

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

ESTUDO DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS
NA PATOGÊNESE DA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
CICLOFOSFAMIDA

MARCOS VENÍCIO ALVES LIMA

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do
Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará como
pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO

FORTALEZA

1994

FC-00002615-3

615
L 732e
1994

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FORTALEZA - CE
1994

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta, em maior ou menor proporção, contribuíram para execução deste projeto de pesquisa, notadamente para os relacionados a seguir:

- Ao meu orientador Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro pelos ensinamentos de mestre e a compreensão de amigo.
- Ao acadêmico de medicina Marcus Vinicius Ponte de Souza Filho, bolsista de iniciação a pesquisa, pela sua participação efetiva na realização deste trabalho.
- À Prof. Dra. Margarida Maria Lima Cordeiro pela inestimável contribuição prestada na realização das análises histopatológicas.
- Aos Professores Doutores Marcus Raimundo Vale e Manoel Odorico de Moraes por tão gentilmente terem cedido seus laboratórios para realização dos nossos experimentos.
- Ao técnico do Biotério Setorial, Haroldo , pela colaboração inestimável no trato dos animais de experimentação.
- À técnica do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Fátima, pelo apoio dispensado ao longo deste trabalho.

À minha esposa, Consuelo, e aos meus filhos, Lucas e Camila, pelos apoios e compreensões, sobretudo nos momentos em que a execução deste trabalho me fez ausente dos seus convívios.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido aracdônico
AD	Água destilada
AMPc	3,5-ciclomonofosfato de adenosina
BK	Bradicinina
C3a	Terceiro componente do complemento
C5a	Quinto componente do complemento
CAA	Cloroacetaldeído
CD	Marcador de difenciação celular
CIC	Cistite induzida por ciclofosfamida
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
ev	Endovenoso
FMLP	N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenil-alanina
g	Gramma
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
h	Horas
HE	Hematoxilina e eosina
HPETE	Ácido hidroxiperoxieicosatetranóico
ICAM	Moléculas de adesão intercelular
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8

ip	Intraperitoneal
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramal
l	Litro
L-NA	N-nitro-L-arginina
L-NAME	L-nitro arginina metil éter
L-NIO	N-iminoetil-L-ornitina
L-NMA	L-N-monometil arginina
LFA	Antígeno linfocitário de função
LPS	Lipopolissacarídeos bacterianos
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
MESNA	Sódio 2-mercaptoetanossulfonato
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
°C	Grau(s) centígrado(s)
PAF	Fator ativador de plaquetas
PG	Prostaglandina
PGD ₂	Prostagandina D ₂
PGE	Prostaglandina E
PGG ₂	Prostaglandina A ₂

PGI₂	Prostaciclina
PMN	Polimorfonucleares
R	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minutos
sc	Subcutâneo
SP	Substância P
SRS-A	Substância de reação lenta da anafilaxia
TNF	Fator de necrose tumoral
TXA₂	Tromboxano A₂
VCAM	Moléculas de adesão vasculares
VLA	“Very late antigen”
µg	Micrograma
µl	Microlitro
5-HT	Serotonina

RESUMO

Estudo dos Mediadores Inflamatórios Envolvidos na Patogênese da Cistite Hemorrágica Induzida por Ciclofosfamida
Dissertação de Mestrado em Farmacologia - UFC - 1994
Marcos Venício Alves Lima

Produziu-se cistite através da administração ip de ciclofosfamida, em ratos Wistar machos, nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg, os quais foram sacrificados 48 h depois, tiveram sua bexigas avaliadas quanto a diferença dos pesos úmido e dessecado.(Δ peso). Daí por diante, na dependência do protocolo experimental, passou-se a tratar os animais com CF na dose de 100mg/kg e realizar os saçrificios após 6, 12, 24, 48 ou 72 horas. Nesta etapas a aferição dos resultados foi realizada através do peso úmido, extravasamento vascular pela técnica do azul de Evans e microscopia ótica com a coloração da hematoxilina e eosina.

Observou-se que a CF, nas doses de 100 e 200 mg/kg, aumentou de maneira significativa o Δ peso, sem que houvesse diferença entre estas doses. Embora o aumento da permeabilidade tenha sido máximo após 12 horas, o aumento ponderal vesical e as alterações histopatológicas; tais como edema, ulcerações da mucosa e infiltrado de células inflamatórias, foram mais intensas passadas 48 h do estímulo nocivo (CF).

Os pré-tratamentos dos animais com dexametasona(inibidor da fosfolipase A₂), indometacina (inibidora da cicloxigenase) e NDGA (inibidor da ciclo e lipoxigenase) bloquearam o aumento patológico da permeabilidade vascular e do peso úmido vesical induzidos pela CF, sendo que o bloqueio da permeabilidade ocorreu de forma mais intensa e em menores doses que o determinado no peso.

Utilizando a cinética da cistite induzida por ciclofosfamida(CIC) observou-se que os pré-tratamentos com os compostos BN-52021 (inibidor do PAF) e HOE-140 (inibidor da bradicinina),propiciaram um bloqueio mais precoce da permeabilidade e posteriormente do aumento ponderal vesical, sendo aquele mais significativo que este último.

A depleção dos grânulos dos mastócitos, conseguida com o tratamento crônico com o composto 48/80, foi eficiente em reduzir significativamente a permeabilidade vascular patológica, embora não tenha produzido alterações consideráveis no peso vesical.

A utilização do L-NAME, bloqueador da NO sintetase, comprovou haver envolvimento do NO na patogênese da CIC, na medida em que a inibição determinada pelo L-NAME diminuiu significativamente a permeabilidade vascular e o peso vesical úmido (após 48 h) induzido pela CF, de uma maneira dose-dependente. Adicionalmente demonstrou-se que o efeito do L-NAME na permeabilidade vascular é revertido pela L-arginina, um precursor da síntese do NO, de modo dose -dependente, mas não o é pela D-arginina com semelhante posologia.

SUMMARY

**Studies of the Mediators Involved in the Pathogenesis of
Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis**
Master Degree in Pharmacology - UFC -1994
Marcos Venício Alves Lima

Cystitis were produced in Wistar male rats by ip administration of cyclophosphamide (CP) at doses of 50, 100 or 200 mg/kg. They were sacrificed 48 h later , their bladders were extirpated and evaluated for the differences in their wet and dry weights (Δ weight). Thereafter, depending on the experimental protocol, it was decided to treat the animals with a 100 mg/kg dose of CP and to kill them after 6, 12, 24, 48 or 72 hours. In these experiments, comparison of results was accomplished from the wet weights, vascular leakage as determined by Evans blue dye and light microscopy with Hematoxylin and Eosin stain.

It was observed that the CP, at doses of 100 and 200 mg/kg significantly increased the Δ weight, but show no differentiation at these doses. Although the increase in vascular permeability attained to the maximum after 12 hours, the increase in vesical weight and the histopathological alterations such as edema, mucosal ulcerations and inflammatory cell infiltration were more intense after 48 hours of CP administration.

The pretreatment of animals with dexamethasone (phospholipase A2 inhibitor), indomethacin (cyclooxygenase inhibitor) and NDGA (dual cyclo-lipoxygenase inhibitor) blocked the CP-induced pathologic increase in vascular permeability and the wet weight of bladder; the permeability being more intense and occurred at smaller doses.

From the kinetic study of CIC, it was observed that pretreatment of rats with compounds BN-52021 (PAF antagonist) and HOE-140 (bradykinin antagonist) produced much early blockade of vascular permeability and subsequently the increase in vesical weight, the former being more significant than the latter.

The mastocyte degranulation by chronic treatment of rats with compound 48/80, was efficient to reduce significantly the pathologic vascular permeability but produced no considerable alterations in the vesical weight. However, detectable reductions of edema and inflammatory cell exsudate was observed when specimens were examined under light microscopy.

The utilization of L-NAME, a inhibitor of NO synthetase revealed the involvement of NO in the pathogenesis of CIC as indicated by its ability to decrease significantly the CP-induced increase in vascular permeability and vesical wet weight(after 48 h). In addition, the inhibitory effect of L-NAME on vascular permeability was found to be reversed by L- arginine, the precursor of NO synthesis in a dose dependent manner but not by D-arginine at similar dosage.

ÍNDICE

	pág.
I - INTRODUÇÃO	001
1 - Ciclofosfamida.....	003
2 - Cistite Hemorrágica.....	006
2.1 - Quadro clínico e diagnóstico.....	008
2.2 - Tratamentos.....	009
2.3 - Modelo experimental.....	010
3 - O processo inflamatório.....	013
3.1 - Modificações no fluxo e permeabilidade vascular.....	013
3.2 - Adesividade e migração leucocitária.....	022
3.3 - Mediadores quimiotáticos.....	026
4 - Objetivos.....	029
II - MATERIAIS E MÉTODOS	031
1 - Animais experimentais.....	032
2 - Aparelhos e instrumentos laboratoriais.....	032
3 - Solução.....	033
4 - Corantes.....	034
5 - Drogas e dissoluções.....	034
6 - Indução de cistite hemorrágica.....	035
6.1 - Análise histopatológica.....	036
6.2 - Determinação do edema.....	037
6.3 - Determinação da permeabilidade vascular.....	038
6.4 - Curva padrão de azul de Evans.....	039
7 - Delineamentos experimentais.....	040

7.1 - Análise preliminar do modelo.....	040
7.2 - Efeito dos tratamentos com dexametasona, indometacina e NDGA no peso vesical (Δ peso) de ratos tratados com ciclofosfamida.....	041
7.3 - Efeito da ciclofosfamida no peso vesical úmido e permeabilidade vascular de bexigas de ratos tratados com ciclofosfamida.....	042
7.4 - Cinética do peso vesical úmido e da permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida.....	042
7.5 - Efeito de doses crescentes de dexametasona, indometacina e NDGA no peso úmido vesical e permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida.....	043
7.6 - Efeito do composto BN-52021 na cinética da cistite induzida por ciclofosfamida.....	044
7.7 - Efeito do composto HOE-140 na cinética da cistite induzida por ciclofosfamida.....	045
7.8 - Efeito da depleção de mastócitos na cinética da cistite induzida por ciclofosfamida.....	045
7.9 - Efeito do L-NAME no peso vesical e na permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida.....	047
7.10- Efeito do L-NAME na cinética da cistite induzida por ciclofosfamida.....	047
7.11- Efeito de doses crescentes de L-arginina na cistite induzida por ciclofosfamida em animais pré-tratados com L-NAME.....	048
7.12- Efeito da L-arginina e D-arginina na cistite induzida por ciclofosfamida em animais pré-tratados com L-NAME.....	048
7.13- Análise estatística.....	049

III-RESULTADOS.....	051
----------------------------	------------

1 - Análise preliminar do modelo.....	052
2 - Efeitos dos tratamentos com dexametasona, indometacina e NDGA no peso vesical de ratos tratados com ciclofosfamida.....	058
3 - Efeito da ciclofosfamida nas variações do peso vesical úmido e da permeabilidade vascular de bexigas de ratos.....	060
4 - Cinética do peso vesical úmido e da permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida.....	063
5 - Efeito de doses crescentes de dexametasona, indometacina e NDGA no peso vesical úmido e permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida	066
6 - Efeito do composto BN-52021 na cinética do peso vesical úmido e permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida.....	070
7 - Efeito do composto HOE-140 na cinética da cistite induzida por ciclofosfamida	070
8 - Efeito da depleção de mastócitos na cinética do peso e da permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida.....	075
9 - Efeito do L-NAME no peso vesical e na permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida.....	078
10 - Efeito do L-NAME na cinética do peso e da permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida.....	078
11-Efeito de doses crescentes de L-arginina no peso e permeabilidade vascular vesicais na cistite induzida por ciclofosfamida em animais pré-tratados com L-NAME.....	082
12-Efeito de L-arginina e D-arginina no peso e permeabilidade vascular vesicais na cistite induzida por ciclofosfamida em animais pré-tratados com L-NAME.....	082

IV - DISCUSSÃO.....086

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....104

I - INTRODUÇÃO

O relato mais antigo do estudo de um agente anti-neoplásico efetivo foi feito por Lissauer, e tratava-se do arsenito de potássio (solução de Fowler), datando do ano de 1875. Posteriormente, Coley demonstrou a atividade de produtos bacterianos em pacientes com câncer; porém, os efeitos eram irregulares, imprevisíveis e acompanhados de reações adversas (**Horton & Hill, 1977**).

A moderna era do tratamento sistêmico do câncer iniciou-se em 1940, quando Huggins demonstrou que a administração de estrógeno produzia melhora considerável em pacientes com câncer prostático (**Huggins & Hodges, 1941**). Entretanto, o primeiro agente quimioterápico citotóxico, a mustarda nitrogenada, só foi utilizada com finalidade terapêutica ao final da Segunda Guerra Mundial (**Phillips, 1950**).

O reconhecimento, em meados dos anos quarenta, de que a cirurgia e radioterapia deveriam estar próximas de seus limites de efetividade produziu um entusiasmo que foi fundamentado no incentivo a descoberta de novas drogas anti-neoplásicas.

A terapêutica sistêmica do câncer progrediu nos últimos anos de uma disciplina unicamente experimental para se incorporar definitivamente no arsenal clínico oncológico, produzindo benefícios indiscutíveis a uma parcela enorme dos pacientes portadores de neoplasias malignas, bem como, mais recentemente, daqueles portadores de imunopatias e transplantados.

1 - CICLOFOSFAMIDA

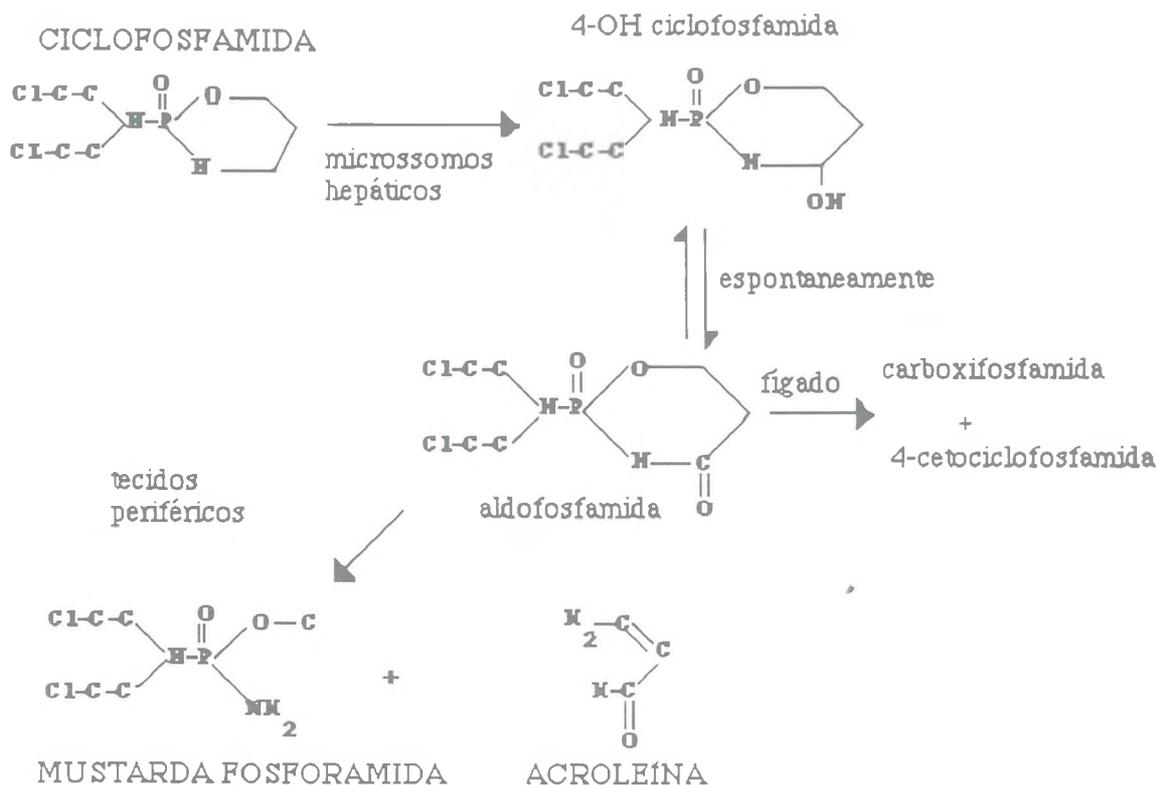
Agentes alquilantes são fármacos citotóxicos que têm a capacidade de estabelecer ligações covalentes com bases nitrogenadas do ácido desoxiribonucleico (DNA), através de grupos alquilas - radicais de hidrocarbonetos que se ligam a cadeias principais de compostos orgânicos - formando pontes entre as cadeias do DNA, interferindo na integridade funcional cromossomial, notadamente na interpretação da seqüência do DNA no pareamento das bases nitrogenadas na duplicação cromossômica.

Arnold e Bourseaux, em 1957, intencionando melhorar a seletividade dos agentes alquilantes, desenvolveram a ciclofosfamida (CF), baseando-se no fato de que as células tumorais possuem altas concentrações de enzimas capazes de romper a ligação fosfato-nitrogênio (P-N), liberando uma potente mustarda fosforamida. A CF pertence a classe das mustardas nitrogenadas dos agentes alquilantes no qual há dois grupos β -cloroetil ligados a um átomo de nitrogênio (**Arnold & Bourseaux, 1958**).

A ciclofosfamida, na realidade trata-se de uma pró-droga, a qual passa por diversas etapas até a formação do composto efetivo. O primeiro metabolito, hidroxíciclofosfamida, é produzido por metabolismo microssômico hepático. Este composto sofre tautomerização espontânea a aldofosfamida, que se hidroliza dentro das células para originar como o composto ativo final a mustarda nitrogenada, e um produto secundário: a acroleína.

A hidroxiciclofosfamida e a aldofosfamida sofrem a ação de enzima oxidantes transformando-se em 4-cetociclofosfamida e carboxifosfamida, respectivamente. Estes compostos têm baixa toxicidade e representam produtos inativos excretados na urina, equivalendo a 80% da CF administrada (Colvin, 1982).

A figura que se segue é uma representação esquemática das etapas pelas quais a ciclofosfamida passa até chegar a sua forma ativa, tal como descrevemos nos parágrafos anteriores.



Embora a farmacocinética da CF não seja amplamente determinada, sobretudo devido a dificuldade de isolar os metabólitos desta droga, estudos clínicos comprovam que a mesma é bem absorvida por via oral e sua biodisponibilidade é de 74% quando comparada com a via endovenosa (Juma, 1980). Após a administração oral de CF, o pico de níveis plasmáticos, o qual é dose-dependente, se dá em uma hora e a

meia-vida plasmática é de quatro a seis horas, quando administrada endovenosamente (**Colvin, 1982**)

Através de estudos experimentais utilizando CF tritiada em seres humanos, bem como técnica de cromatografia, demonstrou-se radioatividade na urina após noventa minutos da injeção venosa dessa droga. Setenta por cento da radioatividade foi excretada dentro de 72 horas. O percentual de recuperação da radiatividade nas fezes foi desprezível (**Bolt e et al., 1961**).

Mellet, usando também a CF marcada, recuperou 43% do total de radiatividade 24 h após a administração de 1 mg/kg de peso de CF. A eliminação da droga não metabolizada(inativa) foi de 11 a 14% do total administrado (**Mellet, 1963**).

A mustarda produzida a partir da CF forma ligações covalentes com ácidos nucleicos do DNA, através de um processo denominado alquilação, inibindo a divisão celular e conseqüentemente, produzindo, desta forma, seu efeito citotóxico.

A toxicidade produzida pela CF é diferente em alguns aspectos da causada pelas demais mustardas nitrogenadas. A CF é estável, bem absorvida por via oral e não produz irritação local. Durante a sua administração em regime de altas doses são observados freqüentemente náuseas, vômitos e alopecia. Os tecidos hematopoiéticos, por terem uma taxa de divisão celular elevada, bem como devido a falta de seletividade na ação da CF, sofrem alterações consideráveis, sendo mais relevante a leucopenia quando comparada com a trombocitopenia e anemia. Ao contrário dos demais agentes alquilantes, o fármaco em questão tem uma predileção pelo epitélio urotelial, produzindo como para-efeitos a

retenção inadequada de água pelo néfron distal e a cistite hemorrágica (CIC) (**Stillwell & Benson, 1988; Fraiser et al., 1991**).

Apesar da importância da CIC, a ureterite e pielite também estão associadas com o uso da ciclofosfamida (**Efros et al. ,1990**).

2 - CISTITE HEMORRÁGICA

Este processo inflamatório vesical, secundário ao uso da CF, foi relatado pela primeira vez em 1959 (**Coggins et al. , 1959**). A incidência desta patologia varia de dois a quarenta por cento nos usuários desta droga, e a mortalidade é em torno de quatro por cento (**Jerkins et al. , 1986**).

Não há predileção por sexo ou idade e a dose mínima total oral para causar cistite em adultos é de 100 g (**Bennet, 1974**). O regime de administração não é um fator preponderante, uma vez que se pode observar CIC nos pacientes que receberam altas doses em uma única injeção intravenosa, quanto naqueles tratados com pequenas doses orais diárias. Já Nissen, demonstrou a existência da CIC em dez por cento dos pacientes tratados com CF, porém apenas naqueles que receberam altas doses. No entanto, outros autores relatam que a CIC se desenvolve com doses menores de CF nas crianças quando comparada com adultos (**Coggins et al. 1959 ; Stiellwell & Benson, 1988**).

A exata causa da lesão vesical é desconhecida. Entretanto, parece estar relacionada com um metabólito urotóxico da CF: a acroleína. Cox sugeriu que o dano urotelial ocorre através do contato direto do

epitélio com a acroleína, a qual experimentalmente causa edema, ulceração, neovascularização, hemorragia e necrose (**Cox, 1979**).

Pohl e colaboradores, baseados em dados clínicos indicando que o cloacetaldeído (CAA) é um importante metabólito da CF, desenvolveu um estudo experimental no sentido de elucidar o real papel do CAA. Após ser injetado intraperitonealmente (ip), o CAA não causa lesão vesical, porém, instilado diretamente na bexiga, produz efeitos urotóxicos, os quais são parcialmente revertidos com o uso do sódio-2-mercaptoetanossulfonato (MESNA) (**Pohl et al. ,1989**).

Biópsias de pacientes com cistite induzida por CF revelam processos inflamatórios agudo ou crônico, com mucosa hiperplásica ou ulcerada, edema da submucosa, infiltrado celular, hemorragia das mucosas ou intra-mural e fibrose (**Stillwell & Benson, 1988**). Em casos severos, o processo inflamatório pode evoluir para necrose de toda a espessura da parede e conseqüente perfuração (**Marsh et al. 1971**).

Observa-se, dentre outras complicações do uso da CF, sobretudo em pacientes que desenvolveram CIC, um aumento da incidência de carcinomas de células transicionais da bexiga, representando um risco relativo de 6,8 : risco acumulado de 3,5 em oito anos e 10,7 % após doze anos do uso desta droga (**Stillwell & Benson, 1988**). Portanto, um seguimento clínico a longo prazo é mandatório para a detecção de recorrências tardias de CIC ou desenvolvimento de malignidade vesical.

2.1 - QUADRO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO:

O quadro clínico varia de uma hematúria microscópica em pacientes assintomáticos, até episódios recorrentes de hematúria maciça associada a disúria, hipertermia, dor supra-púbica, incontidência urinária e noctúria. Numa revisão de 100 casos, realizada por Stillwell, 56% dos pacientes persistem sintomáticos depois da interrupção do tratamento; 40% , de uma semana a um ano; e 16% , de dois a oito anos. O mesmo estudo demonstrou que 21% dos pacientes experimentaram recorrência da hematúria de três meses a dez anos após o episódio inicial (**Stillwell & Benson, 1988**).

O diagnóstico é sugerido pelo quadro clínico descrito, confirmado pela cistoscopia seguida de biópsia. A cistoscopia mostra na fase aguda uma mucosa hiperemiada, áreas de telangiectasia, edema e ulceração, bem como diminuição da capacidade vesical conseqüente ao espasmo do músculo detrussor. A urografia excretora também é um meio propedêutico auxiliar importante, embora não tenha a mesma especificidade e sensibilidade da endoscopia vesical. Mesmo assim, é capaz de revelar achados tais como hidronefrose, obstrução uretral e regularidade nas mucosas e diminuição da capacidade vesical (**Stiellwell & Benson, 1988**).

A ultrassonografia, a despeito de não ser um método efetivo no diagnóstico da CIC, produz imagens que auxiliam no diagnóstico, representadas por hidronefrose, aumento da espessura da parede, diminuição da capacidade vesical, bem como a presença de formações ecográficas sugestivas de coágulos dentro da bexiga (**Kumar & Aggarwall, 1990**).

2.2 - TRATAMENTO

Diversos métodos têm sido advogados na profilaxia e tratamento da CIC, entretanto, a hiperidratação, associada ou não com diuréticos osmóticos de alça, continua como o meio mais eficaz e difundido entre as alternativas protetoras no que concerne ao desenvolvimento da CIC. Todavia, a CF produz um efeito direto nos túbulos renais que induz a um estado de retenção inapropriada da água. Desta forma, a hidratação excessiva submete os pacientes, sobretudo idosos, cardiopatas e nefropatas, ao risco de hipervolemia, hiponatremia e, em caso severo, a morte (**Reynolds *et al.*, 1969; Cox, 1979; Droller *et al.*, 1982; Jerkins *et al.*, 1986**).

A N-acetilcisteína, composto tiol que produz substâncias sulfidrilas as quais se ligam a acroleína, foi usada na profilaxia da CIC com sucesso relativo (**Cox, 1979**). Objetivando impedir a ligação da acroleína ao epitélio vesical, Parson usou o pentossanpolissulfato, um análogo sintético da heparina, obtendo resultados satisfatórios (**Parson, 1986**).

Recentemente, o MESNA, composto que se liga a acroleína tornando-a inativa, passou a ser usado na profilaxia da CIC (**Stepherd *et al.*, 1991; Letendre, 1992; Nicolau & Hogam, 1992**). No entanto, apesar dos bons resultados obtido com este composto, Stepherd e cols. revelaram que não há vantagem no seu uso quando comparado com a hiperidratação (**Stepherd *et al.*, 1991**).

Embora ainda esteja sendo utilizados apenas no campo experimental, análogos de prostaglandinas, tais como o carboprostetrometamina(PGF_2) e misoprostol(PGE_1), em caráter preliminar,

apresentam resultados satisfatórios na profilaxia da CIC, embora seja totalmente desconhecidos os seus mecanismos de ação (**Grinberg, 1990; Kranc et al., 1992**).

Em se tratando da CIC já instalada, as terapias empregadas nos dias atuais vão desde o uso de estrógeno sistêmico (**Liu et al., 1990**), uso de ácido amino-capróico, vitamina E, instilação intra-vesical de formalina (**Shrom et al., 1976**) ou fenol (**Duckett et al., 1973**), aplicações de balões hidrostáticos intra-vesicais, fulguração, ligadura das artérias ilíacas internas, irrigação com sais de alumínio (**Goel et al., 1985**) e nitrato de prata (**Kumar et al., 1985**) e, em casos extremos, cistectomia (**Jerkins et al., 1986**)

Como podemos observar, quase todos os procedimentos utilizados, além de resultados duvidosos, têm elevadas morbidade e, em alguns casos, mortalidade elevadas.

