



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

AMÍLCAR DE FIGUEIREDO DORNELAS FILHO

**PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NA PATOGÊNESE DA CISTITE HEMORRÁGICA
INDUZIDA POR IFOSFAMIDA**

FORTALEZA-CE

2023

AMÍLCAR DE FIGUEIREDO DORNELAS FILHO

**PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NA PATOGÊNESE DA CISTITE HEMORRÁGICA
INDUZIDA POR IFOSFAMIDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior

FORTALEZA-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- D757p Dornelas Filho, Amílcar de Figueiredo Dornelas Filho.
Papel do neutrófilos na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. : Estudo experimental / Amílcar de Figueiredo Dornelas Filho Dornelas Filho. – 2023.
99 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior .
Coorientação: Profa. Dra. Deysi Viviane Tenazoa Wong.
1. Cistite. 2. Ifosfamida. 3. Neutrófilos. 4. Citocinas. 5. Inflamação. I. Título.

CDD 615.1

AMÍLCAR DE FIGUEIREDO DORNELAS FILHO

PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NA PATOGÊNESE DA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Aprovada em: 15/04/2015

BANCA EXAMINADORA

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

.....
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Cear (UFC)

.....
Prof. Dr. Marcos Venício Alves Lima
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sua presença em todos os momentos e por ter me dado força e coragem para continuar nessa caminhada.

À **Universidade Federal do Ceará (UFC)**, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Agradeço aos meus colegas do (LAFICA), em especial a Ana Carla, Anamaria, Ana Paula, Camila, Daniel, Danielle, Enzo, Eudmar, Fábio, Larisse, Lívia e Maraíza, pelo apoio e, em especial, aos grandes amigos Anielle, Camila Meireles, Carlos Wagner, Dra. Deysi Viviana, Renan e Vénucia.

Ao Professor Doutor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro pelo acolhimento que recebi, mesmo não tendo experiência em pesquisa experimental à época. Sendo apenas um simples Farmacêutico Hospitalar, fui recebido com atenção e dedicação por parte do Professor. Através do seu estímulo, força e exemplo, foi possível acreditar que sempre é possível fazer a diferença pelos outros e pela ciência.

Aos apoios financeiros da **PIBC**, **FUNCAP** e **CNPQ**, que investem no desenvolvimento científico deste país.

Quero expressar minha sincera gratidão ao Professor Doutor Roberto César Pereira Lima Júnior, pela sua incansável assistência em várias situações. Seu exemplo de confiança, dedicação e esperança foram elementos fundamentais para o sucesso em nossa missão.

“É melhor morrer em combate do que ver
ultrajada a nossa nação” (Winston
Churchill)

RESUMO

Introdução: A ifosfamida (IFO) é um agente citotóxico alquilante utilizado no tratamento de câncer ginecológico e de mama, por exemplo. Dentre os efeitos adversos da IFO, destaca-se a cistite hemorrágica (CH) afetando de 6-50% dos pacientes. Estudos do nosso laboratório evidenciaram a participação de diversos mediadores inflamatórios na patogênese da CH, como o TNF- α , o IL-1 β e o óxido nítrico, cuja modulação farmacológica previne diversos fenômenos inflamatórios, incluindo a migração de neutrófilos. Entretanto, ainda se desconhece a contribuição dos neutrófilos no desenvolvimento da CH. Portanto, objetivou-se estudar o papel dos neutrófilos na patogênese da CH. **Métodos:** camundongos Swiss fêmeas (25-30g) foram tratados com salina (5 ml/kg, i.p), FUCOIDINA (um inibidor do rolamento de neutrófilos, 100 mg/kg, e.v), IFO (400 mg/kg, i.p) ou IFO+FUCOIDINA (10mg/Kg;30mg/Kg e 100mg/KG) seguido de jejum hídrico. Adicionalmente, os animais foram pré-tratados com doses crescentes de G-CSF (um estimulador de colônia de neutrófilos) por 5 dias (100 μ g/Kg, 200 μ g/Kg, 400 μ g/Kg) e acrescentado IFO (200mg/Kg, i.p.) ou foram tratados com apenas IFO 200mg/Kg ou G-CSF 400 μ g/Kg seguido de jejum hídrico. Após 12h, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e amostras de bexigas foram coletadas para avaliação do peso úmido vesical (PUV, mg/20g de animal), análise dos critérios macroscópicos de lesão (edema e hemorragia), atividade de mieloperoxidase (MPO, neutrófilo/mg proteína) e permeabilidade vesical (PV, pg de azul de evans/mg de bexiga). **Resultados:** a IFO induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) do PUV (52 \pm 9,5), edema (3[3-3]), hemorragia (2[2-3]), MPO (1268 \pm 706,2) e PV (111 \pm 46) vs o grupo salina (PUV: 19,17 \pm 3,67; edema: 0[0-0]; hemorragia: 0[0-0]; MPO: 167,68 \pm 59,84 e PV: 17,36 \pm 2,99). Entretanto, tais parâmetros foram significativamente ($p < 0,05$) reduzidos pela fucoidina 100mg/Kg (PUV: 35,8 \pm 9; edema: 1[1-2]; MPO: 552,7 \pm 203,6 e PV: 38,8 \pm 14,6) vs o grupo IFO. Os grupos pré-tratados com G-CSF (100 μ g/Kg, 200 μ g/Kg, 400 μ g/Kg) obtiveram um aumento significativo do PUV (58,8 \pm 6,13;60 \pm 3,6;58 \pm 5,34) vs PUV do grupo IFO 200mg/Kg(31,32 \pm 4,6). O pré-tratamento com G-CSF (200 μ g/Kg, 400 μ g/Kg) +IFO aumentou o número de neutrófilos (1579 \pm 314; 1951 \pm 257,8) encontrados na bexiga vs grupo tratado com IFO(200mg/Kg)(961,5 \pm 88,5)($P < 0,05$). Já ao avaliar os critérios microscópicos de

lesão observou-se que os animais pré-tratados com 400µg/Kg de G-CSF+IFO 200mg/Kg induziu um aumento significativo($p<0,05$) de escores de infiltrado leucocitário [3(1-3)] e depósito de fibrina [1(0-2)] vs o grupo que recebeu IFO (200mg/Kg) com escore de infiltrado leucocitário [0,5(0-1)] e fibrina [0(0-1)].

Conclusão: a inibição da migração de neutrófilos preveniu o desenvolvimento da cistite hemorrágica, sugerindo o papel dos neutrófilos na patogênese dessa doença.

Palavras-chave: ifosfamida; cistite hemorrágica; neutrófilos, fucoidina

ABSTRACT

ROLE OF NEUTROPHILS IN THE PATHOGENESIS OF IFOSFAMIDE-INDUCED HEMORRHAGIC CYSTITIS

Introduction: Ifosfamide (IFO) is an alkylating cytotoxic agent used in the treatment of gynecological and breast cancer, among others. Among the adverse effects of IFO, hemorrhagic cystitis (HC) stands out, affecting 6-50% of patients. Studies conducted in our laboratory have shown the involvement of various inflammatory mediators in the pathogenesis of HC, such as TNF- α , IL-1 β , and nitric oxide, whose pharmacological modulation prevents various inflammatory phenomena, including neutrophil migration. However, the contribution of neutrophils to the development of HC is still unknown. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of neutrophils in the pathogenesis of HC. **Methods:** Female Swiss mice (25-30g) were treated with saline (5 ml/kg, i.p.), FUCOIDAN (a neutrophil rolling inhibitor, 100 mg/kg, i.v.), IFO (400 mg/kg, i.p.), or IFO+FUCOIDAN (10mg/kg; 30mg/kg; and 100mg/kg) followed by water fasting. Additionally, the animals were pre-treated with increasing doses of G-CSF (a neutrophil colony-stimulating factor) for 5 days (100 μ g/kg, 200 μ g/kg, 400 μ g/kg) and IFO (200mg/kg, i.p.) was added, or they were treated with only IFO 200mg/kg or G-CSF 400 μ g/kg followed by water fasting. After 12 hours, the animals were euthanized by cervical dislocation, and bladder samples were collected for evaluation of bladder wet weight (BWW, mg/20g of animal), analysis of macroscopic lesion criteria (edema and hemorrhage), myeloperoxidase activity (MPO, neutrophils/mg protein), and bladder permeability (BP, pg Evans blue/mg bladder). **Results:** IFO induced a significant increase ($p < 0.05$) in BWW (52 \pm 9.5), edema (3[3-3]), hemorrhage (2[2-3]), MPO (1268 \pm 706.2), and BP (111 \pm 46) compared to the saline group (BWW: 19.17 \pm 3.67; edema: 0[0-0]; hemorrhage: 0[0-0]; MPO: 167.68 \pm 59.84; BP: 17.36 \pm 2.99). However, these parameters were significantly ($p < 0.05$) reduced by 100mg/kg of FUCOIDIN (BWW: 35.8 \pm 9; edema: 1[1-2]; MPO: 552.7 \pm 203.6; BP: 38.8 \pm 14.6) compared to the IFO group. The groups pre-treated with G-CSF (100 μ g/kg, 200 μ g/kg, 400 μ g/kg) showed a significant increase in BWW

(58.8±6.13; 60±3.6; 58±5.34) compared to the BWW of the IFO 200mg/kg group (31.32±4.6). Pre-treatment with G-CSF (200µg/kg, 400µg/kg) + IFO increased the number of neutrophils (1579±314; 1951±257.8) found in the bladder compared to the group treated with IFO (200mg/kg) (961.5±88.5) ($p<0.05$). When evaluating the microscopic lesion criteria, it was observed that animals pre-treated with 400µg/kg of G-CSF+IFO 200mg/kg induced a significant increase ($p<0.05$) in leukocyte infiltration scores [3(1-3)] and fibrin deposition [1(0-2)] compared to the group that received IFO (200mg/kg) with leukocyte infiltration score [0.5(0-1)] and fibrin [0(0-1)]. **Conclusion:** Inhibition of neutrophil migration prevented the development of hemorrhagic cystitis, suggesting the role of neutrophils in the pathogenesis of this disease.

Keywords: ifosfamide; hemorrhagic cystitis; neutrophils; fucoidan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01– Metabolismo da Ifosfamida (Mostarda de Isofosforamida: responsável pelo efeito citotóxico; Acroleína: responsável pelo efeito urotóxico).....	15
Figura 02 -Processo de interação leucócito-endotélio.....	22
Figura 03 – Citocinas e quimiocinas produzidas por neutrófilos.....	24
Figura 04 – Efeito do pré-tratamento com fucoidina previne o aumento no peso úmido vesical durante a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	46
Figura 05 – Pré-tratamento com fucoidina atenua a permeabilidade vesical induzida pela ifosfamida.....	47
Figura 06 – Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre a lesão microscópica durante a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	49
Figura 07 – Fotomicrografia de bexigas de camundongos.....	50
Figura 08 – Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre o acúmulo vesical de neutrófilos durante a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	51
Figura 09 – O pré-tratamento com fucoidina atenua a produção de citocinas pró-inflamatórias.....	52
Figura 10 – Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre a expressão do RNAm da ciclooxigenase-2 (COX-2)	54

Figura 11 – O pré-tratamento com fucoïdina reduz a imunoeexpressão de COX-2 durante a cistite hemorrágica.....	54
Figura 12–Efeito do pré-tratamento com fucoïdina sobre a análise da imunohistoquímica para COX-2	56
Figura 13 – Efeito do pré-tratamento com fucoïdina sobre a hiperalgesia visceral induzida por ifosfamida.....	57
Figura 14 – Efeito do pré-tratamento com fucoïdina sobre a coordenação motora dos animais.....	58
Figura 15 – Efeito do pré-tratamento com fucoïdina sobre os parâmetros bioquímicos de avaliação hepática e renal.....	59
Figura 16 Diferença entre o número total de neutrófilos antes do tratamento com ifosfamida 200mg/Kg e antes da eutanásia.....	60
Figura 17 Efeito do pré-tratamento com filgastrim sobre o peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	62
Figura 18 Fotomicrografias de bexigas de camundongos	65
Figura 19 Efeito do pré-tratamento com filgastrim sobre o acúmulo vesical de neutrófilos durante a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH	Cistite hemorrágica
COX-2	Ciclooxigenase dois
CYP	Ciclofosfamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
G-CSF	Estimulador de colônia de granulócitos
HE	Hemotoxilina-eosina
IFO	Ifosfamida
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
i.p	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
LUTS inferior)	<i>Lower urinary tract symptoms</i> (sintomas do trato urinário inferior)
MESNA	Sódio-2-mercapto-etanosulfonato
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PRR	Receptores de Reconhecimento Padrão
P	Nível de significância
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
s.c.	Subcutâneo
S.E.M.	Desvio padrão da média
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM	Molécula de adesão da célula vascular
FUCO	Fucoidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Câncer	12
1.2	Ifosmamida	12
1.3	Cistite hemorrágica	15
1.4	Migração de neutrófilos no processo inflamatório agudo.....	18
1.5	Fucoidina	23
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVO GERAL	26
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Animais	27
4.2	Drogas, Reagentes	28
4.3	Anticorpos	28
4.4	Aparelhos, materiais e instrumentos laboratórias	29
4.5	Soluções	31
4.6	Corantes	31
4.7	Grupos experimentais	32
4.8	Indução da cistite hemorrágica	34
4.9	Avaliação do peso úmido vesical	34
4.10	Análise macroscópica	34
4.11	Análise microscópica	35
4.12	Avaliação da permeabilidade vesical	35
4.13	Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase	36
4.14	Imuno-histoquímica para ciclooxigenase-2(COX-2)	36
4.15	Teste de von Frey	37
4.16	Dosagem dos níveis de IL-1 β e IL-6 no tecido.....	38
4.17	Contagem de células hematológicas	39
4.18	Análise de parâmetros bioquímicos	39
4.19	Análise microscópica de animais tratados com subdose de IFO.....	39

5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6	RESULTADOS	42
6.1.1	Efeito da fucoïdina sobre o peso úmido vesical	42
6.1.2	Efeito da fucoïdina sobre a permeabilidade vesical	43
6.1.3	Efeito da fucoïdina sobre os escores macroscópicos e microscópicos	44
6.1.4	Efeito da fucoïdina sobre o acúmulo vesical de neutrófilos.....	48
6.1.5	Efeito da fucoïdina sobre dosagem de IL-1 β e IL-6.....	49
6.1.6	Efeito da fucoïdina sobre expressão de COX-2.....	51
6.1.7	Efeito da fucoïdina sobre a nocicepção visceral.....	53
6.1.8	Efeito da fucoïdina sobre o teste rota-rod.....	54
6.1.9	Efeito da fucoïdina sobre parâmetros bioquímicos.....	55
6.2.1	Efeito do filgastrim sobre o número total de neutrófilos	57
6.2.2	Efeito do filgastrim sobre o peso úmido vesical.....	60
6.2.3	Efeito do tratamento com filgastrim sobre os escores macroscópicos	61
6.2.4	Efeito do tratamento com filgastrim sobre os critérios microscópicos.	62
6.2.5	Efeito do filgastrim sobre o acúmulo de neutrófilos.....	64
7	DISCUSSÃO.....	65
8	CONCLUSÃO.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer representa um problema de saúde pública mundial. De acordo com estimativas do projeto da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês International Agency for Research on Cancer) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012 (FERLAY, et al, 2012).

A incidência de casos de câncer no Brasil cresce em um ritmo que acompanha o cenário mundial. Isso se deve, principalmente, pela mudança de hábitos da população, como o consumo de alimentos industrializados, fumo, alcoolismo, exposição a agentes cancerígenos. As estimativas para o ano de 2014, que também são válidas para o ano de 2015, indicam a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, sendo os cânceres de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) os mais incidentes na população brasileira (INCA, 2014; FERLAY, et al, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere que no ano de 2030, haverá uma incidência de 27 milhões de casos de câncer e 75 milhões de pessoas serão portadoras dessa patologia (BRASIL, 2011), muitas das quais sofrendo os efeitos da toxicidade do tratamento oncológico (BRASIL, 2011; GUERRA et al., 2005; JEMAL et al., 2011), com mucosite intestinal induzida por irinotecano, neurotoxicidade induzida por agentes platínicos e alcaloides vegetais e cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida e ifosfamida.

1.2 Ifosfamida

A ifosfamida (IFO) é um fármaco antineoplásico muito utilizado no tratamento de tumores de células germinativas testiculares, tratamento dos sarcomas de tecidos moles, o sarcoma de Ewing e linfomas não-Hodgkin e

tratamento do carcinoma de pulmão e pancreático (BROCK et al., 1988; BRADE et al., 1985; ZALUPSKI; BAKER, 1988; LOEHRER et al., 1990).

É um agente citostático do grupo da oxazafosforinas. Quimicamente está relacionada com a mostarda nitrogenada e é um análogo sintético da ciclofosfamida. Estes agentes são pró-drogas que após metabolização hepática produzem substâncias eletrolíticas capazes de se ligar aos grupamentos nitrogenados dos ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA), bem como a alguns elementos proteicos, corrompendo sua estrutura. Dessa forma, estas drogas produzem ligações covalentes com moléculas e estruturas fundamentais para o metabolismo e a sobrevivência da célula, exercendo assim, seus efeitos citotóxicos de forma independente ao ciclo celular (CHABNER et al., 2005).

