



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

LÍVIA TALITA CAJASEIRAS MOURÃO

**ENVOLVIMENTO DE ÓXIDO NÍTRICO E DE CANAIS DE POTÁSSIO
DEPENDENTES DE ATP NO EFEITO PROTETOR DA AMIFOSTINA
SOBRE AS ALTERAÇÕES MOTORAS FUNCIONAIS E
INFLAMATÓRIAS DA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
IFOSFAMIDA**

FORTALEZA

2012

LÍVIA TALITA CAJASEIRAS MOURÃO

**ENVOLVIMENTO DE ÓXIDO NÍTRICO E DE CANAIS DE POTÁSSIO
DEPENDENTES DE ATP NO EFEITO PROTETOR DA AMIFOSTINA
SOBRE AS ALTERAÇÕES MOTORAS FUNCIONAIS E
INFLAMATÓRIAS DA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
IFOSFAMIDA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro.

FORTALEZA

2012

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

M89e Mourão, Livia Talita Cajaseiras.
Envolvimento de óxido nítrico e de canais de potássio dependentes de ATP no efeito protetor da amifostina sobre as alterações motoras funcionais e inflamatórias da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida/ Livia Talita Cajaseiras Mourão.– 2012.
114 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.
Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.
Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro

1. Cistite. 2. Ifosfamida. 3. Amifostina. I. Título.

CDD 616.623

LÍVIA TALITA CAJASEIRAS MOURÃO

**ENVOLVIMENTO DE ÓXIDO NÍTRICO E DE CANAIS DE POTÁSSIO
DEPENDENTES DE ATP NO EFEITO PROTETOR DA AMIFOSTINA SOBRE AS
ALTERAÇÕES MOTORAS FUNCIONAIS E INFLAMATÓRIAS DA CISTITE
HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 12 de Dezembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

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

Prof. Dr. Alexandre Braga Liborio
Universidade de Fortaleza – Unifor

Aos meus pais, Mourão e Lúcia, por me darem a vida e me ensinarem a vivê-la com dignidade, doando-se inteiramente e renunciando aos seus sonhos para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus. Procuro entre as palavras, aquela que eu gostaria que seus corações ouvissem, pois não bastaria apenas um “obrigada”.

Aos meus irmãos e amigos, Victor e Paula, por estarmos sempre juntos no amor e na graça.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Ronaldo Albuquerque Ribeiro, grande exemplo na busca da excelência em tudo o que se faz, pela confiança, pelo grande apoio e por ser parte da revelação de um novo caminho;

Aos professores Pedro Jorge Caldas Magalhães e Armênio Aguiar dos Santos, por terem cedido espaço e equipamentos para realização dos experimentos e, acima de tudo, pela acolhida, orientação e carinho paternos que recebi desde o início;

Ao estudante de iniciação científica, Felipe Mateus Teixeira Bezerra, pela importante contribuição na execução dos experimentos e pela agradável convivência no laboratório;

Ao Professor Roberto César e à Pós-doutoranda Karoline Aragão por terem acompanhado de forma tão solícita o desenvolvimento deste trabalho; à Professora Gerlyanne, por ter disponibilizado sua atenção e conhecimento para análise das lâminas e aos demais professores do LAFICA, sempre dispostos a prestar sua contribuição no desenvolvimento da pesquisa e na formação dos alunos;

Aos queridíssimos amigos do LAFICA, LELC e LAFARMULI. Tive a felicidade de possuir três “casas” ao invés de apenas uma. Nosso convívio foi muito importante e inspirador;

Às amigas Ana Carla Carvalho, Ana Paula Macedo, Deysi Wong, Patrícia Magalhães e Teresinha Brito, sempre dispostas em auxiliar em várias etapas do desenvolvimento deste trabalho;

Aos funcionários do LAFICA, Vandinha, Carol e Karine, cuja dedicação ao laboratório foi e é imprescindível para a ordem do nosso ambiente de trabalho;

Ao funcionário do biotério, Haroldo Pinheiro, por ter cuidado da melhor forma possível dos animais de experimentação e por ter me auxiliado por inúmeras vezes no Laboratório Escola Prof. Luís Capelo;

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC e do IBMED, em especial, a vigilância noturna representada pelos senhores Rogério Amorim e Reginardo Franco, que me assistiram de modo especial nas madrugadas de trabalho;

Às secretárias da pós-graduação Márcia e Aura;

À capes e ao CNPQ pelo apoio financeiro;

*E, principalmente, a **Deus**, por ter colocado tantos amigos e pessoas competentes no meu caminho, pela família, pela saúde e pela força para prosseguir.*

“Pois aquilo que amamos determina aquilo que buscamos. E aquilo que buscamos determina aquilo que pensamos e fazemos. Aquilo que pensamos e fazemos determina quem somos e em quem nos tornaremos.”

Dieter F. Uchtdorf

RESUMO

A cistite hemorrágica (CH) é um evento inflamatório frequentemente associado ao uso das oxazafosforinas. Nós demonstramos que amifostina (AMF) pode prevenir o dano tecidual provocado pela ifosfamida (IFO). Sabendo-se que IFO também altera a função motora do trato urinário inferior, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de investigar se AMF protege os animais contra as alterações da função vesical provocadas por IFO, e se este efeito ocorre através de mecanismos dependentes do óxido nítrico (NO) e dos canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP). Camundongos Swiss machos (25-30g, n=8) receberam salina (CTR) ou IFO (400mg/kg, ip) para indução de CH. Outro grupo recebeu, 30min antes de IFO, AMF (50mg/kg, sc), aminoguanidina (AMG, 50 mg/kg, ip), ODQ (2 mg/kg, vo) ou glibenclamida (GLI, 10 mg/kg, ip). Outros grupos receberam, 30min antes de AMF, L-arginina (L-ARG, 600 mg/kg, ip), ODQ ou diazóxido (DIAZ, 2mg/kg, ip). Em outra seção, os grupos que receberam AMG foram pré-tratados com L-arginina e os que receberam GLI foram pré-tratados com diazóxido, ambos com intervalos de 30 min. O peso úmido vesical (PUV) e os parâmetros macroscópicos e histopatológicos foram analisados 12h após a injeção de IFO. Em experimentos *ex vivo*, preparações de músculo liso vesical foram mantidas em solução fisiológica aerada com 95% de O₂ – 5% CO₂, pH 7.4 e a 37°C para registro isométrico das contrações musculares a soluções despolarizantes de cloreto de potássio (KCl) e carbacol (CCh). Para o registro de pressão intravesical (PIV) por cistometrograma contínuo (CC), foi realizada uma laparotomia e um catéter de polietileno fixado na bexiga e exteriorizado pela região abdominal foi conectado a um sistema de infusão contínua de salina (0.04mL/min) e a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de sinais biológicos. Nos animais tratados com AMF o aumento PUV provocado por IFO foi inibido em 83%. L-ARG e DIAZ não preveniram tal efeito de IFO no PUV (1.1% e 11.4%, respectivamente). Os escores macro e microscópicos foram significativamente menores em AMF, comparados ao grupo IFO. L-ARG e DIAZ inibiram os escores de AMF. IFO diminuiu a contratilidade de tiras de bexiga ao CCh em relação ao grupo CTR (1.36 ± 0.24 Vs 0.18 ± 0.02 g força/mg de tecido seco; p<0.01). AMF preveniu a hipocontratilidade provocada por IFO ao estímulo com CCh (1.47 ± 0.16 g força/mg de tecido seco; p<0.01). L-ARG e DIAZ inibiram o efeito de AMF (0.6 ± 0.08 e 0.79 ± 0.12 g força/mg de tecido seco, respectivamente; p<0.01 em relação a AMF). Na análise por CC, AMF reverteu o aumento da frequência miccional (FM) provocada por IFO (18 Vs 5.6 micções/15 min, IFO e CTR, respectivamente; p<0.01. AMF – 6.5 micções/15 min; p<0.01 em relação a IFO). L-ARG e DIAZ reverteram as FMs de AMF (p<0,01) (L-ARG: 14.5 e DIAZ: 11.2 micções/15 min). Os traçados cistometrográficos de CTR e AMF mostraram ciclos miccionais regulares com contrações evidentes associadas ao esvaziamento da bexiga. Nas análises de CC de animais tratados com IFO, os traçados mostraram ciclos irregulares de micção e não foram observadas contrações evidentes associadas ao evento da micção. DIAZ também apresentou traçados com este padrão. O tratamento com ODQ não alterou o efeito sobre a disfunção vesical *in vitro* e *in vivo* promovida por IFO e nem sobre a proteção pela AMF. AMF inibe as alterações motoras vesicais promovidas por IFO através de processos múltiplos que provavelmente incluem o NO e KATPs, sem envolver, no entanto, a geração de GMPc.

Palavras-chave: Cistite. Ifosfamida. Amifostina.

ABSTRACT

Hemorrhagic cystitis (HC) is an inflammatory event often associated with the use of oxazafosforins. We have demonstrated that amifostine (AMF) may prevent tissue damage caused by ifosfamide (IFO). Considering that IFO also changes the motor function of the lower urinary tract, the present study aimed to investigate whether AMF protects animals against IFO-related bladder dysfunction, and if this effect occurs through anitric oxide (NO) and ATP-sensitive potassium channels (KATP) dependent mechanism. Male Swiss mice (25-30g, n = 8) were given saline or IFO (400mg/kg, ip) to induce HC. Another group received, 30min before IFO, AMF (50mg/kg, sc), aminoguanidine (AMG, 50 mg/kg, ip), ODQ (2 mg/kg, po) or glibenclamide (GLI, 10 mg/kg, ip). Other groups received 30min before AMF, L-arginine (L-ARG, 600 mg/kg, ip), ODQ or diazoxide (DIAZ, 2mg/kg ip). In another experimental setting, the groups that received AMG were pretreated with L-arginine and those receiving GLI were pretreated with diazoxide each drug administered at intervals of 30 min. Bladder wet weight (BWW) and macroscopic and histopathological parameters were analyzed 12h after IFO injection. *In vitro* assays, bladder smooth muscle preparations were kept in saline solution aerated with 95% O₂ - 5% CO₂, pH 7.4 and at 37 ° C for isometric muscle contractions record the depolarizing solutions of KCl and carbachol (CCh). For the record of intravesical pressure (IVP) by continuous cystometrogram (CC), laparotomy was performed and a polyethylene catheter attached to the bladder and exteriorized through the abdominal region was connected to a system of continuous infusion of saline (0.04mL/min) and a pressure transducer coupled to an acquisition system biological signals. In animals treated with AMF, BWW was reduced by 83% when compared with IFO-injected mice. L-ARG and DIAZ did not prevent IFO-induced BWW effect (1.1% and 11.4%, respectively). Macroscopic and microscopic criteria were significantly reduced in AMF injected mice versus IFO group. L-ARG and DIAZ failed to prevent such criteria in comparison to IFO group. IFO decreased bladder strips contractility response to CCh versus control group (1.36 ± 0.24 Vs 0.18 ± 0.02 g force / mg of dry tissue, $p < 0.01$). AMF prevented the IFO-related decrease in contractility response (1.47 ± 0.16 g force / mg of dry tissue, $p < 0.01$). L-ARG and DIAZ did not alter IFO effect bladder contractility (0.6 ± 0.08 and 0.79 ± 0.12 g force / mg dry tissue, respectively, $p < 0.01$ compared to saline control). In CC analysis, AMF reversed the increased voiding frequency (VF) caused by IFO (18 Vs 5.6 micturition/15 min, IFO and CTR, respectively, $p < 0.01$. AMF – 6.5 micturition/15min; $p < 0.01$ compared to IFO). The VFs in L-ARG and DIAZ (14.5 and 11.2 micturition/15min, respectively) were significantly different from AMF group, $p < 0.01$. Cystometry recordings of control and AMF groups showed regular micturition cycles with evident contractions associated with bladder emptying, which as markedly different from IFO-injected animals that presented an irregular trace concerning micturition cycles and no evident contractions associated with the urination event. DIAZ also showed similar patterns to that of IFO. Treatment with ODQ did not alter either the *in vitro* and *in vivo* effects on bladder dysfunction promoted by IFO or upon protection by AMF. AMF inhibited IFO-related functional alterations in bladders through multiple processes that probably include NO and KATPs without involving the generation of cGMP.

Key words: Cystitis. Ifosfamide. Amifostine. Bladder disfunction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – ***Estrutura química das oxazafosforinas.***

Figura 2 – ***Metabolismo da ifosfamida.***

Figura 3 – ***Estrutura química do mesna.***

Figura 4 – ***Interação entre mesna e acroleína.***

Figura 5 – ***Patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.***

Figura 6 – ***Estrutura química da amifostina.***

Figura 7 – ***Detalhe da bexiga de camundongo.***

Figura 8 – ***Detalhe da montagem da tira de bexiga para registro de contração “in vitro”.***

Figura 9 – ***Sistema para registros de contração em tecido isolado.***

Figura 10 – ***Detalhe de bexiga de camundongo antes e depois da cirurgia de implantação intravesical de catéter.***

Figura 11 – ***Passo a passo da cirurgia de implantação intravesical de catéter.***

Figura 12 – ***Sistema para análise de cistometrograma contínuo.***

Figura 13 – ***Parâmetros avaliados na cistometrografia.***

Figura 14 – ***Efeito da amifostina sobre o aumento do peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***

Figura 15 – ***Fotomicrografias representativas de bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida – análise histopatológica de paredes de bexiga em seção corada por H&E, 40 x : efeito do pré-tratamento com amifostina.***

Figura 16 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito do pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***

- Figura 17 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito do pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 18 – ***Efeito da L-arginina sobre a diminuição do peso úmido vesical provocada pela amifostina em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 19 – ***Fotomicrografias representativas de bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida – análise histopatológica de paredes de bexiga em seção corada por H&E, 40 x : efeito da L-arginina sobre a uroproteção com amifostina.***
- Figura 20 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito da L-arginina sobre o pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 21 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito da L-arginina sobre o pré-tratamento com aminoguanidina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 22 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito da L-arginina sobre o pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 23 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito da L-arginina sobre o pré-tratamento com aminoguanidina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 24 – ***Efeito do ODQ sobre o aumento do peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 25 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito do ODQ sobre a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e sobre o efeito do pré-tratamento com amifostina.***

- Figura 25 – ***Efeito do diazóxido sobre a diminuição do peso úmido vesical provocada pela amifostina em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 26 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito do ODQ sobre a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e sobre o efeito do pré-tratamento com amifostina.***
- Figura 27 - ***Efeito do diazóxido sobre a diminuição do peso úmido vesical provocada pela amifostina em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 28 – ***Fotomicrografias representativas de bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida – análise histopatológica de paredes de bexiga em seção corada por H&E, 40 x: efeito do diazóxido sobre a uroproteção com amifostina.***
- Figura 29 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito do diazóxido sobre o pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 30 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito do diazóxido sobre o pré-tratamento com glibenclamida de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 31 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito do diazóxido sobre o pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 32 – ***Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito do diazóxido sobre o pré-tratamento com glibenclamida de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.***
- Figura 33 – ***Traçados cistometrográficos.***

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – ***Composição da solução nutridora de Tyrode.***

Tabela 2 – ***Efeito da amifostina sobre as alterações macroscópicas e microscópicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida de acordo com os critérios de Gray.***

Tabela 3 – ***Efeito da L-arginina sobre as alterações macroscópicas e microscópicas de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e pré-tratados com amifostina de acordo com os critérios de Gray.***

Tabela 4 – ***Efeito do ODQ sobre as alterações macroscópicas de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida ou protegidos por amifostina de acordo com os critérios de Gray.***

Tabela 5 – ***Efeito do diazóxido sobre as alterações macroscópicas e microscópicas de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e pré-tratados com amifostina de acordo com os critérios de Gray.***

Tabela 6 – ***Parâmetros de cistrometrograma contínuo de camundongos anestesiados.***

LISTA DE ABREVIATURAS

‰: por cento

°C: grau centígrado

µL: microlitro

µm: micrometro

µM: micromolar

ALDH: aldeído desidrogenase

AMF: amifostina

AMG: aminoguanidina

ANOVA: Análise de Variância

ASCO: Sociedade Americana de Oncologia Clínica

ATP: adenosina trifosfato

CaCl₂: cloreto de cálcio

CCh: carbacol

CEPA: Comissão de Ética em Pesquisa Animal

CH: cistite hemorrágica

cm H₂O: centímetro de água

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX-2: ciclooxigenase-2

DIAZ: diazóxido

dimesna: ditioetano-sulfonato de sódio

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

EPM: erro padrão da média

FDA: Food and Drug Administration

g: grama

GLI: glibencamida

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GSH: glutationa

h: hora

HCl: ácido clorídrico

HE: hematoxilina-eosina

IFO: ifosfamida

IL-1: interleucina-1

IL-4: interleucina-4

IL-10: interleucina-10

IL-11: interleucina-11

IL-13: interleucina-13

IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1

IL-1 β : interleucina-1 beta

iNOS: óxido nítrico sintase induzida

i.p.: intraperitoneal

K⁺ATP: canais de potássio dependentes de ATP

KCl: cloreto de potássio

kg: quilograma

LAF: Fundação Lance Armstrong

LAFICA: Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer

LAFARMULI: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso

L-ARG: L-arginina

LELC: Laboratório Escola Prof. Luís Capelo

M: molar

mesna: 2-mercaptoetano-sulfonato de sódio

min: minuto

mg: miligrama

MgCl₂: cloreto de magnésio

MgSO₄: sulfato de magnésio

mL: mililitro

mmol: milimol

mM: milimolar

N: normal

n: número

NaCl: cloreto de sódio

NaHCO₃: bicarbonato de sódio

NaH₂PO₄: fosfato monossódico

NO: óxido nítrico

ODQ: 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3- α)quinoxalin-1-ona

PAF: fator de ativação plaquetária

PDE4: fosfodiesterase-4

PGE₂: prostaglandina E₂

PTX3: pentraxina 3

PUV: peso úmido vesical

s.c.: subcutâneo

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UFC: Universidade Federal do Ceará

v.o.: via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Oxazafosforinas	21
1.2 Cistite hemorrágica	25
1.3 Participação de mediadores inflamatórios na cistite hemorrágica induzida pelas oxazafosforinas	29
1.4 Cistite hemorrágica e as alterações da função vesical	32
1.5 Amifostina	34
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Animais	43
4.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais	43
4.3 Drogas e soluções	45
4.4 Grupos experimentais	47
4.5 Indução de Cistite Hemorrágica	48
4.6 Parâmetros Avaliados na Cistite Hemorrágica	48
4.6.1 Avaliação do peso úmido vesical	48
4.6.2 Análise macroscópica	49
4.6.3 Análise histopatológica	49

4.7 Avaliação dos parâmetros funcionais em tiras isoladas de bexigas (estudo <i>in vitro</i>)	50
4.8 Avaliação dos parâmetros funcionais em bexigas de camundongos anestesiados (análise por cistometrografia)	53
4.9 Análise estatística	56
5 RESULTADOS	57
5.1 Efeito da amifostina sobre as alterações inflamatórias e funcionais da Cistite Hemorrágica induzida pela ifosfamida	58
5.1.1 Avaliação das alterações inflamatórias	59
5.1.2 Avaliação das alterações funcionais	62
5.2 Papel do óxido nítrico na uroproteção da amifostina sobre as alterações inflamatórias e funcionais da cistite hemorrágica induzida pela ifosfamida	66
5.2.1 Avaliação das alterações inflamatórias	66
5.2.2. Avaliação das alterações funcionais	70
5.3 Participação do GMPc nas alterações inflamatórias e funcionais da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e sua correlação com a uroproteção da amifostina	75
5.3.1. Avaliação das alterações inflamatórias	75
5.3.2. Avaliação das alterações funcionais	77
5.4 Papel dos canais de potássio dependentes de ATP sobre as alterações inflamatórias e funcionais da cistite hemorrágica induzida pela ifosfamida e sua correlação com a uroproteção da amifostina	80
5.4.1 Avaliação das alterações inflamatórias	80
5.4.2. Avaliação das alterações funcionais	84
6 DISCUSSÃO	91

7 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	102

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, o número de agentes antineoplásicos cresceu exponencialmente contribuindo para o aumento da sobrevivência de pacientes com câncer. No entanto, os regimes de quimioterapia e radioterapia ainda produzem uma série de efeitos colaterais como náuseas, vômitos, infecções, neutropenia, mucosite, cistite hemorrágica, entre outros. Efeitos que, além de afetar negativamente a qualidade de vida dos pacientes, representam prejuízos à eficácia terapêutica por limitarem, por muitas vezes, a dose e a duração do tratamento.

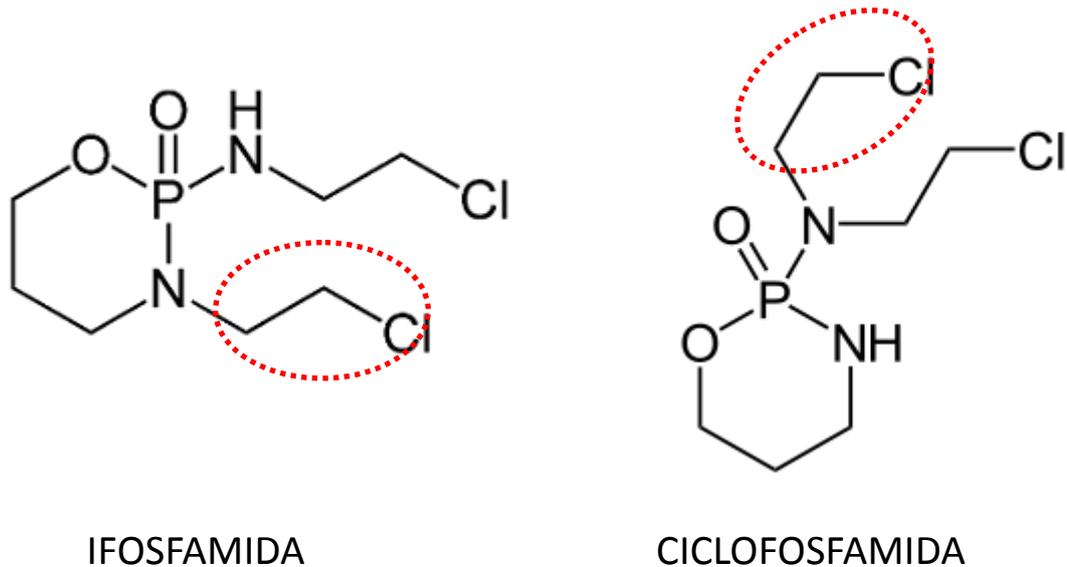
Os efeitos adversos dos antineoplásicos levaram ao desenvolvimento de agentes específicos concebidos para melhorar ou eliminar a toxicidade associada à quimioterapia e à radioterapia. O agente protetor ideal, além de ser desprovido de potencial tóxico, deve ser de fácil administração e capaz de prevenir os efeitos não letais como a alopecia, as morbidades irreversíveis como a neurotoxicidade, assim como os efeitos potencialmente fatais como cardiomiopatia grave, sem afetar negativamente a eficácia antitumoral durante o tratamento (HENSLEY *et al.*, 1999).

1.1 Oxazafosforinas

Ifosfamida e ciclofosfamida são os principais agentes antineoplásicos alquilantes do grupo das oxazafosforinas. São pró-drogas que precisam sofrer ativação no fígado para exercerem sua atividade citotóxica (BRADE; HERDRICH; VARINI, 1985). Quimicamente estes compostos são isômeros de fórmula $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$, que diferem entre si apenas pela posição de um grupo cloroetil (Figura 1). Isto implica em diferentes propriedades físico-químicas como, por exemplo, a solubilidade - a ifosfamida é mais hidrossolúvel que a ciclofosfamida, além de conferir diferenças nas propriedades farmacológicas e principalmente toxicológicas desses compostos. Na ifosfamida, a maior exposição do grupo cloroetil é responsável por uma menor afinidade desta droga pelas enzimas hepáticas. Isto implica em menor ativação e, conseqüentemente, doses maiores de ifosfamida são necessárias para que toxicidades equivalentes de ifosfamida e ciclofosfamida sejam atingidas (HIGGS; NAGY; EINHARN, 1989). Além disso, a

oxidação deste grupamento cloroetil na ifosfamida implica na formação de maiores quantidade de cloroacetaldeído, provavelmente o metabólito responsável pelos efeitos de nefrotoxicidade e neurotoxicidade associadas ao uso desta droga (PRATT *et al.*, 1991).

Figura 1 – **Estrutura química das oxazafosforinas.**

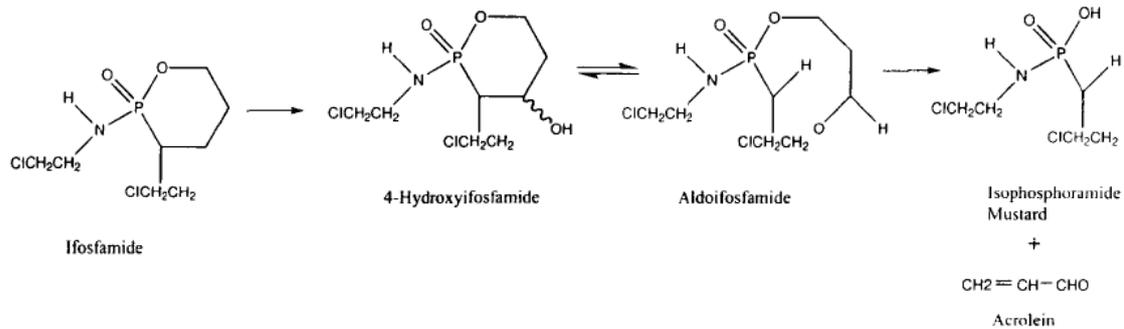


Apesar das diferenças estruturais, as vias metabólicas da ifosfamida e da ciclofosfamida apresentam etapas em comum, de modo que ambas sofrem biotransformação para então exercerem suas atividades citotóxicas, e seus principais metabólitos formados consistem na mostarda de fosforamida, como agente alquilante citotóxico, e a acroleína, como subproduto tóxico responsável pelo dano urotelial (HILL *et al.*, 1973).

Durante seu metabolismo, inicialmente a ifosfamida sofre hidroxilação no átomo de carbono-4 pelo sistema de oxidases de função mista do citocromo P-450. Um via metabólica do composto hidroxilado, a 4-hidroxi-ifosfamida, consiste na abertura espontânea do anel oxazafosforínico com a liberação da unidade de acroleína e a formação da mostarda de fosforamida (Figura 2). Visto que a mostarda de fosforamida exerce pouca toxicidade *in vitro* quando comparada a concentrações equimolares de 4-hidroxi-ifosfamida, concluiu-se que esta consiste no carreador

molecular que atravessa da membrana celular (HILGARD, 1987; KAIJSER *et al.*, 1992; KAIJSER *et al.*, 1997).

Figura 2 – **Metabolismo da ifosfamida.** (Fonte: KAIJSER *et al.*, 1997)



Os autores postulam que a especificidade citotóxica das oxazafosforinas é baseada na liberação dos agentes alquilantes por enzimas do tipo 3',5'-exonucleases. As mostardas de fosforamidas, por sua vez, provocam a inibição de uma porção da enzima DNA polimerase e a alquilação específica do DNA (VOELCKER *et al.*, 1984; BIELICKI; VOELCKER; HOHORST, 1984; HOHORST *et al.*, 1986). Em síntese, os agentes alquilantes formados são capazes de estabelecer ligações covalentes com as bases nitrogenadas do DNA, promovendo a sua ruptura através da quebra da ligação cruzada da fita dupla que compõe esta molécula (HASKELL, 1990).

A ifosfamida foi sintetizada em 1965 na Alemanha pelos laboratórios de pesquisa da Asta e foi incluído em ensaios clínicos no início dos anos 70 (HIGGS; NAGY; EINHARN, 1989). Apesar da ciclofosfamida ser mais comum na prática oncológica, estudos demonstram a eficácia da ifosfamida geralmente como um componente em regimes de combinação em uma variedade de tipos de cânceres como sarcomas de tecido frouxo, tumores de células germinativas, linfomas, câncer de pulmão de não pequenas células, tumores sólidos pediátricos entre outros (BROCK *et al.*, 1988; BRADE; HERDRICH; VARINI, 1985; DECHANT *et al.*, 1991; LOEHRER *et al.*, 1990). Muitas vezes a ifosfamida é utilizada com sucesso no tratamento de pacientes com tumores resistentes a ciclofosfamida. Além de possuir

um largo espectro de atividade antineoplásica, a ifosfamida não proporciona resistência tumoral acentuada e provoca baixa mielossupressão quando comparada a outros agentes citotóxicos (HIGGS; NAGY; EINHARN, 1989; DECHANT *et al.*, 1991).

A ifosfamida também é utilizada no tratamento de doenças inflamatórias como o Lúpus Eritematoso Sistêmico ou Esclerose Sistêmica e tem uma utilização importante como agente imunossupressor nos regime de condicionamento de pacientes submetidos a transplantes de medula óssea (FERRARA *et al.*, 1999).

As oxazafosforinas apresentam uma série de efeitos adversos nos pacientes. Alopecia, náuseas, vômitos, mielossupressão, anemia e complicações pulmonares foram reportados após o tratamento com a ciclofosfamida (RODIN; HAGGARD; TRAVIS, 1970; PATEL *et al.*, 1976; BURKE *et al.*, 1982; COOPER; WHITW; MATTHAY, 1986). O efeito urotóxico, também associado ao uso desta droga, varia desde sensação transitória de esvaziamento vesical, frequência e urgência urinária, disúria, desconforto suprapúbico e cistite hemorrágica (BENNET, 1974; SHROM *et al.*, 1976). Fibrose, necrose, contratura da bexiga e refluxo vesicouretral também foram reportados (JOHNSON *et al.*, 1971; RENERT; BERDON; BAKER, 1973). Além disso, alguns estudos demonstraram a incidência de câncer secundário de bexiga e de outras regiões do trato urinário em pacientes que desenvolveram cistite hemorrágica (STILLWELL; BENSON, 1988; FRAISER; KANEKAL; KEHRER, 1991).

