

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**MODELO DE CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR INJEÇÃO
INTRAVESICAL DE ACROLEÍNA – EFEITO UROPROTETOR DE COMPOSTOS
TIÓIS (MESNA, GLUTATIONA E AMIFOSTINA)**

CRISTINA KELMA LOIOLA PONTE BATISTA

**Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito
para obtenção do título de Mestre em Farmacologia**

Orientador: RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO

Co-orientador: FERNANDO DE QUEIROZ CUNHA

FORTALEZA

2002

B336m Batista, Cristina Kelma Loiola Ponte
Modelo de Cistite Hemorrágica induzida por injeção intravesical de
Acroleína – Efeito uroprotetor de compostos tióis (Mesna,
Glutathione e Amifostina) / Cristina Kelma Loiola Ponte Batista /
Fortaleza - 2002
165 fs.: il
Orientador: Professor. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do
Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.
1. Cistite Hemorrágica 2. Acroleína 3. Compostos Tios 4.
Glutathione 5. Amifostina I. Ribeiro, Ronaldo de Albuquerque
(Orientador) II. Título

CDD 616.623

**MODELO DE CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR INJEÇÃO
INTRAVESICAL DE ACROLEÍNA – EFEITO UROPROTETOR DE COMPOSTOS
TIÓIS (MESNA, GLUTATIONA E AMIFOSTINA)**

Cristina Kelma Loiola Ponte Batista

Aprovada em 18 de Outubro de 2002

BANCA EXAMINADORA

Professor. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)

Professor. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Professor. Dr. Manoel Odorico de Moraes

DEDICATÓRIAS ESPECIAIS

Ao meu pai, Marcus, pelo seu estímulo, pelo seu exemplo de determinação e pela sua constante busca do novo conhecimento.

À minha mãe, Norma, pela sua sinceridade e colaboração que me deram tranqüilidade para continuar trabalhando.

Às minhas filhas pelo carinho e por saberem compreender na sua inocência os meus momentos de ausência.

Gabriela, parceira nas tardes do Laboratório; Gisele, sempre tão meiga e questionadora; Carla doce e amável, apesar dos atrasos quase constantes na escola e Celeste pela paciência na longa espera diante do computador na sua hora do aconchego.

Ao Carlos, meu marido, por ser meu amor, meu cúmplice, meu amigo de todas as horas e grande companheiro nesta vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, princípio e fim de toda a sabedoria, Pai amável e Amigo fiel.

Ao meu amigo e orientador, prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pelos seus ensinamentos, sempre tão pertinentes, pela sua perspicácia como grande pesquisador e principalmente pelas críticas.

Ao Professor Fernando Cunha pela acolhida afetuosa no seu Laboratório me fazendo sentir em casa, pelo seu apoio e pela sua orientação tão valorosa neste trabalho.

Aos meus irmãos, pelo exemplo de espírito científico e por me ensinarem no nosso dia a dia a dividir todos os momentos, pelo carinho e pela confiança na minha capacidade de recomeçar.

Ao meu irmão Moysés Loiola Ponte de Souza pela sua constante disponibilidade, habilidade e companheirismo em todos os momentos e em especial pela sua paciência e perfeccionismo na última etapa da realização desta tese.

Aos bolsistas de Iniciação Científica Ana Carolina Leite, Juliana Sobreira e Bruno Tigre pela colaboração e estímulo.

Aos amigos que estão ou estiveram presentes no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer, pelas horas agradáveis que passamos juntos.

Aos colegas da pós-graduação pela amizade e troca de conhecimentos.

A amiga Silvia Bona que comigo compartilha estes primeiros passos da vida acadêmica como PROFESSORA substituta. Obrigada por tudo.

A todos os amigos que fiz no Laboratório de Farmacologia da Inflamação da USP de Ribeirão Preto, a convivência com vocês certamente foi de grande valor para combater a saudade de casa.

A Professora Gerly Anne de Castro Brito pela sua valiosa contribuição na realização das análises histopatológicas.

Ao Professor Francisco Airton Castro da Rocha pelo seu auxílio prestado neste trabalho.

A Doutora Artemísia, pela dedicação e cuidados com o biotério .

A Sérgio Rosa pela colaboração e apoio técnico, sempre pronto para ajudar.

A Silvandira, nossa Vandinha, anjo da guarda de todos nós, pela ajuda nos experimentos.

Ao Christian, pela acessoria em informática e pela acessibilidade em prestar um favor.

Ao funcionário da Morfologia José Ivan pelo esmero na confecção das lâminas de histopatologia.

Às secretárias da Pós-graduação Silvia e Áurea pela sua amizade, colaboração e lembranças.

Ao amigo Carlos Garcia pela doação dos Fios de sutura que utilizamos, sua ajuda por certo foi muito bem vinda.

Aos meus animais de experimentação cujas vidas se prestaram a humanidade, sempre solícitos e disponíveis a ciência.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos vocês que de alguma maneira contribuíram ou simplesmente compreenderam este momento tão importante na minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi

I – INTRODUÇÃO	1
1. Oxazafosforinas.....	2
1.1. Metabolismo das oxazafosforinas.....	3
1.2. Usos clínicos das oxazafosforinas.....	5
1.3. Efeitos indesejáveis das oxazafosforinas.....	7
2. Cistite hemorrágica.....	9
2.1. Acroleína.....	11
2.2. Quadro clínico e diagnóstico.....	13
2.3. Tratamento e Prevenção da cistite hemorrágica.....	15
2.3.1. 2- Mercaptoetano-Sulfonato de Sódio (MESNA).....	17
2.4. Participação de mediadores inflamatórios na cistite hemorrágica.....	23
3. Glutationa.....	27
4. Amifostina.....	31
5. Justificativa e Objetivos.....	37
II – MATERIAIS E MÉTODOS	39
1. Animais.....	40
2. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais.....	40
3. Drogas, soluções , Líquidos e Corantes utilizados.....	41
4. Protocolo experimental.....	42
4.1. Indução da Cistite hemorrágica.....	42
4.1.1. Cistite hemorrágica por injeção intravesical de acroleína.....	42

4.1.2. Cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida.....	45
4.2. Parâmetros para avaliação da Cistite hemorrágica.....	45
4.2.1. Determinação do Edema.....	45
4.2.2. Determinação da Permeabilidade Vascular (PV).....	45
4.2.3. Análise Macroscópica.....	46
4.2.4. Análise Histopatológica.....	47
5. Delineamentos Experimentais.....	48
5.1. Análise preliminar do modelo de Cistite Hemorrágica induzida por Acroleína.....	48
5.1.1. Efeitos da administração intravesical de doses crescentes de Acroleína na variação do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas.....	48
5.1.2. Efeitos da administração intravesical de doses crescentes de Acroleína na variação da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos.....	49
5.1.3. Determinação da curva temporal da cistite induzida por Acroleína - Avaliação da variação do edema e alterações macroscópicas e histopatológicas.....	50
5.2. Avaliação da proteção vesical exercida pelo Mesna na cistite hemorrágica induzida pela injeção intravesical de Acroleína.....	51
5.2.1. Efeito do tratamento com Mesna nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas de bexigas de camundongos tratados com Acroleína intravesical.....	52
5.2.2. Efeito do tratamento com Mesna nas variações da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos tratados com Acroleína intravesical.....	53
5.3. Avaliação do efeito protetor da Glutathione na cistite hemorrágica.....	54
5.3.1. Efeito de doses crescentes de Glutathione nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas da cistite induzida por Ifosfamida em camundongos.....	54

5.3.2. Avaliação do efeito da administração de Glutathione nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas na cistite induzida por Acroleína.....	55
5.3.3. Efeito do tratamento com Glutathione nas variações da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos tratados com Acroleína intravesical.....	56
5.4. Efeitos comparativos do Mesna e da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifosfamida em camundongos - Variações do Peso Úmido Vesical.....	56
5.5. Efeitos da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifosfamida em camundongos – Alterações macroscópicas e histopatológicas.....	58
5.6. Efeito de doses crescentes de amifostina na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida – Avaliação da variação do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histológicas.....	58
5.7. Efeito da amifostina na cistite hemorrágica induzida por injeção intravesical de acroleína – Avaliação da variação do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histológicas.....	59
5.8. Cinética de edema de pata induzida por ACR em camundongos.....	60
5.9. Efeito da administração de Mesna no edema de pata induzido por acroleína em camundongos.....	60
6. Análise Estatística.....	61
III – RESULTADOS.....	62
1. Análise preliminar do modelo.....	63
1.1. Efeitos da administração intravesical de doses crescentes de acroleína na variação do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas.....	63
1.2. Efeitos da administração <i>ive</i> de doses crescentes de ACR na variação da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos.....	68

1.3.	Determinação da curva temporal da cistite induzida por acroleína – Avaliação da variação do edema e alterações macroscópicas e histopatológicas.....	68
2.	Avaliação da proteção vesical exercida pelo Mesna na cistite hemorrágica induzida pela injeção intravesical de Acroleína.....	74
2.1.	Efeito do tratamento com Mesna nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas de bexigas de camundongos tratados com Acroleína intravesical.....	74
2.2.	Efeito do tratamento com Mesna nas variações da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos tratados com acroleína intravesical.....	79
3.	Avaliação do efeito protetor da Glutathione na cistite hemorrágica.....	81
3.1.	Efeito de doses crescentes de Glutathione nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas da cistite induzida por Ifosfamida em camundongos.....	81
3.2.	Avaliação do efeito da administração de Glutathione (GSH) nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas na cistite induzida por Acroleína.....	86
3.3.	Efeito do tratamento com Glutathione nas variações da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos tratados com Acroleína intravesical.....	91
4.	Efeitos comparativos do Mesna e da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifosfamida em camundongos.....	93
5.	Efeito da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifosfamida em camundongos - Alterações macroscópicas e histopatológicas.....	95
6.	Efeito protetor de doses crescentes de amifostina (AMF) na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida – Avaliação da variação do Peso Úmido vesical, alterações macroscópicas e histológicas.....	98
7.	Efeito protetor da amifostina na cistite hemorrágica induzida pela injeção intravesical de acroleína – Avaliação da variação do Peso úmido Vesical, alterações macroscópicas e histológicas.....	102

8. Cinética de edema de pata induzida por acroleína em camundongos.....	106
9. Efeito da administração de Mesna no edema de pata induzido por acroleína em camundongos.....	109
IV – DISCUSSÃO.....	111
V – CONCLUSÕES.....	128
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
VII – PREMIAÇÃO.....	164

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	-Acroleína
AD	-Água destilada
AE	-Azul de Evans
AMF	-Amifostina
ANOVA	-Análise de Variância
AP-1	-Fator ativador da proteína-1
α	-Alfa
β	-Beta
CAA	-Cloroacetaldeído
CH	-Cistite Hemorrágica
cm	-Centímetro
CMF	-Ciclofosfamida
DIMESNA	-Ditiodietanosulfonato
DNA	-Ácido desoxirribonucleico
EPM	-Erro padrão da média
ev	-Via endovenosa
FA	-Fosfatase alcalina
g	-Gramas
GLI	-Glicina
GS	-Glutathiona sintetase
GSH	-Glutathiona reduzida

GSNO	-Nitrosoglutationa
GSSG	-Glutaciona oxidada
h	-Hora
HE	-Hematoxilina-Eosina
IFO	-Ifosfamida
IL1	-Interleucina-1
IL2	-Interleucina-2
IL4	-Interleucina-4
IL6	-Interleucina-6
IL8	-Interleucina-8
IL10	-Interleucina-10
ip	-Via intra-peritoneal
spl	-Via subplantar
ive	-Via intravesical
kg	-Quilogramas
LAFICA	-Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
L-CIS	-L-Cisteína
L-GLU	-L-Glutamato
L-NAME	-Éster metil L-N ^G -nitroarginina
L-NOARG	-L-N ^G -Nitroarginina
m ²	metros quadrados
MESNA	- 2-mercarptoetano-sulfonato de sódio
mg	-Miligramas
min	-Minutos

ml	-Mililitro
NAC	-N-Acetilcisteína
NADPH	-Forma reduzida de Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-κB	-Fator Nuclear-Kappa B
nm	-Nanômetros
NO	-Óxido Nítrico
NOS	-Óxido Nítrico sintase
NOS-i	-Óxido Nítrico sintase induzida
PAF	-Fator de ativação plaquetária
PGF ₂	.Prostaglandina F ₂
PUV	-Peso Úmido Vesical
PV	-Permeabilidade vascular
SNC	-Sistema Nervoso Central
T _{1/2α}	-Meia vida de distribuição
T _{1/2β}	-Meia vida de eliminação
TNF-α	-Fator de necrose tumoral alfa
TXA ₂	-Tromboxano A ₂
vo	-Via oral
μg	-Microgramas
μm	-Micrômetros
γ-GCS	-Gama Glutamil cisteína sintetase
γ-GT	-Gama Glutamil transpeptidase

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estruturas químicas da Ciclofosfamida e da Ifosfamida.....	4
FIGURA 2. Metabolismo da Ifosfamida.....	6
FIGURA 3. Estrutura química da Acroleína.....	11
FIGURA 4. Estrutura química da Glutathiona.....	17
FIGURA 5. Estrutura química do MESNA.....	18
FIGURA 6 . Estrutura química do Dimesna.....	19
FIGURA 7. Representação esquemática da oxidação do Mesna (M-SH) em Dimesna (M-S-S-M) no plasma, seguido de sua redução de Dimesna em Mesna nos rins e a excreção urinária do Mesna.....	20
FIGURA 8. Representação esquemática da quebra espontânea da Hidroxiciclofosfamida (I) para formar a Acroleína e a mostarda de fosforamida, seguindo-se da detoxificação da acroleína pela reação com o Mesna (II) formando um tioéster não tóxico.....	22
FIGURA 9. Representação esquemática da participação de mediadores inflamatórios na patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.....	26
FIGURA 10. Esquema de síntese e degradação da Glutathiona.....	28
FIGURA 11. Ciclo Redox da Glutathiona.....	30
FIGURA 12 . Estrutura química da amifostina.....	31
FIGURA 13 . Metabolismo da amifostina (WR-2721).....	32
FIGURA 14 . Mecanismo proposto para a seletividade da amifostina.....	33
FIGURA 15 . Etapas do Modelo de Cistite Hemorrágica induzida pela injeção intravesical de acroleína.....	44
FIGURA 16. Aspecto Macroscópico de Bexigas tratadas com injeção intravesical de acroleína após 3 horas da indução.....	64
FIGURA 17. Efeitos da administração intravesical de doses crescentes de Acroleína (ACR) na variação do Peso úmido vesical (PUV) em camundongos.....	65

FIGURA 18. Aspecto Histopatológico das Bexigas tratadas com injeção intravesical de acroleína 75µg após 3 horas da indução.....	66
FIGURA 19. Efeitos da administração intravesical de doses crescentes de acroleína (ACR) na variação da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos.....	70
FIGURA 20. Efeito da injeção de acroleína (ACR) intravesical no Peso Úmido Vesical – Curva temporal.....	71
FIGURA 21. Aspecto Macroscópico de Bexigas tratadas solução salina ive, com injeção intravesical de acroleína 75 µg após 3 e 24 horas da indução.....	72
FIGURA 22. Aspecto Histopatológico de Bexigas tratadas solução salina ive, com injeção intravesical de acroleína 75 µg após 3 e 24 horas da indução.....	72
FIGURA 23. Efeito do tratamento com Mesna na variação do Peso Úmido Vesical induzido pela injeção intravesical de Acroleína - avaliado após 3 e 24 horas.....	75
FIGURA 24. Efeito do tratamento com Mesna nas alterações macroscópicas induzida pela injeção intravesical de Acroleína 75 µg - avaliado após 3 horas.....	76
FIGURA 25. Efeito do tratamento com Mesna nas alterações macroscópicas induzidas pela injeção intravesical de Acroleína 75 µg - avaliado após 24 horas..	76
FIGURA 26. Efeito do tratamento com Mesna nas alterações histopatológicas induzidas pela injeção intravesical de Acroleína 75 µg - avaliado após 3 e 24 horas.....	77
FIGURA 27 . Efeito do tratamento com Mesna nas variações da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos tratados com acroleína intravesical.....	80
FIGURA 28. Efeito de doses crescentes de Glutathione (GSH) nas variações do Peso Úmido Vesical de animais tratados com Ifosfamida (IFO).....	83
FIGURA 29. Efeito do tratamento com Glutathione (GSH) nas alterações macroscópicas induzidas por Ifosfamida (IFO).....	84
FIGURA 30. Efeito do tratamento com Glutathione (GSH) nas alterações histopatológicas induzidas por Ifosfamida (IFO).....	84

FIGURA 31. Efeito do tratamento com Glutathione (GSH) na variação do Peso Úmido Vesical (PUV) induzido pela injeção intravesical de acroleína (ACR) - avaliado após 3 e 24 horas.....	87
FIGURA 32. Efeito do tratamento com Glutathione (GSH) nas alterações macroscópicas induzido pela injeção intravesical de Acroleína - avaliado após 3 horas.....	88
FIGURA 33. Efeito do tratamento com Glutathione (GSH) nas alterações macroscópicas induzidas pela injeção intravesical de Acroleína - avaliado após 24 horas.....	88
FIGURA 34. Efeito do tratamento com Glutathione (GSH) nas alterações histopatológicas induzidas pela injeção intravesical de Acroleína - avaliado após 3 e 24 horas.....	89
FIGURA 35. Efeito do tratamento com Glutathione nas variações da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos tratados com acroleína intravesical.....	92
FIGURA 36. Efeitos comparativos do Mesna e da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifofamida em camundongos.....	94
FIGURA 37. Efeito de doses crescentes de amifostina (AMF) nas variações do Peso Úmido Vesical de animais tratados com Ifofamida (IFO).....	99
FIGURA 38. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) nas alterações macroscópicas induzidas por Ifofamida (IFO).....	100
FIGURA 39. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) nas alterações histopatológicas induzidas por Ifofamida (IFO).....	100
FIGURA 40. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) na variação do Peso Úmido Vesical (PUV) induzido pela injeção intravesical de acroleína (ACR) - avaliado após 3 horas.....	103
FIGURA 41 . Efeito do tratamento com amifostina (AMF) nas alterações macroscópicas induzidas pela injeção intravesical de Acroleína - avaliado após 3 horas.....	104
FIGURA 42. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) nas alterações histopatológicas induzidas pela injeção intravesical de Acroleína - avaliado após 3 horas.....	104

FIGURA 43 . Cinética do edema de pata induzida por acroleína em camundongo.....	107
FIGURA.44 Avaliação histopatológica de pata de camundongo após 6 horas de injeção <i>sp/</i> de acroleína.....	108
FIGURA 45. Efeito da administração de Mesna no edema de pata induzido por acroleína (ACR) em camundongos.....	110
FIGURA 46 . Mecanismo de ação proposto da Glutathione e da amfostina na proteção da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.....	127

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da administração intravesical de doses crescentes de Acroleína (ACR) em camundongos.....	67
TABELA 2 – Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da administração intravesical de acroleína (ACR) em diferentes tempos em camundongos – Curva temporal.....	73
TABELA 3 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos do Mesna (ip e ive) na cistite hemorrágica induzida pela administração intravesical de Acroleína (ACR) em diferentes tempos (3 horas e 24 horas).....	78
TABELA 4 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da administração de doses crescentes de Glutathione (GSH) na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida (IFO) em camundongos.....	85
TABELA 5 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da Glutathione (ip e ive) na cistite hemorrágica induzida pela administração (ive) da acroleína (ACR) em diferentes tempos (3 horas e 24 horas).....	90
TABELA 6 – Análise macroscópica dos efeitos da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifosfamida em camundongo.....	96
TABELA 7- Análise histopatológica dos efeitos da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifosfamida em camundongo.....	97
TABELA 8 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da administração de doses crescentes de amifostina (AMF) na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida (IFO) em camundongos.....	101
TABELA 9 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da amifostina (ip e ive) na cistite hemorrágica induzida pela administração (ive) da acroleína (ACR) avaliadas após 3 horas.....	105

RESUMO

Modelo experimental de Cistite Hemorrágica induzida pela injeção intravesical de Acroleína – Efeito Uroprotetor de compostos tióis (Mesna, Glutathiona e Amifostina) – CRISTINA KELMA LOIOLA PONTE BATISTA. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Dept^o de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Data da Defesa: 18 de Outubro de 2002. Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

A Acroleína (ACR) é um aldeído altamente reativo e tóxico produzido como metabólito urinário das drogas antineoplásicas Ciclofosfamida (CFM) e Ifosfamida (IFO); tem sido apontada como o agente causal da Cistite Hemorrágica (CH) induzida por estes compostos. Os dados anteriores da literatura sobre CH induzida por oxazafosforinas foram obtidos após sua administração intraperitoneal (*ip*), a partir da qual a ACR seria supostamente produzida ou liberada, mas não pela demonstração de sua ação direta na bexiga. Assim, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da injeção intravesical (*ive*) de ACR em camundongos, assim como a ação citoprotetora de alguns compostos tióis como o Mesna, clássico antagonista químico da ACR, a Glutathiona reduzida (GSH), importante tiol endógeno e a Amifostina (AMF), agente que protege seletivamente os tecidos normais contra uma grande variedade de efeitos tóxicos induzidos pela quimioterapia anti-câncer. Para tanto, a CH foi induzida em camundongos *Swiss* machos (25-35 g; n=6 por grupo) através de injeção *ive* de ACR nas doses de 25, 75, 225 µg, os quais foram sacrificados após 3, 6, 12 ou 24 horas e tiveram suas bexigas analisadas quanto as alterações do peso úmido (PUV), permeabilidade vascular (PV) pela técnica do extravasamento do Azul de Evans (25 mg/Kg, *ev*, 30 minutos antes do sacrifício) e análises macroscópica e histopatológica, ambas realizadas segundo os critérios de Gray. Observamos que a ACR induziu de forma dose e tempo dependente significativo ($p < 0,05$) aumento do peso úmido vesical e da PV, com efeito máximo em 12 horas, além de lesões macroscópicas e histopatológicas significativamente diferentes do controle. Grupos receberam administração local (*ive*) de Mesna (2mg), GSH (2mg) ou AMF (1,5mg); ou administração sistêmica (*ip*) de Mesna (80mg/Kg), GSH (125,250,500mg/Kg) ou AMF (25,50,100mg/Kg). O pré tratamento dos animais com Mesna, GSH e AMF, administrados tanto por via *ip* ou *ive* inibiu significativamente os aumentos do PUV, da PV e das alterações macroscópicas e histopatológicas induzidas pela ACR. Este efeito protetor dos compostos tióis também foi demonstrado na CH induzida pela IFO(400 mg/Kg *ip*). Nossos dados em conjunto confirmam o papel da ACR na gênese da CH induzida por oxazafosforinas e evidenciam os compostos tióis como importante linha de defesa celular nesta condição patológica.

ABSTRACT

Experimental model of Hemorrhagic Cystitis induced by intravesical injection of Acrolein – Uroprotective effects of thiol compounds (Mesna, Glutathione and Amifostine). - CRISTINA KELMA LOIOLA PONTE BATISTA . Dissertation submitted as a partial fulfillment of the requirements to a masters degree in Pharmacology to the Postgraduation Pharmacology Course of the Physiology and Pharmacology Department of the Medicine Faculty of Federal University of Ceará. Defense date: 2002, October 18th. Professor: Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

Acrolein (ACR) is a highly reactive and toxic aldehyde produced as a metabolic urinary product of the anticancer drugs Cyclophosphamide (CYP) and Ifosfamide (IFO) that was related as the causative agent of Hemorrhagic Cystitis (HC) induced by these compounds. Systemic administration of CYP or IFO would induce HC through the release of ACR. However, a possible direct effect of ACR to the urothelium is yet to be demonstrated. In this study we aimed to evaluate the effects of the local intravesical (i.ve.) injection of ACR to mice, as well as the cytoprotective action of the thiol compounds: Mesna, the classical ACR chemical antagonist; the reduced form of the endogenous thiol Glutathione (GSH), and Amifostine (AMF), an agent that selectively protects normal tissues against a wide variety of toxic effects induced by anticancer chemotherapy. Male Swiss mice received ACR (25, 75, or 225 µg) i.ve. - 3, -6, -12 or -24 h before sacrifice. The increase in vascular permeability (VP) in the bladders was evaluated by the measure of the concentration of Evans blue dye extravasation, injected 30 min before ACR (25mg/kg e.v.) and by comparison of the Bladder Wet Weight between the groups. The macroscopical and histopathological changes were evaluated using the Gray's criteria. Groups received local (i.ve.) Mesna (2mg), GSH (2mg) or AMF(1,5mg) or systemic (i.p.) Mesna (80 mg/kg), GSH (125,250,500 mg/Kg), and AMF(25,50,100 mg/Kg) 30 min before ACR. Local ACR induced a dose and time-dependent increase in bladder edema as well as in the macroscopical and histopathological lesions, that was significantly different from controls, being maximal 12 h after ACR injection ($p < 0.05$). Pretreatment with either Mesna, GSH, or AMF inhibited both the edema, macroscopical and the histopathological changes, regardless of local or systemic administration. This protective effect of the thiol compounds was also demonstrated in HC induced by IFO (400 mg/Kg ip). In conclusion, our results confirmed the role of ACR in the genesis of HC induced by oxazaphosphorines and indicated the thiol compounds as an important cellular defense line in this pathological condition.

INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

1. Oxazafosforinas

As oxazafosforinas, Ciclofosfamida (CFM) e Ifosfamida (IFO), são ésteres fosforamidídicos cíclicos que pertencem ao grupo dos quimioterápicos antineoplásicos alquilantes. São capazes de estabelecer ligações covalentes com as bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico (DNA), através dos seus grupos alquilas, ou seja, através de radicais de hidrocarbonetos que se ligam a cadeias principais de compostos orgânicos. O resultado desta alquilação é a produção da quebra da molécula de DNA e da ligação cruzada em seu duplo filamento. (HASKELL, 1990 ; CALABRESI & CHABNER, 1990)

A IFO é um isômero estrutural da CFM e difere desta, que contém ambos os grupos cloroetil ligados ao mesmo nitrogênio do exociclo, por apresentar um dos dois grupos cloroetil ligados ao nitrogênio do endociclo (Ver Figura) (SAROSY, 1989). Estas diferenças estruturais estão diretamente relacionadas com propriedades físico-químicas, como maior solubilidade em água da IFO em relação a CFM, bem como com diferentes propriedades farmacológicas e toxicológicas. (BROCK,1977 apud BRADE et al, 1986; CREAVEN et al, 1974; WAGNER et al, 1981)

1.1. Metabolismo das oxazafosforinas

As oxazafosforinas são na verdade pró-drogas, terapeuticamente inativas , que precisam ser primeiramente biotransformadas para se tornarem citotóxicas. Tanto CFM como IFO têm seus metabólitos ativos originados preferencialmente no fígado, (FRAISER et al, 1991; CONNORS et al., 1974), pelo sistema de oxidases de função mista do citocromo P450.

A ativação metabólica inicial se dá a partir da hidroxilação do carbono 4 do anel resultando em 4-hidroxioxazafosforinas- que se encontram em equilíbrio dinâmico com seus tautômeros de anel aberto a aldofosfamida e a aldolfosfamida. Estes por sua vez são transportados pela circulação até os tecidos susceptíveis onde são clivados por reação de β -eliminação para mostarda de fosforamida ou mostarda de isofosforamida (mostardas nitrogenadas) e Acroleína (ACR). (CALABRESI & CHABNER, 1990 ; CONNORS et al., 1974 e LOW et al., 1983) Acredita-se geralmente que as mostardas são responsáveis pelos efeitos terapêuticos citotóxicos (FRAISER et al., 1991 e FISCHER, 1982), enquanto que a ACR responderia pelo dano urotelial . (COX, 1979 ; BROCK et al., 1979 apud BRADE et al., 1986)

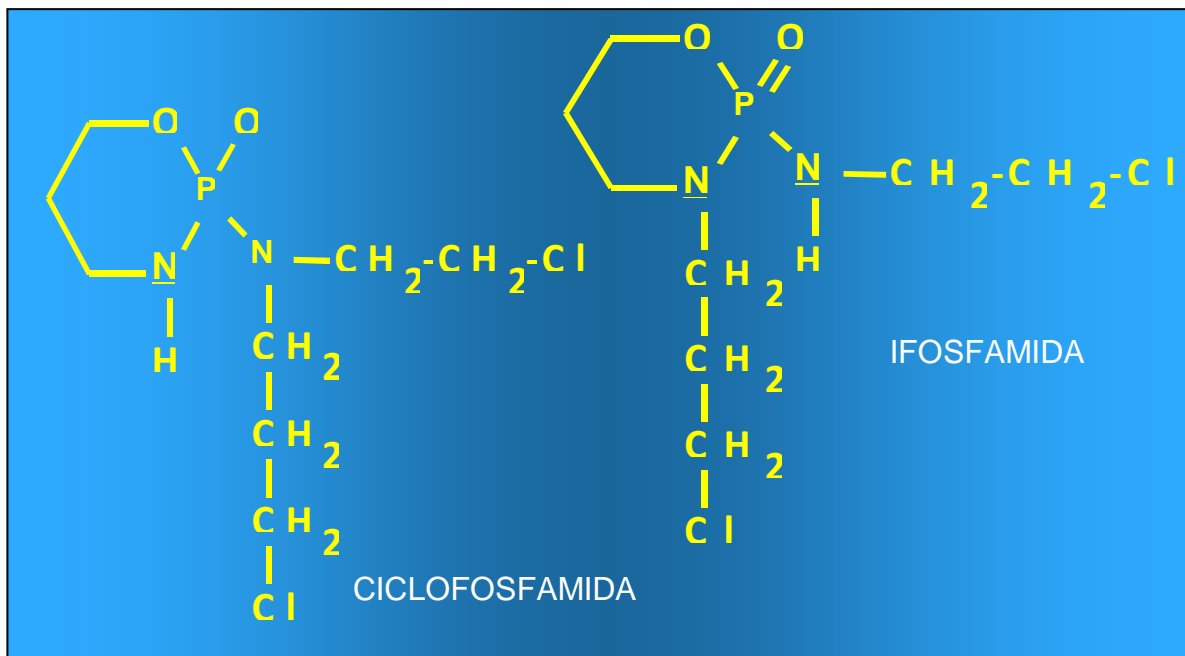


Figura 1. Estruturas químicas da Ciclofosfamida e da Ifosfamida

A desativação deste complexo metabolismo ocorre através da desidrogenação irreversível das 4-hidroxioxazafosforinas a cetooxazafosforinas ou ainda da Aldofosfamida e da Aldofosfamida a carboxifosfamida / carboxilFO. Estas reações de desidrogenação enzimática são catalisadas pela aldeído desidrogenase e/ou aldeído oxidases, enzimas estas que se apresentam nas células tumorais em níveis inferiores aos das células normais, sendo esta uma das razões da ação citotóxica ser mais seletiva nos tumores. Tumores que demonstrem uma atividade maior da aldeído desidrogenase podem apresentar-se resistentes a oxazafosforinas. (BROCK, 1989 ; LIND & ROBERTS, 1990)

Numa via alternativa de desativação das oxazafosforinas, ocorre uma reação de N-decloroetilação produzindo decloroetil-CFM ou decloroetil-IFO (sem aparente atividade citotóxica ou alquilante) e o cloroacetaldeído, outro metabólito associados tanto a neurotoxicidade quanto a nefrotoxicidade e urotoxicidade. (SHAW et al., 1983 ; POLH, STEKAR & HILGARD, 1989; SPRINGATE et al., 1987) Uma das principais diferenças no metabolismo da CFM e da IFO é que a decloroetilação é bem mais importante para IFO do que para a CFM. (BRADE et al., 1985)

Estudos in vitro do metabolismo tanto da CFM com da IFO realizados em microsomas isolados de fígados de ratos, demonstrou que ambas as reações são catalisadas por diferentes enzimas do citocromo P450. Na 4- hidroxilação da CFM participam as P450 2C6, 2C11 e 2B, sendo que a P450 3^A catalisa a maior parte da N-decloroetilação. (YU & WAXMAN, 1996)

1.2. Usos clínicos das oxazafosforinas

A CFM possui um amplo espectro de usos clínicos, sendo um componente essencial de vários esquemas de associações de drogas antineoplásicos. Pode ser utilizada como agente único ou em associação, com bons resultados no tratamento de doenças linfoproliferativas, carcinomas de mama, pulmão, colo uterino, cérebro e ovário, bem como no neuroblastoma e retinoblastoma entre outros. (MONTVALE, 1993 apud SAFRON et al., 1997) Sendo os linfócitos muito sensíveis a atividade citotóxica da CFM, esta também atua como fármaco imunossupressor, sendo portanto utilizada no preparo de pacientes para

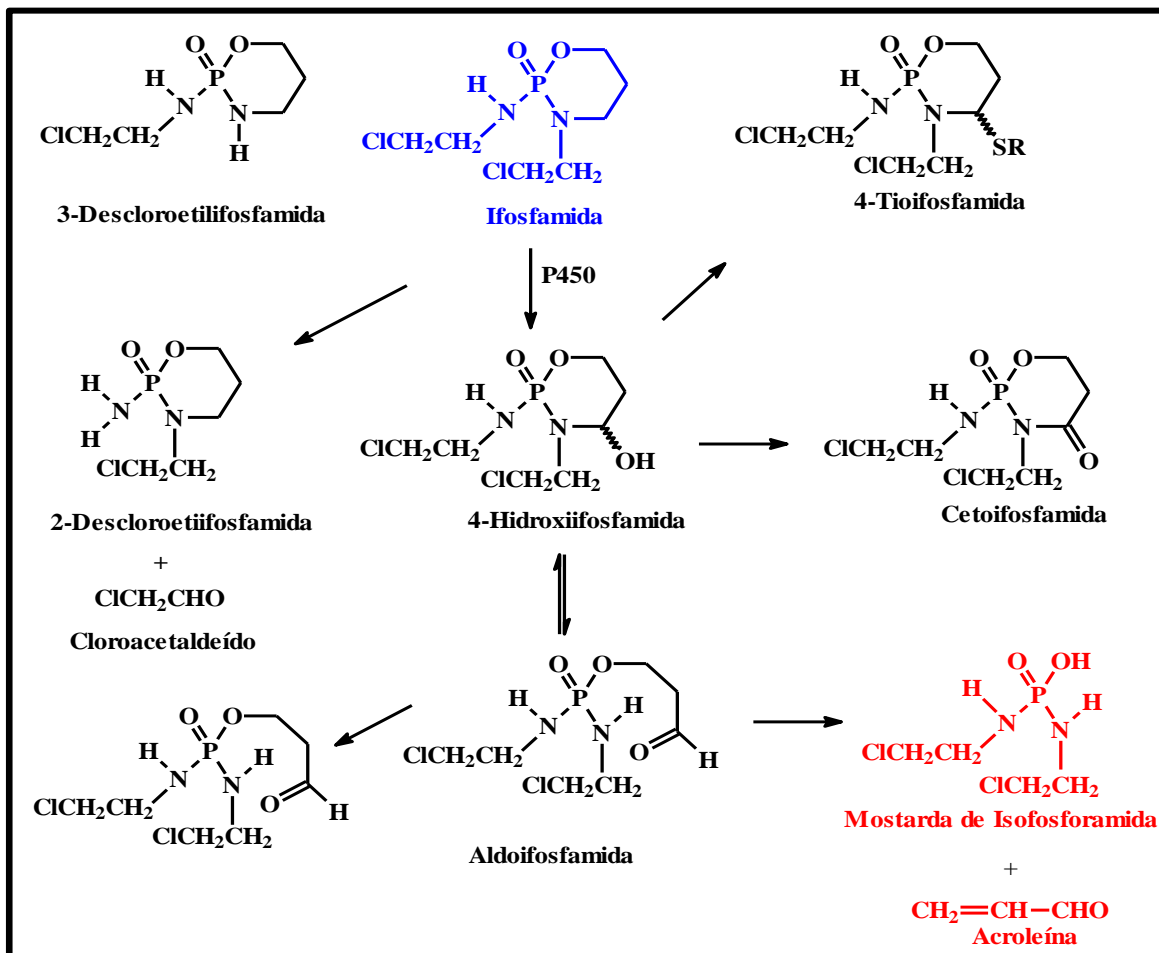


Figura 2. Metabolismo da Ifosfamida

transplante de medula óssea, no controle de rejeição de órgãos pós transplante e em doenças não neoplásicas autoimune como artrite reumatóide, síndrome nefrótica e Granulomatose de Wegener. (LEVINE & RICHIE, 1989 ; GRINBERG-FUNES, SHELDON & WEISS, 1990)

Já a IFO, também é eficaz contra uma grande variedade de tumores, como por exemplo: câncer de testículo, sarcomas de partes moles, câncer de pulmão, osteossarcomas, câncer de ovário e linfomas, além de também ser utilizada como agente imunossupressor. (DECHANT et al., 1991 ; BROCK et al., 1988 ; BRADE et al., 1985 ; ZALUPSKI & BAKER, 1988 ; LOEHRER, 1990) Muitas vezes a IFO demonstra-se eficaz contra tumores resistentes a CFM. Quando comparada com a CFM a IFO proporciona baixa mielossupressão e apresenta baixa resistência tumoral, sendo portanto uma droga ideal para ser incluída em regimes combinados de quimioterapia antineoplásica. (HIGGS et al., 1989)

1.3. Efeitos indesejáveis das oxazafosforinas

Os efeitos colaterais mais comuns da CFM são alopecia, náuseas e vômitos, mielossupressão relacionada a dose, sendo a leucopenia mais evidente do que trombocitopenia e a anemia. A complicação pulmonar mais comuns com o uso de CFM são a pneumonite intersticial e fibrose pulmonar. (BURKE et al., 1982; COOPER et al., 1986; PATEL et al., 1976; RODIN et al., 1970)

O desenvolvimento de um quadro de cistite hemorrágica (CH) estéril é bastante comum com o uso de CFM, sendo este efeito urotóxico limitante para o seu uso. Esta urotoxicidade varia, desde sensação transitória de esvaziamento e irritação com frequência e urgência urinária, disúria, desconforto suprapúbico, microhematúria até cistite hemorrágica. (BENNETT, 1974 ; SHROM et al., 1976) Também já foram descritas fibrose, necrose e contratatura da bexiga, além de refluxo vesicoureteral. (JONHSON et al.,1971; RENERT et al.,1973) Apesar da

importância da CH, a uretrite e a pielite também estão associadas ao uso da CFM. (EFROS et al., 1990) Alguns estudos demonstraram haver aumento na incidência de câncer secundário de bexiga ou de outras porções do trato urinário em pacientes que desenvolveram CH, principalmente com obstrução presente. (STILLWELL & BENSON, 1988 ; FRAISER et al., 1991) Somando-se ao já relatado anteriormente a CFM também pode ocasionar, após terapia por período prolongado, azospermia e falência ovariana (GERSHWIN et al., 1974) Teratogenicidade foi reportada com o uso da CFM durante o segundo mês de gestação. (TOLEDO et al., 1971) Não obstante com o uso das doses usuais para a maioria das neoplasias a CFM não apresente toxicidade cardíaca, mas já foram relatadas cardiomiopatias induzidas por altas doses de CFM em humanos. (FRAISER et al., 1991 ; HOPKINS et al., 1982 ; MILLS & ROBERTS, 1979 ; O'CONNELL & BARENBAUM, 1974)

A CH também é um importante efeito adverso da IFO, sendo este dose limitante, apresentando-se com irritação na bexiga e manifestando desde hematúria macroscópica a hemorragia vesical grave. O metabólito altamente reativo da IFO, a Acroleína é responsabilizada pela sua urotoxicidade. (BROCK et al., 1979 apud BRADE et al., 1985 ; DRAEGER et al., 1976 ; BRADE et al., 1985 ; ZALUPSKI & BAKER, 1988)

A IFO pode causar toxicidade renal (Síndrome de Fanconi), fato este que difere do seu análogo estrutural, a CFM. (BURK et al., 1990 ; GOREN et al., 1989; SKINER et al., 1993) Esta nefrotoxicidade provavelmente decorre da formação do cloroacetaldeído (CAA) a partir do metabolismo da IFO, uma vez que este

metabólito depleta estoques intracelulares de Glutathione, predispondo a um dano celular. (LIND et al., 1989 ; WAGNER, 1994)

Neurotoxicidade, que se manifesta por sonolência, desorientação, confusão, alucinações, letargia e coma após 2 horas depois da dose em bolus, durando até 1 a 3 dias, pode acontecer em cerca de 20% dos pacientes após administração da IFO. (BRADE et al., 1985 ; ZALUSPKI & BAKER, 1988) A administração oral da IFO está associada a uma alta incidência de toxicidade no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo esta incomum com doses semelhantes por administração ev. (BRADE et al., 1985) A formação de cloroacetaldeído também parece ser o responsável pelo desenvolvimento desta toxicidade (ZALUPSKI & BAKER, 1988), uma vez que a administração oral de IFO resulta em concentrações mais elevadas de cloroacetaldeído quando comparadas com as obtidas pela administração endovenosa. (KUROWSKI et al., 1991)

Outros efeitos colaterais da IFO já relatados são cardiotoxicidade, baixa mielossupressão, alopecia, náuseas e vômitos. (BRADE et al., 1985 ; ZALUPSKI & BAKER, 1988)

2. Cistite hemorrágica

Processo inflamatório vesical associado à hemorragia pode ser causada por patologias, como carcinomas, amiloidose e artrite reumatóide, por vírus, como adenovírus, vírus BK, citomegalovírus, vírus do herpes simples, vírus da influenza A, vírus JP e papovavírus, por radiação ionizante, por toxinas, como corantes e inseticidas e principalmente por algumas drogas, como esteróides anabolizantes e

agentes antineoplásicos como as oxazafosforinas. (DEVRIES & FREIHA, 1990: WEST, 1997)

A CH induzida pelo uso de CFM foi relatada pela primeira vez em 1959. (COGINS et al., 1959) Esta significativa urotoxicidade das oxazafosforinas é vista em mais de 40% dos pacientes quando são utilizados esquemas com altas doses, e foram relatadas taxas de mortalidade entre 2 a 4% quando ocorria hemorragia vesical maciça. (WATSON and NOTLEY,1973 ; PHILIPS et al.,1961) Também já foi relatada desenvolvimento de CH com doses menores de CFM em crianças quando comparadas com adultos. (COGINS et al., 1959 ; STIELLWELL & BENSON, 1988)

A Acroleína , um aldeído altamente reativo e tóxico, metabólito final tanto da CFM como da IFO, é apontado como o agente causal da CH. (COX, 1979 ; BROCK et al, 1979 ; KOLB et al, 1994 ; WAGNER, 1994) No metabolismo das oxazafosforinas a ACR é formada pela quebra da aldofosfamida ou aldolfosfamida, provavelmente dentro da bexiga, afirmação esta reforçada pelo fato da ACR ser muito reativa tendo portanto pequena meia vida biológica, bem como quando liberada pelo metabolismo da CFM ou da IFO é amplamente excretada, na urina, como ácido 3 – hidroxipropilmercaptúrico. (COX, 1979)

Os resultados obtidos por Cox que sugeriram a ACR como o metabólito das oxazafosforinas responsável pela CH (aumento do peso das bexigas). (COX, 1979)

Chaviano e colaboradores demonstraram que infusão de ACR na bexiga de ratos produzia efeitos inflamatórios mais pronunciados do que aqueles induzidos pela injeção de CFM *ip*, como maior peso das bexigas e maior absorção de azul

de metileno, um indicador de dano tecidual, (CHAVIANO et al, 1985) estes dados dão consistência à hipótese inicial proposta por Cox de que a ACR é a substância promotora da CH.