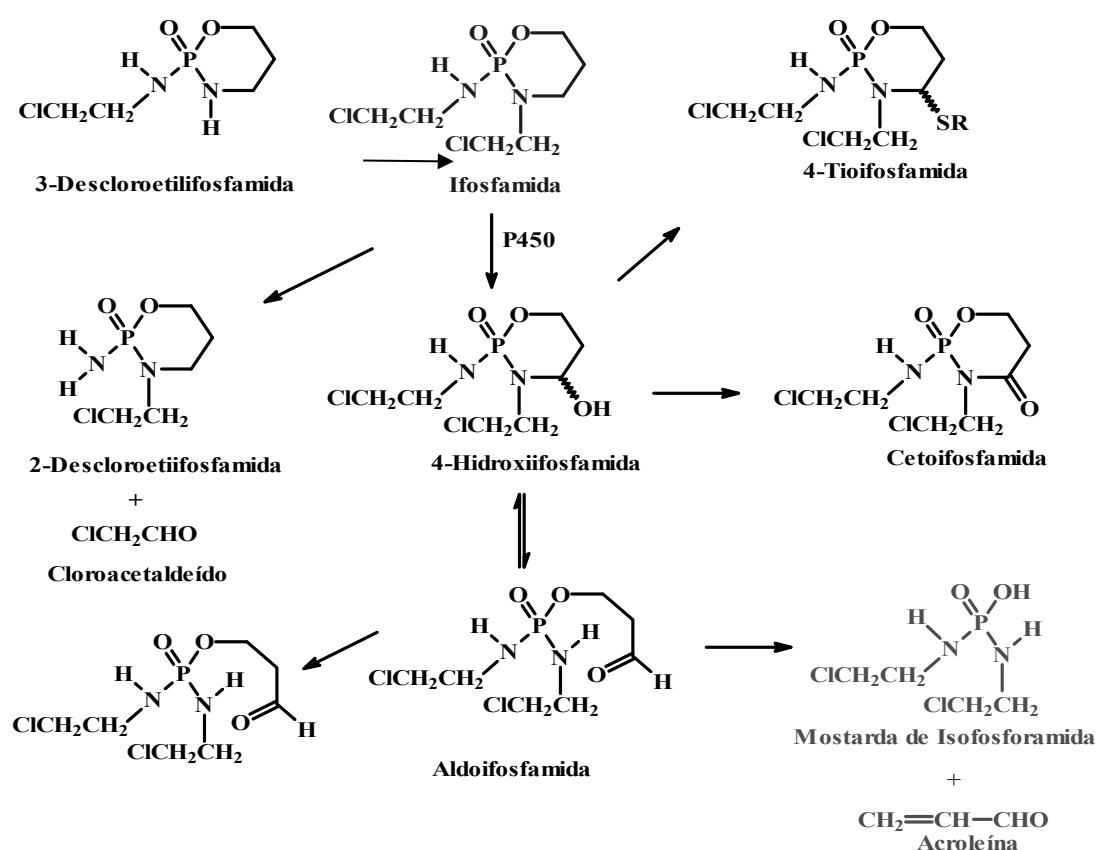
As etapas do metabolismo da IFO e da ciclofosfamida apresentam analogias nas vias de processamento, apresentando metabólitos como a mostarda de fosforamida, agente alquilante citotóxico e a acroleína, subproduto tóxico, o maior responsável pelo dano urotelial (HILL et al., 1973).

A IFO é inativa *in vitro* e preferencialmente ativada *in vivo* no fígado pelas enzimas microssomais, via Citocromo P450 hepático (**Figura 1**), que leva a produção de metabólitos ativos em 4-hidroxi-IFO, que está em equilíbrio com aldofosfamida, seu tautômero. A aldofosfamida se desintegra espontaneamente em acroleína e no metabólito alquilante mostarda de isofosfamida. A acroleína é a responsável pelo efeito urotóxico da IFO. Então, quanto maior a dose ingerida do fármaco, maiores quantidades do metabólito tóxico serão produzidos e mais severas serão os danos ao tecido da bexiga. Os principais efeitos tóxicos dose-dependentes da IFO são: a aplasia medular, a esterilidade, o linfoma e a leucemia, podendo afetar até 5% dos pacientes, a neoplasia de bexiga, a ulceração da mucosa oral e a desnudação intestinal, a alopecia acentuada, há casos de doença venoclusiva do fígado, a toxicidade no Sistema Nervoso Central (SNC), representada por náuseas e vômitos e, finalmente, mas não menos importante, a cistite hemorrágica (CH), que ocorre em aproximadamente 4% dos casos tratados por via intravenosa (IARC et al., 1981; IARC et al., 1987; KLIPPEL et al., 1995; BRUNTON et al., 1996; BRESSA et al., 2010).

O efeito citotóxico se deve à interação entre os metabólitos alquilantes e o DNA. O ponto de ataque preferido são as pontes de fosfodiéster do DNA. A alquilação resulta em fraturas na fita e ligações cruzadas com o DNA. Durante o ciclo celular, a passagem pela fase G2 é atrasada. Os efeitos citotóxicos não são específicos para a fase do ciclo celular; porém ele é específico para o ciclo celular (COLVIN et al., 1976; GAMCSIK et al., 1993).

A acroleína já está presente na urina após 30 minutos da administração de IFO. Este metabólito se acumula na bexiga urinária, gerando a expressão de mediadores inflamatórios tais como fator de necrose tumoral-alfa (TNF α), interleucina 6 (IL-6) e ciclo-oxigenase tipo 2 (COX-2), e causa danos (edema, dilatação vascular e incremento da fragilidade capilar na mucosa da bexiga, levando à hemorragia). O quadro hemorrágico ocorre normalmente nas primeiras 48 horas, caracterizando a cistite hemorrágica. A cronicidade do quadro inflamatório leva a uma fibrose progressiva de parede vesical, a uma diminuição da capacidade de armazenamento da bexiga, que se torna pequena, fibrótica e não continente (KIMURA et al., 1998; RIBEIRO et al., 2002; MANIKANDAN et al., 2010).

Figura 1 – Metabolismo da Ifosfamida (Mostarda de Isofosforamida: responsável pelo efeito citotóxico; Acroleína: responsável pelo efeito urotóxico).



1.3 Cistite hemorrágica

A cistite hemorrágica (CH) está entre os efeitos mais comuns em pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico, sendo um fator limitante do tratamento dos tumores malignos. Há relato de que IFO produz cistite hemorrágica mais frequentemente do que ciclofosfamida (PYERITZ et al., 1978). Na ausência de adequada uroproteção, a CH se torna dose limitante, com uma incidência média que varia de 18 a 40% (HENSLEY et al., 1999). Ela pode ser dividida em três grandes categorias: 1) consequente ao câncer de bexiga ou cânceres adjacentes que avançam sobre a bexiga a partir da próstata, útero, cérvix, ou do reto; 2) cistite infecciosa que ocorre em pacientes imunodeprimidos com câncer; 3) cistite por quimioterapia ou induzida por radioterapia (MOY et al., 2012).

O conjunto de sintomas da CH é chamado de “LUTS” (*lower urinary tract symptoms*) que inclui: disúria, polaciúria, urgência miccional, nictúria, dor suprapúbica e hematúria microscópica ou macroscópica (MOY et al., 2012). Diferentemente dos outros efeitos adversos provenientes do uso de IFO, a CH não provém diretamente do uso do agente antineoplásico, sendo a acroleína como o principal responsável pelo dano urotelial (PHILLIPS et al., 1961; FORNI et al., 1964).

Durante muito tempo, os mecanismos envolvidos na patogênese da CH foram em grande parte desconhecidos e constituíram um assunto de grande interesse para pesquisadores. Durante as duas últimas décadas, vários estudos tentaram elucidar as vias de desenvolvimento da patogênese da CH, mas a maioria dos artigos publicados se concentrou na lesão induzida por ciclofosfamida. Apenas alguns estudos estão relacionados com a IFO, no entanto, os mecanismos subjacentes parecem ser equivalentes. A primeira descrição de dano sintomático na bexiga, hematúria macro e microscópica após a administração de ciclofosfamida, foi descrito logo depois da sua introdução como um agente antineoplásico em 1958 (ARNOLD, et al., 1958; DEVRIES et al., 1990; OTER, et al., 2004; MACEDO et al., 2008).

Os primeiros estudos sugeriram que os agentes alquilantes eram responsáveis diretos pela CH. Todavia, estudos posteriores demonstraram que a ciclofosfamida induzia danos na bexiga de ratos e cães e que esses efeitos eram causados por produtos metabólicos excretados na urina, além de descobrirem que a urina dos cães tratados com ciclofosfamida poderia reproduzir cistite quando transferidas aos cães de controle (PHILIPS et al., 1961). A acroleína foi caracterizada como um metabólito da ciclofosfamida presente na urina responsável pelo desenvolvimento CH (COX et al., 1979; MACEDO et al., 2008). Apesar deste conhecimento, a primeira demonstração do envolvimento de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas e o óxido nítrico (NO), na patogênese da CH induzida por oxazafosforinas ocorreu mais de quinze anos mais tarde (GOMES et al., 1995; SOUZA-FILHO et al., 1997; LIMA-JÚNIOR et al., 2007).

Estudos recentes mostram mecanismos importantes envolvidos na patogênese da CH induzida por IFO. Destaca-se nesse sentido, o envolvimento de citocinas, como TNF- α e interleucina-1 (IL-1), como mediadores inflamatórios envolvidos no dano urotelial e na hemorragia (GOMES et al., 1995; RIBEIRO et al., 2002). A partir de estudos nos quais se utilizavam drogas que reduziam de forma significativa e dose dependente a síntese de óxido nítrico (NO), reduzindo edema, hemorragia e a infiltração de neutrófilos, pode-se confirmar o seu papel de mediador crucial para ocorrência do dano urotelial e hemorrágico da cistite (SOUZA-FILHO, 1997). A administração de soro anti-TNF- α ou anti-IL-1 β diminuíram significativamente os eventos inflamatórios induzidos por IFO (RIBEIRO et al., 2002). Verificou-se também um aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (SOUZA-FILHO, 1997). Ademais, a indução da iNOS na bexiga inflamada parece exigir a ação do fator ativador de plaquetas (PAF) (SOUZA-FILHO, 1997).

Estudo com inibidores da via da ciclooxigenase-2 (COX-2) demonstraram que esta via também participa do processo inflamatório da CH induzida por IFO. Foi observado que eles não só reduzem a atividade da COX-2, como também diminuem a sua expressão por imunohistoquímica em bexigas de ratos pré-tratados com etoricoxibe ou indometacina (MACEDO et al., 2008).

A partir desses estudos, pode-se afirmar que a lesão urotelial induzida por IFO parece depender de uma cascata de mediadores inflamatórios que envolvem citocinas (TNF- α e IL-1), prostaglandinas produzidas via ativação da COX-2 e óxido nítrico, produzido através do aumento da expressão e ativação de iNOS tanto por citocinas como por PAF (MACEDO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2002).

Neste cenário, com base na revisão realizada pelo grupo de pesquisa do LAFICA (Ribeiro et al., 2012), foram identificadas várias etapas interligadas no processo da cistite hemorrágica (CH). Essas etapas foram divididas em quatro fases principais:

a) A primeira fase, conhecida como fase de iniciação, ocorre quando há acúmulo de acroleína na bexiga, resultando em danos ao urotélio.

b) A fase seguinte, denominada fase inflamatória, caracteriza-se pela regulação positiva de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa-B (NFkappaB) (KIUCHI et al., 2009; KORKMAZ et al., 2007), e pela liberação de citocinas inflamatórias pelas células epiteliais e conjuntivas residentes, como os macrófagos (GOMES et al., 1995; RIBEIRO et al., 2002). Nessa fase, ocorre uma resposta inflamatória intensificada, com produção de citocinas em grande quantidade, além da geração de espécies reativas de oxigênio (KORKMAZ et al., 2007) e nitrogênio (KORKMAZ et al., 2005), e expressão de enzimas inflamatórias, como a óxido nítrico sintase induzida (OTER et al., 2004; SOUZA-FILHO et al., 1997) e a ciclooxigenase-2 (MACEDO et al., 2008a; MACEDO et al., 2008b).

c) A terceira fase, denominada fase sintomática, está relacionada à exposição do urotélio e à formação de úlceras, causando dor (MARTINS et al., 2012) e disfunção vesical (MACEDO et al., 2011).

d) A quarta fase, chamada de fase de cicatrização, envolve a reparação dos tecidos, podendo ocorrer sinalizações por fibroblastos e liberação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de queratinócitos (ULICH et al., 1997).

As toxicidades do tratamento oncológico podem afetar a qualidade de vida do paciente, limitando muitas vezes a dose e aumentando a duração do tratamento, o que é muito comum na terapia com IFO. No intuito de minimizar tais

consequências, foram desenvolvidos agentes com o objetivo de aliviar ou eliminar esses efeitos tóxicos (J CLIN ONCOL, 1999; SEBER et. Al, 1999).

Um bom agente protetor deve prevenir as toxicidades, sem afetar a eficácia antitumoral do tratamento oncológico. Vários agentes foram testados, no intuito de prevenir os pacientes da cistite hemorrágica induzida por IFO (BROCK et al., 1981). O mais eficaz foi o 2-mercaptoetano-sulfonato de sódio (MESNA) sendo, atualmente o agente terapêutico mais utilizado com essa indicação (LIMA et al., 2007).

O MESNA (2-mercaptoetano-sulfonato de sódio) é um tiol, que ao alcançar a circulação sanguínea, sofre uma rápida oxidação e assume sua forma dimérica ditiodietanosulfonato de sódio (DiMESNA), sendo esse metabólito menos ativo que o MESNA. O que é muito bom, uma vez que o efeito protetor em nível plasmático do MESNA produziria um antagonismo aos efeitos farmacológicos da IFO (SHAW et al., 1987).

DiMESNA e MESNA são bastante hidrofílicos, sendo rapidamente depurados pelo rim. Por conta dessa rápida depuração renal e por sua meia-vida plasmática ser de apenas cerca de 90 minutos, dextoxificação ocorre principalmente no sistema urinário. Os grupos sulfidril (tiol) livres do MESNA combinam-se com a acroleína, formando um tioéter não tóxico (LIMA et al., 2007).

Estudos mostram que o protocolo padrão de tratamento profilático com MESNA provoca alterações citoscópicas em 66,7% dos pacientes e alterações microscópicas como edema e ulceração em 100% (LIMA et al., 2007). Tais fatos, provavelmente se sustentem pelo fato de MESNA não se tratar de um anti-inflamatório e nem apresente propriedades antioxidantes, portanto acaba não atuando na modulação de vias inflamatórias envolvidas na cistite hemorrágica (SHAW et al., 1987; VIEIRA et al., 2003; LIMA et al., 2007). Por essas razões, substâncias de com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias podem representar uma alternativa em potencial para o tratamento da cistite hemorrágica.

Muitos estudos que avaliaram a CH e o papel de mediadores inflamatórios mediante modulação farmacológica foram feitos por parâmetros que incluíam: peso úmido vesical, permeabilidade vascular, escores macro e microscópicos e atividade de mieloperoxidase, um marcador da migração de

neutrófilos para o tecido inflamado. Considerando que a atividade protetora de moduladores farmacológicos de mediadores pró-inflamatórios envolvia, dentre outros efeitos, a redução do acúmulo de neutrófilos teciduais e a melhora da CH, especulou-se se os neutrófilos teriam um papel na gênese dessa lesão.

1.4 Migração e atividade de neutrófilos no processo inflamatório agudo

Neutrófilos são células fagocíticas de vida curta (12-24 horas) do sistema imune. Na ausência de um estímulo inflamatório, estão ausentes nos tecidos, e ficam circulando na parte central dos vasos sanguíneos. São as primeiras células a serem recrutadas ao processo inflamatório, caracterizando um processo inflamatório agudo. Com o estímulo inflamatório, há um aumento do calibre vascular, causando um aumento do fluxo sanguíneo para o local onde o dano se encontra e, depois disso, as células de defesa começam a diminuir a velocidade, a lateralizar e a parar. Isto possibilita a chegada rápida de anticorpos e leucócitos ao foco da lesão (WAGNER; ROTH, 2000).

Substâncias químicas como histamina, bradicinina, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetária (PAF), NO, neuropeptídeos e citocinas são responsáveis por estimular a contra proteção do organismo ao dano, causando um aumento da permeabilidade vascular, uma vasodilatação, uma contração da musculatura lisa e hipersecreção de fluidos para o foco da lesão (ABBAS; LICHTMAN, 2003; SEELY et al., 2003; ROIT; DELVES, 2004).

O influxo dos neutrófilos para o sítio inflamatório se dá por estimulação de quimiocinas, tais como: CXCL-8/ IL-8, TNF, C3a, C5a e LTB₄ que são responsáveis por fazer com que os neutrófilos diminuam sua velocidade dentro do vaso e iniciem a marginação e posteriormente a migração (KOBAYASHI et al., 2009). As selectinas participam de todo esse processo onde a L-selectina e P-selectina, expressas respectivamente no leucócito e no endotélio vão ser responsáveis pela interação inicial entre essas células, participando do processo conhecido por rolamento.

A exteriorização da P-selectina armazenada nos corpos de Weibel-Palade presente em células endoteliais em repouso e o aumento da expressão de fator ativador de plaquetas (PAF) nas células que revestem as vênulas ocorrem

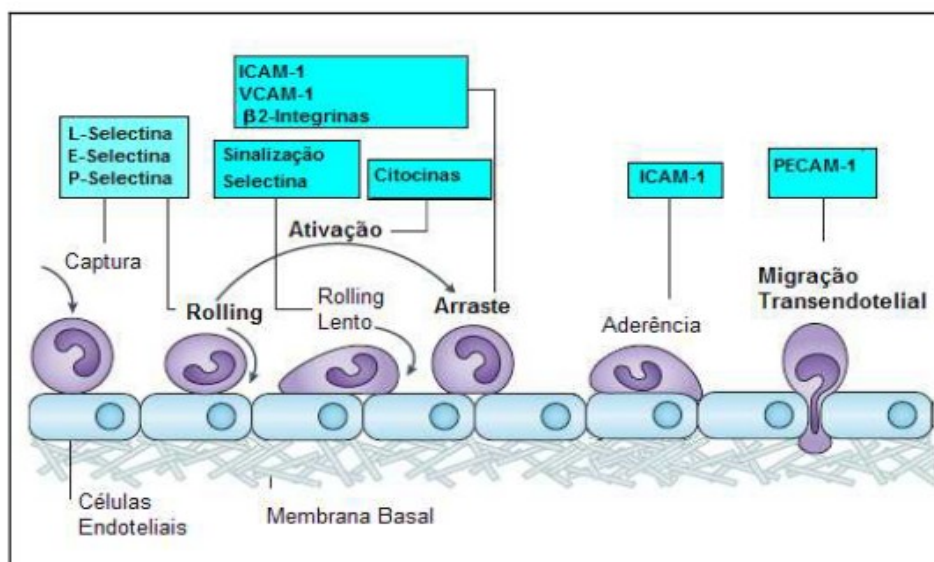
principalmente devido à ação de histamina e trombina provenientes do estímulo inflamatório (PHILLIPSON; KUBES,2011).

A ocupação posterior da P-selectina pelo ligante glicoproteico-1(PSGL-1) promove uma desaceleração dos neutrófilos e facilita a ligação do PAF ao seu receptor presente nos neutrófilos (PAF-R) ativando estas células e resultando no aumento da expressão de integrinas como o antígeno funcional leucocitário-1(LFA-1) (PHILLIPSON; KUBES,2011).

O endotélio ativado por TNF- α , IL-1 β e LPS, expressa posteriormente a E-selectina, passando a produzir CXCL-8, cuja ação é se ligar ao seu receptor na célula inflamatória e induzir um sinal que provocará uma alteração conformacional na molécula de integrina presente no neutrófilo (CD11/CD18), que acaba permitindo uma maior adesão desta célula com o endotélio, facilitando o processo de migração (HAYASHI et al., 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2003). Dessa forma, observa-se que as integrinas são responsáveis pela aderência firme (CHOI et al., 2010; LANGER; CHAVAKIS, 2009).