Quanto ao uso da ifosfamida, a literatura mostra que diversos efeitos colaterais também podem estar associados, dentre eles, encefalopatia grave, mielossupressão, neurotoxicidade e insuficiência cardíaca, esta em proporção inferior (KLASTERSKY, 2003). Alguns casos de pancreatite foram reportados (IZRAELI *et al.*, 1994; GERSON *et al.*, 1997; HUNG *et al.*, 2007). Outro efeito importante associado ao uso da ifosfamida consiste na toxicidade renal, a Síndrome de Fanconi. Este efeito não ocorre com a utilização de ciclofosfamida por ser decorrente da formação do cloroacetaldeído, metabólito formado em maior quantidade após o uso da ifosfamida, e que possui a propriedade de depletar os estoques intracelulares de glutathione, provocando danos celulares. A Síndrome de Fanconi é caracterizada pela disfunção geral das células dos túbulos proximais dos rins e pela excreção excessiva de glicose, aminoácidos, fosfato, bicarbonato entre outros minerais. Insuficiência progressiva e raquitismo são sequelas desta doença (ZAKI; SPRINGATE; TAUB, 2003).

A cistite hemorrágica também é um efeito adverso associado à terapia com ifosfamida. As bexigas dos pacientes manifestam irritação e eventos hemorrágicos que variam desde hematúria macroscópica até o quadro de hemorragia vesical grave (BRADE; HERDRICH; VARINI, 1985; ZALUPSKI; BAYER, 1988).

Apesar de todos os efeitos associados ao uso das oxazafosforinas, sua vantagem frente a outros agentes alquilantes consiste na propriedade de exercer menos efeitos tóxicos como a mucosite, a mielotoxicidade e efeitos sobre as células-tronco. Isto ocorre devido à grande expressão da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) nas células progenitoras hematopoiéticas, megacariócitos e células-tronco do epitélio gastrintestinal. A ALDH inativa a aldoifosfamida convertendo-a em carboxifosfamida, promovendo a resistência tecidual à atividade citotóxica da droga (HILTON, 1984).

1.2 Cistite hemorrágica

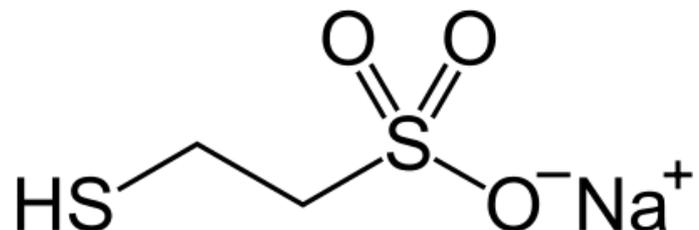
A cistite hemorrágica (CH) é considerada a forma mais grave do espectro de injúrias vesicais provocadas pelos agentes quimioterápicos. É um conjunto de eventos inflamatórios causados pela acroleína, um metabólito tóxico que é excretado pela urina provocando a formação de edema e a ulceração da mucosa associados à hemorragia. Estas alterações podem ser observadas 24h horas após dose única da oxazafosforina (COX, 1979). Clinicamente esta patologia pode ser caracterizada por incidência de hematúria dolorosa com cultura de urina negativa para bactérias ou fungos e sem qualquer outra explicação como cateterização, cálculos urinários ou neoplasias na bexiga (HASSAN *et al.*, 2007). É fato que os pacientes com CH apresentam diversos sintomas no trato urinário inferior incluindo dor suprapúbica, disúria, frequência e urgência urinária, noctúria e hemorragia (STILLWELL *et al.*, 1988).

A incidência da CH é variável nos pacientes submetidos à terapia com oxazafosforinas e depende da forma que o tratamento é realizado. Em estudos realizados em pacientes com câncer de ovário sem a proteção da bexiga, a incidência de CH foi de 18% entre pacientes que receberam ifosfamida e de 6% em pacientes que receberam ciclofosfamida (TEUFEL *et al.*, 1976). Em outros estudos,

foi reportada a incidência de CH em 18 a 40% de pacientes tratados com ciclofosfamida sem regime profilático de proteção (VAN DYK *et al.*, 1972; CREAVEN *et al.*, 1976; UTRACKA-HUTKA *et al.*, 1980), atingindo mais de 70% dos pacientes submetidos a regimes de condicionamento para transplante de medula óssea (WATSON *et al.*, 1973). Entre aqueles pacientes que desenvolveram hemorragia vesical grave, foi reportado um nível de mortalidade entre 2 e 4% (PHILLIPS *et al.*, 1961; WATSON *et al.*, 1973).

Ao longo da evolução, as células humanas desenvolveram mecanismos bioquímicos de proteção contra a toxicidade de substâncias químicas reativas como a acroleína. Um destes mecanismos envolve um composto tiol, a glutathiona. No entanto, os níveis desta substância são muito reduzidos na bexiga (SIDAU; SHAW, 1984) e isto permite que a acroleína permaneça disponível para exercer seus efeitos sobre as células epiteliais deste órgão (SHAW; GRAHAM, 1987). A partir deste raciocínio bioquímico, Brock e colaboradores testaram diversos compostos com grupamentos tióis com o objetivo de selecionar substâncias capazes de proteger profilaticamente a bexiga do dano provocado pela quimioterapia com oxazafosforinas, onde o mesna (2-mercaptoetano-sulfonato de sódio) (Figura 3) foi definido como o agente mais eficaz na uroproteção dos pacientes com CH induzida pelas oxazafosforinas tornando-se, até os dias atuais, a substância mais utilizada com esta finalidade.

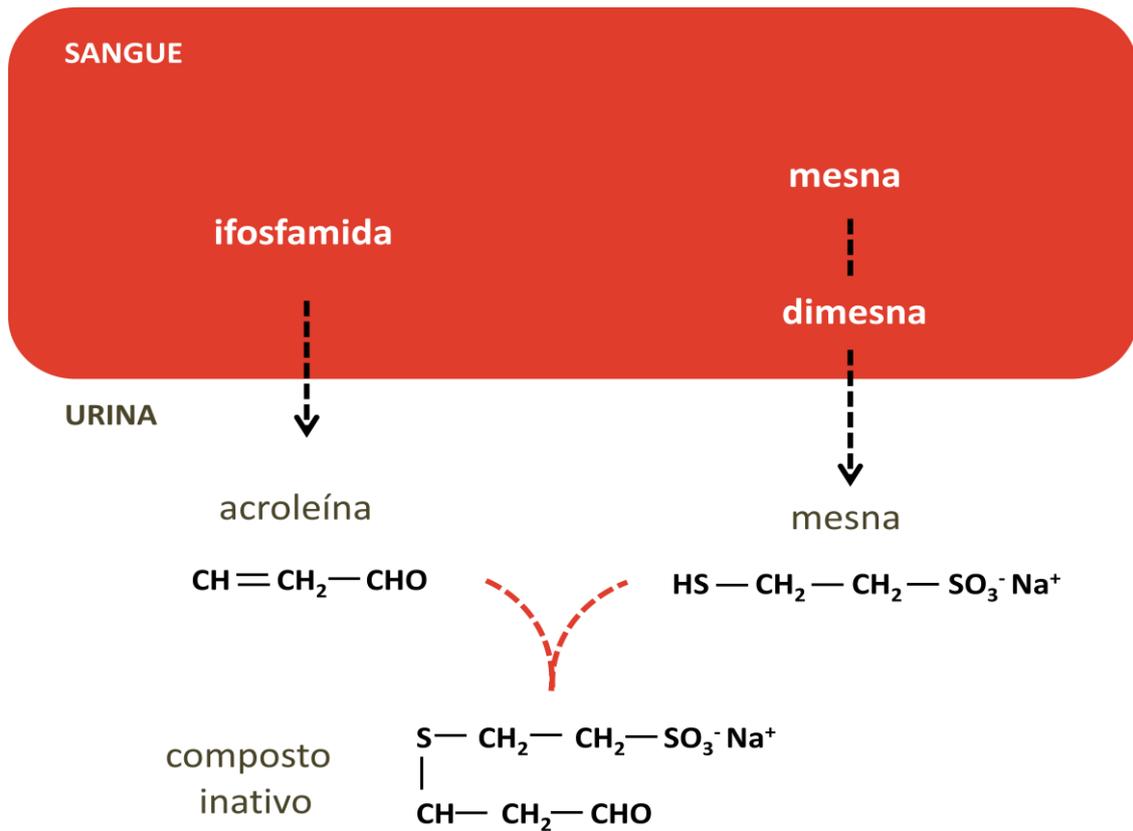
Figura 3 – **Estrutura química do mesna.**



A Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) definiu diretrizes para utilização de agentes protetores na quimioterapia e na radioterapia sugerindo que a dose diária de utilização do mesna deve corresponder a 60% da dose diária de ifosfamida, administrada em 3 *bolus*, 15 min antes, 4 e 8h após a administração de cada dose de ifosfamida (HENSLEY *et al.*, 1999). O fracionamento da dose diária do mesna se faz necessário devido à sua meia vida ser bastante inferior à das oxazafosforinas.

O mesna atua como um antagonista químico da acroleína. Após a administração oral ou intravenosa, é rapidamente oxidado a dimesna no plasma e apenas pequenas quantidades permanecem na circulação como composto fisiologicamente ativo. Mesna e dimesna são substâncias hidrofílicas, portanto, uma vez no espaço intravascular, são rapidamente eliminados pelos rins. Os grupamentos tióis livres reagem com a dupla ligação da molécula de acroleína formando um composto inativo (Figura 4). As concentrações de mesna na urina excedem bastante as concentrações plasmáticas, de modo que a detoxicação ocorre no sistema urinário. Tal restrição local impede que o mesna proteja contra toxicidade não urológica das oxazafosforinas, porém, garante que não haja interferência do mesna com sua atividade citotóxica (BROCK *et al.*, 1982; DECHANT *et al.*, 1991).

Figura 4 – **Interação entre mesna e acroleína.**



Fonte: Adaptado de TAKAMOTO; SAKURA; NAMERE, 2004.

Vários estudos mostram que a introdução de medidas profiláticas como a hiperhidratação, a irrigação vesical contínua e a inclusão do mesna nos regimes de quimioterapia diminuem as complicações da CH provocada pela ifosfamida e pela ciclofosfamida (SHEPHERD *et al.*, 1991; VOSE *et al.*, 1993; MEISENBERG *et al.*, 1994; HADJIBABAIE *et al.*, 2008).

De fato, mesna teve e tem um papel importante na diminuição da gravidade e da incidência da CH, uma vez que possibilita a utilização de doses maiores das oxazafosforinas e, conseqüentemente, o aumento da eficácia dos tratamentos antineoplásicos. No entanto, a CH ainda é uma complicação comum, podendo levar a óbito os pacientes que recebem altas doses de quimioterapia durante o transplante de medula óssea (KOC *et al.*, 2000; EL-ZIMAITY *et al.*, 2004; HADJIBABEI *et al.*, 2008). Além disso, Lima e colaboradores mostraram que o protocolo padrão preventivo não protege completamente a lesão da bexiga induzida pela

quimioterapia, mesmo na ausência dos sinais clínicos e dos sintomas comuns da CH. Mesmo com a profilaxia clássica com três doses de mesna, 66,7% dos pacientes apresentaram lesões cistoscópicas graves e 100% apresentaram danos uroteliais, tais como edema, exocitose e hemorragia (LIMA *et al.*, 2007).

1.3 Participação de mediadores inflamatórios na cistite hemorrágica induzida pelas oxazafosforinas

As referências de que o metabólito urinário das oxazafosforinas, a acroleína, era o principal desencadeador dos eventos inflamatórios da CH, a princípio, era o único achado reconhecido da patogênese deste efeito tóxico (COX, 1979; THEMAN *et al.*, 1987). Por essa razão, modelos experimentais de CH foram desenvolvidos para auxiliar o estudo para uma compreensão detalhada da fisiopatologia da CH, além do possível desenvolvimento de medidas preventivas e terapêuticas.

Desde o início da década de 90, pesquisadores do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da Universidade Federal do Ceará têm se dedicado ao estudo dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da CH induzida pelas oxazafosforinas. Os primeiros estudos demonstraram o envolvimento de prostaglandinas, leucotrienos e fator de ativação plaquetária (PAF) (LIMA *et al.*, 1994). Posteriormente, Gomes e colaboradores demonstraram que citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) desempenham um papel importante na CH induzida por ciclofosfamida, uma vez que a prévia neutralização do TNF- α ou da IL-1 endógena pelo soro anti TNF- α ou anti IL-1 provocou uma inibição significativa dos eventos inflamatórios da CH (GOMES *et al.*, 1995).

Em 1997, Souza-Filho *et al.* demonstraram que a hemorragia e os danos uroteliais da CH podiam ser bloqueados por inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e que este bloqueio foi revertido pela L-arginina e não pelo seu isômero inativo. Em complementação, foi demonstrado por imunohistoquímica que o epitélio de bexigas saudáveis expressou grandes quantidades da enzima NOS constitutiva. O tratamento com ciclofosfamida foi capaz de aumentar os níveis da iNOS nas células da lâmina própria, apesar de diminuir a marcação da NOS

constitutiva no urotélio pela descamação. Este estudo demonstrou a participação do óxido nítrico (NO) como provável mediador final dos danos uroteliais e da hemorragia da CH, e que o PAF modula a atividade da enzima NOS de produção de NO e, conseqüentemente, o processo inflamatório vesical (SOUZA-FILHO *et al.*, 1997). Ribeiro e colaboradores demonstraram posteriormente que a ação do TNF- α também é imprescindível para o aumento da expressão da iNOS (RIBEIRO *et al.*, 1998).

A importância da migração de neutrófilos no desenvolvimento da CH também foi investigada pelos pesquisadores do nosso laboratório. Neste sentido, foi demonstrado que lectinas de plantas com afinidade específica por resíduos de glicose-manose exercem atividade antiinflamatória na CH induzida por ciclofosfamida, uma vez que foram capazes de diminuir de forma significativa o dano urotelial através do provável bloqueio competitivo da ligação com as selectinas e conseqüente inibição da migração de leucócitos para o sítio inflamatório (ASSREUY *et al.*, 1999).

Morais e colaboradores propuseram alternativas terapêuticas para a prevenção da CH induzida por ciclofosfamida ou por ifosfamida. Eles demonstraram que a incorporação de dexametasona nas duas doses finais do mesna foi capaz de diminuir significativamente o edema vesical e as alterações macroscópicas e microscópicas provocadas pelas oxazafosforinas. No entanto, o mesmo não ocorreu quando as doses de mesna foram substituídas pela dexametasona. Esses achados sugerem que mesna é necessário para uroproteção inicial devido ao seu efeito neutralizador rápido enquanto que a dexametasona provavelmente atua na inibição dos mediadores do processo inflamatório que ainda estariam em formação (MORAIS *et al.*, 1999). Este estudo pré-clínico serviu como racional para outro estudo clínico que utilizou o mesmo raciocínio de que a adição de dexametasona às doses convencionais de mesna aumentaria o efeito protetor do esquema (LIMA, 2003).

Em 2002, Ribeiro *et al.* demonstraram os efeitos do NO após a ativação de TNF- α e IL-1 β nos eventos inflamatórios observados após a administração de ifosfamida. Posteriormente foi demonstrado o importante papel da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) e das prostaglandinas (PGEs), e que sua ativação também parece ser dependente da ativação pelo TNF- α e pela IL-1 β . Neste estudo, o inibidor da enzima COX-2, o etoricoxib, foi capaz de inibir a CH induzida pela

ifosfamida. Além disso, a utilização da talidomida, inibidora da síntese de TNF- α , e da pentoxifilina, inibidora da síntese de TNF- α e IL-1 β , diminuíram a expressão de COX-2, bem como as alterações macroscópicas e microscópicas da CH induzida por ifosfamida (MACEDO *et al.*, 2008a).

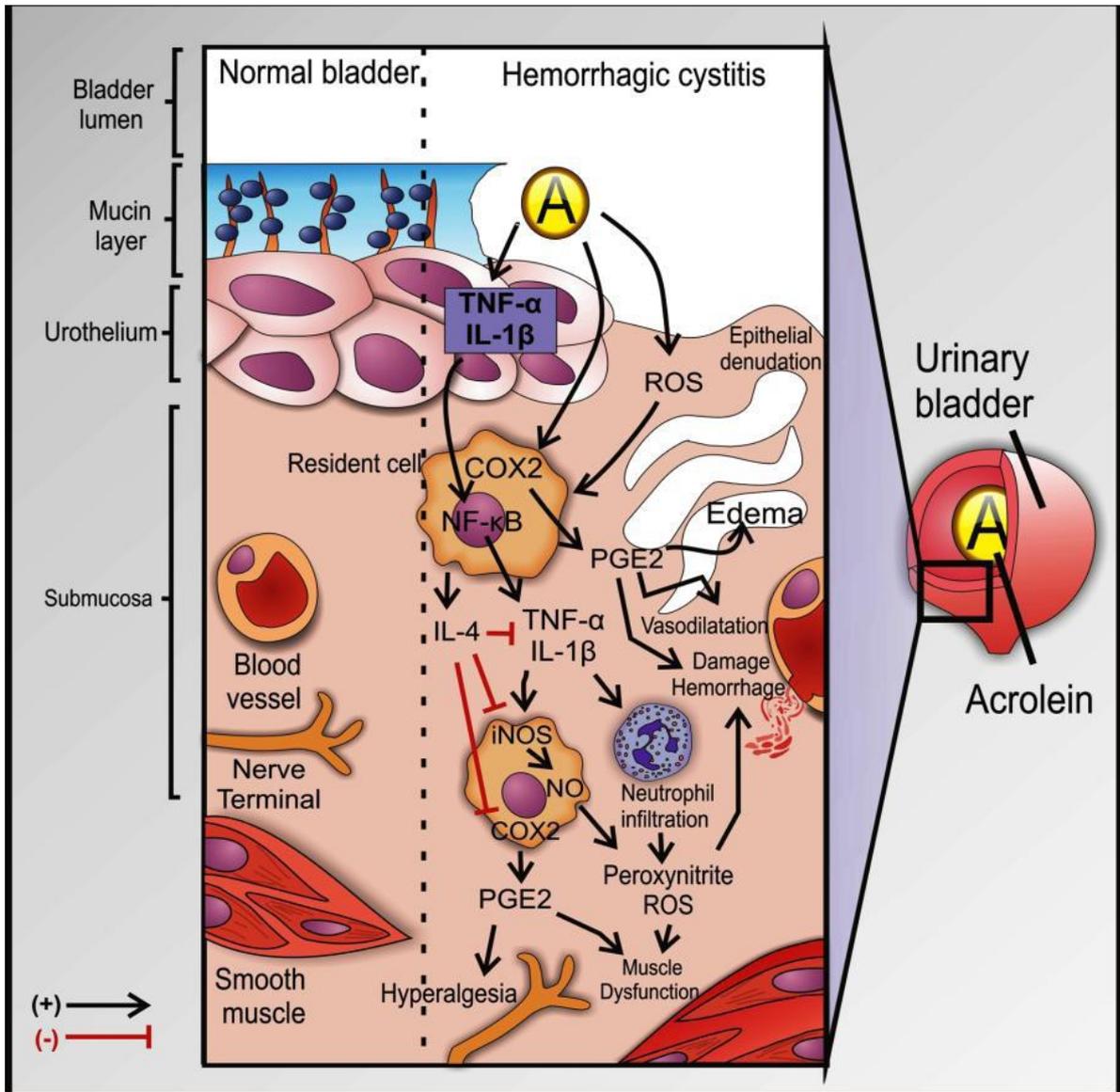
Gifoni e colaboradores demonstraram a participação da pentraxina 3 (PTX3) na CH induzida por ifosfamida e que sua produção está associada ao estímulo por TNF- α e, em menor escala, ao estímulo por IL-1 β . Além disso, PTX3 parece potencializar a expressão de iNOS (GIFONI, 2008).

Um estudo publicado por Korkmaz e colaboradores mostrou que o peroxinitrito pode contribuir para a patogênese da CH induzida pela ciclofosfamida (KORKMAZ *et al.*, 2005). Neste sentido foi relatado que o ebselen, uma substância conhecida por possuir potentes propriedades de reagir e eliminar o peroxinitrito (MASUMOTO *et al.*, 1996), protege significativamente contra o desenvolvimento da CH. Os resultados deste estudo sugerem que a eliminação de peroxinitrito e a inibição de iNOS possuem efeitos protetores semelhantes.

Nosso grupo de pesquisa mostrou o efeito protetor de citocinas antiinflamatórias na prevenção da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Interleucina-11 (IL-11) reduziu o aumento no peso úmido vesical causado por ifosfamida e também os achados macroscópicos e microscópicos de hemorragia e edema (MOTA *et al.*, 2007). Foi também demonstrado através de modelo de cistite hemorrágica experimental em camundongos, que interleucina-4 (IL-4) exógena preveniu parcialmente os eventos inflamatórios da CH induzida por ifosfamida, que IL-4 endógena produzida após a administração de ifosfamida é parte importante do processo de modulação do fenômeno inflamatório exercendo sua atividade antiinflamatória através da inibição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β e enzimas pró-inflamatórias como iNOS e COX-2 (MACEDO *et al.*, 2011). Além disso, dados ainda não publicados revelam que a interleucina-10 (IL-10), uma citocina com ação semelhante à da IL-4, também é parte da atenuação do processo inflamatório da cistite após a administração de ifosfamida.

No sentido de sintetizar o conhecimento a respeito da patogênese da CH induzida pelas oxazafosfoinas, Ribeiro e colaboradores propuseram recentemente um esquema das vias da sua patogênese, que pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – **Patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.**



Fonte: RIBEIRO *et al.*, 2012.

1.4 Cistite hemorrágica e as alterações da função vesical

Durante muito tempo, a única função atribuída ao urotélio era a de barreira contra o extravasamento de água e eletrólitos da urina para os tecidos vesicais. Posteriormente tornou-se evidente que o urotélio possuía várias outras funções. As células uroteliais expressam diferentes tipos de receptores e possuem a propriedade de liberar moléculas de sinalização que determinam a função do músculo detrusor

(ANDERSON, 2002; DE GROAT, 2004). Estudos mostram a existência de todos os tipos de receptores muscarínicos na bexiga de humanos e de ratos (ANDERSSON, 2002; HINATA *et al.*, 2004) e que a contração vesical depende principalmente da ativação do receptor muscarínico do tipo M₃. Os receptores do tipo M₂ parecem agir predominantemente antagonizando, de forma indireta, os efeitos de relaxamento do músculo detrusor e o esvaziamento vesical (GIGLIO; DELBRO; TOBIN, 2001).

Em casos de patologia vesical, ocorrem alterações na população dos receptores muscarínicos. Neste sentido, os estudos são geralmente voltados para a função e a inervação do músculo detrusor (ANDERSSON, 2004). No entanto, alguns estudos mostraram que o urotélio também pode ter um papel importante no desenvolvimento dos distúrbios vesicais. Por exemplo, a liberação de ATP por células uroteliais em cultura após estimulação de receptores muscarínicos é exacerbada em células de gatos com cistite intersticial (BIRDER; BARRICK; ROPPOLO, 2003). Outro trabalho mostra que a atividade de receptores purinérgicos, especificamente a sinalização de ATP extracelular, está aumentada nas células uroteliais de pacientes com cistite intersticial (SUN *et al.*, 2006).

A CH induzida por agentes alquilantes tem sido modelo de inflamação em vários estudos para a análise de função vesical. Dados mostram que a cistite induzida por ciclofosfamida ocorre através da ativação dos nervos aferentes sensíveis à capsaicina (MAGGI *et al.*, 1992). Este evento promove efeitos importantes na função motora do músculo detrusor, incluindo a hiperatividade, que pode ser caracterizada pela diminuição da capacidade de armazenamento vesical e pelo aumento da frequência de micção. A hiperatividade da bexiga após cistite experimental por ciclofosfamida tem sido bem estudada e a participação de prostaglandinas já foi descrita neste fenômeno (BULTITUDE; HILLS; SHUTTLEWORTH, 1976; ISHIZUKA; MATTIASSON; ANDERSSON, 1995). Chuang e colaboradores mostraram que a injeção de ciclofosfamida promoveu o aumento da expressão de COX-2 e PDE4 na bexiga e na medula espinhal, além de induzir inflamação e hiperatividade vesical. Estes efeitos foram suprimidos pelo tratamento com toxina botulínica (CHUANG *et al.*, 2009). Lecci e colaboradores realizaram avaliação farmacológica do papel das isoformas da enzima COX-2 na alteração do reflexo de micção na cistite experimental induzida por ciclofosfamida em ratos (LECCI *et al.*, 2000).

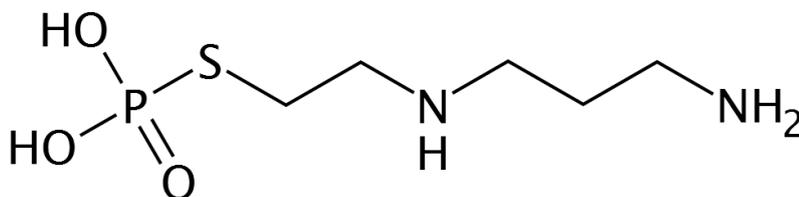
A enzima NOS participa de vários processos de hiperreflexia miccional associados à irritação aguda do trato urinário inferior por substâncias químicas (RICE, 1995; KAKIZAKI; DE GROAT, 1996) e à hiperalgesia vesical associada à inflamação colônica (COUTINHO; GEBHART, 1999). Já foi demonstrado o papel do NO, a nível neuronal, na iniciação da hiperreflexia associada à CH induzida em ratos por ciclofosfamida (LAGOS; BALLEJO, 2004).

Ainda são poucas as evidências que mostram a repercussão do tratamento com ifosfamida nas funções motoras do sistema urinário. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa publicou o estudo da função vesical da cistite induzida por ifosfamida, mostrando que ocorrem alterações importantes no processo de esvaziamento vesical em ratos anestesiados, assim como alterações no comportamento contrátil do músculo detrusor avaliado por metodologia *in vitro*. Além disso, estes processos provavelmente estão envolvidos com o aumento da expressão da enzima COX-2, uma vez que inibidores desta enzima foram capazes de reverter, pelo menos parcialmente, as alterações motoras vesicais provocadas pelo tratamento com ifosfamida (MACEDO *et al.*, 2010).

1.5 Amifostina

Apesar dos achados que revelam o mesna como sendo o principal uroprotetor da CH pelas oxazafosforinas, a literatura mostra que a sua utilização ainda mantém um residual de cistite em torno de 30%, fato que impulsionou a busca por novas alternativas terapêuticas. Neste contexto, novos citoprotetores têm sido investigados e, dentre os compostos tióis, a amifostina (S-2- (3-aminopropilamino) - ácido etilfósforotióico) tem um papel importante.

Figura 6 – **Estrutura química da amifostina.**



Há mais de 50 anos, percebeu-se que o aminoácido cisteína, contendo o grupamento tiol, apresentava propriedades protetoras contra radiação. Durante o período da corrida armamentista nuclear, este achado teve muita importância e levou à criação de um grande programa de pesquisa pelo Walter Reed Army Institute of Research dos Estados Unidos na tentativa de identificar e sintetizar substâncias que fossem capazes de proteger os soldados e os civis contra os danos da radiação nuclear. Mais de 4000 substâncias com propriedades radioprotetoras foram testadas, mas apenas o composto WR-2721, posteriormente conhecido como amifostina, recebeu posição de destaque (GRDINA; KATAOKA; MURLEY, 2000).

Apesar de nunca ter sido utilizada com esta finalidade, a amifostina tornou-se uma substância de grande utilidade na prática oncológica para proteger os tecidos normais contra os danos provocados pela quimioterapia e pela radioterapia. Durante os anos 80, estudos pré-clínicos já mostravam que a amifostina conferia proteção aos tecidos normais contra os danos não somente da irradiação, como também aqueles induzidos pelo tratamento com quimioterápicos.

A amifostina é uma substância hidrofílica incapaz de atravessar as membranas espontaneamente. Após administração intravenosa, é rapidamente desfosforilada convertendo-se no seu metabólito ativo WR-1065 que contém um grupamento tiol livre. Esta substância possui meia-vida plasmática bastante curta (SHAW *et al.*, 1988). A desfosforilação plasmática da amifostina pode ocorrer por hidrólise não enzimática ou através da ação da fosfatase alcalina ligada à membrana. Tal processo ocorre num pH ótimo entre 8 e 9 (NAKAMURA; SHAW; BROWN, 1987).

Atualmente sabe-se que a seletividade da amifostina pelos tecidos normais ocorre uma vez que a concentração desta enzima nas células normais é bem maior que nas células tumorais. Além disso, os tumores são tecidos hipovascularizados, isto implica em hipóxia tecidual, metabolismo anaeróbio e baixo pH. Deste modo, a proteção seletiva ocorre devido à captação do composto WR-1065 ser baixa nos tecidos tumorais. O resultado final é a concentração até 100 vezes maior do tiol livre em órgãos normais, como a medula óssea, rins, glândulas salivares e coração, em comparação com os tecidos tumorais. Por fim, uma vez que o tiol livre adentra uma célula normal, está disponível para se ligar e desintoxicar as espécies ativas de agentes alquilantes ou de radiação ionizante (CALABRO-JONES *et al.*, 1988;

McCULLOCH; SCHEFFLER; SCHEIN, 1991; HOSPERS; EISENHAUER; VRIES, 1999).