Outros estudos também têm sugerido que além da Acroleína o CAA possa estar associado com a produção de urotoxicidade promovida pela administração de oxazafosforinas (WAGNER et al, 1981), . Marcação do anel e das cadeias laterais da CFM com diferentes isótopos radioativos, com posterior injeção ev em ratos, levaram a detecção de altos níveis de CAA marcados na urina. (SHAW, GRAHAN & McLEAN, 1983) , reforçando a hipótese de que o CAA é produzido em sítio próximo à bexiga, provavelmente o rim, já tendo inclusive sido associado à lesão tubular renal induzida por IFO.(MONCRIEFF & FOOT, 1989 ; ZAMLAUSKI et al., 1994)

2.1. Acroleína



Figura 3. Estrutura química da Acroleína

A ACR é um aldeído insaturado, altamente reativo que é gerado pela combustão incompleta ou pirólise de materiais orgânicos como madeiras, combustíveis, alimentos e tabaco. (ASTRY AND JAKAB, 1983; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991)

Tem sido identificado como um perigoso poluente ambiental, de grande importância, particularmente como componente da fumaça de cigarros. (CALDWELL et al, 1998, AYER AND YEAGER, 1982; ALTSCHULER AND Mc PHERSON, 1963) Efeitos tóxicos e genotóxicos têm sido amplamente descritos. (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1995) A fumaça de cigarros causa importante lesão de células epiteliais respiratórias e apoptose, (LANNAN et al., 1994) depleção de Glutathione (GSH) e geração de radicais livres . (EISERICH et al., 1995)

A Acroleína reage rapidamente com compostos intracelulares, particularmente com a GSH (KEHRER AND BISWAL, 2000). Adicionalmente é reconhecido que a ACR induz a geração de radicais livres de oxigênio, como ânion superóxido e radical hidroxil, bem como pode iniciar a peroxidação lipídica. (ADAMS AND KLAIDMAN, 1993 ; PATEL, 1987) Em estudos realizados com ratos, com a administração de ACR observaram uma diminuição dos níveis pulmonares e hepáticos de GSH. (ARUMUGAM et al., 1999 a, b). A exposição a ACR, conforme também já foi relatado, afeta os processos imune e inflamatórios, (LI et al., 1997, 1999; NGUYEN et al., 2001) contribuindo para a diminuição das defesas pulmonares contra infecções, presente nos fumantes.(GREEN, 1985; JAKAB, 1977)

Mais recentemente Nardini e colaboradores demonstraram que a ACR induz a apoptose em células epiteliais brônquicas humanas, associada a depleção celular de GSH e geração intracelular de oxidantes, parecendo este último ser evento desencadeador importante na resposta apoptótica. (NARDINI et al., 2002)

Endogenamente a ACR também pode ser gerada nos sítios inflamatórios pela ação das mieloperoxidases dos neutrófilos (ANDERSON et al., 1997), em condições de peroxidação lipídica (UCHIDA et al., 1998a; UCHIDA et al., 1999 a) e como um produto metabólico de drogas antineoplásicas como as oxazafosforinas. (FRAISER et al., 1991) A ligação de ACR com proteínas sido realmente demonstrada em pacientes com doenças crônicas, pelo menos em parte relacionadas com estresse oxidativo, como nefropatia diabética (SUZUKI AND MIYATA, 1999), doença de Alzheimer (CALINGASAN et al., 1999) e em placas ateroscleróticas. (UCHIDA et al., 1998b)

2.2.Quadro clínico e diagnóstico

O diagnóstico clínico da CH baseia-se em sintomas inespecíficos que vão desde uma hematúria microscópica em pacientes assintomáticos, até hematúria maciça associada a disúria, hipertermia, dor supra-púbica, incontinência urinária e noctúria. Na urinanálise podemos encontrar além de microhematúria, células largas, com citoplasmas disformes e núcleos aumentados e hipercromáticos. (DEVRIES & FREHIA, 1990 ; WALTHER, 1993)

A síndrome quando severa pode levar a complicações como constrição da bexiga, infecções recorrentes do trato urinário, anemia, perfuração da bexiga, insuficiência renal e morte. (SENCER et al., 1993)

Uma vez sugerido o diagnóstico pelo quadro clínico anteriormente descrito, este pode ser confirmado pela cistoscopia seguida de biópsia. A cistoscopia mostra na fase aguda diminuição da capacidade da bexiga, mucosa vesical

hiperemiada, podendo o dano urotelial variar desde telangectasias até ulceração e necrose da mucosa com descamação quase completa do urotélio, infiltrado leucocitário e hemorragia franca, dependendo da severidade do quadro. (STIELLWELL & BENSON, 1988 ; SCHEEF,1971 ; RUBIN & RUBIN, 1966)

Em 1967 foram descritas as primeiras alterações na histologia de bexigas de ratos expostas a CFM, quando foram observadas evidência de perda epitelial, dilatação capilar, hemorragia da submucosa, fibrose e necrose do músculo liso. (KOSS, 1967) Uma vez que o dano vesical não acomete somente a mucosa, mas todas as paredes da bexiga, esta injúria e fibrose podem levar ao desenvolvimento de efeitos adversos incuráveis, não hemorrágicos das oxazafosforinas, (LEVY & HARRIS, 1977; RUBIN & RUBIN, 1966; CROW, 1977) que podem persistir por anos ou recorrerem após meses ou anos do episódio inicial. (STIELLWELL & BENSON, 1988)

Enfatizando os dados anteriores, observa-se em bexigas com lesões por CFM, à microscopia eletrônica, fragmentação da membrana luminal das células superficiais com subsequente fragmentação de suas membranas laterais, desintegração dos desmossomas e hemidesmossomas, resultando na degeneração das células epiteliais com exposição da membrana basal ao lúmen. O edema intercelular acentuado e a coesão celular reduzida devido a lesão do sistema unitivo leva a progressiva descamação das células uroteliais degeneradas. (THEMANN et al., 1987) A superfície luminal de algumas células podem ser cobertas com microvilosidades pleomórficas.(FUKUSHIMA et al., 1981)

A urografia excretora também é um importante método não só diagnóstico, como de seguimento dos pacientes que fizerem uso das oxazafosforinas. Com

sensibilidade e especificidade menores do que a da cistoscopia pode evidenciar hidronefrose, obstrução uretral, fibrose crônica da bexiga, irregularidades na mucosa e diminuição da capacidade vesical. Deve ser realizada anualmente em todos os pacientes que desenvolveram episódio de CH, bem como após novo quadro clínico ou laboratorial de cistite. Além da urografia excretora pacientes que apresentaram CH devem ser seguidos anualmente com cistoscopias e exames de urina que incluem citologia urinária, visando avaliar a fibrose da bexiga e aparecimento de neoplasias. (STIELLWELL & BENSON, 1988)

A ultrassonografia, apesar de não ser um bom método propedeutico para CH, pode evidenciar imagens que acrescentam neste diagnóstico, como: hidronefrose, aumento da espessura da parede, diminuição da capacidade da bexiga e formações sugestivas de coágulos intravesicais. (KUMAR & AGGARWALL, 1990)

2.3. Tratamento e Prevenção da cistite hemorrágica

Várias medidas têm sido propostas para prevenir ou tratar a CH induzida por oxazafosforinas. Diminuir o tempo de contato dos metabólitos urotóxicos com a mucosa vesical além de acelerar sua eliminação são os objetivos de métodos como a hiperidratação, que pode ser associada ou não ao uso de diuréticos de alça, a irrigação da bexiga, esvaziamento freqüente e drenagem com catéter ureteral. (HASELBERGER & SCHWINGHAMMER, 1995 ; DROLLER et al., 1982; GOLIN & BENSON, 1977 ; PHILIPS et al., 1961 ; REYNOLDS et al., 1969). A profilaxia com as medidas acima descritas pode não ser efetiva, uma vez que a

CFM age diretamente no túbulo renal levando a uma retenção inapropriada de água o que pode submeter, principalmente idosos e cardiopatas, ao risco de hipervolemia com sobrecarga de líquidos, hiponatremia, convulsões e morte. (DE FRONZO et al., 1973)

Uma vez ineficaz a prevenção e instalada a CH, esta pode cursar com hemorragia maciça, fazendo-se necessária a hemotransfusão. Para o tratamento deste quadro podem ser utilizadas: Instilação intravesical de formalina, fenol ou nitrato de prata (SHROM et al., 1976 ; SUSAN & MARSH, 1975 ; DUCKETT et al., 1973 ; FAIR, 1974); Uso de estrogênios sintéticos (LIU et al., 1990); Aplicações de balões hidrostáticos intra vesicais, fulgurações dos locais de sangramento, ligaduras ou embolização das artérias hipogástricas (GOEL et al., 1985 ; LAPIDES, 1970 ; BERKSON et al., 1973 ; DUCKETT et al., 1973) e em casos mais extremos, desvio do fluxo urinário com cistectomia. (JERKINS et al., 1986 ; BERKSON et al., 1973 ; GOLIN & BENSON, 1977 ; ANDERSON et al., 1967 ; NOE & MCSWAIN, 1983 ; MARSH et al., 1971 ; LAPIDES, 1970)

Outro método utilizado na CH severa induzida por CFM ou IFO inclui injeção intra vesical da prostaglandina $F_{2\alpha}$ e prostaglandina E_2 , (SHURAF A et al., 1987; MOHIUDDIN et al., 1984) que podem mediar a atividade da vasopressina na bexiga. (BURCH & HALUSHKA, 1982)

O uso de YAG laser demonstrou-se seguro e eficaz quando utilizado em pequeno grupo de pacientes pediátricos. (GWEON & SHANBERG, 1997)

Ulich e colaboradores , em estudo experimental com ratos, demonstrou que ocorria proteção do epitélio da bexiga, após tratamento com CFM, com a

administração sistêmica de um fator de crescimento queratinócitos (ULICH et al., 1997)

A N-acetil cisteína (NAC) é um composto que apresenta grupamento sulfidril livre (tiólico) capaz de se ligar a ACR formando um tioéster não tóxico. (BROCK et al., 1981) Apesar de vários estudos terem demonstrado a eficácia deste produto em prevenir os eventos da CH induzida por oxazafosforinas, sendo no entanto ineficaz na CH já instalada. (PRIMACK, 1971; TOLLEY, 1977; BOTTA et al., 1973) A NAC não é mais utilizada na clínica, pois além de apresentar pouca tolerância gastro intestinal também é capaz de reagir com os agentes alquilantes diminuindo assim seus efeitos citotóxicos antineoplásicos.(CONNORS, 1966)

2.3.1. 2- Mercaptoetano-Sulfonato de Sodio (MESNA)

A maioria das células possuem mecanismos bioquímicos adequados para protegê-las da toxicidade induzida por químicos reativos como a ACR. Um destes mecanismos envolve um composto tiol chamado de Glutathione (FIGURA 4).

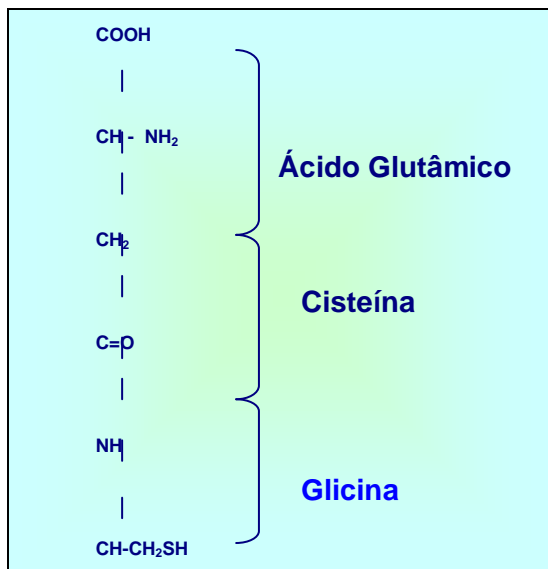


Figura 4. Estrutura química da Glutathione

Nível deste agente químico protetor é, contudo, muito baixo na bexiga, (SIDAU & SHAW, 1984) então produtos tóxicos presentes na urina, como a ACR, podem portanto permanecer disponíveis para exercer seus efeitos sobre as células epiteliais da bexiga. (SHAW & GRAHAM, 1987)

Utilizando-se deste raciocínio bioquímico, Brock e colaboradores testaram vários compostos tióis, (BROCK et al., 1981) com o objetivo de selecionar entre eles uma substância adequada para proteger profilaticamente a bexiga durante uma quimioterapia antineoplásica com oxazafosforinas. O composto que foi por eles selecionado foi o 2- mercaptano-sulfonato de sódio (MESNA) (BROCK et al., 1981) (FIGURA 4)

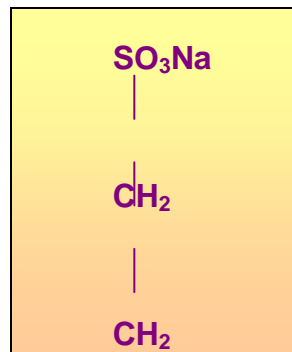


Figura 5. Estrutura química do MESNA

Os primeiros ensaios clínicos com o MESNA foram realizados, no início da década de 70, na França, para o tratamento de diversas patologias respiratórias, principalmente em crianças, incluindo doença pulmonar obstrutiva crônica, (LULLING & DUBOIS, 1973; BUERGI, 1974) bronquite crônica (STEEN et al., 1974) e mal asmático (POKORNY & KLYNCL, 1977) entre outras. O mecanismo de sua ação mucolítica envolve provavelmente a quebra das pontes de enxofre

(dissulfeto) entre as moléculas do muco, (GOBERT et al., 1971) diminuindo então sua viscosidade (BUERGI, 1974) melhorando a função muco ciliar.

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

Ao entrar na circulação sanguínea, quase que imediatamente o Mesna é oxidado a sua forma dimérica, o Ditioldietanosulfonato (DIMESNA), (BROCK, 1989) pela formação de pontes dissulfeto entre duas unidades monoméricas (FIGURA 4)



Figura 6. Estrutura química do diMesna

Esta reação, provavelmente, ocorre de maneira espontânea catalizada por metais de transição presentes na circulação, no entanto é possível que haja a participação de enzimas. Também são formados outros dissulfetos com tióis endógenos, como por exemplo cisteína – Mesna dissulfeto, (DURAN et al, 1981) o que poderia ser responsável pelo, já demonstrado aumento da excreção urinária de cisteína que se segue a administração do Mesna. (SIDAU & SHAW, 1984) (JONES et al., 1985)

Quimicamente o DiMesna é menos reativo do que o Mesna, no sentido de reagir com os metabólitos das oxazafosforinas. Esta propriedade é de grande importância, uma vez que estes metabólitos circulam pela corrente sanguínea e se altas concentrações de Mesna fossem ali encontradas, estes poderiam ser inativados.(SHAW & GRAHAM, 1987) A alta solubilidade do Mesna e do DiMesna facilita seu rápido clearance do plasma para o rim. Isto se reflete nas suas curtas meias-vidas plasmáticas (em torno de 1,5 horas) comparadas com a da IFO (entre 6-8 horas). (SAROSY,1989 : BROCK et al., 1981; SHAW & GRAHAM, 1987) Esta rápida excreção urinária é importante uma vez que o Mesna (mais do que o DiMesna) é responsável pela detoxificação dos metabólitos urinários das oxazafosforinas.

Estudos sugeriram que a razão para que este composto tiol livre fosse excretado na urina é a presença de enzimas renais, a tiotranferase e glutathione redutase, capazes de realizar a redução do DiMesna em Mesna. (ORMSTAD & UEHARA, 1982)

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

Figura 7 . Representação esquemática da oxidação do Mesna (M-SH) em DiMesna (M-S-S-M) no plasma, seguido de sua redução de DiMesna em Mesna nos rins e a excreção urinária do Mesna

A reação do Mesna com metabólitos das oxazafosforinas nem sempre resulta da sua inativação, como a já conhecida interação entre o Mesna e as 4-hidroxi-oxazafosforinas resultando na formação de um composto com atividade antineoplásica alquilante, denominada de malfosfamida. (BROCK, 1980) (FIGURA 8)

O Mesna pode ser administrado pelas vias intravenosa (iv) e oral (vo), sendo por esta última bem absorvido e tolerado. Devido ao fato, citado anteriormente, da meia vida do Mesna ser inferior a das oxazafosforinas, faz-se necessária a repetição da administração do Mesna para se obter proteção vesical adequada. Portanto o Mesna costuma ser administrado em bolus ou em infusão contínua imediatamente antes da CFM ou IFO numa dose inicial de 20% da dose da oxazafosforina, seguida de doses semelhantes após 2 e 6 horas (na administração oral), ou após 4 e 8 horas na (administração intravenosa). (KATZ et al., 1995 ; GOREN et al., 1997)

Em estudos padrões pré-clínicos, o Mesna demonstrou baixa toxicidade aguda e crônica. Não apresentando teratogenicidade ou mutagenicidade. (ANON) Na clínica foram evidenciados discretos efeitos colaterais incluindo diarreia, cefaléia e dores nas pernas. (ANON)

A incidência de cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas, que girava em torno dos 40%, (HOEFER-JANKER et al., 1975) foi significativamente reduzida pela profilaxia com Mesna para cerca de 4%. (SCHEEF & SOEMER, 1980)

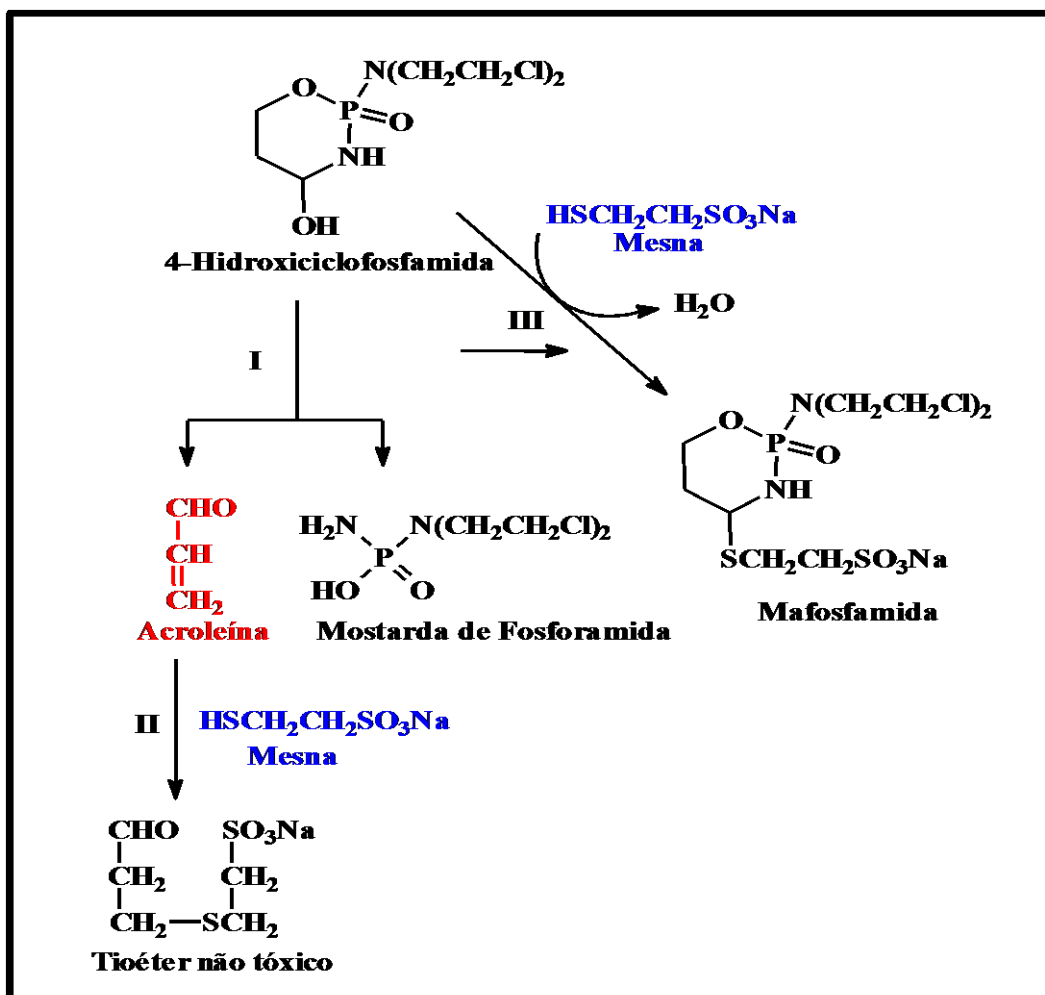


Figura 8. Representação esquemática da quebra espontânea da Hidroxiciclofosfamida (I) para formar a Acroleína e a mostarda de fosforamida, seguindo-se da detoxificação da Acroleína pela reação com o Mesna (II) formando um tioéster não tóxico. A reação da 4 – Hidroxiciclofosfamida com o Mesna (III) também é uma mostarda., a malfosfamida (ASTA Z7557)

Estudos demonstraram o Mesna também foi capaz de prevenir o desenvolvimento de tumores em animais submetidos a quimioterapia de longa duração com oxazafosforinas. (SCHMÄHL & HABS, 1979; HABS & SCHMÄHL, 1983)

2.4. Participação de mediadores inflamatórios na cistite hemorrágica.

As referências de que o metabólito urinário das oxazafosforinas, a Acroleína, era quem desencadeava toda a cascata de eventos inflamatórios da cistite hemorrágica foi até recentemente o único fato reconhecido na patogênese desta condição. No entanto, guiados pela idéia de que a compreensão detalhada de um modelo inflamatório se faz indispensável para o desenvolvimento de medidas preventivas e terapêuticas da patologia a qual se refere o modelo, foi que os pesquisadores de Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará vêm estudando o envolvimento de mediadores inflamatórios na patogênese da CH induzida por oxazafosforinas.

Os primeiros estudos realizados no LAFICA demonstraram o envolvimento de prostaglandinas, leucotrienos e PAF na patogênese da Cistite Hemorrágica induzida por ciclofosfamida. (LIMA, 1994)

Gomes e colaboradores demonstraram que citocinas pró inflamatórias, como Interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) desempenham papel essencial na patogênese da CH induzida por CFM, uma vez que a prévia

neutralização do TNF- α ou da IL1 endógena com soro anti TNF- α ou anti IL1 promoveu uma acentuada inibição dos eventos inflamatórios da CH. (GOMES et al., 1995)

A demonstração da participação do Óxido Nítrico (NO) como provável mediador final dos danos uroteliais e da hemorragia da CH foi uma grande contribuição dos pesquisadores do LAFICA no entendimento da patogênese da CH. Neste estudo Souza-Filho e colaboradores constataram que os eventos inflamatórios e a hemorragia da CH podiam ser bloqueados por inibidores da óxido nítrico sintase (NOS), como Éster Metil L-N^G-Niitroarginina (L-NAME) e L-N^G-Niitroarginina (L-NOARG), sendo este efeito revertido prontamente pela L-Arginina, mas não pelo seu isômero inativo a D-arginina. Adicionalmente, demonstraram por histoquímica para NADPH (Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) diaforase, que as células epiteliais das bexigas dos ratos controle exibiam grandes quantidades da enzima NOS constitutiva. Esta marcação após a indução da cistite com CFM desaparecia com a descamação, no entanto a CFM de forma dose e tempo dependente aumentou os níveis da NOS induzida em células que surgiram na lâmina própria, semelhantes a células inflamatórias. Este estudo ainda indicou a participação do Fator de ativação Plaquetária (PAF) como modulador da atividade da NOS na CH, parecendo sua ação ser requerida para a indução da NOS neste processo inflamatório vesical. (SOUZA-FILHO et al., 1997)

A ação do TNF- α na CH foi demonstrada em outro estudo realizado no LAFICA, quando soro anti TNF- α diminuiu significativamente o edema vesical induzido por CFM, bem como o aumento da atividade da NOS induzida, indicando

que a ação desta citocina também deve ser exigida para a indução da NOS. (RIBEIRO, et al., 1998)

A relevância da migração de neutrófilos no desenvolvimento da CH também já foi investigada por pesquisadores do LAFICA. Utilizando lectinas de plantas com afinidade específica de ligação por resíduos de glicose-manose, demonstraram que estas possuíam acentuada atividade antiinflamatória na CH induzida por CFM, pois diminuíram de forma significativa o dano urotelial, provavelmente por bloqueio competitivo da ligação com as selectinas, inibindo desta forma a migração de leucócitos para o sítio inflamatório. (ASSREUY et al., 1999)

Ribeiro e colaboradores também demonstraram o envolvimento do óxido nítrico produzido pela NOS induzida (NOSi) no dano urotelial e nos eventos inflamatórios que levam à cistite hemorrágica que se segue a administração de Ifosfamida, bem como concluíram que a indução da NOSi no urotélio parece depender de efeito sinérgico de IL-1 β e TNF- α . (RIBEIRO, 2002)

Recentemente estudos do LAFICA propuseram alternativas terapêuticas na prevenção da CH induzida por CFM e IFO, onde demonstraram que a substituição de uma ou duas doses do Mesna por dexametazona inibia significativamente o edema vesical e as alterações macro e microscópicas induzidas pelas oxazafosforinas, o mesmo não acontecendo com a substituição das três doses do Mesna.. Parecendo que o Mesna se faz necessário para a uroproteção inicial pelo seu efeito neutralizador da lesão urotelial iniciada pela ACR, enquanto que a dexametazona deve inibir os mediadores dos processo inflamatório que se segue. (MORAIS, et al., 1999)

Aceitando-se o fato de que o NO seria o mediador final da cascata de eventos inflamatórios que ocorrem no desenvolvimento da CH, permanece ainda a questão qual seria o provável mecanismo molecular intracelular através do qual o NO exerceria seus efeitos, uma vez induzida sua síntese após a ação inicial da ACR no urotélio.

A Figura 9 demonstra esquematicamente a participação de mediadores inflamatórios na CH induzida por oxazafosforinas.

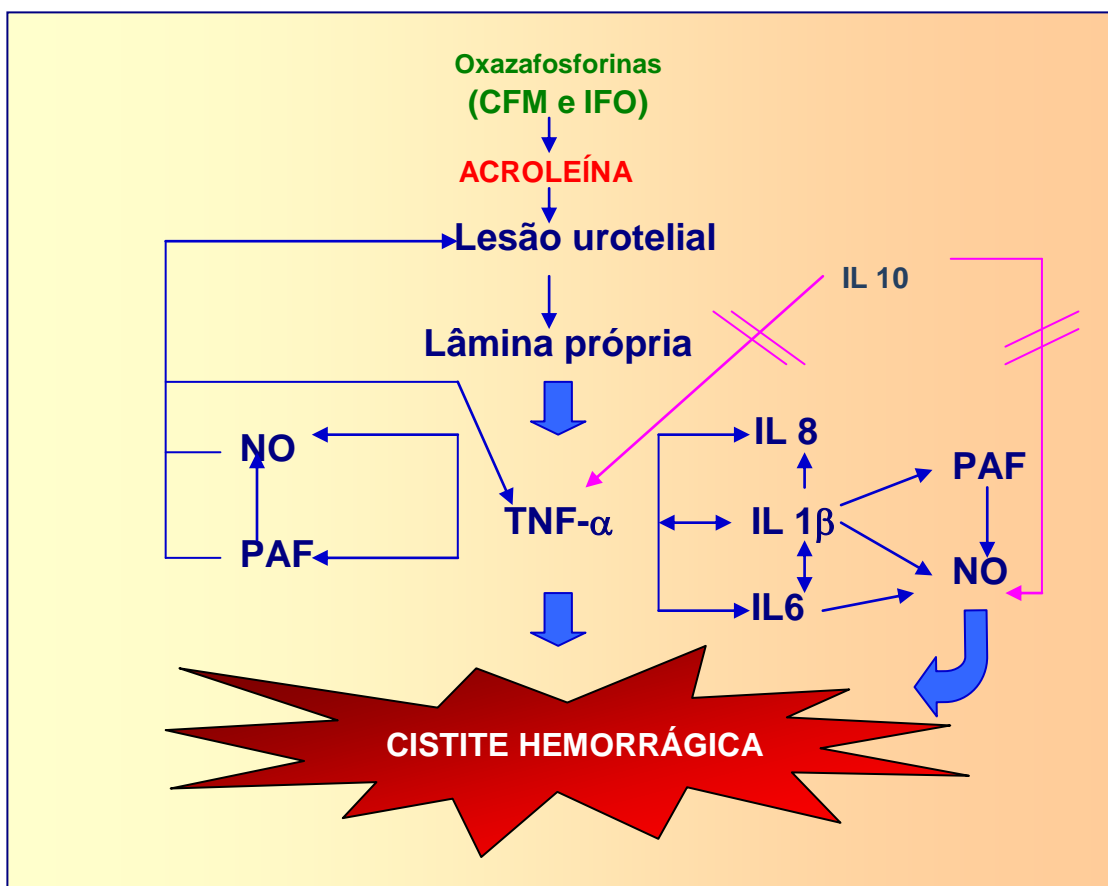


Figura 9. Representação esquemática da participação de mediadores inflamatórios na patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas

3. Glutathione

A manutenção de níveis intracelular apropriados de Glutathione reduzida (GSH) são de extrema importância para o funcionamento dos mecanismos de defesa contra agentes pró-oxidantes, para a detoxificação de drogas tóxicas eletrofílicas e na modulação das respostas imune e inflamatória. (WANG & BALLATORI, 1998 ; RAHMAN & McNEE. 2000)

A Glutathione reduzida (GSH) é um tripeptídeo que contém, como resíduo de cisteína, um grupo tiol (sulfidril) (FIGURA 4) , que é fundamental para o exercício de suas funções. O estado redox da GSH é crucial para muitos processos biológicos como ativação de genes específicos, modulação de sinais sensíveis ao estado redox, regulação da proliferação celular, da apoptose e da inflamação.(RAHMAN & McNEE, 2000)

Os níveis intracelulares de GSH dependem do balanço entre o seu consumo (oxidação) e de sua síntese. Esta síntese de GSH ocorre nas células dos mamíferos(MEISTER & TATE, 1996) na dependência de duas enzimas, a gama glutamylcisteína sintase (γ -GCS) e a Glutathione sintetase, (MEISTER & ANDERSON, 1983) sendo os níveis de síntese de GSH determinados, de uma forma geral, pela a atividade da γ -GCS. (FIGURA 10)

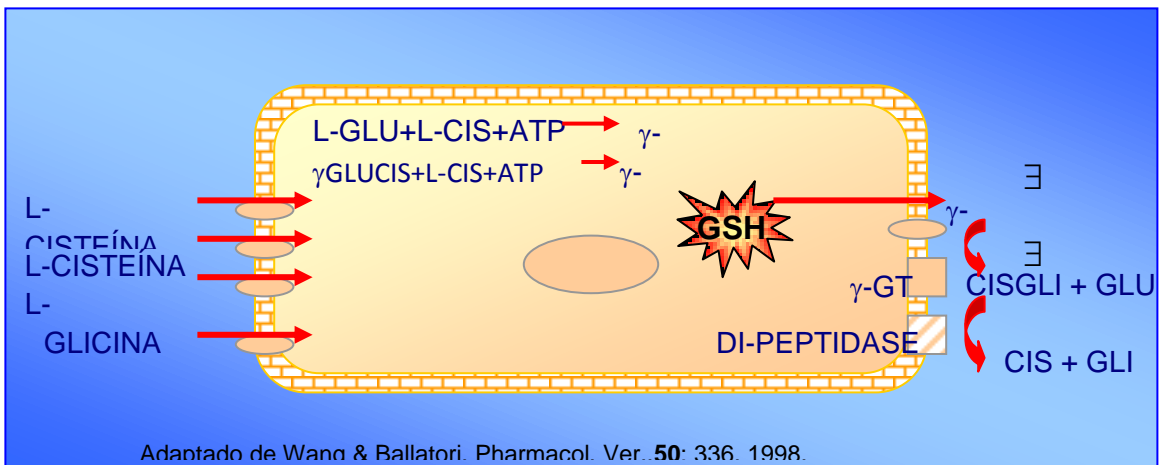


Figura 10. Esquema de síntese e degradação da Glutathione. (L-Glu, L-Glutamato; L-Cis, L-cisteína; Gli, Glicina; γ -GT, gama-glutamiltanspeptidase).

A biodegradação da GSH ocorre fora das células, na região externa da membrana plasmática, onde são encontradas as enzimas gama-glutamiltanspeptidase (γ -GT) e a di-peptidase. Os aminoácidos resultantes destas reações enzimáticas podem ser reaproveitados para uma nova síntese de GSH. (WANG & BALLATORI, 1998) (FIGURA 10)

Durante o metabolismo aeróbio, são liberados alguns compostos intermediários do oxigênio, entre estes o superóxido e o peróxido de hidrogênio, que podem gerar radicais tóxicos, causando peroxidação lipídica e alterações metabólicas nas células. A GSH constitui a primeira linha de defesa intracelular

contra agentes oxidantes derivados do oxigênio, principalmente na mitocôndria, que é onde ocorre a maior formação desses radicais. (DELEVE & KAPLOWITZ, 1991) A GSH é oxidada a GSSG (Glutathione oxidada), quando reage com compostos intermediários do oxigênio, pela ação da GSH peroxidase. Na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), a GSSG é rapidamente reduzida a GSH, pela ação da enzima GSSG redutase, formando um ciclo redox.(FIGURA 11) No estado normal de estresse oxidativo e nitrosativo a atividade da GSSG redutase e os níveis de NADPH são suficientes para manter o equilíbrio entre GSH/GSSG, sendo mais de 98% da Glutathione total constituída por GSH. Caso aumente este estresse ou ocorra diminuição da ação da GSSG redutase ou dos níveis de NADPH a GSSG se acumulará, sendo degradada no meio extracelular, requisitando uma maior síntese “de novo” de GSH. Este consumo de GSH com aumento de GSSG que causam alterações no estado redox intracelular, ativam a transcrição de genes antioxidantes como o da γ -GCS, que é mediada pela ativação do Fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). (GRIFFITH, 1999 ; MANNA et al., 1999)

O NO pode interagir com tióis proteicos ou de baixo peso molecular como a GSH, formando os S-nitrosotióis (TSIKAS et al., 1999; KOSTKA et al., 1999), sendo estes responsáveis pela regulação dos muitos dos processos fisiológicos onde há a participação do NO, como vasodilatação, (IGNARRO et al., 1987) agregação plaquetária, (HIRAYAMA et al., 1999) apoptose (MOHR et al., 1997) e proliferação celular. (LANDER et al., 1993)

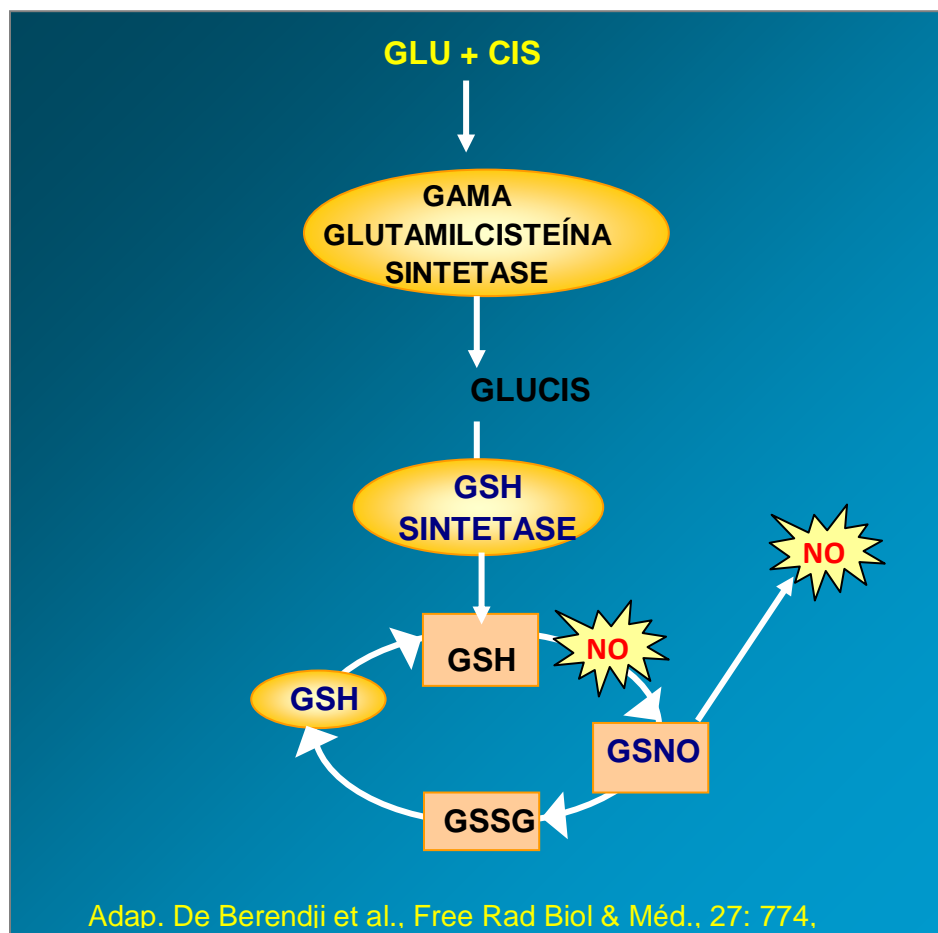


Figura 11. Ciclo Redox da Glutaciona Glu, Glutamato; Cis, cisteína; Gli, Glicina: GSH, Glutaciona reduzida; GSSG, Glutaciona oxidada.