As ligações mediadas por selectinas são pouco estáveis, podendo se desfazer facilmente. Para que ocorra a adesão dos neutrófilos ao endotélio é necessário que haja a participação das β 2 integrinas, que são conhecidas como moléculas de adesão (CAMs): *intercellular cell adhesion molecule* (ICAM-1 ou 2), *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1), *platelet-endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1) (GONZÁLEZ-AMARO; SÁNCHEZ-MADRID, 1999). A forte adesão entre endotélio e leucócitos se dá pela indução de ICAM-1 e VCAM-1 no endotélio. Iniciado esse processo, dá-se a expressão de PECAM-1 nas bordas da célula endotelial, que é essencial para a transmigração de leucócitos para focos de inflamação (SCHENKEL et al., 2006). Esse processo está resumido na **figura 2**.

Figura 02 – Processo de interação leucócito-endotélio. (Fonte: BELINATI et al., 2010).



Os neutrófilos são células multilobuladas produzidas na medula óssea (MO) a partir de um precursor CFU-GM que após contato com estimuladores de colônia (IL-3, G-CSF e GM-CSF) no microambiente da MO sofre uma diferenciação em CFU-G e sobre ação principalmente de G-CSF irá se proliferar e diferenciar em precursores das células mielóides da linhagem neutrofílica. A produção de G-CSF é induzida pela ação da IL-17A sintetizadas pelas células T e esta por sua vez é liberada pela ação da IL-23 produzida por macrófagos e células dendríticas presentes no tecido. A maturação dos neutrófilos depende de fatores de transcrição tais como PU.1 e CCAAT / proteína de ligação e intensificação (C / EBP) α - ζ . Além disso, a produção de G-CSF dentro do tecido inflamado inibe a apoptose dos neutrófilos e aumenta resposta dos neutrófilos ao fMLP (formil Met-Leu-Phe), sugerindo aumento da fagocitose e da produção de espécies reativas de oxigênio (BENDALL; BRADSTOCK,2014; KOLOCZKOWSKA; KUBES,2013).

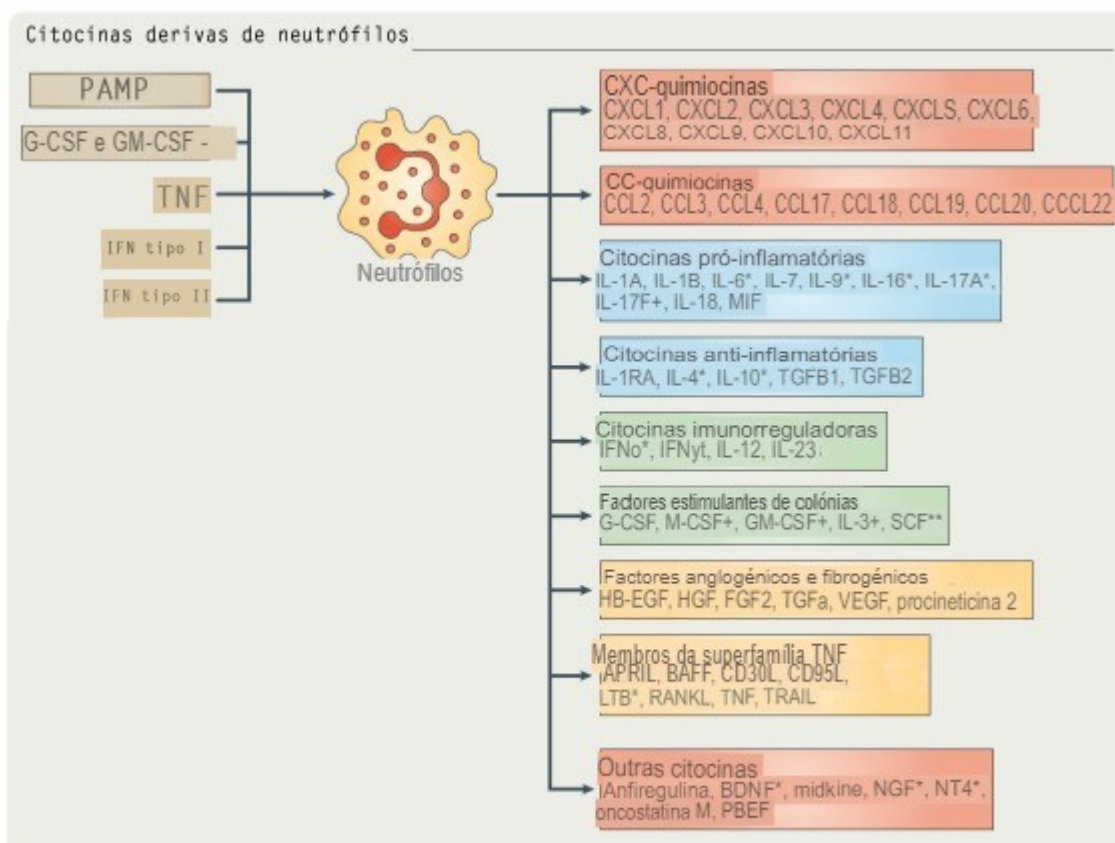
Os neutrófilos não se dividem, têm vida curta e é o principal leucócito presente na corrente sanguínea possuindo dois tipos de grânulos: grânulos azurófilos que se formam precocemente têm lisossomos, mieloperoxidase e muitos efetores antimicrobianos não-oxidativos, incluindo defensinas, catepsina G e

proteínas de aumento de permeabilidade bactericida (BPI) e os grânulos secundários que contêm lactoferrina, fosfatase alcalina e lisozima (KOLOCZKOWSKA; KUBES,2013).

Os neutrófilos ao contrário de sua descrição tradicional de célula efetora terminal desprovida de atividade de transcrição, que só libera mediadores pré-formados para matar patógenos, são na verdade, segundo observações atuais, células com grande capacidade de responder a diferentes citocinas e quimiocinas, alterando seu fenótipo em circunstâncias específicas para participar da inflamação, regulação da angiogênese tumoral e reparação tecidual. As recentes descobertas comprovam que os neutrófilos liberam várias citocinas, conforme ilustrado na **figura 03**. Notavelmente, a produção de citocinas pelos neutrófilos pode ser controlada por mecanismos de regulação sofisticados (SCAPANI, et al., 2007; MONTAVINI et al.,2011). A produção de citocinas por neutrófilos é controlada por mecanismos reguladores que atuam em diferentes níveis, incluindo transcrição, estabilização e tradução do RNA, assim como sobre a secreção de citocinas.

Em relação à secreção de citocinas e quimiocinas, tais como IL-1 β , antagonista do receptor (IL-1RA), proteínas com BAFF/BlyS um membro da superfamília TNF expressa principalmente por células mieloides (BAFF; também conhecido como BlyS), TRAIL, CXCL8, CCL20 não são diretamente liberadas após síntese, contudo são armazenadas em organelas intracelulares. Estas citocinas e quimiocinas são rapidamente liberadas pela ação de secretagogos que atuam sobre neutrófilos (MONTAVINI et al., 2011).

Figura 03 –Citocinas e quimiocinas produzidas por neutrófilos(Fonte: MONTAVINI et al.,2011).



Há muito tempo se sabe que fMLP é capaz de induzir quimiotaxia de neutrófilos através da ativação do receptor FPR1. Portanto, a produção de proteínas formiladas por bactérias, ou oriundas de mitocôndrias, ativa FPR1 preenchendo os critérios de receptor de reconhecimento padrão (PRR) identificando microrganismos e danos teciduais. Além disso, os neutrófilos expressam vasto repertório de PRRs (além do FPR1), incluindo todos os membros do receptor toll-like da família (TLR), com exceção do TLR3 e expressa também o receptor de lectina tipo C (CLEC7A), o receptor CLEC2 (também chamado de CLEC1B) e no citoplasma alguns receptores de ácido ribonucleico RIG-1 e MDA5. Os neutrófilos interagem com inflamassomos

expressando o receptor NOD1, porém sua função não foi totalmente elucidada (MONTAVINI et al.,2011).

Os neutrófilos detectam patógenos e danos teciduais através dos PRRs e sobre ação de sinais provenientes principalmente de outras células do sistema imune, irão sofrer ativação para produzir diversos efetores. Estes incluem radicais livres de oxigênio, enzimas líticas, peptídios antimicrobianos bem como as citocinas e quimiocinas mais recentemente descritas (MONTOVANI et al.,2011).

Considerando-se a cascata de mediadores envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica, é lícito pensar na participação dos neutrófilos, como célula inflamatória também nessa patologia. Dessa forma, o esclarecimento dos mecanismos de ação de novas moléculas que atuem especificamente em cada etapa do processo poderá trazer benefícios para terapia farmacológica do processo inflamatório.

1.5 Fucoïdina

A fucoïdina é um polímero rico em fucoose e grupos sulfatados extraídos de algas macroscópicas encontrado em várias espécies como *Fucus vesiculosus*, *Cladosiphono kamuranus*, *Laminaria japonica* e *Undaria pinnatifida* que possui diversos efeitos farmacológicos tais como antioxidante, anti-inflamatório, anticoagulante e antitumoral. Pode possuir variações na sua composição química, dependendo da espécie de alga que foi extraída e do processo de extração da fucoïdina. A fucoïdina é constituída basicamente de polissacarídeo polisulfatados associados ou não com galactose, xilose, manose ou ácido glicurônico. Dependendo de sua complexa estrutura química, via de administração (oral, intravenosa e intraperitoneal) e dose poderá haver variações em seus efeitos farmacológicos. A fucoïdina inibe tanto a P-selectina como L-selectina sendo essa ação sobre as selectinas a principal atividade anti-inflamatória o que faz da fucoïdina uma importante ferramenta farmacológica e um potencial fármaco que atua no processo inflamatório (LI et al.,2008; FITTON, 2011). O mecanismo de ação desta inibição consiste num bloqueio competitivo e específico pelo sítio de ligação do receptor de

P- e L-selectina impedindo, por exemplo, a ligação da P-selectina do endotélio com a PSLG-1 ligante glicoproteico-1, expressa nos leucócitos (POMIN,2012).

Para que os leucócitos migrem dos vasos sanguíneos para o sítio da lesão, utiliza-se as selectinas, que são polissacarídeos que auxiliam no processo de fixação dos leucócitos nas células endoteliais e iniciem o processo de rolagem, que culmina com a saída para o tecido. As diferentes fontes de fucoidina possuem um efeito inibitório sobre a migração de leucócitos, em especial de neutrófilos e reduz em média cerca de 80% o processo de migração de neutrófilos principalmente pela sua ação sobre as selectinas. Tal avaliação, foi feita num modelo de peritonite aguda induzida em ratos Wistar e observado o extravasamento de neutrófilos para cavidade peritoneal (FITTON, 2011; POMIN,2012).

Diante do papel de inibição da migração de neutrófilos através da inibição da P e L selectinas causada pela fucoidina, visamos elucidar o efeito da inibição da migração de neutrófilos na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

2 JUSTIFICATIVA

Cistite hemorrágica induzida por quimioterapia permanece uma complicação clínica comum e potencialmente fatal. Atualmente, MESNA e hiper-hidratação são as duas medidas mais empregadas na prevenção. No entanto, estas abordagens profiláticas têm provado não ser completamente eficazes, uma vez que os danos histopatológicos e cistoscópicos na bexiga são evidenciados. Diante da relevância clínica da CH após o uso de IFO, faz-se necessário investigar o mecanismo de lesão da bexiga pelo uso desse fármaco. Desta forma, o presente estudo prima por investigar papel do neutrófilo no desenvolvimento da CH, abrindo perspectivas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com cânceres tratados com quimioterapia à base de ifosfamida.

3 OBJETIVO GERAL:

- Investigar o papel dos neutrófilos na patogênese da cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida.

3.1 Objetivos Específicos:

- Investigar o efeito de diferentes doses de Fucoïdina sobre os parâmetros macroscópicos e microscópicos de lesão e sobre a migração de neutrófilos na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida.
- Estudar o efeito da fucoïdina sobre a expressão de marcadores inflamatórios, como a expressão de ciclooxigenase-2 e a dosagem de citocinas IL-1 β e IL-6.
- Avaliar se a inibição da migração de neutrófilos interfere sobre parâmetros noceptivos na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida.
- Avaliar o efeito do tratamento com fucoïdina sobre parâmetros bioquímicos de lesão renal e hepática.
- Investigar o efeito de diferentes doses de G-CSF em relação a parâmetros inflamatórios, como edema, hemorragia, infiltrado neutrofílico, na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas ou machos, com peso entre 20-25g provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais receberam água e ração comercial balanceada à vontade e foram mantidos em gaiolas com temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade (65-70%) e ciclo de luz (12h claro/ 12h escuro).

Os modelos experimentais utilizados neste trabalho foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa Animal(CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará tendo protocolo 84/2014.

Durante a indução de Cistite Hemorrágica, os animais foram submetidos a uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ifosfamida (IFO) (400 mg/kg). Após 12 horas, foram sacrificados com dose elevada de anestésico. Em seguida, foi realizada uma incisão abdominal baixa, excisão da bexiga, com retirada da urina remanescente. As bexigas foram, então, analisadas macroscopicamente, pesadas e submetidas a algum dos métodos descritos, a seguir.

4.2 Drogas, Reagentes

Ifosfamida (Haloxone); Mesna (Genérico Eurofarma); Fucoidina (Sigma Chemical); Filgastrim (Genérico Biosintética); Azul de Evans (Sigma Chemical Co.); Tribromo (Sigma Chemical Co.) ;Carbacol(Sigma Chemical Co.);Formamida(Sigma Chemical Co.);Heparina 5.000ui/ml(Cristalia).

4.3 Anticorpos

- Anticorpo primário anti-COX2 produzido em coelhos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA)
- Anticorpo primário anti-IL-1 β produzido em coelhos (R&D Systems)
- Anticorpo primário anti-IL-6 produzido em coelhos (R&D Systems)

4.4 Aparelhos, Materiais e Instrumentos Laboratoriais

Durante o decorrer dos experimentos foram utilizados os seguintes aparelhos e instrumentos, listados a seguir:

- Seringas de 1,3,5 e 20ml BD
- Algodão Hidrófilo
- Agitador tipo Vortex
- Autoclave
- Agulhas 13X4,5mm ,25X0,7mm e 40X1,2mm
- Aparelho Polytron
- Capela de Fluxo Laminar
- Placa de 96 poços descartável
- Bécker 50ml e 250ml
- Balança Analítica
- Balança para Animais
- Estufa
- Funil
- Lâminas para microscopia
- Lâminas para imunohistoquímica
- Leitor de placas de ELISA
- Espectrofotômetro
- Micro-ondas

- Micropipetas automáticas
- Material Cirúrgico (pinças, tesouras, lâminas de bisturi)
- Papel de Filtro
- Papel para pesagem (Papel Manteiga)
- Ponteiras para micropipetas
- Proveta graduada
- Aparelho Von Frey eletrônico
- Aparelho automatizado contagem de células hematológicas por impedância
- Tubo com EDTA 500µl de Hemograma
- Tubo c/ anticoagulante 500 µl para Bioquímica
- Aparelho Rota Rod
- Centrífuga Refrigerada para eppendorf
- Microscópio óptico(Nikon)
- Aparelho Medidor de pH
- Tubos Falcon 20ml
- Eppendorf 2ml
- Gaze 7,5X7,5
- Máquina fotográfica Nikon
- Microscópio Óptico binocular acoplado à câmera fotográfica Olympus
- Máscara PFF2 tipo N95
- Máscara descartável
- Avental impermeável para manipulação de quimioterápicos
- Luvas descartáveis sem pó
- Gorro descartável
- Papel grau cirúrgico
- Papel Alumínio

4.5 Soluções:

- Ifosfamida 500mg (Haloxane/Baxter)- Diluído em soro fisiológico 0,9% (Isofarma)
- Mesna 400mg (Genérico/Eurofarma)- Diluído em soro fisiológico 0,9% (Isofarma)
- Fucoidina (Sigma Chemical Co.)- Diluído em soro fisiológico 0,9% (Isofarma)
- Filgastrim 300ug/ml (Genérico/Biosintética)-Diluído em soro glicosado 5%(Isofarma)
- Paraformaldeído 4%(PFA)
- Álcool 70%
- Formol Tamponado 10%
- Água Destilada
- Solução de NaCl 0,2%
- Solução de Sacarose 60%
- Solução de Ácido Sulfúrico concentrado
- Peróxido de Hidrogênio 30%
- Salina Tamponada com Fosfato(PBS)
- Brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB)
- Tampão Citrato de Sódio
- Tampão Fosfato de Potássio
- Tampão Fosfato de Sódio
- Solução de 3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine(TMB)
- Solução de Soro Fetal Bovino 5%

4.6 Corantes:

- Hematoxilina(Merck)
- Eosina(Merck)
- Hematoxilina de Mayer(Merck)

4.7 Indução de Cistite Hemorrágica:

Durante a indução de Cistite Hemorrágica, os animais foram submetidos a uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ifosfamida (IFO) (400 mg/kg). Após 12 horas, foram sacrificados com dose elevada de anestésico. Em seguida, foi realizada uma incisão abdominal baixa, excisão da bexiga, com retirada da urina remanescente. As bexigas foram, então, analisadas macroscopicamente, pesadas e submetidas a algum dos métodos descritos, a seguir:

4.8 Protocolos experimentais

4.8.1 Protocolo I:

Os camundongos foram tratados previamente com fucoidina 10mg/kg, 30mg/Kg, 100mg/kg e 30 minutos depois foram injetadas salina ou ifosfamida 400 mg/Kg (i.p.). A partir de então os animais permaneceram com restrição de água. Para a realização dos experimentos, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n=8):

Grupo 1: Salina (5 mL/Kg. i.p.)

Grupo 2: Ifosfamida (IFO 400mg/Kg. i.p.)