Ao contrário do mesna, para o qual os efeitos protetores são dirigidos a um órgão específico, a amifostina é avaliada como um agente citoprotetor de largo espectro. Fato este evidenciado a partir de estudos pré-clínicos que demonstraram a capacidade da amifostina de proteger seletivamente quase todos os tecidos normais, exceto o SNC e os tecidos neoplásicos, contra os efeitos citotóxicos de alguns agentes quimioterápicos e da radioterapia (COLEMAN; BUMP; KRAMER, 1988; SCHUCHTER; LUGINBUHL; MEROPOL, 1992).

Em 1996, o FDA aprovou a amifostina como agente citoprotetor na quimioterapia com cisplatina no tratamento do câncer de ovário. Posteriormente a aprovação foi estendida para tratar a xerostomia em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia, desde que estudos de fase 3 mostraram fortes evidências de que amifostina foi eficaz para este fim. Posteriormente, a ASCO publicou as diretrizes para uso de citoprotetores, recomendando o uso da amifostina para prevenir a nefrotoxicidade em pacientes tratados com cisplatina, reduzir a neutropenia provocada pelos agentes alquilantes e diminuir a incidência de xerostomia aguda e tardia em pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço (HENSLEY *et al.*, 1999).

Um dos mecanismos pelos quais a amifostina protege as células normais provavelmente inclui a sua capacidade de atuar como um “varredor” de radicais livres e isto protege os tecidos dos danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio que são aumentadas por agentes quimioterápicos, radiação ionizante e drogas eletrofílicas reativas como os agentes alquilantes. O segundo mecanismo é baseado na capacidade da amifostina de doar um átomo de hidrogênio promovendo diretamente um reparo químico nas regiões danificadas do DNA. O componente tiol também pode reagir prevenindo a sua ligação com as moléculas de agentes quimioterápicos. Além disso, a conversão intracelular do WR-1065 ao dissulfeto WR-33278 libera íons hidrogênio que podem auxiliar este mecanismo de reparação do DNA (VAN DER VIJGH; PETERS, 1994; SAVOYE *et al.*, 1997). A proteção conferida pela amifostina também tem sido atribuída à sua propriedade moduladora dos níveis de glutathione (UMA DEVI; PRASANNA, 1990). Por fim, é importante considerar que a amifostina se mostrou capaz de reduzir a morte celular por apoptose em linfócitos CD4+ e CD8+ através da inibição da ativação da caspase 3 (RUTELLA *et al.*, 2001).

A amifostina geralmente é bem tolerada pelos pacientes, mas está associada a efeitos secundários transitórios incluindo náusea, vômito, espirro, rubor ou sensação de calor, sonolência, gosto metálico durante a infusão, reações alérgicas e hipocalcemia (SCHUCHTER; LUGINBUHL; MEROPOL, 1992). Contudo, o maior efeito dose limitante consiste na hipotensão transitória e, mesmo com a utilização de pequenas doses, é necessário o monitoramento da pressão sanguínea do paciente. As interrupções no tratamento ocorrem em menos de 5% dos indivíduos tratados com amifostina (KOUVARIS; KOULOULIAS; VLAHOS, 2007). Estudos apontam que a substituição da via de administração intravenosa pela via subcutânea confere maior tolerância pelo paciente, mantendo níveis aceitáveis do metabólito WR-1065 (VAN DER VIJGH; KORST, 1996).

Os pesquisadores do LAFICA têm se dedicado ao estudo da citoproteção da amifostina em diversos modelos experimentais de inflamação. Dentre eles, os modelos de CH induzida por ifosfamida ou por injeção intravesical de acroleína. Em ambos a amifostina foi capaz de prevenir significativamente os clássicos eventos inflamatórios associados a esta patologia (BATISTA *et al.*, 2007). Outros trabalhos mostram que a lesão gástrica induzida por indometacina pode ser prevenida pelo tratamento com amifostina através de mecanismos que envolvem radicais sulfidrílicos não-protéicos e migração de neutrófilos (MOTA *et al.*, 2007). Amifostina também reduziu o dano na mucosa gástrica provocado por álcool etílico através da restauração dos níveis de GSH e estimulação dos neurônios aferentes sensitivos do estômago (JUNQUEIRA-JUNIOR *et al.*, 2011).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

O estudo funcional (*in vivo* e *in vitro*) de animais portadores de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida tem sido descrito na literatura. Alguns desses estudos demonstram o papel de certos mediadores a nível neuronal, destacando-se o óxido nítrico. É bem conhecido o papel evidente do NO na patogênese da cistite hemorrágica e a repercussão da inibição desse mediador sobre a melhora no quadro geral da cistite (SOUZA-FILHO *et al.*, 1997). Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou que, associado ao desenvolvimento de cistite hemorrágica, há uma disfunção urinária detectada por análise de cistometrograma contínuo em animais anestesiados e por metodologias *in vitro* através do estudo da contratilidade de tiras de bexiga, e que a enzima COX-2 tem um papel importante nas alterações funcionais observadas na CH induzida por ifosfamida em bexigas de ratos (MACEDO *et al.*, 2008). Paralelamente, outros dados reportam que a ciclofosfamida promove importantes efeitos sobre as funções motoras do músculo liso da bexiga urinária, incluindo hiperatividade *in vivo*, o que pode ser caracterizada pela diminuição da capacidade vesical e aumento da frequência da micção (BÜYÜKNACAR *et al.*, 2008). A hiperatividade do músculo detrusor após cistite experimental induzida pela ciclofosfamida tem sido bem estudada, bem como a participação das prostaglandinas produzidas pela enzima COX-2 sobre este fenômeno (CHUANG *et al.*, 2008, MACEDO *et al.*, 2010). Apesar dos avanços na caracterização da patogênese da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida e ifosfamida, e que a modulação farmacológica do processo inflamatório se mostra crucial no controle da sua patogênese, torna-se lícito prosseguir na investigação do envolvimento desses mediadores com a alteração da função vesical urinária. Desta forma, os resultados oferecem bases para o conhecimento da fisiopatologia da cistite hemorrágica e da disfunção vesical a ela associada, bem como fornecem subsídios para auxiliar na introdução de condutas terapêuticas complementares na prevenção dessa doença.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da amifostina sobre as alterações da função motora vesical na cistite hemorrágica experimental induzida pela ifosfamida, bem como verificar o envolvimento do óxido nítrico e dos canais de potássio dependentes de ATP neste efeito.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito uroprotetor da amifostina sobre a disfunção vesical induzida pela ifosfamida, utilizando tiras isoladas de bexiga;
- Avaliar o efeito uroprotetor da Amifostina sobre a disfunção vesical induzida pela ifosfamida, através da metodologia de cistometrograma contínuo;
- Avaliar o envolvimento do NO sobre o efeito uroprotetor da amifostina na função vesical “*in vitro*” e “*in vivo*”;
- Avaliar o envolvimento da geração de GMPc no efeito protetor da amifostina na função vesical “*in vitro*” e “*in vivo*”;
- Avaliar o envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP sobre o uroprotetor da amifostina na função vesical “*in vitro*” e “*in vivo*”.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss (*Mus domesticus*) machos, com massa corpórea entre 25 e 30 gramas, precedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC.

Durante o estudo, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, abrigados em gaiolas apropriadas, em número de seis ou oito, à temperatura de 24^oC, em ciclo circadiano claro/escuro de 12h e com acesso a água e alimento *ad libitum*.

Todos os experimentos realizados seguiram rigorosamente as normas estabelecidas pelos princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo 35/12).

4.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- Agitador magnético Thermolyne, mod. M37510/26 (BARNSTEAD);
- Agitador vortex;
- Agulhas descartáveis 0,7x30 e 13x4,5;
- Algodão (CREMER[®]);
- Amplificador Dataq (PM-1000, WCE, USA);
- Alicates para deslocamento cervical;
- Balança para pesagem de animais, mod. ID-1500 (FILIZOLA[®]);
- Balança analítica, mod. AL200 e Ohaus, mod. AS 260D (MARTE[®]);

- Base emborrachada para permanência do animal;
- Base metálica vasada com suporte para permanência do animal;
- Bastão de vidro;
- Béqueres (SIMAX);
- Bomba de infusão de líquidos;
- Bomba Radnoti;
- Catéter de polietileno (PE-50 - Clay Adams, USA);
- Cubas para banho de órgãos (5mL);
- Cânula para gavagem;
- Estufa;
- Estante para tubos Eppendorf;
- Estante para tubos Falcon;
- Geladeira e freezer (-20°C);
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Luvas e máscaras descartáveis;
- Máquina fotográfica digital SONY® modelo DSC-T99;
- Medidor de pH Hanna Instruments H18519N;
- Material cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, agulhas, etc.);
- Microagulhas;
- Micropipetas Gilson de 10, 20, 100, 200 e 1000 µL;
- Microscópio óptico binocular (EMBRAEME®);
- Microscópio óptico Leica acoplado a computador;

- Micrótomo modelo 820 SPENCER – American Optical Corporation;
- Pipetas graduadas (5 e 10mL);
- PowerLab 8/30 (ADInstruments®);
- Placas de Petri;
- Seringas de 1, 5 e 10 mL (BENSON – DIKSON®);
- Sonicador;
- Tubos Eppendorf 3810;
- Tubos plásticos de 15 e 50 mL (FALCON);
- Transdutores de força Grass, modelo FT03C (Quincy, Mass; EUA).

4.3 Drogas e soluções

- Água destilada;
- Álcool etílico 70% (Reagen);
- Amifostina (Ethyol® – Schering-plough; 500 mg) diluída em solução salina 0,9% estéril;
- Aminoguanidina (Sigma-aldrich; A-7259; 100 g) diluída em solução salina 0,9% estéril;
- Diazóxido (Sigma-aldrich; D-9035; 1g) diluído em solução de NaOH 0,05N;
- Eosina (Merck);
- Formol 10% (Formol concentrado – Merck em água destilada 1:10);
- Glibenclamida (Sigma-aldrich; G-0639; 10 g) diluída em solução de NaOH 0,01N glicosada a 4%;

- Hematoxilina (Reagen);
- Ifosfamida (Holoxane® – ASTA – AG, Frankfurt. Alemanha; 500 mg) diluída em solução salina 0,9% estéril;
- L-arginina (Sigma-aldrich; A-5006; 500 g) diluída em solução salina 0,9% estéril;
- ODQ (1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-alpha)quinoxalin-1-ona; 03636; 25mg) diluído em DMSO 1%;
- Solução fisiológica 0,9%, frasco 250 mL – CEME;
- Solução nutritora de Tyrode (Tabela 1);
- Soluções padrão de KCl 1M e 3M;
- Solução padrão de carbacol 100uM (Carbamoylcholine chloride; Sigma-Aldrich - C4382; 25g);
- Uretana (Sigma-Aldrich - U2500; 500g) diluída em água destilada.

Tabela 1 - **Composição da solução nutritora de Tyrode**

Substância	Concentração (mmol/L)
NaCl	136,00
KCl	5,00
NaH ₂ PO ₄	0,36
MgCl ₂	0,98
MgSO ₄	1,18
CaCl ₂	2,00
NaHCO ₃	11,90
Glicose	5,50
Água destilada q.s.p.	1L

4.4 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre 11 grupos (n= 8 animais), por sua vez divididos em 4 sessões, recebendo os tratamentos de acordo com o esquema a seguir:

1)

- CTR: salina 0,9% (i.p.);
- IFO: ifosfamida (400 mg/kg, i.p.);
- AMF: amifostina (50 mg/kg, s.c.) –30min→ifosfamida (400 mg/kg, i.p.);

2)

- L-ARG: l-arginina (600mg/kg, i.p.) –30min→ amifostina (50 mg/kg, s.c.) –30min→ifosfamida (400 mg/kg, i.p.);
- AMG: aminoguanidina (50 mg/kg, s.c.) –30min→ifosfamida (400 mg/kg, i.p.);
- AMG*: l-arginina (600mg/kg, i.p.) –30min→ aminoguanidina (50 mg/kg, s.c.) –30min→ifosfamida (400 mg/kg, i.p.);

3)

- ODQi: ODQ (10 mg/kg, v.o.) –30min→ ifosfamida (400 mg/kg, i.p.);
- ODQa: ODQ (10 mg/kg, v.o.) –30min→ amifostina (50 mg/kg, s.c.) –30min→ ifosfamida (400 mg/kg, i.p.);

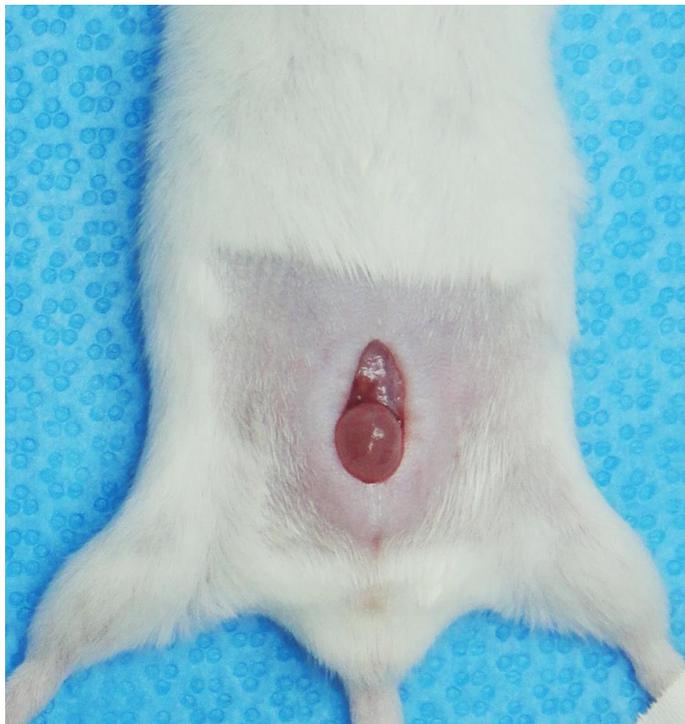
4)

- DIAZ: diazóxido (2 mg/kg, i.p.) –30min→ amifostina (50 mg/kg, s.c.) –30min→ ifosfamida (400 mg/kg, i.p.);
- GLI: glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) –30min→ifosfamida (400 mg/kg, i.p.);
- GLI*: diazóxido (2 mg/kg, i.p.) + glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) –30min→ifosfamida (400 mg/kg, i.p.).

4.5 Indução de Cistite Hemorrágica

Os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de ifosfamida (400 mg/kg) e foram sacrificados por deslocamento cervical após 12 horas. Em seguida, através de uma incisão abdominal mediana, realizou-se cuidadosa dissecação vesical (Figura 7). As bexigas foram seccionadas junto ao colo e abertas, desprezando-se o conteúdo urinário. Posteriormente as mesmas foram pesadas e imersas em formol a 10%. A cistite hemorrágica foi avaliada por alterações no peso úmido vesical e por alterações nos aspectos macroscópicos e histopatológicos das bexigas.

Figura 7 – *Detalhe da bexiga de camundongo.*



4.6 Parâmetros Avaliados na Cistite Hemorrágica

4.6.1 Avaliação do peso úmido vesical

Após dissecadas e retirado seu conteúdo urinário, as bexigas foram pesadas, sendo o peso úmido vesical expresso em mg/20 gramas de peso do animal. O

edema vesical foi quantificado por aumento do peso úmido vesical, reportado como média \pm EPM/20 g de peso do animal.

4.6.2 Análise macroscópica

Durante a pesagem das bexigas, as mesmas foram examinadas quanto ao edema e à hemorragia de acordo com os critérios de Gray *et al.*, 1986, descritos a seguir:

Edema:

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

Hemorragia:

- (3+): coágulo intra-vesical;
- (2+): hematomas na mucosa;
- (1+): telangiectasia ou dilatação dos vasos da bexiga;
- (0): normal.

4.6.3 Análise histopatológica

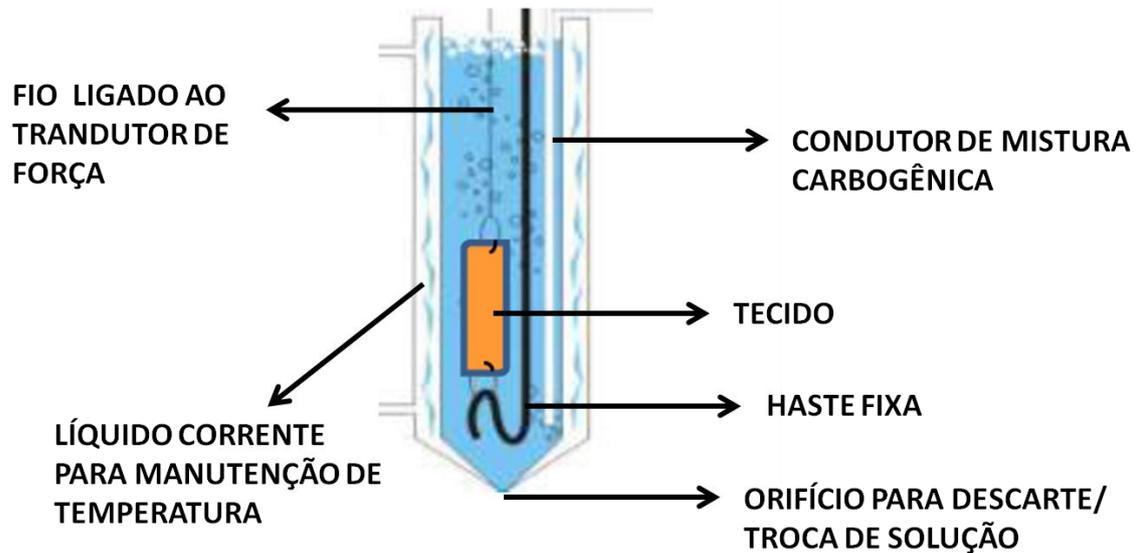
Depois de dissecadas, retirado seu conteúdo urinário, pesadas e analisadas macroscopicamente, as bexigas foram imersas em formol a 10% por 12 horas, desidratadas, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes de 5 μ m, posteriormente corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) e analisados à microscopia óptica. As alterações histológicas foram determinadas de acordo com critérios pré-estabelecidos (GRAY *et al.*, 1986), que são os seguintes:

- (0) –Histologia Normal:** caracterizada por epitélio urotelial normal, ausência de infiltrado inflamatório e ausência de úlceras;
- (1+) –Alterações Discretas:** caracterizadas por redução no número de células epiteliais uroteliais em decorrência de descamação, diminuição das dobras habituais da mucosa 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.

4.7 Avaliação dos parâmetros funcionais em tiras isoladas de bexigas (estudo *in vitro*)

Após 12h da indução da cistite hemorrágica, outros grupos de animais foram sacrificados por deslocamento cervical, suas bexigas foram dissecadas e transferidas para uma placa de Petri com solução nutritora de Tyrode (composição em mM: NaCl= 136; KCl= 5; MgCl₂ = 0,98; CaCl₂ = 2; NaH₂PO₄ = 0,36; NaHCO₃ = 11,9; glicose= 5,5). Cada bexiga foi limpa de seus tecidos adjacentes e dividida em 2 pedaços de dimensões semelhantes que foram montados em câmaras de 5ml contendo solução fisiológica de Tyrode, aerada continuamente à 37°C (Radnoti) com mistura carbogênica (95% O₂ – 5% CO₂), de acordo com o protocolo adaptado de Lagos e Ballejo(2004) (Figura 8).

Figura 8 – *Detalhe da montagem da tira de bexiga para registro de contração “in vitro”.*



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso – UFC (Adaptado).

O sistema de registro isométrico consiste de um amplificador Dataq (PM-1000, WCE, USA), ao qual foram conectados transdutores de força Grass, modelo FT03C (Quincy, Mass., EUA) (Figura 9). O tempo de equilíbrio da preparação foi de 30 minutos e a tensão de repouso foi de 1 g. As soluções utilizadas para induzir as contrações foram preparadas pela adição da substância pura diretamente na solução fisiológica e armazenadas em freezer em concentrações 100 a 1000 vezes maiores que aquelas usadas nas câmaras durante os experimentos. Imediatamente antes do uso, as soluções foram frescas e agitadas em aparelho Vortex. Para avaliação da viabilidade do tecido no início dos experimentos, as preparações foram expostas a soluções despolarizantes de 60 mM de KCl, até que foram obtidas duas respostas de mesma amplitude (aproximadamente 30 a 60 minutos, além do tempo necessário para o equilíbrio da preparação).

Figura 9 – *Sistema para registros de contração em tecido isolado.*



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso – UFC.

Para a realização do estudo foram utilizados protocolos em que a contração foi induzida com KCl e carbacol. As respostas experimentalmente observadas foram consideradas através das deflexões dos traçados originais obtidos pelo sistema de aquisição de dados (Power Lab 8/30), sendo então expressas em valores absolutos e posteriormente relacionadas com o peso de tecido seco utilizado em cada preparação. Para tanto, após a realização das curvas, as tiras de bexigas foram mantidas em estufa à 65°C até a secagem total do tecido e posteriormente foram pesadas em balança de precisão. Os resultados foram expressos em mg de força/mg de tecido seco.

4.8 Avaliação dos parâmetros funcionais em bexigas de camundongos anestesiados (análise por cistometrografia)

Após 12 horas da administração da ifosfamida, os animais foram anestesiados com uretana-50% na dose de 1.2 g/kg por via subcutânea (s.c.). Para o registro da pressão intravesical através da técnica de cistometrograma contínuo, foi realizada uma laparotomia e através de perfuração no ápice da bexiga com agulha 22G foi introduzido um catéter de polietileno (PE-50, Clay Adams, USA) com comprimento suficiente para que o extremo distal alcançasse o lúmen. O catéter foi afixado à bexiga por meio da ligadura realizada com fio de seda 4-0 e a extremidade livre foi exteriorizada pela região abdominal. A parede abdominal foi fechada em um plano com fio de algodão 3-0 (Figuras 10 e 11). Os registros urodinâmicos foram realizados mediante a conexão do catéter exteriorizado a uma chave em T que unia de forma linear uma seringa pela qual foi infundida solução salina continuamente com fluxo de 0,04mL/min e um transdutor de pressão, por sua vez acoplado a um sistema de aquisição de sinais biológicos (PowerLab/8sp, ADInstruments) (Figura 12); uma adaptação do protocolo descrito por Lagos e Ballejo (2004). Os registros foram gravados em computador e analisados no programa Chart v 4.0 (ADInstruments). Os parâmetros avaliados neste trabalho para análise de cistometrografia são definidos na figura 13.

Figura 10 – *Detalhe de bexiga de camundongo antes e depois da cirurgia de implantação intravesical de catéter.*

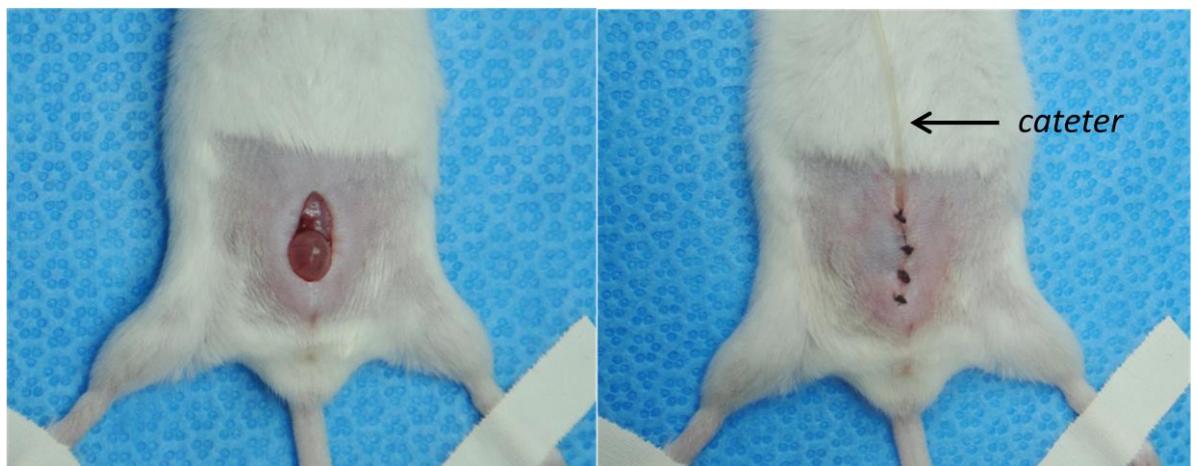
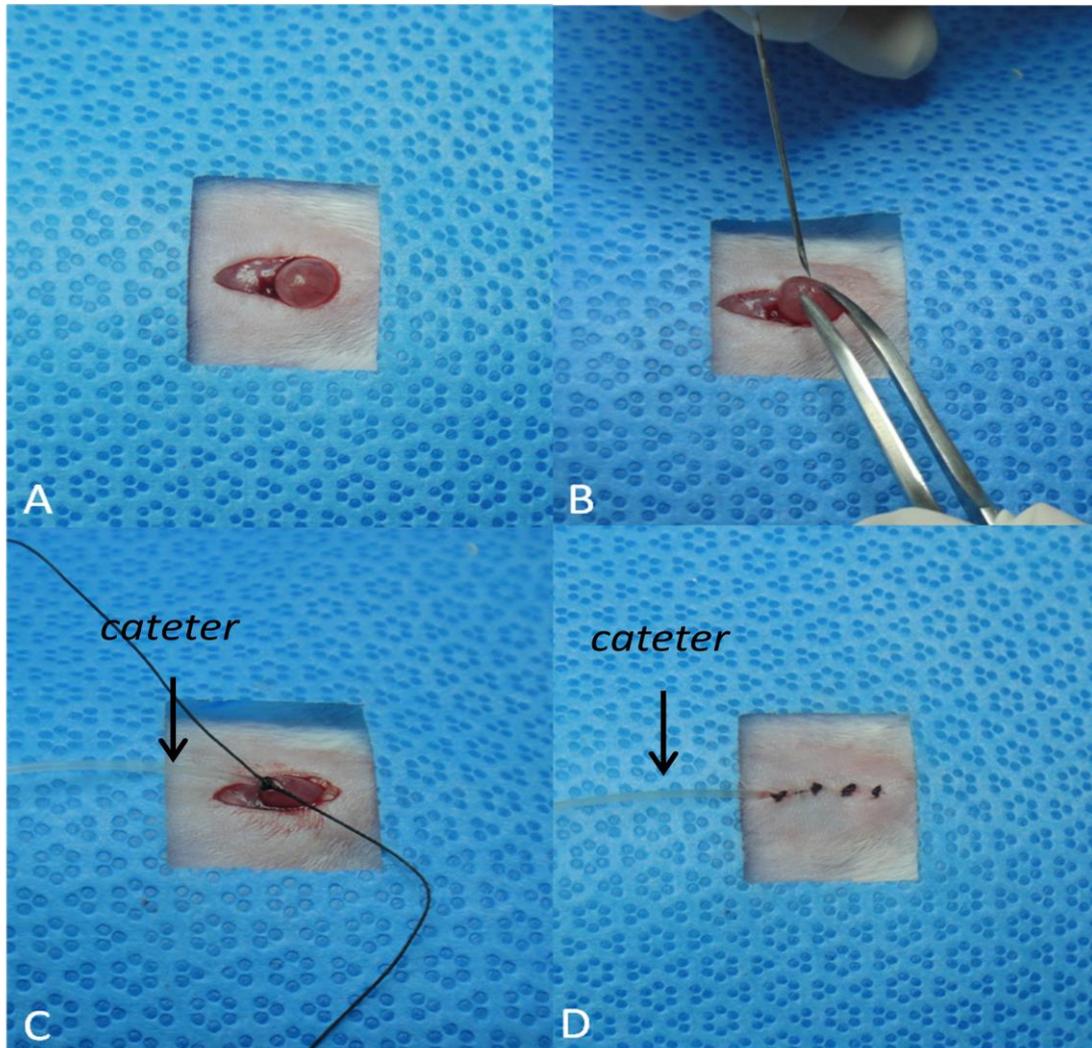


Figura 11 – *Passo a passo da cirurgia de implantação intravesical de catéter.*



A – Incisão abdominal com bexiga exposta. **B** – Perfuração da bexiga com agulha 22G. **C** – Catéter introduzido pelo orifício até o alcance do lúmen da bexiga e fixado com fio cirúrgico. **D** – Incisão abdominal fechada com extremidade do catéter exteriorizada.

