ZAMPRONIO, A. R., SILVA, C. A. A., SOUZA, G. E. P. et alii. Atividade pirogênica da IL-8 em ratos. Em: **VI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumos. Legis Summa. Ribeirão Preto, 344, 1991.
- ZHANG, Y., LIN, J., & VILCEK, J. Synthesis of interleukin 6 (interferon- β 2/b-cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. **J. Biol. Chem.**, 263: 6117, 1988.
- ZIMMERMAN, G., et al. (eds.). **Inflammation: Basic Principles and Clinical**, 2nd ed. New York, Raven Press, 149, 1992.
- ZUCKERMAN, S.H., G.F. EVANS, & GUTHRIE. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms involved in the differential expression of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA. **Immunology.**, 73: 460, 1991.
- ZURIER, R.B. Prostaglandins, leukotrienes, and related compounds. Em: Kelley, W.N., et al. (eds.): **Textbook of Rheumatology**, 4th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 201, 1992.