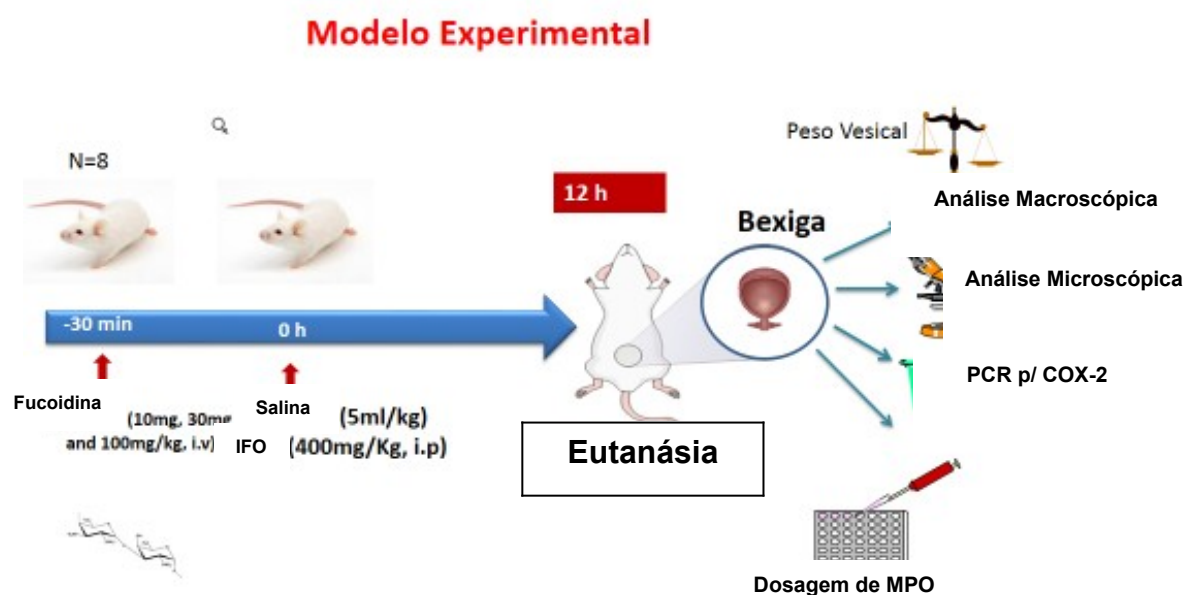
Grupo 3: Fucoidina (10mg/Kg, 30mg/Kg, 100mg/Kg i.v.) + IFO 400mg/Kg i.p

Grupo 4: Fucoidina (100mg/Kg i.v) diluída em soro fisiológico 0,9%

Grupo 5: Mesna (80mg/Kg i.p., uma dose 30 minutos antes e 4h e 8h após administração de ifosfamida)

Em seguida, os animais foram submetidos aos protocolos dos itens 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12.

Figura 4 - Esquema de indução da CH e sua modulação farmacológica com fucoidina



4.8.2 Protocolo II

Os camundongos foram tratados previamente com filgastrim (G-CSF) durante cinco dias consecutivos sendo administradas as doses de 100ug/Kg;200ug/kg e 400ug/Kg e 1 hora depois da última dose foram injetadas salina ou ifosfamida 200 mg/Kg (i.p.). A partir de então os animais permaneceram com restrição de água. Para a realização dos experimentos, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n=8):

Grupo 1: Salina (5 mL/Kg. i.p.)

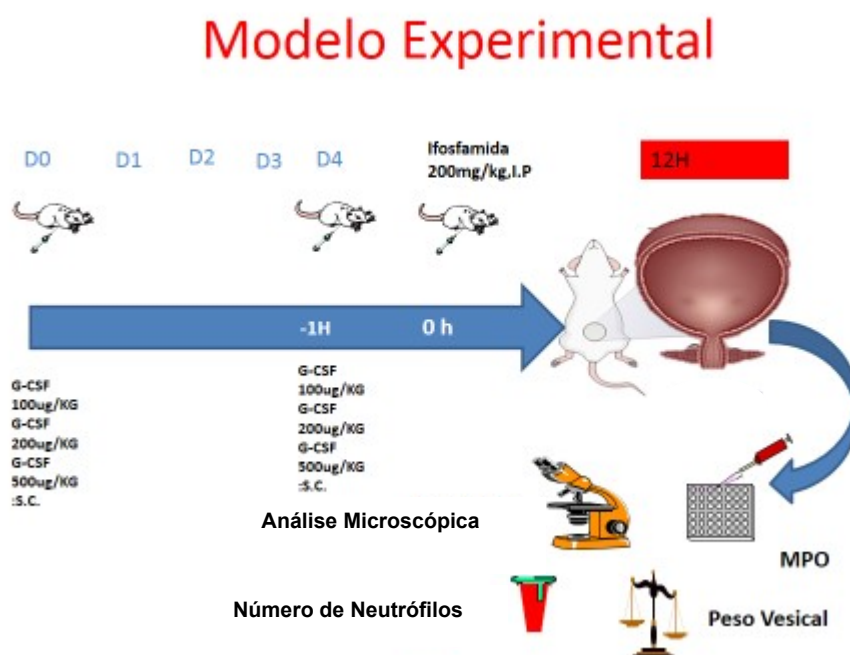
Grupo 2: Ifosfamida (IFO 200mg/Kg. i.p.)

Grupo 3: G-CSF (100ug/Kg;200ug/kg e 400ug/Kg s.c)+IFO 200mg/Kg i.p.

Grupo 4: G-CSF (400ug/Kg s.c)

Em seguida, os animais foram submetidos aos protocolos 4.8, 4.9, 4.10.

Figura 5 - Esquema de indução da CH e sua modulação com G-CSF



4.9 Avaliação dos Parâmetros Gerais de Indução da CH por Ifosfamida.

4.9.1 Avaliação do Peso Úmido Vesical

Depois de dissecadas e retirado o conteúdo urinário com auxílio de papel absorvente (hidrofílico), as bexigas foram pesadas, sendo o peso úmido vesical expresso em mg/20 gramas de peso do animal. O edema vesical foi quantificado por aumento do peso úmido vesical, reportado como média \pm EPM/20 g de peso do animal.

b) Análise Macroscópica

As bexigas foram examinadas macroscopicamente quanto ao edema e hemorragia de acordo com os critérios de Gray *et al.*, 1986, detalhado a seguir:

Edema:

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

Hemorragia:

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

c) Análise Microscópica

As bexigas foram fixadas em formol 10%, em seguida desidratadas em álcool 70%, imersas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados (5

µm), com auxílio do micrótomo, corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e analisado por microscopia óptica. As alterações microscópicas foram determinadas pelos critérios de Gray Modificado (MARTINS *et al*,2012), que se seguem:

(0) - Histologia Normal: caracterizada pelo urotélio normal, bem como ausência de úlcera e infiltrado inflamatório.

(1+) - Alterações Discretas: caracterizada por número de células epiteliais diminuídas pela descamação, “apagamento” das dobras habituais da mucosa em decorrência do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras.

(2+) - Alterações Moderadas: caracterizada por múltiplas ulcerações da mucosa, edema moderado, infiltrado inflamatório, depósito de fibrina e focos hemorrágicos.

(3+) - Alterações Intensas: caracterizada por múltiplas ulcerações da mucosa, erosão na mucosa, edema intenso, infiltrado inflamatório intenso, depósito de fibrina intenso e diversos focos hemorrágicos com possível transmural hemorragia.

(d)- Análise microscópica de grupos que foram tratados com subdose de ifosfamida (200mg/Kg, i.p).

As bexigas foram fixadas em formol 10%, em seguida desidratadas em álcool 70%, imersas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados (5 µm), com auxílio do micrótomo, corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e analisado por microscopia óptica. As alterações microscópicas foram determinadas pela adaptação dos critérios criados por Gray e colaboradores com objetivo de ampliar a precisão de análise dos diferentes tipos de lesão presentes no tratamento com ifosfamida na dose de 200mg/Kg, i.p., conforme detalhes a seguir (adaptado de GIFONI, 2008):

- Edema: 0 ausente; 1 leve; 2 moderado e 3 intenso
- Infiltrado Leucocitário: 0 ausente; 1 leve; 2 moderado e 3 intenso
- Hemorragia: 0 ausente; 1 leve; 2 moderado e 3 intensa
- Fibrina: 0 ausente; 1 leve; 2 moderado e 3 intenso deposito
- Ulceração: 0 ausente; 01 leve; 2 moderado e 3 intensa

(e)- Avaliação da permeabilidade vesical

A permeabilidade vascular vesical foi avaliada pela técnica de extravasamento com solução de Azul de Evans. O Azul de Evans é um corante que se liga à albumina plasmática. Caso haja extravasamento de albumina para o tecido inflamado, devido aumento da permeabilidade e consequente edema encontraremos o corante no interstício. Seguindo a mesma divisão previamente apresentada no protocolo (n = 8), foram injetados, por via endovenosa, via plexo reto-orbital, 2.5% de solução de azul de Evans (25 mg/kg) 30 minutos antes do sacrifício dos animais. As bexigas foram retiradas, dissecadas e incubadas em tubos de ensaio contendo solução de formamida (1 mL/bexiga) à 56°C por 12 horas para extração do corante presente no tecido. Posteriormente, o corante presente nos tubos de ensaio foram mensurados pela absorbância em 630 nm (ELISA). Ao mesmo tempo, foi determinada uma curva de absorbância. Os resultados foram expressos em microgramas de azul de Evans por mg bexiga (média \pm SEM) (MACÊDO et al,2011).

4.10-Avaliação de Parâmetros Inflamatórios

(a)- Determinação da infiltração de neutrófilo através da atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos na bexiga de animais após a indução da cistite por IFO foi determinada pelo ensaio da atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado. Os tecidos foram coletados, conforme protocolo, e incubadas em 200 μ L de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,012 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material

homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Realizou-se, um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 1000 µl de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o "*pellet*" foi ressuspenso em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 50 µL do sobrenadante das bexigas foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3'-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5 min a 37 °C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. Realizou-se a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1 x 10⁵ neutrófilos/ poço/ 50 µL). Determinou-se a absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (MORENO et al, 2006).

(b)-Imunohistoquímica para enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) na bexiga de camundongos

Os tecidos fixados em parafina foram cortados em 5µm de espessura, com auxílio de um micrótomo, montados em lâminas para microscópio revestidas de poli-L-Lisina e foram aquecidas durante 3 horas à 60°C. Logo após, foram processados em banhos sucessivos em xilol, álcool 100%, álcool 70% e em água destilada. As lâminas foram aquecidas em tampão citrato, para recuperação de antígenos, e tratados com peróxido de hidrogênio à 3%, para bloqueio da peroxidase endógena(15min). Para bloquear o efeito da biotina endógena foram incubados durante 1 hora em solução de BSA 5% para posteriormente acrescentar o anticorpo primário anti-COX2 1:200(Santa Cruz) que ficou por 12horas a 4°C.

No dia seguinte, foi lavado com PBS e adicionado o anticorpo secundário (SC-2018 Kit, Santa Cruz, Biotechnology) diluído 1:400 em BSA 5%(30min). Em seguida, foram lavados com PBS e incubado com complexo ABC estreptavidina-biotina-peroxidase (SC-2017 ABC Santa Cruz) (30min). Posteriormente, foram lavados com PBS e adicionado 3,3'-diaminobenzidina(K-3468 Dako) e as lâminas

foram contracoradas com Hematoxilina de Mayer e passaram por banhos sucessivos com álcool 70%, álcool 100% e xilol. Finalmente, foi realizada a desidratação e montagem das lâminas. As amostras foram avaliadas por um patologista e classificadas em escores de 0 a 3 de acordo com sua imunomarcagem de expressão de COX-2. (RIBEIRO et al, 2002)

(c)-Dosagem dos níveis de IL-1 β e IL-6 na bexiga de camundongos por ELISA

Os níveis de IL-1 e IL-6 foram mensurados através da determinação do conteúdo dessas citocinas no sobrenadante dos tecidos. Os tecidos foram coletados e estocados a -80°C para posterior dosagem IL-1 β e IL-6 por ensaio imunoenzimático ao qual obedecerá o protocolo de ELISA descrito a seguir: (1) Incubação com 2 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo anti IL-1 β , anti-IL-6 (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2) – 100 $\mu\text{l/poço}$ (placa de 96 poços) por 16-24h a 4°C ; (2) lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v; (3) bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 $\mu\text{l/poço}$ por 2 horas à temperatura ambiente; (4) lavagem da placa (3x); (5) incubação com a curva padrão de IL-1 e IL-6 diluídas em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100 $\mu\text{l/poço}$ por 16-24h à 4°C); (6) lavagem da placa (3x) (7) incubação com anticorpo biotilado (anticorpo de detecção) diluído 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1 hora à temperatura ambiente; (8) lavagem da placa (3x); (9) incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 $\mu\text{l/poço}$ por 15 minutos à temperatura ambiente; (10) lavagem da placa (3x); (11) incubação com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100 $\mu\text{l/poço}$, cobrir a placa e deixar no escuro por 5-20 min à temperatura ambiente; (12) a reação é parada com 150 $\mu\text{l/poço}$ de H_2SO_4 1M; (13) leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Os resultados são expressos em $\mu\text{g/ml}$ como a curva padrão.

(d)-Expressão de RNA-m da ciclooxigenase-2(COX-2) na bexiga de camundongos

Extração do RNA Total:

As amostras foram congeladas à -80°C até o momento da extração. Foi feito um homogenato com trizol e, em seguida, a extração de RNA foi realizada com o KIT Rneasy Liquid Tissue Mini(Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a finalização do processo de extração, $1\mu\text{l}$ de RNA total de cada amostra foi dosado com o Nanodrop®(Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) com a finalidade de verificar a qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar(c DNA).

Síntese de c DNA:

A síntese de c DNA foi realizado com o iScript™ c DNA Synthesis Kit(Bio-Rad Laboratories,USA) conforme as instruções do fabricante. O protocolo da reação contém $1\mu\text{l}$ da enzima transcriptase reversa, $4\mu\text{l}$ do tampão SX iSript Reaction MIX(solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), um volume da amostra de RNA uniformizado para $200\text{ng}/\mu\text{l}$ e completado a reação com água livre de nuclease em volume suficiente para completar $20\mu\text{l}$. O protocolo padrão do termociclador iCycler(Bio- Rad Laboratories, USA) foi por 25°C durante 5 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. O c DNA foi armazenado em freezer a -20°C até sua posterior utilização no PCR quantitativo em tempo real(qPCR).

4.11 Avaliação da nocicepção após indução de Cistite Hemorrágica (CH)**a) Teste de nocicepção visceral (Von Frey)**

Camundongos Swiss, machos, com peso 20-25g, foram divididos em grupos($n=8$), e tratados com salina ($5\text{ml}/\text{Kg}$, i.p.), IFO($400\text{mg}/\text{Kg}$, i.p.) ou fucoidina ($100\text{mg}/\text{Kg}$, i.v.) mais IFO($400\text{mg}/\text{Kg}$, i.p.). Foi realizado o teste de Von Frey para avaliar a nocicepção visceral pós-injeção de ifosfamida. O aparelho consiste em caixas de acrílico de dimensões $12\times 20\times 17$ cm com o piso em grade, o qual é visualizado através de um espelho posicionado abaixo do mesmo para permitir a

observação dos animais. Um analgesímetro digital conectado a um transdutor de força, cuja ponta em polipropileno possui $0,7 \text{ mm}^2$ (Von Frey eletrônico) detecta as intensidades de estimulação (gramas) aplicadas ao animal. O comportamento de nocicepção visceral é interpretado pela retração acentuada do abdome; ato de lambe ou coçar imediatamente o local de aplicação da pressão; ou tremor com esquiva abrupta (LAIRD et al., 2001). Houve o cuidado para não estimular o mesmo ponto duas vezes em sucessão, para evitar efeitos de sensibilização ou dessensibilização. Foi evitado também a estimulação da área da genitália externa, concentrando-se na parte inferior do abdome médio (LAIRD et al., 2001). Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de adaptação ao aparato do teste no dia anterior ao experimento. Foram obtidas as leituras das respostas nociceptivas dos animais antes (baseline ou T0) e após 12 horas (T1) da administração intraperitoneal de fucoidina, IFO e salina. Os resultados serão obtidos em gramas (g) pela diferença entre as forças aplicadas ($\Delta F = T1 - T0$).

b) Teste do Rota-Rod

Camundongos Swiss, machos, com peso 20-25g, foram divididos em grupos (n=8), e tratados com salina (5ml/Kg, i.p.), IFO(400mg/Kg, i.p.) ou fucoidina (100mg/Kg, i.v.) mais IFO(400mg/Kg, i.p.). O aparelho corresponde a uma barra horizontal com um diâmetro de 5 cm subdivididos em cinco compartimentos que giram a velocidade constante. Os animais foram postos sobre a barra girando a uma velocidade de 4rpm e aqueles que conseguiram permanecer por um tempo maior que 120 segundos. foram selecionados 24 horas antes do teste. Os camundongos foram observados quanto à coordenação motora, na qual foi registrado o número de quedas. O tempo máximo permitido foi 120 seg. (DUNHAM; MIYA, 1957)

4.12-Avaliação de Parâmetros Hematológico e Bioquímicos

a) Contagem de neutrófilos totais utilizando contador automatizado

Os animais foram anestesiados e coletados cerca 250µl de sangue via plexo retro-orbital e acondicionados em tubos padronizados (BD Vacutainer EDTAK2 500µl). Posteriormente, o material foi homogeneizado e levado até o contador automatizado de células hematológicas que opera por princípio de contagem por impedância elétrica.

Os resultados foram expressos em número de neutrófilos por µl de sangue.

b) Análise de parâmetros Bioquímicos (ALT,AST,Cr e Ur)

Os animais foram anestesiados e tiveram seu sangue coletado com auxílio de capilares heparinizados e acondicionados em tubos padronizados para coleta de material para análise bioquímica(BD Vacutainer com gel separador). Logo em seguida, os tubos foram centrifugados a 4.500 rpm durante 15 minutos(20°C) e analisados em aparelho automatizado modelo COBAS 6.000(Roche).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média) para as variáveis com distribuição normal ou pela mediana (mínimo-máximo) para as variáveis sem distribuição normal.

A análise estatística entre os grupos realizou-se empregando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação múltiplo de Bonferroni ou Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn, conforme propriedades respectivamente para dados paramétricos e não paramétricos, baseando-se na continuidade das variáveis em análise, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

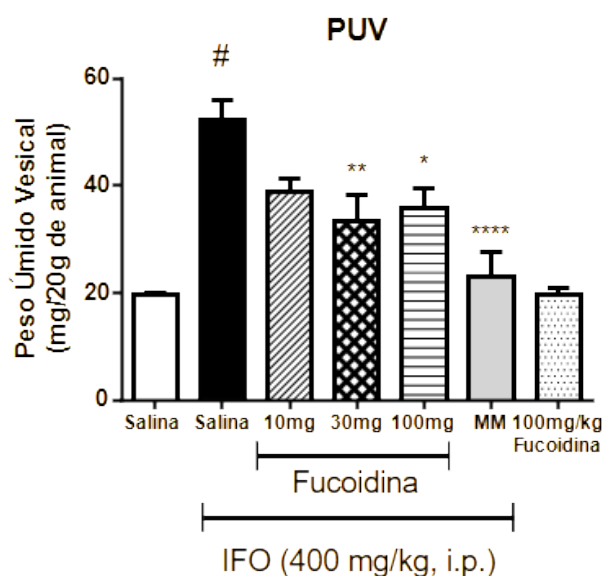
Para a realização dos testes estatísticos utilizou-se o software Graph Pad Prism®, versão 6.0.