2.3 - MODELO EXPERIMENTAL

O modelo experimental da CIC foi idealizado por Philips e cols. em 1961. A CIC foi desenvolvida através da administração de CF, por via intra-peritoneal, em ratos Wistar machos. Observou-se, na ocasião, que animais que receberam altas doses, tal como 222 mg/kg de peso, desenvolveram perda ponderal de até 25 % do seu peso inicial. A dose letal média(DL 50) encontrada foi de 182 mg/kg. Por outro lado, todos animais que receberam 100 mg/kg de peso desenvolveram cistite e não se observou mortalidade neste grupo (**Philips et al., 1961**).

Os estudos microscópicos revelaram a existência de edema e hemorragia flagrantemente do primeiro ao quarto dia, além de extensivas áreas de ulceração da mucosa. Nos espaços de mucosa íntegra havia alterações focais representadas por atipia celular e cariorrexis. A ulceração permanecia proeminente até o sexto dia; não obstante já no quarto a regeneração era evidente (**Philips et al., 1961**).

A lesão renal também pode ser apreciada neste modelo, porém em menor proporção e intensidade que as registradas na bexiga. Tais lesões traduziram-se por hemorragias, ulceração e necrose da mucosa da pelve renal. Ainda nesse trabalho, os estudos microscópicos da próstata ventral confirmaram a existência de edema, o qual já havia sido observado macroscopicamente(**Philips et al., 1961**)

Por ocasião deste trabalho experimental, Philips propôs, como parâmetro de aferição dos resultados, o peso vesical úmido o qual mostrou-se efetivo para tal. Posteriormente, mais precisamente em 1978, Cox utilizou como parâmetro a proporção da diferença dos pesos úmidos e dessecados relativo a cada 100g de peso do animal. Tais métodos são utilizados até os dias atuais . Vale resaltar que neste experimento Cox concluiu que a acroleína era o metabólito da CF envolvido com a patogênese da CIC (**Philips et al., 1961; Cox, 1979**).

Outra metodologia de indução da cistite foi proposta por Chaviano e cols., o qual lançou mão de instilação intra-vesical de acroleína, além de coloração das mucosas com azul de metileno, verificando que o epitélio lesionado cora-se intensamente, ao contrário do normal (**Chaviano et al., 1985**).

Em 1985, Gray e colaboradores estabeleceram critérios para quantificar os efeitos deletérios da CF na bexiga de ratos, tendo como

base as alterações macroscópicas (edema e hemorragia), bem como as histológicas (hemorragias, edema e ulcerações) as quais foram atribuídos valores de zero a três. Entretanto, este método não permite com precisão o estabelecimento de modificações mínimas (**Gray et al., 1986**).

Recentemente, Thermann e colaboradores desenvolveram um estudo com microscopia eletrônica na CIC, onde observaram que a resposta inicial aos metabólitos da CF parecia ser a fragmentação da membrana intraluminal. Isto, danificaria a barreira celular contra a urina hipertônica, provocando rotura das membranas laterais das células superficiais e em todas membranas plasmáticas das células intermediárias e basais, produzindo edema inter e intra-celular e desintegração dos desmossomos, levando a uma progressiva degeneração e descolamento das células epiteliais com exposição das membranas basais. O envolvimento dos vasos sanguíneos independe dos diâmetros e localizações indica a presença de um tipo direto de dano, o qual é precedido por um aumento da permeabilidade induzida por mediadores inflamatórios (**Thermann et al., 1987**)

A despeito do valor da CIC como entidade nólógica, ainda não se deu a devida importância, uma vez que a quantidade de estudos, sobretudo experimentais, na literatura indexada é muito pequena. Portanto , um aprofundamento dos conhecimentos desta patologia, principalmente no que concerne a patogênese e terapêutica, traria como consequência um ganho incalculável pela possibilidade de ter amplas aplicações nas mais diversas áreas em que este fármaco utilizado (**Stiellwell & Bensor, 1988**).

3 - O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é mais bem definida como uma reação do tecido vivo vascularizado a uma agressão local. Os invertebrados, desprovidos de sistema vascular, possuem outras formas de respostas a agressões. O processo inflamatório, como o imune, pode ser gerado a partir de células e por proteínas circulantes (fatores humorais). As diversas células inflamatórias são capazes de mediar as respostas através da liberação, produção de compostos químicos e recrutamento de outras células que liberem ou ativem mediadores químicos adicionais (**Dale & Foreman, 1989**).

3.1 - MODIFICAÇÕES NO FLUXO E PERMEABILIDADE VASCULAR

A resposta inflamatória tem uma dinâmica, bem como uma interdependência entre os elementos envolvidos e não é possível compreender em toda sua plenitude através de estudos setoriais. Entretanto, com a finalidade didática, discorreremos sobre o papel das principais células participantes deste processo biológico, bem como dos mais importantes mediadores que dele participam.

A inflamação se divide em aguda e crônica. A aguda é de duração relativamente curta, perdurando por alguns minutos, várias horas ou poucos dias. Suas características são exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas (edema) e migração de leucócitos, predominantemente

neutrófilos, para o sítio da agressão. Qualquer que seja o agente causal, a inflamação aguda é de certa forma estereotipada. Já a crônica é de duração maior, associa-se a presença de linfócitos, macrófagos e a proliferação vascular e do tecido conjuntivo no foco da lesão (Robbins,1991).

A despeito da ausência de uma seqüência exata, a alteração no fluxo e calibre da microvasculatura é uma etapa que ocorre de forma precoce. Os elementos mais importantes da microvasculatura são os capilares, os quais são estruturas extremamente delicadas com paredes de uma só camada celular (endotélio), diâmetro de quatro a nove micrômetros, formados a partir de minúsculas arteríolas chamadas metarteríolas terminais. Nas junções entre os capilares e as arteríolas existem manguitos musculares ou esfíncteres. Distal a estes manguitos, muitos capilares se interligam em uma rede complexa que irão formar as tributárias venosas denominadas de vênulas (Wallace & Waugh, 1990).

Os capilares são providos de diminutas fendas intercelulares que estabelecem o contato do interior com o exterior vascular. Essas fendas têm espessamento de aproximadamente seis nanômetros, o que é ligeiramente menor que uma molécula de albumina, entretanto, na dependência do equilíbrio pressórico, líquidos circulam livremente por esses poros, em condições normais (Guyton, 1992). Essas junções entre as células endoteliais são plásticas, no sentido de que certos agentes, tais como a histamina ou o calor, podem acentuar o tamanho dos poros e, conseqüentemente, aumentar a permeabilidade vascular, permitindo o extravazamento de moléculas de peso molecular acima de 100.000 Daltons ou mais (Wallace & Waugh, 1990).

Acredita-se que a histamina e a serotonina sejam os mediadores que determinam a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular imediata. Desta forma, para que possa ser rapidamente ativada a resposta inflamatória, estes mediadores são estocados pré-formados em grânulos citoplasmáticos dos mastócitos, basófilos e plaquetas(**Serafin & Austen, 1987**).

Os mastócitos são células teciduais com proeminente papel na fase inicial da inflamação, sobretudo naquelas mediadas por imunoglobulinas da classe E (IgE). Eles são especialmente abundantes na pele, pulmões, mucosas gastrointestinais e nasal. Como podemos observar, estão estrategicamente posicionados, o que os torna relevantes no mecanismo de defesa contra agressões externas (**Serafin & Austen, 1987**). A ativação destas células pode ser através de mecanismos IgE-dependente ou por estímulos outros como as frações C3a e C5a do complemento,, fator quatro de plaquetas e citocinas. Este evento começa com a desgranulação, liberação de histamina e mediadores associados, tais como heparina e tetrapeptídeo conhecidos como fatores quimiotáticos de eosinófilos, culminando com a geração e liberação de fatores neoformados como leucotrienos , PAF e citocinas (**Goetz & Stobo, 1990**)

Ao contrário dos mastócitos, os basófilos são leucócitos circulantes, os quais têm muitas funções destes primeiros. Estas células, tal como os mastócitos, possuem receptores de alta afinidade para IgE. bem como grânulos citoplasmáticos contendo histamina (**Lemanske & Kaliner, 1988**). Embora o conteúdo de mediadores dos grânulos citoplasmáticos das plaquetas lembrem os das células descritas acima. a impossibilidade de migrar do meio vascular limita a participação das plaquetas. de forma direta. no processo inflamatório. Não obstante este

óbice, as plaquetas contribuem no mecanismo da inflamação e da coagulação, os quais estão interrelacionados (**Ginsberg, 1986**).

A histamina é formada pela descaboxilação da L-histidina e degradada por desaminação oxidativa e metilação. A sua liberação dos grânulos se dá através de um mecanismo cálcio-dependente, envolvendo proteínas celulares contráteis e uma mudança nos níveis do 3,5-ciclo-monofosfato de adenosina (AMPc) (**Friedman & Kaliner, 1987**) A histamina exerce seu efeito biológico através da interação com receptores específicos nas células alvos. Na atualidade são conhecidos três tipos de receptores (H1,H2 e H3), porém, apenas o H1 e possivelmente o H3, o qual parece desempenhar uma função regulatória na produção de histamina, estão diretamente envolvidos com a inflamação, particularmente com a permeabilidade vascular (**Arrang *et al.*, 1987**).

O receptor H1 está fartamente presente na musculatura vascular, se ativado, determina relaxamento desta, sobretudo na sua porção venular. No seu mecanismo de ação é conhecida a participação da hidrólise de fosfoinositois e formação de trifosfato de inositol, com conseqüente aumento do cálcio intra-celular (**Donaldson & Hill, 1985**).

Embora apenas a histamina haja exclusivamente na fase inicial da inflamação, outros mediadores participam ativamente dos fenômenos vasculares que ocorrem nesta e em outras fases mais tardias. Entre outros, a serotonina, bradicinina, substância P (SP), derivados do ácido aracdônico pelas vias da ciclo e lipoxigenase e o PAF. A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é um mediador formado a partir da descaboxilação do triptófano, armazenada em grânulos de plaquetas, células neuro-endócrinas do trato gastrointestinal e respiratório e nos mastócitos de roedores. A serotonina contrai músculos lisos e produz

aumento da permeabilidade venular por desconexão parcial das células endoteliais. Entretanto, nos seres humanos, sua principal função é, provavelmente, a de um neuro transmissor (**Saria et al., 1983**).

A bradicinina (BK) é formada no plasma a partir de uma alfa-2-globulina chamada cininógeno, a qual sofre a ação de enzimas geradas no fígado e em outros tecidos (cininogenases) (Proud e cols.,1984). O evento inicial na sua formação é ativação do fator XII do sistema intrínseco da coagulação (fator Hageman), resultante do contato direto com ativadores como o colágeno, membrana basal e endotoxinas. Um fragmento do fator XII, ativador de pré-caliceína, o qual vai atuar na formação de um co-fator da ativação do fator XII, permite uma amplificação auto-catalítica do estímulo inicial (**Saria et al., 1983**). Esta cinina tem sua ação relaxadora na musculatura vascular possivelmente mediada por prostaglandinas (**Barrow et al., 1986**).

A BK produz contração vascular do músculo detrussor da bexiga de diversas espécies animais através de um mecanismo que, pelo menos parcialmente, é dependente de prostaglandinas . Possivelmente, esta ação em muito contribui para os espasmos vesicais*freqüentes nos caso de CIC (**Anderson, 1993**).

A substância P faz parte de uma nova classe de moléculas que funcionam como transmissores ou moduladores no sistema nervoso central. Estão presentes também em fibras nervosas periféricas, as quais se distribuem na pele, trato gastrointestinal e praticamente todo o leito vascular (**Hökfelt et al., 1975**). A SP é um dos mais potentes vasodilatadores conhecidos. Doses tão pequenas quanto dez nanomoles causam vasodilatação em tecidos adiposos e músculos esqueléticos de cães. Em humanos, a infusão de 0.7 picomoles por um minuto na artéria

braquial aumenta de maneira significativa o fluxo sanguíneo. É sabido que o efeito da SP não é influenciado pela atropina, alfa ou beta bloqueadores adrenérgicos ou anti-histamínicos. Isto indica que seu efeito possivelmente se dá de forma direta sobre a musculatura lisa vascular (Pernow & Rossell, 1975) O extravazamento plasmático produzido pela SP não sofre alterações com o tratamento com indometacina, o que sugere que não há participação dos derivados do AA (Lenbeck & Donnerer, 1981)

Desde a identificação e isolamento da primeira prostaglandina nos anos sessenta, os produtos do AA pela via da cicloxigenase têm sido implicados nos mecanismos da inflamação, hipertermia e dor. Os produtos mais importantes desta via são as prostaglandinas. As suas sínteses ocorrem a partir da ação da fosfolipase-A sobre os lipídios da membrana celular, produzindo o AA. Este último, por sua vez, sofre oxidação pela cicloxigenase, transformando-se em um endoperóxido denominado de PGG₂, que é rapidamente reduzido para um instável endoperóxido PGH₂, o qual dá origem as PGF₂-alfa, PGE₂ e PGD₂. Outras vias enzimáticas para endoperóxido cíclico levam a formação de tromboxano-A₂ (TXA₂) e prostaciclina (PGI₂) (Barnes, 1988).

A classificação dos receptores prostanóides tem sido baseada principalmente na seqüência de potência agonista, sendo que há indícios da existência de receptores específicos para cada uma das prostaglandinas (Coleman *et al.*, 1984).

No que diz respeito a inflamação, os seguintes prostanóides, derivados do AA, tem participação efetiva: o TXA₂, um potente agregante plaquetário, a PGI₂, potente inibidor da agregação plaquetária e vasodilatador; as PGE₂ e PGD₂, as quais diminuem a resistência

vascular sistêmica (vasodilatação), inibem a agregação plaquetária e aumentam a permeabilidade capilar (**Root, 1990**).

A lipoxigenação do AA dá origem a produtos de potentes efeitos inflamatórios, particularmente os leucotrienos. Apesar de identificados nos anos setenta, seus efeitos já eram conhecidos desde os anos trinta quando eram chamados de substância de reação lenta da anafilaxia (SRS-A). Com respeito ao processo inflamatório o leucotrieno B₄ desperta maior interesse devido sua capacidade de causar quimiotaxia. Este composto é sintetizado em grande quantidade pelos neutrófilos e macrófagos, e quando administrado por via iv causa neutropenia de forma aguda pelo aumento da emigração de neutrófilos do leito vascular. O LTC₄ e LTD₄ podem aumentar a permeabilidade microvascular e são produzidos largamente pelos mastócitos e macrófagos (**Samuelson, 1983**)

O PAF é um éter-fosfolipídio formado a partir de um lipídio complexo, armazenado na forma de um precursor nas membranas citoplasmáticas, através de uma acetilação catalisada pela acetiltransferase. Sua formação pode ser inibida por antagonistas da fosfolipase A₂ . Seu nome deveu-se a propriedade de ativar plaquetas em coelhos, entretanto, com o passar dos anos , descobriu-se uma série de atividades biológicas , porém conservou-se a antiga denominação (**Albert, 1983**).

O PAF tem a capacidade de ativar uma variedade de células, incluindo plaquetas, cujo mecanismo de ativação envolve indução de agregação e liberação de mediadores dos granulos citoplasmáticos. Dentre outras funções podemos citar a indução de migração leucocitária, além de indução da formação de superóxidos e derivados do AA nestas células. Estes efeitos são suprimidos por diversos inibidores específicos, entre eles o BN52021. O PAF é produzido por polimorfonucleares,

monócitos, macrófagos, mastócitos e eosiófilos após estimulação com zymosan ou IgE (**Braquet, 1987**)

Ainda inerente as suas propriedades como mediador inflamatório, o PAF aumenta a permeabilidade vascular, induz a produção de uma substancia pró-adesiva para granulócitos nas células endoteliais, quando estas são estimuladas por trombina, histamina e leucotrieno C4.; ao mesmo tempo em que estimula os leucócitos a expressarem o complexo CD11-CD18, o qual participa da adesividade(**Zimmerman,1992**) .Finalmente o PAF produz edema , lesão endotelial e trombose vascular quando injetado via sub-cutanea em animais de experimentação (**Braquet, 1987**).

O relaxamento da musculatura lisa dos vasos por nitrovasodilatadores ocorre na presença e ausência de um endotélio intacto, ao contrário, agentes tais como acetilcolina, histamina, bradicinina requerem um epitélio íntegro. Isto levou Furchgott a crer que estes agentes interagem com receptores específicos do endotélio e causam a síntese ou liberação de um fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (**Furchgott,1984**). Da mesma forma que os nitrovasodilatadores, os vasos dilatadores dependentes do EDRF produzem elevações nas concentrações intracelulares do GMP-cíclico de uma forma dose e tempo-dependentes,o que sempre precede o relaxamento da musculatura (**Rapaport et al., 1983**).

Estudos recentes sugeriram que o EDRF e o óxido nítrico (NO) ,liberados pelo endotélio ,são uma única substância,considerando os fatos de terem atividades biológicas semelhante,estabilidade e inibidores comuns (**Palmer et al., 1987**). Tanto o EDRF quanto o NO produzem relaxamento da musculatura vascular, bem como ambos inibem a

agregação plaquetária, induzem desagregação de plaquetas previamente agregadas e inibem adesão plaquetária (**Radomski et al., 1987**).

Apesar de todas evidências para a identificação do NO como um mediador biológico e de que ele é o próprio EDRF, há uma série de controvérsias que incluem observações sobre meia-vida do EDRF, efeitos diferentes em preparações de músculos lisos e uma inesperada correlação entre a atividade biológica e a quantidade de NO detectada por métodos químicos (**Griffith et al., 1984; Palmer, 1987 e Long et al., 1987**).

O precursor do NO é o aminoácido L-arginina, o qual sofre a ação da enzima óxido nítrico sintetase. Esta enzima existe em diversos tecidos sob duas formas, uma constitutiva, citosólica, cálcio-calmodulina dependente e que promove uma liberação de NO por um curto período em resposta a uma estimulação. O NO liberado desta forma age principalmente como um transdutor em diversos mecanismos fisiológicos, dentre os quais o controle homeostático do fluxo coronariano. A produção do outro subtipo enzimático é induzida após a ativação de macrófagos, células endoteliais, entre outras células, por citocinas liberadas por elas. O estímulo de produção do NO por esta via é duradouro, cálcio-calmodulina independente. a enzima é citosólica, necessita de um co-fator (tetraidrobiopterina) e sua produção é inibida por corticosteróides. O NO produzido por esta via está relacionado com funções biológicas tais como defesa (citotoxicidade), vasodilatação em condições patológicas (inflamação) e lesão tecidual (**Moncada et al., 1991**).

A conversão de L-arginina em NO é específica, uma vez que análogos, inclusive D-enantiômeros, não são substratos para a NO sintetase. Desta maneira começou-se a desenvolver inibidores da síntese

de NO, sendo o primeiro deles o L-N-monometil arginina (L-NMA) (*Hibbs et al., 1987*). Recentemente outros análogos da L-arginina foram descritos como inibidores do NO, dentre eles o N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO), N-nitro-L-arginina (L-NA) e o nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (*Rees et al., 1990*).

Em resumo, o NO age como um sistema regulador autócrino para células como plaquetas; adaptador para o sistema cardiovascular, onde o endotélio responde às mudanças do meio e regula o fluxo e a pressão sanguínea. Além disto, tem um importante papel no mecanismo de defesa, sobretudo no que concerne a infecção e a vigilância imunológica contra células neoplásicas (*Moncada et al., 1991*).

Finalmente, conseqüente a ação dos mediadores supracitados, a vasodilatação determina a abertura de novos leitos capilares, aumento do fluxo sanguíneo local (rubor e calor) e elevação da pressão hidrostática capilar o que produz transudação de líquidos inicialmente pobre em proteínas (transudato), posteriormente, em função do aumento da permeabilidade vascular, rico em proteínas (exsudato). Todavia, o equilíbrio dinâmico entre as forças pressóricas que aos poucos se estabelece na microvasculatura determina uma estase relativa que favorece a adesividade leucocitária no endotélio capilar

3.2 ADESIVIDADE E MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIAS

Existe uma capacidade celular inflamatória móvel (circulante) e uma estacionária. As circulantes têm vidas curtas

(neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e as estacionárias têm vidas longas e são representadas por mastócitos e macrófagos. Há ainda aquelas que assumem dupla característica no que diz respeito a mobilidade que são os linfócitos (teciduais e circulantes)(Broide,1992).

Os neutrófilos são polimorfonucleares predominantes na circulação, ricos em grânulos citoplasmáticos onde estão armazenadas enzimas capazes de hidrolizar uma ampla variedade de substratos, incluindo polissacarídeos, proteínas e lipídios. Para desempenhar suas funções nos tecidos estas células são dotadas da capacidade de aderir ao endotélio vascular; migrar no interstício, atraídos por substâncias produzidas no foco da agressão chamadas de fatores quimiotáticos; e, numa coordenada série de etapas, reconhecer e fagocitar os microrganismos ou substâncias tóxicas (Metcalf,1986).

O sangue periférico apresenta dois compartimentos permutáveis de leucócitos, um central e outro marginal. Neste último os leucócitos se locomovem lentamente, o que facilita sobremaneira o fenômeno de adesão ao endotélio das vénulas pós-capilares, penetração em suas paredes e migração unidirecional para o sítio da lesão. Para o eficaz desempenho destas funções, os leucócitos são providos de moléculas de adesão, as quais podem ser constitutivas ou sintetizadas a partir da estimulação por substâncias tais como citocinas (IL-1, IL-8 e TNF-alfa) e produtos bacterianos como os lipopolissacarídeos (LPS) (Zimmerman *et al.*, 1992).

Existem diversos grupos de moléculas de adesão que regulam a interação dos leucócitos com o endotélio, entre elas as selectinas, moléculas de adesão intercelular (ICAM), integrinas leucocitárias e carboidratos(McEver, 1992;Williams&Helewell, 1992).

As selectinas se dividem em E, P e L-selectinas. A E-selectina são um grupo de glicoproteínas expressas exclusivamente no endotélio, através da ativação deste pela interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) e LPS. Seu pico de síntese ocorre quatro a seis horas do estímulo inicial e declina em 24 horas. A segunda, P-selectina, é uma glicoproteína localizada no endotélio e grânulos plaquetários e é expressa na superfície celular após minutos da estimulação do endotélio por substâncias como trombina e histamina. Ao contrário da E-selectina, citocinas como a IL-1 e TNF não induzem sua produção. (**Williams & Hellewell,1992**).

Dentre as três categorias de selectinas, aquela em que ainda não está claro o seu papel na adesividade leucocitária é a da L-selectina. Acredita-se que esta participa na regulação da recirculação dos linfócitos dos órgãos linfáticos para a corrente sanguínea (**Springer,1990**).

No segundo grupo de moléculas de adesão estão os ICAM, representadas principalmente por ICAM-1, ICAM-2 e a molécula de adesão a células vasculares (VCAM-1). Tanto o ICAM-1 quanto o ICAM-2 estão presentes nas células endoteliais, porém não nos leucócitos (**McEver,1992**), e se ligam com integrinas leucocitárias chamadas de LFA-1. O ICAM-1 é expresso nas células endoteliais a partir da ação sobre estas do interferon-gama (IFN-gama), IL-1 e TNF(**Williams & Hellewell,1992**). Já o VCAM-1 é uma glicoproteína que surge na superfície celular do endotélio pela estimulação com as mesmas citocinas citadas, exceto o IFN-gama. Esta proteína de adesão funciona como um receptor endotelial para a integrina leucocitária VLA-4 (**MacEver, 1992**).

Com relação às integrinas, podem ser classificadas em dois sub-grupos, alfa e beta; porém apenas esta última participa da interação

entre os leucócitos e o endotélio. As β -2 integrinas são compostas de três cadeias polipeptídicas chamadas de CD11a, CD11b e CD11c que em associação com o CD18 formam as integrinas conhecidas como LFA-1, MAC-1 e p 150/95, respectivamente (**Williams & Hellewell,1992**). Quanto às β -1 integrinas , o seu representante maior, o VLA-4 , está presente nos eosinófilos, linfócitos, porém não nos neutrófilos. O seu papel parece estar relacionado a migração leucocitária, uma vez que funciona como receptor para proteínas da matriz extra-celular envolvidas com o deslocamento leucocitário (**Springer,1990**).

Finalmente, carboidratos derivados da polilactosamina são reconhecidos como receptores leucocitários da P e E-selectina e têm importantes papéis na primeira fase da adesão, que consiste numa ligação menos consistente que permite ao leucócito desenvolver movimentos semelhantes a cambalhotas (“rolling“), a qual antecede a ligação mais firme onde inicia-se a migração. Esta primeira fase é selectina-dependente e é desencadeada pela ativação das células endoteliais por mediadores como histamina, citocinas(IL-1,IL-8 e TNF), bem como toxinas bacterianas(LPS) (**Zimmerman et al., 1992; McEver, 1992;Williams & Hellewell, 1992**). A ligação das lectinas aos seus receptores determina a expressão superficial do complexo CD11-CD18 nos leucócitos, o qual é fundamental no desenvolvimento de uma adesão mais firme e início da migração leucocitária (**Zimmerman et al., 1992; Mc Ever,1992**).

A migração consiste no processo através do qual os leucócitos deixam a circulação em procura do interstício e inicia-se logo após a adesão, quando estas células inserem grandes pseudópodes dentro das junções das células endoteliais, atravessam a membrana basal e

deixam o espaço intravascular. O movimento destes pseudópodes requer ciclos de regulação positiva e negativa de integrinas em conjunção com uma redistribuição ao longo do cito-esqueleto. Naturalmente, para que haja migração unidirecional é necessário a produção , no sítio da lesão, de fatores quimiotáticos, os quais , por assim dizer, irão recrutar leucócitos para o sítio inflamatório (**Mc Ever,1992**).

3.3 - MEDIADORES QUIMIOTÁTICOS

Ao longo dos últimos 30 anos, importantes grupos de mediadores peptídicos foram isolados, identificados, caracterizados e purificados. Estes mediadores, denominados de citocinas, atuam como reguladores das respostas imune e inflamatória, sendo que, dentre eles a IL-1, IL-8 e o TNF assumem um papel destacado neste último processo biológico (**Hechtman et al., 1991**). A IL-1 é produzida por macrófagos, ceratinócitos, células dendríticas, astrócitos, linfócitos B e T em culturas, fibroblastos, neutrófilos e células endoteliais (**Dinarello, 1991**).

Além do destacado papel na inflamação, a IL-1 produz hiperalgesia por um mecanismo que envolve a participação dos derivados do AA pela via da cicloxigenase, ao contrário da IL-8 que tem um mecanismo prostaglandina independente e, em estudo experimental, há sugestão de que na dor produzida por esta citocina existe a participação do sistema nervoso simpático (**Cunha et al., 1991**).