Figura 12 – **Sistema para análise de cistometrograma contínuo.**

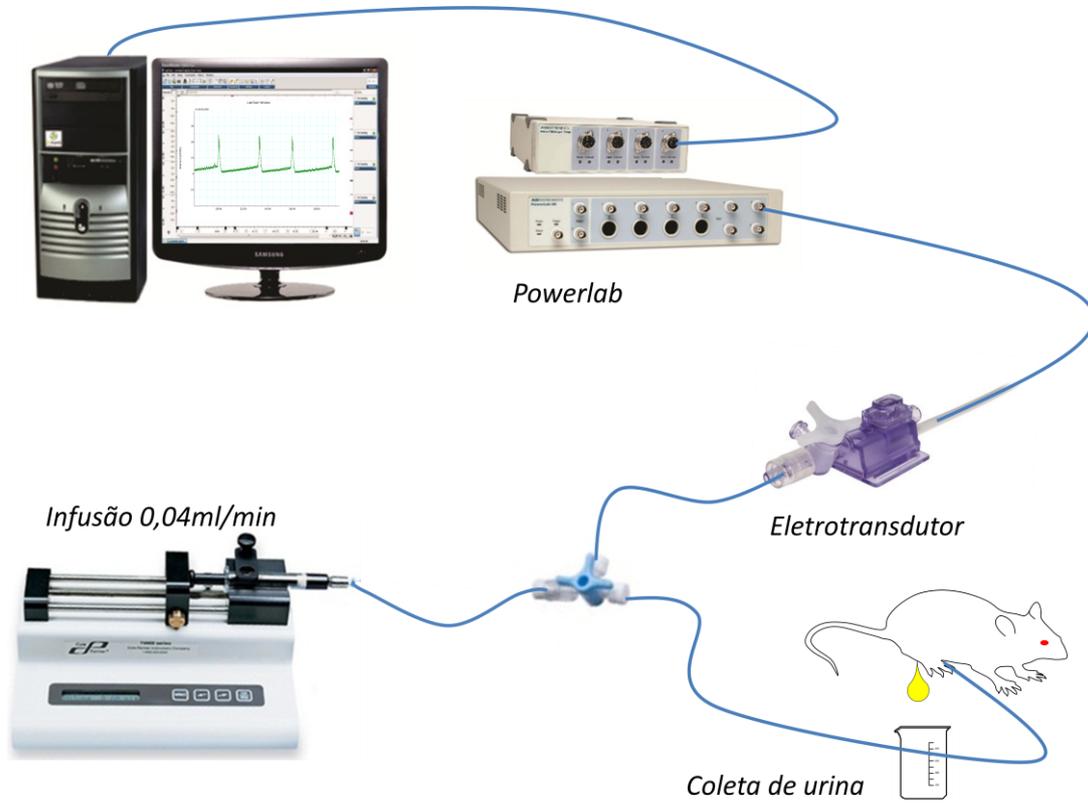
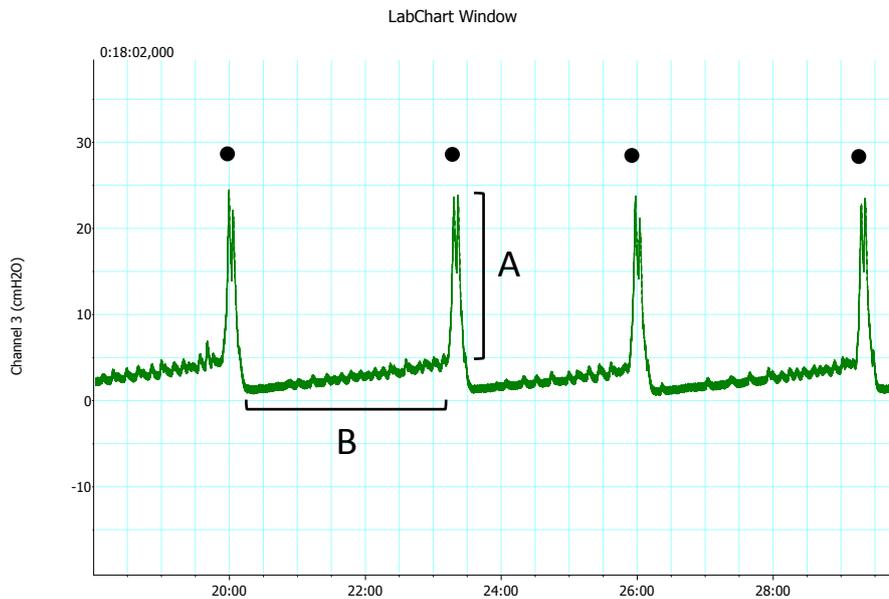


Figura 13 – **Parâmetros avaliados na cistometrografia.**



Amplitude de contração – intervalo A (cmH₂O)

Pressão basal de enchimento – Média dos valores de pressão do intervalo B (cmH₂O)

Frequência de micção – quantidade de eventos ● associados ao esvaziamento/15min

4.9 Análise Estatística

Os resultados de peso úmido vesical e de contratilidade de tiras de bexiga foram reportados como média \pm EPM, acompanhado pelo número de observações (n). A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. Os dados de análise macroscópica e de avaliação histopatológica foram expressos como mediana e intervalo com valores mínimos e máximos e, em seguida, analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Os dados dos parâmetros avaliados por cistometrograma contínuo foram reportados como média \pm EPM e a diferença estatística entre os grupos foi determinada através de Análise de Variância (ANOVA) e teste de Holm Sidak. O nível de significância para todas as situações foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da amifostina sobre as alterações inflamatórias e funcionais da cistite hemorrágica induzida pela ifosfamida

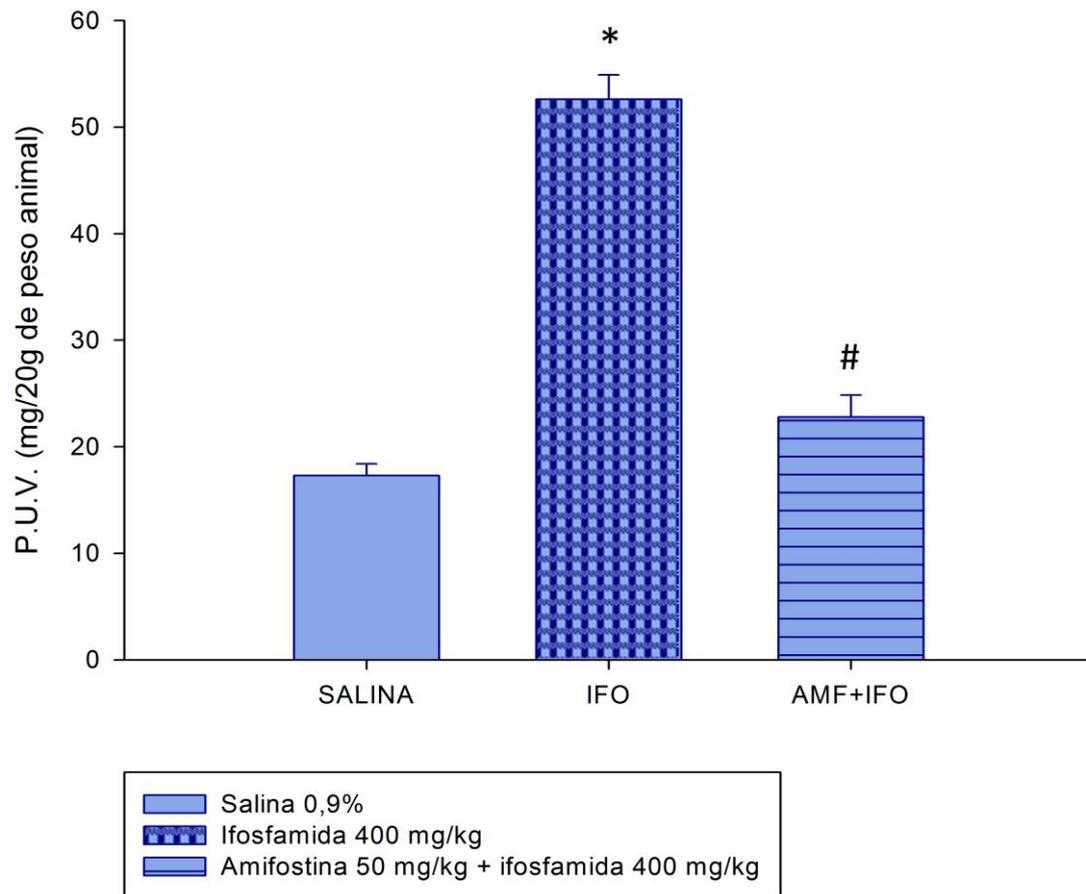
5.1.1 Avaliação das alterações inflamatórias

a) Avaliação macroscópica e de peso úmido vesical

A injeção intraperitoneal de ifosfamida (400 mg/kg, i.p.) provocou o aumento do peso úmido vesical médio para $52,62 \pm 2,29$ mg/ 20 g de peso animal contra $17,03 \pm 1,08$ mg/20 g de peso animal do grupo tratado apenas com salina ($p < 0,001$) (Figura 14). A cistite hemorrágica foi caracterizada macroscopicamente pela presença marcante de edema com escore 3 (2-3) e por hemorragia difusa com hematomas na mucosa e coágulos intravesicais com escore 3 (1-3), valores significativamente diferentes dos atribuídos ao grupo controle: escore 0 (0-0) para edema e hemorragia, ($p < 0,05$) (Tabela 2).

O pré-tratamento de animais que receberam ifosfamida com amifostina (50 mg/kg, s.c.) preveniu a cistite hemorrágica reduzindo em 83,84% ($22,78 \pm 2,06$ mg/20 g de peso animal) o aumento do peso úmido vesical médio observado no grupo IFO, $p < 0,001$ (Figura 14). Na avaliação macroscópica, o grupo pré-tratado com AMF recebeu escores 1 (0-1) para edema e 0 (0-1) para hemorragia ($p < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com IFO) (Tabela 2).

Figura 14 - *Efeito da amifostina sobre o aumento do peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.*



A injeção intraperitoneal de ifosfamida provocou o aumento do peso úmido vesical dos animais. O pré-tratamento com amifostina (s.c.) reverteu este aumento. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8). * p <0,001 em relação ao grupo tratado com salina e # p <0,001 em relação ao grupo tratado com ifosfamida. Os dados foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA).

Tabela 2 - Efeito da amifostina sobre as alterações macroscópicas e microscópicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida de acordo com os critérios de Gray.

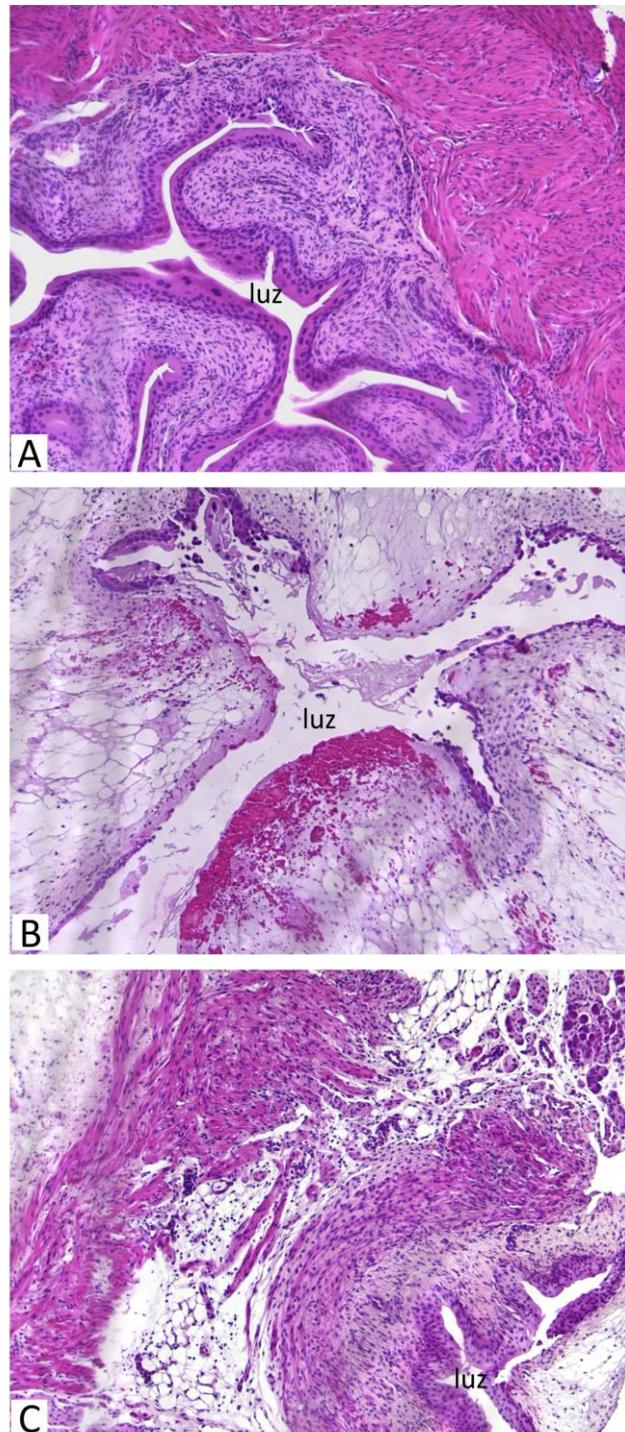
Grupo	Alterações macroscópicas		Alterações microscópicas
	Edema	Hemorragia	
CTR (<i>salina</i>)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IFO (<i>ifosfamida</i>)	3 (2-3) ^a	3 (1-3) ^a	2 (2-2) ^a
AMF (<i>amifostina+ifosfamida</i>)	1 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	1 (0-2) ^b

A injeção intraperitoneal de ifosfamida (400 mg/kg) provocou alterações macroscópicas e microscópicas que foram avaliadas 12h após sua administração no grupo tratado apenas com ifosfamida ou com amifostina (50 mg/kg, s.c.) + ifosfamida. Os resultados foram reportados por mediana e valores mínimos e máximos (n=8). ^ap<0,05 em relação ao grupo CTR e ^bp <0,05 em relação ao grupo IFO. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis e Dunn.

b) Análise histopatológica

De acordo com os critérios de Gray, as imagens das lâminas de bexigas de camundongos tratados com IFO (400 mg/kg, i.p.) mostraram evidências histológicas de cistite com extensa erosão da mucosa com ulceração, presença de infiltrado inflamatório e deposição de fibrina, hemorragia extensa com a presença de coágulos intravesicais, recebendo escore máximo 2(2-2). O pré-tratamento com AMF preveniu o aparecimento dessas alterações recebendo escore 1(0-2), (p<0,05), conforme visto na Tabela 2 e na Figura 15.

Figura 15 – *Fotomicrografias representativas de bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida – análise histopatológica de paredes de bexiga em seção corada por H&E, 40 x: efeito do pré-tratamento com amifostina.*



A – bexiga normal; **B** – bexiga do grupo tratado com IFO (400 mg/kg, i.p.): observa-se intenso dano urotelial, edema, hemorragia e deposição de fibrina. **C** – bexiga do grupo tratado com AMF (50 mg/kg, s.c.) + IFO (400 mg/kg, i.p.): observa-se que o urotélio permanece constituído e que a parede muscular apresenta espessura praticamente normal com quantidade insignificante de infiltrado inflamatório e sem focos hemorrágicos.

5.1.2 Avaliação das alterações funcionais

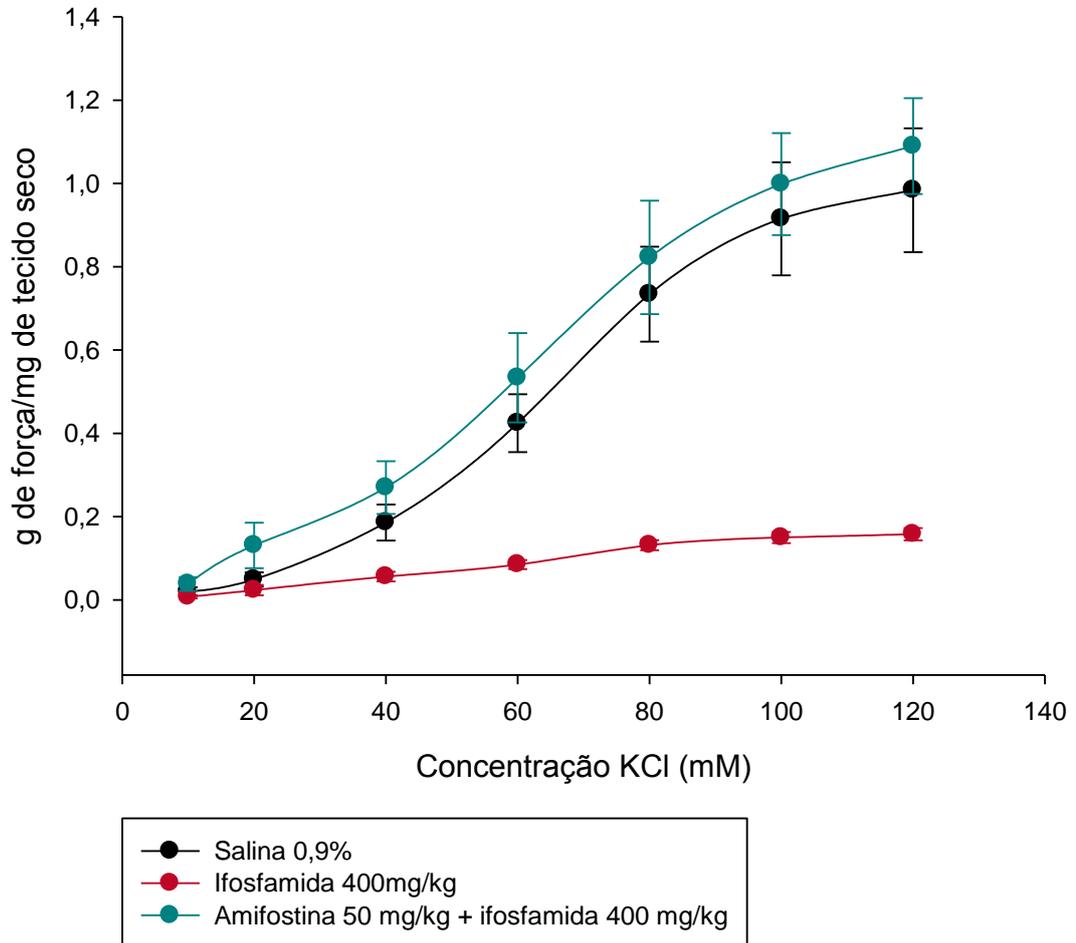
a) Análise de contratilidade de tiras de bexiga

Tiras isoladas de bexigas estimuladas com concentrações crescentes de KCl (0,01 - 0,12M) ou carbacol (CCh, 10^{-9} – 10^{-5} M) produziram curvas concentração-efeito de maneira dependente da concentração ($P < 0,001$, ANOVA).

O tratamento com IFO (400 mg/kg, i.p.) provocou a diminuição da resposta contrátil ao KCl em relação ao grupo controle ($0,15 \pm 0,01$ Vs $0,98 \pm 0,14$ g força/mg de tecido seco, respectivamente. $P < 0,001$). O pré-tratamento com AMF (50 mg/kg, s.c.) reverteu a hipocontratilidade do músculo liso vesical provocada pela IFO ($1,08 \pm 0,11$ g força/mg de tecido seco, $p < 0,001$) (Figura 16).

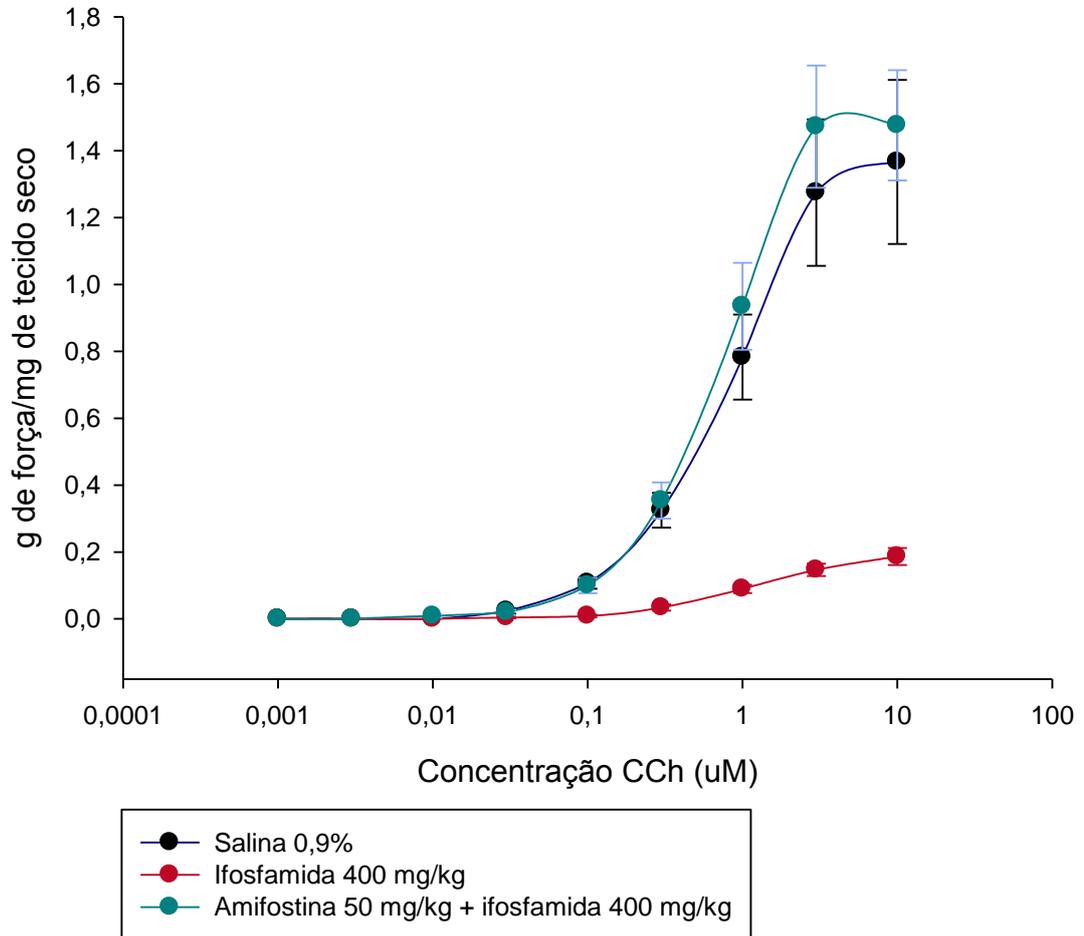
A estimulação com CCh mostrou um padrão semelhante; as tiras isoladas obtidas do grupo IFO contraíram menos em relação àquelas obtidas do grupo CTR ($0,18 \pm 0,02$ Vs $1,36 \pm 0,24$ g força/mg de tecido seco, respectivamente, $p < 0,001$), e as tiras obtidas do grupo AMF mostraram reversão da diminuição da contratilidade vesical provocada por IFO ($1,47 \pm 0,16$ g força/mg de tecido seco, $p < 0,001$ em relação ao grupo IFO) (Figura 17).

Figura 16 – **Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito do pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de KCl (5 a 120mM) em tecido vesical isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/mk, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com amifostina (50 mg/kg, s.c.) 30 min antes de ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

Figura 17 – **Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito do pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de CCh (0,001 a 0,10uM) em tecido isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com amifostina (50 mg/kg, s.c.) 30 min antes de ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

b) Análise de cistometrograma contínuo

A aquisição de sinais biológicos de camundongos anestesiados com uretana e sob infusão intravesical de salina (0,04 ml/mim) produziu registros cistometrográficos típicos que possibilitaram a avaliação de parâmetros relacionados à fisiologia da micção. A análise por cistometrograma contínuo revelou que a pressão basal de enchimento foi significativamente maior ($p < 0,001$) nos animais tratados com IFO ($42,36 \pm 2,92$ cm H₂O) do que nos animais tratados apenas com salina ($20,58 \pm 7,94$ cm H₂O).

No grupo CTR, a amplitude de contração atingiu a média de $21,78 \pm 3,52$ cm H₂O e a frequência de micção foi de $5,66 \pm 0,84$ micções/15 min. Este valor foi significativamente maior ($p < 0,001$) em animais com cistite hemorrágica ($18 \pm 1,06$ micções/15 min). Além disso, o tratamento com IFO produziu traçados sem a presença de contrações evidentes associadas ao reflexo da micção (Figura 33 – pág 93). Neste grupo, o esvaziamento vesical se deu por gotejamento lento e constante de urina, padrão notoriamente diferente do reflexo normal de micção, onde o esvaziamento da bexiga ocorre por jato de urina.

O pré-tratamento com AMF preveniu as alterações observadas nos traçados de animais com cistite hemorrágica. Houve reversão significativa do aumento da pressão basal de enchimento ($21,12 \pm 8,87$ cm H₂O) e do aumento da frequência de micção ($6,5 \pm 0,8$ micções/15 min) provocadas pelo tratamento com IFO ($p < 0,001$) (Tabela 6).

5.2 Papel do óxido nítrico na uroproteção da amifostina sobre as alterações inflamatórias e funcionais da cistite hemorrágica induzida pela ifosfamida

Para a avaliação do envolvimento do NO utilizou-se como ferramenta farmacológica a L-arginina, para o aumento da oferta de NO. Além disso, utilizou-se a aminoguanidina, uma substância com reconhecida propriedade de inibir a enzima NOS.

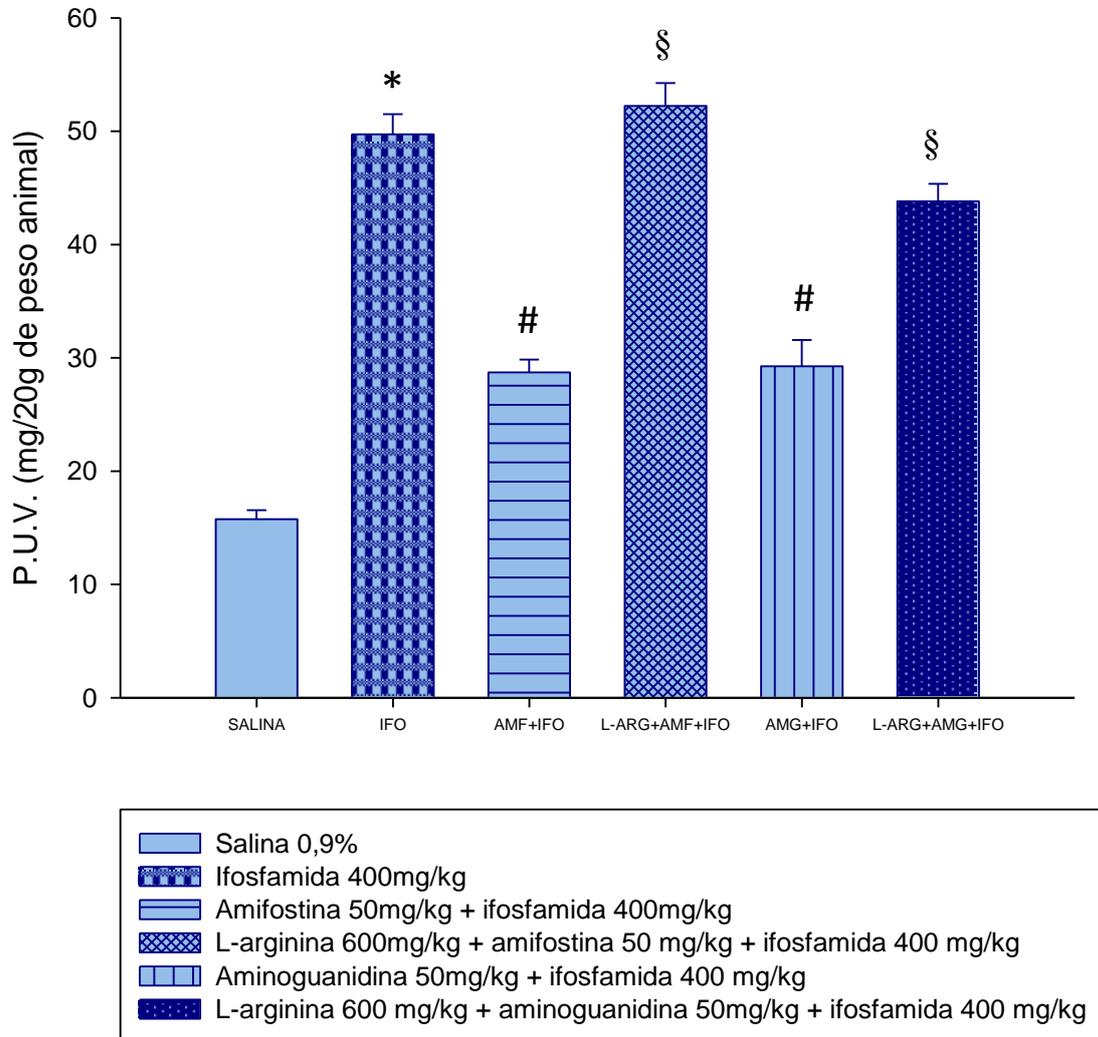
5.2.1 Avaliação das alterações inflamatórias

a) Análise macroscópica e de peso úmido vesical

O pré-tratamento dos animais com L-ARG na dose de 600 mg/kg reverteu completamente o efeito protetor da amifostina sobre as alterações inflamatórias macroscópicas quanto ao edema [IFO: 3(3-3), AMF: 1(0-1) e L-ARG: 3(2-3), $p < 0,05$ em relação a AMF] e hemorragia [IFO: 3(2-3), AMF: 0(0-1) e L-ARG: 3(1-3), $p < 0,05$ em relação a AMF] (Tabela 3) e de peso úmido vesical provocadas pela IFO (IFO: $49,73 \pm 1,77$, AMF: $28,72 \pm 1,12$ e L-ARG $52,23 \pm 2,02$, $p < 0,001$ em relação a AMF) (Figura 18).

A figura 18 também mostra que o pré-tratamento com aminoguanidina na dose de 50 mg/kg de animais com CH foi capaz de reverter o aumento do PUV provocado por IFO (AMG: $29,25 \pm 2,31$, $p < 0,001$ em relação a IFO) e que a adição de L-arginina no tratamento dos animais que receberam aminoguanidina, preveniu esta proteção contra a formação de edema quantificada pelo PUV (AMG*: $43,82 \pm 1,53$, $p < 0,001$ em relação a AMG). Estes resultados estão de acordo com os parâmetros macroscópicos, conforme visto na tabela 3.