6-RESULTADOS:

6.1.1 Efeito da fucoidina sobre o peso úmido vesical (PUV) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

Conforme observado na **figura 04**, o tratamento com ifosfamida (400mg/Kg, i.p) aumentou significativamente o peso vesical da bexiga em 166% ($52 \pm 9,5$) quando comparado com o grupo salina ($19,6 \pm 0,8$) ($p < 0,0001$), como previamente descrito por Ribeiro et al. (2002). Entretanto, o pré-tratamento com doses de fucoidina (30mg/Kg e 100mg/Kg) preveniu parcialmente a variação de peso úmido vesical ($33,5 \pm 12,7$; $35,8 \pm 9,0$, respectivamente). Já o pré-tratamento com fucoidina (10mg/Kg) não foi capaz de reduzir o peso úmido vesical ($39 \pm 5,6$) quando comprado com o grupo tratado com IFO. O grupo injetado apenas com fucoidina 100mg/Kg não apresentou variação nesse parâmetro ($19,7 \pm 3,0$) versus o grupo salina ($p > 0,05$). O tratamento com mesna foi capaz de prevenir significativamente o aumento do PUV (23 ± 13) quando comparado com o grupo Ifosfamida ($p < 0,0001$).

Figura 04 – Efeito do pré-tratamento com fucoidina preveniu o aumento no peso úmido vesical, durante a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



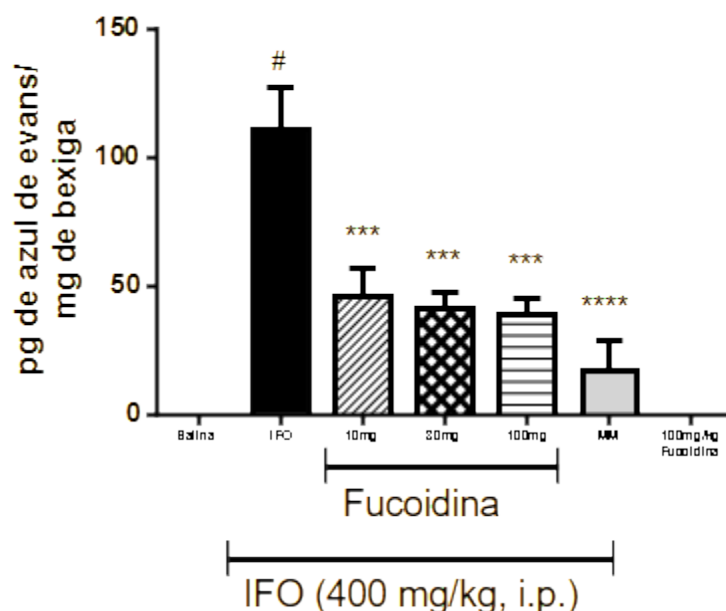
Os animais foram pré-tratados com salina (5ml/Kg, i.p.), fucoidina (10, 30 ou 100mg/Kg, i.v.) 30 minutos antes da administração de ifosfamida (400mg/Kg, i.p.) ou mesna (80mg/Kg i.p., uma dose 30min antes e 4 e 8h após administração de ifosfamida) ou fucoidina somente (100mg/Kg). Após 12 h da administração de ifosfamida, os animais foram sacrificados para a coleta da bexiga visando a mensuração do peso úmido vesical. As barras representam as médias \pm E.P.M dos pesos das bexigas

dos camundongos expressos em (mg/20g de animal) (N=8). Utilizou-se teste estatístico ANOVA e pós-teste de Bonferroni. # $p < 0,05$ vs salina; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs ifosfamida.

6.1.2-Efeito da fucoidina sobre a permeabilidade vesical na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida.

A injeção de ifosfamida aumentou significativamente a permeabilidade vesical (111 ± 46) quando comparado com o grupo salina (0 ± 0 , $p < 0,05$), como apresentado na **figura 05**. Em adição, o pré-tratamento com fucoidina (10mg/Kg, 30mg/Kg ou 100mg/Kg) atenuou (46 ± 26 ; 41 ± 16 ; $38,8 \pm 14,6$, respectivamente) de forma significativa o aumento da permeabilidade vesical versus o grupo IFO ($p > 0,01$). De forma relevante, o controle positivo, mesna, reduziu ($16,8 \pm 28$) a permeabilidade vesical induzida pela ifosfamida em comparação ao grupo ifosfamida ($p < 0,0001$).

Figura 05— Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre a permeabilidade vesical induzida pela ifosfamida.



Os animais foram pré-tratados com salina (5ml/Kg, i.p.), fucoidina (10, 30 ou 100mg/Kg, i.v.) 30 minutos antes da administração de ifosfamida (400mg/Kg, i.p.) ou mesna (80mg/Kg i.p.), uma dose 30min antes e 4 e 8h após administração de ifosfamida ou fucoidina somente (100mg/Kg). Após 11 h da administração de ifosfamida, os animais receberam uma injeção intravenosa de Azul de Evans para posterior coleta da bexiga visando a mensuração da permeabilidade vascular. Os resultados foram expressos em médias \pm E.P.M de pg de Azul de Evans por mg de bexiga. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni. # $p < 0,05$ vs salina; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs ifosfamida.

6.1.3-Efeito da fucoidina sobre os escores macroscópicos e microscópicos de lesão vesical.

A administração de ifosfamida promoveu danos teciduais macroscópicos, conforme critérios de Gray, com aumento significativo ($p < 0,0001$) dos escores de edema 3(3-3) e hemorragia 2(2-3) quando comparado com grupo que recebeu salina (edema: 0[0-0]; hemorragia: 0[0-0]). Tal dano foi prevenido ($p < 0,05$) pelo pré-tratamento com fucoidina na maior dose sobre os escores de edema 1[1-2]), porém não foi observado proteção significativa nos escores de hemorragia 1[0-2]. Entretanto, não se observou proteção nas menores doses (10mg/Kg e 30mg/Kg) em comparação com o grupo ifosfamida. Adicionalmente, o mesna reduziu significativamente ($p < 0,05$) a gravidade do dano (edema: 1[0-3] e hemorragia: 0[0-2]) versus o grupo ifosfamida. A injeção isolada de fucoidina (100 mg/kg) não promoveu dano vesical versus o grupo salina ($p > 0,05$). Os dados estão sumarizados na **tabela 01**.

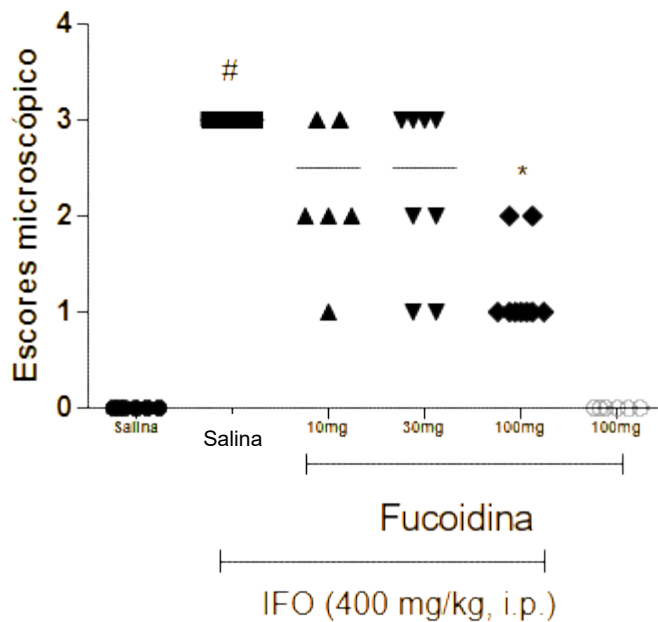
Tabela 01— Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre a lesão macroscópica na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

Grupos	Escores Macroscópicos de Edema	Escores Macroscópicos de Hemorragia
Salina	0(0-0)	0(0-0)
IFO	3(3-3)*	2(2-3)*
F10+ IFO	2,5(1-3)	2(0-3)
F30+ IFO	1,5(0-3)	1,5(1-3)
F100+IFO	1(1-2)#	1(0-2)
MM	0,5(0-3) #	0(0-2) #
F100	0(0-0)	0(0-0)

* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com ifosfamida por Kruskal-Wallis teste de Dunn

Esses achados foram corroborados pela análise microscópica do dano, na qual se verificou que a ifosfamida induziu lesão histopatológica (3[3-3]), **figura 06** em comparação com o grupo salina (0[0-0], $p < 0,05$), sendo a fucoidina na maior dose (100 mg/kg) eficaz ($p < 0,05$) em reduzir os escores de lesão (1[1-2]), **figura 06** versus o grupo ifosfamida.

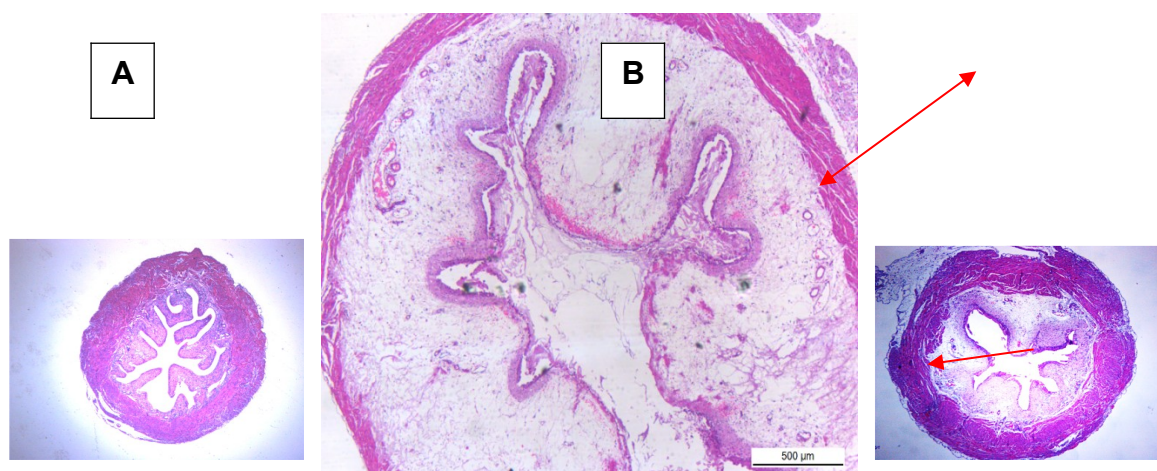
Figura 06 – Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre a lesão microscópica durante a cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida.



Os animais foram pré-tratados com salina (5 ml/Kg, i.p.), fucoidina (10, 30 ou 100 mg/Kg, i.v.) 30 minutos antes da administração de ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.) ou fucoidina somente (100 mg/Kg). Após 12 h da administração de ifosfamida, os animais foram sacrificados para a coleta da bexiga, as quais foram processadas para análise histopatológica. O resultado foi expresso em termos de mediana (mín-máx). Utilizou-se teste estatístico Kruskal Wallis/Dunn para comparação entre os grupos # $p < 0,05$ vs salina; * $p < 0,05$ vs ifosfamida.

A **figura 07** ilustra fotomicrografias representativas de bexigas de animais injetados com salina (**Figura 7A**), ifosfamida (**Figura 7B**) ou fucoidina + ifosfamida (**Figura 7C**).

Figura 09 – Fotomicrografias de bexigas de camundongos.



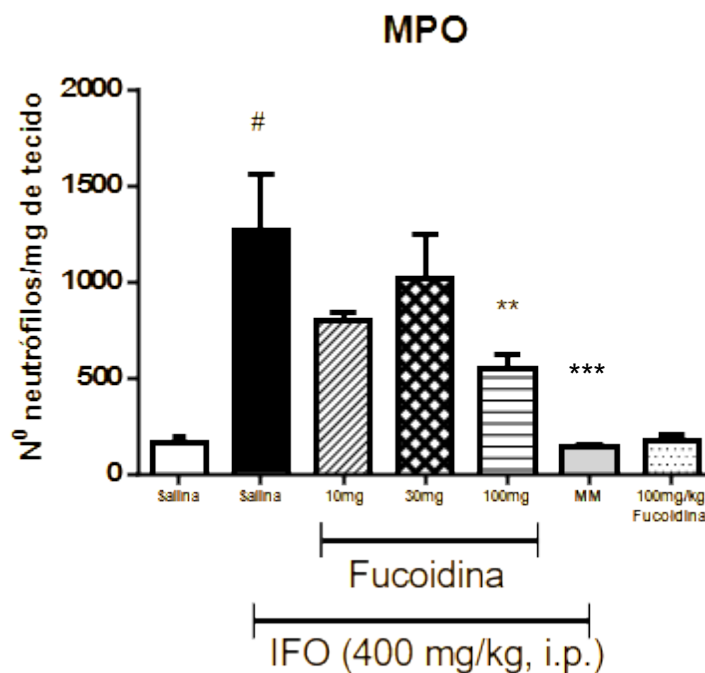
Fotomicrografias de bexigas, 40X (A) Bexiga de camundongo administrado solução salina (5ml/Kg, i.p.). (B) Bexiga de camundongo tratado com IFO (400mg/Kg, i.p.) apresentando extensa área de edema (seta) e perda de urotélio (ponta da seta) (C) Bexiga de camundongo pré-tratado com fucoidina 100mg/Kg, i.v. e depois IFO (400mg/Kg, i.p.), onde visualiza-se uma redução da área de edema (seta) e maior preservação urotelial (ponta da seta).

6.1.4-Efeito da administração prévia de fucoidina sobre o acúmulo vesical de neutrófilos

A injeção de ifosfamida aumentou significativamente ($P < 0,01$) o número de neutrófilos infiltrantes na bexiga durante a cistite hemorrágica (1269 ± 706) quando comparado ao grupo salina (167 ± 59). Adicionalmente, o pré-tratamento dos animais com fucoidina (100 mg/kg) atenuou esse aumento (552 ± 203) versus o grupo ifosfamida ($p < 0,05$). Todavia, a fucoidina em doses menores (10 ou 30 mg/kg) não reduziu esse parâmetro se comparado ao grupo ifosfamida ($P > 0,05$). O controle-positivo adotado nesse estudo, o mesna, preveniu de forma significativa o aumento de neutrófilos na bexiga (141 ± 23) versus o grupo ifosfamida.

Os resultados estão apresentados na **figura 8**.

Figura 8 – Efeito do pré-tratamento de fucoidina sobre o acúmulo vesical de neutrófilos durante a cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida.



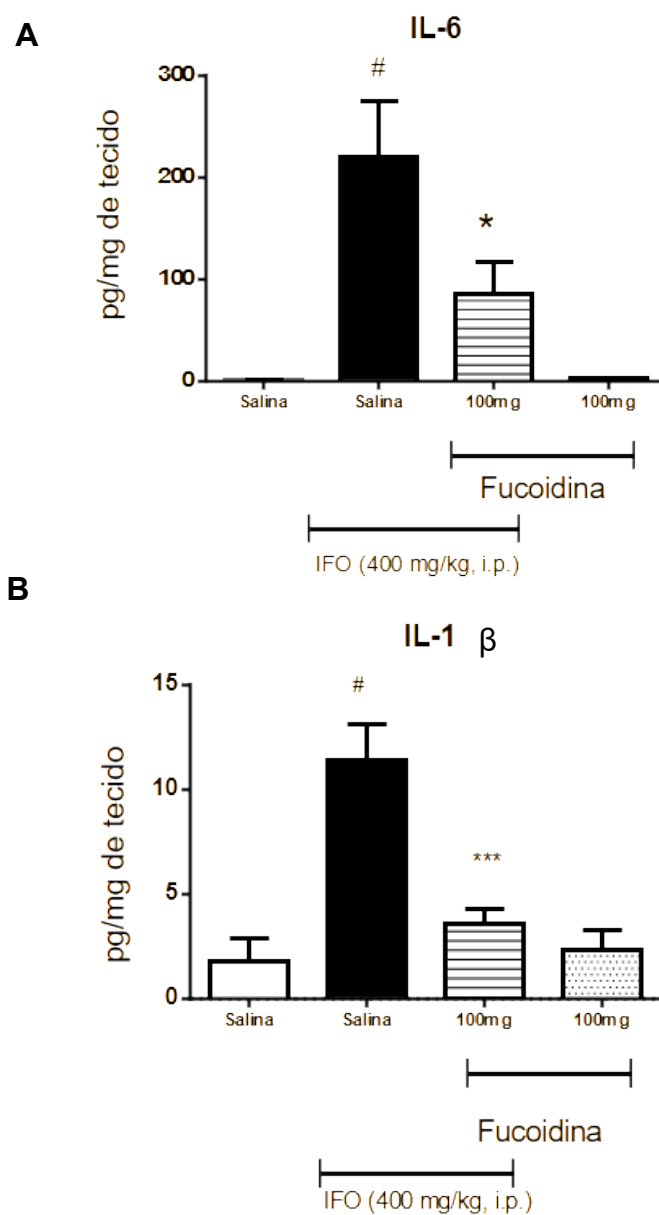
Os animais foram pré-tratados com salina(5ml/Kg,i.p.), fucoidina(10, 30 ou 100mg/Kg,i.v.) 30minutos antes da administração de ifosfamida (400mg/Kg,i.p.) ou mesna (80mg/Kg i.p., uma dose 30min antes e 4 e 8h após administração de ifosfamida) ou fucoidina somente (100mg/Kg). Após 12 h da administração de ifosfamida, os animais foram sacrificados para a coleta da bexiga visando a mensuração do acúmulo de neutrófilos. As barras representam as médias \pm E.P.M do nº neutrófilos infiltrantes/mg de tecido. Utilizou-se teste estatístico ANOVA e pós-teste Newmans-Keuls. # $p < 0,05$ vs salina; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs ifosfamida.

6.1.5-Efeito da fucoidina sobre dosagem de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 na cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida

Como apresentado na **figura 9**, o tratamento dos animais com ifosfamida(400mg/Kg,i.p) aumentou significativamente ($p < 0,05$) os níveis vesicais de IL-1 β e IL-6(11,42 \pm 6,16;220 \pm 123, respectivamente) se comparados com níveis encontrados nas bexigas de animais que receberam salina(IL-1 β : 1,72 \pm 3,2; IL-6 : 0,73 \pm 1). Contudo, os animais que receberam pré-tratamento com fucoidina(100mg/Kg) apresentaram níveis reduzidos de citocinas IL-1 β (3,59 \pm 2,6) e

IL-6 ($86 \pm 76,5$) versus o grupo Ifosfamida ($p < 0,05$). A administração de fucoidina isoladamente não alterou os níveis basais de citocinas se comparado ao grupo salina ($p > 0,05$).

Figura 9 – O pré-tratamento com fucoidina sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias.