Quanto a IL-8, ainda sabe-se que é uma citocina capaz de determinar migração neutrofílica, de uma forma dose-dependente, em cavidade peritoneal e bolsa subcutânea de ratos, por um mecanismo dependente de células residentes. Possivelmente, sua forma indireta de

atuar deve-se à liberação de um fator quimiotático pelas células residentes, particularmente mastócitos (**Ribeiro et al., 1991**).

Experimentalmente, Hechtman e colaboradores demonstraram que a IL-8, da mesma forma que a IL-1, quando administrada por via iv, diminui a migração leucocitária, provavelmente devido a um decréscimo na adesividade endotelial por diminuição da expressão de moléculas de adesão ou por produção de fatores anti-adesivos pelos polimorfonucleares (**Hechtman et al., 1991**).

O TNF consiste em dois peptídeos com múltiplas atividades biológicas. O TNF-alfa foi conhecido inicialmente por caquectina, sobretudo devido a sua propriedade de desenvolver nos pacientes em que sua produção é considerável, um intenso consumo calórico-protéico. Esta citocina é produzida por macrófagos ativados, monócitos, fibroblastos em resposta ao LPS, células tumorais e bactérias (**Old, 1985**).

Outras importantes funções do TNF são estimular os linfócitos T a produzir linfocinas, bem como aumentar a expressão de receptores para a IL-2; incrementação da produção de linfócitos B e de anticorpos; aumento da produção de prostaglandinas pelos macrófagos e, finalmente, atua como fator quimiotático para leucócitos (**Old, 1985**).

Atuando conjuntamente com as citocinas e outros agentes quimiotáticos temos o complemento. Este termo designa um conjunto de proteínas que, de forma sequencial e interrelacionadas, produzem componentes que estão intimamente relacionados com a lise de bactérias, rejeição de transplante e quimiotaxia (**Frank & Fries, 1989**).

A cascata do complemento é ativada por duas vias distintas: a clássica, a qual necessita na maioria dos casos da presença do complexo antígeno-anticorpo para ser iniciada; ao contrário da via alternativa que

que pode ser ativada por compostos tais como proteínas e ácido teitóico de germes Gram negativos, além de polissacarídeos fúngicos (**Root, 1990**).

Dois subprodutos do complemento, o C3a e C5a, gerados a partir da ativação de qualquer uma das vias, são proteínas solúveis, termo-lábeis, contendo 77 e 75 aminoácidos, respectivamente. Ambos são inativados por um fator plasmático que expressa uma função carboxipeptidase (**Barnes et al., 1988**). Esta duas frações têm receptores específicos nas membranas de mastócitos, monócitos, plaquetas e neutrófilos (**Regal et al., 1980**).

Tanto o C3a quanto o C5a induzem aumento da permeabilidade vascular através da ativação de neutrófilos e, apesar de não estar bem esclarecido, existe sugestão de que esta função se deve a indução da liberação de PAF pelos neutrófilos (**Wedmore & Williams, 1981**).

Um dos mais estudados efeitos destas frações do complemento é sua capacidade de induzir ativação e quimiotaxia de células inflamatórias comparáveis, no caso do neutrófilo, a do LTB₄(**Movat et al., 1984**). O C5a tem atividade quimiotática para macrófago, basófilo e eosinófilo. O C3a e C5a elicitam a liberação de derivados do AA, radicais livres, enzimas lisossômicas de neutrófilos e eosinófilos (**Barnes et al., 1988**).

Quanto ao leucotrieno B₄, este é o mais potente agente quimiotático derivado do AA. O LB₄ ainda estimula a liberação de enzimas lisossomiais e aumenta a produção de radicais livres dos neutrófilos humanos. No que diz respeito ao seu efeito vascular, o LTB₄, ao lado do LTC₄, LTD₄ e LTE₄, aumentam a permeabilidade da

microvasculatura, sendo no mínimo de 100 a 1000 vezes mais ativo que a histamina, provavelmente através de sua ação direta nas células endoteliais pós-capilares (Barnes *et al.*, 1988).

4 - OBJETIVOS

A gravidade da reação, sua causa específica e tecido afetado, introduzem modificações nos padrões básicos da resposta inflamatória, as quais incluem o conteúdo líquido, proteico e celular do exsudato, a extensão da lesão, a seletividade relativa por estruturas teciduais específicas, bem como na participação em maior ou menor proporção de um grupo de mediador. A compreensão das particularidades de um determinado modelo inflamatório é uma condição indispensável para o incremento das ações profiláticas e terapêutica da patologia representada pelo modelo em questão.

A descoberta de uma grande variedade de mediadores inflamatórios e de seus inibidores específicos tornou viável a elaboração de projetos de pesquisa visando determinar o papel destas substâncias nas diversas patologias inflamatórias, o que sobremaneira tem contribuído para a evolução dos conhecimentos em diversas áreas da medicina.

O objetivo inicial deste trabalho de tese foi demonstrar a exequibilidade e a caracterização dos eventos inflamatórios do modelo da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida, em ratos, uma vez que tratava-se de um modelo jamais utilizado por nós e escassamente pesquisado em todo o mundo. Após esta etapa, denominada de estudo

preliminar, passamos a estudar a participação de diversos mediadores inflamatórios, incluindo os derivados do AA, bradicinina, PAF, óxido nítrico, além de células como os mastócitos na patogênese deste processo.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a execução deste trabalho de pesquisa utilizamos ratos Wistar, machos, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

Antes dos experimentos os animais, acondicionados em caixas apropriadas, em número máximo de seis, tinham livre acesso a água e comida até os momentos em que foram utilizados.

2 - APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS

- Seringas de 1, 3 e 10 ml (IBRAS -CBO)
- Lâminas para microscopia.
- Balança analítica (METHER E MARTE)
- Microscópio ótico binocular (NIKON)
- Estufa de secagem modelo 315 SE (FANEM)
- Autoclave (FABE)
- pHmetro (DIGIMED)

- Banho-Maria modelo 100 (FANEM)

- Pipetas (LABSYSTEMS)

- Espectrofotômetro (SPEKOL)

- Centrífuga modelo FR 15 (FANEM)

- Câmara de Neubauer

3 - SOLUÇÃO

- Salina tamponada com fosfato (PBS)

Cloreto de sódio P.A. (MERCK)..... 8.00 g

Cloreto de potássio P.A. (MERCK)..... 0.20 g

Fosfato de sódio dibásico P.A. (MERCK)..... 1.15 g

Água destilada q.s.p. 1.00 l

Antes do uso, o pH foi elevado para 7.4 com NaOH 0.1 M e solução autoclavada.

4 - CORANTES

- a) Azul de Evans (SIGMA).....2.5 g
Água destilada.....100 ml
- b) Azul de toluidina.....100 mg
Água destilada.....100 ml

5 - DROGAS E DISSOLUÇÕES

- a) Ciclofosfamida (ENDUXAN - ABBOTT).
- b) Dexametasona (DECADRONAL - PRODROME).
- c) Indometacina (MERCK SHARP & DOHME)- dissolvida em solução de bicarbonato de sódio a 10 % e , a seguir , rediluída em PBS
- d) Composto NDGA (SIGMA)- dissolvida em etanol num volume deste que representasse 10 % do total a ser administrado. Os 90 % restantes foram completados com água destilada.

e) Composto BN 52021 (INSTITUTO PASTEUR -França)- o liofilizado de 40 mg foi adicionado ao diluente específico e em seguida rediluído em solução tampão (PBS).

f) L-nitro-arginina metil éster - L-NAME (SIGMA).

g) L-ARGININA (SIGMA).

h) D-ARGININA (SIGMA).

i) Composto 48/80 (SIGMA).

j) Composto HOE-140 (HOECHST).

l) Formamida (VETEC)

6 - INDUÇÃO DA CISTITE HEMORRÁGICA

Ratos Wistar machos, pesando entre 180 e 220 gramas foram submetidos a injeção intraperitoneal de ciclofosfamida(CF) em concentrações de 10, 20, e 40 mg/ml, quando se queria administrar doses de 50, 100 e 200 mg/kg, respectivamente (Phillips . 1961). Os animais foram mantidos com água e comida *ad libitum* até o momento dos sacrifícios, os quais foram realizados através de deslocamentos cervicais, após 6, 12, 24, 48 e 72 horas da administração da CF, na dependência do protocolo experimental a ser executado. Em seguida, através de uma

incisão abdominal mediana, procedemos a uma cuidadosa dissecação vesical, na qual dissecamos a próstata, ureteres, vesículas seminais e, finalmente, seccionamos as bexigas junto ao colo vesical. Tais órgãos foram imediatamente abertos, tiveram seus conteúdos urinários desprezados e foram postos em contato com um papel absorvente para retirar o excesso de líquidos. Após a pesagem, as bexigas foram acondicionadas em tubos de ensaios e, na dependência do que estava estipulado no protocolo, levada a estufa, imersas em formol a 10 % quando se desejava fazer histopatologia.

6.1 - ANÁLISE HISTOPATÓLOGICA

Na primeira fase do nosso projeto, ou seja, etapas em que utilizamos apenas o peso como parâmetro, as bexigas, após fixadas em formol a 10 %, foram submetidas a desidratação em álcool, em concentrações crescentes (70, 80 e 100 %), imersas em xilol durante 30 minutos e impregnadas em parafina líquida a 60 °C. Os blocos formados desta maneira foram seccionados no micrótomo calibrado para 5 micrômetros. Os materiais obtidos foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) e analisados sob microscopia ótica. Vale ressaltar que o patologista somente após a emissão dos laudos tomou conhecimento dos grupos a que pertenciam as bexigas analisadas.

Na segunda fase, após submetidas a extração do corante (azul de Evans) pela formamida, as bexigas foram retiradas dos tubos de ensaio contendo esta última droga e postas para fixar no formol a 10%,

seguindo, à partir daquele momento, a mesma metodologia descrita para histopatologia.

Convém destacar que a permamência dos espécimes vesicais na formamida não produziu qualquer dano tecidual ou interferências com a técnica de processamento das lâminas, de tal sorte que todas poderiam ser aproveitadas para estudo histopatológico. Desta maneira, no curso dos experimentos, utilizamos amostras vesicais para fazer correlação histopatológica com o controle ou outros tratamentos, tomando como base os critérios microscópicos estabelecidos por Gray e colaboradores(Gray *et al.*, 1986).

6.2 - DETERMINAÇÃO DO EDEMA

A determinação do edema foi realizada de acordo com os métodos propostos por Philips (1961) e Cox (1979).

Nos experimentos iniciais, quando o peso era o único parametro utilizado, o edema foi quantificado mediante a utilização da diferença entre o peso úmido e o dessecado (Δ peso). O primeiro era resultado da pesagem realizada imediatamente após o sacrifício do animal, enquanto que o segundo era obtido após manutenção da bexiga em estufa de secagem a 100^oc por um período de 12 horas.

Os resultados foram dados em mg/100 g de peso do animal, visando sobretudo a correção em função da variação de peso dos ratos, e expressos em médias e erros padrões das médias (EPM).

Nos experimentos subseqüentes, tendo em vista que passamos a processar as bexigas para obtenção do extravazamento vascular de azul de Evans, adotamos apenas o peso úmido para representar o edema vesical.

6.3 - DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR

A metodologia empregada para medir o aumento da permeabilidade vascular foi baseada naquela utilizada por Garcia e Wilhelm, entretanto realizamos adaptações, uma vez que desconhecíamos o seu uso para o modelo da cistite (**Garcia Leme & Wilhelm, 1975**).

Uma hora antes do momento pré-estabelecido para sacrifício, os animais foram anestesiados com éter etílico, colocados em suporte para fixação das patas de modo a permanecerem em decúbito dorsal e, seguidos de uma cuidadosa inspeção peniana para identificar os seios venosos dorsais, submetidos a injeção endovenosa de uma solução a 2,5 % de Azul de Evans, na dose de 25 mg/kg de peso.

Em continuidade, os animais foram sacrificados e tiveram suas bexigas retiradas, conforme maneira já tratada anteriormente, imersas em formamida numa proporção de 0.01ml para cada miligrama deste órgão. Os tubos contendo a formamida e as bexigas foram deixados no banho-maria a uma temperatura de 56 °C por um período de 12 horas. Passada esta etapa, retiramos as bexigas dos tubos de ensaios e procedemos às leituras da formamida-tinta pelo azul de Evans extraído dos tecidos vesicais- no espectrofotômetro , utilizando para tanto um comprimento de

onda de 600 nm, tendo o tubo "branco" o mesmo volume de formamida que os demais.

Os dados obtidos em absorvância foram convertidos em micrograma (μg) de azul de Evans através da utilização de uma curva padrão que resultou, depois de uma análise de regressão e correlação, em uma função matemática. Os resultados foram dados em μg de azul de Evans/bexiga e expressos em médias e EPM.

Esta metodologia foi padronizada ao longo de todos os experimentos em que a permeabilidade vascular foi estudada.

6.4 - CURVA PADÃO DE AZUL DE EVANS

A partir de uma solução-mãe de 250 mg/ml de azul de Evans, na qual usamos como solvente a formamida, realizamos rediluições sucessivas de 1:1 com formamida pura até atingirmos a concentração de 0.061 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Em seguida realizamos leitura no espectrofotômetro (600 nm) em cada uma das 13 diluições.

Os valores em absorvância foram utilizados para realizar análise de correlação e regressão linear, obtendo desta forma a equação de conversão de absorvância em μg de azul de Evans.

7 - DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

7.1-ANÁLISE PRELIMINAR DO MODELO

Objetivando avaliar a exequibilidade do modelo experimental de cistite induzida por ciclofosfamida, bem como a obtenção de dados que norteassem os delineamentos posteriores, estabelecemos alguns questionamentos que resultaram em tres experimentos preliminares descritos a seguir:

a) EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE CICLOFOSFAMIDA NA VARIAÇÃO DO PESO VESICAL (Δ PESO)

Ratos machos, em número de 24 animais, divididos em 6 por grupos, foram tratados de maneira que no primeiro grupo administrou-se apenas água destilada(AD) via ip, enquanto que os três seguintes foram tratados com CF, via ip, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, nesta ordem.Os sacrifícios ocorrem passadas 48 horas dos tratamentos.

b) CINÉTICA DO EDEMA(Δ PESO) VESICAL EM RATOS TRATADOS COM 100 mg/kg DE CICLOFOSFAMIDA

Ratos machos,em número de 24 animais, foram divididos em quatro grupos, sendo que, excetuando-se o primeiro (controle), todos receberam ciclofosfamida na dose de 100 mg/kg, via ip. Dentre os tres grupos tratados, os sacrifícios ocorreram passados 24, 48 e 72 horas(h) da

administração da CF. Os animais foram avaliadas quanto ao Δ peso vesical.

c) AVALIAÇÃO TEMPORAL DAS MODIFICAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DE BEXIGAS DE RATOS TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA

Oito ratos machos foram submetidos a aplicações de CF na dose de 100 mg/kg de peso, via ip, mantidos numa caixa com água e comida livremente e sacrificados aos pares após 12, 24, 48 e 72 h da CF, respectivamente. As bexigas foram extirpadas, processadas conforme descrição anterior e analisadas sob microscopia ótica.

Microscopia das bexigas de outros dois ratos não tratados (normais) serviram de controle para as avaliações.

7.2 - EFEITO DOS TRATAMENTOS COM DEXAMETASONA, INDOMETACINA E NDGÁ NO PESO VESICAL (Δ PESO) DE RATOS TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA

Ratos Wistar, machos, em número de 36 animais, divididos em seis grupos, foram tratados da seguinte forma: um dos grupos recebeu apenas ciclofosfamida na dose de 100mg/kg de peso intraperitonealmente. Noutro foi injetado, via subcutânea (sc), 2mg/kg de indometacina 30 minutos antes e 24 h depois da administração de CF na mesma dose anterior. Desta mesma maneira, 30 minutos antes de tratar os

demais grupos com semelhante dose de CF, os animais receberam injeções, via SC de 1mg/kg de dexametasona e 50 mg/kg do composto NDGA, respectivamente. Doses idênticas de drogas com que cada grupo foi tratado foram administradas passadas 24 horas da utilização da CF. Os animais foram mantidos e sacrificados como exposto anteriormente, ao final de 48 horas.

7.3 - EFEITO DA CICLOFOSFAMIDA NAS VARIAÇÕES DO PESO VESICAL ÚMIDO E DA PERMEABILIDADE VASCULAR DE BEXIGAS DE RATOS .

Utilizamos 12 ratos Wistar machos, divididos em dois grupos de igual número de animais. O primeiro grupo recebeu apenas AD via intra-peritoneal, enquanto que nos demais aplicou-se CF na dose de 100 mg/kg, via ip. Uma hora antes dos sacrifícios , os animais foram injetados com azul de Evans, nas concentrações e doses já demonstradas anteriormente, e suas bexigas foram avaliadas quanto ao éxtravazamento do azul de Evans pela técnica exposta no item 6.3 e quanto ao peso úmido conforme item 6.2

7.4 - CINÉTICA DO PESO VESICAL ÚMIDO E DA PERMEABILIDADE VASCULAR NA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

Um total de 50 ratos receberam injeções intraperitoneais de CF na dose de 100 mg/kg de peso. Dez outros animais, os quais não foram tratados com CF, foram sacrificados e avaliados quanto ao pesos úmidos e permeabilidade vascular de suas bexigas. Os demais animais foram mortos em grupos de dez, após 6, 12, 24, 48 e 72 horas, respectivamente. As bexigas, de forma semelhante ao que ocorreu no grupo anterior, o qual serviu de controle para o experimento, tiveram seus pesos úmidos e permeabilidades vasculares determinadas pelas técnicas padronizadas para este trabalho de tese.

Os dados obtidos foram utilizados para realizar um estudo de correlação a fim de verificar a existência ou não de dependência entre as duas variáveis estatísticas.

7.5 - EFEITOS DE DOSES CRESCENTES DE DEXAMETASONA, INDOMETACINA E NDGA NO PESO VESICAL ÚMIDO E PERMEABILIDADE VASCULAR NA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

Um total de 50 ratos foram separados em número de cinco por caixa (dez grupos). Os animais do primeiro grupo receberam CF, via ip, na dose de 100 mg/kg. Três outros grupos foram submetidos a injeções subcutaneas(sc) de dexametasona, 30 minutos antes da CF(100 mg/kg), nas dose de 0.5, 1 e 2 mg/kg, respectivamente. Mais tres grupos, obedecendo os mesmos horários, foram pré-tratados (30 minutos antes da CF) com 0.5 , 2 e 5 mg/kg de indometacina, via sc, respectivamente. As doses correspondentes a cada grupo foram repetidas . Os grupos

restantes foram tratados nos mesmos termos que os anteriores no que diz respeito aos horários e vias de administrações, com doses de 25, 50 e 100 mg/kg de NDGA, além de CF.

Aos animais, sacrificados após 48 horas, foram dados tratamentos semelhantes aos de outros experimentos no sentido de obter os pesos vesicais úmidos e as permeabilidades vasculares.

7.6 - EFEITO DO COMPOSTO BN-52021 NA CINÉTICA DA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

Quinze ratos, separados em grupos de cinco animais, foram pré-tratados com 10 mg/kg de BN-52021, um inibidor do PAF, injetado via sc 30 minutos antes de receberem 100 mg/kg de CF, via ip. Os primeiros cinco animais foram sacrificados após seis horas da CF; mais cinco, após 12 horas e os últimos, 48 horas. Este grupo recebeu um dose adicional de BN-52021, idêntica a primeira, passadas 24 h da CF.

Cinco animais foram submetidos a injeção de apenas CF, objetivando exclusivamente avaliar a eficiência da droga em uso em produzir cistite.

Mais uma vez, as bexigas foram analisadas pelas mesmas metodologias já descritas, objetivando determinar o peso úmido e permeabilidade vascular. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles da cinética de animais que receberam somente CF.

7.7 - EFEITO DO COMPOSTO HOE-140 NA CINÉTICA DA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

Dezoito ratos receberam injeções de 2.0 mg/kg de HOE-140, um inibidor da bradicinina, via sc administradas 30 minutos antes de 100 mg/kg de CF, via ip. Seis animais foram sacrificados após seis horas e outros tantos após 12 horas. Os restantes receberam novas doses de HOE-140 idênticas as primeiras, depois de 24 h da CF. As bexigas foram utilizadas para avaliações dos pesos úmidos e permeabilidades vasculares.

Para efeito de comparação dos dados lançamos mãos da cinética do item 7.4.

7.8 - EFEITO DA DEPLEÇÃO DE MASTÓCITOS NA CINÉTICA DA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

A diminuição do número de mastócitos teciduais foi conseguido através de injeções repetidas do composto 48/80. A solução a ser administrada, numa concentração de 0.1%, foi conseguida através da dissolução deste composto, em sua forma liofilizada, em solução fisiológica.

Os animais foram tratados durante 4 dias da seguinte forma: duas injeções, via ip diárias, com intervalos mínimos de 10 e máximo de 12 horas; nas doses de 0.6 mg/kg, do primeiro ao terceiro dia, e 1.2 mg/kg no quarto dia, em mesmo número, via e intervalo de tempo dos primeiros

dias (**Di Rosa et al. , 1971**). Os experimentos foram realizados no quinto dia.

A eficiência da depleção dos mastócitos foi determinada pelo método de **Souza & Ferreira** (1985) e consistiu na contagem dos mastócitos nas cavidades peritoneais de ratos que receberam(06) ou não(06) o composto 48/80.

Para tanto, imediatamente após os sacrifícios, injetamos 10 ml de uma solução contendo albumina(a 3%) , numa proporção de 1:100 com PBS e acrescida de 0.1 ml de heparina para cada 100 ml de PBS. Massageamos os abdomens dos ratos por 90 segundos, aproximadamente, abrimos os peritoneos e recolheu-se cerca de 5 ml do exsudato de cada cavidade isoladamente.

Os exsudatos foram centrifugados por cerca de cinco minutos, numa velocidade de 1000 rpm. Em seguida desprezou-se os sobrenadantes e diluimos os sedimentos em 100µl de albumina. Alíquotas de 40 µl destas soluções foram adicionadas em 160 µl de azul de toluidina a 0.1 % e postas em camaras de Neubauer e praticou-se a contagem nos quadrantes externos, em microscópio ótico Os resultados foram expressos em médias do percentual de mastócitos e erro padrão (EPM).

Finalmente, uma vez depletados de mastócitos, os animais em número de 18, foram tratados com CF na dose de 100 mg/kg, sacrificadas, seis a seis, após seis, doze e 48 horas após. As bexigas foram avaliadas quanto ao peso úmido e permeabilidade vascular.

7.9 - EFEITO DO L-NAME NO PESO VESICAL ÚMIDO E NA PERMEABILIDADE VASCULAR NA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

Utilizamos 30 ratos divididos em cinco grupos. O primeiro grupo recebeu apenas CF na dose de 100 mg/kg, via ip, enquanto que os demais grupos, 30 minutos antes de idêntica dose de CF, sofreram administrações de L-NAME em doses de 2.5, 5, 10 e 20 mg/kg, respectivamente, via ip. As doses correspondentes a cada grupo foram repetidas depois de seis horas da aplicação de CF.

Os animais foram sacrificados passadas 12 horas dos tratamentos com CF, avaliados seus pesos e permeabilidades vasculares vesicais.

7.10 - EFEITO DO L-NAME NA CINÉTICA DA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

Lançamos mão da mesma metodologia aplicada nos experimentos anteriores no que diz respeito a avaliação vesical. Para tanto, injetamos em vinte ratos, divididos em quatro grupos, 20 mg/kg de peso de L-NAME, via ip divididos em duas doses iguais/dia, sendo a primeira 30 minutos antes de ser administrada CF (100 mg/kg).

Na sexta hora, enquanto sacrificávamos o primeiro grupo, injetamos novas doses de L-NAME nos demais. Após 12 horas novo grupo foi sacrificado. Um terceiro, na 24a hora, ao mesmo tempo que outras doses de L-NAME eram administradas nos demais. Por fim, o

último grupo foi sacrificado após 48 horas, tendo recebido uma nova dose de L-NAME na trigéssima hora.

Os dados foram comparados com a cinética da cistite de animais tratados exclusivamente com CF.

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

Em três grupos, cujos animais haviam sido submetidos a injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de L-NAME, via ip, tratou-se, trinta minutos após, com 100 mg/kg de peso de CF. Ao mesmo tempo em que se administrava esta droga, procedeu-se a injeções de L-arginina, nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg, respectivamente. Uma segunda administração de semelhantes doses de L-NAME e L-arginina foi repetida para os grupos específicos depois de seis horas da anterior. Um quarto grupo, cujo objetivo era servir como controle, recebeu apenas CF de forma idêntica aos demais.

Todos os animais foram sacrificados na décima segunda hora do uso da primeira dose da CF.

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

Um total de 24 ratos, distribuídos em quatro caixas e denominados de grupo um a quatro, foram tratados da seguinte forma: o primeiro grupo recebeu apenas CF(100 mg/kg), intraperitoneal. O segundo, além de CF, recebeu 30 minutos antes e seis horas após L-NAME na dose de 10 mg/kg, via ip. Quanto ao terceiro, este recebeu além da CF e do L-NAME nos mesmos esquemas posológicos, 600 mg/kg/dia de L-arginina, dividida em duas aplicações que obedeceram os mesmos horários e vias de administração do L-NAME. Finalmente, o último grupo, tratado com CF e L-NAME da mesma maneira que o anterior, adicionou-se 600 mg/kg/dia de D-arginina da mesma forma com que foi usada a L-arginina.

Após sacrifícios na décima segunda hora, obteve-se, por semelhantes processos, os pesos úmidos e permeabilidades vasculares das bexigas destes ratos.

7.13 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aos resultados obtidos foram aplicados tratamentos estatísticos para determinações das estimativas pontuais das médias dos grupos, bem como das medidas de dispersão representadas pelo desvio padrão e erro padrão da média (EPM), que nos deu os afastamentos com que as médias amostrais se apresentavam em relação a média aritmética real da população analisada.

Para verificação de diferenças significativas entre médias em caso de apenas dois tratamentos, utilizamos o teste t (Student) para dados independentes (não emparelhados). No caso de comparação de mais de

uma média lançamos mãos de análises de variâncias (ANOVA) e aplicamos o teste de Fisher utilizando níveis de significância maior que 95% ($p < 0.05$) (**Fisher, 1966**).

Para avaliarmos a dependência da absorbância e concentração de azul de Evans estabelecemos uma correlação linear, seguido de análise de regressão a fim de expressar essa relação sob forma matemática, através da representação de uma função onde o x representasse a absorbância e o y as concentrações de azul de Evans

No que diz respeito ao peso úmido e a permeabilidade vascular medida pelo método do azul de Evans, demos idêntico tratamento estatístico referido no parágrafo anterior, objetivando estudar a interdependência das duas variáveis(**Rodrigues, 1986**).