Figura 18 - **Efeito da L-arginina sobre a diminuição do peso úmido vesical provocada pela amifostina em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



A injeção intraperitoneal de ifosfamida provocou o aumento do peso úmido vesical dos animais. O pré-tratamento com amifostina (s.c.) reverteu este aumento. A administração intraperitoneal de L-arginina 30 min antes de amifostina foi capaz de prevenir a diminuição do peso úmido vesical provocado pela amifostina. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8). * p <0,001 em relação ao grupo tratado com salina, # p <0,001 em relação ao grupo tratado com ifosfamida e § p <0,001 em relação ao grupo tratado com amifostina + ifosfamida. Os dados foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA).

Tabela 3 - **Efeito da L-arginina sobre as alterações macroscópicas e microscópicas de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e pré-tratados com amifostina de acordo com os critérios de Gray.**

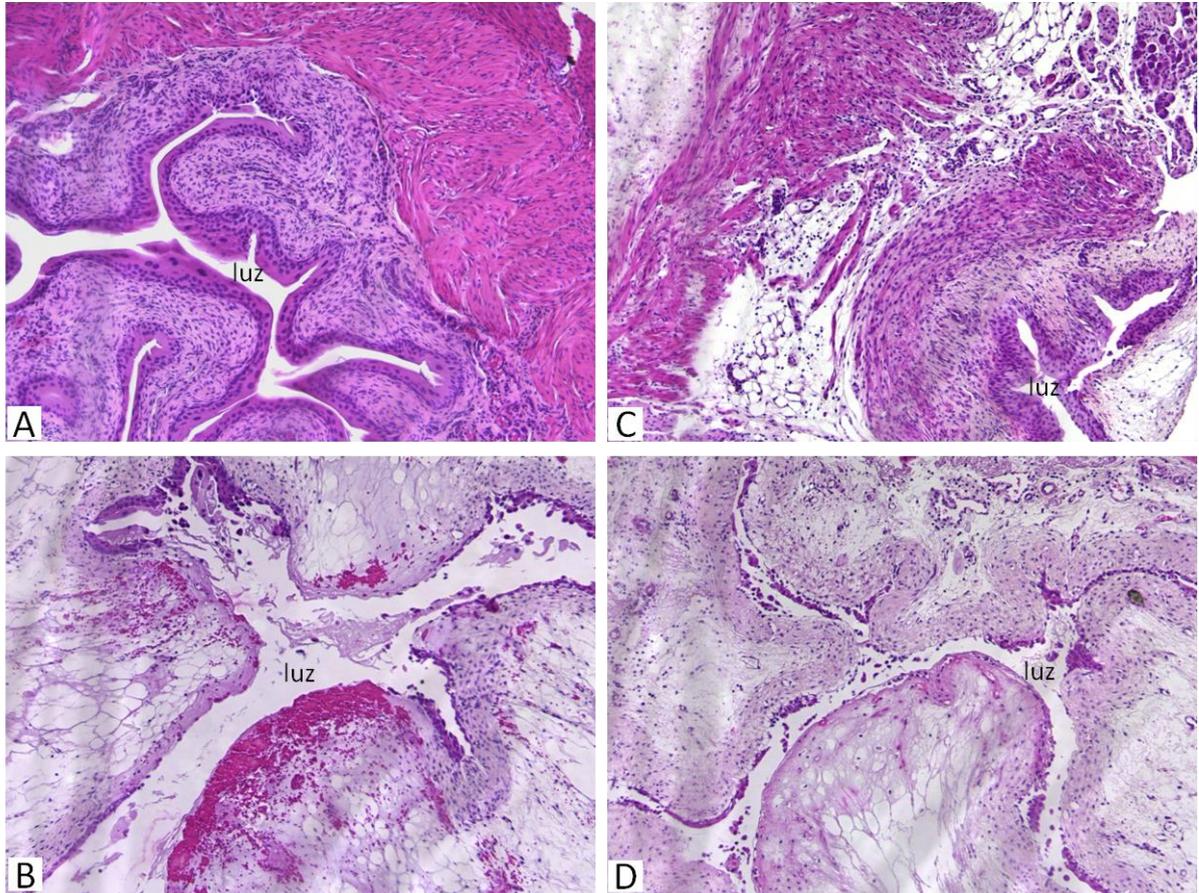
Grupo	Alterações macroscópicas		Alterações microscópicas
	Edema	Hemorragia	
CTR (<i>salina</i>)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IFO (<i>ifosfamida</i>)	3 (3-3) ^a	3 (2-3) ^a	2 (2-2) ^a
AMF (<i>amifostina+ifosfamida</i>)	1 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	1 (0-2) ^b
L-ARG (<i>L-arginina+ amifostina+ifo</i>)	3 (2-3) ^c	3 (1-3) ^c	2 (1-2) ^c
AMG (<i>aminoguanidina+ifosfamida</i>)	1 (0-1) ^b	1(0-1) ^b	---
AMG* (<i>l-arginina+aminoguanidina+ifo</i>)	3 (2-3) ^{a,c}	3 (2-3) ^{a,c}	---

A injeção intraperitoneal de ifosfamida (400 mg/kg) provocou alterações macroscópicas e microscópicas que foram avaliadas 12h após sua administração no grupo tratado apenas com ifosfamida, com amifostina (50 mg/kg, s.c.) + ifosfamida ou com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) + amifostina (50 mg/kg, s.c.) + ifosfamida. A tabela também mostra alterações macroscópicas para os grupos que receberam aminoguanidina (50mg/kg, i.p.) + ifosfamida ou L-arginina + aminoguanidina + ifosfamida. Os resultados foram reportados por mediana e valores mínimos e máximos (n=8). ^ap<0,05 em relação ao grupo CTR, ^b p <0,05 em relação ao grupo IFO e ^c p <0,05 em relação ao grupo AMF. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis e Dunn.

b) Análise histopatológica

A análise histopatológica baseada nos critérios de Gray mostrou que as bexigas de animais tratados com L-arginina, amifostina e ifosfamida (L-ARG) apresentaram, assim como as do grupo tratado apenas com IFO, exulceração da mucosa vesical, múltiplas úlceras, edema acentuado, infiltrado inflamatório, depósito de fibrina e hemorragia, recebendo escore 2(1-2), p<0,05 em relação ao grupo AMF que foi tratado apenas com amifostina e ifosfamida (Figura 19).

Figura 19 – *Fotomicrografias representativas de bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida – análise histopatológica de paredes de bexiga em seção corada por H&E, 40 x : efeito da L-arginina sobre a uroproteção com amifostina.*



A – bexiga normal; **B** – bexiga do grupo tratado com IFO (400 mg/kg, i.p.): observa-se intenso dano urotelial, edema, hemorragia e deposição de fibrina. **C** – bexiga do grupo tratado com AMF (50 mg/kg, s.c.) + IFO: observa-se que o urotélio permanece constituído e que a parede muscular apresenta espessura praticamente normal com quantidade insignificante de infiltrado inflamatório e sem focos hemorrágicos. **D** – bexiga do grupo tratado com L-ARG (600 mg/kg, i.p.) + AMF + IFO: observa-se intensa descamação do urotélio, com edema marcante, deposição de fibrina e presença de pequenos focos hemorrágicos.

5.2.2 Avaliação das alterações funcionais

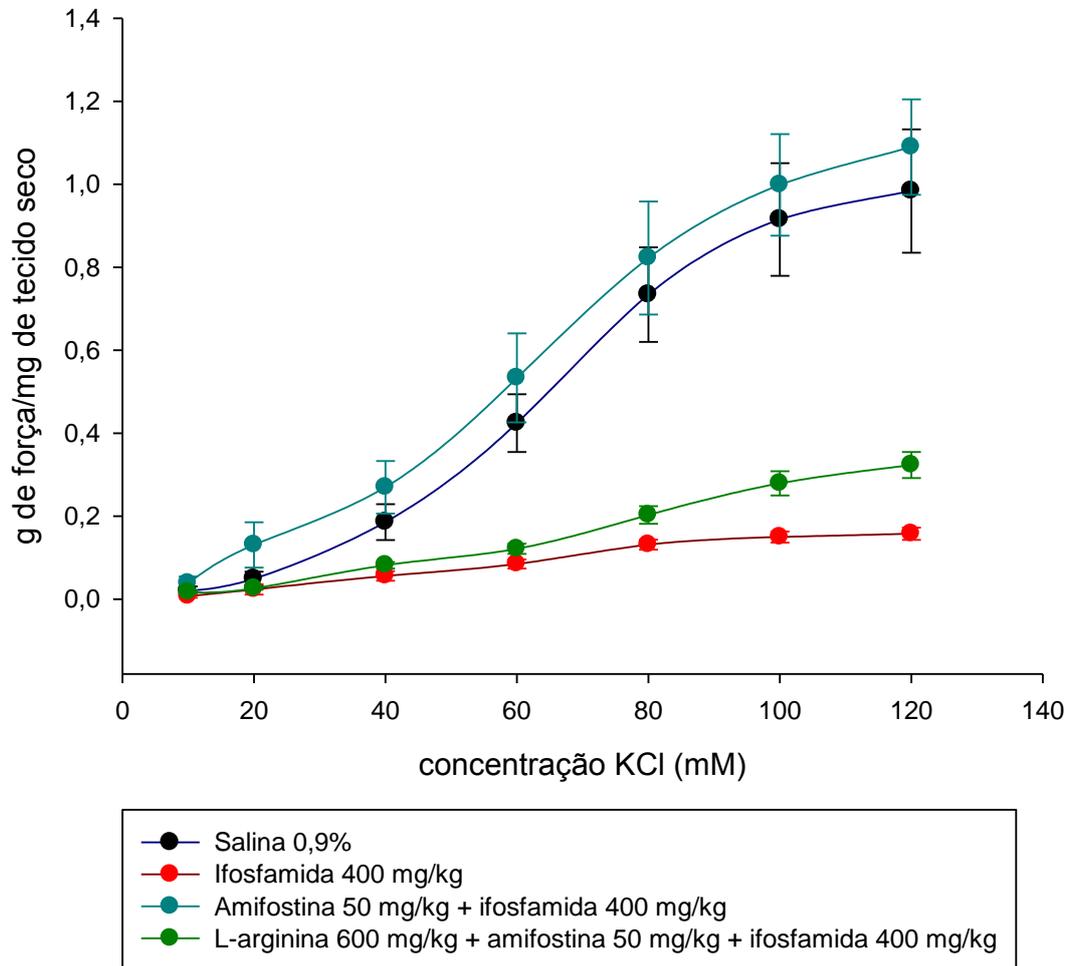
a) Análise de contratilidade de tiras de bexiga

A injeção de L-arginina (600 mg/kg, i.p.) antes da administração de amifostina e ifosfamida promoveu a diminuição da resposta contrátil do tecido vesical em relação ao grupo AMF tanto ao estímulo com KCl ($0,32 \pm 0,03$ Vs $1,09 \pm 0,11$ g força/mg de tecido seco, L-ARG e AMF, respectivamente, $p < 0,001$)(Figura 20), como ao estímulo com CCh ($0,6 \pm 0,08$ Vs $1,47 \pm 0,16$ g força/mg de tecido seco, L-ARG e AMF, respectivamente, $p < 0,001$)(Figura 22).

A administração de aminoguanidina, 30 min antes de ifosfamida, reverteu completamente a hipocontratilidade de tiras de bexiga ao estímulo com KCl em animais com CH não tratada ($0,99 \pm 0,09$ Vs $0,15 \pm 0,01$ g força/mg de tecido seco, AMG e IFO, respectivamente, $p < 0,001$). O pré-tratamento com L-arginina inibiu o efeito da aminoguanidina sobre as tiras de bexigas de camudongos com CH por IFO (AMG*: $0,59 \pm 0,06$ g força/mg de tecido seco, $p < 0,001$ em relação a AMG)(Figura 21).

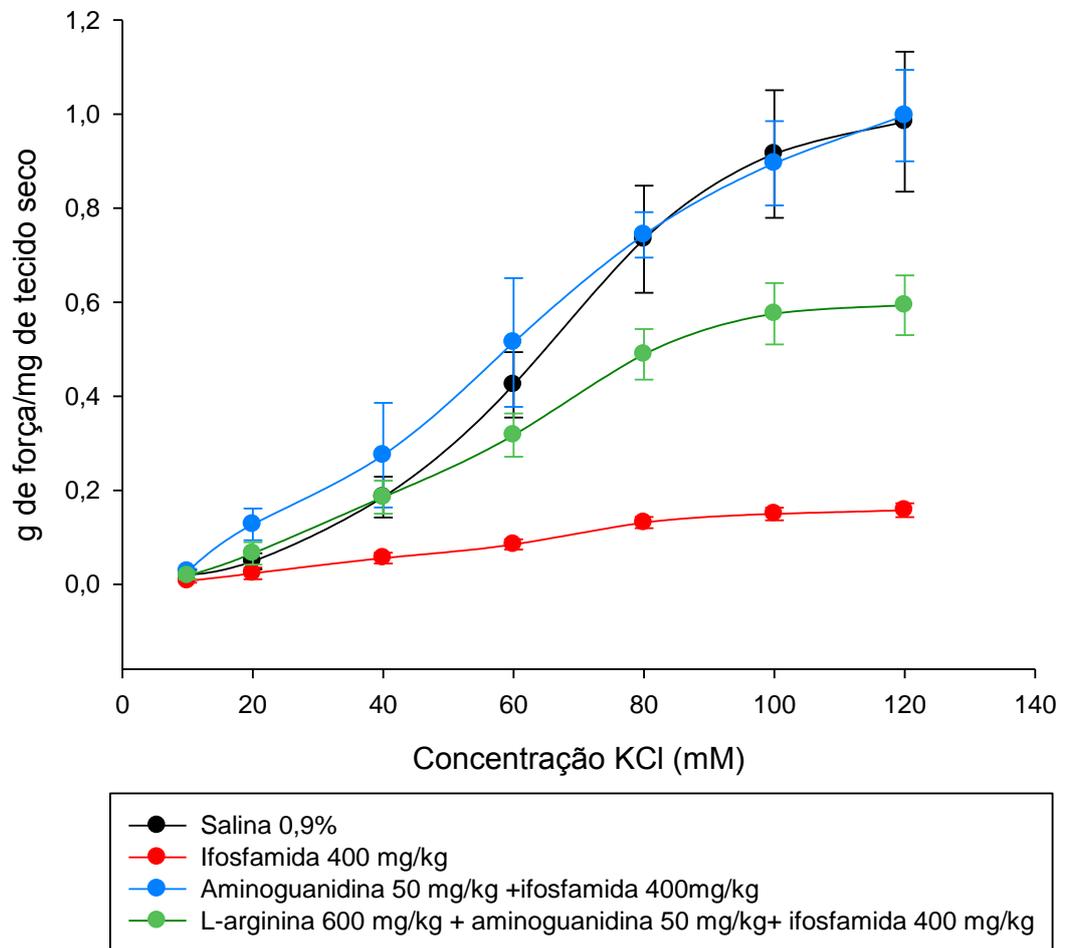
A figura 23 mostra a responsividade de tiras de bexiga ao CCh. L-arginina inibiu o reestabelecimento da força contrátil, provocado pela aminoguanidina, de tiras de bexiga de animais tratados com ifosfamida (AMG: $1,25 \pm 0,33$; AMG*: $0,71 \pm 0,07$ g força/mg de tecido seco, $p < 0,001$).

Figura 20 – Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito da L-arginina sobre o pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



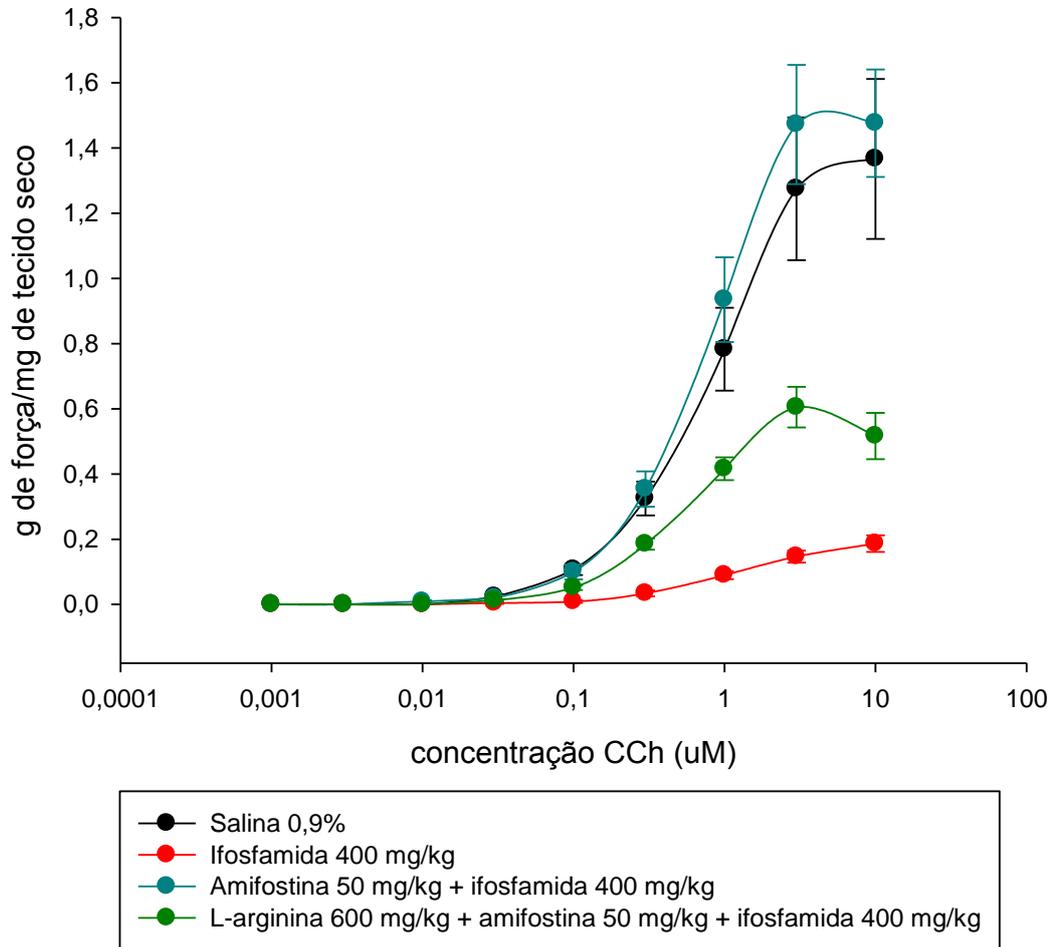
A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de KCl (5 a 120mM) em tecido vesical isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com amifostina (50 mg/kg, s.c.) 30 min antes de ifosfamida ou ainda de animais pré-tratados com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) 30 min antes de amifostina e 1h antes de ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

Figura 21 – Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito da L-arginina sobre o pré-tratamento com aminoguanidina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



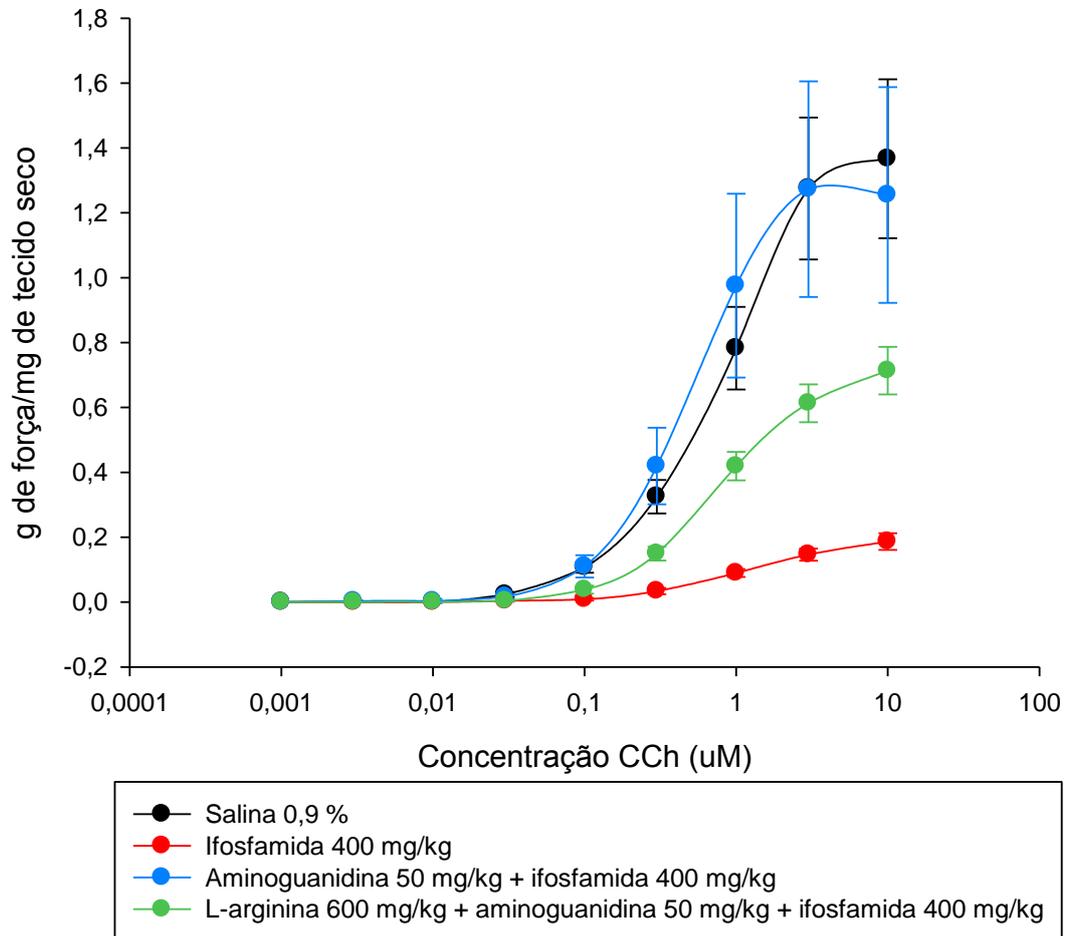
A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de KCl (5 a 120mM) em tecido vesical isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com aminoguanidina (50 mg/kg, i.p.) 30 min antes de ifosfamida ou ainda de animais pré-tratados com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) 30 min antes de aminoguanidina e 1h antes de ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

Figura 22 – **Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito da L-arginina sobre o pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de CCh (0,001 a 0,10uM) em tecido vesical isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com amifostina (50 mg/kg, s.c.) 30 min antes de ifosfamida ou ainda de animais pré-tratados com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) 30 min antes de amifostina e 1h antes de ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

Figura 23 – **Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito da L-arginina sobre o pré-tratamento com aminoguanidina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de CCh (0,001 a 0,10uM) em tecido vesical isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com aminoguanidina (50 mg/kg, s.c.) 30 min antes de ifosfamida ou ainda de animais pré-tratados com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) 30 min antes de aminoguanidina e 1h antes de ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

b) Análise de cistometrograma contínuo

A análise dos traçados cistometrográficos de animais que receberam o pré-tratamento com L-arginina antes de amifostina revelou um padrão urodinâmico semelhante ao grupo CTR e ao grupo AMF, com contrações evidentes associadas ao evento de micção e pressão basal de enchimento baixa ($11,82 \pm 1,22$ cmH₂O) em relação ao grupo IFO ($p < 0,001$). Por outro lado, L-ARG foi capaz de reverter parcialmente a diminuição da frequência de micção provocada por AMF ($11,16 \pm 1,6$ Vs $6,5 \pm 0,8$ micções/15 min, $p = 0,009$). Resumidamente, diferentemente do que foi observado nas alterações inflamatórias e na contratilidade vesical *in vitro*, L-ARG não foi capaz de inibir completamente as alterações dos parâmetros urodinâmicos de AMF, com exceção da frequência de micção (Figura 33 – pág 93, Tabela 6).

5.3 Participação do GMPc nas alterações inflamatórias e funcionais da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e sua correlação com a uroproteção da amifostina

Para avaliação do envolvimento do GMPc, utilizou-se como ferramenta farmacológica o ODQ, um reconhecido e ativo inibidor da guanilato-ciclase do GMPc. Sendo assim, animais foram pré-tratados com ODQ antes de receberem ifosfamida.

5.3.1 Avaliação das alterações inflamatórias

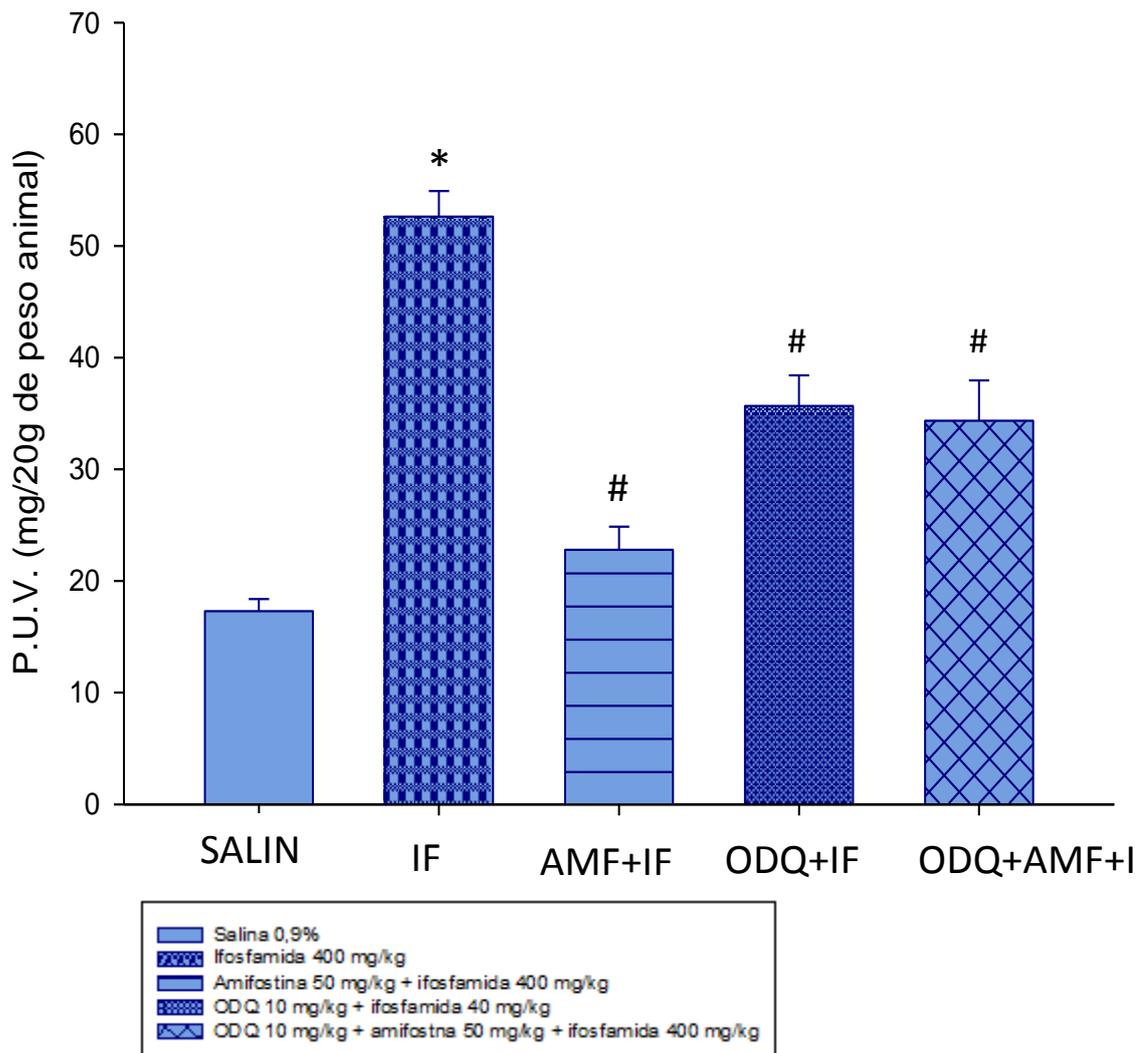
a) Análise macroscópica e de peso úmido vesical

O pré-tratamento dos animais com o ODQ na dose de 10 mg/kg reverteu as alterações macroscópicas de edema e hemorragia promovidas pela ifosfamida [edema - IFO: 3(2-3) e ODQi: 1(1-2), $p < 0,05$] e hemorragia [IFO: 3(1-3) e ODQi: 0(0-2), $p < 0,05$], assim como inibiu o aumento peso úmido vesical (IFO: $52,62 \pm 2,29$ e ODQi: $35,67 \pm 2,06$, $p < 0,001$).

O pré-tratamento com ODQ e amifostina de animais com CH induzida por ifosfamida manteve os padrões semelhantes ao do grupo pré-tratado

apenas com ODQ, isto para alterações macroscópicas de edema [1(1-1)] e de hemorragia [1(1-2)], $p < 0,05$ em relação à IFO (Tabela 4); bem como para alterações de peso úmido vesical, atingindo valor médio de $34,35 \pm 3,6$, $p < 0,001$ em relação à IFO (Figura 24).

Figura 24 - **Efeito do ODQ sobre aumento do peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



A injeção intraperitoneal de ifosfamida provocou o aumento do peso úmido vesical dos animais. O pré-tratamento com ODQ reverteu este aumento, assim como o pré-tratamento com amifostina + ODQ. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM ($n=8$). * $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com salina e # $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com ifosfamida. Os dados foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA).