A reação do NO com a GSH forma um composto intermediário, a nitrosoglutaciona (GSNO), que pode contribuir para os efeitos deletérios do NO, uma vez que são muito mais estáveis do que este gás, mantendo no entanto suas propriedades pois funcionam como reservas intracelulares de NO. (GASTON et al., 1993) O NO pode também interagir com enzimas do metabolismo da GSH, como a Glutaciona peroxidase (ASAHI et al., 1995), a Glutaciona S-transferase (CLARCK & DEBNAM, 1988), a γ -GCS (HAN et al., 1995) e a Glutaciona redutase, (BECKER

et al., 1995) diminuindo as defesas antioxidantes celulares tornando a célula mais susceptível a lesão oxidativa ou nitosativa.

4. Amifostina

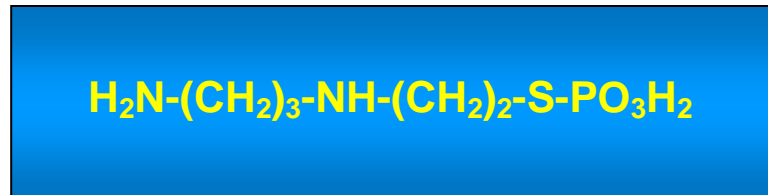


Figura 12 – Estrutura química da Amifostina

A Amifostina (AMF) é um tiofosfato orgânico, que emergiu dentre mais de 4000 compostos testados, num programa iniciado em 1959, pelo Exército dos Estados Unidos da América, que tinha como objetivos identificar e sintetizar drogas capazes de conferir proteção aos indivíduos que trabalhassem em ambientes radioativos, tendo sido codificada com o nome WR-2721. (SWEENEY, 1979)

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

A Amifostina, realmente trata-se uma pró droga que ao ser desfosforilada, por uma fosfatase alcalina ligada a membrana, se converte num produto ativo

contendo um grupamento tiol livre (SH) que recebeu o código WR-1065 .
(NAKAMURA et al., 1987) (FIGURA 13)

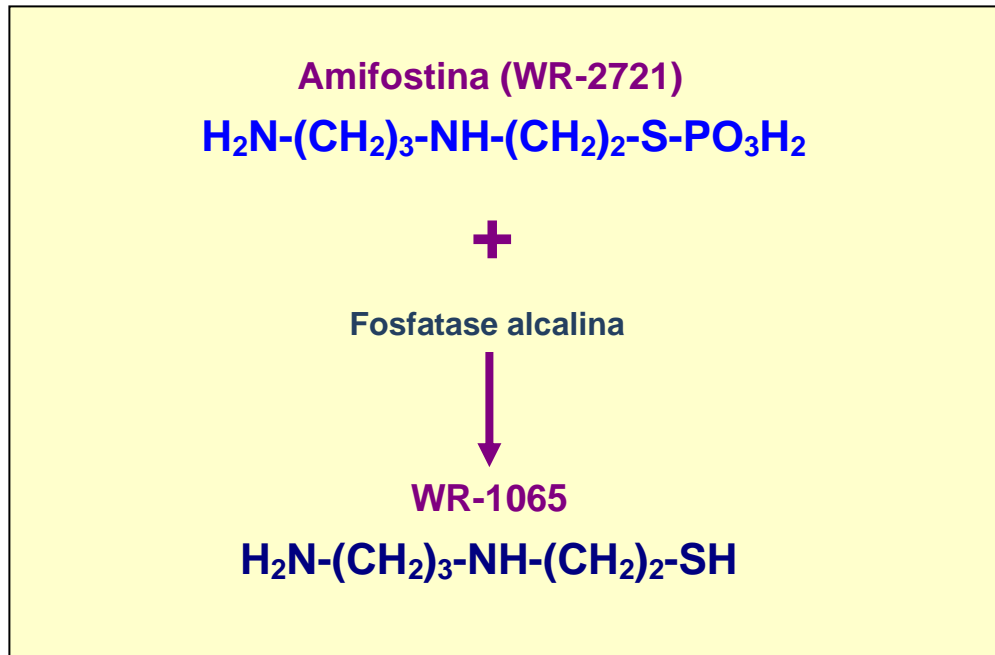


Figura 13 – Metabolismo da Amifostina (WR-2721)

A Amifostina parece proteger os tecidos normais de modo seletivo, primariamente porque há uma conversão preferencial pelas células normais, uma vez que a concentração da fosfatase alcalina ligada a membrana nestas é aproximadamente 275 vezes maior do que nos tecidos neoplásicos, (YANG et al., 1995) levando a grandes diferenças nas razões pelas quais a Amifostina é convertida no seu metabólito ativo. O pH neutro dos tecidos normais também favorece esta conversão , enquanto que o ambiente relativamente ácido dos tecidos tumorais a dificultam. (McCULLOCH et al., 1991; CALABRO-JONES et al., 1988) (FIGURA 14)

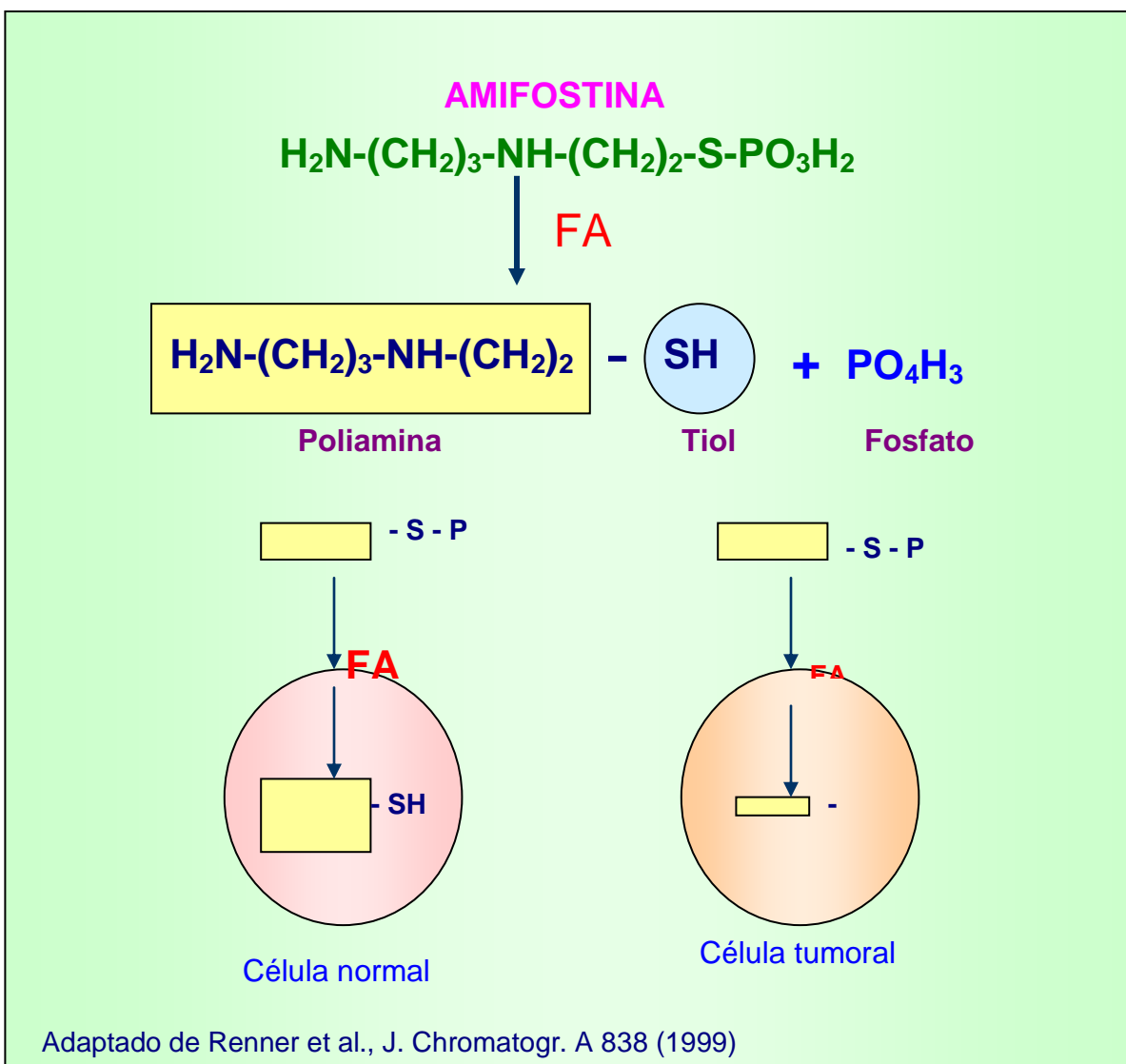


Figura 14. Mecanismo proposto para a seletividade da Amifostina. Apenas o metabólito ativo, o composto com um grupamento tiol livre (**SH**), entra nas células. Este é formado nos tecidos por uma fosfatase alcalina (**FA**) ligada à membrana; Células tumorais têm atividade reduzida desta enzima comparada à células normais.

Um outro fator que diferencia a concentração da forma ativa da Amifostina nas células normais é o modo através do qual ela é transportada, ou seja a droga ativa entra nestas por difusão facilitada enquanto que entra por difusão passiva nas células neoplásicas. (YUHAS, 1980), resultando desta forma numa concentração do composto tiol livre 50 a 100 vezes superior nos tecidos normais, mesmo após múltiplas e consecutivas doses.(CAPIZZI, 1996)

A farmacocinética da Amifostina tem sido estudada utilizando-se cromatografia líquida de alta performance com detecção por cintilação. Estes estudos demonstraram que se seguindo a sua administração, a Amifostina possui no homem meias vidas de distribuição e eliminação extremamente rápidas ($T_{1/2\alpha} < 1\text{min}$; $T_{1/2\beta} = 8.8\text{ min}$). (CAPIZZI R.L., 1996) Aproximadamente 90% da droga é removida do plasma dentro de 6 minutos; portanto a quantidade de pró-droga que é bioconvertida a tiol livre na circulação sistêmica é bem pequena em relação a dos tecidos normais. (SHAW et al., 1986 ; SHAW et al., 1988). Este rápido clearance ocorre de maneira similar em cães, (SWYNNERTON et al., 1985) em macacos (SWYNNERTON et al., 1986) e em camundongos. (SHAW et al., 1994)

Em estudos experimentais recentes, in vivo e in vitro, o uso da Amifostina reduziu a atividade citotóxica nas células normais de diversos esquemas terapêuticos anticâncer, sem redução da sua ação citotóxica antitumoral. (ALBERTS et al., 1996; YUHAS, 1979; PAINE et al., 1996) Como exemplo podemos citar o efeito protetor da Amifostina na mielotoxicidade induzida por ciclofosfamida (DOUAY et al., 1995) e na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina. (YUHAS & CULO, 1980) Diversos estudos clínicos têm demonstrado

que o pré tratamento com Amifostina resultou em uma diminuição na incidência da nefrotoxicidade, mielotoxicidade e neurotoxicidade em pacientes que receberam ciclofosfamida, cisplatina e uma associação destes agentes, sem no entanto haver decréscimo na sua ação antitumoral. (KEMP et al., 1996 ; CAPIZZI & OSTER, 1995) Também em investigação clínica a Amifostina apresentou-se como um agente citoprotetor de amplo espectro, sendo eficaz na nefrotoxicidade, neurotoxicidade, esofagite, xerostomia e mucosite induzida por quimioterapia e radiação (GRIGS , 1998). Adicionalmente, estudos pré clínicos sugerem que a Amifostina pode também proteger contra a cardiotoxicidade induzida por antraciclinas e mutagenicidade induzida por quimioterapia e radiação (GRDINA et al., 1992; LITTLEFIELD et al., 1993)

No caso da administração da Amifostina para a prevenção da toxicidade induzida pela cisplatina a dose recomendada para adultos é de 740 a 910 mg/m², uma dose diária, numa infusão de 15 minutos, iniciada 30 minutos antes da terapia com cisplatina. (GRDINA, 1997)

Os mecanismos pelos quais a Amifostina protege as células normais ainda estão sob investigação, no entanto esta citoproteção possivelmente inclui os seguintes mecanismos:

a) Capacidade de atuar com um “*scavenger*” de radicais livres, protegendo os tecidos dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio geradas a partir de agentes quimioterápicos, radiação ionizante e drogas eletrofilicas reativas como os agentes alquilantes.

b) A Amifostina pode doar um átomo de hidrogênio e facilitar então, diretamente o reparo químico nos locais de destruição do DNA.

c) Seu componente tiol se liga aos agentes quimioterápicos impedindo assim sua ligação com o DNA. (VAN DER VIJGH & PETERS, 1994)

d) Esta proteção, conferida pela Amifostina, também tem sido atribuída à modulação dos níveis de Glutathione. (UMA DEVI & PRASANNA, 1990)

Os efeitos adversos mais comuns da Amifostina são náuseas e vômitos, que ocorrem principalmente quando os tempos de infusão são superiores a 15 minutos. (TURRISI et al., 1986). Se a Amifostina é administrada associada a um esquema quimioterápico muito emetogênico, o balanço hídrico do paciente deve ser cuidadosamente monitorado. É recomendado o uso de medicação antiemética, 1 hora antes da Amifostina, incluindo dexametazona e antagonistas dos receptores 5-HT₃ (ondasetron 32 mg ev ou granisetron 1 mg ev). O lorazepam pode também ser útil no controle de náuseas refratárias (SCHUCHTER, 1996)

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

Coriza e espirros são comuns, ocorrendo em aproximadamente 25% dos pacientes, mas resolvem-se uma vez que a infusão se complete. ((TURRISI et al., 1986)

Hipocalcemia, que pode resultar da inibição da liberação dos hormônios das paratireóides, é comum no entanto raramente possui significância clínica. (SCHUCHTER, 1996)

O fato da Amifostina ser extensamente estudada como uma droga citoprotetora (HOPERS et al, 1999), bem como já ser utilizada na prevenção da mielotoxicidade induzida por cisplatina e ciclofosfamida, (LINKS & LEWIS, 1999) despertou nosso interesse em avaliar o seu possível efeito protetor em modelo de cistite hemorrágica induzida por Acroleína.

5. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A demonstração de que a ACR, metabólito final das oxazafosforinas, é a causa da CH induzida por estas, foi decorrente de estudos onde foram administrados compostos que supostamente produziram a ACR e não pela demonstração de sua ação direta ao ser injetada intravesicalmente.

Conforme descrito anteriormente, já se conhece a participação de citocinas e NO na patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas, sendo provavelmente, o NO o mediador final desta lesão. No entanto ainda não foram esclarecidos, os mecanismos intracelulares da ação do NO na CH.

Um modelo de cistite hemorrágica induzida por Acroleína poderia comprovar a importância, já atualmente aceita, deste aldeído tóxico na lesão urotelial, além de poder vir a ter utilidade na investigação dos alvos moleculares do NO nesta condição.

Nossos objetivos nesta tese de dissertação de mestrado foram os seguintes:

1- Avaliar a exequibilidade da indução de CH pela injeção intravesical (*ive*) de ACR em modelo murino.

2- Tendo em vista validar o modelo, verificar se o Mesna, um uroprotetor de comprovada eficácia clínica, seria capaz de prevenir a lesão vesical induzida pela a injeção *ive* de Acroleína.

3- Utilizar o modelo para avaliar o papel protetor da Glutathione, bem como verificar se esta possível proteção também pode ser obtida na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida.

4- Avaliar o efeito citoprotetor da Amifostina em modelos de cistite hemorrágica induzida por Acroleína e por Ifosfamida em camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais:

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 25 a 35 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici - UFC, do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC e do Biotério da Faculdade de Medicina - USP- Ribeirão Preto.

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

2. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais.

- Agulhas 29G e 25 G;
- Balança para pesagem dos animais, mod. ID-1500 (FILIZOLA);
- Balança analítica, digital modelo 260 (MARTE);
- Banho -maria modelo 100 (FANEN)
- Base emborrachada para permanência do animal;
- Bastão de vidro;
- Beckers de 5, 10 e 50 ml;

- Fio de sutura em Algodão 3-0
- Geladeira e freezer;
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Leitor de ELISA;
- Luvas descartáveis;
- Material cirúrgico (pinças, tesouras, agulhas, etc);
- Microscópio óptico binocular (OLYMPUS CX 40);
- Micrótomo modelo 820 SPENCER - American Optical Corporation;
- Pletismômetro Hugo Basile (7140)
- Seringas de insulina 0,5 cc com agulha 29G ultrafina (13 x 3,3), de 1 e de 5 ml (BECTON - DICKINSON);
- Tubos plásticos de 15 ml (FALCON)

3. Drogas, soluções , Líquidos e Corantes utilizados

- Acroleína (densidade =0,84 mg/ml) – (SIGMA Brasil)
- Amifostina (Ethyol 200mg – Gentilmente cedido pela Schering do Brasil):dissolvida em solução salina 0,9%
- Glutaciona reduzida (SIGMA do Brasil)
- Ifosfamida (HOLOXANE 1g- Asta Médica, AG Frankfurt, Alemanha): dissolvida em solução salina 0,9%
- Mesna (MITEXAN 400 mg - Asta Médica, AG Frankfurt, Alemanha): dissolvido em solução salina 0,9%

- Água destilada (AD)
- Alcool etílico 70% (Reagen)
- Alcool iodado
- Azul de Evans (AE) - (SIGMA da Brasil)

AE.....2,5 g

AD.....100mL

- Eosina (Reagen)
- Formamida (Vetec)
- Formol 10% (Formol concentrado - Merck - 10mL
Água destilada q.s.p. - 100,0 mL)

- Hematoxilina (Reagen)
- Soro fisiológico 0,9%

4. Protocolo experimental.

4.1. Indução da cistite hemorrágica.

4.1.1. Cistite hemorrágica induzida por injeção intravesical de Acroleína

Em camundongos *Swiss* machos (25-35g), anestesiados com injeção *ip* de Hidrato de cloral (400 mg/kg, a partir de uma solução a 10%), foi realizada, sob condições estéreis, pequena incisão abdominal na linha média, com aproximadamente 1 cm. Através desta incisão a bexiga foi exposta e após o

esvaziamento do seu conteúdo urinário, por suave compressão bidigital, um volume de 0,1 ml de ACR, nas doses de 25, 75 e 225 μg /bexiga, ou de salina como controle (sham), foram injetados no polo superior e no lúmen vesical com agulha curta (13 x 3,3), ultra fina, de calibre 29. Após a injeção a bexiga foi recolocada com cautela na sua posição anatômica e a parede abdominal foi fechada em um único plano com fio de algodão 3-0 com pontos separados (FIGURA). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após 3, 6, 12 ou 24 horas da injeção da ACR, conforme o protocolo experimental realizado, em seguida reabertos e, após cuidadosa dissecação vesical, as bexigas foram seccionadas junto ao colo, tendo seus conteúdos desprezados. Foram colocadas em contato com papel absorvente para retirar o excesso de líquidos e posteriormente submetidas a análise das alterações macroscópicas, do peso úmido vesical, da permeabilidade vascular e histopatologia, conforme descrição a seguir.



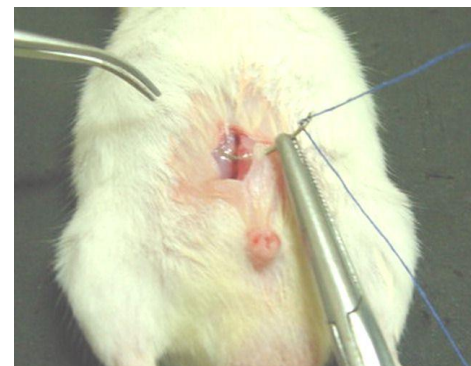
A



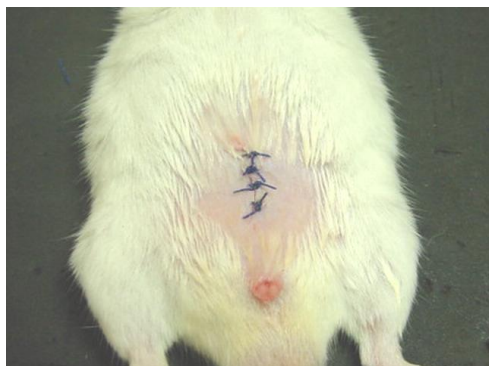
B



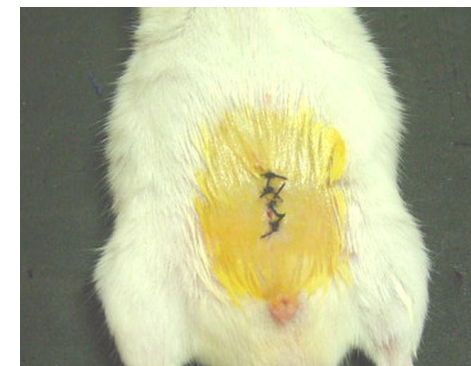
C



D



E



F

FIGURA 15 – Etapas do Modelo de Indução de Cistite hemorrágica induzida por injeção intravesical de Acroleína. A- Abertura da Cavidade Abdominal; B- Exposição da Bexiga; C- Injeção Intravesical de Acroleína, D- Fechamento em plano único da incisão cirúrgica, E- Parede abdominal suturada; F- Assepsia da Sutura com Álcool Iodado.

4.1.2. Cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida.

Camundongos *Swiss* machos foram tratados com injeção intraperitoneal de Ifosfamida (400 mg/Kg), após 12 horas foram sacrificados por deslocamento cervical e em seguida tiveram suas bexigas retiradas após serem cuidadosamente dissecadas. As bexigas foram posteriormente submetidas a análises macroscópicas, do peso úmido vesical, da permeabilidade vascular e histopatológicas, conforme o delineamento experimental.

4.2. Parâmetros para avaliação da Cistite hemorrágica

4.2.1. Determinação do Edema

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

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

4.2.2. Determinação da Permeabilidade Vascular (PV)

Trinta minutos antes do sacrifício os animais receberam injeção endovenosa, via plexo retroorbitário, de solução de Azul de Evans (AE) a 2,5% na

dose de 25 mg/Kg. De acordo com o descrito anteriormente, após serem sacrificados, os animais tiveram suas bexigas retiradas, pesadas e colocadas em tubos com 1 ml de Formamida, os quais foram incubados a 56° C durante toda a noite. A absorvância do corante extraído da bexiga pela Formamida, foi lida em 600nm, realizada em um espectrofotômetro. Através da utilização de uma curva padrão de AE estes resultados foram convertidos em (μg de AE). Nossos dados foram expressos como Média + EPM de (μg de AE/ bexiga).

4.2.3. Análise Macroscópica

As bexigas foram cuidadosamente dissecadas e examinadas macroscopicamente, logo após sua retirada e esvaziamento do conteúdo. De acordo com os critérios de Gray, (GRAY et al., 1996) foram avaliadas quanto a edema e hemorragia, conforme o descrito a seguir:

Edema:

Grave (3+): edema interno e externo;

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

Leve(1+): intermediário;

Normal(0): nenhum.

Hemorragia:

(3+): coágulo intravesical;

(2+): Hematomas na mucosa;

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

(0): Normal.

4.2.4. Análise Histopatológica

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

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

(1+) - Alterações discretas: Caracterizada por número de células epiteliais uroteliais diminuídos pela descamação, apagamento das dobras habituais

da mucosa em decorrência do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras

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

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (DHEW Publication, Bethesda, MD, USA.).

5. Delineamentos Experimentais

5.1. Análise preliminar do modelo de Cistite Hemorrágica induzida por Acroleína

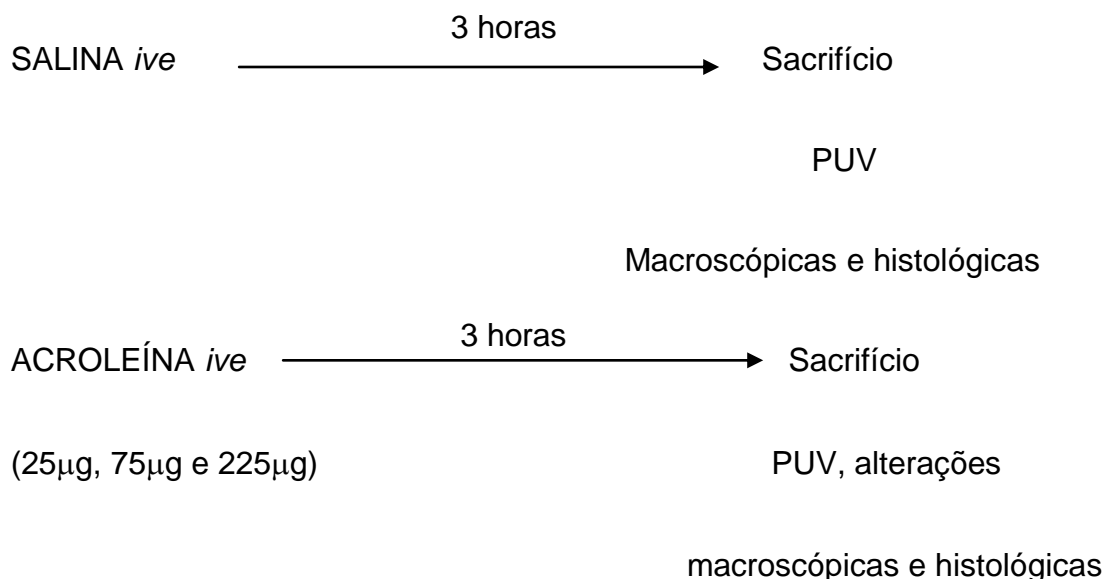
Para avaliar a exequibilidade deste modelo experimental de CH, bem como para obter dados que pudessem ser utilizados em delineamentos posteriores foram realizados os seguintes experimentos.

5.1.1. Efeitos da administração intravesical de doses crescentes de Acroleína na variação do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas

Camundongos *Swiss* machos, em número de 20 animais, divididos em 4 grupos, receberam injeção *ive* de Acroleína nas doses de 25, 75 e 225 µg /

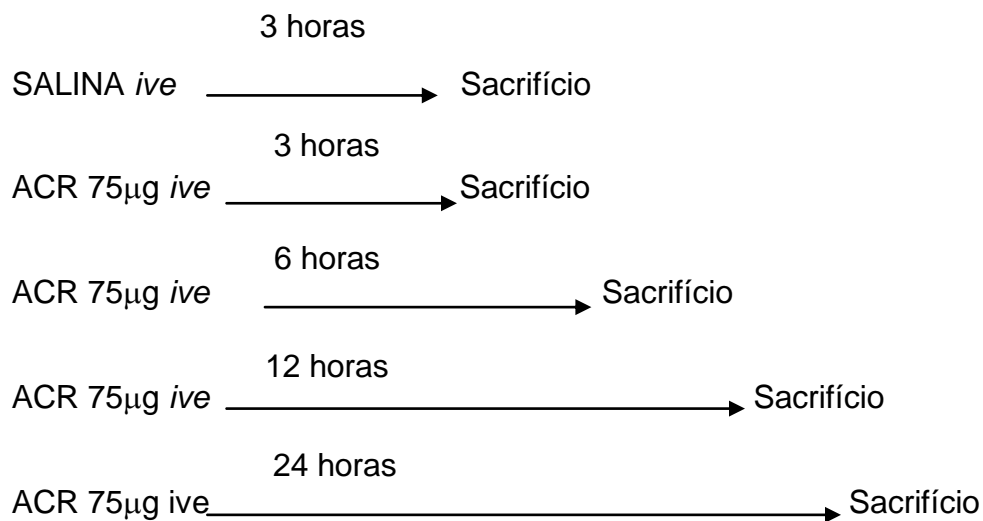
Bexiga, conforme descrito anteriormente, e sacrificados após 3 horas da injeção. Animais de um grupo controle receberam o mesmo volume de solução salina *ive* sendo sacrificados após o mesmo tempo.

As bexigas de todos os animais foram dissecadas, pesadas determinadas alterações do PUV e submetidas a análises macroscópicas e microscópicas.



5.1.2. Efeitos da administração intravesical de doses crescentes de Acroleína na variação da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos

Dezesseis camundongos machos foram divididos em 4 grupos e receberam injeção *ive* de Acroleína nas doses de 25, 75 e 225 µg / Bexiga, conforme descrito anteriormente, sendo que o primeiro grupo recebeu salina *ive*. Todos foram sacrificados após 3 horas da injeção. Trinta minutos antes do sacrifício



5.2. Avaliação da proteção vesical exercida pelo Mesna na cistite hemorrágica induzida pela injeção intravesical de Acroleína

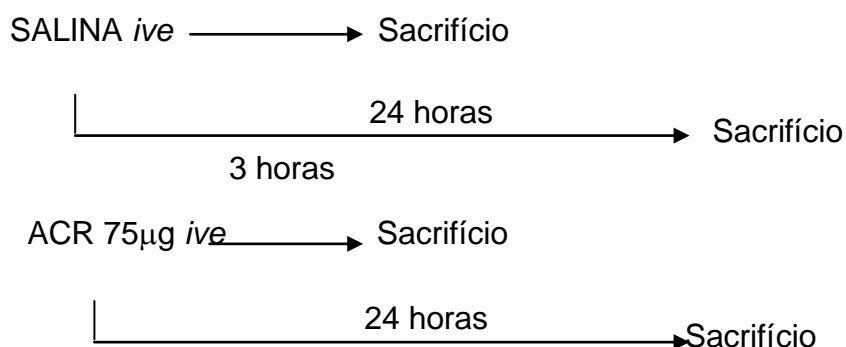
Para avaliar este efeito protetor, os animais que receberam injeção intravesical de Acroleína (75µg) foram tratados com Mesna, através de duas vias de administração, *ip* e *ive*.

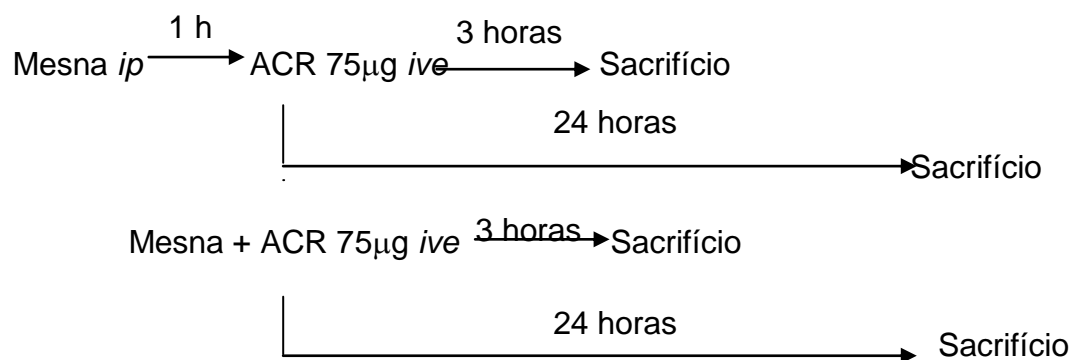
Para a via intraperitoneal foi escolhida a dose do Mesna de 80 mg/Kg, baseando-se na dose que é administrada clinicamente para a proteção vesical, 20% da dose da Ifosfamida (400 mg/Kg), imediatamente antes e 4 e 8 horas após.

Já para administração *ive* em associação com a Acroleína, utilizamos a dose de 2 mg/Bexiga, uma vez que esta corresponde aproximadamente a mesma dose *ip*, 2 mg/25 g de peso.

5.2.1. Efeito do tratamento com Mesna nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas de bexigas de camundongos tratados com Acroleína intravesical

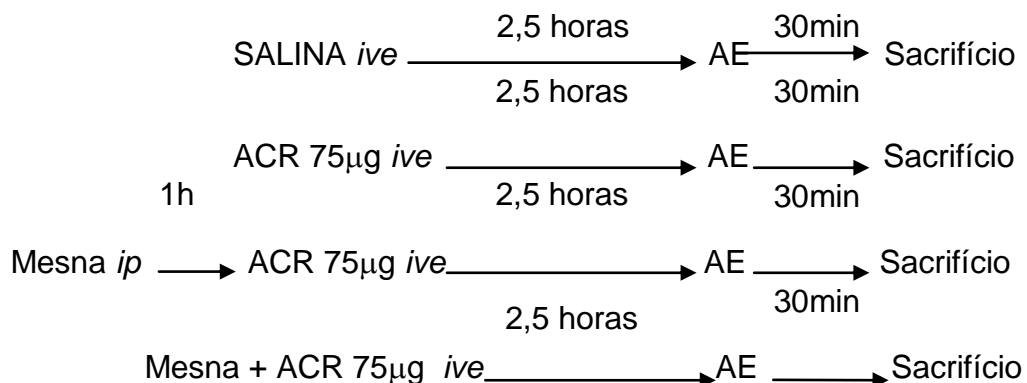
Camundongos machos receberam injeção intravesical de Acroleína 3 horas
75 µg/Bexiga conforme procedimento já descrito, sendo os animais sacrificados após 3 e 24 horas; nos grupos controle foi injetada solução salina *ive*. Para verificar o efeito do Mesna na cistite induzida por Acroleína, este foi administrado tanto sistemicamente por via intraperitoneal, 80 mg/kg, 1 hora antes da injeção *ive* de ACR, como associada a esta na administração *ive*, 2 mg/Bexiga. Os animais tratados com o Mesna (*ip* ou *ive*) também foram sacrificados 3 e 24 horas após. O efeito do tratamento com Mesna nas variações do PUV, alterações macroscópicas e histopatológicas induzidas pela injeção de ACR foram avaliados nos diferentes tempos.





5.2.2. Efeito do tratamento com Mesna nas variações da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos tratados com Acroleína intravesical

Utilizamos camundongos machos nos quais a cistite foi induzida por injeção intravesical de Acroleína 75 µg/Bexiga, o grupo controle recebeu solução salina *ive*. O Mesna foi administrado pela via intraperitoneal, 80 mg/kg, 1 hora antes da indução da cistite e por via intravesical associado a Acroleína, 2 mg/Bexiga. Todos os animais foram sacrificados após 3 horas da indução da cistite. Trinta minutos antes do sacrifício todos receberam Azul de Evans (25 mg/Kg *ev*) para posterior avaliação da permeabilidade vascular.

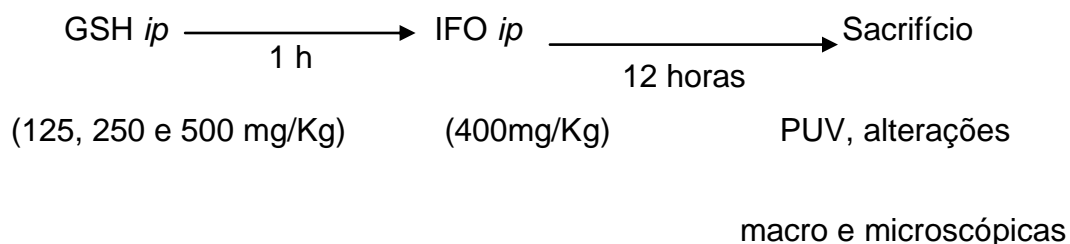


5.3. Avaliação do efeito protetor da Glutathione na cistite hemorrágica.

Para avaliar o efeito uroprotetor da Glutathione na cistite induzida pela injeção intravesical de Acroleína, primeiramente fomos estabelecer a dose a ser utilizada. Semelhantemente ao que fizemos com o Mesna, utilizamos a dose de GSH que foi capaz de proteger as bexigas dos animais tratados com Ifosfamida.

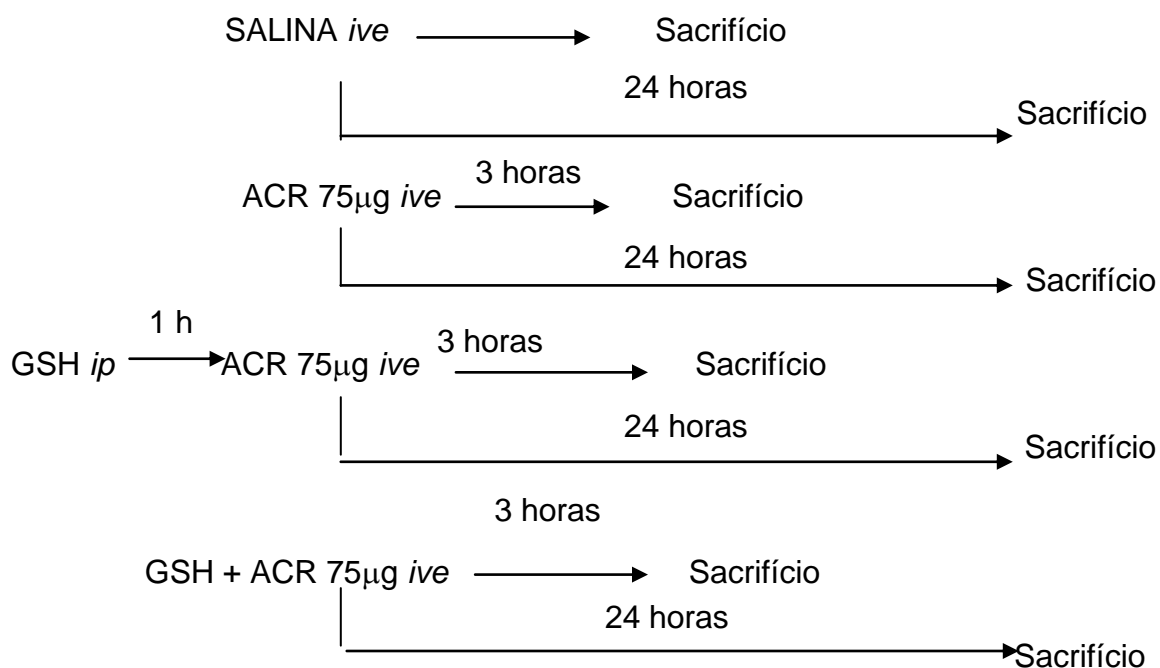
5.3.1. Efeito de doses crescentes de Glutathione nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas da cistite induzida por Ifosfamida em camundongos

Camundongos *Swiss* machos, em número de 30, foram divididos em 5 grupos. Os animais do primeiro grupo receberam apenas Ifosfamida 400 mg/kg *ip*. Três outros grupos foram submetidos a injeções intraperitoneais de Glutathione nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, 1 hora antes da indução da cistite com IFO (400 mg/kg *ip*). No grupo controle apenas solução salina foi administrada (0,5 ml/20g *ip*). A cistite hemorrágica foi avaliada após 12 horas da administração da IFO, pela determinação das mudanças do PUV, análise macroscópica e avaliação histopatológica, conforme já descrito.