III - RESULTADOS

1 - ANÁLISE PRELIMINAR DO MODELO

O objetivo primordial desta etapa do nosso trabalho de tese foi a obtenção de elementos que contribuíssem para traçar linhas gerais a serem seguidas nas etapas subseqüentes. Isto se deveu, sobretudo, ao fato de que tratava-se de um modelo experimental jamais utilizado no departamento em que desenvolvemos este trabalho, bem como de haver apenas uma modesta, por que não dizer escassa, quantidade de trabalhos experimentais na literatura indexada que tratassem do modelo em questão.

Como podemos verificar, na figura 01 o aumento do peso vesical (Δ peso) é dose-dependente, sendo que a dose de ciclofosfamida de 50 mg/kg não resultou em aumento estatisticamente significativo do Δ peso, ao passo que as doses de 100 e 200 mg/kg de peso foram eficiente em fazê-lo, de forma significativa ($p < 0.001$), não obstante nenhuma diferença estatisticamente significante haja entre estas últimas duas doses. Outro aspecto a se destacar é que não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes no peso dessecado nos animais tratados com CF quando comparados com o controle, bem como entre si.

Conseqüente ao resultado anterior, decidimos, a partir dos experimentos posteriores, adotar a dose-padrão de 100 mg/kg de peso, uma vez que nesta dosagem obtivemos a máxima resposta e, por conhecimento prévio (**Philips et al., 1961**) sabíamos que a mortalidade nas duas primeiras semanas de animais tratados com esta dose era desprezível estatisticamente.

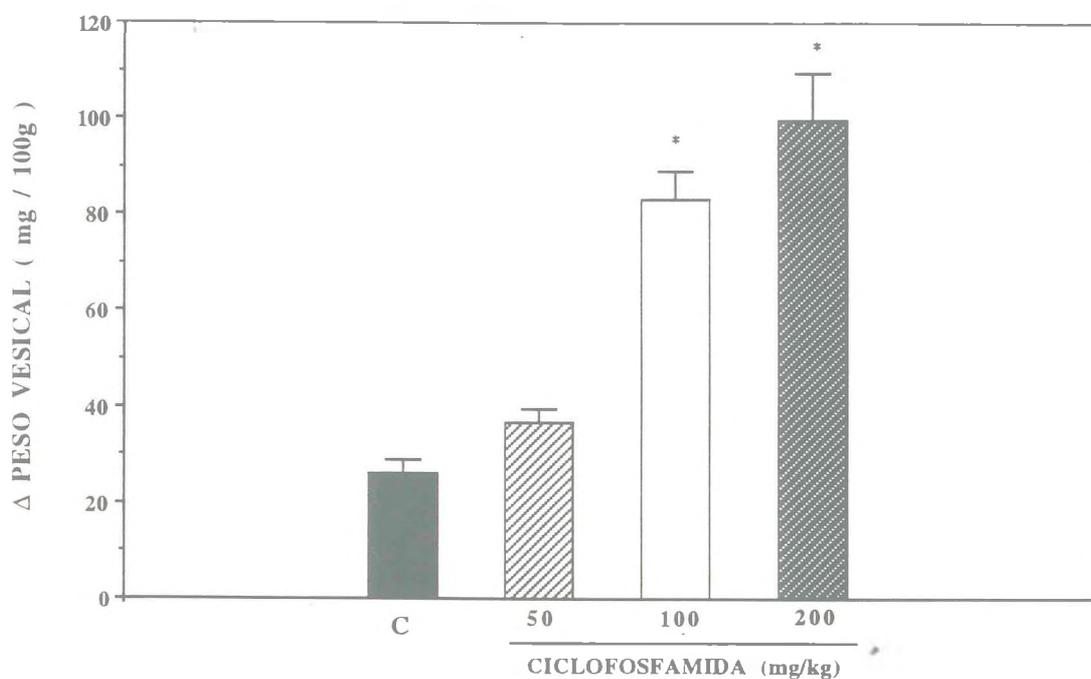


Figura 01. Efeito de doses crescentes de ciclofosfamida na diferença entre os pesos vesicais úmido e dessecado- Cada grupo foi constituído por seis animais, tratados individualmente com 50, 100 e 200 mg/kg de peso de CF, via ip. Os animais do grupo controle (C) receberam injeções ip de AD. Todos os animais foram sacrificados após 48 horas da CF. As barras representam a médias \pm EPM. (*) indica diferença estatisticamente significativa com relação ao controle (ANOVA, teste de Fisher).

A figura 02 demonstra que o aumento do Δ peso é tempo-dependente, sendo que já no primeiro dia (24 h) o peso aumento de uma maneira estatisticamente significativa com relação ao controle ($p < 0.01$) e tornou-se máximo após 48 horas da injeção da CF. Observou-se uma discreta tendência de queda do peso no terceiro dia, a despeito de não haver diferença estatisticamente significativa com relação aos valores de 48 horas.

Em condições normais, em face da pequena espessura parietal e elasticidade, a bexiga de ratos, quando repleta de urina, apresenta-se como um órgão translúcido, maleável e tem uma coloração pálida quando comparada com o intestino. Não há exuberância de vascularização, ao contrário, há apenas as duas artérias vesicais emergindo, uma de cada lado, de suas porções postero-laterais no sentido caudo-cranial. A figura 03- foto A mostra o aspecto microscópico de uma bexiga normal, podendo-se observar as ausências de descamação do epitélio transicional, edema e congestão vascular, bem como um infiltrado leucocitário apenas discreto.

Passadas seis horas da administração da CF, pode-se observar, macroscopicamente, um aumento do volume vesical, edema dos lobos prostáticos, aumento discreto da espessura da parede, porém não é bem evidente a hiperemia ou presença de focos hemorrágicos parietais. Após 12 horas, a parede vesical apresenta-se espessada, opaca, com pontos hemorrágicos parietais e foco bem definidos na mucosa. Na vigéssima quarta hora o incremento volumétrico vesical persiste, há áreas (focos) bem definidas de hemorragia, bem como diminuição da flexibilidade da bexiga, o que dificulta sobremaneira a dissecção e extirpação deste órgão.

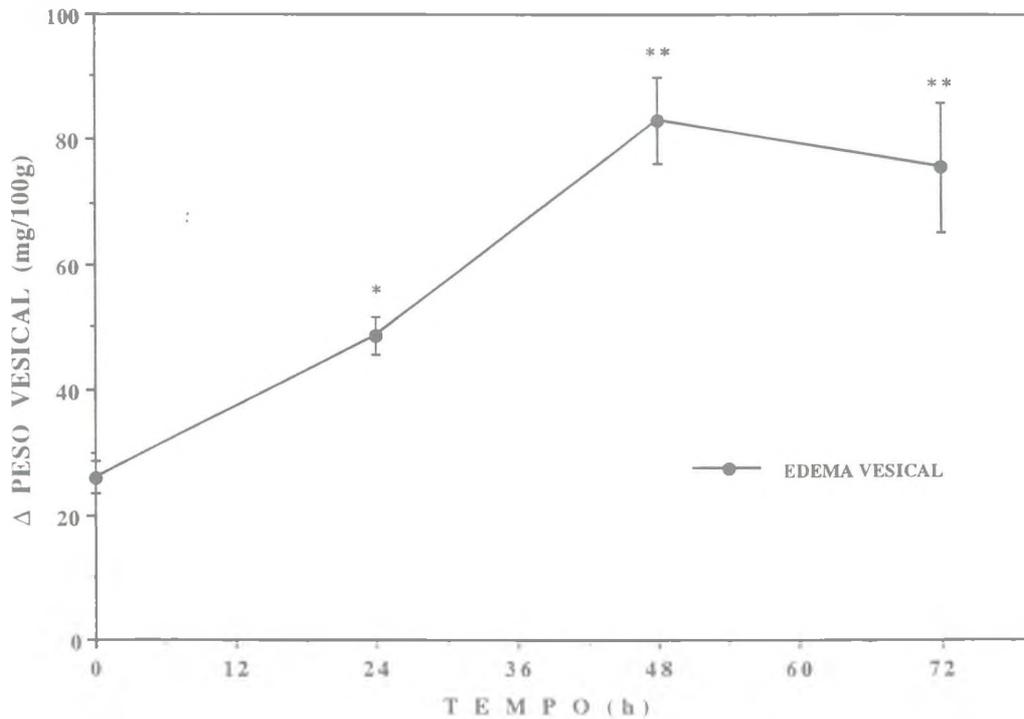


Figura 02. Cinética do edema vesical(Δ peso) em ratos tratados com 100 mg/kg de ciclofosfamida - Cada símbolo (•) representa a média \pm EPM da diferença entre os pesos vesicais úmido e dessecado referente a seis animais. O ponto correspondente no eixo do x diz respeito ao momento do sacrifício após a administração da CF. (*) e () indicam, respectivamente, diferenças estatisticamente significativas com $p < 0.01$ e $p < 0.001$ (ANOVA, teste de Fisher).**

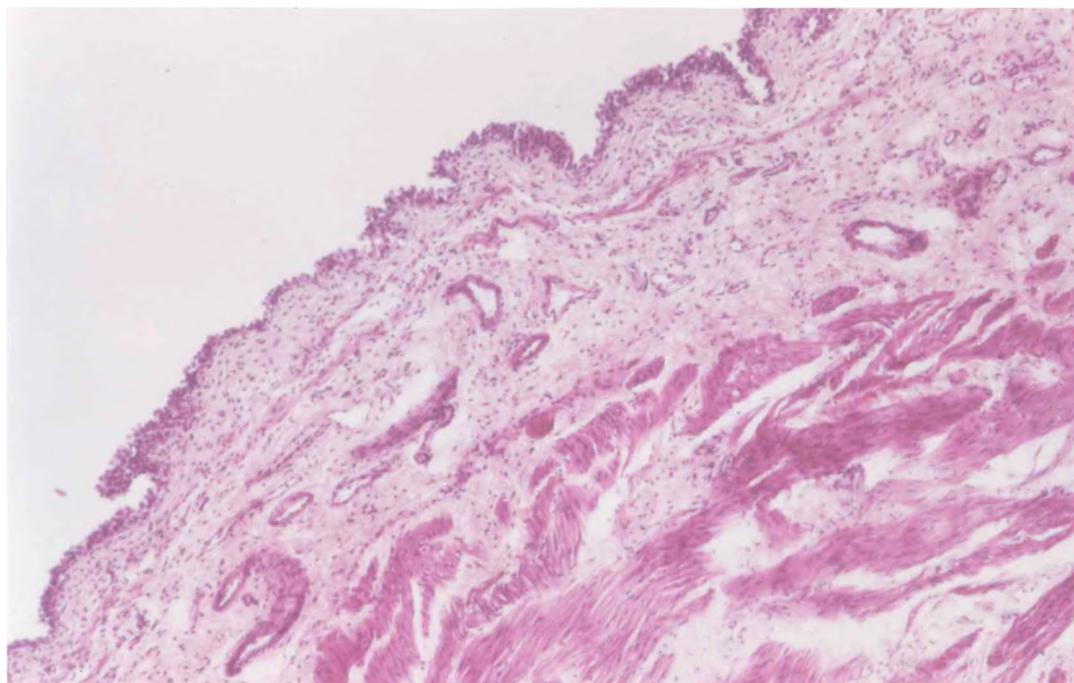


Figura 03 - foto A - Microfotografia de bexiga normal de rato. Observe a integridade da mucosa, a ausência de edema e exsudato celular. Coloração HE (4 x 10).

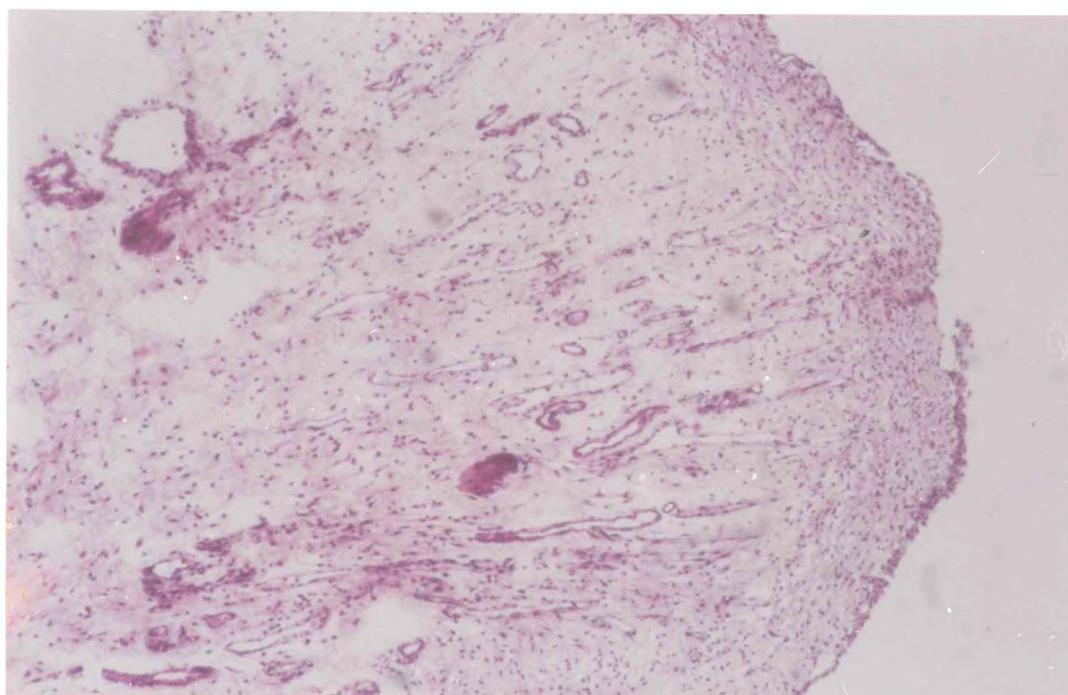


Figura 03 - foto B - Microfotografia de bexiga de ratos tratados com 100 mg/kg de CF e sacrificados após 48 h. Nota-se trecho de ulceração, acentuado edema e infiltrado leucocitário. Coloração HE (4 x 10).

A expressão dos achados histopatológicos obedeceram aos critérios estabelecidos por Gray e colaboradores (**Gray et al.,1986**), de tal forma que na décima segunda hora as bexigas já apresentavam edema e erosão leves, além de um infiltrado leucocitário constituído de neutrófilos e macrófagos, com predomínio deste último. Vinte quatro horas depois, observa-se um exsudato constituído de neutrófilos e macrófagos, agora predominando o primeiro, bem como raros eosinófilos na mucosa, associados a um leve edema, os quais se tornaram máximo após 48 horas da administração da CF (Figura 03- foto B). Nesse momento, além do edema que atinge sua máxima intensidade, ainda se pode observar áreas de descamações e ulcerações da mucosa (erosões), além de hemorragia não só na mucosa, as quais já eram evidentes na vigéssima quarta horas, mas de toda a espessura da parede vesical. O infiltrado inflamatório é marcante nesta etapa, preponderando os neutrófilos com relação aos macrófagos Quanto a macroscopia, os achados nesta etapa correlacionam-se com os descritos acima, na medida em que a a bexiga atinge seu peso máximo, embora tenha o aspecto retrátil e excepcionalmente apresente-se repleta de urina. Soma-se a isto, o fato de que a hemorragia é surpreendente, tanto na mucosa quanto na parede vesical, bem como o fato de que, em função do edema , a bexiga adere às estruturas dos órgãos adjacentes, dificultando a dissecação necessária para a individualização do órgão.

Setenta e duas horas depois da CF. à inspeção (macroscopia), as bexigas têm praticamente o mesmo aspecto descrito para aquelas de 48 h. exceto o edema que diminuiu, embora o estudo microscópico tenha revelada, associado aos achados anteriores, a existência de um pleomorfismo discreto do epitélio transicional com relação as bexigas de

48 h. Importante ainda é a presença de áreas nucleares arredondadas, claras e excêntricas, as quais, devido seu aspecto, assemelhavam-se com depósitos de glicogênio, bem como de uma diminuição do infiltrado celular com relação ao dia anterior.

Desta forma, baseados nos resultados supracitados, passamos a utilizar nos experimentos subseqüentes, além da dose de 100 mg/kg, a quadragéssima oitava hora como momento ideal para o estudo deste fenomeno inflamatório.

2 - EFEITO DOS TRATAMENTOS COM DEXAMETASONA, INDOMETACINA E O COMPOSTO NDGA NO PESO VESICAL(Δ PESO) DE RATOS TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA

Como podemos observar na figura 04, o pré-tratamento do animais com dexametasona(inibidor de fosfolipase A₂) na dose de 1mg/kg de peso foi capaz de bloquear, de maneira significativa ($p < 0.001$), o edema vesical induzido por ciclofosfamida.

Quanto a indometacina(inibidor da cicloxigenase)(figura 04), usada na dose de 2mg/kg de peso, foi eficiente na promoção do bloqueio do aumento do peso vesical($p < 0.01$) em animais tratados com CF. Entretanto, aqueles animais tratados com o composto NDGA(inibidor da ciclo e lipoxigenase) não apresentaram bloqueio do edema vesical (figura 04), embora, do ponto de vista macroscópico era evidente a diminuição dos focos hemorrágicos, tanto parietais como da mucosa. Por este motivo nos ocorreu a idéia de adaptar para nosso modelo a metodologia de mensuração da permeabilidade vascular proposta por

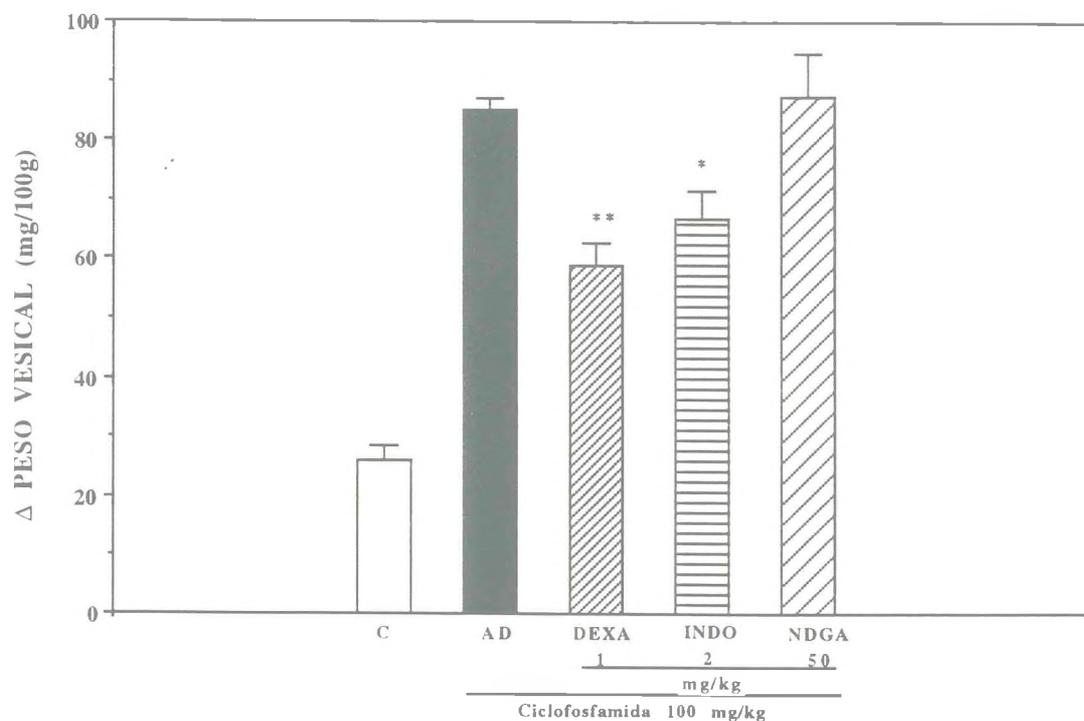


Figura 04. Efeito dos tratamentos com dexametasona, indometacina e composto NDGA na diferença entre os pesos vesicais úmido e dessecado (Δ peso) em ratos tratados com 100 mg/kg de peso de ciclofosfamida - As barras representam a média \pm EPM referente a seis animais e os resultados foram comparados com o grupo de animais que receberam somente AD, via ip. (*) e (**) representam, respectivamente, diferenças estatisticamente significativas com $p < 0.05$ e $p < 0.001$. (ANOVA, teste de Fisher)

Garcia e Wilhelm(1975), os quais utilizavam a técnica do azul de Evans para aferir o aumento de permeabilidade em pele de ratos.

3 - EFEITO DA CICLOFOSMIDA NAS VARIAÇÕES DO PESO VESICAL ÚMIDO E NA PERMEABILIDADE VASCULAR.

Na figura 05 é evidente a eficiência da metodologia para avaliar a permeabilidade vascular no modelo da CIC; haja vista que a permeabilidade aumenta 17,8 vezes com relação ao controle, ao passo que o peso, embora de forma significativa ($p < 0.001$), aumentou apenas 3.47 vezes com relação ao controle.

A necessidade de expressar a permeabilidade vascular sob forma de uma grandeza de mais fácil compreensão, nos levou a desenvolver uma curva padrão de azul de Evans(figura 06), segundo metodologia descrita no ítem II-6.4 , a qual nos revelou a existência de uma correlação linear entre a concentração de azul de Evans e a absorbância. Esta relação pode ser expressa sob a forma de uma equação matemática que passou a ser usada posteriormente para a conversão dos valores dos experimentos posteriores. Vale salientar que, a julgar pelo coeficiente de correlação e determinação, a própria unidade, ficou clara uma relação direta e linear entre as concentrações de azul de Evans e absorbância.

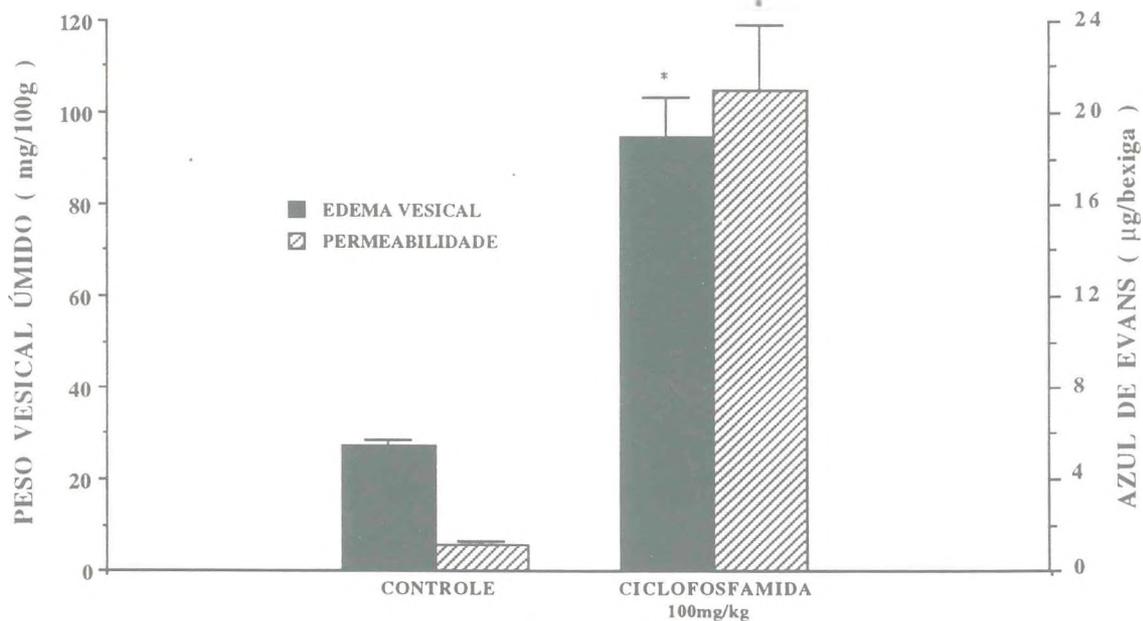


Figura 05. Efeito da ciclofosfamida no peso vesical úmido e permeabilidade vascular de bexigas de ratos tratados com ciclofosfamida - As barras representam a média \pm EPM do peso vesical e da permeabilidade vascular, conforme legenda, referentes a seis animais tratados com 100 mg/kg de peso de CF via ip.e sacrificados após 48 h (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (administrado apenas AD ip) com $p < 0.001$ (teste t de student)

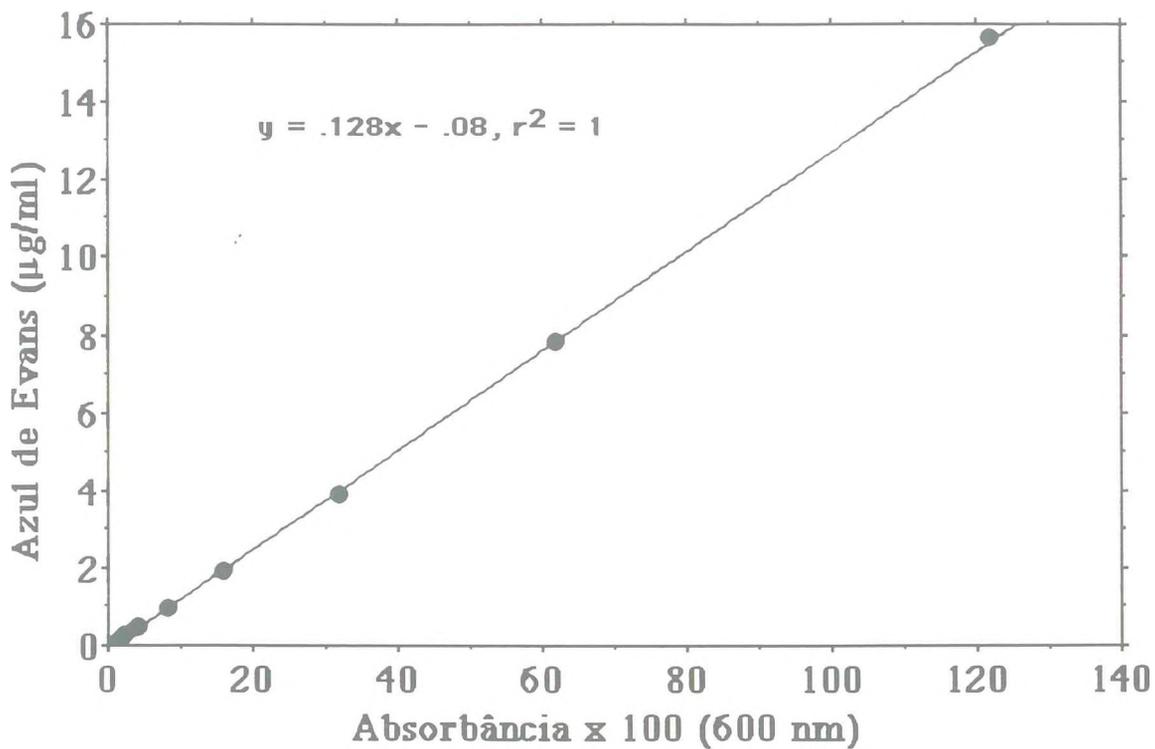


Figura 06. Curva padrão da correlação entre concentrações de azul de Evans e absorbância - Os pontos representam o resultado da análise no espectrofotômetro, num comprimento de onda de 600 nm. das concentrações de azul de Evans correspondentes no eixo de y. r é o coeficiente de determinação da regressão linear.