Tabela 4 - **Efeito do ODQ sobre as alterações macroscópicas de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida ou protegidos por amifostina de acordo com os critérios de Gray.**

Grupo	Alterações macroscópicas		Alterações microscópicas
	Edema	Hemorragia	
CTR (<i>salina</i>)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IFO (<i>ifosfamida</i>)	3 (2-3) ^a	3 (1-3) ^a	2 (2-2) ^a
AMF (<i>amifostina+ifosfamida</i>)	1 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	1 (0-2) ^b
ODQi (<i>ODQ+ifosfamida</i>)	1 (1-2) ^b	0 (0-2) ^b	—
ODQa (<i>ODQ+amifostina+ifosfamida</i>)	2 (1-2) ^b	1 (1-2) ^b	—

A injeção intraperitoneal de ifosfamida (400 mg/kg) provocou alterações macroscópicas e microscópicas que foram avaliadas 12h após sua administração no grupo tratado apenas com ifosfamida, com ODQ (10 mg/kg v.o.) + ifosfamida ou com ODQ + amifostina + ifosfamida. Os resultados foram reportados por mediana e valores mínimos e máximos (n=8). ^ap<0,05 em relação ao grupo CTR e ^b p <0,05 em relação ao grupo IFO. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis e Dunn.

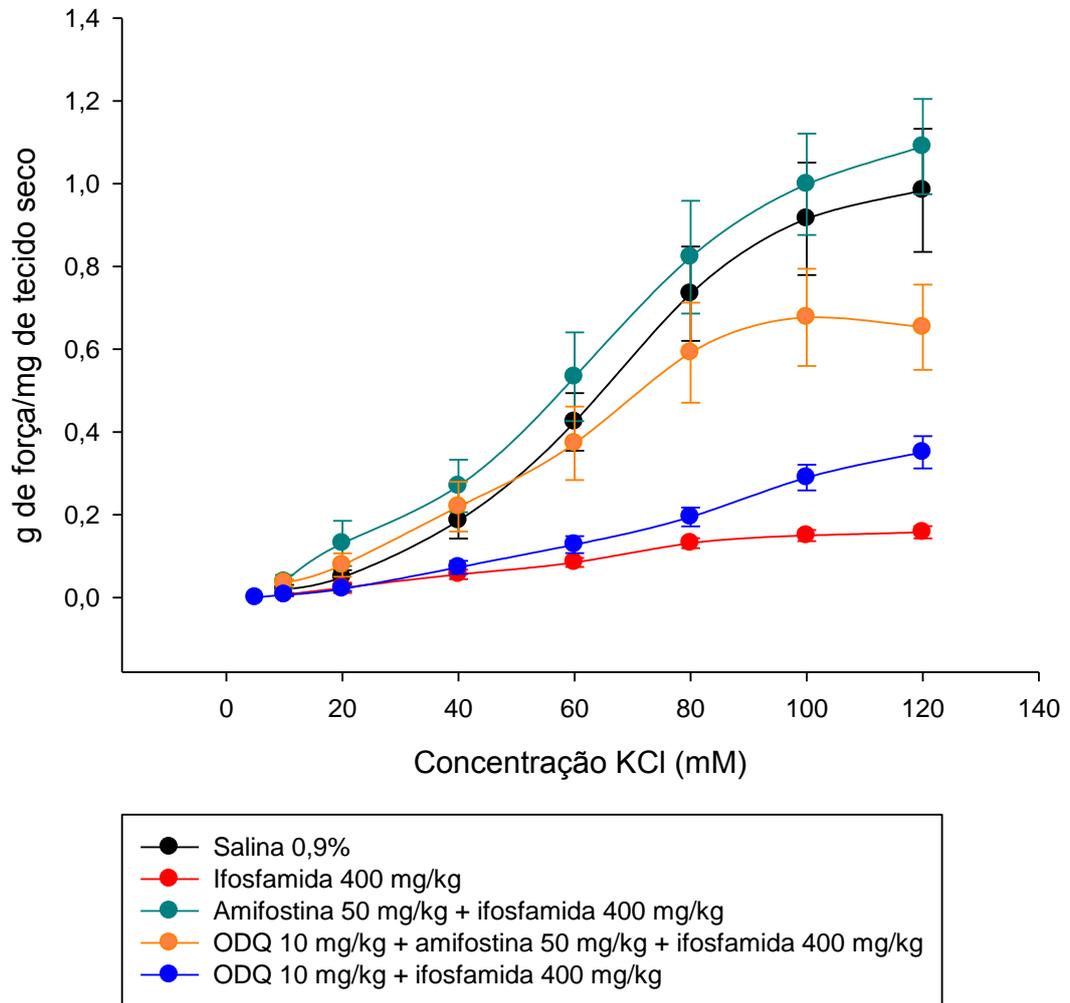
5.3.2 Avaliação das alterações funcionais

a) Análise de contratilidade de tiras de bexiga

Tiras de bexiga de camundongos que receberam ODQ antes de ifosfamida produziram força máxima ao estímulo com KCl com valor médio de $0,35 \pm 0,03$ g força/mg de tecido seco, e de $0,44 \pm 0,04$ g força/mg de tecido seco para o estímulo com CCh, ambos valores foram semelhantes aos do grupo tratado apenas com ifosfamida.

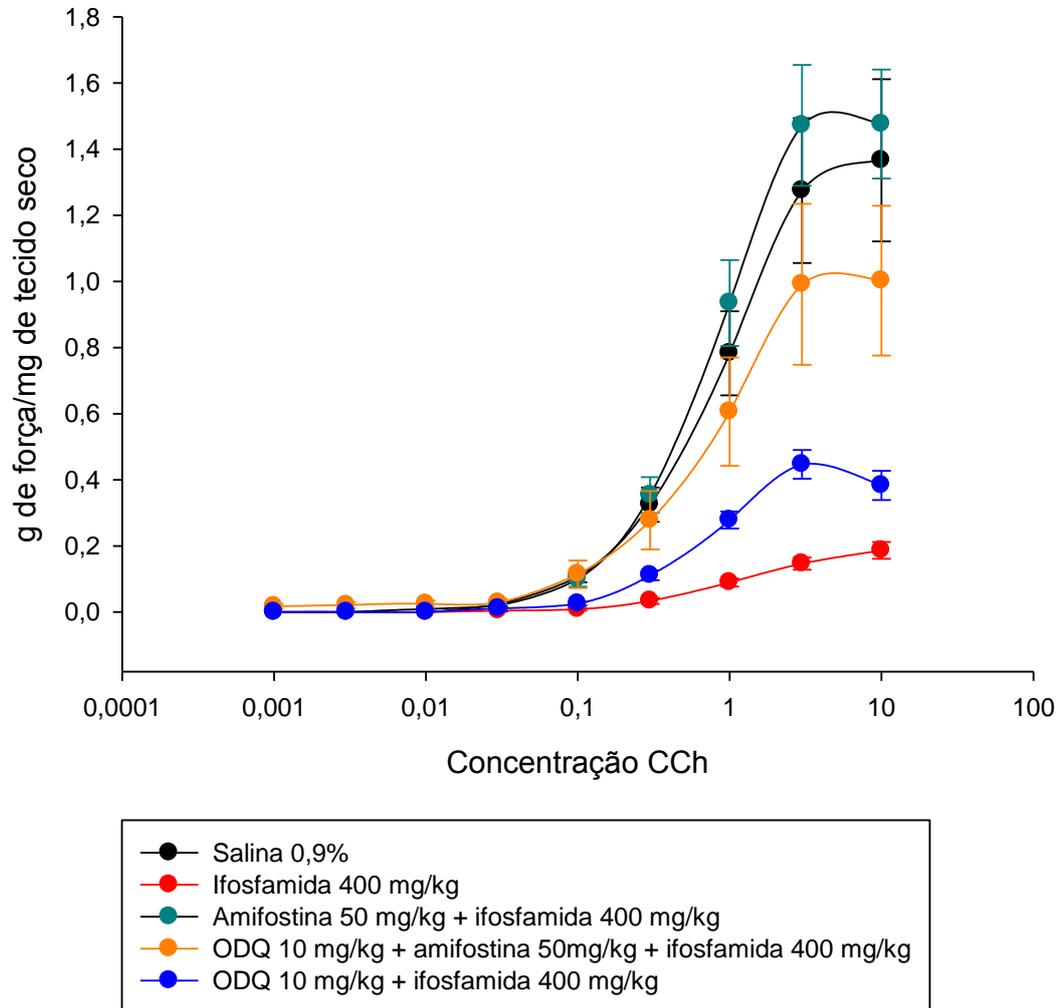
O tratamento com ODQ antes de amifostina e ifosfamida produziu resposta contrátil das tiras de bexiga ao KCl de $0,67 \pm 0,11$ g força/mg de tecido seco, e ao CCh de $1,00 \pm 0,22$ g força/mg de tecido, valores estes semelhantes aos do grupo tratado apenas com amifostina e ifosfamida (Figuras 25 e 26).

Figura 25 – **Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito do ODQ sobre a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e sobre o efeito do pré-tratamento com amifostina.**



A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de KCl (5 a 120mM) em tecido vesical isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com ODQ (10 mg/kg, v.o.) 30 min antes de ifosfamida ou antes de amifostina (50 mg/kg, s.c.) e ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

Figura 26 – **Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito do ODQ sobre a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e sobre o efeito do pré-tratamento com amifostina.**



A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de CCh (0,001 a 0,10uM) em tecido vesical isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com ODQ (10 mg/kg, v.o.) 30 min antes de ifosfamida ou antes de amifostina (50 mg/kg, s.c.) e ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

b) Análise de cistometrograma contínuo

A análise dos traçados cistometrográficos de animais que receberam o pré-tratamento com ODQ antes de ifosfamida revelou um padrão urodinâmico semelhante ao grupo IFO, com pressão basal de enchimento de $38,54 \pm 3,32$ cm H₂Oe com frequência de micção de $13,06 \pm 1,57$ micções/15 min (p<0,05 em relação a CTR). Neste grupo os traçados cistometrográficos

também não mostraram contrações evidentes associadas ao reflexo de micção (Figura 33 – pág 93, Tabela 6).

5.4 Papel dos canais de potássio dependentes de ATP sobre as alterações inflamatórias e funcionais da cistite hemorrágica induzida pela ifosfamida e sua correlação com a uroproteção da amifostina

Para a avaliação do envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP, utilizou-se como ferramenta farmacológica uma substância ativadora destes canais, o diazóxido. Além disso, utilizou-se também a glibenclamida, um agente com reconhecida propriedade de bloquear os canais de potássio sensíveis ao ATP.

5.4.1 Avaliação das alterações inflamatórias

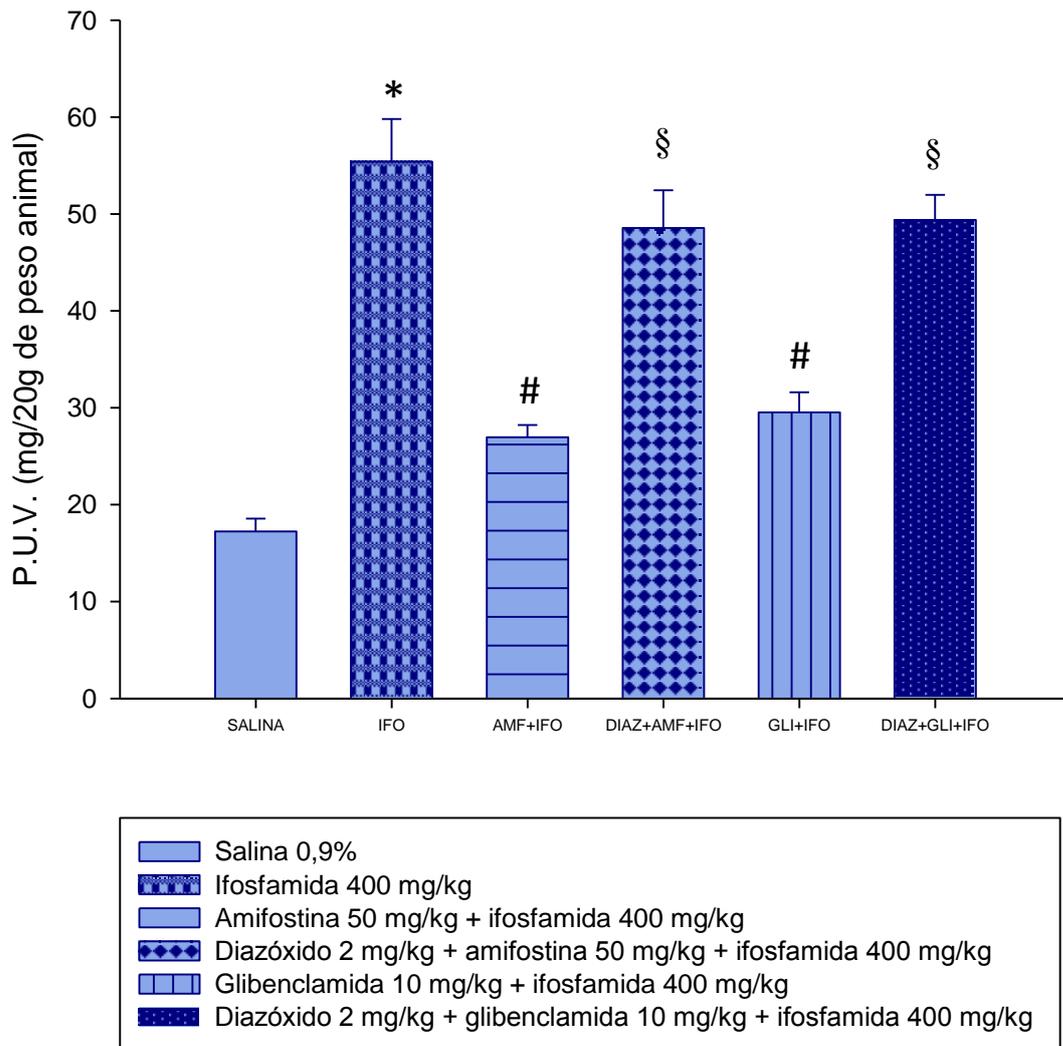
a) Análise macroscópica e de peso úmido vesical

O P.U.V. de animais que receberam pré-tratamento com diazóxido (2 mg/kg, i.p.) antes de amifostina atingiu valor médio de $48,55 \pm 3,89$ g/mg de peso animal, valor maior que o encontrado no grupo CTR ($17,24 \pm 1,32$ g/mg de peso animal, $p < 0,001$)(Figura 27). A análise pelos critérios de Gray demonstrou alterações macroscópicas importantes para edema e hemorragia [3(2-3) e 2(1-3), respectivamente] com $p < 0,05$ quando comparados aos escores atribuídos ao grupo CTR [0(0-0) para edema e hemorragia] como também ao grupo AMF [1(0-1) para edema e 0(0-2) para hemorragia](Tabela 5).

A figura 27 também mostra que o pré-tratamento com glibenclamida na dose de 10 mg/kg de animais com CH foi capaz de reverter o aumento do P.U.V. provocado por IFO (GLI: $29,52 \pm 2,07$, $p < 0,001$ em relação a IFO) e que a adição de diazóxido ao tratamento dos animais que receberam glibenclamida, preveniu esta proteção contra a formação de edema quantificada pelo PUV (GLI*: $49,37 \pm 2,59$, $p < 0,001$ em relação a GLI). Estes

resultados estão de acordo com os parâmetros macroscópicos de Gray, conforme visto na tabela 5.

Figura 27 - **Efeito do diazóxido sobre a diminuição do peso úmido vesical provocada pela amifostina em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



A injeção intraperitoneal de ifosfamida provocou o aumento do peso úmido vesical dos animais. O pré-tratamento com amifostina (s.c.) reverteu este aumento. A administração intraperitoneal de diazóxido 30 min antes de amifostina foi capaz de prevenir a diminuição do peso úmido vesical provocada pela amifostina. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8). * p <0,001 em relação ao grupo tratado com salina, # p <0,001 em relação ao grupo tratado com ifosfamida e § p <0,001 em relação ao grupo tratado com amifostina + ifosfamida. Os dados foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA).

Tabela 5 - **Efeito do diazóxido sobre as alterações macroscópicas e microscópicas de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e pré-tratados com amifostina de acordo com os critérios de Gray.**

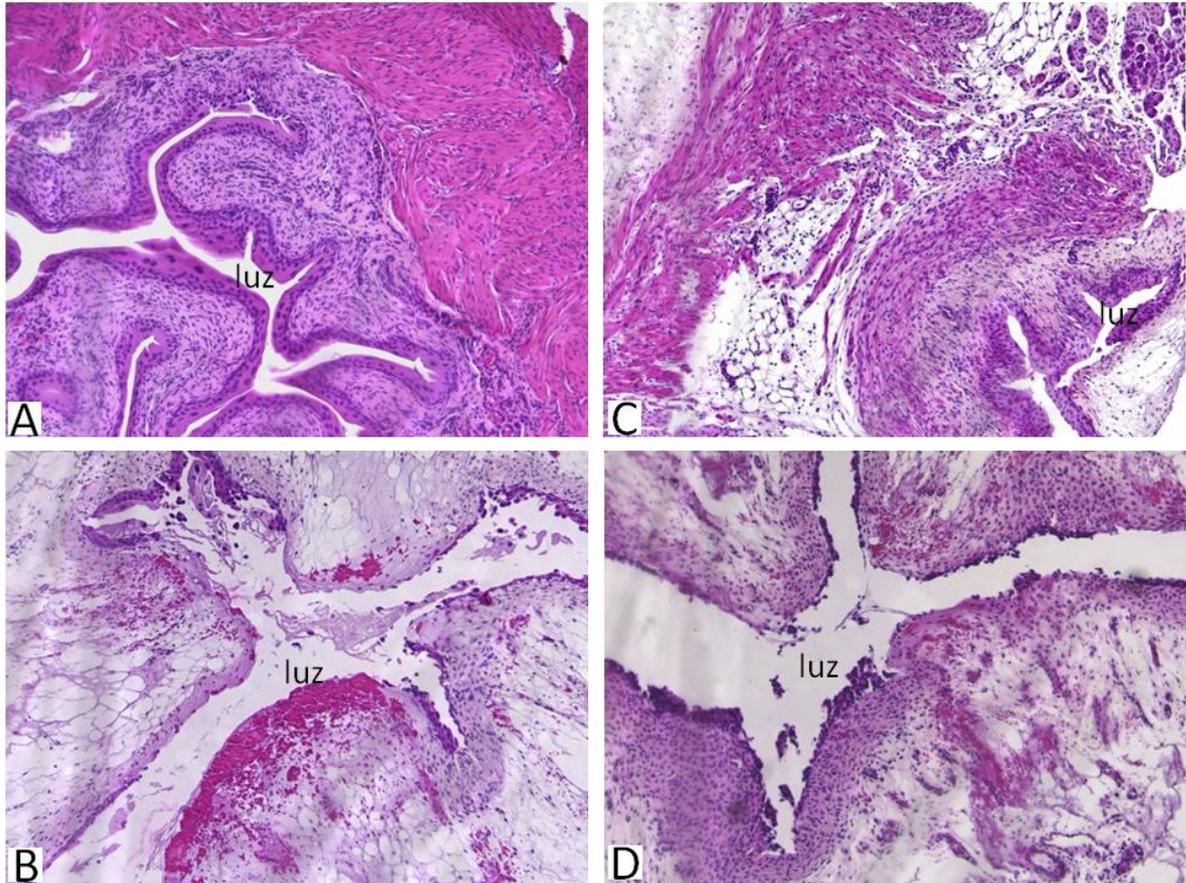
Grupo	Alterações macroscópicas		Alterações microscópicas
	Edema	Hemorragia	
CTR (<i>salina</i>)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IFO (<i>ifosfamida</i>)	3 (2-3) ^a	3 (1-3) ^a	2 (2-2) ^a
AMF (<i>amifostina+ifosfamida</i>)	1 (0-1) ^b	0 (0-2) ^b	1 (0-2) ^b
DIAZ (<i>diazóxido+ amifostina+ifo</i>)	3 (2-3) ^c	2 (1-3) ^c	2 (2-2) ^c
GLI (<i>glibenclamida+ifosfamida</i>)	1 (1-2) ^b	1 (0-2) ^b	---
GLI* (<i>diazóxido + glibenclamida+ifo</i>)	3 (2-3) ^{a,c}	2 (1-3) ^{a,c}	---

A injeção intraperitoneal de ifosfamida (400 mg/kg) provocou alterações macroscópicas e microscópicas que foram avaliadas 12h após sua administração no grupo tratado apenas com ifosfamida, com amifostina (50 mg/kg, s.c.) + ifosfamida ou com diazóxido (2 mg/kg, i.p.) + amifostina (50 mg/kg, s.c.) + ifosfamida. Os resultados foram reportados por mediana e valores mínimos e máximos (n=8). ^ap<0,05 em relação ao grupo CTR, ^b p <0,05 em relação ao grupo IFO e ^c p <0,05 em relação ao grupo AMF. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis e Dunn.

b) Análise histopatológica

Na tabela 5 e na Figura 28 é possível observar-se que o pré-tratamento com o diazóxido na dose de 2mg/kg aumentou de forma significativa (p<0,05) o edema e a hemorragia das bexigas, recebendo escore 2(2-2), comparando ao atribuído às bexigas dos animais tratados apenas com amifostina e ifosfamida [1(0-2)]. Revelando assim o mesmo padrão histopatológico do grupo IFO [2(2-2)](Figura 10).

Figura 28 – *Fotomicrografias representativas de bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida – análise histopatológica de paredes de bexiga em seção corada por H&E, 40 x : efeito do diazóxido sobre a uroproteção com amifostina.*



A – bexiga normal; **B** – bexiga do grupo tratado com IFO (400 mg/kg, i.p.): observa-se intenso dano urotelial, edema, hemorragia e deposição de fibrina. **C** – bexiga do grupo tratado com AMF (50 mg/kg, s.c.) + IFO: observa-se que o urotélio permanece constituído e que a parede muscular apresenta espessura praticamente normal com quantidade insignificante de infiltrado inflamatório e sem focos hemorrágicos. **D** – bexiga do grupo tratado com DIAZ (600 mg/kg, i.p.) + AMF + IFO: observa-se perda das dobras do urotélio com intensa descamação, edema marcante, deposição de fibrina e presença de focos hemorrágicos.

5.4.2 Avaliação das alterações funcionais

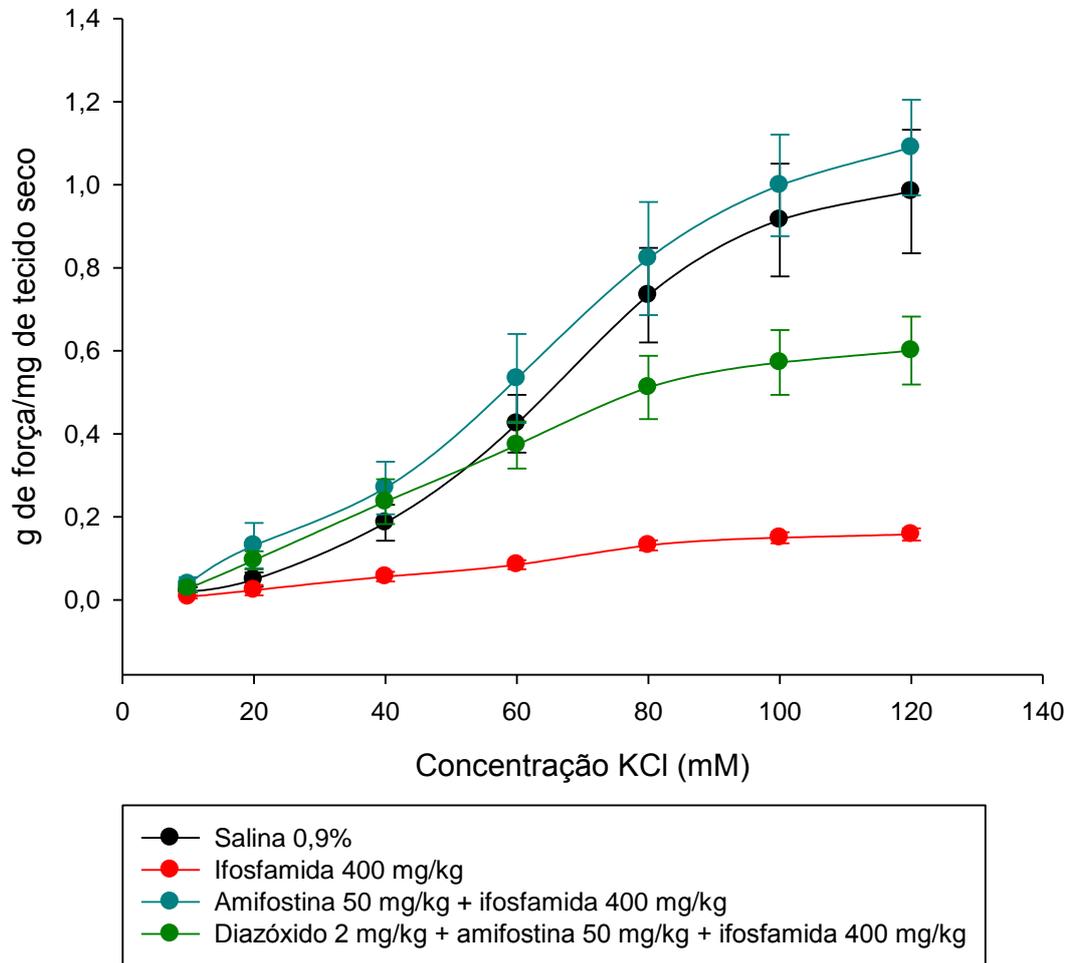
a) Análise de contratilidade de tiras de bexiga

A injeção intravesical de diazóxido (2mg/kg, i.p.) antes da administração de amifostina e ifosfamida promoveu a diminuição da resposta contrátil do tecido vesical ao estímulo com KCl em relação ao grupo AMF, ($0,6 \pm 0,08$ Vs $1,09 \pm 0,11$ g força/mg de tecido seco, DIAZ e AMF, respectivamente, $p=0,007$)(Figura 29). Numa proporção menor, o mesmo ocorreu ao estímulo com carbacol ($0,79 \pm 0,12$ Vs $1,47 \pm 0,16$ g força/mg de tecido seco, DIAZ e AMF, respectivamente, $p<0,05$)(Figura 31).

A administração de glibenclamida, 30 min antes de ifosfamida, reverteu completamente a diminuição da força contrátil de tiras de bexiga de animais com CH não tratada ao estímulo com KCl ($0,79 \pm 0,11$ Vs $0,15 \pm 0,01$ g força/mg de tecido seco, GLI e IFO, respectivamente, $p<0,001$). O pré-tratamento com diazóxido inibiu o efeito da glibenclamida sobre as tiras de bexigas de camudongos com CH por IFO (GLI*: $0,40 \pm 0,11$ g força/mg de tecido seco, $p<0,001$ em relação a GLI)(Figura 30).

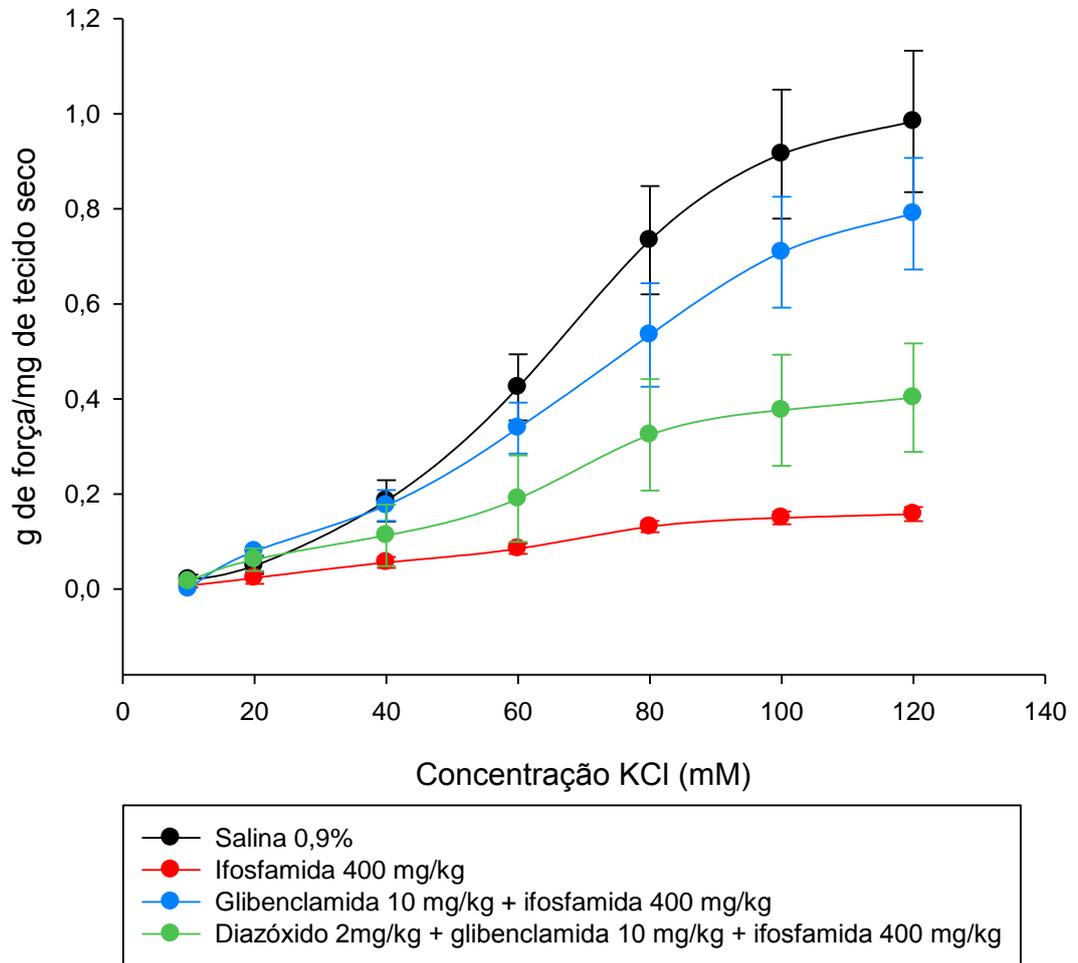
A figura 32 mostra a responsividade de tiras de bexiga ao CCh. Nela observa-se que o diazóxido inibiu o reestabelecimento da força contrátil provocada pela glibenclamida em tiras de bexiga de animais tratados com ifosfamida (GLI: $0,59 \pm 0,10$; GLI*: $1,00 \pm 0,11$ g força/mg de tecido seco, $p<0,001$).