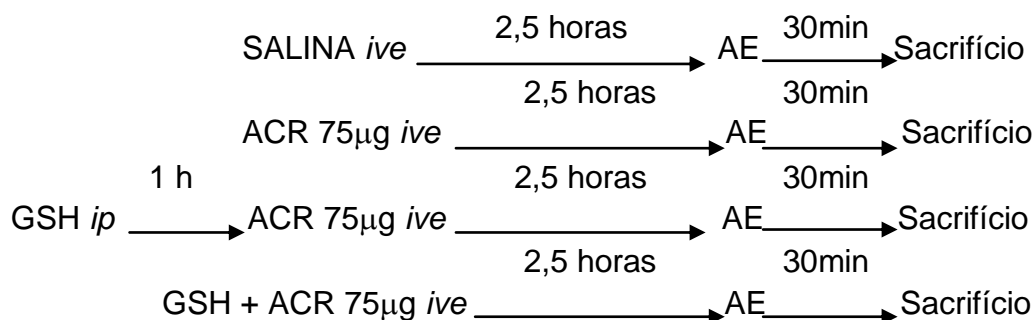
5.3.2. Avaliação do efeito da administração de Glutathione nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas na cistite induzida por Acroleína

Quarenta e oito camundongos *Swiss Machos* foram divididos em quatro grupos. No primeiro grupo, os camundongos receberam apenas injeção intravesical de Acroleína 75 µg/Bexiga conforme metodologia já descrita. No grupo controle foi injetada solução salina *ive*. Nos animais dos outros dois grupos a Glutathione foi administrada pela via intraperitoneal (500 mg/kg) 1 hora antes da indução da cistite por *ACR*, ou pela via intravesical (2mg/bexiga), associada a Acroleína. Após 3 horas da indução da cistite foram sacrificados 6 animais de cada grupo, o mesmo ocorrendo após 24 horas. O efeito protetor do tratamento com GSH nas variações do PUV, alterações macroscópicas e histopatológicas induzidas pelo injeção de *ACR*, nos diferentes tempos, foram avaliadas.



5.3.3. Efeito do tratamento com Glutathione nas variações da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos tratados com Acroleína intravesical

Utilizamos 18 camundongos machos nos quais a cistite foi induzida por injeção intravesical de Acroleína 75 µg/Bexiga, tendo um grupo controle (n=6) recebido solução salina *ive*. A Glutathione foi administrada pela via intraperitoneal (500 mg/kg) 1 hora antes da indução da cistite ou por via intravesical (2mg/Bexiga) associada a Acroleína . Todos os animais foram sacrificados após 3 horas da indução da cistite. Trinta minutos antes do sacrifício todos foram injetados com Azul de Evans (25 mg/Kg *ev*) e avaliados quanto as variações da permeabilidade vascular.

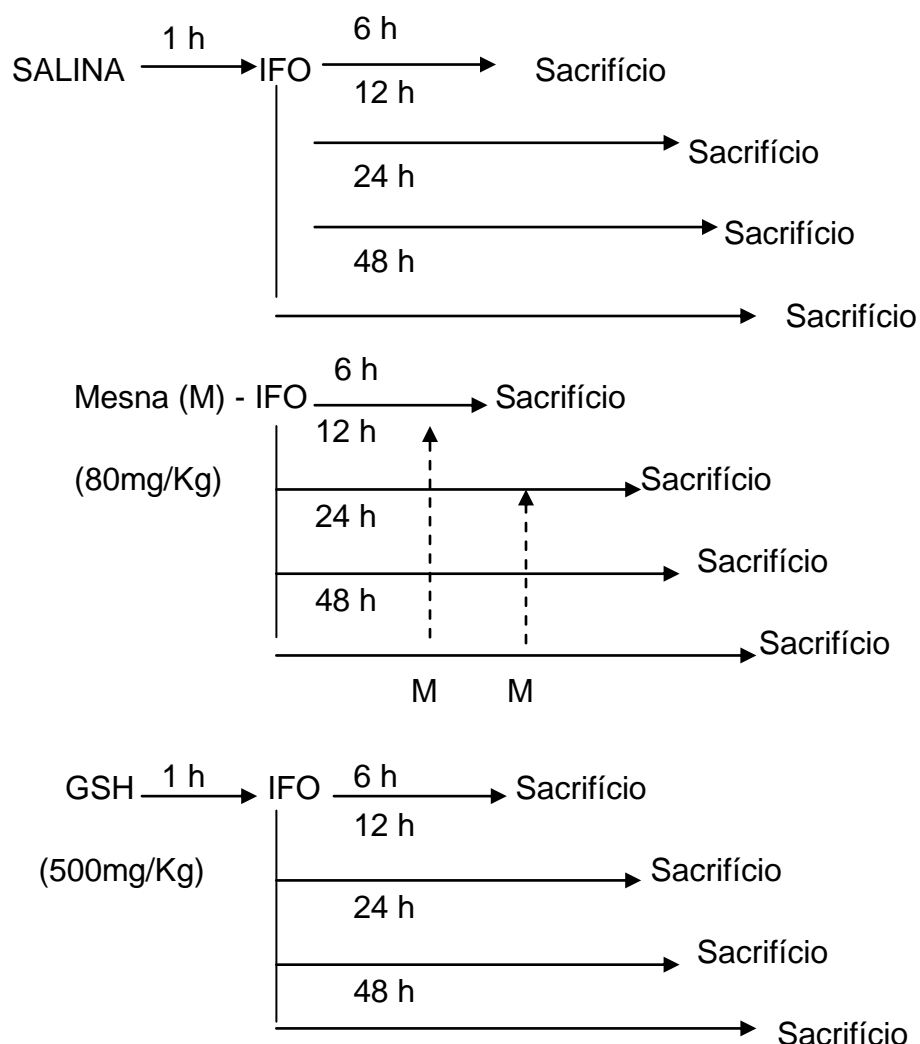


5.4. Efeitos comparativos do Mesna e da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifosfamida em camundongos - Variações do Peso Úmido Vesical.

Utilizamos para este experimento 72 camundongos *Swiss* machos, divididos em 3 grupos, que receberam Ifosfamida 400 mg/kg *ip*. Um destes grupos

foi tratado com Mesna imediatamente antes e após 4 e 8 horas da indução da cistite com IFO, outro grupo recebeu uma dose de Glutathiona (500 mg/kg *ip*), 1 hora antes da IFO e o outro, da mesma maneira, solução salina (0,5 ml/20g *ip*). Os animais dos três grupos foram sacrificados seis a seis após 6, 12, 24 e 48 horas da IFO.

Também foram utilizados seis camundongos, que receberam apenas 0,5 ml/Kg *ip* de solução salina que foram sacrificados para obtenção dos pesos úmidos vesicais, que serviram como controle. Após o sacrifício, as bexigas foram avaliadas quanto às variações do peso úmido.



5.5. Efeitos da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifosfamida em camundongos – Alterações macroscópicas e histopatológicas.

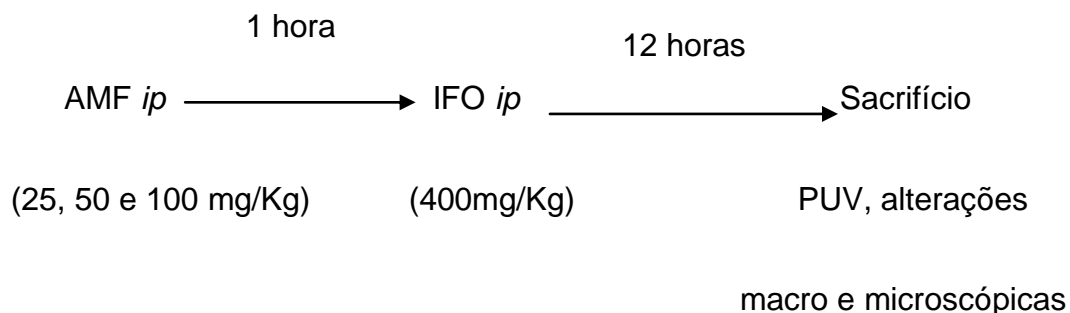
Utilizamos para este experimento 48 camundongos *Swiss* machos, divididos em 2 grupos, nos quais a cistite hemorrágica foi induzida por injeção *ip* de Ifosfamida 400 mg/kg. Um destes grupos foi tratado com uma dose de Glutathione (500 mg/kg *ip*), 1 hora antes da IFO e o outro, da mesma maneira, solução salina (0,5 ml/20g *ip*). Os animais de ambos os grupos foram sacrificados seis a seis após 6, 12, 24 e 48 horas da IFO.

Também utilizamos, como controle, seis camundongos, que receberam apenas 0,5 ml/Kg *ip* de solução salina. Após o sacrifício, todos os animais tiveram suas as bexigas dissecadas e avaliadas quanto às variações macroscópicas e histológicas.

5.6. Efeito de doses crescentes de Amifostina na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida – Avaliação da variação do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histológicas.

Trinta camundongos *Swiss* machos foram divididos em 5 grupos. Os animais do primeiro grupo receberam somente Ifosfamida 400 mg/kg *ip*. Três outros grupos foram submetidos a injeções intraperitoneais de Amifostina (AMF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, 1 hora antes da indução da cistite com IFO (400 mg/kg *ip*). No grupo controle apenas solução salina foi administrada

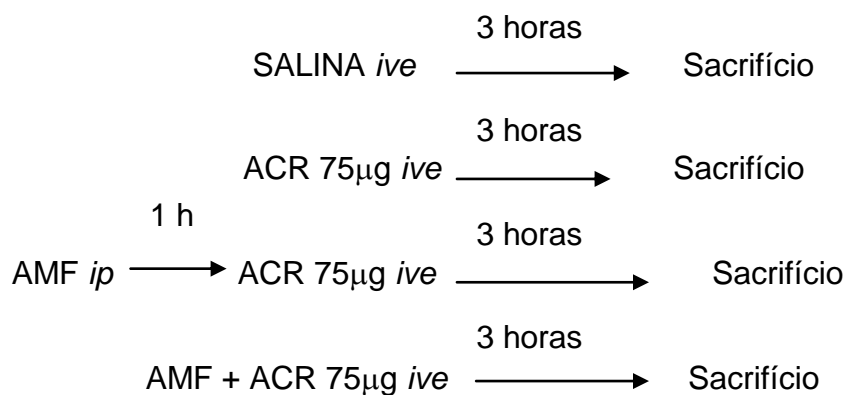
(0,5 ml/20g *ip*). A cistite hemorrágica foi avaliada após 12 horas da administração da IFO, pela determinação das variações do PUV, análise macroscópica e avaliação histopatológica, conforme descrito anteriormente.



5.7. Efeito da Amifostina na cistite hemorrágica induzida por injeção intravesical de Acroleína – Avaliação da variação do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histológicas.

Utilizamos vinte e quatro camundongos Swiss Machos, que foram divididos em quatro grupos. O primeiro grupo recebeu apenas injeção intravesical de Acroleína 75 µg/Bexiga conforme metodologia já descrita. No grupo controle foi injetada solução salina *ive* (0,1 ml). Nos animais dos outros dois grupos a Amifostina foi administrada pela via intraperitoneal (50 mg/kg) 1 hora antes da indução da cistite por ACR, ou pela via intravesical (1,5 mg/bexiga), associada a Acroleína. Todos os animais foram sacrificados após 3 horas da indução da

cistite. Foi avaliado o efeito protetor do tratamento com AMF nas variações do PUV, alterações macroscópicas e histopatológicas induzidas pela injeção de ACR.



5.8. Cinética de edema de pata induzida por Acroleína em camundongos

Para avaliar a atividade inflamatória da Acroleína realizamos este experimento, onde num grupo com camundongos *Swiss* (n=6) foi realizada injeção subplantar (*sp*) de 0,06 ml de Acroleína (40 µg) na pata esquerda, volume igual de solução salina também foi injetado em um outro grupo de seis animais. O volume das patas foi mensurado imediatamente antes da administração da ACR (volume basal) e em seguida após 30 minutos, 1, 2, 6, 24 e 48 horas bem como no 6º dia, com pletismômetro. Foi considerado como edema a variação entre o volume da pata (ml) e o seu valor basal em cada medida. Os resultados foram expressos como média + EPM.

5.9. Efeito da administração de Mesna no edema de pata induzido por Acroleína em camundongos.

Visando verificar a ação protetora do Mesna, como um antagonista químico da Acroleína, utilizamos 18 camundongos *Swiss*, divididos em 3 grupos. Todos os animais foram tratados com 0,06 ml de Acroleína (40 μ g) *spl*. Em um dos grupos o Mesna (80 mg/kg) foi administrado 1 hora antes da ACR por via intraperitoneal, outro grupo recebeu o Mesna (1mg/pata) em solução com a Acroleína, enquanto que no grupo controle apenas a ACR foi administrada. Lançando mão da mesma metodologia aplicada no experimento anterior (5.8.), as patas foram medidas por pletismometria imediatamente antes da Acroleína, após 30 minutos, 1, 2 e 6 horas. O edema foi expresso como as variações dos volumes em relação a medida inicial (ml). Os resultados são apresentados como média + EPM.

6. Análise Estatística

Os resultados da variação do Peso úmido Vesical e da Permeabilidade Vascular foram expressos como média + Erro Padrão da Média (EPM). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni.

Os dados não paramétricos, resultantes da análise macroscópica e da avaliação histopatológica foram reportados como medianas e foram aplicados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney, seguido de Dunns.

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

RESULTADOS

III. RESULTADOS

1. Análise preliminar do modelo

O principal objetivo desta etapa foi obter dados que pudessem ser utilizados nas etapas subsequentes, tendo em vista, o fato deste modelo ainda não ter sido utilizado, além de ser escassa a quantidade de trabalhos experimentais os quais verificam a ação intravesical da acroleína.

1.1. Efeitos da administração intravesical de doses crescentes de acroleína na variação do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas

A administração intravesical de acroleína induziu aumento marcante de 108,56% e de 227,76% no Peso Úmido Vesical, com as doses de 75 e 225 µg respectivamente, sendo tais aumentos estatisticamente significativos, quando comparados com o grupo controle ($p < 0,001$). A dose de 25 µg induziu a um aumento de apenas 20,53 % em relação ao controle, não sendo este significativo. (Figura 17)

Macroscopicamente a cistite observada após 3 horas da administração *ive* das doses de 75 e 225 µg de ACR foi caracterizada pela presença de severo edema e por intensa hemorragia, com hematomas de mucosa e coágulos intravesicais, sendo estes achados significativamente diferentes do controle

($p < 0,05$), conforme pode ser observado na Figura 16. Nas bexigas dos animais que receberam a dose menor de acroleína ($25\mu\text{g}$) foram evidenciados edema e hemorragias mais discretos. A intensidade dos achados macroscópicos encontrados na cistite induzida por doses crescentes de Acroleína estão indicados na Tabela 1.

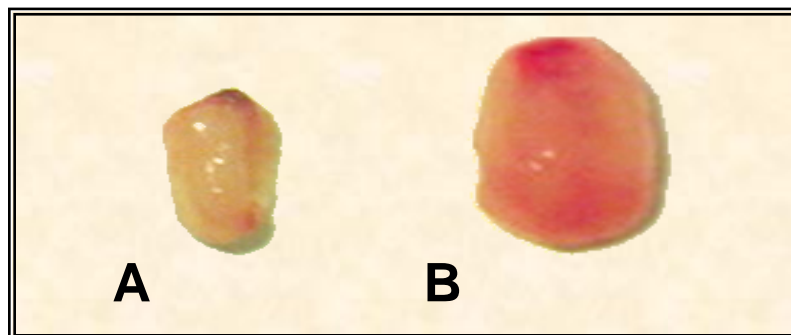


Figura 16. Aspecto Macroscópico de Bexigas tratadas com salina *ive* (A) e com ACR $75\mu\text{g}$ *ive* (B).

De acordo com os critérios histopatológicos de Gray, 3 horas depois da injeção *ive* de Acroleína o grupo tratado com a dose de $25\mu\text{g}$ apresentou edema e hemorragia discretas, porém com urotélio preservado, enquanto que nos grupos que receberam as doses de 75 e $225\mu\text{g}$ evidenciou-se extensa erosão de mucosa, hemorragia e edema acentuados, porém com infiltração leucocitária discreta., recebendo escores de 2(1 –2) como mostrado na Figura 18. Os escores para os parâmetros de Gray destes resultados são mostrados na Tabela 1.

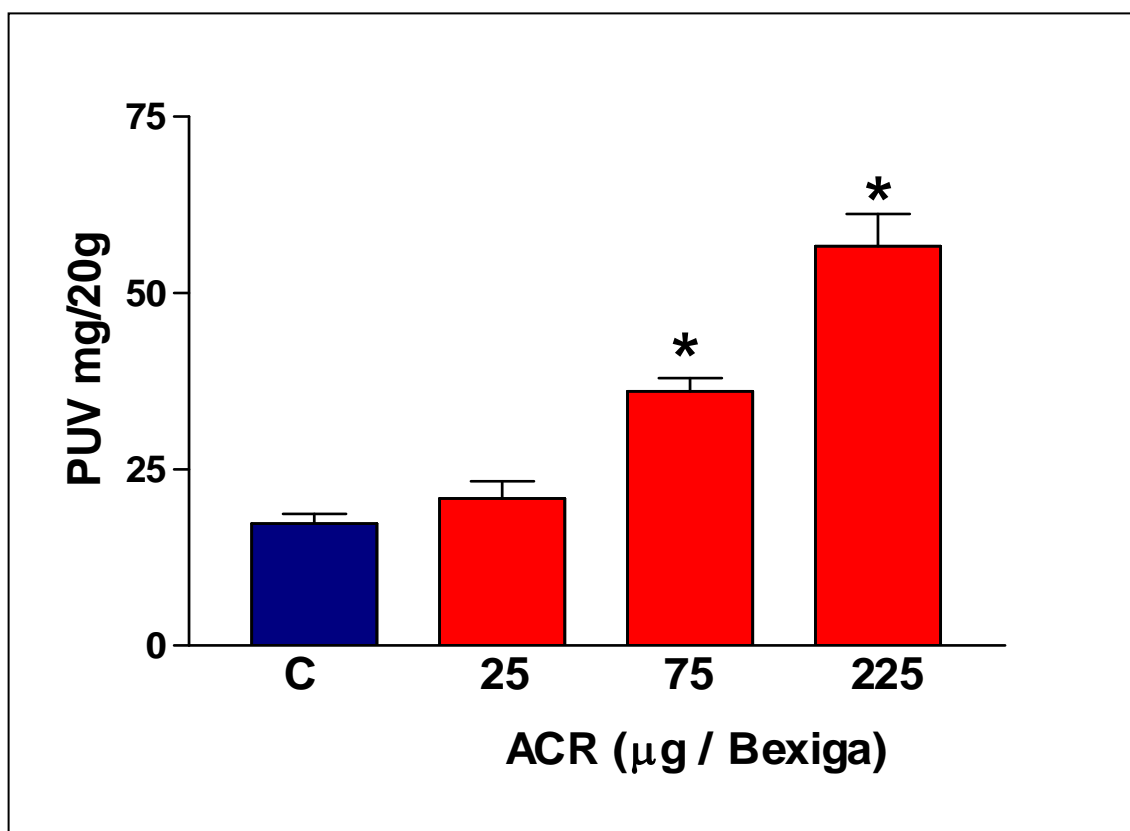


Figura 17. Efeitos da administração intravesical de doses crescentes de Acroleína (ACR) na variação do Peso úmido vesical (PUV) em camundongos. Cada grupo foi constituído de seis animais, que receberam individualmente injeções intravesicais (*ive*) com 25, 75 e 225 μg de acroleína / Bexiga. Os animais do grupo controle (C) receberam mesmo volume de solução salina *ive*. Todos os animais foram sacrificados após 3 horas da ACR. As barras representam a média \pm EPM. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com relação ao controle (ANOVA , teste de Bonferroni)

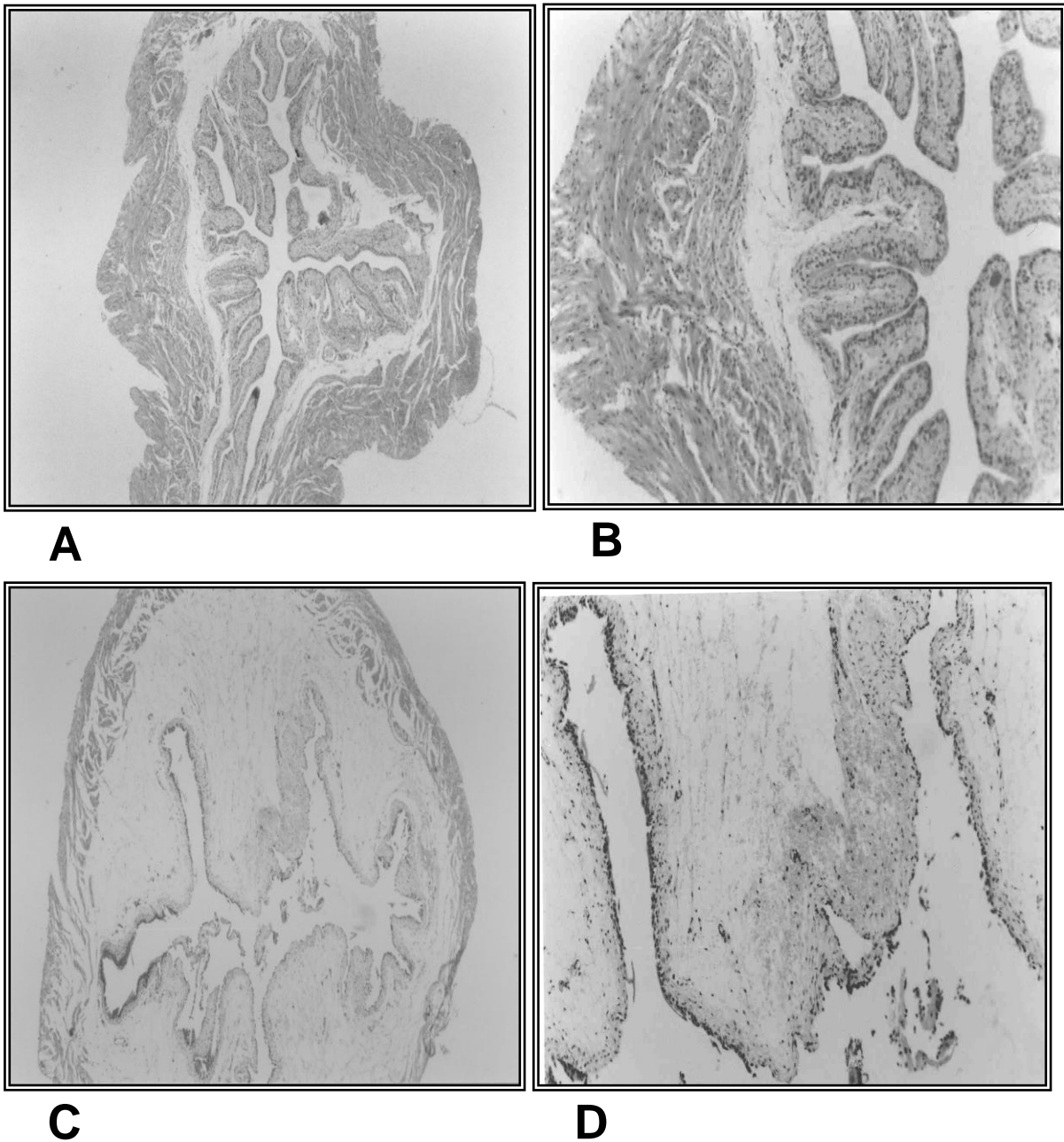


Figura 18. Aspecto Histopatológico de Bexigas tratadas com Injeção Intravesical de Acroleína 75µg após 3 horas da indução. (A) Bexiga Controle-Salina *ive*, 40x; (B) Bexiga Controle- Salina *ive*, 100x; (C) Acroleína 75µg *ive*, 40x; (D) Acroleína 75µg *ive*, 100x. Coloração HE.

TABELA 1 – Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da administração intravesical de doses crescentes de Acroleína (ACR) em camundongos:

Grupos	Análise Macroscópica (Edema)	Análise Macroscópica (Hemorragia)	Análise Microscópica
C	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
ACR 25 µg	1 (0 – 2)	1 (0 – 2)	1 (1 – 2)
ACR 75 µg	2 (2 – 3)*	3 (2 – 3)*	2 (1 – 2)*
ACR 225 µg	3 (3 – 3)**	2 (2 – 3)**	2 (1 – 2)*

A injeção intravesical de Acroleína nas doses de 25, 75 e 225 µg induziu alterações macroscópicas e microscópicas que foram avaliadas 3 horas após sua administração. Os resultados são expressos pela medianas e variações (n = 6). * p < 0,05 em relação ao grupo controle (C – animais tratados apenas com solução salina) e **p<0,01, pelos testes de Kruskal Wallis (seguido de Dunns) e Mann Whitney.

1.2. Efeitos da administração intravesical de doses crescentes de Acroleína na variação da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos

Como pode ser evidenciado na Figura 19, a acroleína injetada intravesicalmente nas doses de 25, 75 e 225 μg levou a um aumento importante da permeabilidade vascular, sendo que apenas as elevações induzidas pela duas doses maiores (1288,13% e 2372,88% respectivamente) foram estatisticamente significativas em relação ao controle, com $p < 0,001$. O resultado do corante extraído das bexigas foi expresso como μg de Azul de Evans / Bexiga, sendo reportados como médias \pm EPM de cada grupo. Utilizamos o teste de ANOVA seguido do teste de Bonferroni para as análises estatísticas.

1.3. Determinação da curva temporal da cistite induzida por acroleína – Avaliação da variação do edema e alterações macroscópicas e histopatológicas

Como conseqüência dos resultados anteriores, decidimos adotar a dose de 75 μg *ive* de acroleína como dose padrão para os próximos experimentos.

A Figura 20 demonstra que o aumento do Peso Úmido Vesical, induzido pela injeção *ive* de acroleína, é tempo dependente, sendo que já nas primeiras 3 horas este aumenta (194,24%) de maneira significativamente diferente do

controle ($p < 0,01$) e tornou-se máximo após 12 horas da injeção da acroleína (448,10%). Evidenciamos uma discreta tendência a queda do peso nas 24 horas (271,47%), no entanto ainda estatisticamente significativa em relação ao controle.

Decorridas três horas da administração da ACR, macroscopicamente as bexigas se apresentavam com aumento do volume e já evidenciamos hiperemia e áreas com presença de focos hemorrágicos parietais. Estes achados se intensificaram após 6 e 12 horas da ACR. As bexigas avaliadas no tempo de 24 horas apresentavam paredes intensamente edemaciadas, muitas vezes friáveis e perfuradas além de repletas de coágulos. (Figura 21)

Microscopicamente as bexigas avaliadas após três horas da injeção da acroleína, segundo critérios de Gray, exibiram alterações consideradas intensas, no entanto praticamente sem infiltrado leucocitário. Após 6 horas o edema tornou-se mais exuberante, com presença de deposição de fibrina e infiltrado leucocitário discreto com neutrófilos e monócitos, sendo encontrados achados semelhantes nas bexigas dos animais sacrificados após 12 horas. Já nas bexigas examinadas com 24 horas da ACR uma lesão com descamação total do urotélio, intensa hemorragia, edema, necrose e infiltrado leucocitário importantes foram observados. (Figura 22)

Os achados macroscópicos e histopatológicos são encontrados na Tabela 2, sendo diferentes do controle, com significância estatística ($p < 0,05$), em todos os tempos.

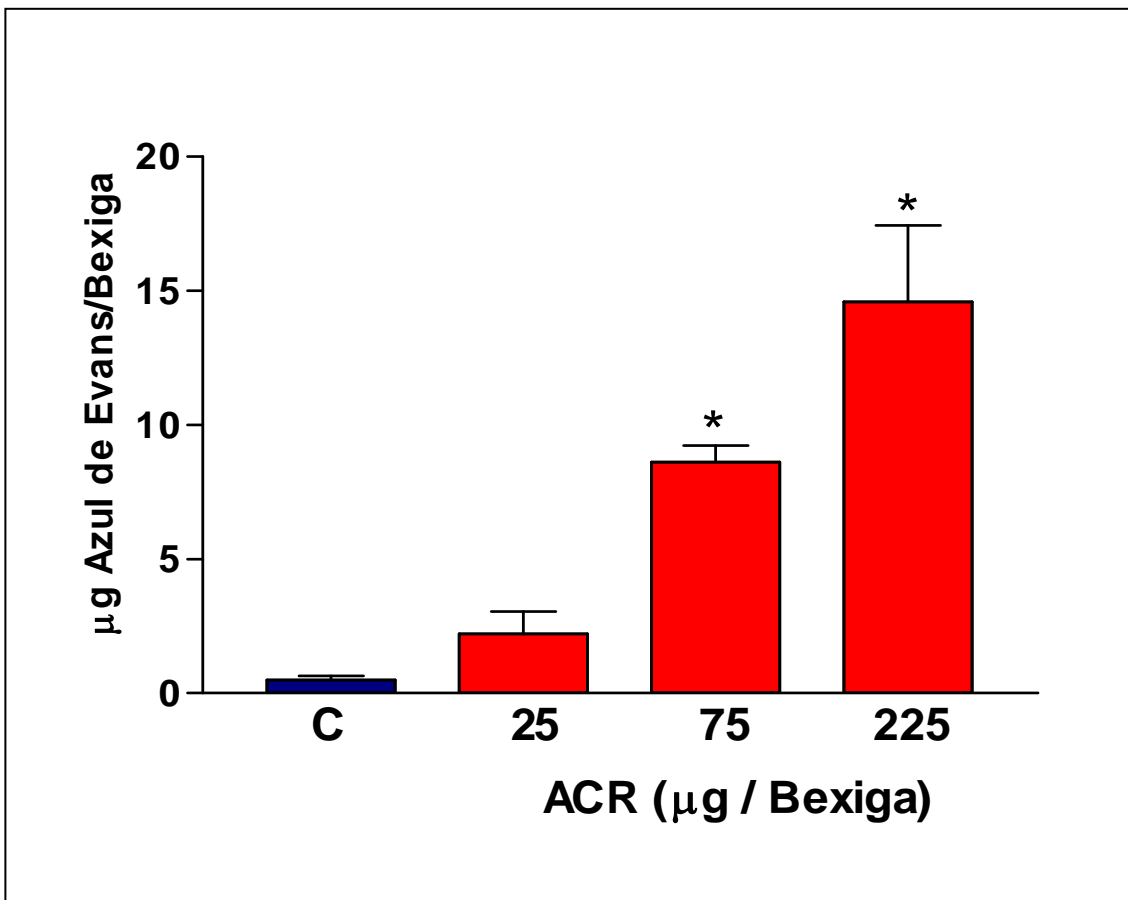


Figura 19. Efeitos da administração intravesical de doses crescentes de acroleína (ACR) na variação da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos. As barras representam média \pm EPM da permeabilidade vascular, expressa em μg de Azul de Evans / Bexiga, referentes a seis animais tratados com doses crescentes de Acroleína *ive* (25, 75 e 225 μg /Bexiga) e sacrificados após 3 horas da injeção. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (C) , no qual foi administrado apenas solução salina *ive*. $p < 0,05$ ANOVA (seguido de teste de Bonferroni)

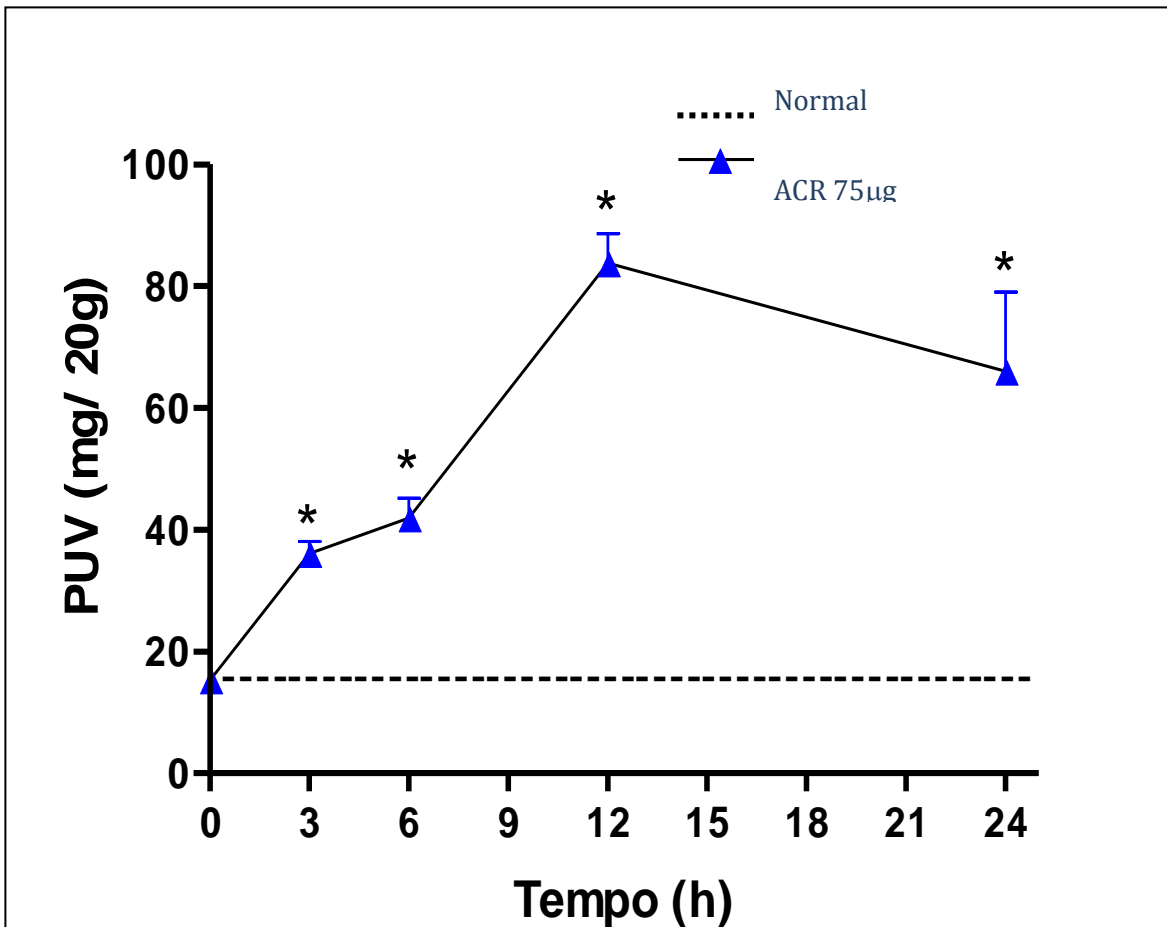


Figura 20. Efeito da injeção de acroleína (ACR) intravesical no Peso Úmido Vesical – Curva temporal. Cada símbolo (σ) representa a média \pm EPM dos pesos úmidos referentes a seis animais. O ponto correspondente no eixo do x corresponde ao momento do sacrifício após a injeção intravesical de Acroleína (75 μ g). (*) indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas salina (0,02 ml *ive*), com $p < 0,05$ (ANOVA , teste de Bonferroni)

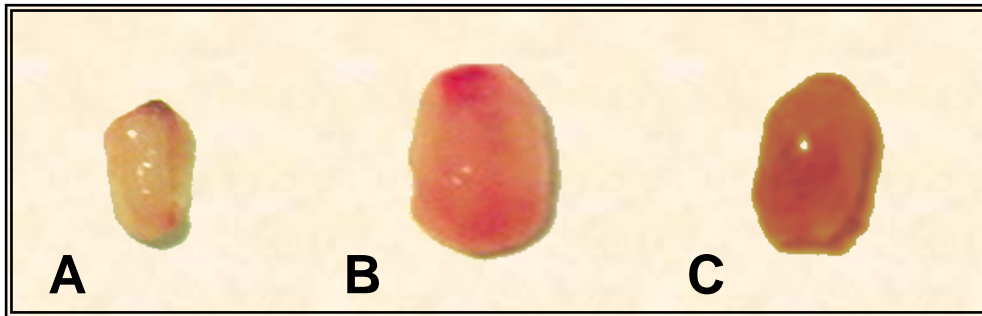


Figura 21. Aspecto Macroscópico de bexigas tratadas com Solução Salina *ive* (A) e com Acroleína *ive* 75 μ g após 3 horas (B) e após 24 horas (C).

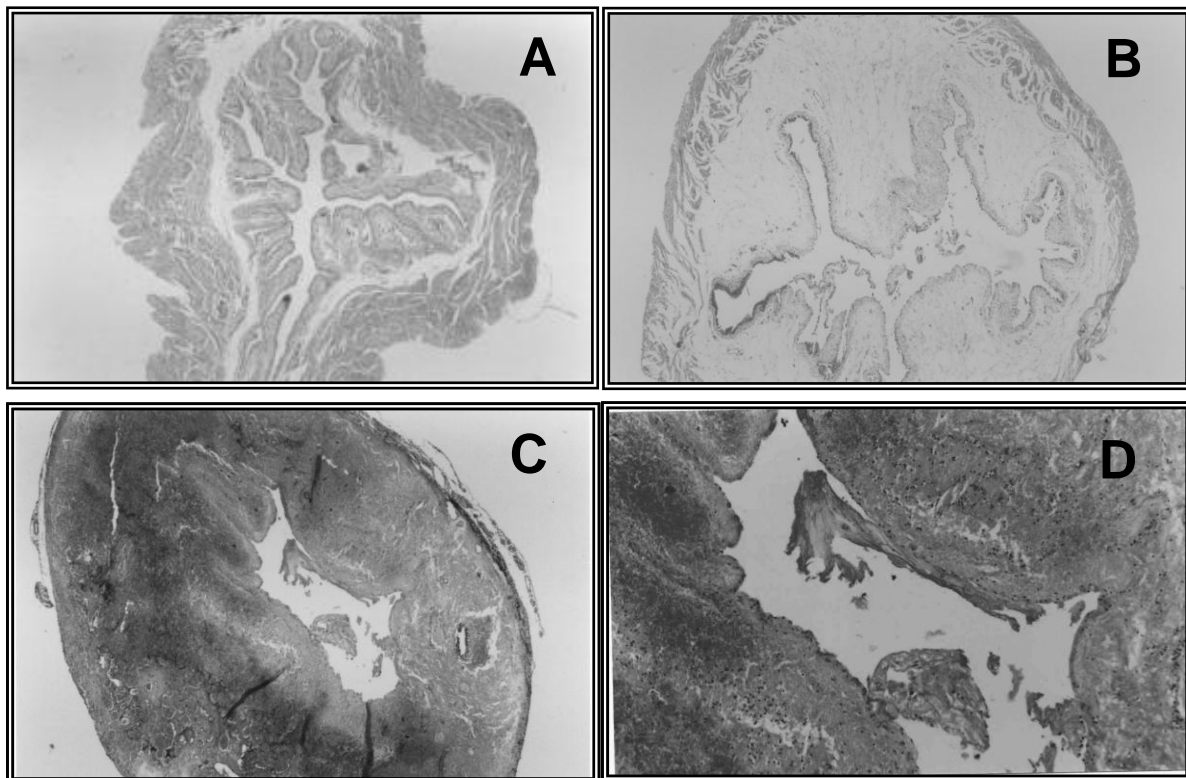


Figura 22. Aspecto Histopatológico de bexigas tratadas com Solução Salina *ive* (A) e com Acroleína *ive* 75 μ g após 3 horas (B) e após 24 horas 40x(C) e 100x(D). Coloração HE.

TABELA 2 – Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da administração intravesical de acroleína (ACR) em diferentes tempos em camundongos – Curva temporal .