4 - CINÉTICA DO PESO VESICAL ÚMIDO E DA PERMEABILIDADE VASCULAR NA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

No que concerne ao peso vesical (figura 07), curiosamente, este já se encontrava significativamente elevado ($p < 0.001$) após seis e doze horas depois de administrada a CF; entretanto, só alcançaram valores máximos na quadragéssima oitava hora. Já no terceiro dia havia uma discreta tendência de decréscimo dos valores dos pesos, embora ainda fossem significantemente elevados ($p < 0.001$).

Quanto à permeabilidade, não obstante já estivesse aumentada de maneira estatisticamente significativa na sexta hora ($p < 0.01$), tornou-se máxima após 12 horas, permanecendo assim até a quadragéssima oitava hora, quando, tal como ocorreu com o peso, mostrou uma clara tendência a decrescer.

O estudo de interdependência entre as variáveis utilizadas (peso úmido e permeabilidade vascular) mostrou haver uma correlação positiva entre elas, sendo o coeficiente (r) de 0.718, o qual proporcionou a obtenção de um t (teste de hipótese) maior que o tabelado, comprovando, desta maneira, a dependência entre as variáveis (figura 08)

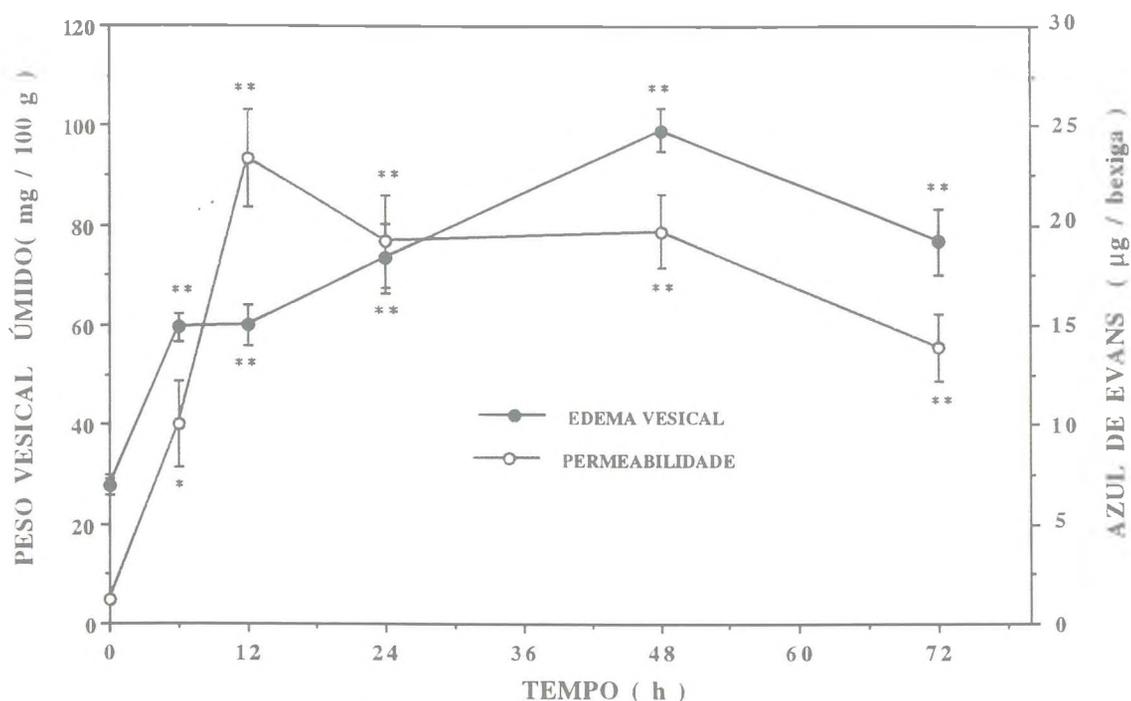


Figura 07. Cinética do peso vesical úmido e da permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida - Cada símbolo representa a média \pm EPM da permeabilidade vascular ou do peso vesical, conforme as legendas, referente a 10 animais. (*) e (**) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles específicos com $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente (ANOVA, teste de Fisher).

CORRELAÇÃO LINEAR

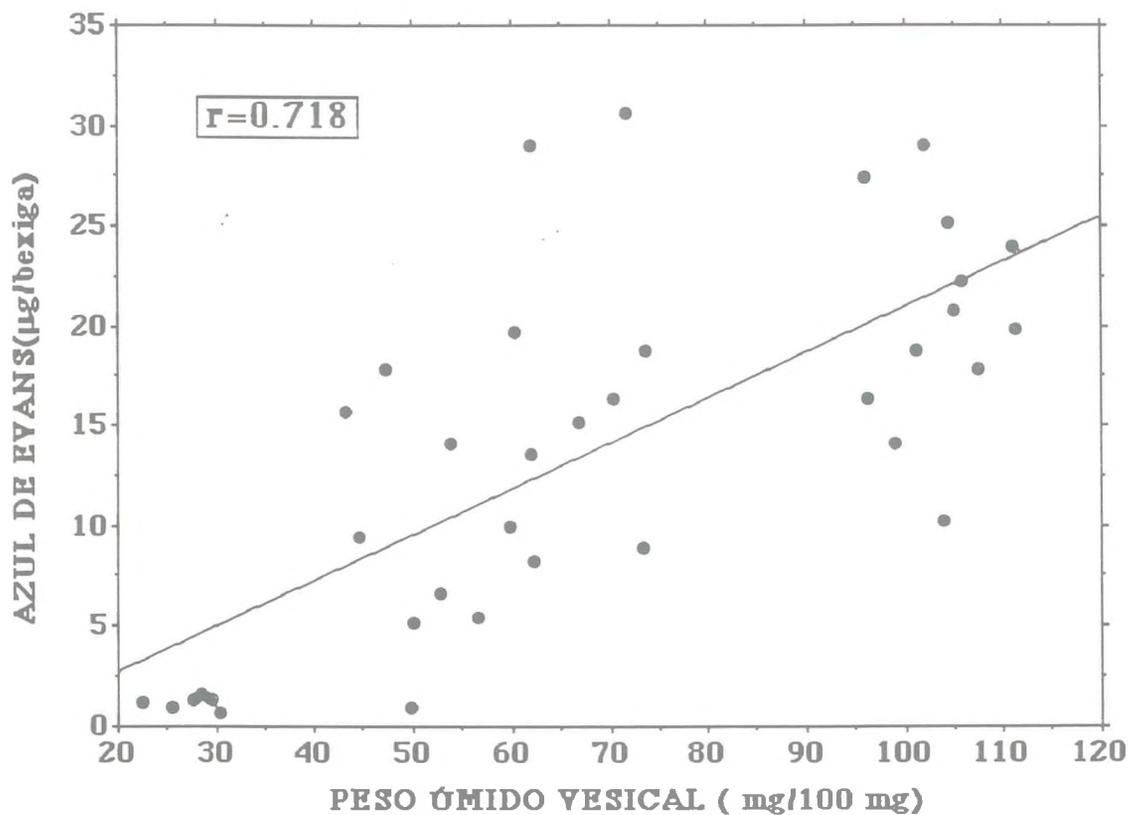


Figura 08 Estudo de correlação entre o peso vesical úmido e permeabilidade vascular - Cada símbolo (•) representa o valor individual referente ao peso vesical e sua correspondente permeabilidade vascular, avaliada pelo método do azul de Evans. O r indica o coeficiente de correlação.

5 - EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE DEXAMETASONA, INDOMETACINA E DO COMPOSTO NDGA NO PESO VESICAL ÚMIDO E PERMEABILIDADE VASCULAR NA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

Segundo podemos observar na figura 09 a dexametasona produziu inibição tanto do peso ($p < 0.01$) quanto da permeabilidade vascular ($p < 0.001$), de uma forma dose-dependente. A dose de 0.5 mg/kg ao dia foi eficiente em reduzir a permeabilidade, embora não tendo inibido o aumento do peso determinado pela CF. Quanto a microscopia, as lâminas de bexigas dos animais pré-tratados com dexametasona mostravam diminuição do edema, erosão e abolição do acúmulo de células inflamatórias, embora tenha persistido um grau leve de congestão vascular (Figura 10 - fotografia A)

A indometacina (figura 11) conseguiu bloquear o aumento de peso úmido e permeabilidade vascular vesicais de uma forma dose-dependente, sendo que a máxima inibição da permeabilidade foi conseguida com a dose de 5.0 mg/kg, mesma dose foi a única a bloquear o edema(peso úmido). A indometacina, a despeito de ter produzido diminuição expressiva do edema na análise histopatológica, não interferiu no desenvolvimento das erosões, congestão vascular e do infiltrado inflamatório(Figura 14-foto A e B)

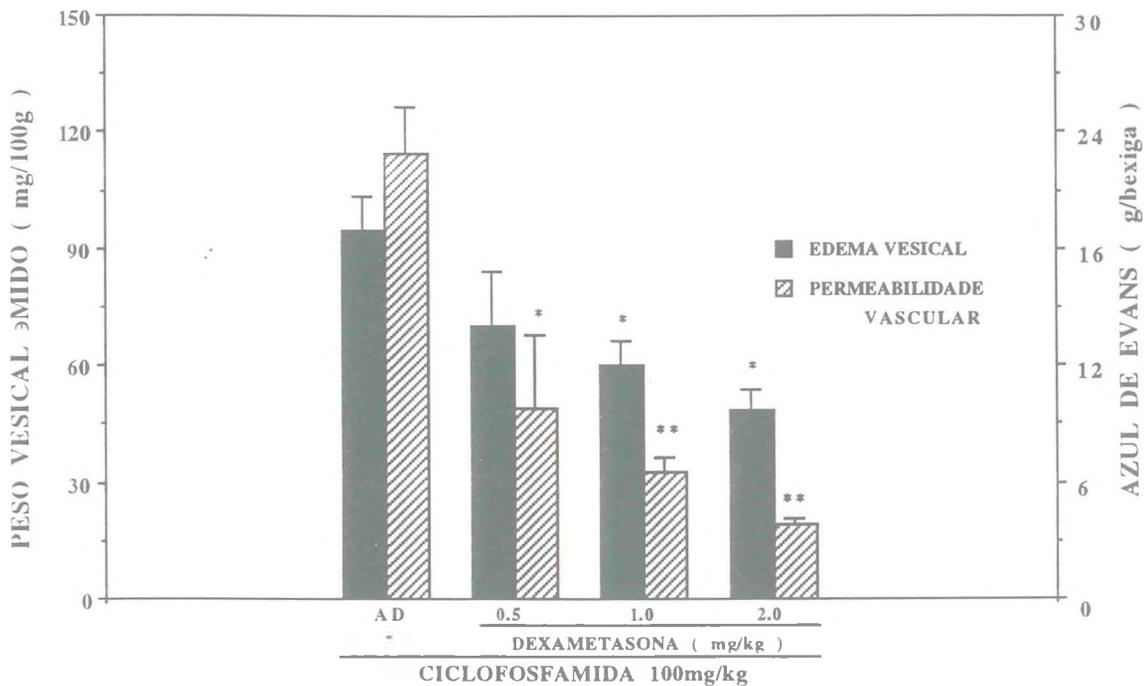


Figura 09. Efeito do pré-tratamento com doses crescentes de dexametasona no peso vesical úmido e na permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida - A dexametasona foi administrada nas doses de 0.5 , 1 e 2 mg/kg de peso, via sc, 30 minutos antes e 24 h depois da CF e os sacrifício se deram passadas 48 horas. As barras representam médias \pm EPM referentes a cinco animais cada. (*) e (**) indicam diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle com $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente (ANOVA, teste de Fisher).

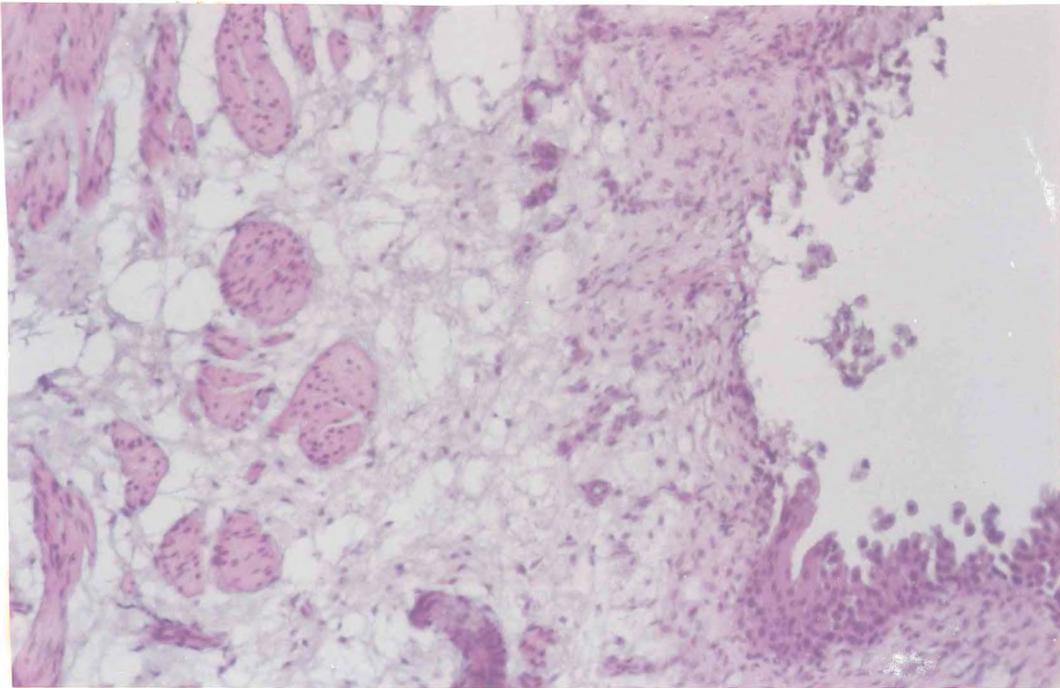


Figura 10 - foto A - Microfotografia de bexiga de ratos pré-tratados com dexametasona nos quais se induziu CIC . Observe a diminuição do edema e do infiltrado celular, embora ainda haja descamação epitelial.

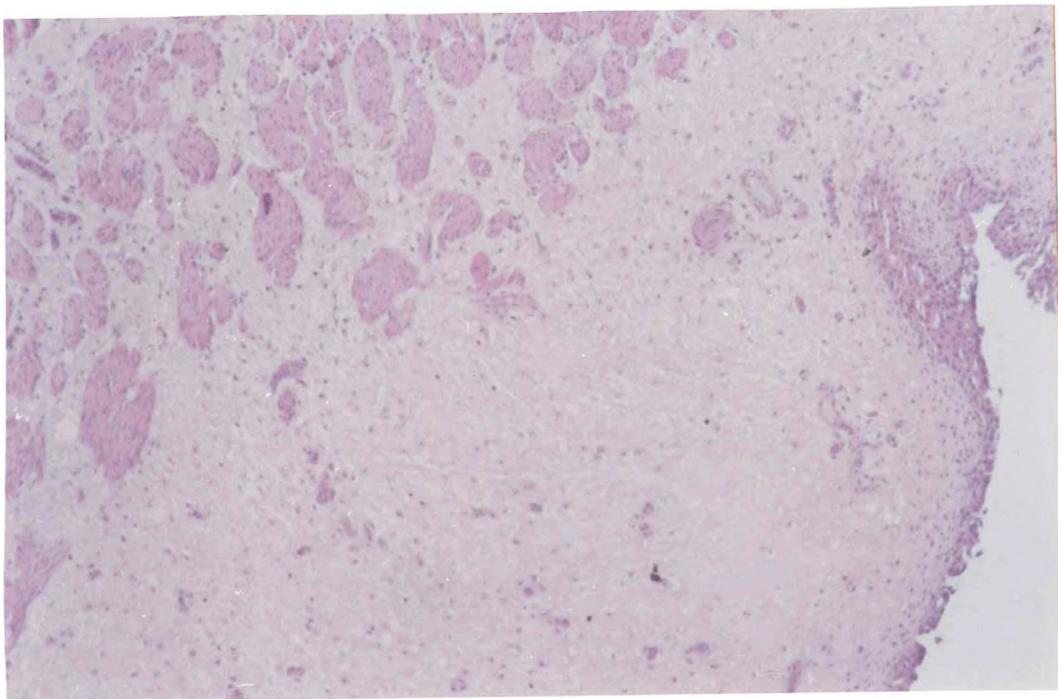


Figura 10- foto B - Microfotografia de bexiga de ratos pré-tratados com NDGA nos quais se induziu CIC. A coloração HE (4 x 10). Observe que ainda há edema, porém diminuiu o infiltrado celular e as erosões.

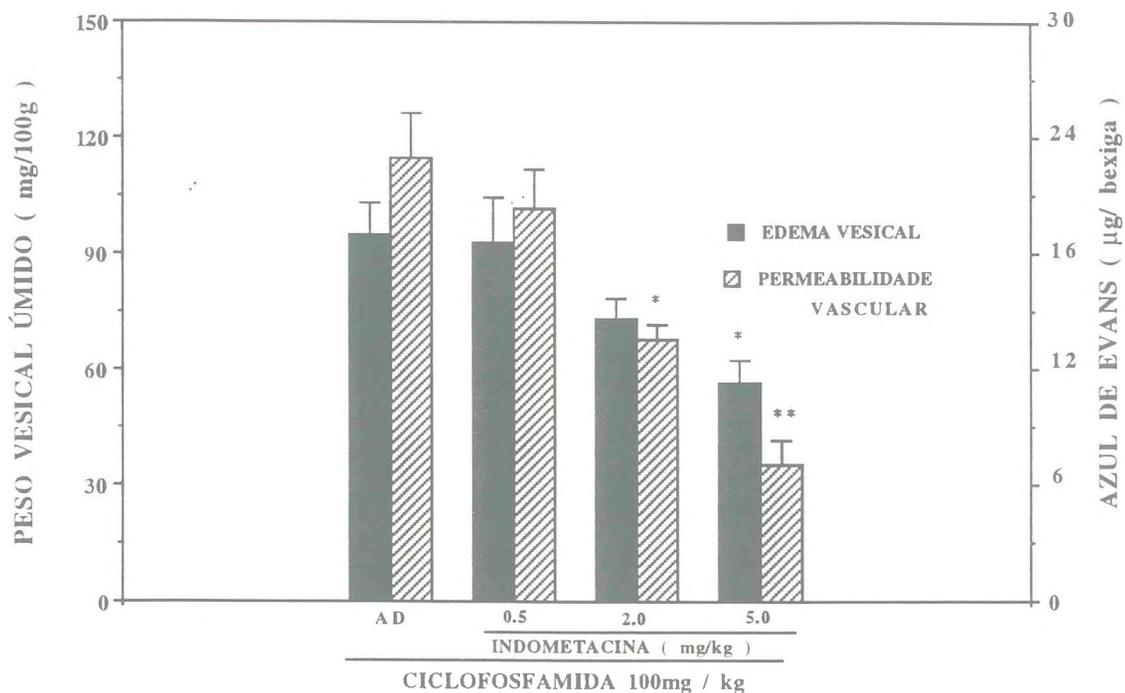


Figura 11. Efeito do pré-tratamento com doses crescentes de indometacina no peso vesical úmido e na permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida - A indometacina foi administrada nas doses de 0.5 , 2 e 5 mg/kg de peso, via sc, 30 minutos antes e 24 h depois da CF e os animais foram sacrificados 48 horas depois. As barras representam médias \pm EPM referentes a cinco animais cada. (*) e (**) indicam diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle com $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente (ANOVA, teste de Fisher).

Quanto ao NDGA (figura 12), somente produziu inibições estatisticamente significativas do peso ($p < 0.01$) e da permeabilidade vascular ($p < 0.001$) na dose de 100 mg/kg ao dia. Quanto às alterações histopatológicas, o NDGA inibiu parcialmente o edema e a erosão da mucosa, ao passo que impediu totalmente o acúmulo de células inflamatórias.

6 - EFEITO DO COMPOSTO BN-52021 NA CINÉTICA DO PESO ÚMIDO E PERMEABILIDADE VASCULAR NA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

O gráfico da figura 13 revela que o tratamento pré-tratamento com o BN-52021 foi capaz de bloquear de maneira significativa ($p < 0.01$) a permeabilidade vascular vesical dos ratos em que se tentou induzir cistite com ciclofosfamida. Esta inibição foi detectada após doze horas da CF, porém, no caso do edema (peso úmido) só determinou bloqueio passadas 48 horas da CF.

O BN-52021 produziu bloqueio em todos os níveis dos critérios microscópicos de Gray, de tal forma que praticamente não se observaram edema, congestão vascular, erosões ou exsudato inflamatório celular.

7 - EFEITO DO COMPOSTO HOE-140 NA CINÉTICA DA CISTIE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

O tratamento com este inibidor da bradicinina produziu um bloqueio significativo da permeabilidade vascular ($p < 0.05$) à partir da

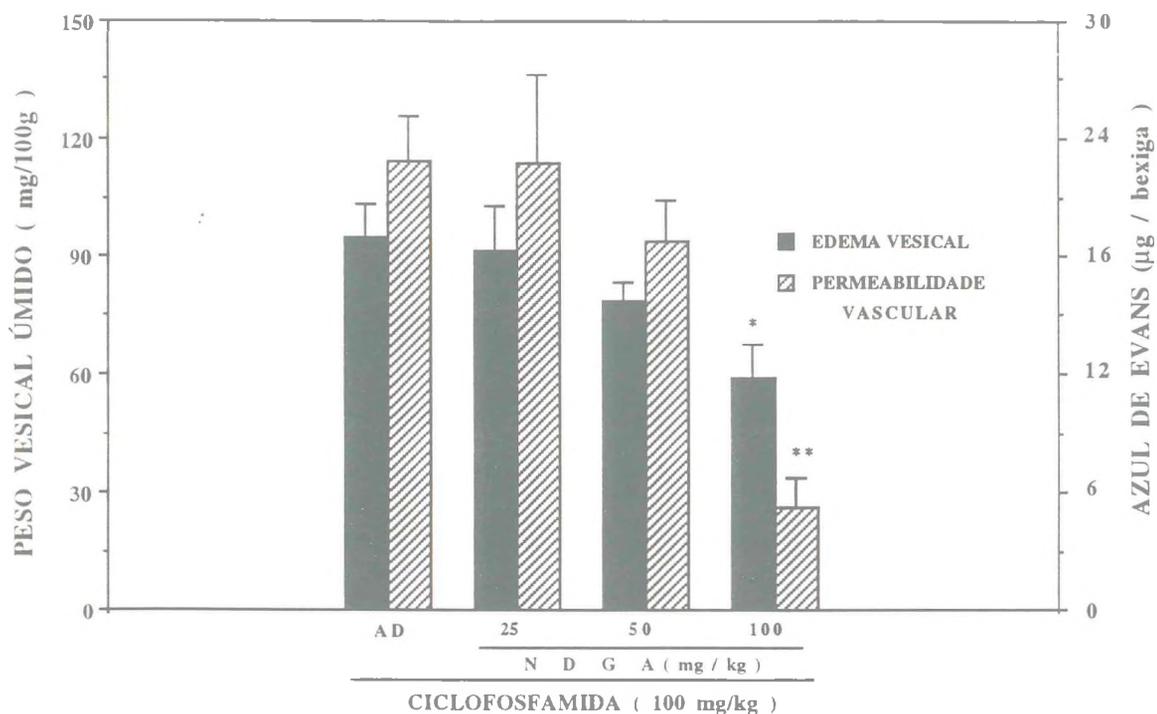


Figura 12. Efeito do pré-tratamento com doses crescentes do composto NDGA no peso vesical úmido e na permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida - O NDGA foi administrado nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg de peso, via sc, 30 minutos antes e 24 h depois da CF e os animais foram sacrificados 48 h depois da indução da cistite. As barras representam média \pm EPM referentes a cinco animais cad. (*) e (**) indicam diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle com $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente (ANOVA, teste de Fisher).

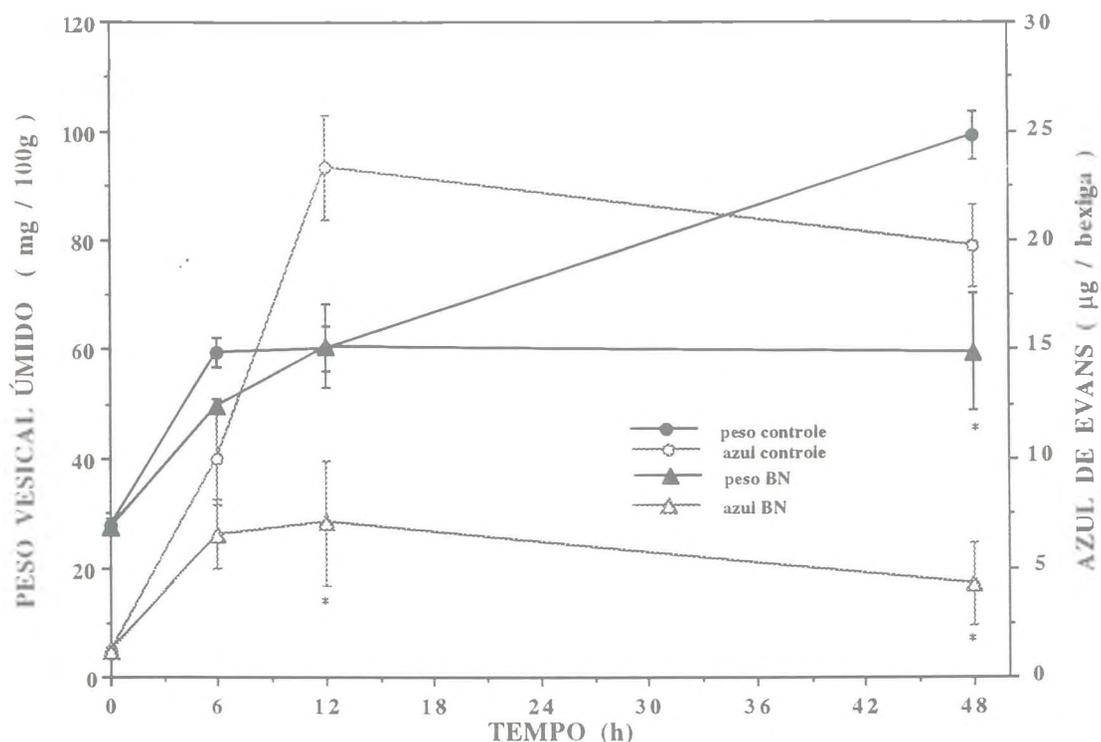


Figura 13. Efeito do composto BN-52021 na cinética da cistite induzida por ciclofosfamida - Cada símbolo representa média \pm EPM do peso vesical úmido ou da permeabilidade vascular, segundo a legenda apresentada no gráfico, referentes a dez animais, no caso da CF(controle) e cinco animais nos grupos tratados com 10 mg/kg de peso/dia de BN-52021, via sc. O eixo do x corresponde aos horários, após a CF, em que os animais foram sacrificados. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (animais tratados só com CF e sacrificados nos mesmos horários) com $p < 0.01$ (ANOVA, teste de Fisher).