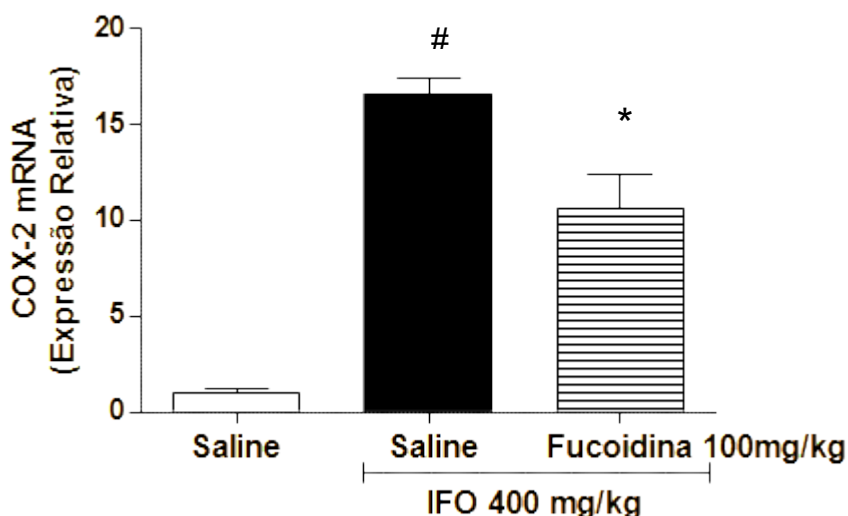
Os animais foram pré-tratados com salina (5ml/Kg,i.p.), fucoidina(100mg/Kg,i.v.) 30 minutos antes da administração de ifosfamida (400mg/Kg,i.p.) ou fucoidina somente (100mg/Kg). Após 12 h da administração de ifosfamida, os animais foram sacrificados para a coleta da bexiga visando a mensuração da concentração de citocinas pró-inflamatórias. As barras representam as médias \pm

E.P.M concentração de citocinas (IL-1 β e IL-6) por mg de tecido. Utilizou-se teste estatístico ANOVA e pós-teste Newmans-Keuls. #p<0,05 vs salina; *p<0,05; ***p<0,001 vs ifosfamida.

.6.1.6-Efeito da fucoidina sobre a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) durante a cistite hemorrágica.

Conforme observado na **figura 10**, os animais tratados com ifosfamida (400mg/Kg, i.p.) apresentaram um aumento significativo (p<0,05) da expressão relativa de RNA-m de COX-2 (16,56 \pm 1,9) quando comparados com o grupo que recebeu salina (1 \pm 0,4). Além disso, na **figura 11** observa-se que os escores histopatológicos de imunomarcagem no grupo tratado com ifosfamida (2[1-3]) e superior de forma significativa(p<0,05) ao grupo injetado com salina (0[0-0]), respectivamente. A **figura 10** ilustra também que na bexiga dos animais que receberam pré-tratamento com fucoidina(100mg/Kg,i.v.) seguido de ifosfamida observou-se uma atenuação da expressão da COX-2 (RNA-m COX-2: 10,5 \pm 4,5) versus o grupo ifosfamida. A **figura 10 e figura 12** demonstram que os escores de imunoexpressão de COX-2 estão reduzidos no grupo pré-tratado com fucoidina(0[0-1]) versus o grupo ifosfamida.

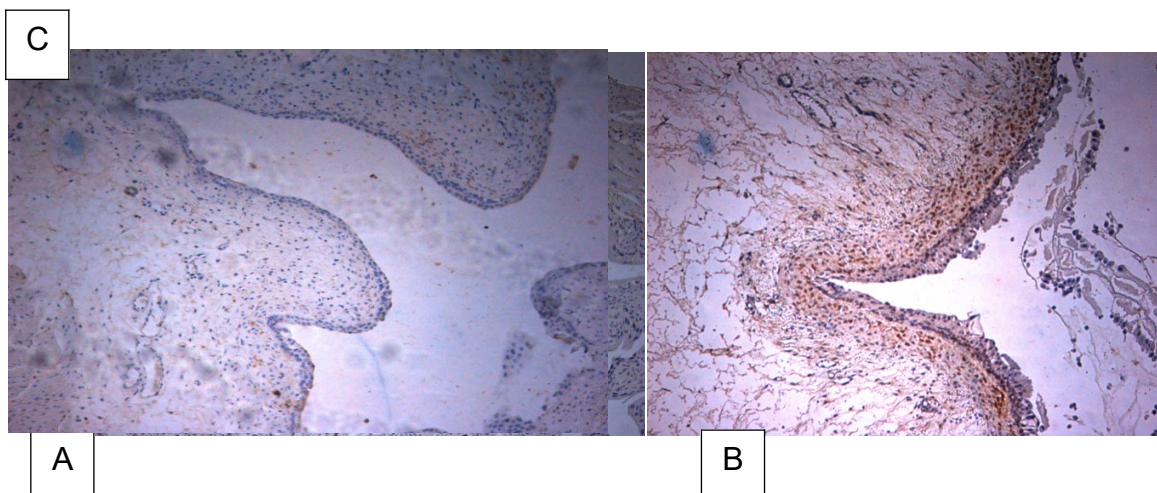
Figura 10 - Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre a expressão do RNA-m da ciclooxigenase-2(COX-2).



Os animais foram pré-tratados com salina(5ml/Kg,i.p.) ou fucoïdina(100mg/Kg,i.v.) 30 minutos antes da administração de ifosfamida (400mg/Kg,i.p.). Após 12 h da administração de ifosfamida, os

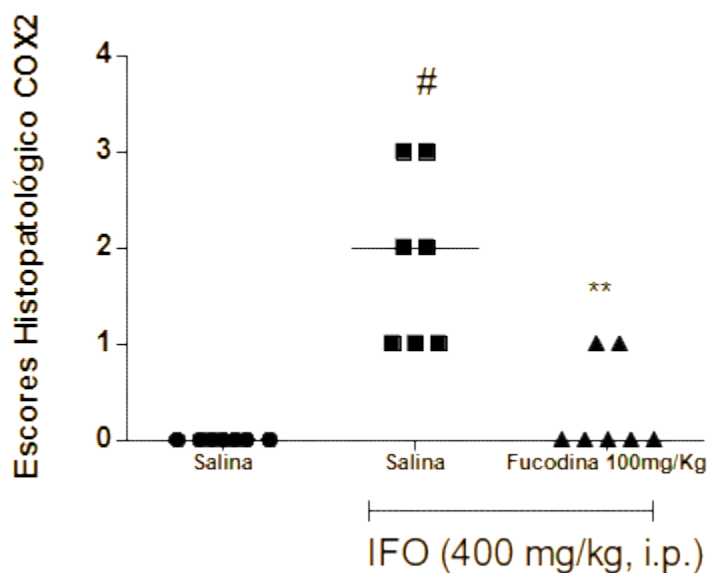
animais foram sacrificados para a coleta da bexiga para a quantificação da expressão de COX-2. As barras representam as médias \pm E.P.M da expressão relativa de mRNA para COX-2. Utilizou-se teste estatístico ANOVA e pós-teste Newmans-Keuls.

Figura 11 – O pré-tratamento com fucoidina reduz a imunoposição de COX-2 durante a cistite hemorrágica.



Fotomicrografias de Bexigas, imunohistoquímica, aumento 40X (A)Bexiga de camundongo administrado solução salina (5ml/Kg,i.p.). (B)Bexiga de camundongo tratado com IFO (400mg/Kg, i.p.) apresentando extensa imunomarcção urotelial e em células no tecido conjuntivo (C)Bexiga de camundongo pré-tratado com fucoidina(100mg/Kg,i.v.) seguido de IFO (400mg/Kg,i.p.), onde visualiza-se uma redução da imunomarcção para COX-2 no urotélio e no tecido conjuntivo.

Figura 12 - Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre a análise da imunohistoquímica para COX-2.

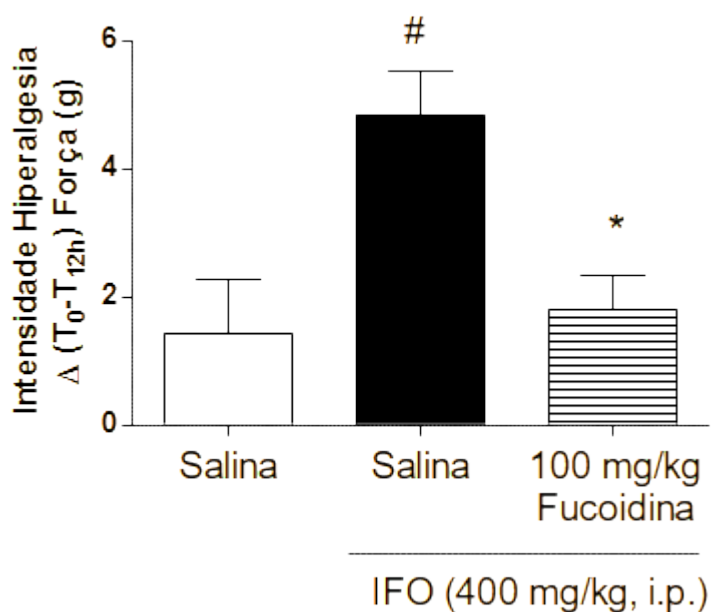


Os animais foram pré-tratados com salina(5ml/Kg,i.p.) ou fucoidina(100mg/Kg,i.v.) 30minutos antes da administração de ifosfamida (400mg/Kg,i.p.). Após 12 h da administração de ifosfamida, os animais foram sacrificados para a coleta da bexiga para a realização do ensaio de imunohistoquímica para COX-2. Os dados são expressos como mediana (mín-máx). Utilizou-se teste estatístico Kruskal Wallis e Teste de Dunn. # $p < 0,05$ vs salina; ** $p < 0,01$; vs ifosfamida.

6.1.7-Efeito da fucoidina sobre a nocicepção visceral induzida por ifosfamida.

Na **figura 13** observa-se que a ifosfamida induziu um significativo ($p < 0,05$) aumento da intensidade de hiperalgesia ($4,8 \pm 1,5$) quando comparado ao grupo salina ($1,4 \pm 2$). Em adição, o pré-tratamento com fucoidina(100mg/Kg) preveniu ($1,8 \pm 1,2$) essa resposta nociceptiva versus o grupo ifosfamida ($p < 0,05$). Ao se verificar a capacidade motora do animal, verificou-se que nenhum dos tratamentos empregados, salina, ifosfamida ou fucoidina, interferiu na deambulação normal dos animais ($p > 0,05$ entre os grupos, **Figura 13**).

Figura 13 - Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre a hiperalgesia visceral induzida por ifosfamida.

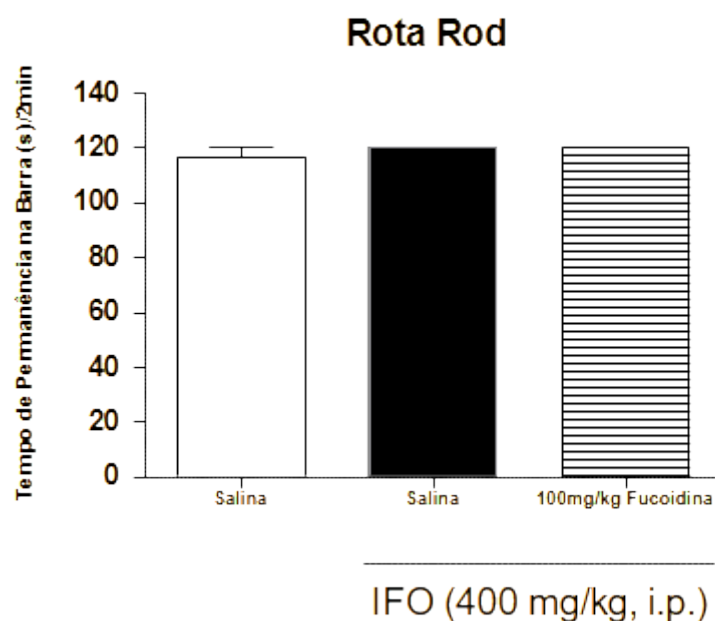


Os animais foram pré-tratados com salina(5ml/Kg,i.p.) ou fucoidina(100mg/Kg,i.v.) 30 minutos antes da administração de ifosfamida (400mg/Kg,i.p.). Uma hora antes e doze horas após a administração de ifosfamida, a intensidade de hiperalgesia foi analisada. Os dados são expressos como médias \pm E.P.M. Utilizou-se teste estatístico ANOVA e pós-teste Newman-Keuls. # $p < 0,05$ vs salina; * $p < 0,05$; vs ifosfamida.

6.1.8-Efeito da administração prévia com fucoidina sobre o teste do rota-rod

Na **figura 14** observa-se que o tratamento prévio com fucoidina (100mg/Kg,i.v.) associado com ifosfamida (400mg/Kg,i.p.) não alterou o tempo de permanência dos animais na barra quando avaliados por 120 minutos. Ademais, o tratamento com ifosfamida(400mg/Kg,i.p.) não alterou a coordenação motora dos animais quando comparado ao tratamento com salina (5ml/kg,i.p.).

Figura 14 - Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre a coordenação motora dos animais.

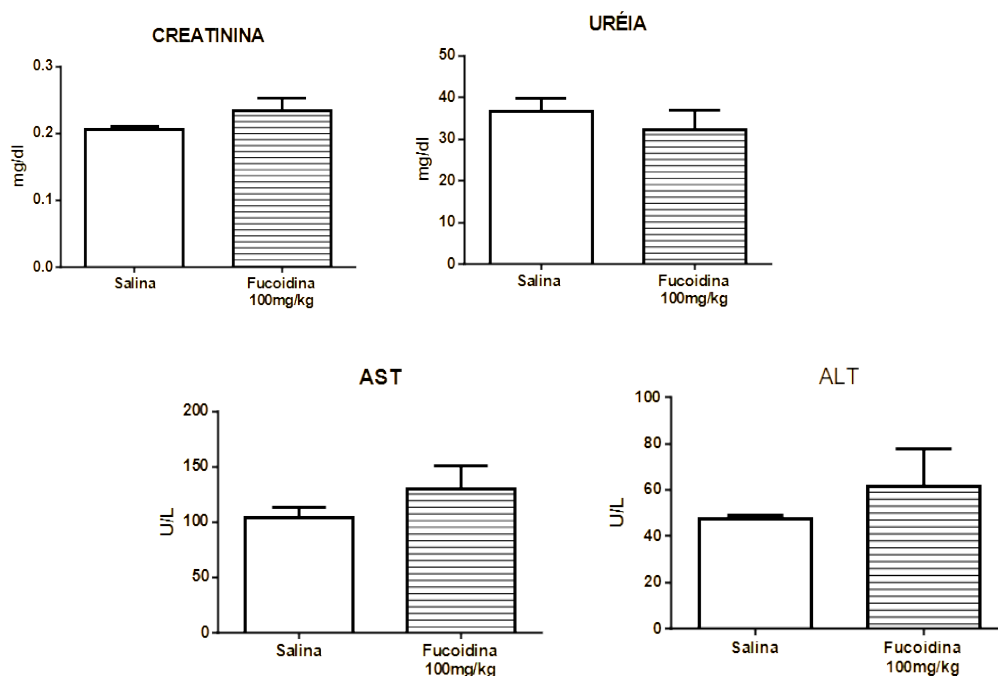


Os animais foram pré-tratados com salina(5ml/Kg,i.p.) ou fucoidina(100mg/Kg,i.v.) 30minutos antes da administração de ifosfamida (400mg/Kg,i.p.). Após 12 h da administração de ifosfamida, os animais foram submetidos ao teste do rota-rod. Os dados são expressos como médias \pm E.P.M. Utilizou-se teste estatístico ANOVA e pós-teste Newman-Keuls.

6.1.9-Efeito do tratamento prévia com fucoidina sobre parâmetros bioquímicos

Os animais foram tratados com 5ml/kg de salina ou fucoidina (100mg/kg,i.v.) e retirado sangue para análise bioquímica. Conforme observado na **figura 15** os animais tratados com salina obtiveram os seguintes resultados quando avaliadas as enzimas hepáticas (AST [103,8 \pm 9,5] e ALT[47,6 \pm 1,2]) versus o encontrado no grupo tratado com fucoidina (AST[130,4 \pm 20,8] e ALT[52,8 \pm 6,4]) ($p>0,05$). Adicionalmente foram analisadas ureia e creatinina sérica do grupo tratado com salina(Ur[36,6 \pm 1,09] e Cr[0,2 \pm 0,006] versus fucoidina (Ur[33,6 \pm 1,2] e Cr[0,19 \pm 0,001])($p>0,05$).

Figura 15 - Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre parâmetros bioquímicos de avaliação hepática e renal



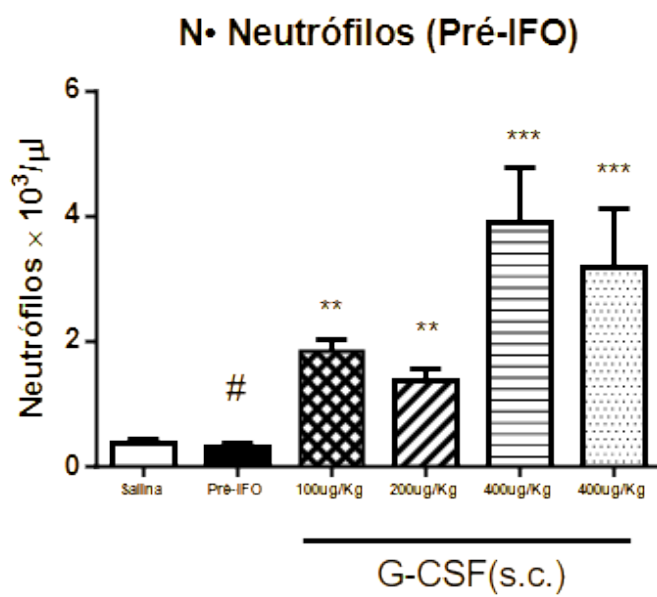
Os animais foram tratados com salina(5ml/Kg,i.p.) ou fucoidina(100mg/Kg,i.v.). Após 12 h da administração, foram coletados sangue e analisado os parâmetros AST,ALT, Cr e Ur. Os dados são expressos como médias \pm E.P.M e avaliados utilizando o t-teste.