Grupo	Análise Macroscópica (Edema)	Análise Macroscópica (Hemorragia)	Análise Microscópica
C	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
ACR 3 – horas	2 (2 - 3)*	3 (2 - 3)*	2 (1 - 2) *
ACR - 6 horas	2 (2 - 3)**	2 (1 - 2)*	2 (2 - 2) *
ACR - 12 horas	2 (1 - 3)**	2 (0 - 2)**	2 (1 - 2) *
ACR - 24 horas	2 (1 - 3)**	3 (2 - 3)**	2 (2 - 2) *

A injeção intravesical de Acroleína induziu a alterações macroscópicas e microscópicas que se apresentaram de uma forma tempo-dependente. Estes eventos macroscópicos (edema e hemorragia) e histológicos da cistite hemorrágica foram evidenciados logo após 3 horas da indução e se acentuaram decorridas 6 e 12 horas, tornando-se muito severos após 24 horas. Os resultados são reportados por medianas e variações (n = 6). *p<0.05 e ** p<0,01 em relação ao grupo controle tratado com solução salina, pelos testes de Kruskal Wallis (seguido de Dunns) e Mann Whitney.

2. Avaliação da proteção vesical exercida pelo Mesna na cistite hemorrágica induzida pela injeção intravesical de Acroleína

2.1. Efeito do tratamento com Mesna nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas de bexigas de camundongos tratados com Acroleína intravesical

Como podemos observar na Figura 23, o pré tratamento dos animais com o Mesna *ip*, na dose de 80 mg/Kg de peso, foi capaz de bloquear de maneira significativa ($p < 0,001$) o aumento do Peso Úmido Vesical induzido pela injeção *ive* de acroleína em 80,89% e 88,51% respectivamente avaliados após 3 e 24 horas. Esta inibição ocorreu de maneira análoga, 88,42% e 98,05% nos animais nos quais o Mesna foi administrado *ive* juntamente com a acroleína e examinados respectivamente após 3 e 24 horas.

Macroscopicamente, nas análises de ambos os tempos (3 e 24 horas) as bexigas do camundongos tratados com Mesna (*ip* ou *ive*) diferiram estatisticamente dos controles positivos ($p < 0,05$), que correspondiam aos animais que receberam apenas a injeção *ive* da Acroleína, analisados nos mesmos tempos. (Figura 24 e 25)

Do ponto de vista histológico, os camundongos que receberam Mesna por ambas as vias de administração, apresentaram bexigas com evidente diminuição da hemorragia, do edema e do infiltrado leucocitário quando comparados com

aqueles em que apenas a ACR intravesical foi administrada e examinados após 3 e 24 horas. (Figura 26)

Os resultados das análises macroscópicas e histológicas estão demonstradas na Tabela 3.

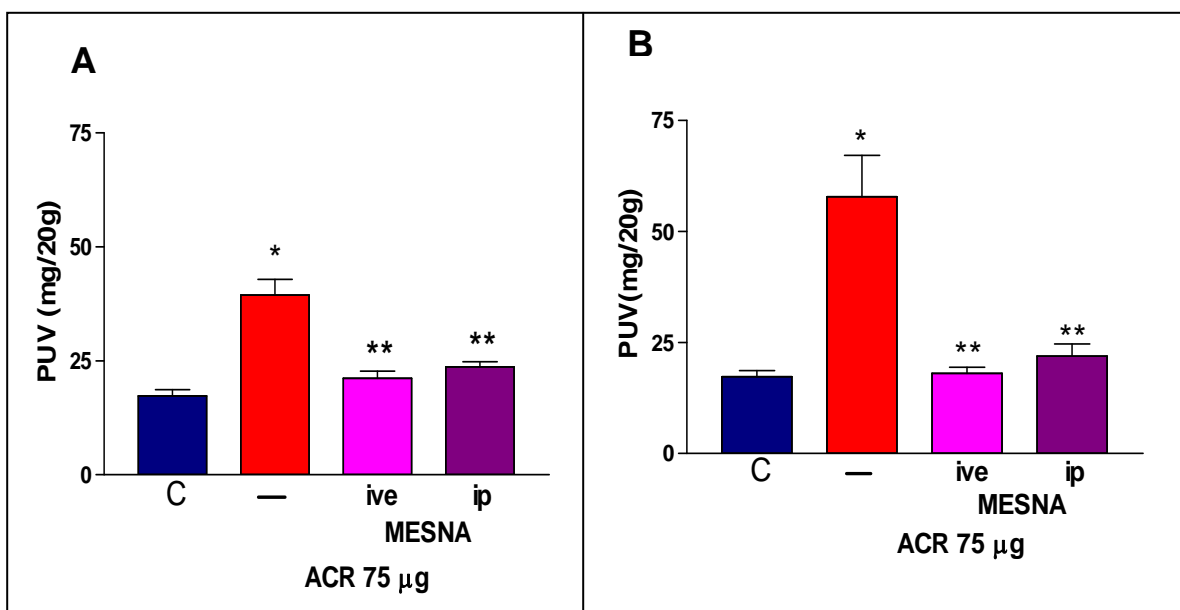


Figura 23. Efeito do tratamento com Mesna na variação do Peso Úmido Vesical induzido pela injeção intravesical de Acroleína - avaliado após 3 e 24 horas. A injeção intravesical (*ive*) de acroleína (ACR)(75 µg) induziu a um aumento de Peso Úmido Vesical no grupo tratado apenas com ACR. Somente uma dose de Mesna foi administrada pela vias *ive* (2mg) associado a acroleína (75 µg) ou por via *ip* (80 mg /Kg) 1 h antes desta. Os animais foram sacrificados após 3h (**A**) ou 24 h (**B**) da indução da cistite. As barras representam a média ± EPM do Peso Úmido Vesical referentes a seis animais que receberam apenas Acroleína ou que foram tratados com Mesna.(*) representa diferença estatisticamente significativa quando comparadas com o grupo controle (C), que recebeu salina *ive* e (**) quando comparadas ao grupo que recebeu apenas ACR. $p < 0,05$ (ANOVA , teste de Bonferroni)

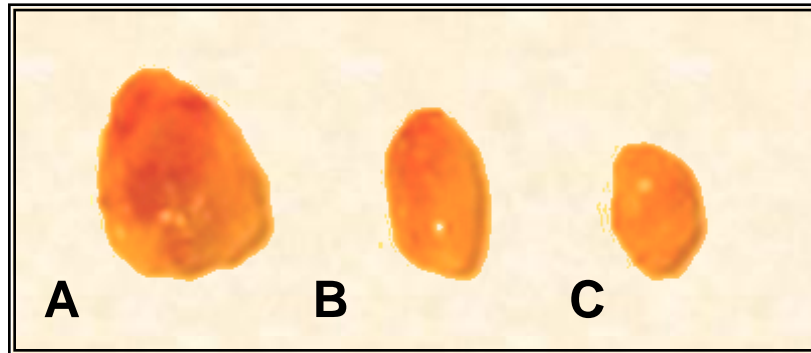


Figura 24. Efeito do tratamento com Mesna nas alterações macroscópicas induzidas pela injeção intravesical de Acroleína 75 μ g avaliado após 3 horas.
(A) ACR 75 μ g *ive*; (B) Mesna *ip* + ACR; (C) Mesna *ive* + ACR.

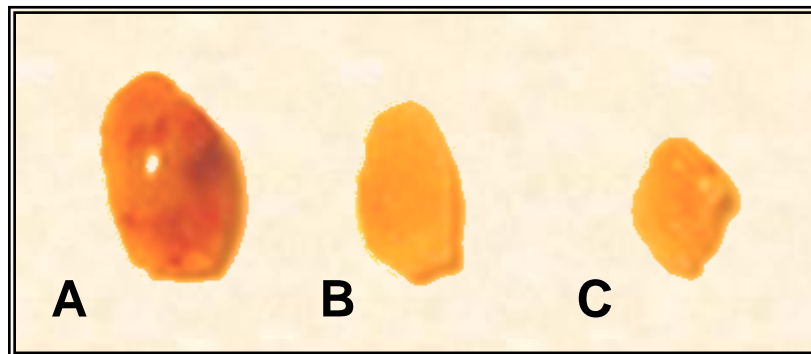


Figura 25. Efeito do tratamento com Mesna nas alterações macroscópicas induzidas pela injeção intravesical de Acroleína 75 μ g avaliado após 24 horas.
(A) ACR 75 μ g *ive*; (B) Mesna *ip* + ACR; (C) Mesna *ive* + ACR.

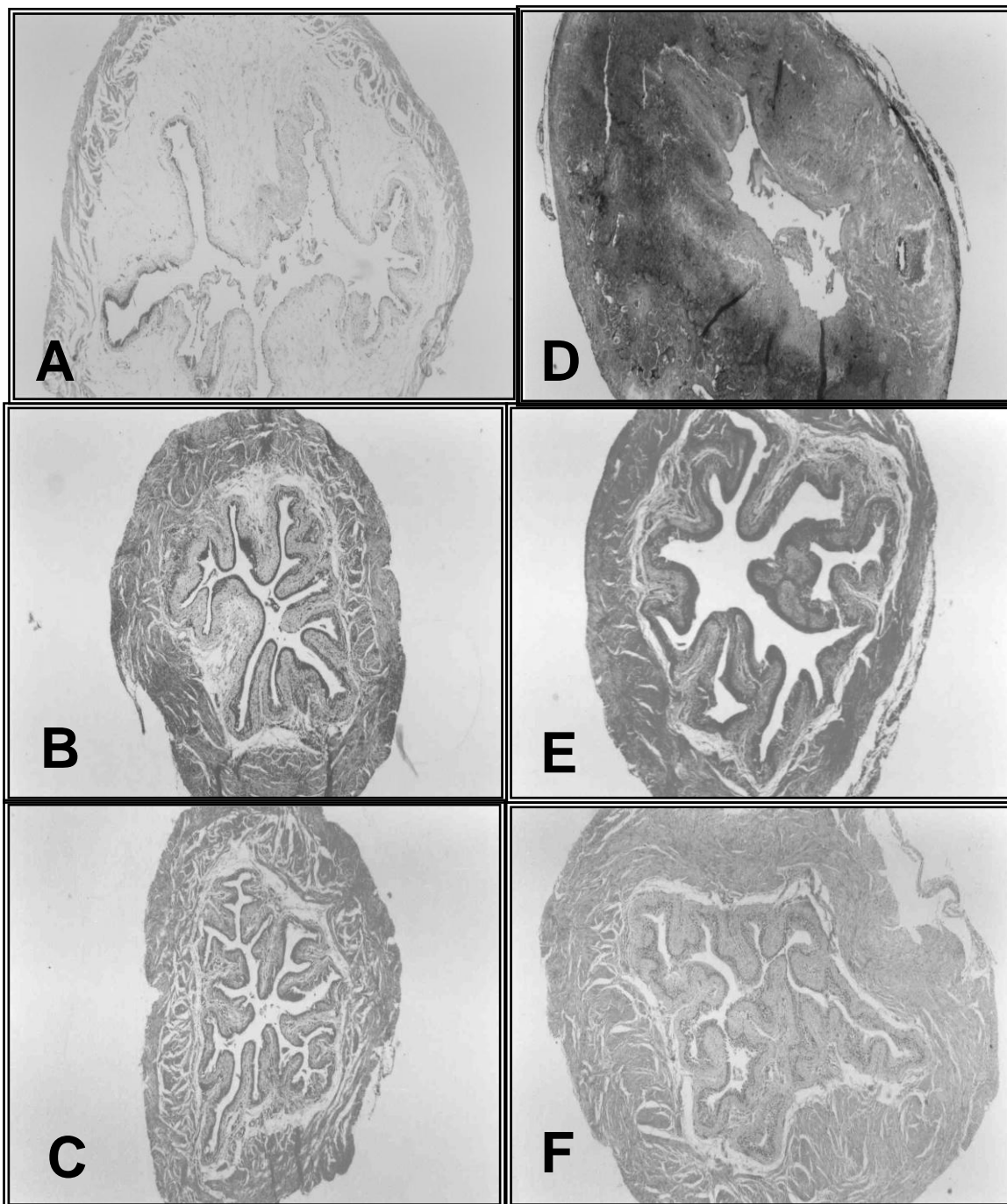


Figura 26. Efeito do tratamento com Mesna nas alterações histopatológicas induzidas pela injeção *ive* de Acroleína 75 μ g avaliado após 3 e 24 horas. (A) ACR *ive* -3 horas; (B) Mesna *ip* + ACR -3 horas; (C) Mesna *ive* + ACR -3 horas; (D) ACR *ive* -24 horas; (E) Mesna *ip* + ACR -24 horas; (F) Mesna *ive* + ACR -24 horas. 40x. Coloração HE.

TABELA 3 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos do Mesna (*ip* e *ive*) na cistite hemorrágica induzida pela administração intravesical de Acroleína (ACR) em diferentes tempos (3horas e 24 horas)

Grupos	Análise macroscópica (Edema)		Análise macroscópica (Hemorragia)		Análise Microscópica	
	3h	24h	3h	24h	3h	24h
C	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
ACR 75 µg	2(2-3)*	3(2-3)*	2(1-3)*	2(2-3)*	2(1-2)*	2(2-2)*
Mesna <i>ip</i>	1(0-1)**	0(0-1)**	0(0-1)**	1(0-1)**	0(0-2)**	0(0-1)**
Mesna <i>ive</i>	0(0-1)**	0(0-1)**	0(0-1)**	0(0-1)**	0(0-1)**	0(0-1)**

A injeção de 75µg de ACR *ive* induziu a cistite hemorrágica evidenciada por alterações macroscópicas e microscópicas que significativamente diferiram do controle (C), que recebeu solução salina, quando analisadas após 3 e 24 horas.

As alterações induzida nas bexigas dos animais pela ACR foram inibidas de forma significativa pelo tratamento com o Mesna (*ip* e *ive*) quando comparadas com os camundongos nos quais apenas a ACR fora administrada; isto ocorreu nas análises que se deram após 3 e 24 horas. Os dados desta tabela estão relatados como medianas e variações (n=6). * p< 0,05 em relação ao grupo controle (C) e ** p< 0,05 em relação ao grupo tratado apenas com ACR (CH), pelos testes de Kruskal Wallis (seguido de Dunns) e Mann Whitney.

2.2. Efeito do tratamento com Mesna nas variações da Permeabilidade Vascolar de bexigas de camundongos tratados com acroleína intravesical

Segundo podemos observar na Figura 27 o Mesna administrado tanto sistemicamente por via intraperitoneal, como localmente por via intravesical, produziu inibição do aumento da permeabilidade vascular induzida pela Acroleína em 92,1% e 100%(respectivamente *ip* e *ive*) sendo este bloqueio estatisticamente diferente do controle positivo, que recebeu apenas a ACR *ive* e não havendo diferenças, com, significância estatística, entre as vias de administração do Mesna.

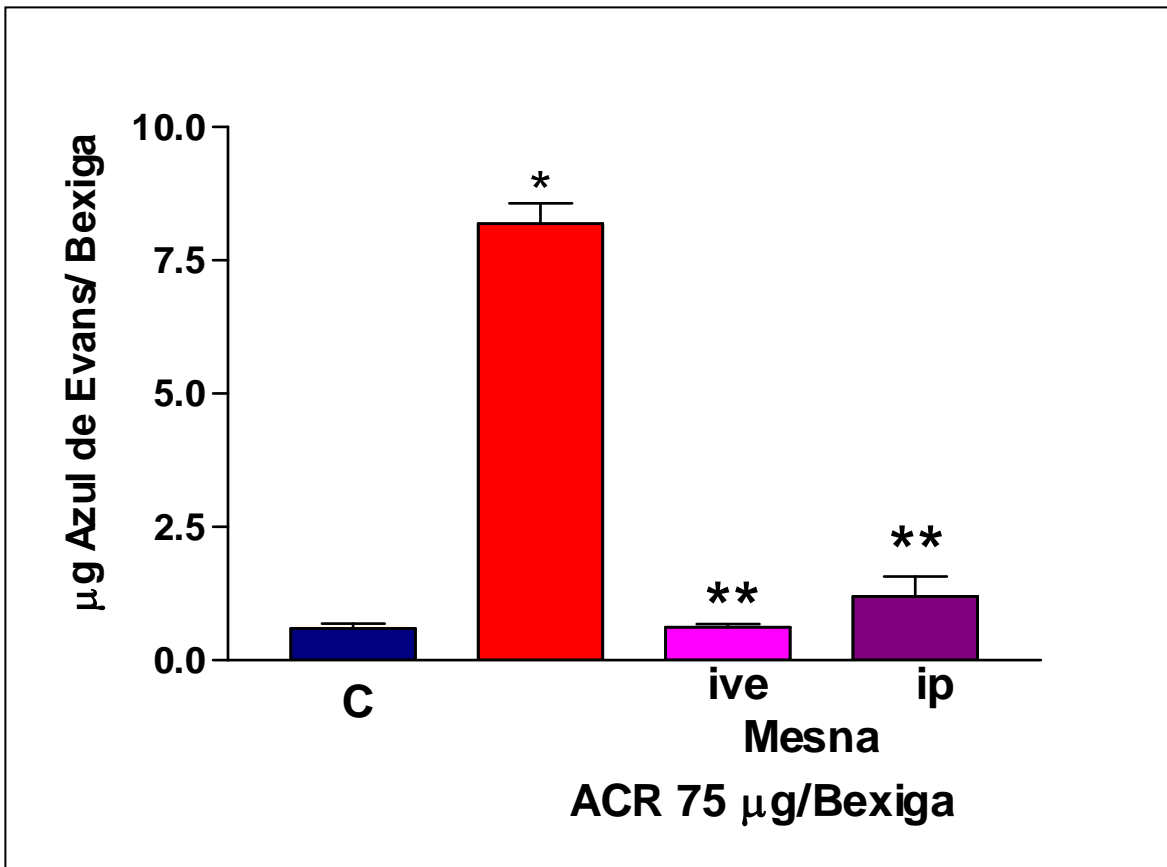


Figura 27 . Efeito do tratamento com Mesna nas variações da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos tratados com acroleína intravesical. As barras representam média \pm EPM da variação da permeabilidade vascular (expressa por μg de Azul de Evans / bexiga) dos animais tratados com Mesna por via *ive* (2mg) associado a acroleína ou por via *ip* (80 mg / Kg) 1 hora antes desta. Todos os animais foram sacrificados após 3 horas da injeção da cistite com Acroleína. (*) representa diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo que recebeu apenas solução salina *ive* enquanto que (**) diferença significativa quando comparada ao grupo que recebeu ACR *ive* . (n = 6) $p > 0,05$ (ANOVA , teste de Bonferroni)

3. Avaliação do efeito protetor da Glutathione na cistite hemorrágica.

3.1. Efeito de doses crescentes de Glutathione nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas da cistite induzida por Ifofamida em camundongos

A injeção intraperitoneal de Ifofamida (400 mg/Kg) induziu a um marcante aumento do peso úmido vesical, 12 horas depois de sua administração (187,5% , quando comparado com o grupo controle , $p < 0,001$). Este aumento do peso úmido vesical induzido pela IFO foi inibido pelo tratamento dos camundongos com diferentes doses de Glutathione (125, 250 e 500 mg/Kg *ip*), sendo esta inibição de 65.82% e 77,85% respectivamente com as doses de 250 e 500 mg/Kg, estatisticamente significativa. A dose de 125 mg/Kg inibiu 54,16% do aumento do PUV induzido pela IFO, não sendo esta inibição significativa, o que pode ser observado na Figura 28.

A cistite hemorrágica observada 12 horas após a administração da IFO (400mg/Kg *ip*) foi caracterizada macroscopicamente pela presença de severo edema, com escores 3(3-3) e por acentuada hemorragia sendo evidenciados hematomas de mucosa e coágulos na luz vesical, recebendo escores de 2 (2-3) e sendo significativamente ($p < 0,05$) diferentes do controle que recebeu solução salina, com escores 0 (0-0). O tratamento com as doses de 250 e 500mg /Kg de Glutathione foi capaz de inibir significativamente o edema vesical induzido pela Ifofamida enquanto que apenas a dose de 500 mg/Kg da Glutathione inibiu os

eventos hemorrágicos induzidos pela IFO, de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$), com indicado na Tabela 4 e pode ser evidenciado na Figura 29.

De acordo com os critérios histopatológicos de Gray, 12 horas depois da Ifofamida, já existiam evidências histológicas de cistite, como extensa erosão da mucosa, ulceração, hemorragia, edema intenso, depósitos de fibrina e acentuado infiltrado leucocitário com presença de polimorfonucleares e mononucleares, recebendo escores 2(2-2). Estas alterações foram inibidas estatisticamente ($p < 0,05$) pela dose de GSH 500 mg/Kg, *ip*. Os escores os parâmetros de Gray destes resultados são encontrados na Tabela 4 e também estão demonstrados na Figura 30.

Mesmo com a dose de 500 mg/Kg pode-se observar que uma única injeção *ip* de Glutathione não foi suficiente para neutralizar completamente a cistite induzida por IFO, havendo um residual de cistite de intensidade 22,15 % do valor inicial, não sendo este, no entanto estatisticamente diferente do controle.

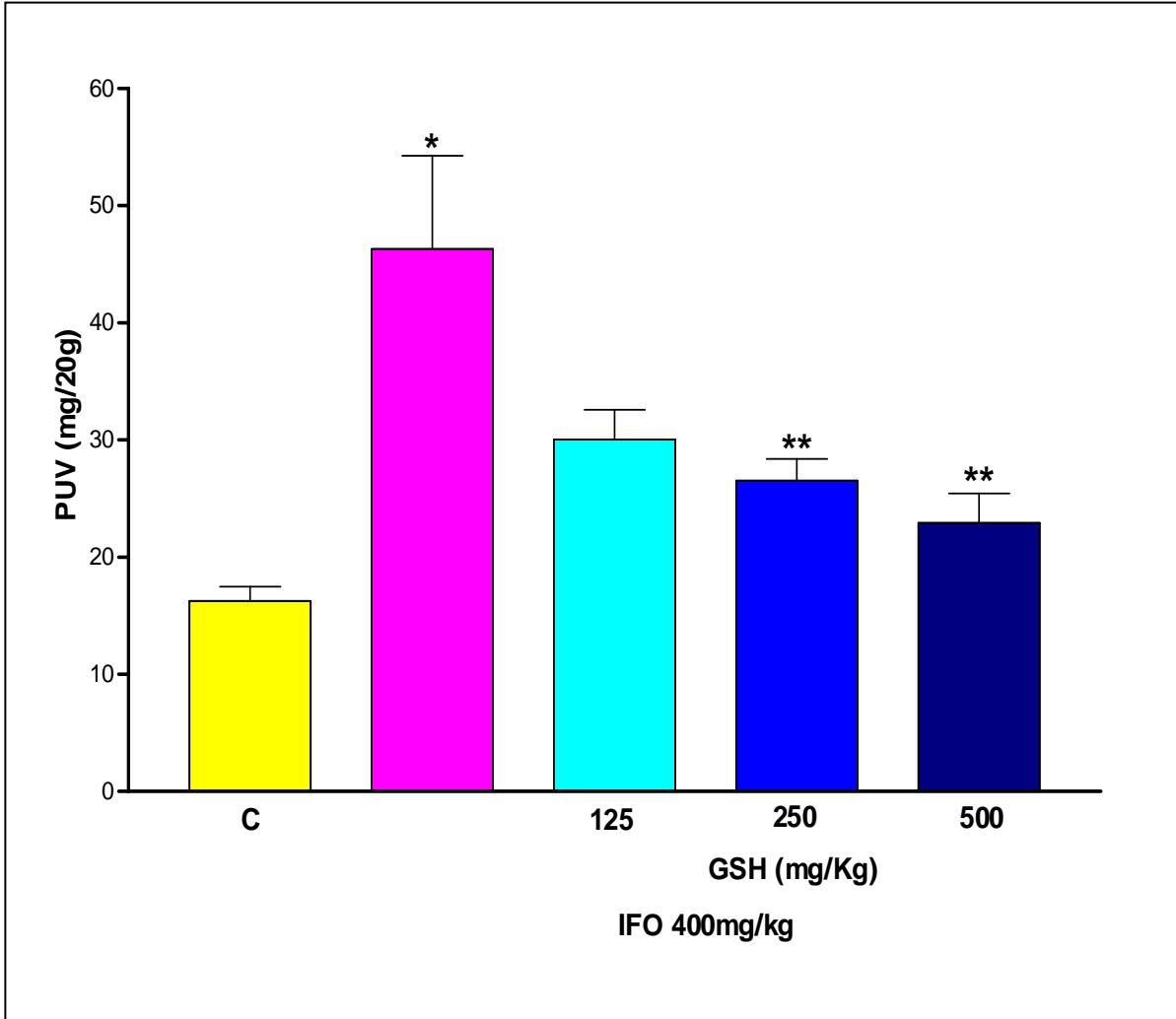


Figura 28. Efeito de doses crescentes de Glutathione (GSH) nas variações do Peso Úmido Vesical de animais tratados com Ifofosfamide (IFO). A Glutathione foi administrada nas doses de 125, 250 e 500 mg /Kg de peso, por via *ip*, 1 hora antes da Ifofosfamide (400 mg/Kg *ip*). Os sacrifícios se deram passadas 12 horas. As barras representam médias \pm EPM referentes a seis animais cada grupo. (*) e (**) indicam diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle (C), que recebeu apenas salina *ip*, e em relação ao grupo que recebeu apenas IFO, respectivamente, com $p < 0,05$. (ANOVA, teste de Bonferroni)

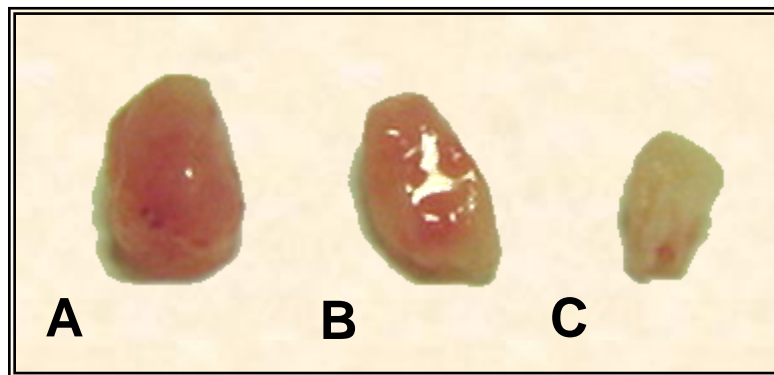


Figura 29. Efeito do tratamento com Glutathiona(GSH) nas alterações macroscópicas induzidas por Ifosfamida (IFO). (A) IFO 400mg/kg; (B) GSH 125mg/kg + IFO; (C) GSH 500mg/kg + IFO.

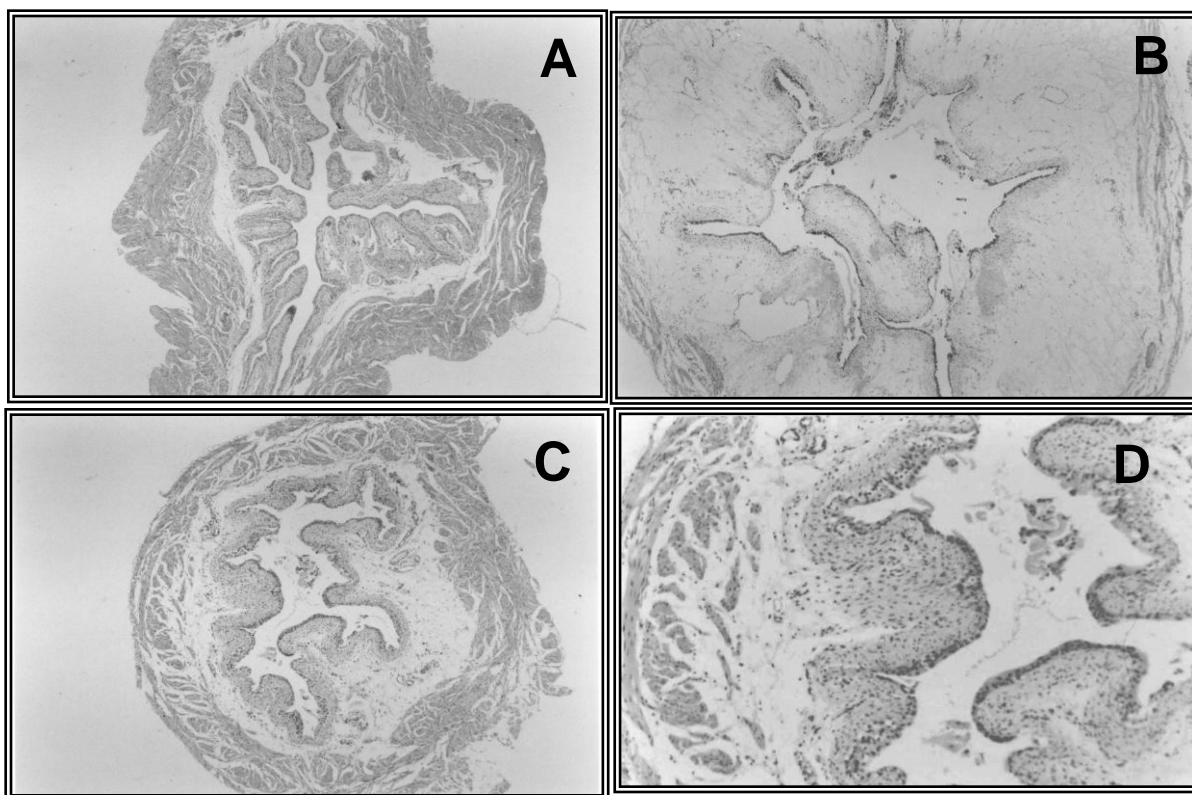


Figura 30. Efeito do tratamento com Glutathiona(GSH) nas alterações histopatológicas induzidas por Ifosfamida (IFO). (A) Bexiga Controle; (B) IFO 400mg/kg; (C) GSH 500mg/kg + IFO.40x.; (D) GSH 500mg/kg + IFO.100x Coloração HE.

TABELA 4 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da administração de doses crescentes de Glutathiona (GSH) na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida (IFO) em camundongos.

Grupos	Análise Macroscópica (Edema)	Análise Macroscópica (Hemorragia)	Análise Microscópica
C	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
IFO	3 (3 – 3) *	2 (2 – 3) *	2 (2 – 2) *
GSH 125	1 (1 – 2)	1 (0 – 2)	2 (1 – 2)
GSH 250	1 (0 – 1)**	0 (0 – 1)	1 (1 – 2)
GSH 500	1 (0 – 1)**	0 (0 – 0)**	1 (0 – 1)**

A IFO (400 mg/Kg *ip*) induziu a alterações macroscópicas e microscópicas que foram avaliadas 12 horas após sua administração no grupo tratado somente com a IFO (controle positivo – CH) que se demonstraram estatisticamente diferentes do grupo que recebeu salina *ip* (C). Nos animais que receberam as doses de GSH 250 e 500 mg/Kg, *ip* 1 hora antes da administração da IFO houve inibição destes achados, os quais foram significativamente diferentes dos animais que receberam somente IFO. Os resultados estão reportados por medianas e variações (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (C) e ** $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado somente com Ifosfamida (controle positivo – CH), utilizando-se os testes de Kruskal Wallis (seguido de Dunns) e Mann-Whitney.

3.2. Avaliação do efeito da administração de Glutathione (GSH) nas variações do Peso Úmido Vesical, alterações macroscópicas e histopatológicas na cistite induzida por Acroleína

Na Figura 31, evidenciamos que o tratamento dos animais com a Glutathione (GSH) *ip*, na dose de 500 mg/Kg de peso, bloqueou de maneira significativa ($p < 0,001$) o aumento do Peso Úmido Vesical induzido pela injeção *ive* de acroleína (75 μ g) em 76,18% e 95,79% avaliados respectivamente após 3 e 24 horas. De forma semelhante, este aumento foi inibido em 100% nos animais nos quais a Glutathione foi administrada na bexiga associada a Acroleína e examinados após 3 e 24 horas.

As análises macroscópicas de ambos os tempos (3 e 24 horas) demonstraram que as bexigas dos camundongos tratados com Glutathione (*ip* ou *ive*) apresentaram-se com edema e hemorragia discretos, sendo estes estatisticamente diferentes dos animais que receberam apenas a injeção *ive* da Acroleína (controles positivos –CH), analisados nos mesmos tempos. ($p < 0,05$) (Figura 32 e 33)

Histologicamente avaliados, os camundongos que receberam Glutathione por ambas as vias de administração, apresentaram bexigas praticamente sem hemorragia, edema e infiltrado leucocitário quando comparados com os controles positivos, examinados após 3 e 24 horas. (Figura 34)

Os resultados das análises macroscópicas e histológicas estão demonstradas na Tabela 5.

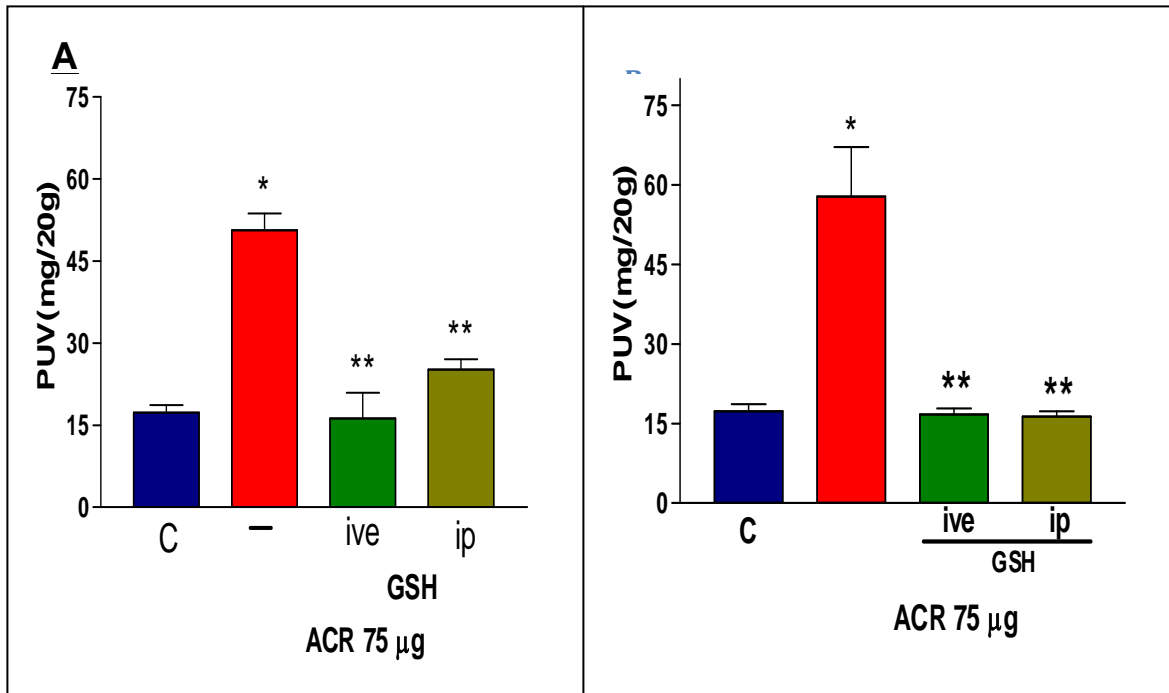


Figura 31. Efeito do tratamento com Glutathione (GSH) na variação do Peso Úmido Vesical (PUV) induzido pela injeção intravesical de acroleína (ACR) - avaliado após 3 e 24 horas. As barras representam a média \pm EPM do Peso Úmido Vesical referentes a seis animais que receberam apenas acroleína (75 μ g) ou que foram tratados com apenas uma dose de Glutathione (GSH) por via intravesical (2mg) associado a ACR ou por via *ip* (500 mg/Kg) 1 hora antes da indução da cistite. Os animais foram sacrificados após 3 ou 24 horas da injeção da ACR, conforme podemos evidenciar em **A** e **B**, respectivamente. (*) representa diferença estatisticamente significativa quando comparadas com o grupo controle (C) , que recebeu salina *ive* e (**) quando comparadas ao grupo que recebeu apenas ACR. $p < 0,05$ (ANOVA , teste de Bonferroni)



Figura 32. Efeito do tratamento com Glutathiona (GSH) nas alterações macroscópicas induzidas pela injeção intravesical de Acroleína 75µg avaliado após 3 horas. (A) ACR 75µg *ive*; (B) GSH *ip* + ACR; (C) GSH *ive* + ACR.



Figura 33. Efeito do tratamento com Glutathiona (GSH) nas alterações macroscópicas induzidas pela injeção intravesical de Acroleína 75µg avaliado após 24 horas. (A) ACR 75µg *ive*; (B) GSH *ip* + ACR; (C) GSH *ive* + ACR.

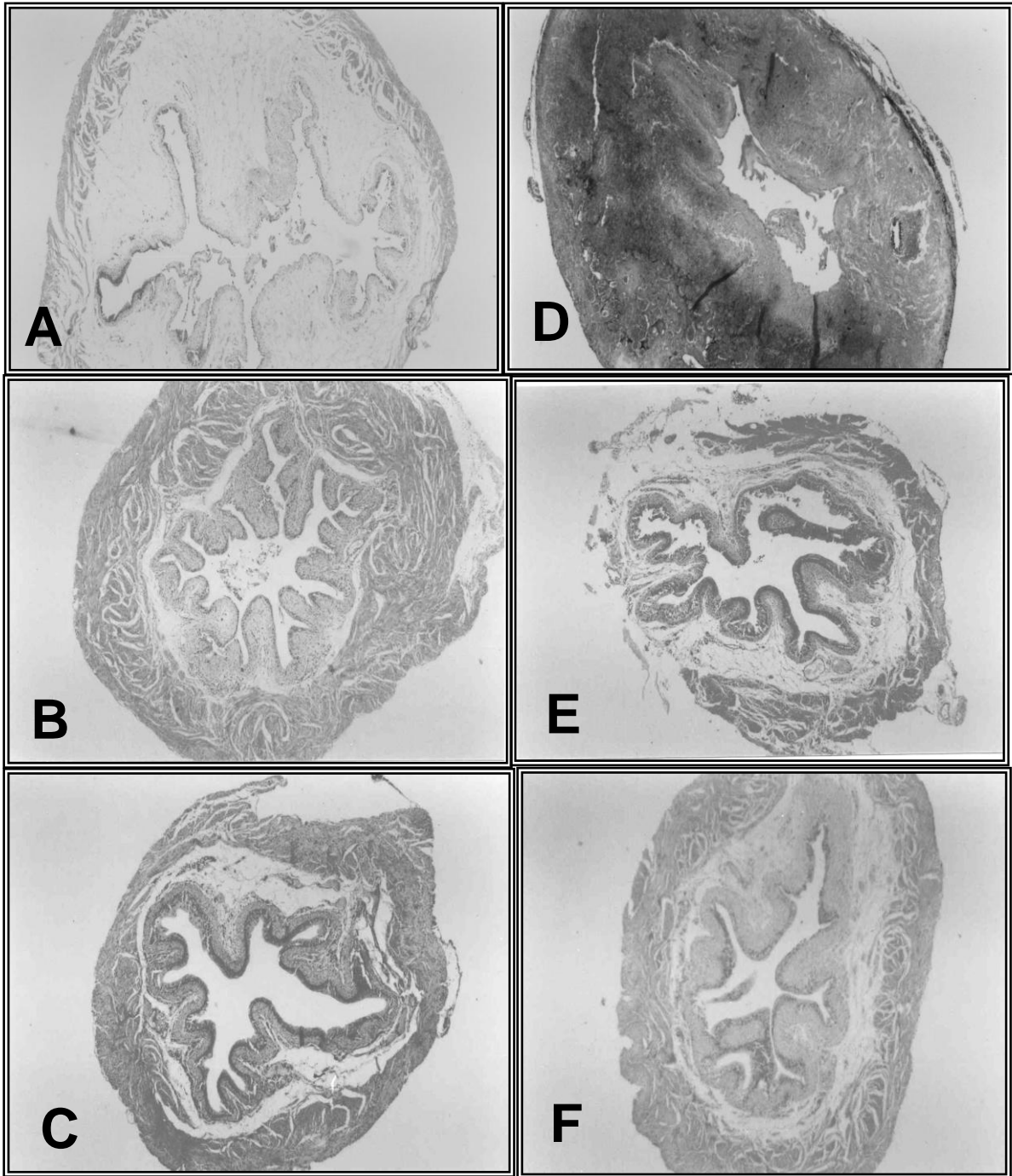


Figura 34. Efeito do tratamento com Glutathione (GSH) nas alterações histopatológicas induzidas pela injeção *ive* de Acroleína 75µg avaliado após 3 e 24 horas. (A) ACR *ive* -3 horas; (B) GSH *ip* + ACR -3 horas; (C) GSH *ive* + ACR -3 horas; (D) ACR *ive* -24 horas; (E) GSH *ip* + ACR -24 horas; (F) GSH *ive* + ACR -24 horas. 40x. Coloração HE.