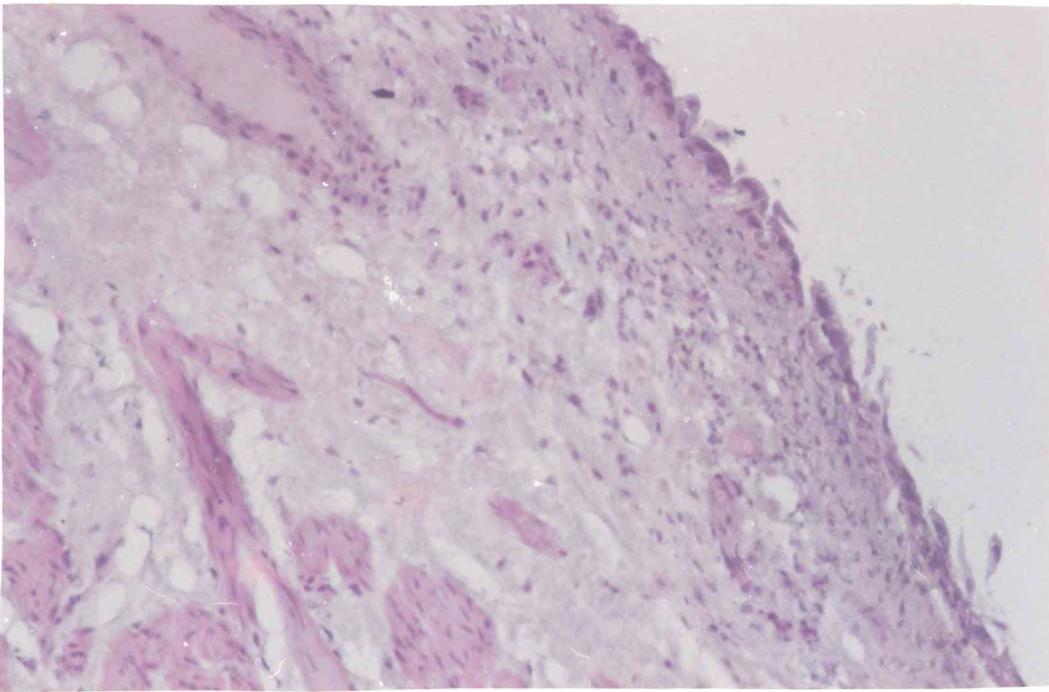


Figura 14- foto A - Microfotografia de bexiga de rato pré-tratado com indometacina no qual se induziu CIC. Coloração HE (10 x 10). Observa-se a diminuição do edema muito embora permaneçam as erosões e o infiltrado inflamatório.

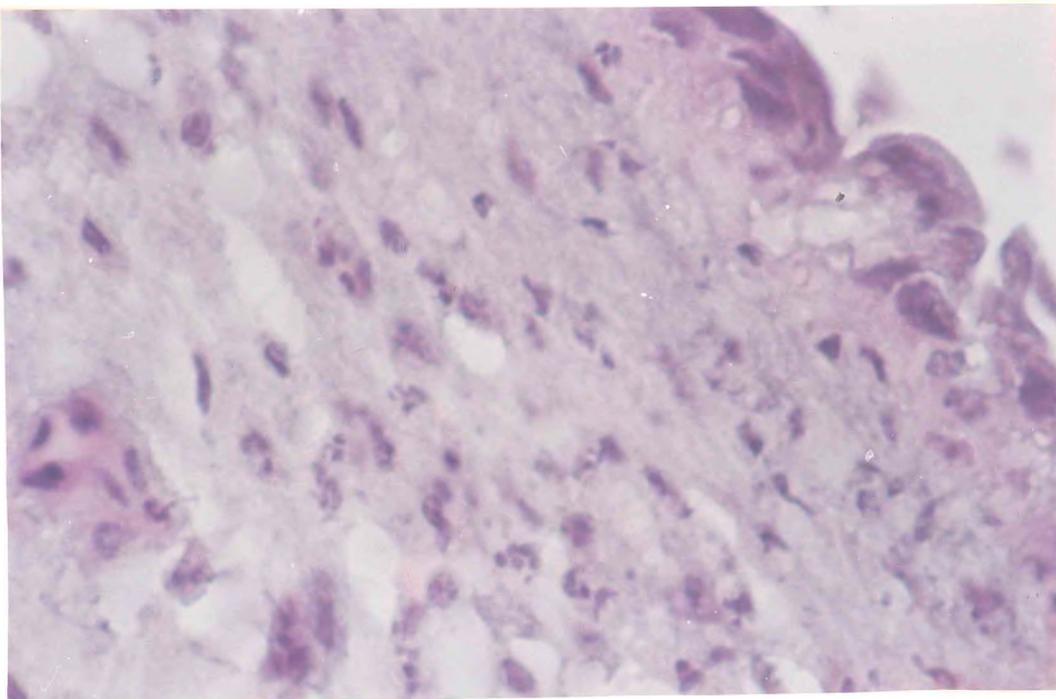


Figura 14 - foto B - Trata-se da mesma microfotografia acima em maior aumento (40 x 10) demonstrando o infiltrado celular inflamatório em maior detalhe.

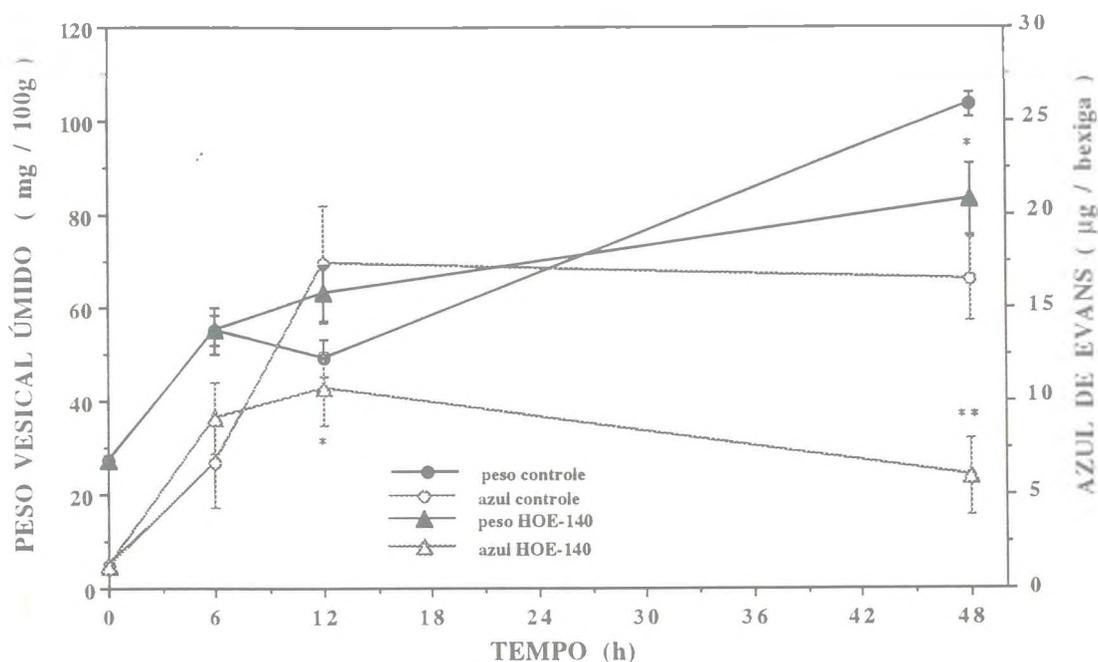


Figura 15. Efeito do composto HOE-140 na cinética da cistite induzida por ciclofosfamida - Cada símbolo representa média \pm EPM do peso vesical úmido ou da permeabilidade vascular, conforme as legendas, referentes a dez animais, no caso da CF (controle) e cinco nos grupos tratados com 2.0 mg/kg de peso/dia de HOE-140, via sc. O eixo do x corresponde aos horários, após a CF em que os animais foram sacrificados. (*) e (**) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (animais tratados só com CF e sacrificados nos mesmos horários) com $p < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente(ANOVA, teste de Fisher).

décima segunda hora, tendo sido máximo 48 h depois da administração da CF ($p < 0.01$). Quanto ao edema, o HOE-140 somente proporcionou um bloqueio estatisticamente significativo após 48 horas ($p < 0.01$) (figura 15).

A histopatologia demonstrou que bloqueou parcialmente todos os eventos inflamatórios incluído nos critérios de Gray, embora não se tenha observado uma ação mais marcante em um deles especificamente.

8 - EFEITO DO COMPOSTO 48/80 NA CINÉTICA DO PESO ÚMIDO E DA PERMEABILIDADE VASCULAR VESICAIS NA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

O tratamento crônico com o composto 48/80 foi eficiente (figura 16), uma vez que resultou em uma drástica diminuição dos mastócitos da cavidade peritoneal nos animais pré-tratados com 48/80 quando comparados com os animais do grupo controle ($p < 0.001$).

Ao mesmo tempo, a depleção dos mastócitos produziu uma inibição estatisticamente significativa ($p < 0.001$) da permeabilidade vascular já na sexta hora depois da injeção de CF, a qual perdurou até a quadragéssima oitava hora, embora em nenhum momento se observou diminuição nos valores dos pesos úmidos (figura 17).

Excetuando-se o edema e a erosão, o 48/80 determinou um bloqueio nos demais aspectos analisados, seja a congestão vascular ou o infiltrado inflamatório (Figura 19 - foto A).

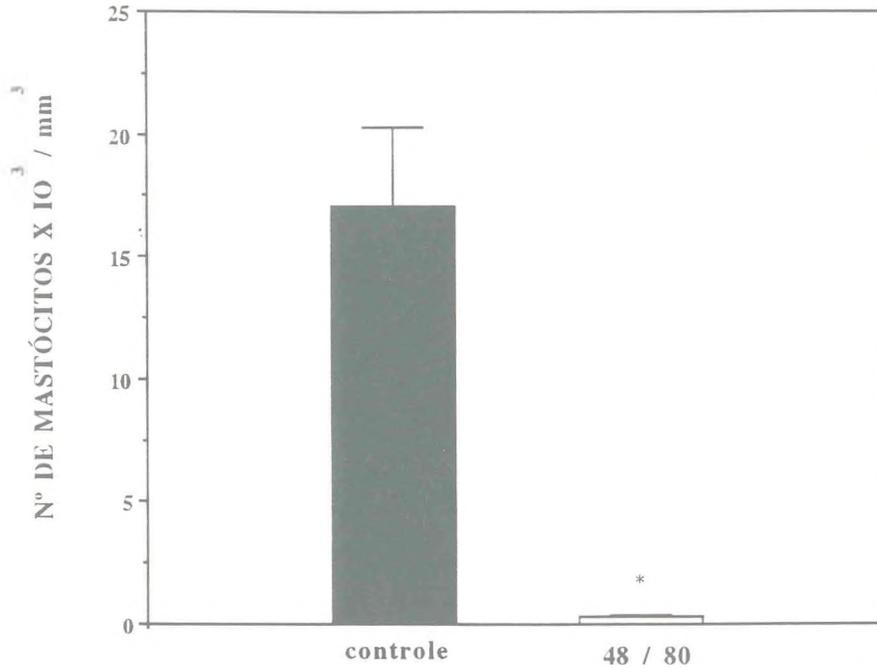


Figura 16. Depleção de mastócitos com o composto 48/80 - A barra de controle(escura) corresponde a média \pm EPM do número de mastócitos visualizado pela coloração do azul de toluidina no lavado peritoneal de seis ratos não tratados. A outra barra representa a média \pm EPM do número de mastócitos do lavado peritoneal em seis ratos tratados cronicamente com o composto 48/80. O símbolo (*) indica diferença estatisticamente significativa com relação ao controle com $p < 0.001$ (teste t de student).

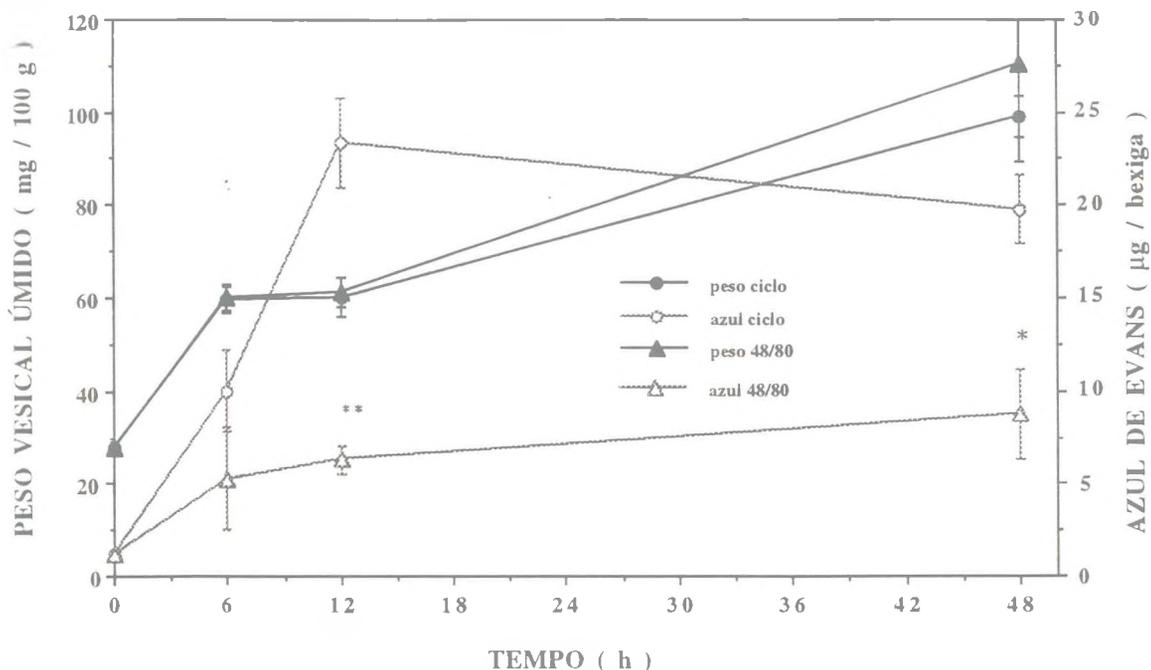


Figura 17. Papel da depleção dos grânulos mastocitários com o composto 48/80 na cinética da cistite induzida por ciclofosfamida - Cada símbolo representa a média \pm EPM do peso vesical úmido ou da permeabilidade vascular, conforme legendas, referentes a dez animais no caso do controle(CF) e seis no grupo tratado com 48/80. O eixo do x corresponde aos horários, após a CF, em que os animais foram sacrificados. (*) e (**) indicam diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle (animais tratados só com CF e sacrificados nos mesmos horários) com $p < 0.01$ e $P < 0.001$, respectivamente (ANOVA . teste de Fisher).

09 - EFEITO DO L-NAME NO PESO VESICAL ÚMIDO E NA PERMEABILIDADE VASCULAR NA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

O L-NAME produziu de uma forma dose-dependente inibição significativa ($p < 0.001$) da permeabilidade vascular(figura 18), porém, não foi eficiente em inibir o aumento do peso vesical nos animais sacrificados após doze horas do tratamento com ciclofosfamida

O máximo efeito inibitório alcançado foi com a dose de 20mg/kg ad dia, ao passo que a dose de 5mg/kg, não bloqueou de forma significativa a permeabilidade vascular ou o peso vesical.

Quanto aos aspectos microscópicos, o L-NAME propiciou uma inibição do desenvolvimento de erosões e do acúmulo do infiltrado celular inflamatório, embora tenha persistido um leve edema e congestão vascular (Figura 19 - foto B).

10 - EFEITO DO L-NAME NA CINÉTICA DO PESO VESICAL ÚMIDO E DA PERMEABILIDADE VASCULAR NA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA.

A utilização de L-NAME na dose de 20 mg/kg se deveu, sobretudo ao fato de esta ter sido a dose de máxima efetividade no tocante a inibição da permeabilidade vascular. O tratamento com esta droga determinou uma inibição estatisticamente significativa da permeabilidade vascular desde a sexta hora da administração da CF ($p < 0.05$), tornando-se máxima já na décima segunda hora ($p < 0.001$), persistindo até o final do segundo dia(figura 20).

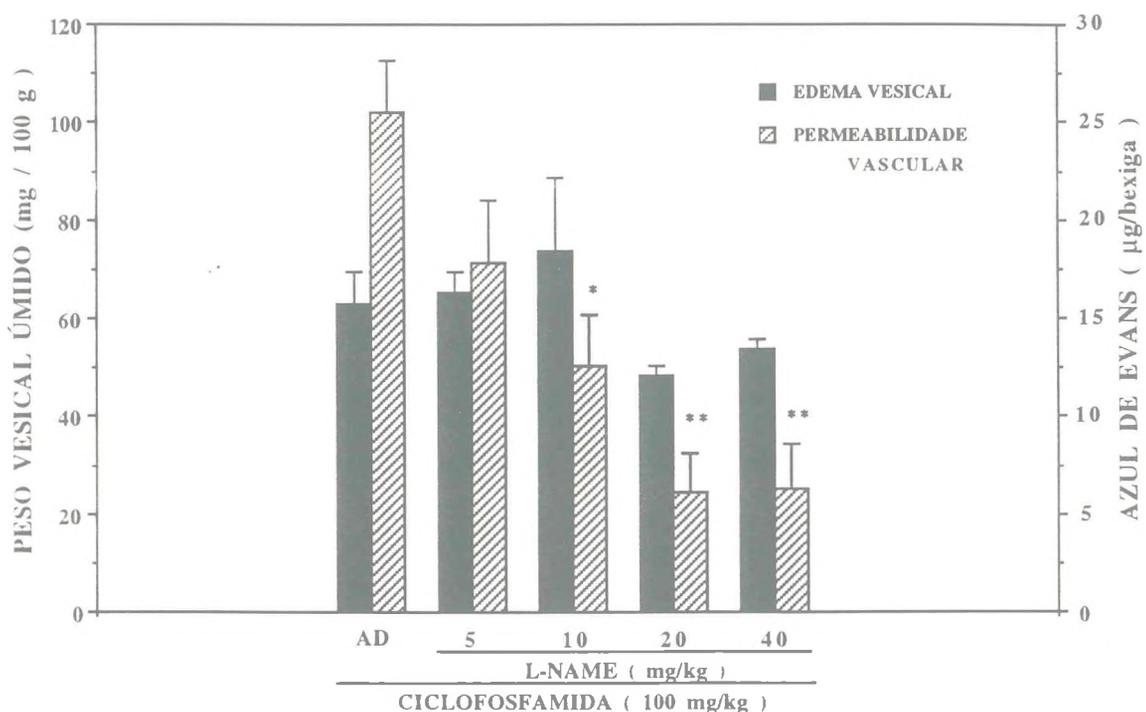


Figura 18. Efeito de doses crescentes de L-NAME no peso vesical úmido e permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida - O L-NAME foi administrado via ip nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg de peso/dia, dividido em duas aplicações, 30 minutos antes e 6 horas depois da CF. As barras representam as médias \pm EPM do peso vesical úmido ou da permeabilidade vascular, conforme as legendas, referentes a grupo de seis animais. Todos os sacrifícios ocorreram passadas 12 horas da CF. Os símbolos (*) e () indicam diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle (tratados com CF + AD) com $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente (ANOVA, teste de Fisher).**

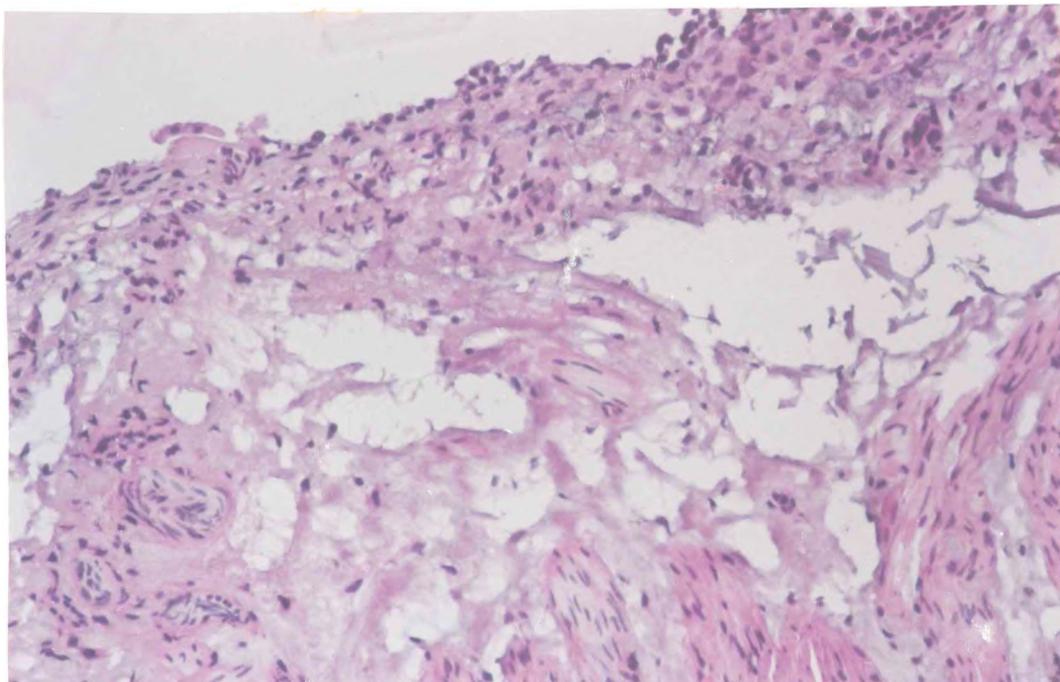


Figura 19 - foto A - Microfotografia de bexiga de rato pré-tratado cronicamente com o composto 48/80 no qual se induziu CIC. Coloração HE (10 x 10). Observa-se a dimiuuição do edema, apesar de serem evidentes as erosões epiteliais.

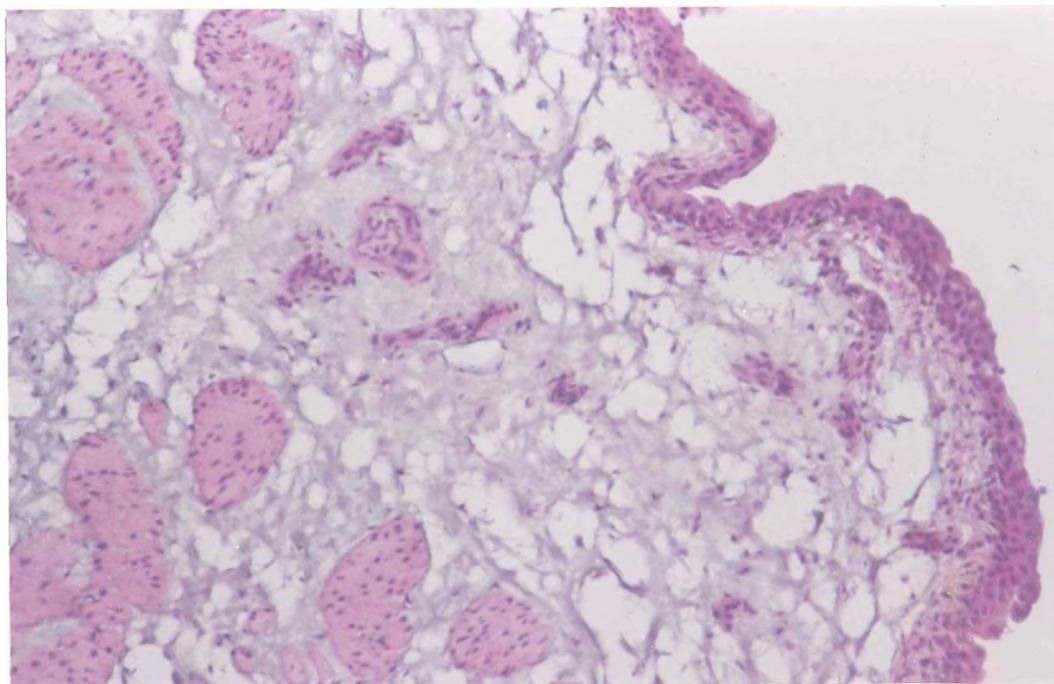


Figura 19 - foto B - Bexiga de ratos pré-tratados com 20 mg/kg de L-NAME no qual se induziu CIC. Coloração HE (10 x 10). Observa-se a diminuição do edema, infiltrado celular e das erosões epiteliais.

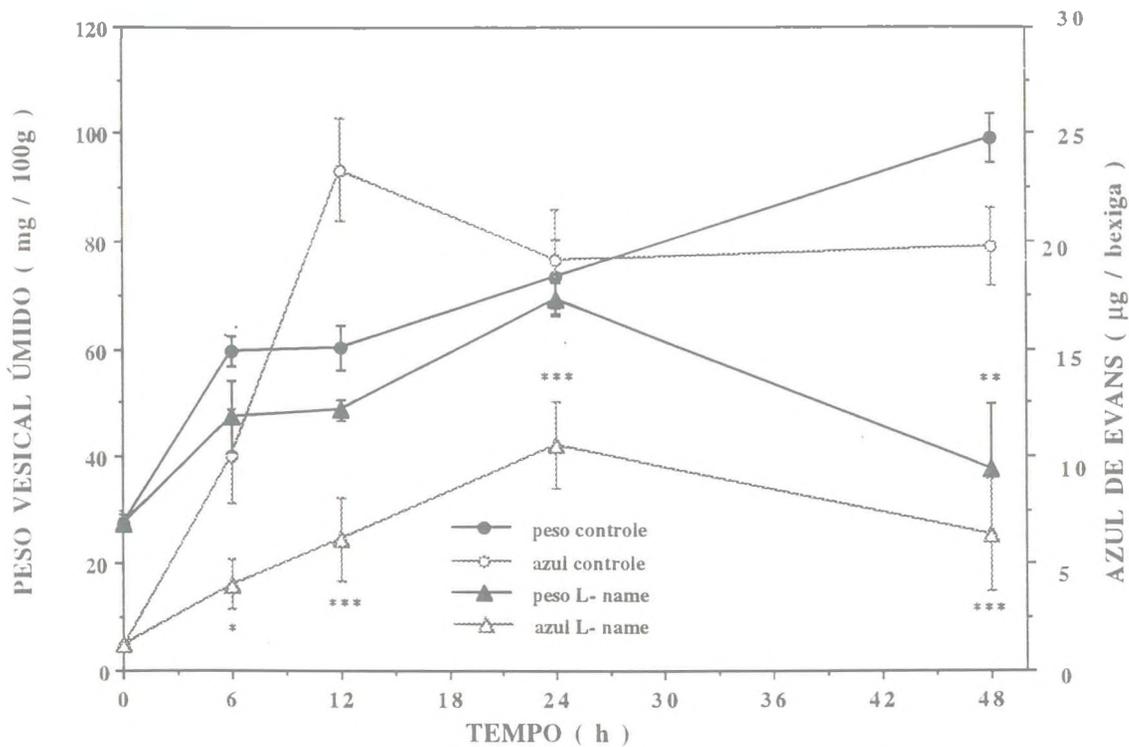


Figura 20. Efeito do pré-tratamento com L-NAME na cinética da cistite inuzida por ciclofosfamida - Cada símbolo representa a média \pm EPM do peso vesical úmido ou da permeabilidade vascular, conforme as legendas, referentes a dez animais, no caso do controle (CF), cinco animais no grupo tratado com a dose de 20 mg/kg/dia de L-NAME, via ip, dividida em duas aplicações. O eixo do x refere-se aos momentos dos sacrifícios. (*), (**) e (***) indicam diferenças estatisticamente significativas com relação ao ponto correspondente no controle com $p < 0.05$; $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente (ANOVA, teste de Fisher).