6.2.1-Efeito do tratamento prévio com filgastrim sobre o número total de neutrófilos circulantes

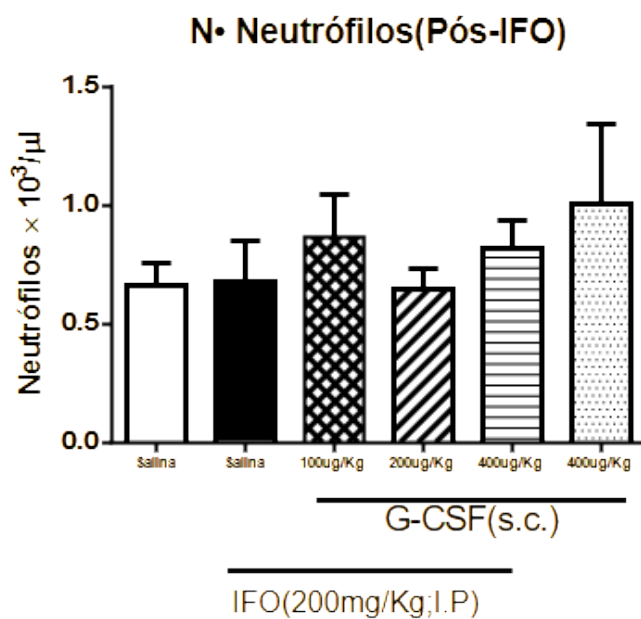
Conforme observado na **figura 16A**, os grupos pré-tratados com filgastrim (G-CSF, 100, 200, 400 ug/Kg, s.c.) apresentaram um aumento na contagem total de neutrófilos (541%, 402%, 1150%, respectivamente) quando comparados com os grupos não-tratados com o filgastrim [salina ($0,34 \times 10^3/\mu\text{l}$) e pré-IFO ($0,32 \times 10^3/\mu\text{l}$)], $p < 0,05$. Entretanto, após 12 horas da injeção de IFO houve uma normalização da quantidade de neutrófilos circulantes **figura 16B**. Adicionalmente, observa-se na **figura 16C** uma variação percentual negativa ([mensuração no tempo 12 horas menos o valor obtido no tempo 0 h] x 100) nos grupos previamente injetados com filgastrim + IFO (100 μg [-50%]; 200 μg [-45%]; 400 μg [-74%]) ou somente filgastrim (-65%) se comparados aos grupos que não receberam este fármaco (salina [76%] e IFO (121%), $P < 0,05$).

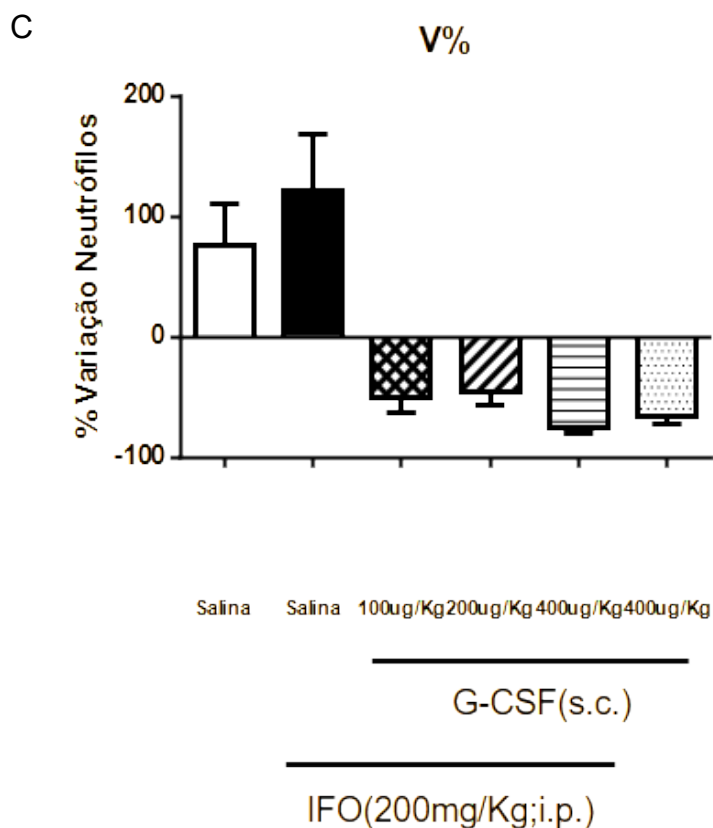
Figura 16 - Diferença entre o número total de neutrófilos antes do tratamento com ifosfamida 200mg/kg e antes da eutanásia.

A



B



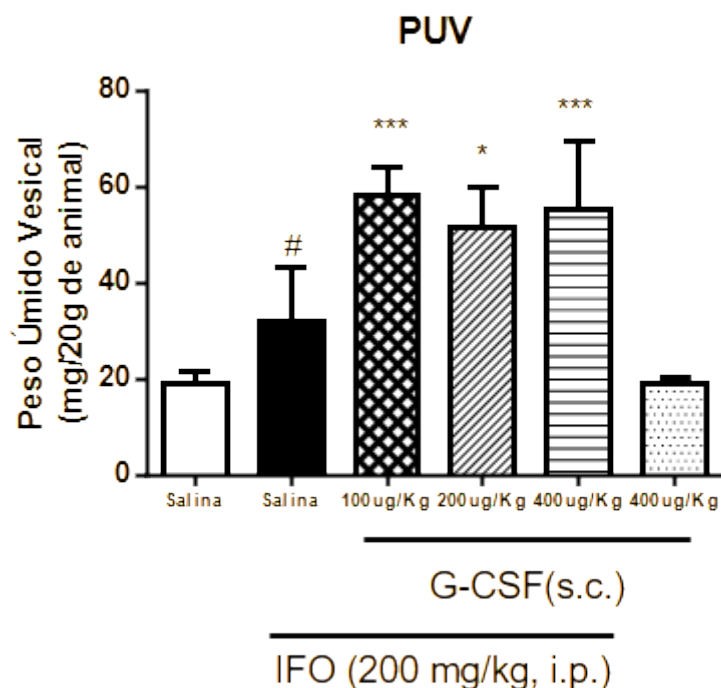


Os animais foram pré-tratados com G-CSF nas doses (100ug, 200ug, 400ug/Kg), logo após, foi administrado ifosfamida (200mg/Kg i.p.) ou apenas salina(5ml/Kg), ifosfamida(200mg/Kg) e G-CSF na dose 400µg/Kg e 1 hora depois coletado sangue pelo plexo retro-orbital, nos tempos 0 e 12 h para contagem do número total de neutrófilos circulantes (Painel A e B, respectivamente). Posteriormente, foi avaliada variação percentual do número de neutrófilos entre estes tempos (Painel C). Utilizou-se teste estatístico ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

6.2.2-Efeito do tratamento prévio com filgastrim (G-CSF) sobre o peso úmido vesical (PUV) durante a cistite hemorrágica

A injeção de Ifosfamida (200mg/Kg,i.p.) aumentou o peso úmido vesical ($31,3 \pm 4,6$) de forma significativa ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo salina ($19,2 \pm 0,9$). Além disso, o pré-tratamento com filgastrim (100 ug/Kg; 200 ug/Kg ou 400 ug/kg, s.c.) seguido de Ifosfamida (200 mg/Kg, i.p.) promoveu um significativo aumento do peso vesical ($58,8 \pm 6,1$; $60,0 \pm 3,6$; $58 \pm 5,3$, respectivamente). O tratamento com filgastrim (400ug/Kg, s.c.), isoladamente, não alterou o peso úmido vesical ($19,0 \pm 0,6$) se comparado ao grupo controle que recebeu salina ($p > 0,05$). Os resultados estão expressos na **figura 17**.

Figura 17 - Efeito do pré-tratamento com filgastrim sobre o peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Os animais foram pré-tratados por 5 dias com filgastrim e administrados ifosfamida (200mg/Kg,i.p.) ou receberam apenas ifosfamida (200mg/kg,i.p.), salina(5ml/Kg,i.p.) ou filgastrim (400ug/Kg). As barras representam as médias \pm E.P.M dos pesos das bexigas, sendo utilizado o teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni para análise estatística. # $p < 0,05$ vs grupo salina; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs grupo ifosfamida.

6.2.3-Efeito do tratamento prévio com diferentes doses de filgastrim sobre escores qualitativos macroscópicos de edema e hemorragia.

A injeção de IFO (200 mg/kg, i.p.) aumentou significativamente os escores vesicais macroscópicos para edema e hemorragia quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$). A **tabela 2** demonstra que o grupo IFO(200mg/Kg, i.p) não alterou de forma significativa($p > 0,05$) os escores de hemorragia e edema quando comparado com grupo pré-tratado com G-CSF(100;200;400 μ g/Kg, s.c) e posteriormente IFO(200mg/kg, i.p). Adicionalmente, o tratamento de animais com filgastrim (100

ug/Kg, 200 ug/Kg, 400 ug/Kg, s.c.) antes da injeção de IFO aumentou a gravidade dos escores macroscópicos para ambos os parâmetros versus o grupo salina (**Tabela 2**).

Tabela 03 - Efeito do pré-tratamento com filgastrim sobre a lesão macroscópica induzida por ifosfamida.

Grupos	Escores Macroscópicos de Edema	Escores Macroscópicos de Hemorragia
Salina	0(0-0)	0(0-0)
IFO 200	1,5(1-3)**	1(1-2)**
G-CSF 100+IFO	2(1-3)**	2(1-3)**
G-CSF 200+IFO	2(2-3)**	2(1-3)**
G-CSF 400+IFO	3(2-3)**	2(1-3)**
G-CSF 400	0(0-0)	0(0-0)

Os grupos foram analisados utilizando teste não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. **p<0,05 versus o grupo salina.

6.2.4-Efeito do tratamento prévio com filgastrim sobre os critérios qualitativos de lesão microscópica

Segundo a **tabela 3** de análise microscópica, a IFO (200 mg/Kg; i.p.) induziu lesão histopatológica com aumento significativo dos escores de edema [2(1-3)] quando comparado ao grupo salina (P<0,05). Adicionalmente, a injeção de filgastrim (400µg/Kg; s.c) e IFO(200 µg/Kg; i.p) aumentou de forma significativa (p<0,05) o infiltrado leucocitário [0,5 (0-1)] e a deposição de fibrina [0 (0-1)] em comparação com o grupo IFO (200mg/Kg i.p.). Ao se comparar os grupos G-CSF(100 µg/Kg; 200 µg/Kg; 400 µg/Kg s.c) + IFO como grupo salina encontraram-se diferenças significativas (p<0,05) em todos os parâmetros avaliados (edema,

infiltrado leucocitário, hemorragia, depósito de fibrina) com única exceção do critério de ulceração.

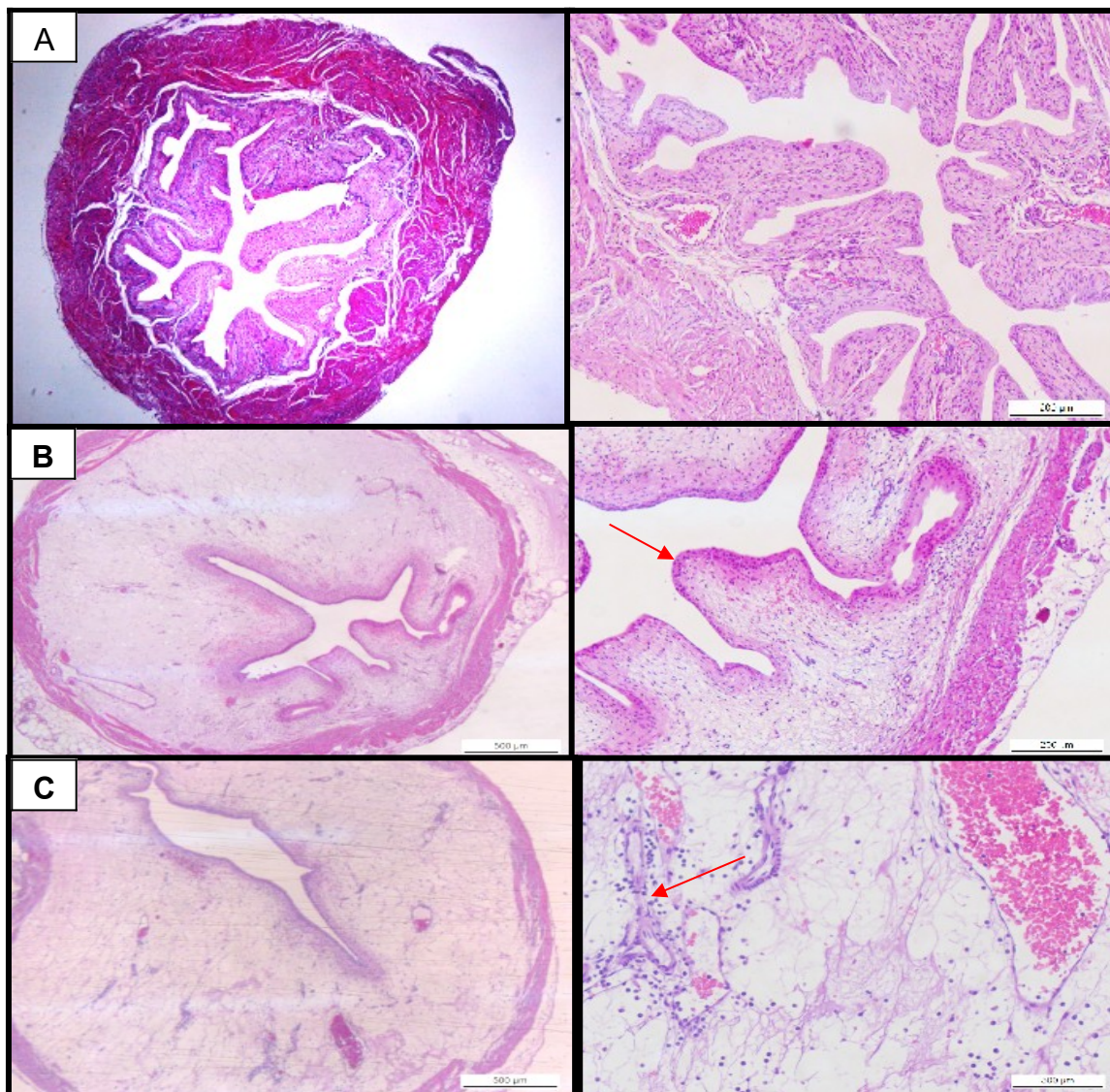
Na **Figura 20** visualizam-se fotomicrografias representativas de bexigas de animais injetados com salina (**Figura 20A**), ifosfamida (200mg/Kg), (**Figura 20B**) ou G-CSF (400 µg/Kg) + ifosfamida (**Figura 20C**) em menor (coluna esquerda, 40x) e maior aumento (coluna direita, 100x).

Tabela 03 - Efeito do tratamento prévio com filgastrim sobre a lesão microscópica durante a cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida.

Grupo	Edema	Infiltrado Leucocitário	Hemorragia	Fibrina	Ulceração	Total
Salina	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IFO 200 mg/Kg	2 (1-3) [#]	0,5(0-1)	1(0-2)	0(0-1)	0(0-1)	3,5(1-5)
G-CSF (200µg/Kg) + IFO (200mg/Kg)	3(2-3) ^{*,#}	1,5(1-2) ^{*,#}	1(1-2) ^{*,#}	1(0-3) ^{*,#}	0,5(0-2)	7(6-10)
G-CSF (400µg/Kg) + IFO (200mg/Kg)	3(2-3) ^{*,#}	3(1-3) ^{*,#}	2(1-3) ^{*,#}	1(0-2) ^{*,#}	1(0-3)	10(7-11)
G-CSF (400µg/Kg)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

Os animais foram pré-tratados durante 5 dias com filgastrim (200 ou 400µg/Kg) antes da administração de ifosfamida (200mg/Kg,i.p.), com salina(5ml/Kg,i.p.) ou G-CSF(400µg/Kg). Após 12 h da administração de ifosfamida, os animais foram sacrificados para a coleta da bexiga, as quais foram processadas para análise histopatológica. O resultado foi expresso em termos de mediana (mín-máx). Utilizou-se teste estatístico Kruskal Wallis/Dunn para comparação entre os grupos. [#]p<0,05 vs salina; *p<0,05 vs grupo IFO;

Figura 18 – Fotomicrografias de bexigas de camundongos.

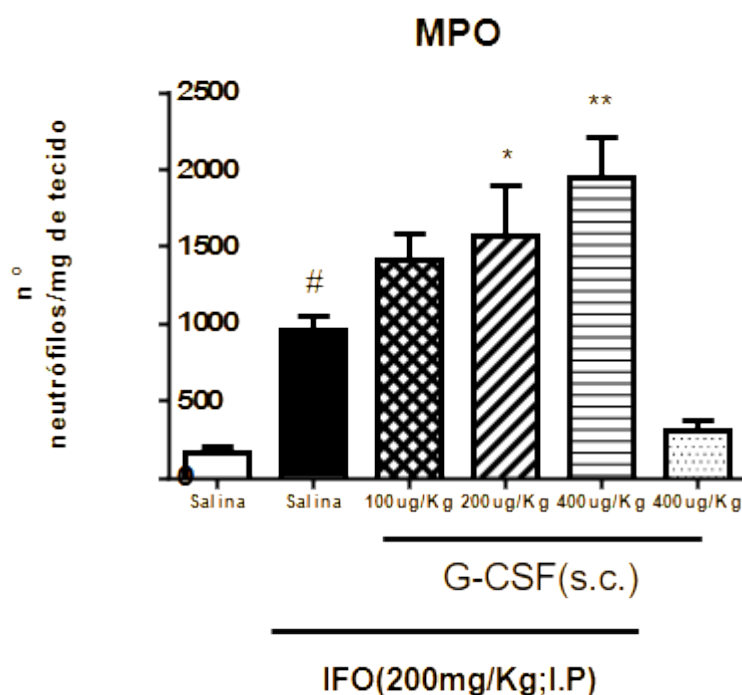


Fotomicrografias de bexigas, HE (A) Bexiga de camundongo administrado com solução salina (5ml/Kg,i.p.) (B) Bexiga de camundongo tratado com IFO (200mg/Kg, i.p.) apresentando edema e redução das camadas do urotélio(ponta da seta). (C) Bexiga de camundongo pré-tratado com G-CSF 400 μ g/Kg e depois IFO (200mg/Kg,i.p.), onde visualiza-se uma aumento do edema e principalmente um grande infiltrado leucocitário(ponta da seta). Coluna da esquerda representa um aumento de 40x e a da direita um aumento de 100x.

6.2.5-Efeito do tratamento prévio com filgrastim sobre o acúmulo vesical de neutrófilos

A injeção de IFO (200 mg/kg, i.p.) induziu um marcante acúmulo vesical de neutrófilos ($961,5 \pm 88,5$) em comparação com o grupo salina ($p < 0,05$). Ademais, o pré-tratamento com filgastrim (G-CSF, 200 ug/Kg ou 400 ug/kg) seguido de IFO promoveu uma potencialização do acúmulo neutrofilico (1579 ± 314 , $p < 0,05$; 1951 ± 257 , $p < 0,001$, respectivamente) quando comparado ao grupo IFO (**Figura 19**). O tratamento com apenas filgastrim (400 ug/Kg,s.c.) não se mostrou capaz de alterar os níveis de neutrófilos no tecido (304 ± 65) em comparação com grupo salina ($p > 0,05$, **Figura 19**).