TABELA 5 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da Glutaciona (*ip* e *ive*) na cistite hemorrágica induzida pela administração (*ive*) da acroleína (ACR) em diferentes tempos (3 horas e 24 horas)

Grupos	Análise macroscópica (Edema)		Análise macroscópica (Hemorragia)		Análise Microscópica	
	3h	24h	3h	24h	3h	24h
C	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
ACR 75 µg	2(2-3)*	3(2-3)*	2(2-2)*	2(2-3)*	2(1-2)*	2(2-2)**
GSH <i>ip</i>	0(0-0)**	0(0-1)**	0(0-0)**	0(0-1)**	0(0-1)**	0(0-1)**
GSH <i>ive</i>	0(0-0)**	0(0-1)**	0(0-1)**	0(0-1)**	0(0-1)**	0(0-1)**

A injeção de 75µg de ACR *ive* induziu a cistite hemorrágica caracterizada por alterações macroscópicas e histológicas que foram estatisticamente diferentes do controle (C), que recebeu solução salina, quando analisadas após 3 e 24 horas. As alterações vesicais induzidas pela ACR foram inibidas significativamente pelo tratamento com a Glutaciona (*ip* e *ive*) quando comparadas com os animais que receberam apenas a ACR, este bloqueio foi demonstrado nas análises que se realizaram após 3 e 24 horas da indução da CH. Os dados desta tabela estão relatados como medianas e variações (n=6). * p< 0,05 em relação ao grupo controle (C) e ** p< 0,05 em relação ao grupo tratado apenas com ACR (CH), pelos testes de Kruskal Wallis (seguido de Dunns) e Mann- Whitney.

3.3. Efeito do tratamento com Glutathione nas variações da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos tratados com Acroleína intravesical

Observando-se a Figura 35, a Glutathione administrada tanto sistemicamente por via intraperitoneal, como localmente *ive* foi capaz de produzir uma inibição do aumento da permeabilidade vascular induzida pela injeção intravesical de acroleína (75µg) em 95,79% e 100%, respectivamente, sendo este bloqueio estatisticamente diferente dos camundongos que receberam apenas a injeção intravesical de ACR (controle positivo). Apesar da administração da GSH *ive* ter provocado uma inibição maior do aumento da Permeabilidade Vascular do que a daquela obtida com a administração sistêmica (*ip*), ambas foram significativamente diferentes dos controles positivos.

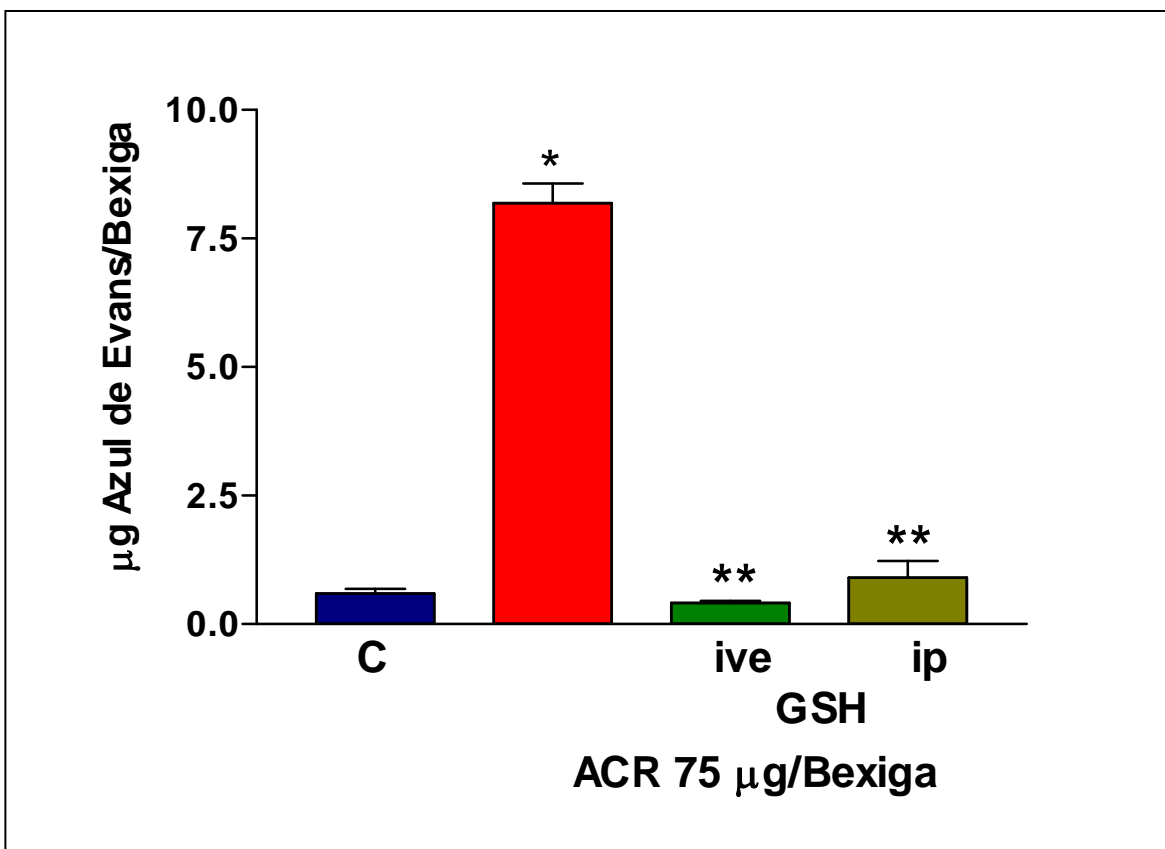


Figura 35. Efeito do tratamento com Glutationa (GSH) nas variações da Permeabilidade Vascular de bexigas de camundongos tratados com Acroleína (ACR) intravesical. As barras representam média \pm EPM da variação da permeabilidade vascular (expressa por μg de Azul de Evans / bexiga) dos animais tratados com GSH por via *ive* (2mg) associado a ACR ou por via *ip* (500 mg / Kg) 1 hora antes desta. Todos os animais foram sacrificados após 3 horas da injeção da cistite com Acroleína.(*) Representa diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo que recebeu apenas solução salina *ive* enquanto que (**) indica diferença significativa quando comparada ao grupo que recebeu ACR *ive* . (n = 6) $p > 0,05$. (ANOVA , teste de Bonferroni)

4. Efeitos comparativos do Mesna e da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifofosfamida em camundongos

Conforme pode ser visto na Figura 36, a injeção intraperitoneal de Ifofosfamida 400 mg/Kg, levou a um aumento tempo - dependente do Peso Úmido Vesical. Logo após seis horas da administração da IFO, o aumento do peso úmido (188,15%) já se demonstrou estatisticamente significativo ($p < 0,01$) em relação ao controle. Valores máximos foram alcançados doze horas após a indução da cistite (225,31%) e a partir daí, foi observado decréscimo progressivo deste aumento do PUV, embora este permanecesse significativamente elevado até 48 horas ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com uma dose de Glutathione (500 mg/Kg *ip*) inibiu o aumento do Peso Úmido Vesical em todos os tempos de maneira significativa ($p < 0,05$) semelhantemente a inibição obtida com administração do Mesna (80 mg/Kg *ip*), imediatamente antes e após 4 e 8 horas da Ifofosfamida.

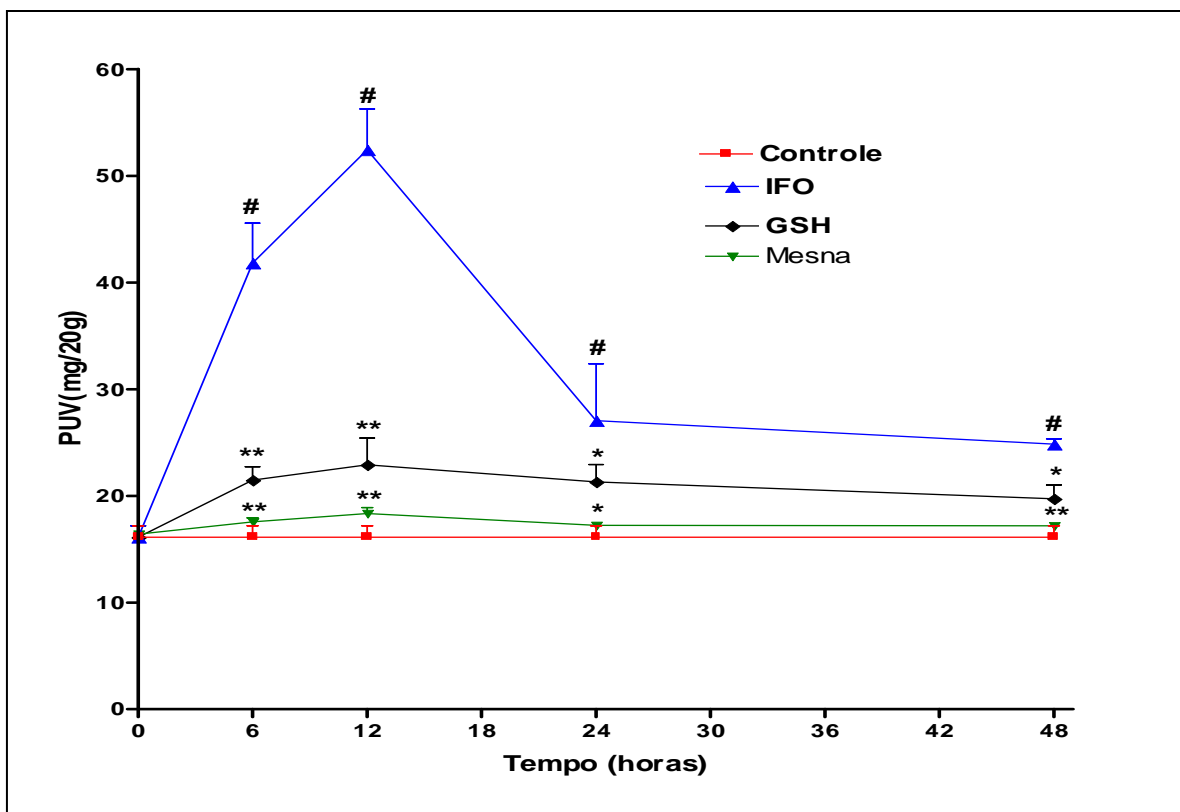


Figura 36. Efeitos comparativos do Mesna e da Glutaciona na cinética da cistite induzida por Ifosfamida em camundongos . O gráfico mostra a variação do peso úmido de bexigas de camundongos injetados com IFO, 400 mg/Kg *ip* e tratados com GSH 500 mg/Kg *ip* e Mesna 80 mg/Kg *ip* (1 hora antes da IFO). Cada símbolo representa média \pm EPM do PUV, referente a seis animais de cada grupo, conforme legenda representada no gráfico. O eixo do x corresponde aos horários, após a IFO, em que os animais foram sacrificados.(#) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, que recebeu apenas solução salina *ip*, com $p < 0,01$. (*) e (**) indicam diferenças estatisticamente significativas com relação ao grupo tratado apenas com IFO com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. (ANOVA, teste de Bonferroni)

5. Efeito da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifosfamida em camundongos - Alterações macroscópicas e histopatológicas

Macroscopicamente, as bexigas dos animais que receberam Ifosfamida (400 mg/Kg *ip*) apresentaram-se com edema importante, já nas primeiras seis horas após a indução da cistite que se acentuou após 12 horas. Decorridas 24 horas o edema vesical regrediu, não obstante sendo ainda estatisticamente significativo com relação ao controle ($p < 0,05$). A injeção de Ifosfamida também induziu a eventos hemorrágicos como telangiectasias e hematomas parietais na bexiga, isto após seis horas, enquanto que com doze horas já foram evidenciados coágulos intravesicais. A administração da Glutathione (500 mg/Kg *ip*) também foi capaz de abolir as alterações macroscópicas da cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida em todos os tempos de maneira significativa ($p < 0,05$), conforme pode ser observado na Tabela 6.

O estudo histopatológico revelou, no grupo que foi sacrificado após 6 horas, presença de edema vesical moderado a intenso, já com presença de hemorragia, erosão e infiltrado leucocitário mais discreto, recebendo escores 2(1-2). No grupo sacrificado doze horas após, encontramos, na análise histológica pelos critérios de Gray, cistite hemorrágica intensa em todos os animais, com acentuado edema, presença de hemorragia importante, erosão, necrose e grande infiltração leucocitária, com escores 2(2-2). Nos tempos de 24 e 48 horas, muito embora as bexigas ainda se apresentassem com sinais inflamatórios de cistite, estes, se comparados com o grupo que foi sacrificado com 12 horas, foram menos intensos. Os animais que receberam Glutathione (500 mg/Kg *ip*) apresentaram, à análise

microscópica, bexigas com áreas mais extensas de urotélio preservado, menores edema, infiltrado leucocitário e hemorragia, em comparação com os achados observados nos animais dos grupos não tratados, em todos os tempos. De acordo com o que pode ser verificado na Tabela 7.

TABELA 6 – Análise macroscópica dos efeitos da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifofamida em camundongo.

Grupos		Controle	IFO	GSH - IFO
Edema	6h	0(0-0)	3 (2 – 3) *	0 (0 – 1) **
	12h	0(0-0)	3 (2 – 3) *	0 (0 – 1) **
	24h	0(0-0)	1 (1 – 2) *	0 (0 – 1) **
	48h	0(0-0)	1 (1 – 2) *	0 (0 – 0) **
Hemorragia	6h	0(0-0)	2 (1 – 2) *	0 (0 – 1) **
	12h	0(0-0)	2 (2 – 2) *	0 (0 – 0) **
	24h	0(0-0)	1 (1 – 1) *	0 (0 – 0) **
	48h	0(0-0)	0 (0 – 1) *	0 (0 – 0) **

A Ifofamida (400 mg/Kg *ip*) induziu ao aparecimento de sinais macroscópicos de cistite como edema e hemorragia, avaliados segundo critérios de Gray, em diferentes tempos, nos animais que receberam somente Ifofamida e naqueles que foram tratados com Glutathione (500 mg/Kg *ip*) 1 hora antes da indução da cistite. Os resultados estão reportados como medianas e variações (n=6).* p<0,05 em relação ao grupo controle (animais que receberam somente solução salina) e **p<0,05 em relação aos animais que receberam apenas Ifofamida, pelos testes de Kruskal Wallis (seguido de Dunns) e Mann – Whitney.

TABELA 7- Análise histopatológica dos efeitos da Glutathione na cinética da cistite induzida por Ifosfamida em camundongo.

Tempo (h)	Controle	IFO	GSH-IFO
6h	0(0-0)	2 (1 – 2) *	1 (0 – 1)**
12h	0(0-0)	2 (2 – 2) *	1 (0 – 1)**
24h	0(0-0)	2 (1 – 2)*	1 (0 – 1)**
48h	0(0-0)	1 (1 - 2) *	0 (0 – 1) **

A Ifosfamida (400 mg/Kg *ip*) induziu a alterações histopatológicas que puderam ser observadas logo após 6 horas de sua administração, sendo estas máximas com doze horas da indução da cistite e regredindo progressivamente após 24 e 48 horas. Os achados microscópicos da CH foram avaliados nos animais que receberam somente Ifosfamida e no grupo que foi tratado com Glutathione (500 mg/Kg *ip*) 1 hora antes da indução da cistite. Os resultados estão descritos como medianas e variações (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com solução salina) e ** $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com Ifosfamida, utilizando-se os testes de Kruskal Wallis (seguido de Dunns) e Mann – Whitney.

6. Efeito protetor de doses crescentes de amifostina (AMF) na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida – Avaliação da variação do Peso Úmido vesical, alterações macroscópicas e histológicas.

A injeção *ip* de Ifosfamida (400 mg/Kg) induziu a um importante aumento do peso úmido vesical, 12 horas depois de sua administração (187,5% , quando comparado com o grupo controle , $p < 0,001$). O tratamento com diferentes doses de amifostina (25, 50 e 100 mg/Kg *ip*) inibiram este aumento do peso úmido vesical induzido pela IFO, sendo esta inibição de 68,72%, 92,67% e 95,57% respectivamente com as doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, estatisticamente significativa, o que pode ser observado na Figura 37.

Macroscopicamente a cistite hemorrágica observada 12 horas após a administração da IFO (400mg/Kg *ip*) foi caracterizada pela presença de severo edema, com escores 3(3-3) e por acentuada hemorragia sendo evidenciados hematomas de mucosa e coágulos na luz vesical, recebendo escores de 2 (2-3) o que foi significativamente ($p < 0,05$) diferentes do controle que recebeu solução salina, com escores 0 (0-0). A análise macroscópica demonstrou que o tratamento com as doses de 25, 50 e 100mg /Kg de amifostina também foi capaz de inibir significativamente o edema vesical e os eventos hemorrágicos induzido pela Ifosfamida, de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$), conforme indicado na Tabela 5 bem como pode ser visualizado na Figura 38.

De acordo com os critérios histopatológicos de Gray, 12 horas depois da Ifosfamida, já são observadas evidências histológicas de cistite, como extensa erosão da mucosa, ulceração, hemorragia, edema intenso, depósitos de fibrina e

acentuado infiltrado leucocitário com presença de polimorfonucleares e mononucleares, recebendo escores 2(2-2). Estas alterações foram inibidas estatisticamente ($p < 0,05$) por todas as doses utilizadas de AMF (25, 50 e 100 mg/Kg *ip*). Os escores para os parâmetros de Gray destes resultados são encontrados na Tabela 8 e também estão demonstrados na Figura 39.

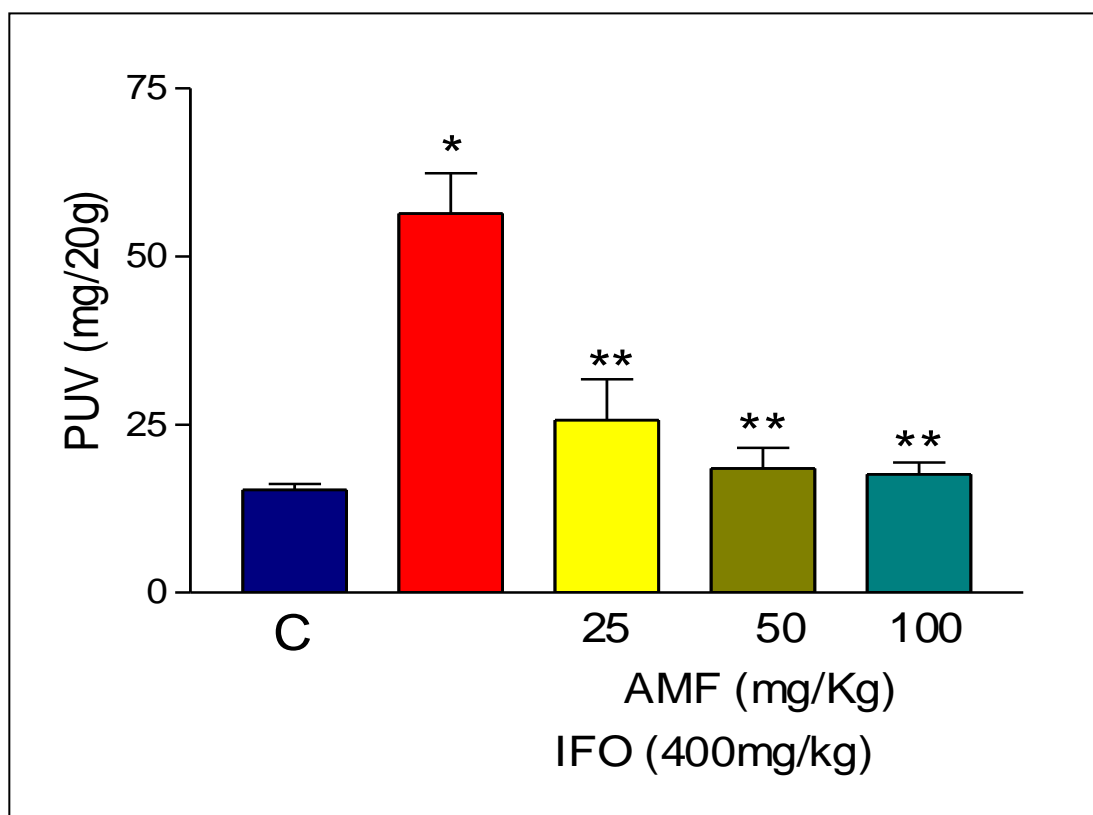


Figura 37. Efeito de doses crescentes de amifostina (AMF) nas variações do Peso Úmido Vesical de animais tratados com Ifofamida (IFO). A amifostina foi administrada nas doses de 25, 50 e 100 mg /Kg de peso, por via *ip*, 1 hora antes da Ifofamida (400 mg/Kg *ip*). Os animais foram sacrificados após 12 horas. As barras representam médias \pm EPM referentes a seis animais cada grupo. (*) e (**) indicam respectivamente diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle (C), que recebeu apenas salina *ip*, e em relação ao grupo que recebeu apenas IFO, com $p < 0,05$. (ANOVA, teste de Bonferroni)

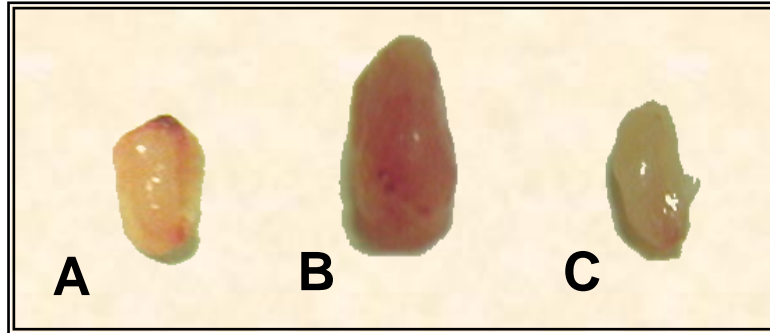


Figura 38. Efeito do tratamento com Amifostina (AMF) nas alterações macroscópicas induzidas por Ifosfamida (IFO). (A) Bexiga Controle; (B) IFO 400mg/kg; (C) AMF 100mg/kg + IFO.

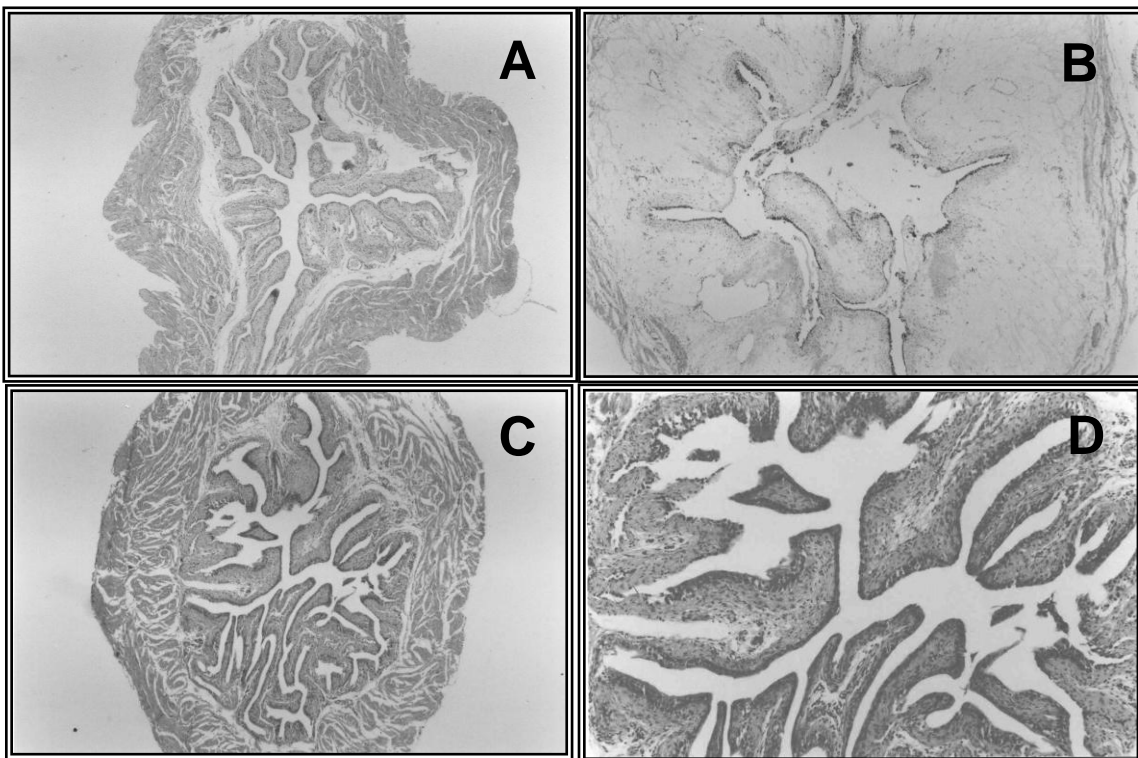


Figura 39. Efeito do tratamento com Amifostina (AMF) nas alterações histopatológicas induzidas por Ifosfamida (IFO). (A) Bexiga Controle; (B) IFO 400mg/kg; (C) AMF 100mg/kg + IFO.40x.; (D) AMF 100mg/kg + IFO.100x Coloração HE.

TABELA 8 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da administração de doses crescentes de amifostina (AMF) na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida (IFO) em camundongos.

Grupos	Análise Macroscópica (Edema)	Análise Macroscópica (Hemorragia)	Análise Microscópica
C	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
IFO	3 (3 – 3) *	2 (2 – 3) *	2 (2 – 2) *
AMF 25	0 (0 – 2) **	0 (0 – 1) **	0 (0 – 2) **
AMF 50	0 (0 – 1) **	0 (0 – 1) **	0 (0 – 1) **
AMF 100	0 (0 – 1) **	0 (0 – 1) **	0 (0 – 1) **

A IFO (400 mg/Kg *ip*) induziu a alterações macro e microscópicas, que, avaliadas 12 h após sua administração, foram estatisticamente diferentes do grupo que recebeu salina *ip* (C). Em todos animais que receberam AMF, houve inibição dos achados macroscópicos, de maneira significativa. As três doses utilizadas de AMF (25, 50 e 100 mg/Kg, *ip*) também inibiram significativamente as alterações histológicas induzidas pela IFO. Os resultados estão reportados por medianas e variações (n=6). * p<0,05 em relação ao grupo controle (C) e ** p<0,05 em relação ao grupo tratado somente com Ifosfamida, utilizando-se os testes de Kruskal Wallis (seguido de Dunns) e Mann-Whitney.

7. Efeito protetor da amifostina na cistite hemorrágica induzida pela injeção intravesical de acroleína – Avaliação da variação do Peso úmido Vesical, alterações macroscópicas e histológicas

A injeção intravesical de acroleína (75 μ g), induziu a um aumento do Peso Úmido Vesical em 192,83% , após 3 horas, e o pré tratamento dos animais com amifostina (AMF) *ip*, na dose de 50 mg/Kg de peso, bloqueou 68,29% deste aumento o que foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$). De forma semelhante, este aumento foi inibido em 94,63% nos animais nos quais a AMF foi administrada na bexiga (1,5 mg) associada a Acroleína e examinados após 3 horas. (Figura 40).

As análises macroscópicas evidenciaram que as bexigas dos camundongos tratados com amifostina (*ip* ou *ive*) apresentaram-se com edema e hemorragia mais discretos, sendo estes estatisticamente diferentes dos animais que receberam apenas a injeção *ive* da Acroleína (controles positivos), analisados no mesmo tempo. ($p < 0,05$). (Figura 41)

Na avaliação histológica, os camundongos que receberam amifostina por ambas as vias de administração, apresentaram bexigas com hemorragia, edema e infiltrado leucocitário menores do que os controles positivos que receberam somente injeção *ive* de ACR, isto examinados após o mesmo tempo (3 horas), sendo esta inibição estatisticamente significativa. (Figura 42)

Os resultados das análises macroscópicas e histológicas estão demonstradas na tabela 9.

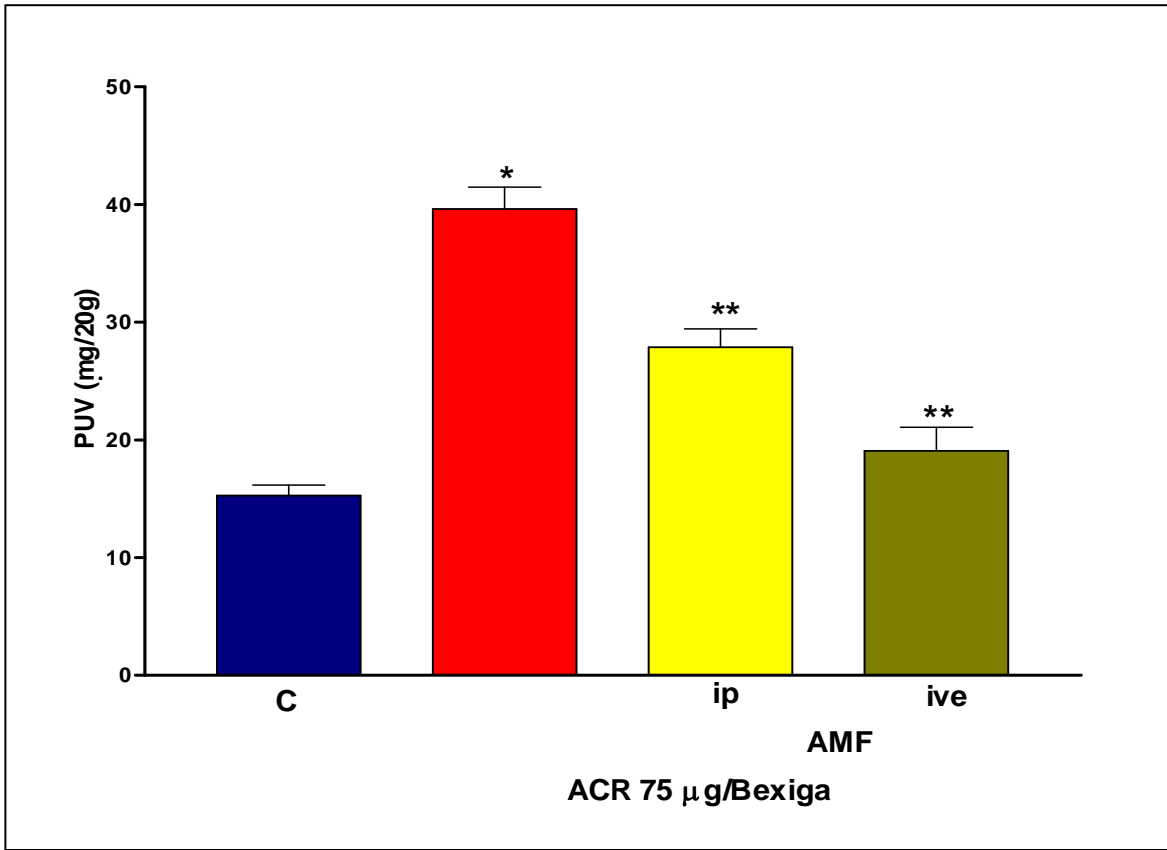


Figura 40. Efeito do tratamento com amifostina (AMF) na variação do Peso Úmido Vesical (PUV) induzido pela injeção intravesical de acroleína (ACR) - avaliado após 3 horas. As barras representam a média \pm EPM do Peso Úmido Vesical referentes a seis animais que receberam apenas acroleína (75 μ g) ou que foram tratados com amifostina, por via intravesical (1,5mg) associado a ACR ou por via *ip* (50 mg/Kg) 1 hora antes da indução da cistite. Os animais foram sacrificados após 3 horas da injeção da ACR. (*) representa diferença estatisticamente significativa quando comparadas com o grupo controle (C), que recebeu salina *ive* e (**) quando comparadas ao grupo que recebeu apenas ACR. $p < 0,05$ (ANOVA , teste de Bonferroni)

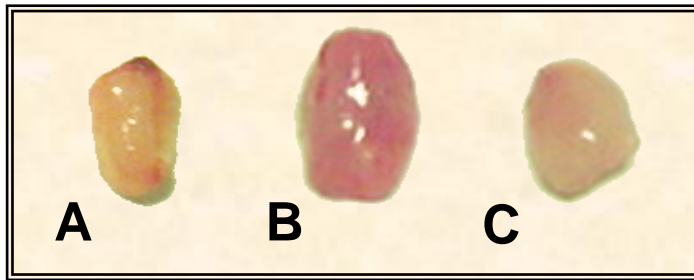


Figura 41. Efeito do tratamento com Amifostina (AMF) nas alterações macroscópicas induzidas pela injeção intravesical de Acroleína 75µg avaliado após 3 horas. (A) Bexiga Controle; (B); ACR 75µg *ive* ; (C) AMF *ive* + ACR.

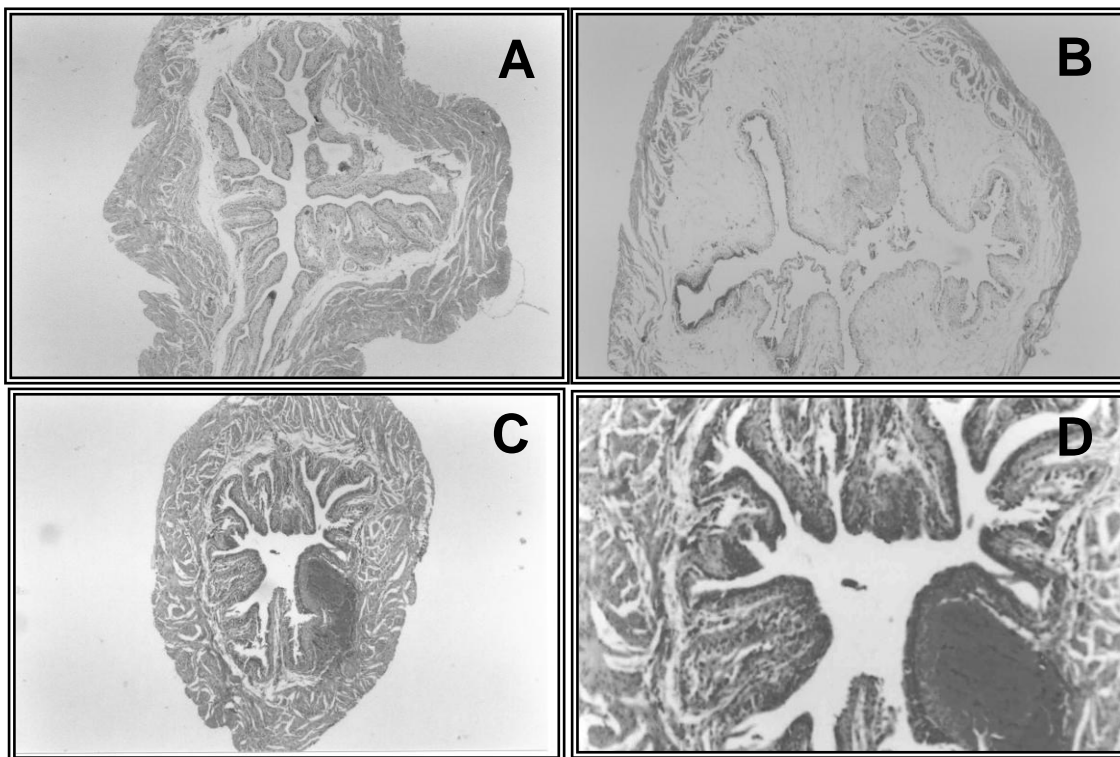


Figura 42. Efeito do tratamento com Amifostina (AMF) nas alterações histopatológicas induzidas por Acroleína (ACR). (A) Bexiga Controle; (B) ACR 75µg; (C) AMF *ive* + ACR.40x.; (D) AMF *ive* + ACR.100x .Coloração HE.

TABELA 9 - Análises macroscópicas e histológicas dos efeitos da amifostina (*ip* e *ive*) na cistite hemorrágica induzida pela administração (*ive*) da acroleína (ACR) avaliadas após 3 horas

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

A injeção de 75µg de ACR *ive* induziu a cistite hemorrágica com alterações macroscópicas e histológicas que foram estatisticamente diferentes do controle (C), que recebeu solução salina, quando analisadas após 3 horas. As alterações vesicais induzidas pela ACR foram inibidas pelo tratamento com a amifostina (*ip* e *ive*) quando comparadas com os animais que receberam apenas a ACR, sendo no este bloqueio estatisticamente significativo apenas, como foi demonstrado na análise que se realizou após 3 horas da indução da CH. Os dados desta tabela estão relatados como medianas e variações (n=6). * p< 0,05 em relação ao grupo controle (C) e ** p< 0,05 em relação ao grupo tratado apenas com ACR, pelos testes de Kruskal Wallis (seguido de Dunns) e Mann- Whitney.