Não obstante o bloqueio da permeabilidade tenha sido verificado de forma precoce, a ação inibitória do L-NAME sobre o aumento do peso úmido vesical só se verificou ao final de 48 horas após a CF.

11- EFEITO DE DOSES CRESCENTES DE L-ARGININA NO PESO ÚMIDO E PERMEABILIDADE VASCULAR VESICAIS NA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM L-NAME

Conforme podemos observar na figura 21, o bloqueio do aumento da permeabilidade vascular determinado pelo pré-tratamento com L-NAME na dose de 20 mg/kg ao dia, em ratos que receberam CF na dose de 100 mg/kg, o qual foi altamente significativo ($p < 0,001$), foi revertido quase que totalmente, de uma forma dose-dependente, com a administração de L-arginina, o substrato específico da síntese de óxido nítrico (NO).

12 - EFEITO DE L-ARGININA E D-ARGININA NO PESO ÚMIDO E NA PERMEABILIDADE VASCULAR NA CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA EM ANIMAIS PRÉ-TRATADOS COM L-NAME

À semelhança do que ocorreu no experimento anterior, o L-NAME produziu, em níveis significativos ($p < 0,001$), inibição da permeabilidade vascular vesical determinada pela CF, a qual foi

completamente revertida quando se acrescentou a este tratamento o substrato da síntese do NO, a L-arginina, na dose de 600 mg/kg/dia. Por outro lado, dose semelhante do seu isômero dextrógiro D-arginina, usada da mesma forma, não afetou a capacidade do L-NAME em inibir a permeabilidade vascular (figura 22).

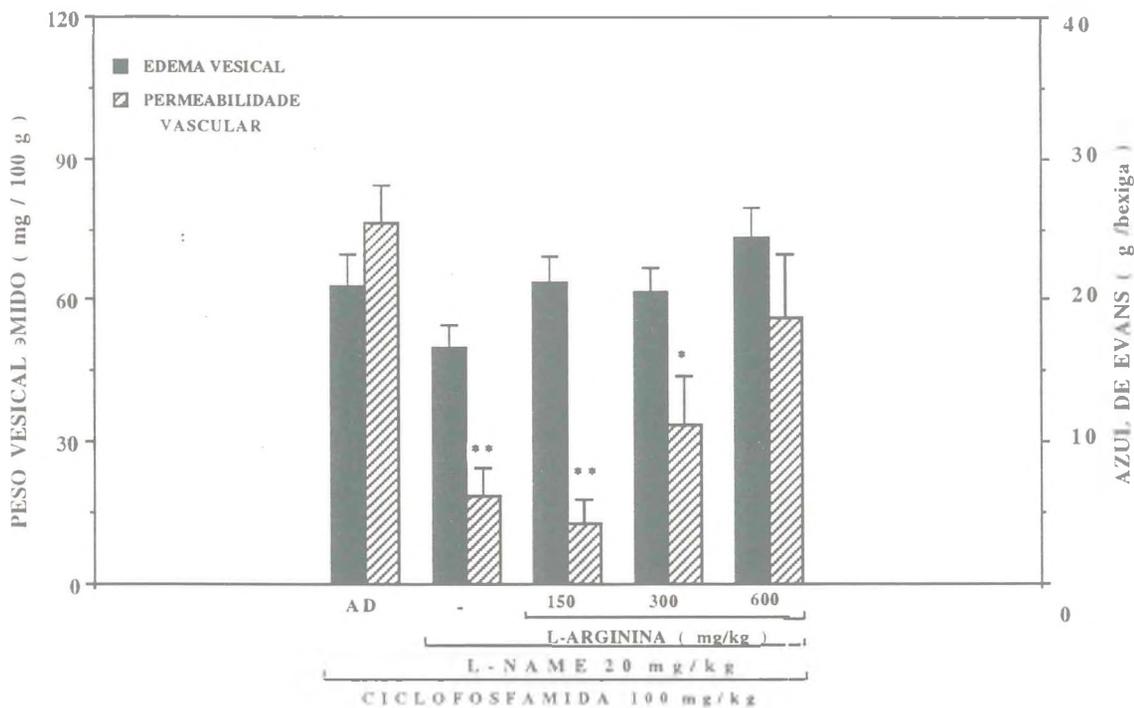


Figura 21. Efeito de doses crescentes de L-arginina na inibição do aumento de permeabilidade vascular produzido pela L-NAME na cistite induzida por ciclofosfamida - As doses utilizadas estão representadas no gráfico e a via de administração foi a ip. Todos animais foram sacrificados 12 horas após a CF. As barras representam as médias \pm EPM do peso vesical úmido e permeabilidade vascular, conforme as legendas, referentes a grupos de seis animais. Os símbolos (*) e (**) indica diferença estatisticamente significativa com relação ao controle (CF + AD) com $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente (ANOVA, teste de Fisher).

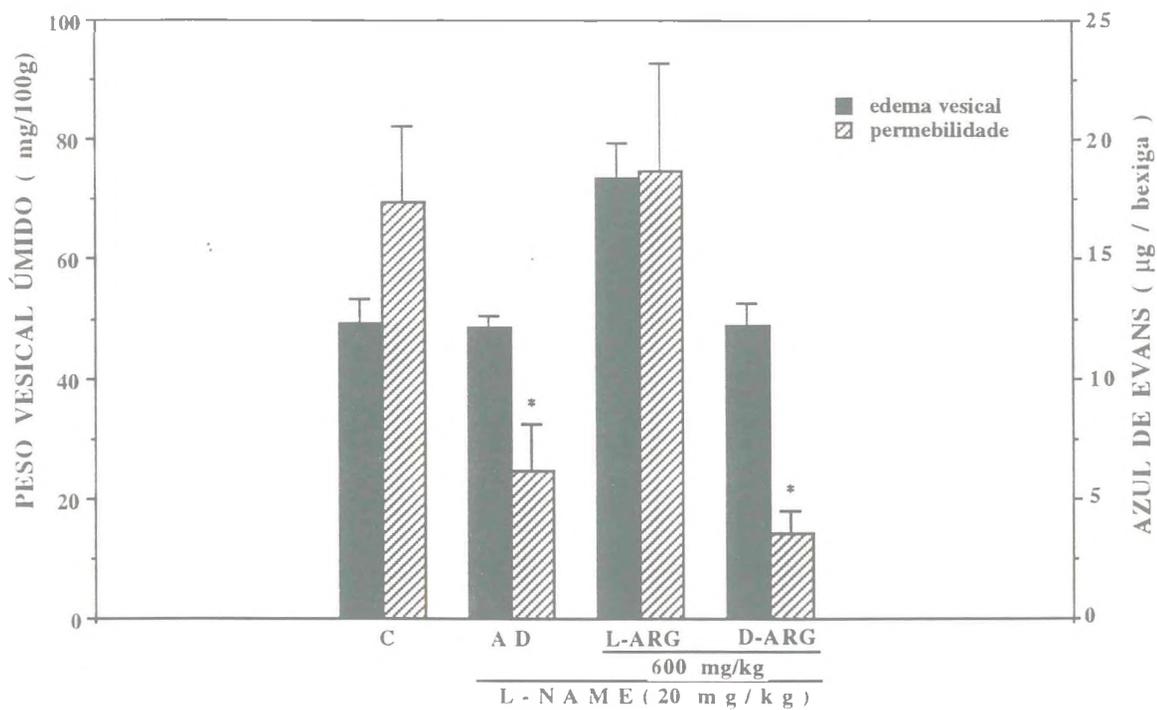


Figura 22. Efeito da L-arginina e D-arginina na inibição produzida pela L-NAME no aumento da permeabilidade vascular na cistite induzida por ciclofosfamida - As doses utilizadas estão representadas no gráfico e a via de administração em todos os casos foi ip. Os animais foram sacrificados 12 dias depois da CF na dose de 100 mg/kg de peso, via ip. As barras representam as médias \pm EPM do peso vesical úmido e da permeabilidade vascular, conforme as legendas, referentes a grupos de seis animais. O símbolo (*) representa diferença estatisticamente significativa com relação ao controle (tratados só com CF) com $p < 0.001$ (ANOVA, teste de Fisher).

IV - DISCUSSÃO

A ciclofosfamida (CF) foi introduzida como um agente anti-tumoral no final da década de cinquenta. Tão logo se iniciou seu uso, já se observou a ocorrência de cistite hemorrágica como uma complicação tão freqüente quanto severa(**Coggins et al. , 1959**).

A integridade dos epitélios de todos os departamentos orgânicos é uma condição importante no processo de defesa contra agentes agressores de qualquer natureza. Adicionalmente, em condições naturais, além da barreira epitelial, as células transicionais da bexiga produzem uma camada de muco sobre a superfície epitelial, formada sobretudo de glicosaminoglicans, a qual tem a função anti-aderente, evitando desta forma que bactérias e compostos tóxicos urinários se fixem à mucosa. Este efeito anti-aderente da camada polissacarídica é importante na adaptação das células da mucosa vesical com seu “ambiente” intra-vesical, protegendo-as, de uma forma inespecífica contra muitos componentes urinários potencialmente tóxicos(**Parson, 1986**).

Therman e colaboradores, em um estudo experimental com microscopia eletrônica, mostrou que a lesão mais inicial na CIC era a ruptura da membrana intra-luminal, o que viabilizaria sobremaneira o contato dos produtos urinários tóxicos com as camadas mais profundas do epitélio vesical, produzindo descolamento das células epiteliais e exposição da membrana basal. Não obstante estas etapas já estejam clarificadas, é desconhecido o mecanismo pelo qual a acroleína desencadeia este processo (**Thermann et al., 1987**).

Sabe-se que na inflamação aguda, qualquer que seja o agente agressor, as alterações subseqüentes constituem uma resposta bastante uniforme (**Robins, 1991**). Os mediadores inflamatórios originam-se do

plasma, das células ou, em algumas circunstâncias, do próprio tecido agredido. Dentre estas substâncias, assumem fundamental importância as aminas vasoativas (serotonina e histamina), proteases plasmáticas (cininas, C3a e C5a), metabólitos do AA (PG e TX), fator ativador de plaquetas (PAF), e citocinas. Baseados no exposto acima, decidimos dedicar a maior parte do tempo dispendido neste projeto de pesquisa ao estudo de vários destes mediadores inflamatórios e seus envolvimento na CIC, bem como estudar o papel do óxido nítrico como um provável mediador pró-inflamatório nesta patologia (*Arrang et al., 1987; Saria et al., 1983., Zimmerman, 1992, ; Anderson, 1993*).

Considerando o fato de que este, pelo menos para nós, era um modelo inusitado de inflamação, foi fundamental dividirmos o projeto em duas etapas. A primeira tratava-se de um estudo prévio intencionando verificar a exequibilidade do modelo, compreender a sua cinética de desenvolvimento e as alterações histopatológicas associadas, bem como determinar a dose de CF ideal para se observar o fenômeno inflamatório. Ao passo que na segunda etapa avaliamos o envolvimento de diversos mediadores inflamatórios no desenvolvimento da CIC.

Os resultados desta primeira etapa, denominadas de análise preliminar do modelo, revelaram que a CIC desenvolve-se como um processo inflamatório agudo com duração de dias, onde desde as primeiras horas que se seguiram a administração de CF, pode-se observar eventos tipicamente inflamatórios, incluindo o edema e a congestão vascular. Observa-se, no entanto que este modelo tem uma particularidade com relação a maioria das patologias inflamatórias, sobretudo no que concerne as alterações histopatológicas, que é a preponderância de fenômenos vasoativos, tais como congestão e

hemorragias, bem como a marcante presença de erosões do epitélio transicional.

Ainda nesta etapa, à partir dos resultados obtidos com a diferença de peso (Δ peso) e ratificados pela microscopia, ficou claro que a CIC é um processo inflamatório que atinge toda sua plenitude 48 horas depois do estímulo lesivo e em seguida apresenta uma tendência para involução dos diversos eventos que dela fazem parte.

Vários destes achados estão em consonância com os registrados por alguns autores em trabalhos experimentais, muito embora não tenha havido preocupação por parte daqueles no sentido de fazer uma descrição temporal mais detalhada das modificações histopatológicas(**Phillips et al., 1961**).

Outro aspecto relevante desta etapa é que os resultados revelam que a CIC, no que tange a quantidade de ciclofosfamida administrada, desenvolveu-se de uma forma dose-dependente, sendo a dose de 100 mg/kg de peso a mais efetiva na gênese deste processo. Vale ressaltar que, empregando-se esta última dose, ao longo dos demais experimentos, não se observou qualquer mortalidade dependente de CF nos animais de experimentação. Baseados nos resultados desta fase do projeto, optamos por trabalhar com doses de 100 mg/kg de peso e sacrificar os animais após 48 h da injeção da CF.

Uma vez que os glicorticóides representam a classe de droga mais efetiva na terapêutica das doenças inflamatórias, adotamos esta droga, representada pela dexametasona, um dos mais potentes componentes deste grupo, como droga padrão no estudo de inibição do processo inflamatório da CIC, embora tenhamos, nesta mesma etapa

utilizado inibidores da ciclooxigenase (indometacina) e da ciclo e lipoxigenase (NDGA).

A ação deste hormônio esteróide se processa através de várias etapas, as quais se iniciam com sua difusão pela membrana plasmática, seguido de ligação ao receptor esteroideal citoplasmático, formando um complexo que atravessa a membrana nuclear, ligando-se a um sítio específico na cromatina. Este último passo desencadeia a produção de RNAm específicos que resultarão na produção de novas proteínas responsáveis pela ação propriamente dita dos corticóides(**Barnes & Adcock, 1993**)

Os neutrófilos há muito tempo têm sido reconhecidos como células da mais alta expressão na imunidade natural a uma grande variedade de agentes infecciosos e em doenças inflamatórias de diversas etiologias. Estas células representam a grande maioria dos leucócitos circulantes e sempre são as primeiras a chegarem no sítio da agressão. Ao mesmo tempo em que o tratamento com corticóide determina redução de até 80 % dos monócitos, linfócitos eosinófilos e basófilos circulantes, a mesma droga produz aumento dos neutrófilos na corrente sanguínea, embora haja substancial diminuição destas células no foco inflamatório (**Cupps, 1989; Butterfield & Gleich, 1989**)

Segundo Scheleimer e colaboradores, os glicocorticóides não alteram funcionalmente os leucócitos, e sim inibem a produção e liberação de substância quimiotáticas, as quais impedem a acumulação de neutrófilos nos tecidos lesados(**Butterfield & Gleich, 1989**). Contrário a estes conceitos, outros pesquisadores, estudando neutrófilo *in vitro*, observaram que a incubação com dexametasona determina uma diminuição significativa na capacidade de migração leucocitária induzida

por FMLP e zimosan. Este efeito é independente da síntese proteica ou do período de incubação (**Lomas et al., 1991**).

Outra ação dos corticóides relacionada a inflamação diz respeito a inibição da produção dos derivados do AA pelas vias da ciclo e lipoxigenase(**Roderick, 1989**). O mecanismo parece ser condicionado a indução de produção de uma proteína, denominada lipocortina-1, de peso molecular de 37 kDa, a qual é termo-estável, ácido-resistente, tripsina-sensível e que tem atividade inibitória sobre a fosfolipase A₂. Possivelmente, boa parte da interferência dos corticóides na quimiotaxia leucocitária se dá através da inibição dos derivados do AA, notadamente o LTB₄, o mais potente agente quimiotático entre eles (**Butterfield & Gleich, 1989**).

Os glicorticóides têm um potente efeito inibitório na transcrição de diversas citocinas, incluindo a IL-1, TNF-alfa, IL-8, cujas papeis na inflamação já foram por demais destacados. Além de inibir suas produções, os corticosteróides também bloqueiam seus efeitos de diversas formas, destacando-se a diminuição da expressão de receptores para uma determinada citocina, como é o caso da IL-8 (**Barnes & Adcock, 1993**).

No nosso modelo experimental, a dexametasona utilizada na dose de 1 mg/kg produziu uma inibição estatisticamente significativa($p < 0.001$) do aumento do peso vesical (edema)(figura 04).

A atividade dos derivados do ácido aracdônico na resposta inflamatória inclui quimiotaxia, vasodilação, ativação da secreção leucocitária, sem contar com as atuações em eventos correlatos como hipertermia e hiperalgesia. As variadas formas de atuação dos prostanóides se deve as ações diferenciais de seus múltiplos derivados, as

quais, de forma sintética poderíamos registrar a seguir: A PGE e a PGI que se constituem provavelmente nos mediadores mais importantes na vasodilação inflamatória, além de potencializar os efeito quimiotático de outros mediadores; os leucotrienos C₄, D₄ e E₄ que causam intenso aumento da permeabilidade vascular; o LTB₄ que causa agregação e adesão dos leucócitos ao endotélio venular e é um dos mais poderosos agentes quimiotáticos, finalmente, sem deixar de considerar a ação menos importante na inflamação de outros derivados do AA, a PGE₂ que está envolvida com a patogenia da dor e da febre na inflamação, eventos muito freqüentes na CIC (**Samuelson, 1983; Root, 1990; Robins,1991**)

Tal como a dexametasona, embora nas doses utilizadas tenha apresentado menor eficácia que esta última, a indometacina também bloqueou significativamente ($p < 0.05$) o edema, ao passo que o NDGA, não obstante macroscopicamente tenha havido diminuição expressiva das áreas de hemorragias e hiperemia, na dose utilizada (50 mg/kg), não determinou bloqueio do peso (Δ peso). No caso da indometacina, ficou claro que há envolvimento dos derivados do AA pela via da cicloxigenase no desenvolvimento do edema da CIC. No entanto, com relação ao NDGA nos ocorreu dois questionamento: o primeiro dizia respeito a dose, a qual poderia não ter sido suficiente para provocar inibição, o segundo e mais razoável para nós naquele momento, a possibilidade de que o parâmetro utilizado na aferição dos resultados não fora suficientemente sensível para detectar as alterações induzidas pelo NDGA, as quais relatamos como aspectos macroscópicos e tratavam-se de fenômenos de cunho predominantemente vascular

Amparados nestas observações, procuramos adaptar a metodologia preconizada por Garcia Leme e Wilhelm(1975) para

estudar permeabilidade vascular em pele de ratos, naturalmente fazendo algumas modificações de ordem operacional por se tratar de um modelo diferente daquele utilizado pelos referidos pesquisadores. Esta técnica baseia-se no fato do azul de Evans ser uma substância que, devido ao seu peso molecular e sua afinidade com albumina (ligação), em condições normais, não extravaza para o espaço intersticial. Por outro lado, em condições em que haja aumento da permeabilidade vascular, tal como ocorre na inflamação, este corante sai do intravascular, acumulando-se no interstício (**Garcia Leme & Wilhelm., 1975**).

Motivados pela rica expressão de fenômenos vasculares no modelo em estudo, associado ao fato de que as alterações do fluxo e da permeabilidade da microvasculatura são condições indispensáveis para o surgimento do edema, realizamos experimentos onde, além de lançar mão do peso úmido para mensuração do edema, utilizamos o método do extravazamento do azul de Evans para expressar as modificações ocorridas na permeabilidade vascular. O primeiro passo consistiu em determinar a exequibilidade e sensibilidade do método de extravazamento para o modelo da CIC. Como podemos observar na figura 05, é flagrante a eficiência desta metodologia neste modelo, uma vez que as modificações ocorridas foram mais facilmente observadas quando comparadas com aquelas verificadas no peso úmido. Para se ter uma idéia, a permeabilidade vascular ao azul de Evans aumentou cerca de 18 vezes com relação ao controle, ao passo que no peso houve um incremento de aproximadamente três vezes e meia.

Até então, expressávamos a permeabilidade através de absorbância, no entanto para tornar mais compreensíveis nossos resultados desenvolvemos uma curva padrão de concentrações de azul de

Evans relacionada com as correspondentes absorvências obtidas. Como podemos apreciar na figura 06, há uma correlação linear entre as concentrações de azul e a absorvência, sendo o coeficiente de determinação(r^2) de 1.0 Desta forma, à partir de então podíamos expressar a permeabilidade em forma de quantidade de azul de Evans extraída de cada bexiga, utilizando a equação da reta obtida no estudo de regressão linear.

O passo seguinte consistiu no desenvolvimento de um estudo temporal (cinética) do desenvolvimento do edema e das modificações da permeabilidade vascular (figura 07). De forma surpreendente, podemos observar que o edema já pode ser detectado, em forma de aumento estatisticamente significativo do peso úmido($p<0.01$) na sexta hora após a injeção da CF e que, assemelhando-se aos dados fornecidos pela anatomopatologia, é máximo passadas 48 horas. Quanto a permeabilidade, esta também já se encontrava significativamente elevada ($p<0.01$) após seis horas, entretanto alcançou seu valor máximo já na vigéssima quarta hora, persistindo assim até o terceiro dia. Ainda como parte desta etapa, realizamos um estudo estatístico de correlação entre o peso vesical úmido e a permeabilidade vascular medida pelo azul de Evans (figura 08) e verificamos uma correlação positiva destes parâmetros, obtendo um coeficiente de correlação(r) equivalente a 0.711. No teste de hipótese, verificamos que o t obtido é maior que o tabelado, de maneira que, seguramente, o extravazamento de azul de Evans expressa também o desenvolvimento do edema na CIC; soma-se a isto o fato de que, neste modelo, a permeabilidade mostrou-se mais efetiva na aferição dos resultados.

Relativo à permeabilidade vascular, sabe-se ainda que os glicorticóides inibem o extravazamento protéico pela supressão da produção de mediadores envolvidos com a permeabilidade ou vasodilatação da microvasculatura, bem como, através da transcrição de uma proteína, atua nas células endoteliais provocando alteração na resposta aos mediadores vaso-ativos, tais como LTC₄, PAF e bradicina, diminuindo a vasodilatação produzidas por eles(**Williams & Yarwood, 1990**).

Na presente investigação foi demonstrado que o pré-tratamento com dexametasona (figura 09), inibidora da fosfolipase A₂ inibiu, de maneira dose-dependente, o edema e a permeabilidade vascular nas bexigas de ratos que receberam ciclofosfamida, sendo que a inibição da permeabilidade já pode ser observada com a dose de 0.5 mg/kg de peso ao dia, enquanto que o peso somente foi bloqueado significativamente com a dose de 1 mg/kg. Mais uma vez, a anatomopatologia revelou diminuições consideráveis do edema, erosão do epitélio transicional e inibição completa do infiltrado inflamatório, embora ainda tenha sido demonstrado a existência de congestão vascular.

Com a utilização do inibidor da cicloxigenase, indometacina, também foi possível demonstrar a participação dos prostanóides nos aumentos do peso vesical e da permeabilidade vascular da CIC, uma vez que esta droga foi capaz de inibir o extravazamento de azul de Evans, de maneira dose-dependente(figura 11).A microscopia demonstrou que a indometacina produziu inibição moderada do edema, diminuição significativa da congestão vascular, porém não foi eficiente em inibir o infiltrado inflamatório, notadamente o macrofágico. A propósito destes resultados, devemos ressaltar que há concordância com os dados da

literatura, uma vez que, a despeito de atuarem na microvasculatura, os bloqueadores prostanóides não interferem no mecanismo de quimiotaxia das células inflamatórias.

De forma semelhante o bloqueador de lipo e cicloxigenase, o composto NDGA, inibiu o edema e a permeabilidade vascular por um mecanismo que provavelmente também é dependente da dose empregada (figura 12). Um aspecto esclarecedor deste experimento é que ele nos possibilitou responder as questões que fizemos quando utilizamos apenas o Δ peso como parâmetro de aferição dos resultados na CIC. Na realidade a dose empregada naquela(50 mg/kg) ocasião era sub-ótima no que diz respeito a inibição do edema entretanto, apesar de não ser estatisticamente significativa, podia-se perceber uma tendência de redução do extravazamento vascular. Quanto aos aspectos histopatológicos, o NDGA, assim como ocorreu com a indometacina, produziu bloqueios parciais do edema e da erosão mucosa e de forma adicional, diferentemente da indometacina, bloqueou amplamente a formação do infiltrado inflamatório. À partir destes resultados, torna-se lícito especular que estes efeitos adicionais no acúmulo de células inflamatórias da dexametasona e do NDGA, em parte, se deveram ao fato de ambos serem também inibidores da formação de produtos da lipoxigenase, uma vez que, reconhecidamente o LTB₄ é um dos mais potentes agentes quimiotáticos que existe (**Barnes et al., 1988**)

Embora individualmente os mediadores tenham efeito específicos e de intensidades variáveis, o fato é que eles são liberados simultaneamente e agem sinergicamente na indução do edema, como é o caso das prostaglandinas que potenciam o extravazamento da histamina, bradicina e PAF. Este último, é conhecido por uma diversidade de efeitos

pró-inflamatórios em adição ao seu efeito ativador de plaquetas. Entre eles assume um papel relevante a capacidade de aumentar a permeabilidade microvascular, tal como foi demonstrado na pata de rato inicialmente e posteriormente em muitos outros tecidos (**Williams & Yarwood, 1990**).

Incentivados pela abundância de achados vasculares, notadamente do extravazamento vascular, associado a eficiência do método empregado para aferi-lo, somados ao fato de que o PAF, em vários modelos experimentais, se relaciona com estes fenômenos, tanto quanto com outros, tais como ulcerações e indução de hemorragia da mucosa intestinal (**Braquet et al., 1987**), foi que decidimos estudar a participação deste mediador na CIC. Não menos importante para esta decisão foi o fato de que o PAF age por um mecanismo independente dos produtos da cicloxigenase, histamina ou receptores adrenérgicos (**Braquet et al., 1990**). Para tanto, utilizamos o composto BN-52021, baseado no fato de que ele fora eficiente em inibir o edema em diversos modelos de inflamação (**Braquet et al., 1987**).

Não obstante o BN-52021 somente tenha bloqueado o edema(peso vesical úmido) após 48 horas do tratamento com a CIC, com 12 horas a inibição da permeabilidade foi máxima ($p < 0.01$). Os dados do estudo de microscopia das bexigas dos animais pré-tratados com BN-52021 se revestem da maior importância por demonstrarem que o BN-52021 aboliu praticamente todos os achados referentes a erosão, congestão e infiltrado de células inflamatórias, persistindo apenas um leve edema. Estes resultados sugerem que o PAF tem um papel destacado na patogênese da CIC.