Figura 29 – **Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito do diazóxido sobre o pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



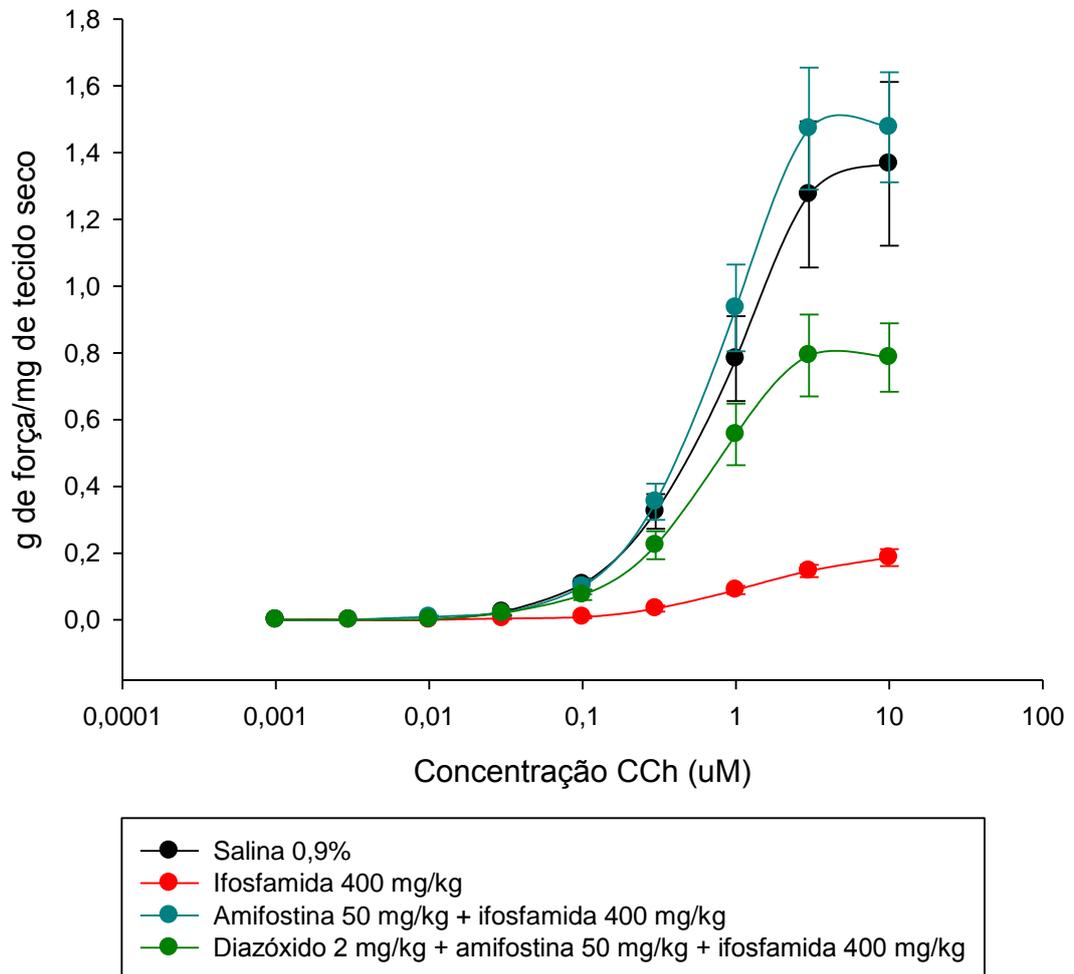
A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de KCl (5 a 120mM) em tecido vesical isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com amifostina (50 mg/kg, s.c.) 30 min antes de ifosfamida ou ainda de animais pré-tratados com diazóxido (2 mg/kg, i.p.) 30 min antes de amifostina e 1h antes de ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

Figura 30 – **Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com KCl: efeito do diazóxido sobre o pré-tratamento com glibenclamida de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



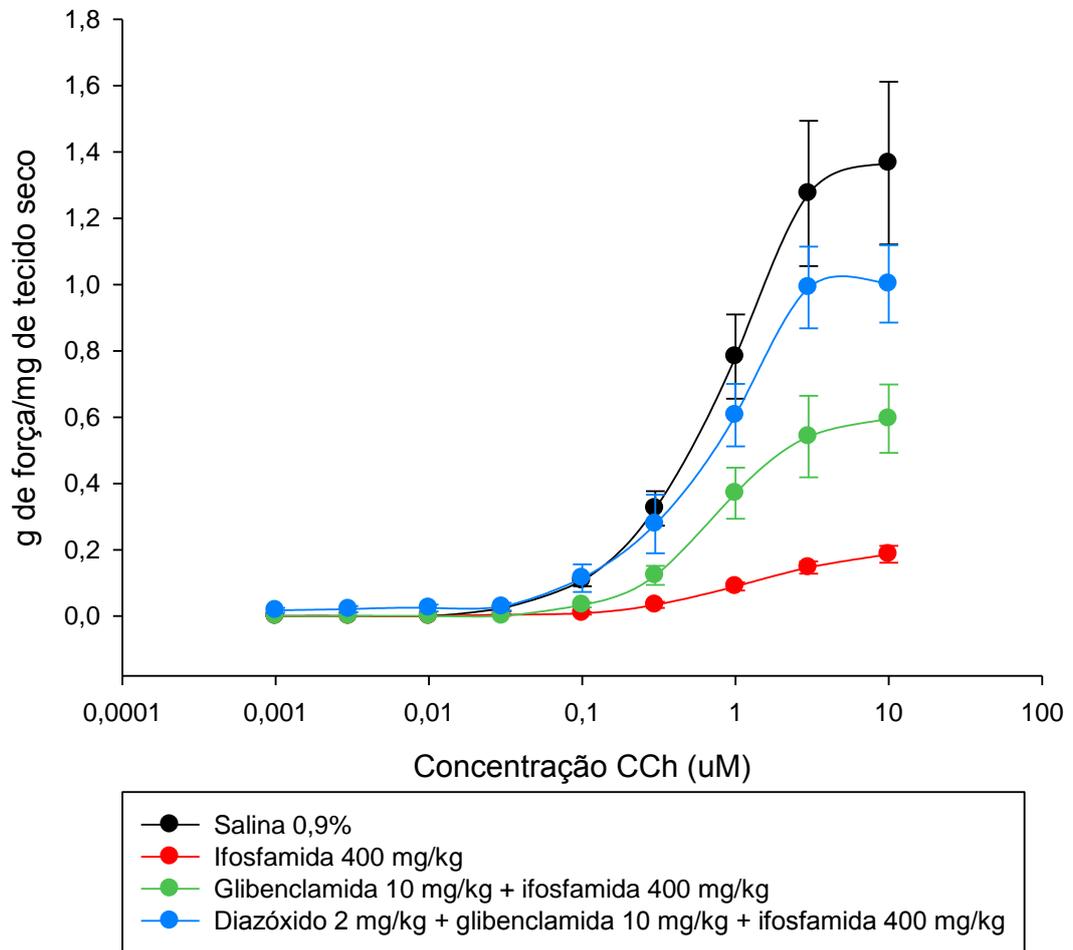
A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de KCl (5 a 120mM) em tecido vesical isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com glibenclamida (10 mg/kg, v.o.) 30 min antes de ifosfamida ou ainda de animais pré-tratados com diazóxido (2 mg/kg, i.p.) 30 min antes de glibenclamida e 1h antes de ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

Figura 31 – **Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito do diazóxido sobre o pré-tratamento com amifostina de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de CCh (0,001 a 0,10uM) em tecido vesical isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com amifostina (50 mg/kg, s.c.) 30 min antes de ifosfamida ou ainda de animais pré-tratados com diazóxido (2 mg/kg, i.p.) 30 min antes de amifostina e 1h antes de ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

Figura 32 – **Curvas concentração-efeito de tiras isoladas de bexiga ao estímulo com CCh: efeito do diazóxido sobre o pré-tratamento com glibenclamida de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.**



A responsividade contrátil do tecido vesical foi determinada através de adição de concentrações cumulativas de CCh (0,001 a 0,10uM) em tecido vesical isolado obtido de animais tratados 12h antes com salina ou ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Curvas concentração-efeito também foram obtidas de tecido isolado de animais pré-tratados com glibenclamida (10 mg/kg, v.o.) 30 min antes de ifosfamida ou ainda de animais pré-tratados com diazóxido (2 mg/kg, i.p.) 30 min antes de glibenclamida e 1h antes de ifosfamida. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=8).

b) Análise de cistometrograma contínuo

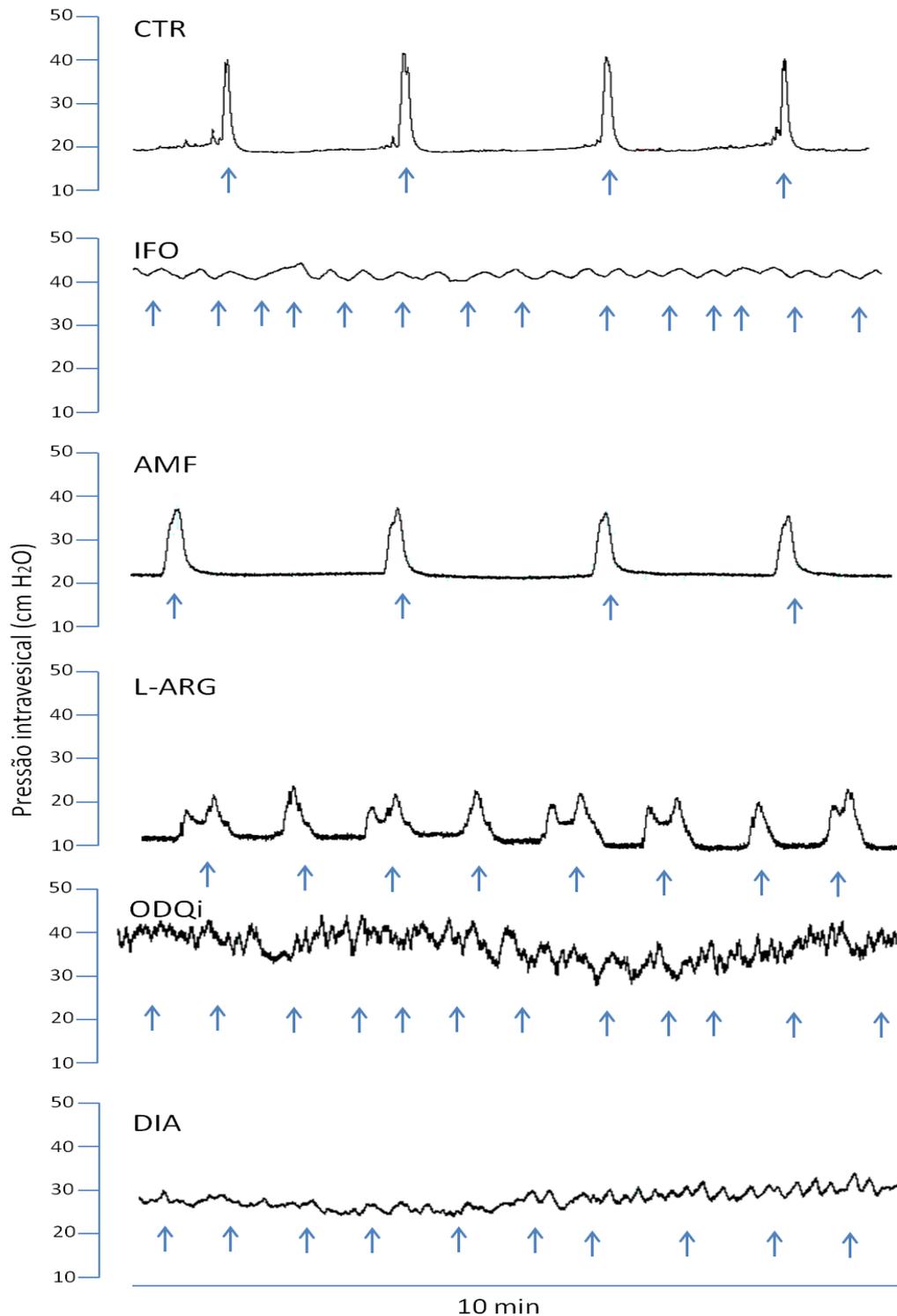
A análise dos traçados cistometrográficos de animais que receberam o pré-tratamento com diazóxido mostrou que esta substância, além de provocar alterações inflamatórias importantes, o aumento do peso úmido vesical e diminuição da resposta contrátil de tiras de bexigas, também provocou uma mudança do padrão urodinâmico de animais anestesiados. Ocorreu um aumento da frequência de micção de $6,5 \pm 0,8$ (AMF) para $14,50 \pm 1,28$ micções/15 min (DIAZ), $p < 0,001$ (Tabela 6). Os traçados cistometrográficos deste grupo mantiveram padrão semelhante ao grupo IFO, sem contrações associadas a eventos de micção e com pressão basal de enchimento relativamente alta ($32,57 \pm 2,8$ cmH₂O), quando comparada ao grupo CTR ($20,58 \pm 7,94$ cmH₂O, $p < 0,001$) (Figura 33).

Tabela 6 - **Parâmetros de cistometrograma contínuo de camundongos anestesiados.**

Parâmetro:	Pressão basal de enchimento (cm H ₂ O)	Amplitude de contração (cm H ₂ O)	Frequência de micção (micções/15 min)
CTR (<i>salina</i>)	$20,58 \pm 3,94$	$21,78 \pm 3,52$	$5,66 \pm 0,84$
IFO (<i>ifosfamida</i>)	$42,36 \pm 2,92^a$	—	$18,0 \pm 1,06^a$
AMF (<i>amifostina+ifosfamida</i>)	$21,12 \pm 3,87^b$	$14,57 \pm 3,67$	$6,5 \pm 0,8^b$
L-ARG (<i>l-arginina+amifostina+ifo</i>)	$11,82 \pm 1,22^b$	$12,02 \pm 2,46$	$11,16 \pm 1,6^c$
ODQi (<i>ODQ+ifosfamida</i>)	$38,54 \pm 3,32$	—	$13,06 \pm 1,57$
DIAZ (<i>diazóxido+ amifostina+ifo</i>)	$32,57 \pm 2,81$	—	$14,5 \pm 1,28^c$

12h após injeção intraperitoneal de ifosfamida (400 mg/kg, i.p.) os traçados cistometrográficos foram obtidos para análises dos parâmetros de pressão basal de enchimento, amplitude de contração e frequência de micção. Observa-se que não foram atribuídos valores para os grupos IFO e DIAZ no parâmetro de amplitude de contração visto que as gravações não mostraram contrações evidentes associadas aos eventos de micção. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=6). ^a $P < 0,05$ em relação a CTR, ^b $P < 0,05$ em relação a IFO e ^c $P < 0,05$ em relação a AMF e a CTR. Os dados foram analisados pelo teste de Holm Sidak (ANOVA).

Figura 33 – **Traçados cistometrográficos.**



Gravações de registro de pressão intravesical de animais tratados com salina (**CTR**) e de animais tratados com ifosfamida (400 mg/kg, i.p.) (**IFO**); amifostina (50 mg/kg, s.c.) + IFO (**AMF**); l-arginina (600 mg/kg, i.p.) + AMF + IFO (**L-ARG**); ODQ (2mg/kg, v.o.) + IFO; (**ODQi**) ou diazóxido (2 mg/kg, i.p.) + AMF + IFO (**DIA**). Setas abaixo dos traçados indicam os eventos de micção. As calibrações foram ajustadas de acordo com a escala vertical para pressão em cmH₂O. O período de gravação para todos os traçados foi equivalente a dez minutos.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas, os avanços no diagnóstico e no tratamento do câncer têm produzido um aumento considerável na sobrevivência dos pacientes. Só nos Estados Unidos, a sobrevivência triplicou desde 1971, com uma taxa de crescimento de 2% ao ano. O câncer, quando diagnosticado, deixou de ser uma sentença de morte automática. No entanto, esse desenvolvimento positivo trouxe consigo novos problemas. Uma pesquisa da Fundação Lance Armstrong (LAF) em 2004, envolvendo sobreviventes de câncer nos EUA mostrou que outros aspectos do câncer, incluindo depressão e medo da recidiva, além das sequelas físicas dos efeitos colaterais do tratamento ou dos efeitos secundários da doença tais como dor crônica, infertilidade e disfunção sexual, preocupações financeiras e problemas de emprego muitas vezes representam desafios maiores do que o próprio câncer. Não obstante, este mesmo período foi marcado por progressos na pesquisa da quimioproteção, cujo principal fundamento na terapia do câncer é o de reduzir os efeitos colaterais indesejáveis da droga sob julgamento, sem afetar sua eficácia (JENA *et al.*, 2010).

O conhecimento da cascata de mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da cistite hemorrágica, assim como de outros efeitos colaterais provocados por agentes antineoplásicos tornou-se um importante objetivo a ser alcançado no sentido de se descobrir terapias eficientes capazes de diminuir ou eliminar as consequências deletérias e limitantes dos efeitos colaterais da quimioterapia do câncer.

Nesse contexto, o LAFICA deixou contribuição importante ao propor uma cascata de mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica consequente ao uso de ciclofosfamida ou ifosfamida. Esta cascata encontra-se muito bem descrita em recente revisão publicada pelo grupo (RIBEIRO *et al.*, 2012). Outra importante contribuição do LAFICA foi o

estabelecimento de um modelo experimental que efetivamente e com parâmetros e conceitos farmacológicos pudesse demonstrar que o metabólito acroleína quando injetado intravesicalmente em ratos ou camundongos fosse capaz de reproduzir com toda fidedignidade os achados inflamatórios observados no modelo de cistite hemorrágica induzida pela injeção sistêmica de oxazafosforinas (BATISTA *et al.*, 2006).

No presente estudo foi possível se demonstrar que a injeção intraperitoneal de ifosfamida além de promover todas aquelas já muito bem estudadas alterações inflamatórias, foi também capaz de provocar, nas bexigas removidas e estudadas *in vitro*, um marcante diminuição da força contrátil frente a reconhecidos estímulos indutores de contratilidade tais como cloreto de potássio e carbacol. Dados semelhantes já haviam sido mostrados com ciclofosfamida, mas não com ifosfamida (HU *et al.*, 2002). Entretanto, o que os outros estudos não haviam mostrado é que o mesna, além de ser um ótimo protetor das alterações inflamatórias, razão pela qual ele é utilizado na prática clínica, também o é das alterações funcionais, não menos importantes nesta patologia (MACEDO *et al.*, 2010).

Além do estudo funcional que tomou como parâmetro a contratilidade de tiras de bexigas de animais com cistite induzida, foram estudadas também as alterações funcionais através da análise urodinâmica *in vivo* em animais anestesiados. Dessa forma foi também possível se demonstrar que ifosfamida foi capaz de promover o aumento da frequência dos eventos de micção e, mais uma vez, demonstrou-se que o mesna também bloqueou totalmente esse outro parâmetro funcional alterado na cistite experimental, o qual mimetiza totalmente aquilo que é observado na correspondente patologia humana.

Nosso laboratório havia demonstrado previamente um efeito protetor da amifostina sobre os eventos inflamatórios observados na cistite induzida por ifosfamida e também naquela provocada pela injeção intravesical de acroleína (BATISTA *et al.*, 2007). Diante dos nossos novos estudos com funcionalidade

na cistite experimental, tornou-se racional avaliar se amifostina também inibia as alterações da função vesical.

Os resultados ora apresentados, além de confirmarem a eficácia da amifostina em promover a proteção do tecido vesical contra os eventos inflamatórios clássicos da cistite desencadeada pela ifosfamida, mostraram também que amifostina foi capaz de prevenir significativamente a diminuição da responsividade de tiras de bexigas com cistite ao estímulo contrátil do agonista colinérgico carbacol e de potássio, além de restabelecer para a normalidade o padrão urodinâmico modificado na vigência de cistite. Até onde foi possível investigar, esse efeito da amifostina ainda não havia sido demonstrado.

É bem conhecido que o processo inflamatório vesical provocado pela ciclofosfamida ocorre concomitante ao desenvolvimento de hiperatividade vesical caracterizada pela diminuição da capacidade de armazenamento de urina e conseqüente aumento da frequência de micção (LECCI *et al.*, 1994). Alguns mecanismos deste processo têm sido desvendados. Hu e colaboradores demonstraram que as prostaglandinas sintetizadas no desenvolvimento da CH induzida por ciclofosfamida podem ativar ou sensibilizar os nervos aferentes, alterando o limiar do reflexo de micção. Além disso, um inibidor específico da enzima COX-2 foi capaz de diminuir ou eliminar as alterações na disfunção do trato urinário inferior nesta mesma patologia (HU *et al.*, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos pelos pesquisadores do LAFICA utilizando experimentos de contratilidade em tiras de bexigas e através de análise de cistometrograma contínuo em animais com cistite induzida por ifosfamida. Os autores sugeriram que prostaglandinas estavam envolvidas nesse fenômeno, desde que seu bloqueio com inibidores seletivo e não seletivo de COX-2 atenuou significativamente as alterações funcionais (MACEDO *et al.*, 2010).

O NO é uma molécula sinalizadora gasosa que se difunde rapidamente nas membranas e regula uma ampla variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos. Apesar da compreensão que o NO seria provavelmente o

mediador final da cistite induzida pelas oxazafosforinas, os seus alvos moleculares e os mecanismos de proteção celular que estariam envolvidos neste processo ainda não foram completamente esclarecidos. Como citado em outro momento, foi demonstrado que a iniciação da hiperreflexia vesical associada ao tratamento com ciclofosfamida é um processo dependente do aumento da expressão, a nível neuronal, da enzima NOS.

No sentido de se investigar o envolvimento do NO no efeito protetor da amifostina, experimentos foram delineados utilizando-se uma maior oferta do substrato para a síntese de NO, a L-arginina, e depois um inibidor da enzima NOS, a aminoguanidina. Em assim sendo, foi possível observar-se que o pré-tratamento com L-arginina foi capaz de reverter o efeito protetor da amifostina tanto sobre as clássicas alterações inflamatórias como sobre as modificações motoras vesicais observadas na cistite induzida por ifosfamida. Adicionalmente, o fato da administração de aminoguanidina previamente à ifosfamida causar um efeito protetor semelhante ao demonstrado anteriormente para a amifostina, e que em ambas as situações houve reversão pela L-arginina, nos permitem sugerir que possivelmente o efeito protetor da amifostina parece envolver o bloqueio da síntese de NO.

De fato, dados recentes do nosso laboratório, ainda não publicados, reforçam essa hipótese desde que revelam a presença de imunoexpressão de NOS induzida em amostras de bexigas de animais portadores de cistite hemorrágica provocada pela ifosfamida e uma atenuação significativa dessa imunoexpressão quando do tratamento prévio com amifostina.

Outros dados recentes do nosso laboratório dão conta de que o bloqueio da síntese de NO por L-NAME inibe a nocicepção visceral observada nos animais com cistite hemorrágica e que a L-arginina reverte tal efeito, o que sugere que o NO parece também participar dos mecanismos da dor visceral. Utilizando o mesmo modelo experimental de cistite, os mesmos autores demonstraram que o bloqueio dos receptores TRPA1, envolvidos na nocicepção, com o composto HC-030031, promoveu uma atenuação significativa na nocicepção visceral sendo que tal efeito foi independente da

geração de NO, sugerindo que vias diferentes de nocicepção parecem estar atuando na dor vesical induzida por agentes antineoplásicos (PEREIRA *et al.*, 2012).

A esta altura nos perguntamos se a aludida participação do NO neste efeito protetor da amifostina sobre as alterações inflamatórias e funcionais, envolvia a geração de GMP-cíclico. Para responder a esta questão, utilizou-se como ferramenta farmacológica um agente bloqueador da guanilato-ciclase do GMPc, o composto ODQ. Dessa forma, demonstrou-se que tal bloqueio por si só foi capaz de promover uma atenuação parcial, porém, significativa dos eventos inflamatórios da cistite e que o tratamento com ODQ concomitante à amifostina não foi capaz de reverter o efeito protetor desta última e nem de potenciar esta proteção. Por outro lado, o tratamento com ODQ associado à amifostina não modificou de forma significativa a capacidade deste último agente em reverter a hipocontratibilidade *in vitro* das bexigas de animais tratados com ifosfamida. Este dado parece sugerir que a participação do NO não envolve a via NO-GMPc.

O papel de canais de potássio dependentes de ATP na CH induzida por ciclofosfamida havia sido demonstrado anteriormente e de forma clara por Lima-Júnior e colaboradores, uma vez que estes autores mostraram que o diazóxido, um conhecido bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP, foi capaz de inibir de forma significativa os eventos inflamatórios e a hiperalgesia observados na CH. Este efeito foi revertido pelo pré-tratamento com a glibenclamida, uma substância ativadora dos canais de potássio. Foi demonstrado ainda que a α,β -amirina, um composto terpenóide derivado de plantas, atenuou a dor visceral e a formação de edema através de mecanismos que envolviam o bloqueio da liberação de substância P e a abertura de canais K^+ ATP-dependentes (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2007).

À luz destes conceitos, decidiu-se avaliar a participação dos canais de potássio dependentes de ATP nas propriedades uroprotetoras da amifostina na disfunção vesical da CH induzida por ifosfamida. Os resultados mostraram que o diazóxido inibiu significativamente o efeito protetor da amifostina sobre

o peso úmido vesical e sobre as alterações macroscópicas e microscópicas de edema e hemorragia observados na cistite por ifosfamida. Estes achados sugerem que amifostina atua, pelo menos em parte, ativando canais de K^+ ATP dependentes.

Tal efeito também foi claramente observado no processo de reestabelecimento da função vesical pela amifostina. A força contrátil de tiras de bexigas de animais que receberam tratamento com diazóxido seguido de amifostina e ifosfamida manteve um padrão intermediário em relação ao grupo de animais com cistite hemorrágica e ao grupo protegido pela amifostina. No entanto, os valores são significativamente menores que este último. Isto significa que houve uma inibição importante do efeito da amifostina sobre as tiras de bexiga, ainda que tenha sido a nível parcial, o que sugere que provavelmente este evento atua paralelamente a outros processos, com a participação de outros mediadores e receptores.

A análise dos traçados cistometrográficos de animais anestesiados com uretana mostrou que durante a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida foram observadas alterações comprometedoras da função motora vesical de camundongos. Não encontramos na literatura nenhum estudo em camundongos que tenha utilizado tal metodologia. Enfatizamos que o desenvolvimento de modelos em camundongos torna sempre possível a utilização de animais modificados geneticamente, podendo facilitar a descoberta de mecanismos envolvidos na patogênese dessa patologia.

De fato, a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida foi confirmada pela presença de edema, descamação epitelial e hemorragia no tecido vesical. Além disso, a análise cistometrográfica revelou alterações importantes na atividade da bexiga que foram observadas principalmente através do aumento da pressão de enchimento vesical e do aumento da frequência miccional. Neste grupo experimental, todos os traçados obtidos apresentaram um padrão irregular, mesmo após um longo período de estabilização em que o animal se adaptasse melhor à condição experimental. Estes resultados corroboram com estudos prévios que mostram que ocorre o

aumento na excitabilidade do músculo detrusor na ocorrência de um processo inflamatório.

Demonstrou-se também no presente estudo que as tiras de bexigas de animais tratados com ifosfamida perderam a habilidade geral da musculatura em produzir respostas contráteis. Em complementação a este raciocínio, a análise por cistometrograma contínuo deste grupo confirmou a incapacidade do músculo liso vesical de produzir contrações provocadas pelo estímulo de estiramento, uma vez que não foi possível observar, na maioria dos traçados cistometrográficos, a presença de contrações evidentes associadas aos eventos de micção. Aparentemente o tratamento com ifosfamida proporcionou a perda da capacidade de armazenamento de urina pela bexiga, uma vez que o volume de urina eliminado por evento de micção e os intervalos entre estes eventos foram bastante reduzidos.

O pré-tratamento com a amifostina restabeleceu o padrão urodinâmico dos traçados de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Nesta análise, a presença de contrações evidentes e regulares associadas ao evento da micção consistem em um dado relevante no que diz respeito ao restabelecimento da condição motora vesical, ainda que a amplitude de contração, em geral, tenha sido menor em relação ao grupo de animais saudáveis.

Um achado curioso do nosso estudo mostrou que o pré-tratamento com L-arginina de animais protegidos da CH com amifostina, apesar de manter a responsividade de tiras de bexiga ao estímulo contrátil tão reduzida quanto a do grupo tratado apenas com ifosfamida, não foi capaz de bloquear completamente o efeito da amifostina sobre as alterações urodinâmicas observadas em animais anestesiados. Na análise de cistometrografia deste grupo foi possível observar contrações miccionais nos traçados, no entanto as bexigas foram incapazes de atingir valores de pressão máxima elevados. Isto pode ser observado quando são considerados os valores de pressão basal de enchimento somada aos de amplitude de contração. Além disso, a frequência

de micção também se manteve elevada, o que mostra que ocorreu uma alteração do padrão urodinâmico deste grupo de animais.