8. Cinética de edema de pata induzida por acroleína em camundongos

A acroleína (40 µg, em volume de 0,06 ml) injetada por via subplantar, conforme podemos observar na Figura 43, produziu um edema de pata inicial que se tornou evidente nos primeiros trinta minutos após a injeção. Este edema sofreu redução decorridas 2 horas e gradualmente foi aumentando até obter seu pico máximo na sexta hora. A partir desta última medida o edema progressivamente regrediu. Os animais que receberam apenas injeção *sp/* de solução salina (0,06 ml) apresentaram um pequeno aumento do volumes das patas na 1ª hora que regrediu a partir da 2ª hora e que retornou aos níveis iniciais em torno das 24 horas

A avaliação histopatológica das patas evidenciou edema com presença de infiltrado celular com polimorfonucleares e mononucleares. (Figura 44)

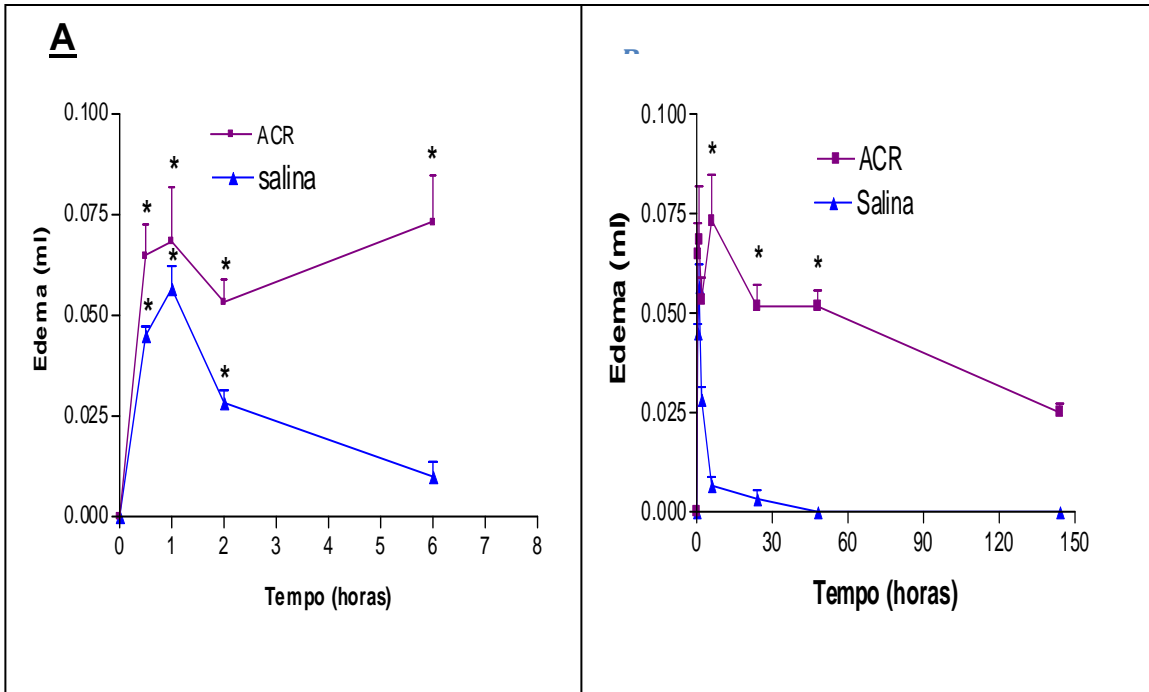


Figura 43. Cinética do edema de pata induzida por acroleína em camundongo. O gráfico mostra o edema produzido pela injeção subplantar (*sp*) de acroleína e de solução salina, observado até a sexta hora (**A**) e até o sexto dia (**B**). Cada ponto representa a média \pm EPM da variação do volume das pata, em relação ao seus volumes iniciais. O eixo do x corresponde ao horário, após a injeção subplantar, em que o edema foi medido. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao volume inicial, com $p < 0,001$ (ANOVA, teste de Bonferroni)

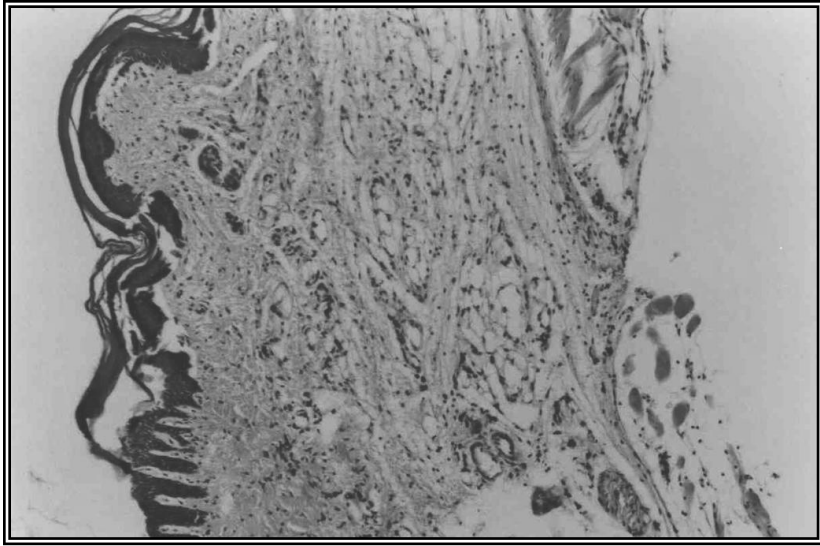
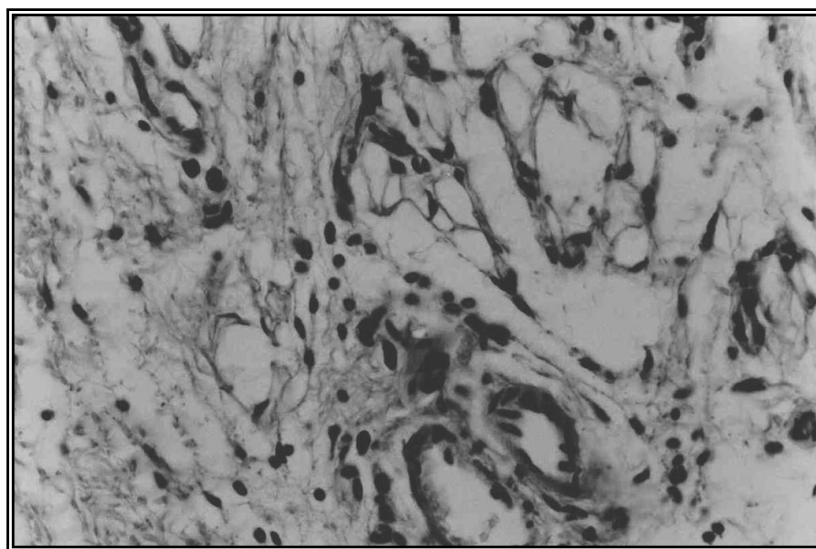


Figura 44. Avaliação Histopatológica de pata de camundongo após 6 horas de injeção *sp/* de Acroleína. (A) ACR *sp/* 100x; (B) ACR *sp/* 400x. Coloração HE.

A



B

9. Efeito da administração de Mesna no edema de pata induzido por acroleína em camundongos.

De acordo com os dados já descritos no experimento anterior, a acroleína produziu um edema de pata inicial (30 minutos) que foi seguido de um edema secundário (6^a hora). O tratamento dos animais com Mesna (80 mg/Kg *ip*) 1 hora antes da injeção *sp/* da ACR não foi capaz de inibir o edema por ela produzido em nenhuma das medidas de maneira significativa. Já a administração do Mesna (1mg/pata), em solução com a acroleína, inibiu de forma estatisticamente significativa o edema em todas as medidas ($p < 0,05$). (Figura 45)

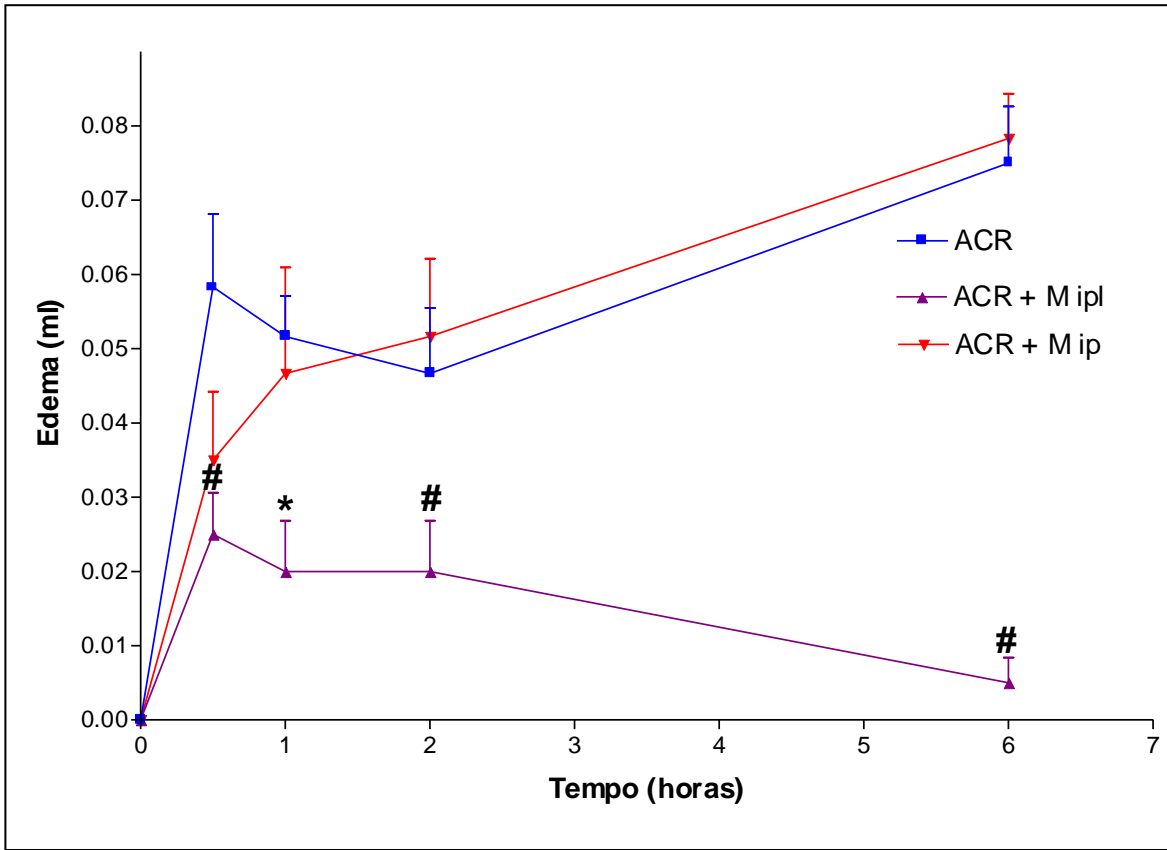


Figura. Efeito da administração de Mesna no edema de pata induzido por acroleína (ACR) em camundongos. O gráfico mostra o efeito do Mesna no edema produzido pela injeção subplantar (*spl*) de acroleína, observado até a sexta hora. O Mesna foi administrado por via *ip* (80 mg/Kg) ou em injeção *spl* (1 mg) associado a acroleína. Cada símbolo representa média \pm EPM da variação dos volumes das patas, em relação aos seus volumes iniciais, referente a seis animais de cada grupo, conforme legenda representada no gráfico. O eixo do x corresponde ao horário, após a injeção da acroleína, em que o edema foi mensurado. (*) e (#) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação as medidas dos animais que receberam apenas a injeção *spl* de ACR , com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. (ANOVA, teste de Bonferroni)

DISCUSSÃO

IV - DISCUSSÃO

A despeito do fato da quimioterapia antineoplásica continuar a ser a opção de melhores resultados para o tratamento de muitos tipos de neoplasias, há uma constante pesquisa direcionada para a busca do desenvolvimento de novas drogas com eficácia e especificidade maiores, bem como com efeitos adversos reduzidos.

Para a obtenção destes tão sonhados agentes, a investigação tem se aprofundado na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na interação das drogas com as células do hospedeiro.

As oxazafosforinas, Ciclofosfamida e Ifosfamida, conforme já foi anteriormente descrito, figuram entre as drogas citotóxicas mais utilizadas, sendo ativas contra muitos tipos de doenças neoplásicas e benignas.(HUNTER & HARRISON, 1982; BRADE et al, 1985; BROCK, 1986; GERSHWIN et al., 1974) Um fator que limita o seu uso é o desenvolvimento de um quadro de cistite hemorrágica como um efeito colateral importante e ameaçador da vida, caso não se estabeleçam medidas uroprotetoras adequadas.

Tem sido proposto que a causa desta toxicidade vesical seja a acroleína, um metabólito tóxico das oxazafosforinas, que em contato direto com o urotélio causaria edema, ulceração, neovascularização, hemorragia e necrose. (COX, 1979)

Baseados na consideração acima exposta, decidimos neste projeto de pesquisa avaliar o efeito direto da acroleína sobre o epitélio vesical, uma vez que

na maioria dos trabalhos existentes os resultados foram obtidos após a administração sistêmica de compostos que supostamente seriam convertidos endogenamente em acroleína.

Tendo em vista o fato de que este era um modelo de inflamação pouco habitual, pelo menos para nós, dividimos o projeto em etapas. A primeira consistia num estudo prévio que visava verificar a exequibilidade do modelo, compreender sua cinética de desenvolvimento, as alterações histopatológicas a ele relacionadas, assim como determinar a dose ideal de acroleína na qual eventos inflamatórios pudessem ser observados.

Os resultados desta primeira etapa, que chamamos de análise preliminar do modelo, revelaram que a cistite hemorrágica induzida por acroleína desenvolve-se como um processo inflamatório agudo, onde desde as primeiras horas após sua administração intravesical podem ser evidenciadas manifestações tipicamente inflamatórias como edema e congestão vascular.

Neste modelo, macroscopicamente, podemos observar, como características particulares, um edema que se demonstrou mais exuberante nas primeiras observações, após 3 horas da administração da acroleína, enquanto que nas verificações mais tardias, após 24 horas da indução da cistite, os eventos hemorrágicos predominaram, apesar das bexigas ainda apresentarem edema significativo, porém com muita necrose e por muitas vezes apresentarem-se friáveis ou mesmo perfuradas. Estes achados foram ratificados pela análise histopatológica.

Analisando as variações dos pesos úmidos vesicais, vimos que a cistite induzida por acroleína apresentou edema máximo, 6 horas após o estímulo lesivo.

Muitos destes achados estão de acordo com os demonstrados por alguns autores em trabalhos experimentais, mesmo que não tenha havido por parte destes o objetivo de descrever mais detalhadamente, de forma temporal, os aspectos macroscópicos e histológicos. (CHAVIANO, et al., 1985; SAKATA et al., 1989; FRAISER et al., 1992)

Outro aspecto muito importante desta etapa é que os resultados demonstraram que este modelo de cistite hemorrágica, no que diz respeito a acroleína, desenvolveu-se de uma forma dose-dependente, sendo que as doses intravesicais de 75µg e 225µg foram eficazes para a geração do processo, tomando como parâmetros o aumento do peso úmido vesical, as alterações macroscópicas e histopatológicas, sendo estas últimas caracterizadas por edema exuberante e extensas áreas de descamação do epitélio vesical e ulceração, com infiltrado leucocitário importante evidenciado a partir da 6ª hora após a indução da cistite. Baseados nos resultados desta fase do projeto, optamos por trabalhar com a dose da acroleína de 75µg /Bexiga e sacrificar os animais em dois tempos, após 3 e 24 horas da injeção intravesical da acroleína, visando melhor observar nestes tempos o edema e a hemorragia, respectivamente. .

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, investigaram a cistite hemorrágica como uma patologia inflamatória, elucidando vários aspectos da sua patogênese.

Pesquisadores do LAFICA demonstraram que a cistite hemorrágica induzida pela injeção intraperitoneal de oxazafosforinas, ciclofosfamida e ifosfamida, desenvolve-se como um processo inflamatório agudo e progressivo, induzido de forma dose-dependente, onde há a participação de PAF, Óxido Nítrico e de citocinas, como IL1 e $TNF\alpha$, como mediadores cruciais envolvidos nos eventos inflamatórios, bem como na lesão urotelial e na hemorragia. (GOMES et al., 1995; SOUZA-FILHO et al, 1997; RIBEIRO et al., 1998; RIBEIRO et al., 2002)

Estimulados pela preponderância de fenômenos vasculares, como congestão e hemorragia, além do conhecimento de que as alterações da permeabilidade vascular são imprescindíveis para a gênese do edema, tomamos como parâmetro para mensuração deste, além das variações do peso úmido vesical, o método do extravazamento do Azul de Evans para avaliar as modificações da permeabilidade vascular. Esta técnica baseia-se no fato de que o Azul de Evans possui grande afinidade com a albumina, ligando-se a esta. Em condições normais, o corante não extravasa para o interstício, no entanto na vigência de uma condição onde exista aumento da permeabilidade vascular, como num processo inflamatório, o Azul de Evans sai do vaso acumulando-se no espaço intersticial.

Como podemos observar na Figura 19, são notórias a eficiência e sensibilidade desta metodologia, neste modelo de cistite hemorrágica, uma vez que as modificações ocorridas são mais evidentes do que aquelas observadas com o peso úmido vesical. Para demonstrar esta sensibilidade, tomamos como

exemplo o fato de que a permeabilidade vascular ao azul de Evans aumentou cerca de 25 vezes em relação ao controle , com a dose maior da acroleína (225 µg), enquanto que no peso foi demonstrado ascensão de apenas três vezes e meia, aproximadamente, com a mesma dose. (Figura 17)

O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado apenas após 3 horas da injeção intravesical de acroleína, pois nas análises mais tardias (após 6, 12 e 24 horas) a existência nas bexigas de grande quantidade de sangue provocava interferência na leituras da absorvância do corante extraído.

Nossos resultados demonstraram que a injeção intravesical de acroleína produz efeitos mais acentuados no extravazamento do Azul de Evans, quando comparado a dados anteriores do nosso laboratório, relacionados aos efeitos da administração *ip* tanto de Ciclofosfamida como de Ifosfamida em ratos e camundongos(GOMES, T.N.A., 1995) , o que está de acordo com os dados de Chaviano e colaboradores que também observaram inflamação mais pronunciada com a acroleína. (CHAVIANO et al., 1985)

Com o intuito de conferir validade ao modelo de cistite hemorrágica, aqui apresentado, os animais que receberam acroleína intravesicalmente, foram tratados com um uroprotetor de eficácia clínica comprovada , o Mesna.

O Mesna (ácido 2-mercaptoetano sulfonato) é um composto tiol que entrou em ensaios clínicos como um agente uroprotetor sistêmico no final da década de 70 e dentro de um curto período de tempo se tornou a droga de escolha para esta finalidade. (KATZ et al., 1995) A administração sistêmica do Mesna promove uma detoxificação regional do sistema urinário (ELIAS et al.,

1990; SCHEULEN et al., 1983), uma vez que a interação do Mesna com a acroleína resulta num composto inativo. (WAGNER, 1994) O Mesna por sua alta solubilidade, é excretado rapidamente, possuindo então curta meia vida plasmática (1,5 horas, aproximadamente) quando comparada as da Ciclofosfamida e Ifosfamida (ambas em torno de 6-7 horas). Devido a esta diferença farmacocinética, faz-se necessária a administração repetida do Mesna para obtenção de uroproteção adequada (BROCK et al., 1981; SHAW & GRAHAM, 1987). O Mesna é comumente utilizado imediatamente antes da oxazafosforina (Ciclofosfamida ou Ifosfamida), 20% da dose desta e doses semelhantes são repetidas após 4 e 8 horas, quando da administração endovenosa (KATZ et al., 1995) ou após 2 e 6 horas, quando a administração é oral. (GOREN et al., 1997)

No presente estudo, tratamos sistemicamente os animais que receberam acroleína intravesical com o Mesna numa dose de 80 mg/Kg de peso *ip*, fundamentado na dose que é habitualmente administrada para a prevenção contra a urotoxicidade da Ifosfamida (20% de 400mg/Kg). No entanto optamos por fazê-la em apenas uma administração, uma vez que neste modelo os aspectos farmacocinéticos não interfeririam já que a acroleína está sendo administrada diretamente na bexiga e não sendo formada a partir da metabolização das oxazafosforinas.

O Mesna também foi administrado em associação com a acroleína em injeção intravesical. A dose utilizada neste tratamento foi de 2 mg / Bexiga, que corresponde a dose semelhante a do tratamento sistêmico (2 mg/25g de peso).

No nosso modelo experimental, de forma similar ao que acontece na prática clínica, o Mesna proporcionou proteção vesical eficaz tanto quando foi

utilizado por via sistêmica como por via intravesical , nas análises realizadas após 3 e 24 horas da acroleína, baseando-se em todos os parâmetros aqui utilizado.

Em busca de uma compreensão mais detalhada dos eventos envolvidos no processo de instalação do quadro de cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas, um grupo de pesquisadores do LAFICA, estudando a participação do NO, estabeleceu que a modulação farmacológica dos níveis de IL1, TNF α e da expressão da NOS induzida, conseqüentemente dos níveis de NO poderia tornar-se ferramenta adequada no desenvolvimento de fármacos eficientes no controle da patogenia desta afecção. (RIBEIRO et al., 2002)

Apesar da compreensão de que o NO provavelmente seria o mediador final da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas, ainda permanece sem o devido esclarecimento os alvos moleculares por ele afetados, bem como os mecanismos de proteção celular aqui envolvidos.

Algumas ações inflamatórias do Óxido Nítrico já são bem conhecidas como relaxamento da microvasculatura com controle do fluxo arterial (PERSON et al., 1990 ; FORTES et al., 1990) ,controle da permeabilidade vascular induzida por PAF e Bradicinina, controle da migração de neutrófilos. (MONCADA, 1992; TAVARES-MURTA et al., 1994) e controle da dor inflamatória (FERREIRA, DUARTE & LORENZETTI, 1991)

De acordo com o que já foi citado anteriormente no capítulo Introdução, um dos principais alvos moleculares do NO é a Glutathiona reduzida (GSH). Diferentes tipos celulares expostos a doadores de NO tiveram seus níveis de Glutathiona intracelular reduzidos, aumentados ou inalterados. (BERENDJI et al.,

1999) Alguns autores demonstraram que a depleção de Glutathione aumenta a sensibilização de células aos efeitos citotóxicos do NO (WINK et al., 1994; WALKER et al., 1994; LUPERCHIO et al., 1996) e que esta depleção não parece ser, por si só, suficiente para determinar morte celular. (SANTOS-SILVA, 2002)

A diminuição dos níveis de Glutathione reduzida (GSH) e aumento da sua forma oxidada (GSSG), que estão presentes durante situações de estresse oxidativo ou nitrosativo, encontram-se associados a um aumento da expressão de γ -GCS (RAHNMAN & MACNEE, 2000) esta por sua vez é mediada pela ativação do Fator Nuclear κ B (NF- κ B).(MANNA et al., 1999) No entanto estudos realizados com células leucêmicas humanas demonstraram que embora o NO tenha diminuído os níveis de glutathione intracelular, não contribuiu para o aumento da expressão da γ -GCS, pois inibiu a atividade do NF- κ B. (SANTOS-SILVA, 2002)

Além da inibição da ativação do NF- κ B, a exposição de células obtidas de adenocarcinoma pulmonar A549 à acroleína se relacionou com a depleção de glutathione, bem como com a inibição da ativação de um outro fator de transcrição, o AP-1. (BISWAL et al., 2002)

No presente estudo também avaliamos o papel protetor da Glutathione reduzida na cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas. O pré tratamento dos animais com GSH na dose de 500 mg/Kg *ip* foi capaz de inibir os eventos inflamatórios provocados pela administração de Ifosfamida (400mg/Kg *ip*), de maneira significativa desde as primeiras observações (6 horas). (Figuras 28 e 36)

Nossos resultados demonstram que apenas uma dose de Glutathione reduzida (GSH)(500 mg/Kg *ip*) uma hora antes da Ifosfamida foi capaz de inibir

significativamente o curso temporal do aumento do peso úmido vesical induzido pela Ifosfamida , de forma semelhante a inibição promovida pelo Mesna, administrado em três doses, 1 hora antes e após 4 e 8 horas da Ifosfamida.

A mesma dose da GSH foi capaz de inibir a cistite hemorrágica induzida por acroleína quando observadas após 3 e 24 horas da indução, analisados por todos os parâmetros.

O efeito protetor local da Glutathione também foi por nós evidenciado quando esta foi administrada intravesicalmente na dose de 2 mg/Bexiga em associação com a acroleína.

Na cistite hemorrágica induzida por Ciclofosfamida, onde a acroleína é o metabólito que se aceita estar envolvido na toxicidade vesical associada a esta droga, existe uma expressão aumentada do mRNA de citocinas na bexiga, principalmente IL1 β , IL2, IL4, IL8, IL6 e TNF α e β .(AL-RAWITHI et al., 1998) Somando-se a já descrita participação de mediadores inflamatórios na cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas, nos questionamos sobre as possíveis ações pró inflamatórias da acroleína.

A acroleína é um aldeído insaturado altamente reativo, amplamente distribuído como um poluente ambiental (ASTRY AND JACOB, 1983; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991), presente como um dos principais componentes voláteis da fumaça do cigarro (CADWELL et al., 1998; AYER AND YEAGER, 1982; ALTSCHULER AND MC PHERSON, 1963), podendo ser gerado endogenamente como um metabólito tóxico de drogas antineoplásicas,

Ciclofosfamida e Ifosfamida (FRAISER et al., 1991) e também pode ser produzido nos sítios inflamatórios (ANDERSON et al., 1997)

Está bem demonstrado na literatura que a exposição do trato respiratório de animais a acroleína induziu a liberação de três eicosanóides broncoconstrictores, $PGF_2 \alpha$, TXA₂ e Leucotrieno B₄, bem como estimulou o influxo de neutrófilos para o lavado brônquico. A acroleína também foi capaz de estimular a liberação de eicosanóides em cultura de células epiteliais bovinas (LEIKAULF, 1992). Adicionalmente, Anderson e colaboradores propuseram que a produção de acroleína por fagócitos ativados poderia exercer um papel importante na lesão tecidual nos locais de inflamação. (ANDERSON et al., 1997)

Já se reconhece o fato de que a acroleína pode estimular a liberação de IL8 (MIO et al., 1997) e estudos mais recentes demonstraram que a mesma pode afetar diretamente a função dos neutrófilos, uma vez que a exposição de neutrófilos humanos isolados à acroleína, inibiu acentuadamente a apoptose espontânea destas células e induziu a produção da quimiocinas Interleucina 8 (IL8), aumentando o recrutamento de células inflamatórias. (FINDELSTEIN et al., 2001)

Visando avaliar os possíveis efeitos inflamatórios da acroleína *per se*, foi por nós realizado um experimento de edema de pata induzido por acroleína, assim como avaliamos o efeito do tratamento com o Mesna, por duas vias de administração distintas.

O Mesna ao ser absorvido é prontamente oxidado a dimesna pela formação de pontes disulfeto entre duas unidades monoméricas (BROCK et al.,

1980), o dimesna por sua vez é muito menos eficaz do que o Mesna como antagonista químico da acroleína.(SHAW et al., 1987) O fato de serem extremamente hidrofílicos, faz com que ambos, Mesna e Dimesna, sofram rápida excreção urinária. (ORMSTAD et al., 1983) Nos rins as pontes dissulfeto são quebradas e o Mesna é então novamente formado, (ORMSTAD E UEHARA, 1982) podendo desta forma reagir com a acroleína, protegendo da toxicidade urinária induzida por esta, de uma maneira específica, ou seja sem interferir com a atividade antineoplásica das oxazafosforinas.

Para comprovar o efeito urinário específico do Mesna, o administramos tanto por uma via sistêmica (*ip*) como local em associação com a acroleína em injeção subplantar.

A injeção subplantar de acroleína induziu a um edema que obteve seus valores máximos após seis horas da injeção da acroleína e as patas tiveram seus volumes de volta aos valores normais por volta do 6º dia. O pico do edema em torno da 6ª hora, , conforme pudemos observar na Figura 43, sugere a participação de células , o que foi comprovado na avaliação histológica das patas, que evidenciou presença de infiltrado de neutrófilos e mononucleares, confirmando os relatos, já citados anteriormente, de Finkelstein e colaboradores, de que a acroleína é capaz de recrutar neutrófilos.(FINKELSTEIN e al., 2001)

O tratamento sistêmico com o Mesna, por via intraperitoneal, não foi capaz de inibir o edema de pata induzido pela acroleína, o que condiz com os dados existentes na literatura, que indicam que apenas na bexiga o Dimesna é convertido a Mesna por ação de enzimas presentes nas células renais.(ORMSTAD E UEHARA, 1982)

Já o Mesna administrado em associação com a acroleína, inibiu prontamente o edema induzido por esta isoladamente, em todos os tempos, uma vez que a detoxificação da acroleína pode ser obtida pela reação química com o Mesna com formação de um tioéter relativamente estável e não tóxico. (SHAW et al., 1987)

O mecanismo pelo qual a acroleína, metabólito urotóxico da Ciclofosfamida e da Ifosfamida, é dirigida até a bexiga ainda não é totalmente conhecido. (RAMU et al., 1995) No entanto estudos sugerem que a taxa de aparecimento da acroleína na bexiga é muito mais crucial para o desenvolvimento da cistite hemorrágica do que o total excretado cumulativamente. (AL-RAWITHI et al., 1998)

A Glutathiona reduzida (GSH) prontamente se conjuga com a acroleína, e o composto formado desta reação, o acroleína mercapturato S-3 (hidroxipropil)-N-acetilcisteína tem sido encontrado na urina de homens e animais que receberam Ciclofosfamida. (RAMU et al., 1995). Além de se conjugar com a acroleína a GSH também pode se associar com o próprio Óxido Nítrico, com formação de um composto intermediário, a nitrosoglutathiona (GSNO), (CLANCY et al., 1994) podendo desta maneira amplificar o efeito citotóxico do NO, uma vez que é muito mais estável, além de poder vir a funcionar como um estoque intracelular de NO. (GASTON, 1993)

A compreensão deste fato nos leva a propor que o Óxido Nítrico gerado na cistite hemorrágica induzida pela acroleína, quer injetada diretamente na bexiga, quer gerada pelo metabolismo das oxazafosforinas, esteja causando

redução dos níveis de glutathione tanto pela oxidação desta à GSSG, como pela inibição da sua síntese de novo.

A acroleína também pode depletar estoques intracelulares de glutathione diretamente (POCERNICH et al., 2001) ou secundariamente a geração de espécies pró oxidantes (NARDINI et al., 2002)

O presente trabalho, associado aos dados da literatura já citados, comprovam a real importância da acroleína na gênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.

Acrescentando-se ao já sugerido em trabalhos anteriores, a acroleína além de lesar inicialmente o urotélio, expondo elementos da lâmina própria, com conseqüente ativação e liberação de citocinas e Óxido Nítrico (GOMES, 1995), poderia, por si só, induzir a liberação de mediadores inflamatórios, eicosanóides, citocinas e NO, além de diminuir os níveis vesicais de Glutathione, tendo desta forma amplificados seus efeitos citotóxicos. (Figura 46)

As aplicações clínicas do entendimento da sinalização molecular da acroleína pode ser evidenciada em diversas condições patológicas, incluindo câncer, devido a sua presença como metabólito das oxazafosforinas, e inflamação como produto de peroxidação lipídica.(UCHIDA, 1999 a) A acroleína também tem sido implicada na patogênese de doenças como aterosclerose e Doença de Alzheimer,(UCHIDA, 1998b; CALINGASAN et al., 1999) onde a importância protetora de níveis aumentados de Glutathione no cérebro já foi demonstrada. (POCERNICH et al., 2001)

Apesar da extensa literatura toxicológica da acroleína, ainda existe uma compreensão incompleta da base molecular da citotoxicidade por ela induzida,

assim como a habilidade de diferentes antioxidantes em inibir os seus efeitos adversos. (NARDINI et al., 2002).

Nossos resultados em conjunto confirmam a importância dos tióis endógenos e a Glutathione, como ferramenta farmacológica, nos permitiu evidenciar os mecanismos citoprotetores que ocorrem na cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.

Novos agentes potencialmente citoprotetores têm sido investigados e carregam consigo a promessa de diminuir a toxicidade das terapias anticâncer melhorando assim as condições de vida dos pacientes oncológicos. Confirmando a importância dos compostos tióis na proteção celular, um composto emergiu dentre muitos testados com esta finalidade, trata-se da Amifostina, um tiofosfato que após sofrer desfosforilação no organismo é convertido num tiol livre. (GRIGGS, 1998)

Tal droga tem se mostrado clinicamente eficaz na proteção contra diversos efeitos indesejados de drogas antineoplásicas como cardiotoxicidade induzida por antraciclina (GREEN et al, 1992)(DORR et al., 1994) e mielotoxicidade induzida por carboplatina,(TRESKES et al., 1994) , ciclofosfamida e seus derivados.(CAPIZZI, 1996)(DOUAY et al., 1995)

O fato da amifostina ser um composto tiol de forma semelhante ao Mesna, clássico antagonista químico da acroleína, nos estimulou a estudá-la como possível droga protetora na cistite hemorrágica induzida tanto por Ifosfamida como pela injeção intravesical de acroleína. De fato, os resultados dos nossos estudos comprovaram este efeito inibitório já que o tratamento com amifostina foi capaz de inibir significativamente os eventos inflamatórios analisados tanto

macroscopicamente (edema e hemorragia) como a nível histopatológico (erosão, edema, infiltrado leucocitário e necrose) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, estando de acordo com os dados da literatura que já citam a amifostina como sendo eficaz na prevenção da CH induzida por ciclofosfamida (SRIVASTAVA et al, 1999).

A amifostina também bloqueou a cistite hemorrágica induzida pela injeção intravesical de acroleína. Esta proteção vesical em ambos os modelos de cistite pode ser atribuída não somente ao fato de suas características químicas, mas também pela sua habilidade em modular os níveis de glutatona aumentando o *pool* intracelular de grupos tiol (SH). (UMA DEVI and PRASANA, 1990) (UMA DEVI et al., 2000) além de atuar como um potente "scavenger" de radicais livres de oxigênio. (CAPIZZI, 1996) proporcionando assim um incremento nos mecanismos de defesas celulares.

Ainda poderíamos propor que a possibilidade de que a Amifostina também possa agir como um modulador da liberação de citocinas (IL1 e $TNF\alpha$) e dessa forma também inibir a NOS induzida, inibindo conseqüentemente a liberação de Óxido Nítrico. No entanto este possível mecanismo ainda deve futuramente ser investigado, bem como os seus efeitos moleculares.

A partir da compreensão mais detalhada da patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas, bem como dos sistemas de proteção celular envolvidos nesta situação, abrem-se então novos horizontes na busca de substâncias capazes não somente de antagonizar quimicamente a acroleína, mas

CONCLUSÕES

V - CONCLUSÕES

- ◆ A injeção intravesical de acroleína induziu de forma dose-dependente o desenvolvimento de um processo inflamatório vesical agudo e progressivo em camundongos *Swiss*.
- ◆ Os eventos inflamatórios da Cistite Hemorrágica induzida pela injeção intravesical de acroleína caracterizaram-se pela importância de fenômenos vasculares, como congestão, hemorragia e erosões do epitélio, sendo o edema mais exuberante nas observações iniciais atingindo sua plenitude 12 horas depois do estímulo lesivo. Já as manifestações hemorrágicas predominaram após 24 horas da injeção da acroleína.
- ◆ De maneira semelhante ao que ocorre na clínica e nos modelos de Cistite Hemorrágica induzida por oxazafosforinas, o Mesna atuou como um uroprotetor eficaz na lesão vesical induzida pela acroleína, quer administrado local ou sistemicamente, em apenas uma dose, bloqueando as manifestações macroscópicas e histológicas.
- ◆ O pré-tratamento dos camundongos *Swiss* com apenas uma dose de Glutathione reduzida conferiu proteção vesical, com inibição significativa da Cistite Hemorrágica induzida por Ifosfamida não apenas no seu pico, no tempo de 12 horas, mas em toda a cinética de lesão.

- ◆ A inibição da Cistite Hemorrágica induzida por acroleína após o tratamento com a Glutathione reduzida foi obtida de maneira significativa nos tempos de 3 e 24 horas da injeção intravesical,
- ◆ O tratamento de camundongos Swiss com amifostina foi capaz de inibir de maneira estatisticamente significativa as alterações macroscópicas e histopatológicas da cistite hemorrágica induzidas tanto pela Ifosfamida como pela injeção intravesical de acroleína.
- ◆ A acroleína foi capaz de induzir uma resposta edematogênica extravascular rica em leucócitos, a qual foi também inibida pela administração local do Mesna, mas não o foi pela sua administração sistêmica, confirmando o fato de que na circulação a sua forma de Dimesna é pouco eficiente em antagonizar quimicamente a acroleína.
- ◆ Os resultados deste trabalho comprovam a real importância do metabólito urinário das oxazafosforinas, a acroleína como causa da Cistite Hemorrágica por estas induzida, e ainda evidenciam a importância dos tióis endógenos como importante sistema de defesa celular contra compostos tóxicos como a acroleína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. D. Jr., KLAIMAN, L. K. Acrolein-induced oxygen radical formation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 15, p. 187-193, 1993.

ALBERTS D.S., SPEICHER L.A, KRUTZSCH M., WYMER J., CAPIZZI R.L., CONLON J., BARRETT A, AICKIN M. WR-1065, the active metabolite of amifostine (Ethyol), does not inhibit the cytotoxic effects of a broad range of standard anticancer drugs against human ovarian and breast cancer cells. **Eur. J. Cancer**, 32 A (Suppl 4):17, 1996.

AL-RAWITHI, S., EL-YAZIGI, A., ERNST, P., AL-FIAR, F., NICOLLS, P. J. Urinary excretion and pharmacokinetics of acrolein and its parent drug cyclophosphamide in bone marrow transplant patients. **Bone Marrow Transpl.**, v. 22, p. 485-490, 1998.

ALTSCHULER, A . P., Mc PHERSON, S. P. Spectrophotometric analysis of aldehydes in the Los Angeles atmosphere. **J. Air Pollut. Control Assoc.**, v. 13, p. 109-111, 1963.

ANDERSON, E. E., COBB, O. E., GLENN, J. F. Cyclophosphamide hemorrhagic cystitis. **J. Urol.**, v. 97, p. 857, 1967.

ANDERSON, M. M., HAZEN, S. L., HSU, F. F., HEINECKE, J. W. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxyl-aminoacids into glycoaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein: a mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxyl and

- alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. **Am. J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 424-432, 1997.
- ANON. In: New horizons in Cancer chemotherapy. Boehringer Ingelheim Hospital Division, Ellesfield Avenue, Bracknell, Berks, UK.
- ARUMUGAM, N., SIVAKUMAR, V., THANISLASS, J., PILLAI, K. S., DEVARAJ, H. Acute pulmonary toxicity of acrolein in rats-underlying mechanism. **Toxicol. Lett.**, v. 104, p. 189-194, 1999 a.
- ARUMUGAM, N., THANISLASS, J.,RAGUNATH, K., DEVARAJ, S. N., DEVARAJ, H. Acrolein-induced toxicity-defective mitochondrial function as a possible mechanism. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 36, p. 373-376, 1999 b.
- ASAHI, M., FUJII, J., SUZUKI, K., SEO, H. G.,KUZUYA, T., HORI, M., TADA, M., FUJII, S., TANIGUCHI. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 21035-9, 1995.
- ASSREUY, A. M. S., MARTINS, G. J., MOREIRA, M. E. F., BRITO, G. A. C., CAVADA, B. S., RIBEIRO, R. A., FLORES, C. A. Prevetion of cyclphosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-manose biding plant lectins. **J. Urol.**, v. 161, p. 1988-1993, 1999.
- ASTRY, C. L., JAKAB,G. J. The effects of acrolein exposure on pulmonary antibacterial defenses. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 67, p. 49-54, 1983.
- AYER, H. E., YEAGER, D. W. Irritants in cigarette smoke plumes. **Am. J. Public. Health** , v. 72, p. 1283-1285, 1982.

BECKER, K., GUI, M., SCHRMER, R. H. Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. **Eur. J. Biochem.**, v. 234, p. 472-8, 1995.

BENNETT, A . H. Cyclophosphamide and hemorrhagic cystitis. **J. Urol.**, v. 111, p. 603, 1974.

BERENDJI, KOLB-BACHOFEN, V., MEYER, K. L., KRÖNCKE, K. D. Influence of nitric oxide on the intracellular reduced glutathione pool: different cellular capacities and strategies to encounter nitric oxide-mediated stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v.27, p. 773-780, 1999.

BERKSON, B. M., LOME, L. G., SHAPIRO, I. Severe cystitis induced by cyclophosphamide. Role of surgical management. **JAMA**, v. 225, p. 605, 1973.

BISWAL, SHYAM, ACQUAAH-MENSAH, GEORGE, DATTA, KAUSHIK, WU, XULI, KEHRER, JAMES,P. Inhibition of cell proliferation and Ap-1 activity by acrolein in human A549 lung adenocarcinoma cells due to thiol imbalance and covalent modifications. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 15, p. 180-186, 2002.

BOTTA Jr., J. A., NELSON, L., WEIKEL Jr., J. H. Acetylcystein in the prevention of cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 51, p. 1051, 1973.

BRADE, W. P., HERDICH, K., VARINI, M. Ifosfamide – pharmacology, safety and therapeutic potential. **Cancer Treat. Rev.**, v. 12, p. 1-47, 1985.