Ainda como parte do estudo de mediadores inflamatórios de ação pronunciada na microvasculatura decidimos estudar a bradicina (BK), uma cinina formada na resposta inflamatória à partir de precursores plasmáticos. Outra cinina, a lisina-bradicinina (calidina), tem propriedade farmacológica semelhante a BK. Existem dois tipos de receptores de BK, o B₁ que é ativado por fragmentos tais como Lis-bradicinina e des-Arg-bradicinina e o B₂, ativado pela BK propriamente dita. Muitas das respostas a cininas parecem ser mediadas via receptor B₁, embora o B₂ esteja envolvido com a patogênese da asma e a inflamação experimental. A bradicinina é um potente vasodilatador e também determina aumento da permeabilidade vascular. Nestes casos específicos, seu efeito parece ser mediado via prostaglandinas (**Barnes et al., 1988 ; Karl-Erik, 1993**).

Muito embora tenha promovido um bloqueio menos intenso que o BN-52021, o HOE-140, inibidor de bradicinina, também inibiu a permeabilidade, de maneira estatisticamente significativa após 12 h ($p < 0,05$) e 48 h ($p < 0,01$) do tratamento com ciclofosfamida. Por outro lado, semelhante ao que ocorreu com o BN-52021, o HOE-140 só produziu inibição significativa do peso vesical úmido ($p < 0,01$) passadas 48 h da CF. Concernente aos achados microscópicos, nos animais pré-tratados com o referido inibidor da BK, verificou-se edema, erosão da mucosa e congestão vascular leves, além de diminuição do infiltrado de células inflamatórias, tanto no que diz respeito aos neutrófilos quanto aos macrófagos.

Prosseguimos o estudo dos papéis dos mediadores vasoativos na CIC, particularmente aqueles liberados pelos mastócitos, utilizando o composto 48/80, conhecido por promover degranulação mastocitária in vivo e in vitro (**Paton, 1951**). Na primeira etapa do

experimento (figura 16) demonstramos que, com o tratamento crônico com o composto 48/80, os animais apresentaram degranulação mastocitária praticamente completa ($p < 0.001$) e que ao serem submetidos a administrações de ciclofosfamida, apresentaram bloqueio significativo ($p < 0.001$) da permeabilidade vascular a partir de doze horas do tratamento com este agente citotóxico, embora não se tenha observado inibição do aumento ponderal vesical.

Muito embora o peso úmido como parâmetro não tenha sido revelador no que diz respeito ao edema, quando analisamos microscopicamente os espécimes resultante deste experimento podemos verificar que o composto 48/80 diminuiu sensivelmente o edema, a congestão vascular e o infiltrado neutrofílico e macrofágico, a despeito de ainda existirem áreas de erosões.

Pelos resultados apresentados neste bloco conclui-se que os mediadores liberados pelos mastócitos desempenham um papel importante na patogênese da CIC, sobretudo no que tange as suas atuações na microvasculatura. Por outro lado, a ausência de mastócitos funcionalmente competentes não impede que se desenvolva alguns eventos próprios da CIC, notadamente a erosão do epitélio transicional e o aumento ponderal vesical. Isto sugere que outros mecanismos independentes da ativação dos mastócitos participam na manutenção do edema e lesões da mucosa.

Finalmente, atraídos pelo vasto campo que recentemente se abriu na investigação da importância biológica do óxido nítrico (NO) em diversos setores (Fisiologia, Fisiopatologia e Farmacologia), associado aos dados publicados nos últimos anos relativos a atuação do NO nos

fenômenos vasculares e na inflamação, é que resolvemos avaliar o papel do NO na patogênese da CIC.

O envolvimento do NO na resposta inflamatória não está totalmente esclarecido, embora existam algumas evidências de que este mediador poderia modular a inflamação aguda participando de diversos eventos correlacionados com este fenômeno. No controle do fluxo sanguíneo, em condições normais(regulação fisiológica), o NO é sintetizado mediante ação catalítica da enzima constitutiva relaxando a musculatura lisa dos vasos e produzindo vasodilatação. Entretanto em condições patológicas, o NO é sintetizado à partir de uma enzima que tem sua formação induzida por substâncias tais como o LPS, IFN gama (Peers, 1994). O mecanismo de ação é dependente da estimulação da síntese de GMPc, o qual determina uma seqüência de fosforilações protéicas associada com o relaxamento de músculos lisos (Stambuk, 1993). Já o seu efeito no aumento da permeabilidade vascular parece se processar através de ação direta sobre as células endoteliais e em muito se parece com aqueles produzidos pelo PAF e histamina.(Rapoport *et al.*, 1983; Moncada *et al.*, 1991; Stambuk, 1993)

O macrófago ativado por LPS, IFN-gama sintetiza NO e mais que isto: há experimentos demonstrando que o efeito citotóxico desta célula é dependente da L-arginina e bloqueado pelo L-NAME (Stambuk, 1993). O neutrófilo também produz NO e essa quantidade é ampliada quando estas células são ativadas com FMLP(Moncada *et al.*, 1991).

Ao se avaliar a capacidade do L-NAME, inibidor da síntese de NO, em produzir bloqueio do aumento da permeabilidade vascular patológica de bexiga de ratos tratados com 100 mg/kg de CF e

sacrificados com 12 h , obtivemos um resultado que julgamos muito interessante. O L-NAME de modo semelhante ao que ocorreu com outros inibidores de mediadores inflamatórios utilizados anteriormente, produziu uma inibição do aumento de permeabilidade vascular induzido pela ciclofosfamida, de uma maneira dose-dependente (figura 18), a despeito de não ter inibido o aumento ponderal vesical.

De posse destes dados, procedemos a execução de um experimento que objetivava ter uma idéia da dinâmica do bloqueio do L-NAME (cinética). Para tanto utilizamos a dose de 20 mg/kg/dia devido ter sido a mais efetiva no experimento anterior. Como resultado (figura 20), verificou-se que o L-NAME, ao contrário dos efeitos dos antagonistas de outros mediadores utilizados até então, foi capaz de bloquear o extravasamento vascular do azul de Evans já na sexta hora depois da injeção de CF($p < 0.05$), demonstrando estar envolvido no aumento de permeabilidade numa fase precoce do processo inflamatório da CIC. Por outro lado, de forma semelhante a aqueles, somente foi eficiente em inibir o aumento do peso vesical passadas 48 h ($p < 0.01$), muito embora nas condições dos experimentos tenha sido mais eficaz em fazê-lo que os demais.

Com a finalidade de nos certificarmos de que o efeito do L-NAME foi mediado exclusivamente pelo NO, testamos o efeito do L-NAME(20 mg/kg) em associação com doses excessivas e crescentes de L-arginina, o substrato do óxido nítrico (figura 21). Verificamos que o bloqueio induzido pelo L-NAME no aumento da permeabilidade vascular foi revertido, de modo dose-dependente, pela L-arginina ($p < 0.01$). A seguir, objetivando esclarecer se de fato a reversão do bloqueio se deveu a uma ação antagonista da L-arginina sobre o L-NAME e não a um efeito

direto desta, lançamos mão do isômero dextrógiro da arginina, a D-arginina. Os dados resultantes desse último experimento (figura 22), ratificaram os anteriores, uma vez que a L-arginina na dose de 600 mg/kg foi capaz de reverter a inibição do L-NAME, ao passo que a D-arginina, na mesma dose, em nada modificou o efeito desta última droga.

Quanto aos aspectos histopatológicos, o L-NAME proporcionou uma diminuição do edema, completo desaparecimento das áreas de erosões, além de ter impedido o acúmulo de neutrófilo e macrófagos no sítio inflamatório nos espécimes vesicais examinados.

Os resultados do presente estudo sugerem o envolvimento do NO na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (CIC), sobretudo no que concerne ao aumento da permeabilidade vascular, produção de edema e formação de erosão epitelial. Adicionalmente, os achados histopatológicos indicam que o NO parece também estar implicado na infiltração celular da CIC.

Experimentos recentes demonstraram que o L-NMA, inibidor da NO sintetase, é capaz de inibir a formação de edema de pata de rato induzido por BK, 5-HT e composto 48/80 , levando a crer que, pelo menos naquele modelo o NO tem uma estreita relação com aqueles mediadores vasoativos, podendo ser um agente amplificador da ação de alguma destas drogas (*Antunes et al., 1992*)

Recentemente, observou-se que os glicorticóides (dexametasona e hidrocortisona) inibem a indução da óxido nítrico sintetase, mas não a ação da enzima constitutiva, em células endoteliais (*Rees et al., 1990*). Isto pode explicar a efetividade dos corticóides em estados patológicos como o choque séptico, que é caracterizado por uma ampla liberação de citocinas, hipotensão e redução da sensibilidade aos

vasoconstrictores. Outro aspecto importante relativo a ação desta droga diz respeito a susceptibilidade para infecções dos pacientes em curso de corticoterapia, tal como se observa nos transplantados. Pelo menos em parte, esta ação é resultante da diminuição da eficiência dos macrófagos e neutrófilos devido a inibição da NO sintetase (Peers, 1994).

Na asma, no choque séptico e na artrite reumatóide, muito provavelmente o NO é responsável pela vasodilatação patológica e dano tecidual, assim, a inibição da NO sintetase pelos corticosteróides explicaria os benefícios que esta terapia traria nestas patologias (Moncada *et al.*, 1991). Muito provavelmente, parte do efeito da dexametasona na bexiga dos animais aqui utilizados se deveu ao bloqueio que esta droga propicia na produção de NO.

Por fim, o conjunto de todos dados obtidos demonstram que a CIC desenvolve-se como um processo inflamatório agudo e progressivo, induzido de forma dose-dependente, caracterizando-se por uma exuberância de eventos vasculares, infiltrado neutrofilico-macrocitário e erosões epiteliais. Estes eventos atingem máximas intensidades após 48 h da administração da CF. Na patogenia da CIC há participação dos derivados do AA pela via da ciclo e lipoxigenase, bradicinina, PAF e óxido nítrico. Os resultados ainda sugerem a participação dos mastócitos no aumento da permeabilidade vascular patológica.

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, D.H., and Snyder, F. Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocoline (platelet-activating factors from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. **J. Biol. Che., 258** : 97-102, 1983.
- Anderson. K.E. Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. **Pharm. Reviews, 44(3)** : 253-302, 1993.
- Antunes, E.; Giradelo, C.M.; Cirino, G. *et al.* Effects of LNMA and L-NAME on the rat paw oedema. in : **Second International Meeting on Biology of Nitric Oxide**, London, 30 th sept.- 2nd oct.,1991. poster 134.
- Arnold, H.. and Bourseaux, X.F. Synthase und abbou cytostatisch wirsamer cyclischner N-phosphamidester des Bis-(beta-chloräthyl)-amins. **Angew. Chemic., 70** : 539-544, 1958.
- Arrang, J.M.; Garbarg,M.; Lancelot, J.C. *et al.* Highly potent and selective ligands for histamine H₃-receptors, **Nature, 327**: 117-123, 1987.
- Barnes, P.J.. and Adcock, I. Anti-inflammatory actions of steroids:molecular mechanisms. **TiPS Reviews, vol. 14** : 436-441, 1993.
- Barnes, P.J.; Chung, K.F., and Page, C.P. Inflammatory mediators and asthma. **Pharmacol. Reviews, 40 (1)** : 49-77. 1988.
- Barrow, S.E.; Dollery, C.T.; Heavey, D.J. *et al.* Effects of vasodilative peptides on prostacyclin synthesis in men. **Br. J. Pharmacol., 87** : 243-248, 1986.
- Bennett, A.H. Cyclophophamide and hemorrhagic cystitis. **J. Urol., 111** : 603-606. 1974.

- Bolt, W., Ritz, F.; Toussaint, R., and Nahrman, H. Verteilung und Ausscheidung eines cytotatisch wirkendem, mit tritium markierten. **Arzneimittel-Forsch**, **11** : 170-175, 1961.
- Braquet, P.; Touqui, L.; Shen, T.Y. *et al.* Perspectives in platelet-activating factor research. **Pharmacol. Reviews**, **39(2)** :97-145, 1987.
- Broide, D.H. Células inflamatórias : estrutura e função *in* : **Imunologia Básica**, Ed. Prentice/Hall do Brasil, 7a ed., 109-118, 1992.
- Butterfield, J.H., and Gleich, G.J. Anti-inflammatory effects of glucorticoids on eosinophils and neutrophils. *in* : **Anti-inflammatory Steroid Action**, Ed. Academic Press, Inc., p. 151-119.
- Butterfield, J.H., and Gleich, G.J., Anti-inflammatory effects of glucorticoids on eosinophils and neutrophils, *in* : **Anti-inflammatory Steroids Action**, Ed. Academic Press, Inc., p. 151-179, 1989.
- Chaviano, A.H.; Gill, W.B.; Ruggiero, K.J. *et al.* Experimental Cytosaxan cystitis and prevention by acetilcisteine. **J. Urol.**, **134(3)** : 598-600, 1985.
- Coggins, P.R.; Raudin, R.G., and Eisman, S.H. Clinical pharmacology and preliminary evaluation of cytoxan . **Cancer Chemother. Res.**, **3** : 9-11, 1959.
- Coleman, R.A., Humphrey, P.P.; Kennedy, I. *et al.* Prostanoid receptors: the development of a working classification. **Trends Pharmacol.Sci.** **5**: 303-306, 1984.
- Colvin, M. The alkylating agents *in* : **Pharmacologic principles of cancer treatment**. Ed. W.B.Saunders Company, p. 276-308, 1982.
- Cox, J.P. Cyclophosphamide cystitis- identification of acrolein as the causative agent. **Biochem. Pharmacol.**, **28** : 2045-2049, 1979.

- Cunha, F.Q.; Lorenzetti, B.B.; Poole, S. *et al.* Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, **104** : 765-767, 1991.
- Cupps, T.R. Effects of glucorticoids on lymphocyte function. *in* : **Anti-inflammatory Steroid Actions**, Ed. Academic Press, Inc., p.132-146, 1989.
- Dale, M.M., and Foreman, J.C. Introduction to immunology of host defence mechanisms. *in* : **Dale&Foreman: Textbook of Immunopharmacology**, Ed. Blackwell, 2nd ed., p 1-18, 1989.
- Di Rosa, M.; Giroud, J.P., and Willoughby, D.A. Studies of the mediators of acute inflammatory response induced in rats in different sites by carragenin and turpentine. **J. Path.** , **104** : 15-29, 1971.
- Dinarello, C.A., and Cannon, J.G. New concepts on the pathogenesis of fever. **Ann. of Inf. Dis.**, **10(1)** : 168-184, 1991.
- Donaldson, J., and Hil, S.J. Histamine-induced inositol phospholipid breakdown in longitudinal smooth muscle of guinea pig ileum. **Br. J. Pharmacol.**, **85** : 499-512, 1985.
- Droller, M.J; Saral, R., and Santos, G. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Urology**, **20** : 256-258, 1982.
- Duckett, J.W.; Peters, P.C., and Donaldson, M.H. Severe cyclophosphamide hemorrhagic cystitis controlled with phenol. **J. Pediatr. Surg.**, **8**: 55, 1973.
- Efros, M.; Ahmed, T., and Choudhury, M. Cyclophosphamide induced hemorrhagic pyelitis and ureteritis associated with cystitis in marrow transplantation, **J. Urol.**, **144 (5)**: 1231-1232, 1990.

- Ehrlich, R.M.; Freedman, A.; Goldsobel, A.B. *et al.* The use of sodium 2-mercaptoethane sulfonate prevent cyclophosphamide cystitis. **J. Urol.**, **131** : 960-963, 1984.
- Fisher, R.A. **Statistical Methods for Research Workers**, Ed Hafner Publishing Co., 10a ed. , 1948
- Fraiser, L.H.; Kaliner, S., and Kehrer, I.P. Cyclophosphamide toxicity. characterising and avoiding the problem. **Drugs**, **42(5)** : 781-795, 1991.
- Frank, M.M.; Fries, L.F. Complement, *in* :: **Fundamental Immunology**, Ed. Paul WE, 2nd ed., p 679-702, 1989
- Friedman, M.M., and Kaliner, M.A. Human mast cells and asthma. **Am. Rev. Resp. Dis.**, **135** : 1157-1164, 1987.
- Garcia Leme, J., and Wilhelm, D.L. The effects of adrenalectomy and corticosterone on vascular permeability responses in the skin of the rat. **Br. J. Pathol.** **56**: 402, 1975.
- Ginsberg, M.H. Role of platelets in inflammation and reumatic disease. **Adv. Inflam. Res.**, **2** : 53, 1986.
- Goel, A.K.; Rad, M.S.; Bhagwat, A.G. *et al.* Intravesical irrigation with alum for the control of massive bladder hemorrhage. **J. Urol.**, **133** : 956-958. 1985.
- Goetz, E.J., and Stobo, J.D. Immunologia. *in*: **Fisiopatologia**, Ed Panamericana. 2a ed., p. 82-125. 1990.
- Gray, K.J.; Engelmann, U.H.; Johnson, E.H. *et al.* Evaluation of misoprostol citoprotection of bladder with cyclophosphamide (cytoxan) therapy. **J. Urol.** **133**: 497. 1986.

- Griffith, T.M.; Edwards, D.H.; Lewis, M.J. *et al.* The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. **Nature**, **308** : 635-645, 1984.
- Grinberg, D.J The use of prostaglandin F₂-alpha for the prophylaxis of cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **J. Urol.**, **144(6)** : 1500-1504, 1990.
- Guyton, A.C. A microcirculação e o sistema linfático, *in*: **Tratado de Fisiologia Médica**. Ed. Guanabara-Koogan, 8a ed., p. 149-150, 1992.
- Hader, J.E.; Marzella, L.; Myers, R.A. *et al.* Hyperbaric oxygen treatment for experimental cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **J. Urol.**, **149(6)** : 1617-1621, 1993.
- Hechtmann, D.H., Cybulsky, M.I.; Fuchs, H.J. *et al.* Intravascular IL-8 inhibitor of polymorphonuclear leucocyte accumulation at site of acute inflammation. **J. of Immun.**, **147(3)** : 883-892, 1991.
- Hököfelt, T.; Kellerth, J.O.; Nilsson, G. *et al.* Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. **Brain Res.**, **100** : 235-252, 1975.
- Horton, J., and Hill, G.J. Systemic cancer treatment in : **Clinical Oncology**, Ed. W.B. Saunders Company, p: 157-182, 1977
- Huggins, C., and Hodges, C.F. Studies on prostatic cancer, **Cancer Res.**, **1** : 293, 1941.
- Jerkins, G.R.; Noe, H.N., and Hill, D.E. An unusual complication of silver nitrate treatment of hemorrhagic cystitis : case report. **The J. of Urol.**, **1936** : 456-458, 1986.
- Juma, F.D.; Rogers, H.J., and Trounce, J.R. The pharmacokinetics of cyclophosphamide, phosphoramide mustard, and non-nitrogen mustard

studied by gas chromatography in patients receiving cyclophosphamide therapy. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, **10** : 327-335, 1980.

Kranc, D.M.; Kim, J.; Straus, F. *et al.* Prophylactic and therapeutic carboprost tromethamine bladder irrigation in rats with cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **J. Urol.** **148(4)**: 1326-1330, 1992.

Kumar, A., and Aggarwal, S. The sonographic appearance of cyclophosphamide-induced acute hemorrhagic cystitis, **Clin. Radiol.**, **41(4)** : 289-290, 1990.

Kumar, A.P.M., Wrenn, E.L.; Jayalakshamma, B. *et al.* Silver nitrate irrigation with alum for the control of massive bladder hemorrhage. **J. Urol.** **133** : 956. 1985.

Lemanske, R.F., and Kaliner, M. Late-phase IgE-mediated reactions, **J. Clin. Immunol.**, **81**: 1-5, 1988.

Lembeck, F., and Donnerer, J. Time course of capsaicin-induced functional impairments in comparison with changes in neuronal substance P content. **Arch. Pharmacol.**, **316** : 240-243, 1981.

Letendre, L.; Hoagland, H.C., and Gutz, M.A. Hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. **Mayo Clin. Proc.** **67 (2)**: 128-130, 1992.

Liu, Y.K.; Harty, J.I.; Stenbuck, G.S.; Holt, H.A. *et al.* Treatment of radiation or cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis using conjugated estrogen. **The J. of Urol.** **144** : 41-43, 1990.

Lomas, D.A.; Ip, M.; Chamb, A. *et al.* The effect of *in vitro* and *in vivo* dexamethasone on human neutrophil function. **Agents and Actions**, **33**: 279-285, 1991

- Long, C.J., Shikano, K., and Berkowitz, B.A. Anion exchange resins discriminate between nitric oxide and EDRF. **Eur. J. Pharmacol.**, **142** : 317-318, 1987.
- Mc Ever, R.P. Leucocyte-endothelial cell interactions. **Cur. Op. in cell Biol.**, **4** : 840-849, 1992.
- Mellet, W.; Ritz, F. The absorption and fate of tritium labeled cyclophosphamide in dogs. **Fed. Proc.**, **22(part I)** : 864, 1963.
- Metcalf, D. The molecular biology and functions of granulocyte macrophage colony-stimulating factors. **Blood**, **67**: 257, 1986.
- Moncada, S.; Palmer, M.J., and Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43** (2): 109-142, 1991
- Movat, H.Z.; Rettl, C.; Burrowes, C.E. *et al.* The effects of leukotriene b₄ on polymorphonuclear leukocytes and the microcirculation-comparison with activated complement (c5a) and enhancement of prostaglandin E₂. **Am J. Pathol.**, **115** : 233-244. 1984.
- Nicolau, D.P., and Hogan, K.R. National survey of use of MESNA for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. **Mayo Clin. Proc.**, **67** (6) : 611-612, 1992.
- Old, L.J. Tumor necrosis factor (TNF). **Science**, **230** : 630. 1985.
- Palmer, R.M.J.; Ferrige, A.G., and Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, **327** : 524-526. 1987.
- Parsons, C.L. Successful management of radiation cystitis with sodium pentosanpolysulfate. **J. Urol.**, **814** : 813-814. 1986.

- Paton, W.D.M. Compound 48/80 : a potent histamine liberator. **Br. J. Pharmacol.** **6** : 499-508, 1951.
- Peers, S.H. Anti-inflammatory steroids, in: **Immunopharmacology of Microcirculation**. Ed. Academic Press Limited, p. 207-219, 1994.
- Pernow, B., and Rosell, S. Effects of substance P on the blood flow in canine adipose tissue and skeletal muscle, **Acta Physiol. Scand.**, **93** : 139-141, 1975.
- Philips, F.S., Sternberg, S.S; Cronin, A.P., and Vidal, P.M. Cyclophosphamide and bladder toxicity, **Cancer Res.**, **21** : 1577-1589, 1961
- Pohl, J.; Stekar, J., and Hilgar, P. Chloroacetaldehyde and its contribution to urotoxicity during treatment with cyclophosphamide or ifosfamide- an experimental study. **Arzneimittel Farsching**, **39(6)** : 704-705, 1989.
- Proud, D.; Togias, A.; Naclerio, R.M. *et al.* Kinins are generated in vivo following nasal airway challenge of allergic individuals with allergen, **J. Clin. Invest.**, **72** : 1678-1685, 1983.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., and Moncada, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **Br. J. Pharmacol.**, **92** : 181-187, 1987.
- Rapoport, R.M., and Murad, F. Agonist induced endothelium-dependent relation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. **Circ. Res.**, **52** : 352-357, 1983.
- Rees, D.D., Palmer, R.M.J., Schulz, R.; Hodson, H.F., and Moncada, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.** **101** : 746- 752, 1990.

- Reynolds, R.D.; Simerville, J.J.; O'hara, D.D. *et al.* Hemorrhagic cystitis due to cyclophosphamide. **J. Urol.** **101** : 45-47, 1969
- Ribeiro, R.A.; Flores, C.A.; Cunha, F.Q. *et al.* IL-8 cause *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism, **Imunology**, **73** : 472-477, 1991.
- Robbins, S.L.; Kumar, V., and Cotran, R.S. Inflamaç o e reparo. *in* : **Patologia**, p. 33-72, 1991.
- Roderick, J.F. Glucorticoids and the inhibition of Phospholipase A₂, in: **Anti-inflammatory Steroid Action**. Ed. Academic Press, Inc., p 48-64, 1989.
- Rodrigues, P.C. Correla o e regress o linear. *in* : **Bioestat stica**, Ed. EDUFF, p. 111-113, 1986.
- Root, R.K. and Cohen, M.S. The microbicidal of human neutrophils and eosinophils. **Res. Inf. Dis.**, **3**: 565, 1981
- Root, R.K. Doenças infecciosas : mecanismos patog nicos e respostas do hospedeiro. *in* : **Fisiopatologia**, Ed Panamericana, 2a ed., p. 126-157, 1990.
- Samuelson, B. Leukotriens - mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science**, **220** : 568, 1983.
- Saria, A.; Lundberg, J.M.; Skofitsch, G *et al.* Vascular protein leakage in various tissues induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine, and by antigen challenge. **Arch, Pharmacol.**, **324** : 213-218, 1983.
- Serafin, W.E. and Austen, K.F. Mediators of immediate hypersensitivity reactions. **N. Engl. J. Med.**, **317** : 31, 1987.

- Shrom, S.H.; Donaldson, M.H.; Duckett, J.W. *et al.* Formalin Treatment for intractable hemorrhagic cystitis. **Cancer**, **38** : 1785. 1976.
- Souza, G.E.P., and Ferreira, S.H. Blockage by anti-macrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agent. Actions**, **17** : 97-103, 1985.
- Springer, T.A. Adhesion receptors of immune system. **Nature**, **346** : 425-434, 1990.
- Stambuck, B.U...Science's 1992 "molecule of the year": NO news!, **J. of the Brazilian Assoc. for the Advancem. of Sci**, 45(2) :97-99, 1993.
- Stepherd, J.D., Pringle, L.E.; Barnett, M.T. *et al.* Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. **Clin. Oncol.**, **9** (11) : 2016-2020, 1991.
- Stillwell, T.J., and Benson, R.C., Cyclophosphamide- induced hemorrhagic cystitis- a review of 100 patients. **Cancer**, **61** : 451-457, 1988.
- Therman, H.; Oberdorf, E.; Brock, N. *et al.* Electron microscopic investigations of cyclophosphamide-induced lesions of urinary bladder of the rat and their prevention by MESNA. **Urol. Int.**, **42**(1): 37-43, 1987.
- Wallace, A.G., and Waugh, R.A. Fisiopatologia da doença cardiovascular *in*: **Os Princípios Biológicos das Doenças**. Ed. Panamericana, 2a ed., p 790-792. 1990.
- Wedmore, C.V., and Williams, T.J. Platelet-activating factor (PAF), a secretory product of polymorphonuclear leucocytes, increase vascular permeability in rabbit skin. **Br. J. Pharmacol.**, **74** : 916-917, 1981.
- Williams, T.J., and Hellewell, P.G. Endothelial cell biology. **Am. Rev. Resp. Dis.**, **146** : S45-S50, 1992.

Williams, T.J., and Yarwood, H. Effects of glucocorticosteroids on microvascular permeability, **Am. Rev. Respir. Dis.** , **141** : S39-S43, 1990.

Zimmerman, G.A.; Prescott, P.M., and Mc Intyre, T.M. Endothelial cell interactions with granulocytes, **Imun. Today**, **13** (3): 93-99, 1992.