Como citado anteriormente, durante estudo *in vitro* a avaliação da participação do GMPc na disfunção vesical promovida pela ifosfamida, os resultados de contratilidade de tiras de bexigas sugerem que a participação do NO neste processo não envolve a via NO-GMPc. No estudo urodinâmico este fato pôde ser confirmado quando se mostrou, mais uma vez, que o pré-tratamento com ODQ de animais que receberam ifosfamida foi incapaz de inibir as alterações que esta droga promoveu nas bexigas de animais anestesiados.

Na fase final do presente trabalho, ainda no estudo urodinâmico, observou-se que o bloqueio de canais de potássio ATP-dependentes pelo diazóxido foi eficiente em inibir completamente os efeitos da amifostina sobre o padrão urodinâmico alterado dos animais com cistite por ifosfamida. Novamente, todos os animais do grupo mantiveram um padrão urodinâmico alterado, assim como os animais com cistite hemorrágica.

Em resumo, o processo da disfunção motora vesical desencadeada pela ifosfamida é um evento importante no contexto do estudo da fisiopatologia da cistite por ifosfamida, uma vez que as alterações funcionais que são identificadas experimentalmente podem ser associadas a eventos clínicos comuns na correspondente patologia em pacientes submetidos à quimioterapia por oxazafosforinas. Os achados deste trabalho sugerem que a ação protetora da amifostina sobre esta disfunção vesical provocada pela ifosfamida, envolve um bloqueio na formação de óxido nítrico e também da abertura de canais de potássio sensíveis a ATP sem, no entanto, envolver a geração de GMP-c. Os resultados ora apresentados, além de acrescentarem informações inéditas no que diz respeito ao processo que leva à perda da função vesical do trato urinário inferior na CH, poderão direcionar estudos mais aprofundados objetivando identificar os alvos efetores associados ao processo fisiológico de micção.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- I) A amifostina preveniu as alterações urodinâmicas, avaliadas por metodologia de cistometrograma contínuo, de animais com cistite hemorrágica experimental induzida por ifosfamida, bem como a restabeleceu a capacidade do tecido vesical em responder a estímulos contráteis *“in vitro”*.
- II) Tal efeito protetor da amifostina parece ocorrer através da inibição da geração de NO e da abertura de canais de potássio dependentes de ATP sem, no entanto, ocorrer via geração de GMPc.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, K. E. Bladder activation: Afferent mechanisms. **Urology**, v. 59, p. 43-50, 2002.
- ANDERSSON, K. E.; ARNER, A. Urinary bladder contraction and relaxation: Physiology and pathophysiology. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 935–86, 2004.
- ASSREUY, A. M.; MARTINS, G. J.; MOREIRA, M. E.; BRITO, G. A.; CAVADA, B. S.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J. Urol.**, v. 161, n. 6, p. 1988-1993, 1999.
- BATISTA, C. K.; BRITO, G. A.; SOUZA, M. L.; LEITÃO, B. T.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. A model of hemorrhagic cystitis induced with acrolein in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n. 11, p. 1475-1481, 2006.
- BATISTA, C. K.; MOTA, J. M.; SOUZA, M. L.; LEITÃO, B. T.; SOUZA, M. H.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Amifostine and glutathione prevent ifosfamide- and acrolein-induced hemorrhagic cystitis. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 59, p. 71-77, 2007.
- BENNETT, A. H. Cyclophosphamide and hemorrhagic cystitis. **J. Urol.**, v. 111, p. 603-606, 1974.
- BIELICKI, L.; VOELCKER, G.; HOHORST, H.J. Activated cyclophosphamide: an enzyme-mechanism-based suicide inactivator of DNA polymerase/3'-5' exonuclease. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 107, n. 3, p.195-198, 1984.
- BIRDER, L. A.; BARRICK, S. R.; ROPPOLO, J. R. Feline interstitial cystitis results in mechanical hypersensitivity and altered ATP release from bladder urothelium. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 285, p.423-429, 2003.
- BRADE, W. P.; HERDRICH, K.; VARINI, M. Ifosfamide - pharmacology, safety and therapeutic potential. **Cancer Treat. Rev.**, v. 12, p. 1, 1985.
- BROCK, N.; HILGARD, P.; PEUKERT, M.; POHL, J.; SINDERMAN, H. Basis and new developments in the field of oxazaphosphorines. **Cancer Invest.**, v. 6, n. 5, p. 513-532, 1988.
- BUENO, L.; FIORAMONTI, J.; DELVAUX, M.; FREXINOS, J. Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: from basic to clinical investigations. **Gastroenterology**, v. 112, p. 1714–1743, 1997.

BULTITUDE, M. I.; HILLS, N. H.; SHUTTLEWORTH, K. E. Clinical and experimental studies on the action of prostaglandins and their synthesis inhibitors on detrusor muscle in vitro and in vivo. **Br. J. Urol.**, v. 48, n. 7, p. 631-637, 1976.

BURKE, D. A.; STODDART, J. C.; WARD, M. K.; SIMPSON, C. G. Fatal pulmonary fibrosis occurring during treatment with cyclophosphamide. **Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)**, v. 285, p. 696, 1982.

CALABRO-JONES, P. M.; AGUILERA, J. A.; WARD, J. F.; SMOLUK, G. D.; FAHEY, R. C. Uptake of WR-2721 derivatives by cells in culture: identification of the transported form of the drug. **Cancer Res.**, v. 48, n. 13, p. 3634-3640, 1988.

CANCER survivors: living longer, and now, better. **Lancet**, v. 364, n. 9452, p. 2153-2154, 2004.

CHUANG, Y.; YOSHIMURA, N.; HUANG, C.; WUA, M.; CHIANG, P.; CHANCELLOR, M. B. Botulinum Toxin A Administration Inhibits COX-2 and EP4 Expression and Suppresses Bladder Hyperactivity in Cyclophosphamide-Induced Cystitis in Rats. **Eur. Urol.**, v. 56, p. 150-167, 2009.

COLEMAN, N.; BUMP, E.; KRAMER, R. Chemical modifiers of cancer treatment. **J. Clin. Oncol.**, v. 6, p. 709-733, 1988.

COOPER, A. J. D.; WHITW, D. A.; MATTHAY, R. A. Drug-induced pulmonary disease. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 133, p. 321-340, 1986.

COUTINHO, S. V.; GEBHART, G. F. A role of spinal nitric oxide in mediating visceral hyperalgesia in the rat. **Gastroenterology**, v. 116, p. 1399-1408, 1999.

COX, P. J. Cyclophosphamide cystitis: Identification of acrolein as the causative agent. **Biochem. Pharmacol.**, v. 28, p. 2045-2049, 1979.

CREAVEN, P. J.; ALLEN, L. M.; COHEN, M. H.; NELSON, R. L. Studies on the clinical pharmacology and toxicology of isophosphamide (NSC-109427). **Cancer Treat. Rep.**, v. 60, p. 445-449, 1976.

DE GROAT, W. C. The urothelium in overactive bladder: passive bystander or active participant? **Urology**, v. 64, p. 7-11, 2004.

DECHANT, K. L.; BROGDEN, R. N.; PILKINGTON, T.; FAULDS, D. Ifosfamide/MESNA. A review of its antineoplastic activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cancer. **Drugs**, v. 42, p. 428-467, 1991.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, p. 125–131, 1995.

ELZIMAITY, M.; SALIBA, R.; CHAN, K.; SHAHJAHAN, M.; CARRASCO, A.; KHORSHID, O.; CALDERA, H.; COURIEL, D.; GIRALT, S.; KHOURI, I.; IPPOLITI, C.; CHAMPLIN, R.; DE LIMA, M. Hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: donor type matters. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4674-4680, 2004.

FERRARA, F.; COPIA, C.; ANNUNZIATA, M.; DI NOTO, R.; RUSSO, C.; PALMIERI, S.; SPASIANO, A.; DEL VECCHIO, L. Complete remission of refractory anemia following a single high dose of cyclophosphamide. **Ann.Hematol.**, v. 78, n. 2, p. 87-88, 1999.

FRAISER, L. H.; KANEKAL, S.; KEHRER, J. P. Cyclophosphamide toxicity characterizing and avoiding the problem. **Drugs**, v. 42, n. 5, p. 781-795, 1991.

GERSON, R.; SERRANO, A.; VILLALOBOS, A.; STERNBACH, G. L.; VARON, J. Acute pancreatitis secondary to ifosfamida. **J. Emerg. Med.**, v. 15, p. 645–647, 1997.

GIFONI, M. A. C. **Envolvimento da pentraxina 3 (PTX3) na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

GIGLIO, D.; DELBRO, D. S.; TOBIN, G. On the functional role of muscarinic M2 receptors in cholinergic and purinergic responses in the rat urinary bladder. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 428, p. 357-364, 2001.

GOMES, T. N.; SANTOS, C. C.; SOUZA-FILHO, M. V.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Participation of TNF-alpha and IL-1 in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 1103-1108, 1995.

GOREN, M. P.; MCKENNA, L. M.; GOODMAN, T. L. Combined intravenous and oral mesna in outpatients treated with ifosfamida. **Cancer Chemother.Pharmacol.**, v. 40, n. 5, p. 371-375, 1997.

GRDINA, D. J.; KATAOKA, Y.; MURLEY, J. S. Amifostine: mechanisms of action underlying cytoprotection and chemoprevention. **Drug Metabol. Drug Interact.**, v. 16, n. 4, p. 237-279, 2000.

HADJIBABAIE, M.; ALIMOGHADDAM, K.; SHAMSHIRI, A. R.; IRAVANI, M.; BAHAR, B.; MOUSAVI, A.; JAHANI, M.; KHODABANDEH, A.; ANVARI, Y.; GHOLAMI, K.; GHAVAMZADEH, A. Continuous bladder irrigation prevents hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Urol. Oncol.**, v. 26, p. 43-46, 2008.

HASKELL, M. H. Drug used in cancer chemotherapy. **Cancer Treat.**, v. 3, p. 44-51, 1990.

HASSAN, Z.; REMBERGER, M.; SVENBERG, P.; ELBANDER, M.; OMAZIC, B.; MATTSSON, J.; CONRAD, R.; SVAHN, B. M.; AHLGREN, A.; SAIRAFI, D.; ASCHAN, J.; LE BLANC, K.; BARKHOLT, L.; RINGDEN O. Hemorrhagic cystitis: a retrospective single-center survey. **Clin. Transplant.**, v. 21, p. 659-667, 2007.

HENSLEY, M. L.; SCHUCHTER, L. M.; LINDLEY, C.; MEROPOL, N. J.; COHEN, G. I.; BRODER, G.; GRADISHAR, W. J.; GREEN, D. M.; LANGDON, R. J.; MITCHELL, R. B.; NEGRIN, R.; SZATROWSKI, T. P.; THIGPEN, J. T.; VON HOFF, D.; WASSERMAN, T. H.; WINER, E. P.; PFISTER, D. G. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guidelines for the Use of Chemotherapy and Radiotherapy Protectants. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, p. 3333-3335, 1999.

HIGGS, D.; NAGY, C.; EINHARN, L. H. Ifosfamide: a clinical review. **Semin. Oncol. Nurs.**, v. 5, n. 2, p. 70-77, 1989.

HILGARD, P. Current status of oxazaphosphorine analogue development. **Cancer Treat. Rev.**, v. 14, n. 3/4, p. 187-192, 1987.

HILL, D. L.; LASTER JR, W. R.; KIRK, M. C.; EL-DAREER, S.; STRUCK, R. F. Metabolism of iphosphamide (2-(2-chloroethylamino)-3-(2-chloroethyl)tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine 2-oxide) and production of a toxic iphosphamide metabolite. **Cancer Res.**, v. 33, n. 5, p. 1016-1022, 1973.

HILTON, J. Role of aldehyde dehydrogenase in cyclophosphamide-resistant L1210 leukemia. **Cancer Res.**, v. 44, n. 11, p. 5156-5160, 1984.

HINATA, N.; SHIRAKAWA, T.; OKADA, H.; ACHAYA, B.; KAMIDONO, S.; GOTOH, A. Quantitative analysis of the levels of expression of muscarinic receptor subtype RNA in the detrusor muscle of patients with overactive bladder. **Mol. Diagn.**, v. 8, p. 17-22, 2004.

HOHORST, H. J.; BIELICKI, L.; VOELCKER, G. The enzymatic basis of cyclophosphamide specificity. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 25, p. 99-122, 1986.

HOSPERS, G. A.; EISENHAUER, E. A.; VRIES, E. G. The sulfhydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio-and chemoprotective agents. A review, indications for use and prospects. **Br. J. Cancer**, v. 80, p. 629-638, 1999.

HOWS, J.; MEHTA, A.; GORDON-SMITH, E. C. Mesna versus forced diuresis to prevent cyclophosphamide induced haemorrhagic cystitis in marrow transplant patients (preliminary data). **Cancer Treat.Rev.**, v. 10, Suppl.A, p. 53-56, 1983.

HU, V. Y.; MALLEY, S.; DATTILIO, A.; FOLSOM, J. B.; ZVARA, P.; VIZZARD, M. A. COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. **Am. J. Physiol. Regul.Integr.Comp. Physiol.**, v. 284, p. R574-R585, 2002.

HUNG, M. C.; HUNG, G. Y.; LIN, P. C.; TIU, C. M.; TIEN, Y. C. Acute pancreatitis associated with ifosfamide. **J. Chin.Med. Assoc.**, v. 70, p. 176-179, 2007.

HWANG, W. Y. K.; KOH, L. P.; NG, H. J.; TAN, P. H. C.; CHUAH, C. T. H.; FOOK, S. C.; CHOW, H.; TAN, K. W.; WONG, C.; TAN, C. H.; GOH, Y. T. A randomized trial of amifostine as a cytoprotectant for patients receiving myeloablative therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v. 34, p. 51-56, 2004.

ISHIZUKA, O.; MATTIASSON, A.; ANDERSSON, K. E. Prostaglandin E2-induced bladder hyperactivity in normal, conscious rats: involvement of tachykinins? **J. Urol.**, v. 153, n. 6, p. 2034-2038, 1995.

IZRAELI, S.; ADAMSON, P. C.; BLANEY, S. M.; BALIS, F. M. Acute pancreatitis after ifosfamide therapy. **Cancer**, v. 74, p. 1627-1628, 1994.

JENA, G.; VIKRAM, A.; TRIPATHI, D. N.; RAMARAO, P. Use of chemoprotectants in chemotherapy and radiation therapy: the challenges of selecting an appropriate agent. **Integr.Cancer Ther.**, v. 9, n. 3, p.253-258, 2010.

JOHNSON, W. W.; MEADOWNA, D. C. Urinary-bladder fibrosis and telangiectasia associated with long-term cyclophosphamide therapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 284, n. 6, p. 290-294, 1971.

JUNQUEIRA-JUNIOR, J.; JUNQUEIRA, A. F.; MEDEIROS, J. V.; BARBOSA, S. H.; NOGUEIRA, A. C.; MOTA, J. M.; SANTANA, A. P.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; LIMA-JUNIOR, R. C.; SOUZA, M. H. Role of capsaicin-

sensitive primary afferent neurons and non-protein sulphhydryl groups on gastroprotective effect of amifostine against ethanol-induced gastric damage in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 56, n. 2, p. 314-322, 2011.

KAIJSER, G. P.; BEIJNEN, J. H.; BULT, A.; WIESE, G.; DE KRAKER, J.; KEIZER, H. J.; UNDERBERG, W. J. Gas chromatographic determination of 2- and 3-dechloroethylifosfamide in plasma and urine. **J. Chromatogr.**, v. 583, n. 2, p. 175-182, 1992.

KAIJSER, G. P.; TER RIET, P. G.; DE KRAKER, J.; BULT, A.; BEIJNEN, J. H.; UNDERBERG, W. J. Determination of 4-hydroxyifosfamide in biological matrices by high-performance liquid chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 15, n. 6, p. 773-781, 1997.

KAKIZAKI, H.; DE GROAT, W. C. Role of spinal nitric oxide in the facilitation of the micturition reflex by bladder irritation. **J. Urol.**, v. 155, n. 1, p. 355-360, 1996.

KATZ, A.; EPELMAN, S.; ANELLI, A.; GORENDER, E. F.; CRUZ, S. M.; OLIVEIRA, R. M.; MARQUES, L. A. A prospective randomized evaluation of three schedules of mesna administration in patients receiving an ifosfamide-containing chemotherapy regimen: sustained efficiency and simplified administration. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 121, n. 2, p. 128-131, 1995.

KLASTERSKY, J. Side effects of ifosfamide. **Oncology**, v. 65, p. 7-10, 2003.

KOC, S.; HAGGLUND, H.; IRETON, R. C.; PEREZ-SIMON, J. A.; COLLINS, S. J.; APPELBAUM, F. R. Successful treatment of severe hemorrhagic cystitis with cystectomy following matched donor allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v. 26, p. 899-901, 2000.

KORKMAZ, A.; OTER, S.; SADIR, S.; COSKUN, O.; TOPAL, T.; OZLER, M.; BILGIC, H. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. **J. Urol.**, v. 173, p. 1793-1796, 2005.

KOUVARIS, J. R.; KOULOULIAS, V. E.; VLAHOS, L. J. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. **Oncologist**, v. 12, n. 6, p. 738-747, 2007.

LAGOS, P.; BALLEJO, G. Role of spinal nitric oxide synthase-dependent processes in the initiation of the micturition hyperreflexia associated with cyclophosphamide-induced cystitis. **Neuroscience**, v. 125, p. 663-670, 2004.

LECCI, A.; BIRDER, L. A.; MEINI, S.; CATALIOTO, R. M.; TRAMONTANA, M.; GIULIANI, S.; CRISCUOLI, M.; MAGGI, C. A. Pharmacological evaluation of the role of cyclooxygenase isoenzymes on the micturition reflex following experimental cystitis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, n. 2, p. 331-338, 2000.

LECCI, A.; GIULIANI, S.; SANTICIOLO, P.; MAGGI, C. A. Involvement of spinal tachykinin NK1 and NK2 receptors in detrusor hyperreflexia during chemical cystitis in anaesthetized rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 259, p. 129-135, 1994.

LIMA, M. V. A. **Estudo Clínico-Laboratorial do Efeito da Dexametasona e do 2-Mercaptoetano Sulfonato Sódico (Mesna) na Profilaxia da Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida**. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

LIMA, M. V. A. **Estudos dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1994.

LIMA, M. V.; FERREIRA, F. V.; MACEDO, F. Y.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Histological changes in bladders of patients submitted to ifosfamide chemotherapy even with MESNA prophylaxis. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 59, p. 643-650, 2007.

LIMA-JUNIOR, R. C. P.; SOUSA, D. I. M.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, a, b-amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK1-receptors, and K⁺ATP channels. **Inflamm. Res.**, v. 56, n. 12, p. 487-494, 2007.

LOEHRER, P. J. (Chairman). Ifosfamide. **Semin. Oncol.**, v. 17, Suppl. 4, p. 1-79, 1990.

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

MACEDO, F. Y.; BALTAZAR, R.; MOURAO, L. C.; ALMEIDA, P. R.; MOTA, J. M.; SCHMITT, F. C.; RIBEIRO, R. A. Induction of COX-2 expression by acrolein in the rat model of hemorrhagic cystitis. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 59, p. 425-430, 2008b.

MACEDO, F. Y.; MOURAO, L. T.; FREITAS, H. C.; LIMA-JUNIOR, R. C.; WONG, D. V.; ORIA, R. B.; VALE, M. L.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Interleukin-4 modulates the inflammatory response in ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Inflammation**, v. 35, p. 297-307, 2011.

MACEDO, F. Y.; MOURAO, L. T.; PALHETA, R. C.; JUCA, D. M.; LIMA-JUNIOR, R. C.; SÁ NETO, J.; MAGALHÃES, P. J.; SANTOS, A. A.; SOUZA, M. H.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Cyclooxygenase-2 contributes to functional changes seen on experimental hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide in rat urinary bladder. **Cancer Chemother.Pharmacol.**, v. 67, p. 935-943, 2010.

MAGGI, C. A.; LECCI, A.; SANTICIOLI, P.; DEL BIANCO, E.; GIULIANI, S. Cyclophosphamide cystitis in rats: Involvement of capsaicin-sensitive primary afferents. **J. Auton.Nerv.Syst.**, v. 38,p. 201-208, 1992.

MASUMOTO, H.; SIES, H.The reaction of ebselen with peroxyxynitrite.**Chem. Res. Toxicol.**, v. 9, p. 262-267, 1996.

MCCULLOCH, W.; SCHEFFLER, B. J.; SCHEIN, P. S. New protective agents for bone marrow in cancer therapy. **Cancer Invest.**,v. 9, n. 3, p. 279-287, 1991.

MEISENBERG, B.; LASSITER, M.; HUSSEIN, A.; ROSS, M.; VREDENBURG, J. J.; PETERS, W. P. Prevention of hemorrhagic cystitis after high-dose alkylating agent chemotherapy and autologous bone marrow support.**Bone Marrow Transplant.**, v. 14, n. 2, p. 287-291, 1994.

MORAIS, M. M.; BELARMINO-FILHO, J. N.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis - comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 1211-1215, 1999.

MOTA, J. M.; BRITO, G. A.; LOIOLA, R. T.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Interleukin-11 attenuates ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Int. Braz. J. Urol.**, v. 33, p. 704-710, 2007.

NAKAMURA, J.; SHAW, L. M.; BROWN, D. Q. Hydrolysis of WR2721 by mouse liver cell fractions.**Radiat.Res.**, v. 109, n. 1, p. 143-152, 1987.

PATEL, A. R.; SHAH, P. C.; RHEE, H. L.; SASSOON, H.; RAO, K. P. Cyclophosphamide therapy and interstitial pulmonary fibrosis.**Cancer**, v. 38, n. 4, p. 1542-1549, 1976.

PEREIRA, L. M.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; BEM, A. X.; TEIXEIRA, C. G.; GRASSI, L. S.; MEDEIROS, R. P.; MARQUES-NETO, R. D.; CALLADO, R. B.; ARAGÃO, K. S.; WONG, D. V.; VALE, M. L.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Blockade of TRPA1 with HC-030031 attenuates visceral nociception by a mechanism independent of inflammatory resident cells, nitric oxide and the opioid system. **Eur. J. Pain**, v. 17, n. 2, p. 223-233, 2012.

PHILLIPS, F. S.; STERNBERG, S. S.; CRONIN, A. P.; VIDAL, P. M. Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. **Cancer Res.**, v. 21, p. 1577-1589, 1961.

PRATT, C. B.; MEYER, W. H.; JENKINS, J. J.; AVERY, L.; MCKAY, C. P.; WYATT, R. J.; HANCOCK, M. L. Ifosfamide, Fanconi's syndrome, and rickets. **J. Clin. Oncol.**, v. 9, n. 8, p. 1495-1499, 1991.

RENERT, W. A.; BERDON, W. E.; BAKER, D. H. Hemorrhagic cystitis and vesicoureteral reflux secondary to cytotoxic therapy for childhood malignancies. **Am. J. Roentgenol. Radium. Ther. Nucl. Med.**, v. 117, n. 3, p. 664-669, 1973.

RIBEIRO, R. A.; FREITAS, H. C.; CAMPOS, M. C.; SANTOS, C. C.; FIGUEIREDO, F. C.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **J. Urol.**, v. 167, p. 2229-2234, 2002.

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

RIBEIRO, R. A.; SOUZA FILHO, M. V. P.; SANTOS, C. C.; LIMA, M. M. P.; BALLEJO, G.; CUNHA, F. Q. Involvement of Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor in the Pathogenesis of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. In: INTERNATIONAL CANCER CONGRESS, 17th, 1998, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro, 1998. v. 1. p. 227-231.

RICE, A. S. Topical spinal administration of a nitric oxide synthase inhibitor prevents the hyper-reflexia associated with a rat model of persistent visceral pain. **Neurosci. Lett.**, v. 187, n. 2, p. 111-114, 1995.

RODIN, A. E.; HAGGARD, M. E.; TRAVIS, L. B. Lung changes and chemotherapeutic agents in childhood. Report of a case associated with cyclophosphamide therapy. **Am. J. Dis. Child.**, v. 120, n. 4, p. 337-340, 1970.

RUTELLA, S.; PIERELLI, L.; RUMI, C.; BONANNO, G.; MARONE, M.; SICA, S.; CAPOLUONGO, E.; AMEGLIO, F.; SCAMBIA, G.; LEONE, G. T-cell apoptosis induced by granulocyte colony-stimulating factor is associated with retinoblastoma protein phosphorylation and reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. **Exp. Hematol.**, v. 29, n. 4, p. 401-415, 2001.

SAVOYE, C.; SWENBERG, C.; HUGOT, S.; SY, D.; SABATTIER, R.; CHARLIER, M.; SPOTHEIM-MAURIZOT, M. Thiol WR-1065 and disulphide WR-33278, two metabolites of the drug ethylol (WR-2721), protect DNA against fast neutron-induced strand breakage. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 71, n. 2, p. 193-202, 1997.

SCHUCHTER, L. M.; LUGINBUHL, W. E.; MEROPOL, N. J. The current status of toxicity protectants in cancer therapy. **Semin. Oncol.**, v. 19, p. 742-751, 1992.

SHAW, I. C.; GRAHAM, M. I. Mesna – a short review. **Cancer Treat. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 67-86, 1987.

SHAW, L. M.; GLOVER, D.; TURRISI, A.; BROWN, D. Q.; BONNER, H. S.; NORFLEET, A. L.; WEILER, C.; GLICK, J. H.; KLIGERMAN, M. M. Pharmacokinetics of WR-2721. **Pharmacol. Ther.**, v. 39, p. 195–201, 1988.

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

SHROM, S. H.; DONALDSON, M. H.; DUCKETT, J. W.; WEIN, A. J. Formalin treatment for intractable hemorrhagic cystitis. A review of the literature with 16 additional cases. **Cancer**, v. 38, p. 1785, 1976.

SIDAU, B.; SHAW, I. C. Determination of sodium 2-mercaptoethanesulphonate by high-performance liquid chromatography using post-column reaction colorimetry or electrochemical detection. **J. Chromatogr.**, v. 311, n. 1, p. 234-238, 1984.

SOUZA-FILHO, M. V.; LIMA, M. V.; POMPEU, M. M.; BALLEJO, G.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRA, R. A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am. J. Pathol.**, v. 150, p. 247-256, 1997.

STILLWELL, T. J.; BENSON JR, R. C. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis: a review of 100 patients. **Cancer**, v. 61, p. 451-457, 1988.

SUN, Y.; CHAI, T. C. Augmented extracellular ATP signaling in bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 290, p. 27-34, 2006.

TAKAMOTO, S.; SAKURA, N.; NAMERE A. Monitoring of urinary acrolein concentration in patients receiving cyclophosphamide and ifosfamide. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 806, p. 59-63, 2004.

TEUFEL, G.; PFLEIDERER, A. Ifosfamid im bergleich zu endoxan beifrotgeschrittenen ovarilkarzinomin. **Geburtshilfe Frauenheilkd**, v. 36, p. 274-279, 1976.

THEMAN, 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. **Urol. Int.**, v. 42, n. 1, p. 37-43, 1987.

UMA DEVI, P.; PRASANNA, P. G. Radioprotective effect of combinations of WR-2721 and mercaptopropionylglycine on mouse bone marrow chromosomes. **Radiat. Res.**, v. 124, n. 2, p. 165-170, 1990.

UTRACKA-HUTKA, B.; CZOWNICKI, Z. Clinical evaluation of Mitexan in the prevention of urinary tract complications during treatment with Holoxan. **Nowotwory**, v. 30, p. 377-383, 1980.

VAN DER VIJGH, W. J.; KORST, A. E. Amifostine (Ethyol): pharmacokinetic and pharmacodynamic effects in vivo. **Eur. J. Cancer**, v. 32A, p. 26-30, 1996.

VAN DER VIJGH, W. J.; PETERS, G. J. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine (Ethyol): preclinical aspects. **Semin. Oncol.**, v. 21, n. 5, Suppl. 11, p. 2-7, 1994.

VAN DYK, J. J.; FALKSON, H. C.; VAN DER MERWE, A. M.; FALKSON, G. Unexpected toxicity in patients receiving ifosfamide. **Cancer Res.**, v. 34, p. 921-924, 1972.

VIEIRA, M. M.; BRITO, G. A.; BELARMINO-FILHO, J. N.; MCEDO, F. Y.; NERY, E. A.; CUNH, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Use of dexamethasone with mesna for the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Int. J. Urol.**, v. 10, p. 595-602, 2003.

VOELCKER, G.; WAGNER, T.; WIENTZEK, C.; HOHORST, H. J. Pharmacokinetics of "activated" cyclophosphamide and therapeutic efficacies. **Cancer**, v. 54, n. 6, p. 1179-1186, 1984.

VOSE, J. M.; REED, E. C.; PIPPERT, G. C.; ANDERSON, J. R.; BIERMAN, P. J.; KESSINGER, A.; SPINOLO, J.; ARMITAGE, J. O. Mesna compared with continuous bladder irrigation as uroprotection during high-dose chemotherapy and transplantation: a randomized trial. **J. Clin.Oncol.**, v. 11, p. 1306-1310, 1993.

WATSON, N. A.; NOTLEY, R. G. Urological complications of cyclophosphamide.**Br. J. Urol.**, v. 45, n. 6, p. 606-609, 1973.

ZAKI, E. L.; SPRINGATE, J. E.; TAUB, M. Comparative toxicity of ifosfamide metabolites and protective effect of mesna and amifostine in cultured renal tubule cells.**Toxicol.In Vitro**, v. 17, n. 4,p. 397-402, 2003.