BROCK, N. (1977) apud BRADE, W., SEEBER, S., HERDRICH, K. Comparative activity of ifosfamide and cyclophosphamide. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 18, suppl 2, p. S1-S9, 1986.

BROCK, N. (1977) apud BRADE, W., SEEBER, S., HERDRICH, K. Comparative activity of ifosfamide and cyclophosphamide. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 18, suppl 2, p. S1-S9, 1986.

BROCK, N. Ideas and reality in the development of cancer chemotherapeutic agents with particular reference to oxazaphosphorines cytostatics. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 111, p.1-12, 1986.

BROCK, N. Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future. **Cancer Res.**, v. 49, p. 1-7, 1989 .

BROCK, N. Uromitexan (mesna)- concept and mode of action. **Beiträge zur Onkologie**, v. 5, p. 1 –11, 1980.

BROCK, N., HILGARD, P., PEUKERT, M., POHL, J., SINDERMAN, H. Basis and new developments in the field of oxazaphosphorines. **Cancer Invest.**, v. 6, p. 513-532, 1988.

BROCK, N., POHL, J. & STEKAR, J. Studies on the urotoxicity of oxazaphosphorine cytostatics and its prevention. II Comparative study on the uroprotective efficacy of thiols and other sulphur compounds. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v. 17, p. 1155 – 1163, 1981.

BROCK, N., STEKAR, J., POHL, J., NIEMEYER, U., SCHEFFLER, G. Acrolein, the causative factor of urotoxic side-effects of cyclophosphamide, ifosfamide, trofosfamide and sufosfamide. **Arzneimittelforschung**, v. 29, p. 659-661, 1979.

BRYANT, B.M., HARMAN, M. & FORD, H.T. Prevention of isophosphamide induced urothelial toxicity with 2- mercaptoethanosulphonate (mesna) in patients with advanced carcinoma. **Lancet**, v. 2, p. 657 –659,1980.

BUERGI, H. Mucolytic action of mesna. **Anaesthetist**, v. 23, p. 394 –397, 1974.

BUKOWSKI R.M. Amifostine (Ethyol): dosing, administration and patient management guidelines. **Eur. J. Cancer**, 32 A(Suppl 4):46, 1996.

BURCH, R. M., HALUSHKA, P. V. Vasopressin stimulates prostaglandin and tromboxane synthesis in toad bladder epithelial cells. **Amer. J. Physiol.**, v. 243, p. F593, 1982.

BURK, C. D., RESTINAO, I., KAPLAN, B. S., MEADOWS, A. T. Ifosfamide induced renal tubular dysfunction and rickets in children with Wilms tumor. **J. Pediatr.**, v.117, p. 331-335, 1990.

BURKE, D. A ., STODDART, J. C., WARD, M. K., SIMPSON, C. G. B. Fatal pulmonary fibrosis occurring during treatment with cyclophosphamide. **Br. Med. J.**, v. 285, p. 686, 1982.

CALABRESI, P., CHABNER, B. A. Antineoplastic agents. In: GILMAN, A. G., et al. (Ed) **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 8th ed. New York: Pergason Press, 1990. Chapt. 52, p. 1209-1263, 1990.

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

CALDWELL, J. C., WOODRUFF, R., MORELLO-FROSCH, R., AXELRAD, D. A ., Application of health information to hazardous air pollutants modeled in EPA's cumulative exposure project. **Toxicol. Ind. Health**, v. 14, p. 429-454, 1998.

CALINGASAN, N. Y., UCHIDA, K., GIBSON, G. E. Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. **J. Neurochem.**, v. 72, p. 751-756, 1999.

CAPIZZI R. L.& OSTER W. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine: clinical experiences. **Eur. J. Cancer**, 31 A (Suppl 1):8, 1995.

CAPIZZI R.L. The preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapies by amifostine (Ethyol). **Eur. J. Cancer**, 32 A(Suppl 4):5, 1996.

CHAVIANO, A . H., GILL, W. B., RUGGIERO, K.J. et al. Experimental Cytoxan cystitis and prevention by acetilcisteine. **J. Urol. V.** 134(3), p. 598-600, 1985.

CLANCY, R.M., LEVARTOVSKY, D., LESZCZYNSKA-PIZIAK, J., YEGUDIN, J., ABRAMSON, S. B. Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitroglutathione as a bioactive intermediary. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p. 3680-3684, 1994.

- CLARCK, A. G., DEBNAM, P. Inhibition of glutathione S-transferases from rat liver by S-nitroso-L-glutathione. **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, p. 3199-3201, 1988.
- COGGINS, P. R., RAVDIN, R. G., EISMAN, S. H. Clinical pharmacology and preliminary evaluation of cytoxan (cyclophosphamide). **Cancer Chemother. Rep.**, v. 3, p. 9, 1959.
- CONNORS, T. A. Protection against the toxicity of alkylating agents by thiols: the mechanism of protection and its relevance to cancer chemotherapy. A review. **Eur. J. Cancer**, v. 2, p. 293, 1966.
- CONNORS, T. A., COX, P. J., FARMER, F. B., FOSTER, A. B., JARMAN, M. Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 23, p. 115-129, 1974.
- COOPER, A. J. D., WHITE, D. A., MATTHAY, R. A. Drug-induced pulmonary disease. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 133, p. 321-340, 1986.
- 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., ALFORD, D. A., COHEN, M. H. Clinical pharmacology of isophosphamide. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 16, p. 77-86, 1974.
- CROW, S. E., THEILER, G. H., MADEWELL, B. R., WELLER, R. E., HONNESS, A. M. Cyclophosphamide-induced cystitis in the dog and cat. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 171, p. 259, 1977.

DE FRONZO, R. A ., BRAINE, H., COLVIN, O. M., DAVIS, P. J. Water intoxication in man after cyclophosphamide therapy: time course and relation to drug activation. **Ann. Intern. Med.**, v. 78, p. 861,1973.

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.

DELEVE, L. M., KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacol. Ther.**, v. 52, p. 287-305, 1991.

DEVRIES, C. R., FREIHA, F. S. Hemorrhagic cystitis: A review. **J. Urol.**, v. 143, p. 1-9, 1990.

DORR R.T., LAGEL K.E. Antracycline cardioprotection by amifostine (WR-2721) and its active metabolite (WR-1065) in vitro (abstract). **Proc. Amer. Soc. Clin. Oncol.**, v.13, p. 435, 1994.

DOUAY L., HU C., GIARRATANA M.C. et al., Amifostine improves the antileukemic therapeutic index of ifosfamide: implications for bone marrow purging. **Blood**, v. 86, p. 2849-2855, 1995.

DOUAY L., HU C., GIARRATANA M.C., GORIN N.C. Amifostine (WR-2721) protects normal haematopoietic stem cells against cyclophosphamide derivatives' toxicity without compromising their antileukaemic effects. **Eur. J. Cancer**, 31 A (Suppl 1):14, 1995.

DRAEGER, M. J., PETER, G., HOHORST, H. J. Deactivation of cyclophosphamide (NSC-26271) metabolites by sulphhydryl compounds. **Cancer Treat. Rep.**, v. 60, p. 355-359, 1976.

DROLLER, M. J., SARAL, R., SANTOS, G. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Urology**, v. 20, p. 256, 1982.

DUCKETT Jr., J. W., PETERS, P. C., DONALDSON, M. W., Severe cyclophosphamide hemorrhagic cystitis controlled with phenol. **J. Pediatr. Surg.**, v. 8, p. 55, 1973.

DURAN, M., AARSEN, G., FOKKENS, R.H., NIBERING, N.M.M., CATS, B.P., DE BREE, P.K. & WADMAN, S.K. 2-Mercaptoethanosulphonate – cysteine disulphide excretion following the administration of 2 – mercaptoethanosulphonate – a pitfall in the diagnosis of sulphate oxidase deficiency. **J. Clin. Chim. Acta**, v. 111, p. 47 –53, 1981.

EFROS, M, AHMED, T., CHOUDHURY, M. Cyclophosphamide induced hemorrhagic pyelitis and ureteritis associated with cystitis in marrow transplantation, **J. Urol.**, v.144, p. 1231-1232, 1990.

EISERICH, J. P., VAN DER VLIET, A ., HANDELMAN, G. J., HALLIWELL, B., CROSS, C. E. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 62, p. 1490S-1500S, 1995.

ELIAS, A. D., EDER, J. P., SHEA, T., BEGG, C. B., FREI 3rd , E., ANTMAN, K. H. High dose ifosfamide with Mesna uroprotection: a phase I study. **J. Clin. Oncol.**, v. 8, p. 170-179, 1990.

FAIR, W. R. Formalin in the treatment of massive bladder hemorrhage. Techniques, results and complications. **Urology**, v. 3, p. 573, 1974.

FERREIRA, S. H., DUARTE, I. D., LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 201, p. 101, 1991.

FINKELSTEIN, E. I., NARDINI, M., VANDER VLIET, A., Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco-related lung disease? **Am. J. Physiol. Lung Cell, Mol. Physiol.**, v. 281, p. L732-L739, 2001.

FISCHER, D. S. Alkylating agents. In: FISHER, D. S., MARSH, J. C. (Eds.) **Cancer therapy**. Boston: GK Hall Medical, 1982.

FORTES, Z. B., OLIVEIRA, M. A., SCIVOLETTO, R. et al. Nitric oxide release may be involved in microvasculatory response to acetylcholine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 182, p. 143, 1990.

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

FRAISER, L., KEHRER, J. P. Murine strain differences in metabolism and bladder toxicity of cyclophosphamide. **Toxicology**, v. 75, p. 257, 1992.

FUKUSHIMA, M. D., ARAI, M., COHEN, S. M., JACOBS, J. B., FRIEDEL, G. H. Scanning electron microscopy of cyclophosphamide-induced hyperplasia of the rat urinary bladder. **Lab. Invest.** v. 44, p. 89, 1981.

GASTON, B., REILLY, J., DRAZEN, J. M. FACKLER, J., RAMDEV, P., ARNELLE, D., MULLINS, M. E., SUGARBAKER, D. J., CHEE, C., SINGEL, D. J. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 10957-10961, 1993.

GERSHWIN, M. E., GOETZL, E. J., STEINBERG, A. D. Cyclophosphamide: use in practice. **Ann. Intern. Med.**, v. 80, p. 531-540, 1974.

GOBERT, J., RISACK, L. & CLOSE, J. Etudes biochimiques, metaboliques et pharmacologiques dun mucolttique: le Mistabron. **Acta Anaesth. Belg.**, v. 22, p. 85 –114, 1971.

GOEL, A. K., RAO, M. S., BHAGWAT, A. G., VAIDYANATHAN, S., GOSWAMI, A. K., SEM, T. K. Intrvesical irrigation with alum for the control of massive bladder hemorrhage. **J. Urol.**, v. 133, p. 956, 1985.

GOLIN, A. L., BENSON, R. C. Cyclophosphamide hemorrhagic cystitis requiring urinary diversion. **J. Urol.**, v. 118, p. 110, 1977.

GOMES, M. V. A. Estudo dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, 1995.

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

GOMES, T.N.A., 1995 - Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida e Ifosfamida – Envolvimento de Citocinas e óxido nítrico na patogênese da lesão induzida por Ciclofosfamida. Fortaleza, 1995. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará.

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

GOREN, M. P., PRATT, C. B., VIAR, M. J. Tubular nephrotoxicity during long-term ifosfamide and mesna therapy. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 25, p. 70-72, 1989.

GRAY, K.J., ENGELMANN, U.H., JONHSON, E.H., FISHMAN, I.J. Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (Cytosan) therapy. *J. Urol.*, v. 133, p. 497, 1986

GRDINA D.J. Molecular mechanism in cytoprotection and chemoprevention with Ethiol (amifostine), **Schering-Plough Pharmaceuticals**, 1997.

GRDINA D.J., SHIGEMATSU N., DALE P., NEWTON G.L., AGUILERA J. A FAHEY R.C. Thiol and disulfite metabolites of radiation protector and potential chemopreventive agent WR 2721 are linked to both its anti-cytotoxic and anti-mutagenic mechanisms action. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 767, 1995.

GREEN D., WRIGHT A, SCHEIN P.S., CLARKE R. WR-2721 chemoprotection of doxorubicin toxicity in mice. **Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.**, v.33, p. 490, 1992.

GREEN, G. M. Mechanisms of tobacco smoke toxicity on pulmonary macrophage cells. **Eur. J. Resp. Dis. Suppl.**, v. 139, p. 82-85, 1985.

GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 922-935, 1999.

GRIGGS J. J. Reducing the toxicity of anticancer therapy: new strategies. **Leukemia Res.**, v. 1001, p. S27 – S33, 1998.

GRINBERG-FUNES, D. J., SHELDON, C., WEISS, M. The use of prostaglandin F₂ alpha for the prophylaxis of cyclophosphamide induced cystitis in rats. **J. Urol.**, v. 144, p. 1500-1504, 1990.

GWEON, P., SHANBERG, A. Treatment of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis with neodymium: YAG laser in pediatric patients. **J. Urol.**, v. 157, p. 2301-2302, 1997.

HABS, M. R. & SCHMÄHL, D. Prevention of urinary bladder tumors in cyclophosphamide treated rats by addition medication with the uroprotectors sodium 2 - mercaptoethanesulphonate (mesna) and disodium- 2,2'- dithio-bis-ethanesulphonate(dimesna). **Cancer**, v. 51, p. 606 –609, 1983.

HAN, J., STAMLER, J. S., LI, H., GRIFFITH, O. W. Inhibition of γ -glutamylcysteine synthetase by S-nitrosylation. In: **Biology of Nitric oxide**, Stamler, J.S., Gross, S., Moncada, S., Higgs, A. (eds), p. 114, Portland Press: London, 1995.

HASELBERGER, M. B., SCHWINGHAMMER, T. L. Efficacy of mesna for the prevention of hemorrhagic cystitis after high-dose cyclophosphamide therapy. **Ann. Pharmacother.**, v. 29, p. 919-921, 1995.

HASKELL, M. H. Drugs used in cancer chemotherapy. In: M. HASKELL, M. (Ed.) **Cancer treatment**. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. Chapt.5, p. 44-51.

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

HIRAYAMA, A., NORONHA-DUTRA, A. A., GORDGE, M. P., NEILD, G. H., HOTHERSALL, J. S. S-nitrosothiols are stored by platelets and released during platelet-neutrophil interactions. **Nitric Oxide**, v. 3, p. 95-104, 1999.

HOEFER-JANKER, W., SCHEEF, W., GÜNTHER, U., HÜL, W., VAHLENSIECK, W. & BRÜHL, P. Erfahrungen mit der fraktionierten Ifosfamid-stosstherapie bei generalisierten malignen Tumoren. **Med. Welt.**, v. 26, p. 9972-9979, 1975.

HOPKINS, H. A., BETSILL, W. L., HOBSON, A. S., LOONEY, W. B. Cyclophosphamide-induced cardiomyopathy in the rat. **Cancer Treat. Rep.**, v. 66, p. 1521-1527, 1982.

HUNTER, H., HARRISON, E. The anti-cancer spectrum of ifosfamide. **Semin. Oncol.**, v. 9, p. 96-100, 1982.

IGNARRO, L. J., BYRNS, R. E., WOODS, K. S. Endothelium-dependent modulation of cGMP levels and intrinsic smooth muscles tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein. **Circ. Res.**, v. 60, p. 82-92, 1987.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Acrolein IARC **Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.**, v. 63, p. 337-372 , 1995.

JAKAB, G. J. Adverse effect of a cigarette smoke component, acrolein, on pulmonary antibacterial defenses and on viral-bacterial interactions in the lung. **Am. Ver. Resp. Dis.**, v. 115, p. 33-38, 1977.

JERKINS, G. R., NOE, H. N., HILL, D. E. Na unusual complication of silver nitrate treatment of hemorrhagic cystitis: case report. **J. Urol.**, 1936, p. 456-458, 1986.

JONES, M., MURRELL, R.D. & SHAW, I.C. Excretion of sodium 2-mercaptoethanosulphonate (mesna) in the urine of volunteers. **Eur. J. Clin. Oncol.**, v. 21, p. 553 – 555,1985.

JONHSON, W. W., MEADOWS, D. C. Urinary-blaaer fibrosis and telangiectasis associate with long-term cyclophosphamide therapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 84, p. 290, 1971.

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 na ifosfamide-containing chemotherapy regiment: sustained efficiency and simplified administration. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 121, p. 128-131, 1995.

KEHRER, J. P., BISWAL, S. S. The molecular effects of acrolein. **Toxicol. Sci.**, v. 57, p. 6-15, 2000.

KEMP G., ROSE P., LURAIN J., BERMAN M., MANETTA A , ROULLET B., HOMESLEY H., BEMPOMME D., GLICK J. Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control (sic) trial in patients with advanced ovarian cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 14, p. 2101, 1996.

KOLB, N. S., HUNSAKER, L. A ., JAGT, D. L. V. Aldose reductase-catalysed reduction of acrolein: implications in cyclophosphamide toxicity. **Mol. Pharmacol.**, v. 45, p. 797-801, 1994.

KOSS, L. G. Light and electron microscopic study of the effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs in the rat. **Lab. Invest.**, v. 16, p. 44, 1967.

KOSTKA, P., XU, B., SKILES, E. H. Degradation of S-nitrosocysteine in vascular tissue homogenates: role of divalent ions. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 33, p. 665-670, 1999.

KUMAR, A., AGGARWALL, S. The sonographic appearance of cyclophosphamide-induced acute hemorrhagic cystitis. **Clin. Radiol.**, v. 41(4), p. 289-290, 1990.

KUROWSKI, V., CERNY, T., KÜPFER, A . et al. Metabolism and pharmacokinetics of oral and intravenous ifosfamide. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 117, p. 148, 1991.

LANDER, H. M., SCHJPAL, P., LEVINE, D. M., NOVOGRODSKY, A. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds **J. Immunol.**, v. 150, p. 1509-1516, 1993.

LANNAN, S., DONALDSON, K., BROWN, D., Mc NEE, W. Effects of cigarette smoke and its condensates on alveolar epithelial cell injury in vitro. **Am. J. Physiol.**, v. 226, L92-L100, 1994.

LAPIDES, J. Treatment of delayed intractable hemorrhagic cystitis following radiation or chemotherapy. **J. Urol.**, v. 104, p. 707,1970.

LEIKAUL, G. D. Mechanisms of aldehyde-induced bronchial reactivity: role of airway epithelium. **Res. Rep. (Health Effects Institute)**, 49, p. 1-35, 1992.

LEVINE, L. A, RICHIE, J. P. Urological complications of cyclophosphamide. **J. Urol.**, v. 41, p. 1063-1069, 1989.

LEVY. L., HARRIS, R. Effect of N-acetylcistein on some aspects of cyclphosphamide-induced toxicity and immunosuppression. **Biochem. Pharmacol.**, v. 26, p. 1015, 1977.

LI, L., HAMILTON, R. F. Jr., HOLIAN, A . Effect of acrolein on human alveolar macrophage NF- κ B activity. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. L550- L557, 1999.

LI, L., HAMILTON, R. F. Jr., TAYLOR, D. E., HOLIAN, A. Acrolein-induced cell death in human alveolar macrophages. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 145, p. 331-339, 1997.

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

LIND, M. J., MCGOWN, A . T., HADFIELD, J. A ., THATCHER, N., CROWTHER, D., FOX, B. W. The effect of ifosfamide and its metabolites on intracellular

glutathione levels in vitro and in vivo. **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, p. 1835-1840, 1989.

LIND, M. J., ROBERTS, H. L. Thatcher N and Idle JR: The effect of route of administration and fractionation of dose on the metabolism of ifosfamide. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 26, p. 105-111, 1990.

LINKS M., LEWIS, C. Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacological and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 57, p. 293-308, 1999.

LITTLEFIELD L.G., JOINER E.E., COLYER S.P., SALLAN F., FROME E.L. Concentration-dependent protection against X-ray-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by the aminothiols WR 1065. **Radiat. Res.**, v. 133, p. 88, 1993.

LIU, Y. K., HARTY, J. I., STEINBOCK, G. S., HOLT Jr., H. A., GOLDSTEIN, D. H., AMIN, M. Treatment of radiation or cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis using conjugated estrogen. **J. Urol.**, v, 144, p. 41-43, 1990.

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

LOW, J. E., BORCH, R. F., SLADEK, N. E. Further studies on the conversion of 4-hydroxyoxazaphosphorines to reactive mustards and acrolein in inorganic buffers. **Cancer Res.**, v. 43, p. 5815-5820, 1983.

LULLING, J., DUBOIS, G. Etude contrôlée d'un mucolytique associé à la Kinesithérapie dans les bronchopneumopathies obstructives. **Acta Tuberc.Pneumol.Belg.**, v. 64, p. 74 –79, 1973.

LUPERCHIO, S., TAMIR, S., TANNENBAUM, S. R. NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 21, p. 513-519, 1996.

MANNA, S. K., KUO, M. T., AGGARWAL, B.B. Overexpression of γ -glutamylcystein synthetase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor κ B and activator protein 1. **Oncogene**, v. 18, p. 4371-4382, 1999.

MARSH, F. P., VINCE, F. P., POLLOCK, D. J., BLANDY, J. P. Cyclophosphamide necrosis of the bladder causing calcification, contracture and reflux: treated by colcystoplasty. **Br. J. Urol.**, v. 43, p. 324, 1971.

McCULLOCH W., SCHEFFLER B.J., SCHEIN P.S. New protective agents for bone marrow in cancer therapy. **Cancer Invest.**, v. 9, p.279, 1991.

MEISTER, A., ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu. Ver. Biochem.**, v. 52, p.711-760, 1983.

MILLS, B. A ., ROBERTS, R. W. Cyclophosphamide-induced cardiomyopathy: a report of two cases and review of the English literature. **Cancer**, v. 43, p. 2223-2226, 1979.

- MIO, T., ROMBERGER, D. J., THOMPSON, A. B., ROBBINS, R. A., HEIRE, R. A.,
RENNARD, S. I. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human
bronchial epithelial cell. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.**, v. 155, p. 1770-
1776, 1997.
- MOHIUDDIN, J., PRENTICE, H. G., SCHEY, S., BLACKLOK, H.DANDONA, P.
Treatment of cyclophosphamide-induced cystitis with prostaglandin E₂. **Ann.
Intern. Med.**, v. 101, p. 142, 1984.
- MOHR, S., ZECH, B., LAPETINA, E. G., BRUNE, B. Inhibition of caspases-3 by S-
nitrosation and oxidation caused by nitric oxide. **Biochem. Biophys. Res.
Commun.**, v. 238, p. 387-391, 1997.
- MONCADA, S. The L-arginine: nitric oxide pathway. **Acta Physiol. Scand.**, v. 145,
p. 201, 1992.
- MONCRIEFF, M., FOOT, A . Fanconi syndrome after ifosfamide. **Cancer
Chemother. Pharmacol.**, v. 23, p. 121, 1989.
- MONTVALE, N. J. (1993) apud SAFRON, J., RICE, D., GORDON, D., LEAF, C.,
WHITE, R. Protective effect of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate treatment on
cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **J. Urol.**, v. 157, p. 1946-1950,
1997.
- MORAIS, M. M., BELARMINO-FILHO, J. N., BRITO, G. A. C., RIBEIRO, R. A.
Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced
hemorrhagic cystitis – comparison of the effects of dexamethazone and
Mesna. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 1211-1215, 1999.

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

NARDINI et al., 2002 – Nardini, M. , Finkelstein, E.I., Reddy, S., Valcchi, G., Traber, M., Cross, C.E., van der Vliet, A. Acrolein-induced cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cell. Modulation by alpha-tocopherol and ascorbic acid. **Toxicol.**, v. 170, p. 173-185 , 2002.

NGUYEN, H., FINKELSTEIN, E., REZNICK, A ., CROSS, C., VAN DER VLIET, A. Cigarette smoke impairs neutrophil respiratory burst activation by aldehyde-induced thiol modification. **Toxicology**, v. 160, p. 207-217, 2001.

NOE, H. N., McSWAIN, H. M. Management of severe reflux in th patient with cyclophosphamide cystitis. **J. Urol.**, v. 130, p. 769, 1983.

O'CONNELL, T. X., BARENBAUM, M. C. Cardiac and pulmonary effects of high doses of cyclophosphamide and isophosphamide. **Cancer Res.**, v. 34, p. 1586-1591, 1974.

ORMSTAD, K. & UEHARA, N. Renal transport and disposition of Na₂-mercaptoethanosulphonate disulphide (dimesna) in the rat. **FEBS Lett.**, v. 150, p. 354-358, 1982.

ORMSTAD, K., ORHENIUS, S., LASTBON, T., UEHARA, N., POHL, J. & BROCK, N. Pharmacokinetics and metabolism of sodium 2-mercaptoethanosulphonate in the rat. **Cancer Res.**, v. 43, p. 333 –338, 1983.

PAINE G.D., TAYLOR C.W., LOPEZ M.H., JONHSON C.S., CAPIZZI R.L. Effects of amifostine and paclitaxel on growth of human ovarian carcinoma

xenografts in the severe combined immune-deficient mouse: preliminary results. **Semin. Oncol.**, 23(Suppl 8):35, 1996.

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

PATEL, J. M. Stimulation of cyclophosphamide-induced pulmonary microsomal
lipid peroxidation by oxygen. **Toxicology**, v. 45, p. 79.91, 1987.

PERSON, M. G., GUSTAFSSON, L. E., WIKLUND, N. P. et al. Endogenous nitric
oxide as a modulator of rabbit skeletal muscle microcirculation in vivo. **Braz.
J. Pharmacol.**, v. 100, p. 463, 1990.

PHILIIPS, F.S., STERNBERG, S.S., CRONIN, A. P. and VIDAL ,P.M. :
Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. **Cancer Res.**,v. 21, p. 1557,
1961.

POCERNICH, C. B., CARDIN, A. L., RACINE, C. L., LAUDERBACK, C. M.,
BUTTERFIELD, D. A. Glutathione elevation and its protective role in
acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to
brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease. **Neurochem. Inter.**, v.
39, p. 141-149, 2001.

POKORNY, J. & KLYNCL, V. Intensive therapy of status asthmaticus in children.
Intensive Care Med., v. 3, p. : 315, 1977.

POLH, J., STEKAR, J. & HILGARD, P. Chlororoacetaldehyde and its contribution to urotoxicity during treatment with cyclophosphamide or ifosfamide-na experimental study. **Arzneimittel Farsching**, v. 39(6), p. 704-705, 1989.

PRIMACK, A. Amelioration of cyclophosphamide-induced cystitis. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 47, p. 223,1971.

RAHMAN, I., MAcNEE, W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 28, p. 1405 – 1420, 2000.

RAMU, K., FRAISER, L. H., MAMIYA, B., AHMED, T. KEHRER, J. P. Acrolein mercapturates: synthesis, characterization and assessment of their role in the bladder toxicity of cyclophosphamide. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 8, p. 515-524, 1995.

RENERT, W. A ., BERDON, W. E., BAKER, D. H. Hemorrhagic cystitis and vesicoureteral reflux secondary to cytotoxic therapy for childhood malignancies. **Amer. J. Roentgenol.**, v. 117, p. 664, 1973.

REYNOLDS, R. D., SIMMERVILLE, J. J., O'HARA, D. D., HART, J. B., PARKINSON, J. E. Hemorrhagic cystitis due to cyclophosphamide. **J. Urol.**, v. 101, p. 45, 1969.

RIBEIRO, R. A., FREITAS, H. C., CAMPOS, M. C., SANTOS, C.C., FIGUEIREDO, F. C., BRITO, G. A. C., CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor α and Interleukin – 1 β 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., SOUZA-FILHO, M. V. P., SANTOS, C. C., LIMA, M. V. A., LIMA, M. M. P., BALLEJO, G., CUNHA, F. Q. Involvement of nitric oxide and TNF α in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced cystitis. In: INTERNATIONAL CANCER CONGRESS, 17., Italy, 1998. **Proceedings**, p. 227-231.

RODIN, A . E., HAGGARD, M. E., TRAVIS, L. B. Lung changes and chemotherapeutic agents in childhood. **Am. J. Dis. Child.**, v.120, p. 337-340, 1970.

RUBIN, J. S. & RUBIN, R. T. Cyclophosphamide hemorrhagic cystitis. **J. Urol.**, v. 96, p. 313, 1966.

SAFRON, J., RICE, D., GORDON, D., LEAF, C., WHITE, R. Protective effect of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate treatment on cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **J. Urol.**, v. 157, p. 1946-1950, 1997.

SAKATA, T., SMITH, R. A., GARLAND, E. M., COHEN, S. M. Rat urinary bladder epithelial lesions induced by acrolein. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v. 9, p. 159-169, 1989.

SANTOS-SILVA, M. C. Efeito citotóxico do óxido nítrico e do Taxol sobre células linfoblásticas leucêmicas: Envolvimento do Fator de transcrição NF- κ B e papel da Glutathione. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

SAROSY, G. Ifosfamide – Pharmacologic overview. **Semin. Oncol.**, v. 16, p. 2-8, 1989.

SCHEEF, W. & SOEMER, G. Treatment of solid tumors with Holoxan and Uromitexan. Joint Symposium Study Group for Oncology of the German Cancer Society and Asta-Werke AG, Düsseldorf 29 February, p. 21-25, 1980.

SCHEEF, W. P. Problems, experience and results of clinical investigations with ifosfamide. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF CHEMOTHERAPY,7., Prague,1971. **Proceedings.**

SCHEULEN, ME, NIEDERLE, N., BREMER, K., SCHUTE, J., SEEBER, S. Efficacy of ifosfamide in refractory malignant disease and uroprotection by Mesna: results of a clinical phase II study with 151 patients. **Cancer Treat. Rev.**, v.10, p. 93-101, 1983.

SCHMÄHL, D. & HABS, M. Carcinogenic action of low dose cyclophosphamide given orally to Sprague – Dawley rats in a lifetime experiment. **Int. J. Cancer**, v. 23, p. 706 –712,1979.

SCHUCHTER L.M. Guidelines for the administration of amifostine. **Semin. Oncol.**, 23(Suppl 8):40, 1996.

SENCER, S. F., HAAKE, R. J., WEISDORF, D. J. Hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation. **Transplantation**, v. 56, p. 875-879, 1993.

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

SHAW L.M., BONNER H.S., BROWN D.Q. Metabolic pathway of WR-2721 (ethyol-amifostine) in the BALB/c mouse. **Drug Metab. Dispos.**, v. 22, p. 895-902, 1994.

SHAW L.M., TURRISI A.T., GLOVER D.J., BONNER H.S. et al. Human pharmacokinetics of WR 2721. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.12, p. 1501-1504, 1986.

SHAW L.W., GLOVER D.J., TURRISI A. et al. Pharmacokinetics of WR-2127. **Pharmacol. Ther.**, v. 39, p. 195-201, 1988.

SHAW, I. C., GRAHAM, M. I. & JONES, M. The fate of sodium [^{14}C]-mercaptoethanesulphonate in the rat. **Arzneim.-Forsch.**, v. 36, p. 487–489, 1986.

SHAW, I. C., GRAHAM, M. I., & McLEAN, A E. M. 2-Chloroacetaldehyde: a metabolite of cyclophosphamide in rat. **Cancer Treat. Rev.**, v. 10, p. 17-24, 1983.

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.

SHURAFI, M., SHUMAKER, E., CRONIN, S. Prostaglandin F_2 -alpha bladder irrigation for control of intractable cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **J. Urol.**, v. 137, p.1230, 1987.

SIDAU, B & SHAW, I. C. Detection of 2- mercaptoethanosulphonate (mesna) by hplc using post column reaction colorimetry and eletrochemical detection. **J. Chromatogr.**, v. 311, p. 234-238, 1984.

SKINER, R., SHARKEY, I. M., PEARSON A . D. J., CRAFT, A . W. Ifosfamide, mesna and nephrotoxicity in children. **J. Clin. Oncol.**, v. 11, p. 173-190, 1993.

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

SPRINGATE, J., ZAMLAUSKI-TUCKER, M. J. LU, H. &CHAN, K. K. Renal clearance of ifosfamide. **Drug Metab. Dis.**, v. 29(9), p. 1081-1082, 1987.

SRIVASTAVA A, NAIR, S.C., SRIVASTAVA. V.M., BALAMURUGAN,A.N., JEYSEELAN,I.,CHANDY M.,GUNASEKARAN S. Evaluation of uroprotective efficacy of amifostine against cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis. **Bone Marrow Transplant**, v.23, p.463-467, 1999.

STEEN, S.N., ZIMENT, I., FREEMAN, D. & THOMAS, J.S. Evaluation of a new mucolytic drug. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 16, p. 58 –62 ,1974.

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

SUSAN, L. P., MARSH, R. J. Phenolization of bladder in treatment of massive intractable hematuria. **Urology**. V. 5, p. 119, 1975.

SUZUKI, D., MIYATA, T. Carbonyl stress in the pathogenesis of diabetic nephropaty. **Intern. Med.**, v. 38, p. 309-314, 1999.

SWEENEY T.R. A survey of compounds from the antiradiation drug development program of the US Army Medical Research and Development Command. Washington, DC. **Walter Reed Army Institute of Research**, 1979.

SWYNNERTON N.F., HUELE B.K., MANGOLD D.J. A method for the combined measurement of ethiofos and WR 1065 in plasma: application to pharmacokinetic experiments with ethiofos and its metabolites. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 12, p. 1495-1499, 1986.

SWYNNERTON N.F., MANGOLD D.J., LUDDEN T.M. Measurement of ethiofos (WR 2721) in plasma: preliminary pharmacokinetics in th beagle. **J. Liq. Chromatog.**, v. 8, p. 2675-2687, 1985.

TAVARES-MURTA, B. M., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. Fator de necrose tumoral e interleucina 8 inibem o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório via liberação de óxido nítrico. Livro de resumos da **IX Reunião Anual da FESBE**, p. LXVII, 1994.

THEMANN, H., OBERDORF, E., BROCK, N. & POHL, J. Electron microscopic investigations of cyclophosphamide-induced lesions of the urinary bladdere of the rat and their prevention by mesna. **Urol. Internat.**, v. 42, p. 37, 1987.

TOLEDO, T. M., HARPER, R. C., MOSSER, R. H. Fetal effects during cyclophosphamide and irradiation therapy. **Ann. Intern. Med.**, v. 74, p. 87-91, 1971.

TOLLEY, D. A. The effect of N-acetyl cysteine on cyclophosphamide cystitis. **Br. Urol.**, v. 49, p. 659, 1977.

TRESKES M.M BOVEN E. van dr LOOSDRECHT AA et al. Effects of the modulating agent WR-2721 on mielotoxicity and antitumor activity in carboplatin-treated mice. **Eur. J. Cancer**, v.30, p. 183-187, 1994.

TSIKAS, D., SANDMANN, J., ROSSA, S., GUTZKI, F. M., FROLICH, J. C. Investigations of S-transnitrosylation reactions between low-and high-molecular weight S-nitroso compounds and their thiols by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Anal. Biochem.**, v. 270, p. 231-241, 1999.

TURRISI AT, GLOVER D.J., HURWITZ S., GLICK J., NORFLEET A.L., WEILER C., YUHAS J.M., KLIGERMAN M.M. Final report of the phase I trial of single dose WR-2721 (s-2 (3aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid). **Cancer Treat. Rep.**, v.70, p.1389, 1986.

UCHIDA, K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 9, p. 109-113, 1998 a.

UCHIDA, K., KANEMATSU, M., SAKAI, K., MATSUDAN, T., HATTORI, N., MIZUNO, Y., SUZUKI, D., NOGLUCHI MIYATA, T., NOGUCHI, N., NIKI, E., OSWA, T. Protein-bound acrolein: potencial markers for oxidative stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 4882-4887, 1998b.

UCHIDA, K., SHIRAISHI, M., NAITO, Y., TORII, Y., NAKAMURA, Y., OSAWA, T.
Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 2234-2242, 1999 b.

ULICH, T. R., WHITCOMB, L., TANG, W., TRESSEL, P. O., TARPLEY, J., YI, E. S., LACEY, D. Keratinocyte growth factor ameliorates cyclophosphamide-induced ulcerative hemorrhagic cystitis. **Cancer Res.**, v. 57, p. 472-475, 1997.

UMA DEVI P., and PRASANA, P.G.S. Radioprotective effect of combinations of WR-2721 and mercaptopropionylglycine on mouse bone marrow chromossomes. **Radiat. Res.**, v. 124, p. 165-170, 1990.

UMA DEVI, P., NAGARATHNAM, A , and SATISH RAO, B. S. Chemical modifiers of radiosensitivity. In: **Introduction to Radiation Biology** (Uma Devi,P., Nagarathnam, A , and Satish Rao, B.S., Eds), p. 131-150. Churchill Livingstone, New Delhi, India, 2000.

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

WAGNER, T. Ifosfamide clinical pharmacokinetics. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 26, p. 439-456, 1994.

WAGNER, T., HEYDRICH, D., JORK, T.,VOELKER, G., HOHORST, H. J. Comparative study on human pharmacokinetics of activated ifosfamide and

cyclophosphamide by a modified fluorometric test. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 100, p. 95 1981.

WALKER, M. W., KINKER, M. T., ROBERTS, R. T., SPITZ, D. R. Nitric oxide-induced cytotoxicity: involvement of cellular resistance to oxidative stress and the role glutathione in protection. **Pediatr. Res.**, v. 37, p. 41-49, 1994.

WALTHER, M. M. Cystitis. In: DE VITA, V. T., HELLMAN, S., ROSENBERG, S. A. (Eds). **Cancer. Principles and practice of oncology**. Philadelphia: JB Lippincott, 2358-2362, 1993.

WANG, W., BALLATORI, N. Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. **Pharmacol. Rev.**, 50: (3) 1998.

WATSON, N.A. and NOTLEY, R.G.: Urologic complication of cyclophosphamide. **Br. J. Urol.**, v.45, p. 609, 1973.

WEST, N.J. Prevention and treatment of hemorrhagic cystitis. **Pharmacotherapy**, v. 17, p. 696-706, 1997.

WINK, D. A., NIMS, R. W., DARBYSHIRE, J. F., CHRISTODOULOU, HANBAUER, L., COX, G. M., LAVAL, F., LAVAL, J., COOK, J. A., KRISHNA, M. C., DEGRAFF, W. G., MITCHELL, J. B. Reaction Kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 7, p. 519-525, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental health criteria. In: Acrolein. Geneva: **World Health Organization** (publ. 127), 1991.

YANG J.L., FERNANDES D.J., SPEICHER L. CAPIZZI R.L. Biochemical determinants of the cytoprotective effect of amifostine (meeting abstract). **Proc. Ann. Meet Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 36, p. 1725, 1995.

YU, L. & WAXMAN, D. J. Role of cytochrome P450 in oxazaphosphorine metabolism. Deactivation via N-dechloroethylation and activation via 4-hydroxylation catalysed by distinct subsets of rat liver cytochromes P450. **Drug Metabol. Dis.**, v. 24(11), p. 1254-1262, 1996.

YUHAS J.M. Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by S-2(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid. **Cancer Res.**, v. 40, p. 1519, 1980.

YUHAS J.M. Differential protection of normal and malignant tissues against the cytotoxic effects of mechlorethamine. **Cancer Treat. Rep.**, v. 63, p. 971, 1979.

YUHAS J.M., CULO F. Selective inhibition of the nephrotoxicity of *cis*-dichlorodiammineplatinum (ii) by WR-2721 without altering its antitumor properties. **Cancer Treat. Rep.**, v. 64, p.57, 1980.

ZALUPSKI,M., BAKER, L. H., Ifosfamide. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 80, p. 556, 1988.

ZAMLAUSKI – TUCKER, M. J., MORRIS, M. E. & SPRINGATE, J. E. Ifosfamide metabolite chloroacetaldehyde causes Fanconi syndrome in the perfused rat kidney. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 129, p. 170, 1994.