Figura 19- Efeito do pré-tratamento com filgastrim sobre o acúmulo vesical de neutrófilos durante a cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida.



Os animais foram tratados com filgastrim (100 ug/Kg, 200 ug/Kg, 400 ug/kg, s.c.) + Ifosfamida (200mg/kg, i.p) ou receberam apenas ifosfamida (200 mg/kg, i.p), salina (5 ml/Kg) ou filgastrim (400 ug/Kg,s.c.). As barras representam as médias \pm E.P.M do número de neutrófilos/mg de tecido. Foi utilizado teste estatístico ANOVA e pós-teste Newmans-Keuls. Sendo # $p < 0,05$ vs salina e * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ vs grupo ifosfamida (IFO).

7- DISCUSSÃO

A quimioterapia tem sido usada como principal terapia coadjuvante em vários tipos de câncer. Diversas drogas têm sido utilizadas, entretanto, acompanhado do tratamento quimioterápico podem ocorrer vários efeitos colaterais, como a cistite hemorrágica (CH). A acroleína é o metabólito responsável por essa urotoxicidade, que acaba dificultando o tratamento. Estudos já mostraram que o acúmulo desse metabólito na bexiga acaba levando a um quadro inflamatório agudo, que se dá inicialmente por dano no urotélio, seguido por uma sinalização, através de citocinas, recrutando células de defesa para o foco da lesão, culminado numa sintomatologia caracterizada por uma hipertermia local, edema e dor (ASSREUY et al., 1999; KORKMAZ et al., 2007; RIBEIRO et al., 2002).

A CH torna limitante o tratamento quimioterápico. A medida atual para se realizar a uroproteção da bexiga segue o protocolo de uso de MESNA, com uma alta ingestão de líquidos, diuréticos, diurese forçada e alcalinização da urina, mas que atuam de uma forma não completamente efetiva. Diante disso, faz-se necessário buscar novas alternativas de tratamento que não tragam danos permanentes aos pacientes (RATLIFF et al., 1998; RIBEIRO et al., 2002; ZAKI et al., 2003).

O presente estudo buscou esclarecer a participação do neutrófilo nesse quadro inflamatório. Utilizou-se a dose de IFO 400 mg/kg via intraperitoneal, a qual foi possível reproduzir o dano causado pelo metabólito do quimioterápico sobre a bexiga de camundongos. Evidenciou-se um aumento do peso da bexiga dos animais tratados com esse fármaco e um grande influxo leucocitário, principalmente polimorfonucleares (RIBEIRO et al., 2012; LEITE et al., 2015).

Demonstrou-se previamente que células epiteliais e do tecido conjuntivo são responsáveis por sinalizar a migração de células inflamatórias para a lesão, sendo comprovada a participação, principalmente de fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e da interleucina- 1β , pela via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B), sendo esse fator responsável por regular a expressão de iNOS, COX-2 e $TNF-\alpha$, que estão diretamente ligados a inflamação (RIBEIRO et al., 2012; MACEDO et al., 2012; LEITE et al., 2015; VYKHOVANETS et al., 2012).

Os neutrófilos derivam da linhagem granulocítica e são as células do sistema imune que apresentam a maior concentração de grânulos azurófilos citoplasmáticos

que contém a MPO celular. Chega a representar 5% do peso seco dessas células. Dessa forma pode ser utilizado como parâmetro para medir a concentração dessas células no tecido lesionado (DEWALD et al., 1986; KLEBANOFF et al., 2005).

Fucoidina é um polissacarídeo sulfatado obtido através de algas. Estudos mostram que ela age como inibidor da migração de neutrófilos através da inibição das moléculas de adesão P e L-selectina (SKINNER et al., 1991, VARKI, 1994). Foi mostrado que pré-tratamento com fucoidina mostra uma redução significativa na migração de neutrófilos para focos inflamatórios (ROCHON et al., 1993; MEBIUS & WATSON, 1993; VARKI et al., 1994). Provavelmente, a capacidade de inibição de migração se dá pela presença dos sítios fucosilados presentes na molécula que mimetiza os ligandos de selectinas (PATANKAR et al, 1993; VARKI, 1994; ZHANG e cols et al., 2001). Além do seu papel fundamental de inibição na migração de polimorfonucleares, a fuicoidina também se apresenta como uma fármaco anticancerígeno, através da inibição de crescimento de células de carcinoma hepatocelular Huh7 e células HepG2, da indução de apoptose e autofagia de células CF-7 do câncer de mama humano, do carcinoma de pulmão de Lewis, do melanoma B16, e AGS de adenocarcinoma gástrico (HU et al., 2010; YAMASAKI et al., 2012) .

O efeito protetor da fucoidina pode ser explicado pela análise de MPO, em que os grupos que receberam um tratamento com o fármaco na dose de 100 mg/kg, antes da indução da CH por IFO 400 mg/kg apresentaram uma redução na migração de neutrófilos para o tecido da bexiga. Isto também pode ser evidenciado por meio da análise histológica. Estes dados estão de acordo com o que foi encontrado na literatura (SHIMAOKA et al., 1996; SOUZA et al., 2003; PINTO et al., 2010). Esse papel fundamental de inibição da migração neutrofilica deste fármaco também foi evidenciado em estudos que buscaram analisar o papel dessas células em diversas patologias, como na asma, aterosclerose, pancreatite aguda, doença cerebrovascular, metástase e complicações vasculares na obesidade (WANG et al., 2012; HARTMAN et al., 2012; TAHA et al., 2012; CARVALHO et al, 2014;WANG et al., 2017).

A redução do acúmulo de neutrófilos no tecido inflamado da bexiga durante o tratamento com fucoidina, detectada pela redução da MPO tecidual, contribui para uma redução da produção local de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6 e COX-2),

por conseguinte, para a menor extensão do dano histopatológico verificado neste estudo.

Vários estudos analisam o papel do neutrófilo através da inibição das selectinas. Ao se estudar a colite experimental, observou-se que a fucoidina causou uma significativa inibição da MPO na mucosa colônica de animais, com uma redução do rolamento e do acúmulo de polimorfonucleares no tecido lesado (ZHANG e cols et al., 2001). Um estudo recente utilizando anticorpo anti-P-selectina mostrou uma redução na necrose e na hemorragia de células acinares. Diante desse fato, pode-se observar a relação direta entre fucoidina e selectinas, que acaba resultando na inibição do rolamento e por consequência o extravasamento dos neutrófilos para o foco inflamatório (HARTMAN e cols et al., 2012).

Na presente investigação, foi mostrado o papel relevante da P-selectina no processo de migração de neutrófilos na CH induzida por ifosfamida sendo observado importante atenuação do processo inflamatório pelo bloqueio competitivo deste receptor tornando-se um possível alvo terapêutico.

Liou e colaboradores (2013) estudaram o efeito da ausência de P-selectina em animais nocaute (selectina-P^{-/-}) utilizando modelo de lesão em nervo ciático, induzida cirurgicamente pela compressão com fio de sutura. Posteriormente, coletou tecido no tempo 0, 1, 3, 7 e 14 dias após desafio e avaliou dosagem de MPO, citocinas e contagem de células por citometria de fluxo, encontrando uma redução significativa na concentração de MPO, número de neutrófilos, dosagem de IL-6 e TNF- α e observou também um aumento na concentração de citocinas anti-inflamatórias tais como IL-10, IL-4, IL-13 e IL-1Ra e um efeito antinoceptivo nos animais que não possuíam o receptor para P-selectina, corroboram com nossos achados sobre o efeito anti-inflamatório da inibição específica da P-selectina através da administração de fucoidina. Já Cunha e colaboradores (2008), propuseram que os neutrófilos possuem uma participação crucial nos mecanismos inflamatório e hipernociceptivo e utilizaram o fármaco fucoidina mostrando que o tratamento com doses crescentes, reduz o efeito hipernoceptivo e a concentração de MPO encontrado na pata de ratos tratados com carragenina. Além disso, observou que a inibição da migração de neutrófilos pela ação da fucoidina reduziu a produção de PGE2 nos ratos tratados, com interleucina-1 β administrado na pata.

No presente estudo, observou-se que o pré-tratamento com fucoidina promoveu uma redução na concentração de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6. Sendo estes mediadores intensamente estudados em diversos trabalhos sobre CH mostrando sua participação relevante na formação do edema vesical e de outros mediadores como COX-2 e INOS.

No trabalho de Wang e colaboradores (2013), observou-se o aumento de IL-6 na urina a partir de 12 horas, após o tratamento com acroleína administrada intravesical, modelo de CH. Adicionalmente, ao administrar anticorpo anti-IL-6 houve uma redução do peso vesical da bexiga e nos parâmetros microscópicos de lesão. Já Girard e colaboradores (2011) avaliaram a expressão do RNAm de IL-6 no urotélio e detrusor da bexiga de ratos tratados com ciclofosfamida e sacrificados em diferentes tempos (4 horas, 48 horas, 3 dias e 10 dias) sendo encontrada maior expressão RNAm de IL-6 no detrusor de animais tratados versus sua expressão no urotélio. Posteriormente, foi quantificado por técnica de Western blotting a concentração de IL-6 no tecido, confirmando altas concentrações de IL-6 no período de 4 e 48 horas pós-tratamento com oxazofosforinas. Nishii e colaboradores (2006) também encontraram um aumento na expressão de RNAm de IL-6 em camundongos tratados com ciclofosfamida sendo significativo a partir de 1 hora até 12 horas pós-indução e este resultado foi confirmado por técnica de imunohistoquímica.

Ribeiro e colaboradores (2002) administraram anti-soro contra IL-1 β em camundongos tratados com IFO 400mg/Kg, i.p. e analisaram com 6 horas e com 12 horas após indução de cistite o peso úmido vesical das bexigas, encontrando uma redução significativa versus os animais que receberam apenas IFO. Outrossim, avaliaram expressão de INOs após tratamento com soro e observaram uma redução na expressão de INOs no grupo tratado com anti-IL-1 β . Macedo e colaboradores (2008) modularam a cistite hemorrágica em ratos com pentoxifilina fármaco que possui atividade inibitória sobre as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6, obtendo redução das lesões macroscópica e microscópica. Além de reduzir o peso úmido vesical corroborando com achados encontrados com a inibição da migração de neutrófilos pela fucoidina que promoveu uma redução de IL-1 β e IL-6.

Em recente trabalho de Leite e colaboradores (2014) utilizando o fármaco anankira, é uma forma recombinante do IL-1RA endógeno, que difere da forma nativa na medida em que não é glicosilado e tem uma metionina N-terminal adicional. Anakinra está aprovado para o tratamento de artrite reumatoide que possui ação competitiva sobre o receptor de IL-1, no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, comprovou-se que a IL-1 é fundamental para patogênese desta reação adversa e promoveu uma redução em diferentes parâmetros MPO, escores macroscópico, escores microscópico, permeabilidade vesical e peso úmido vesical. Adicionalmente, avaliou-se o efeito noceutivo na cistite hemorrágica, encontrando uma redução significativa no grupo pré-tratado com anankira versus o grupo tratado apenas com IFOS 400mg/kg, semelhante aos resultados obtidos com a inibição da migração de neutrófilos pela fucoidina no modelo de cistite induzida por IFOS.

O peso úmido vesical (PUV) mede o peso da bexiga em relação a 20g do peso do camundongo. Quanto maior o PUV, maior o edema produzido. O tratamento com IFO mostrou um aumento significativo em relação ao grupo controle. Além disso, a fucoidina nas doses 30 mg e 100 mg /kg foi capaz de reduzir o edema causado por IFO. Também houve uma redução na permeabilidade vascular com o pré-tratamento, nas três doses analisadas. Isso pode ser evidenciado mais especificamente na dose de 100 mg/kg através da análise macroscópica e histopatológica da bexiga, obtendo-se uma menor extensão do infiltrado celular na parede vesical, os escores microscópicos analisados segundo Gray e pode-se observar que o grupo FUCO apresentou escores semelhantes ao grupo que recebeu tratamento padrão com MESNA (FLOWER et al., 2005). A partir da análise histológica, também se observou a ausência de tecido de reparação tecidual, quando há proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno, provavelmente isso se deu pelo fato desse processo começar em média após 48 horas do início do processo inflamatório (PHILIPS et al., 2003).

No presente estudo, observamos um aumento na expressão de RNAm de COX-2 nos animais tratados com IFO e uma redução nos pré-tratados com fucoidina. Adicionalmente, ao analisar imunomarcagem para COX-2 por imunohistoquímica encontramos também uma redução da expressão da COX-2 nos animais pré-tratados com 100mg/Kg de fucoidina o que sugere uma menor produção

de prostanoídes - em especial de PGE₂-, tendo assim, um efeito antiedematoso e anti-nociceptivo. Ficando visível, o papel dos neutrófilos sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias e sua posterior ação sobre a ciclooxigenase-2.

Em trabalho utilizando modelo de cistite em ratos, induzida por ciclofosfamida de Dornelles e colaboradores (2014) utilizando um antagonista seletivo de CXCR2 o fármaco SB225002, observou-se uma redução significativa na migração de neutrófilos e por consequência deste bloqueio uma redução no peso úmido vesical, escores microscópicos de lesão e uma redução concomitante na dosagem de IL-1 β e TNF- α , com uma melhoria funcional na avaliação de urodinâmica e um efeito na redução da nocicepção visceral.

A COX-2 é uma isoenzima comprovadamente participante de processos inflamatórios e indução da dor. Citocinas como IL-1 e TNF- α são mediadores cruciais para sua expressão. Foi demonstrado que essa isoenzima está ligada ao processo patológico da CH e que tratamento com inibidores acabam reduzindo sua expressão e consequentemente a inflamação (KUMMER et al., 2002; MACEDO et al., 2008; MACEDO et al., 2012).

Macedo e colaboradores (2007) observaram o aumento da expressão de COX-2 nos animais com cistite hemorrágica e que o tratamento com inibidor não seletivo indometacina ou com inibidor seletivo de COX-2 etoricoxib, são capazes de reduzir os escores macroscópico e microscópico de lesão, além de diminuir significativamente o peso úmido vesical das bexigas de animais tratados com anti-inflamatórios não esteroidais.

Diversos trabalhos demonstram que a CH experimental induzida por oxazafosforinas está acompanhada de hipernocicepção visceral (Dornelles, 2014; Lima-Junior, 2007).

No presente estudo, observou-se que os neutrófilos são células do sistema imunológico imprescindível para gênese da dor no modelo de cistite hemorrágica em camundongos e que quando administramos fucoidina na dose de 100mg/Kg via endovenosa encontramos uma redução na hipernocicepção muito semelhante ao grupo tratado com salina 5ml/Kg. Portanto, comprovamos que o bloqueio competitivo das selectinas promovem um efeito anti-noceptivo neste modelo. Já Cunha e colaboradores (2008), ao administrar o fármaco DF2162 cuja ação é inibição não

competitiva alostérica dos receptores de quimiocinas CXCR2 e CXCR1 que são fundamentais para quimiotaxia e adesão de neutrófilos. Constatou-se que os neutrófilos são células essenciais para processo inflamatório e hipernoceptivo no modelo de edema de pata induzida por carragenina e por CXCL1/KC. Entretanto, no modelo de edema de pata induzida por CXCL1/KC o fármaco DF2162 bloqueia de forma significativa o efeito hipernoceptivo semelhante aos valores basais encontrados nos animais tratados com salina.

Em virtude do que se evidenciou com bloqueio da migração de neutrófilos pela inibição competitiva dos receptores de P e L- selectinas pelo fármaco fucoidina na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, o resultado nos encorajou a avaliar o efeito do fármaco filgastrim (G-CSF), um importante estimulador de colônia de células granulocíticas da linhagem neutrofílica, utilizado largamente na clínica para o tratamento de neutropenia febril pós-quimioterapia. O G-CSF foi encontrado aumentado no líquido sinovial e no soro de pacientes com artrite reumatoide e o tratamento prévio com G-CSF exacerba o processo inflamatório nos diferentes modelos de artrite reumatoide em ratos e camundongos. Portanto, animais nocaute para G-CSF(G-CSF^{-/-}) estão protegidos de muitos efeitos lesivos do modelo de artrite reumatoide provocado por colágeno. Além disso, os animais tratados com anticorpos anti-G-CSF cursam com uma neutropenia e são mais resistentes à indução de artrite reumatoide (LAWLOR et. al. 2004; EYLES et al.2008)

No presente estudo, observou-se que o pré-tratamento com G-CSF (200mg/Kg e 400mg/Kg) aumenta a quantidade de neutrófilos na bexiga de camundongos com cistite induzida por 200mg/Kg de IFOS e o peso úmido vesical. Já os escores de infiltrado leucocitário e depósito de fibrina estão aumentados nos animais que receberam tratamento com 400mg/kg de G-CSF versus o grupo que recebeu apenas IFOS 200mg/Kg. Estes resultados corroboram com trabalho Silvescu e Sacktein(2014) que encontraram um aumento da expressão de moléculas ligante ao receptor de E-selectina (MPO-EL) em células mieloides humanas. *In vitro*, o G-CSF aumenta a expressão de CD11d em neutrófilos humanos e em trabalho de Eyles e colaboradores (2008), observou-se que administração sistêmica ou local de G-CSF aumentam a migração de leucócitos na articulação de animais com atrite induzida por colágeno e que esta migração é dependente de MAC-1. Adicionalmente,

que os neutrófilos de camundongos tratados com G-CSF possuem um aumento da expressão de CD11b. Neste contexto, nossos resultados mostram um maior infiltrado de leucócitos na bexiga de animais pré-tratados com G-CSF, porém, novos estudos são necessários para ampliar o conhecimento das possíveis causas deste agravamento da lesão. Adicionalmente, observar se na prática clínica o pré-tratamento com estimuladores de colônia (G-CSF, GM-CSF) podem aumentar a propensão ao desenvolvimento de reações adversas aos quimioterápicos, tendo vista, a grande utilização destes fármacos na recuperação dos efeitos mielotóxicos do tratamento de diferentes tipos de cânceres.

Dessa forma, acreditamos que a migração de neutrófilos seja um passo essencial para a gênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

8- CONCLUSÃO

Os dados apresentados nos permitem concluir que:

- a) O bloqueio de P-selectina e L-selectina com fucoidina atenuam todos os eventos associados ao processo inflamatório (edema, aumento da permeabilidade vascular, infiltração neutrofílica e hipernocicepção) da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.
- b) O papel primordial dos neutrófilos na liberação de mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6 e sobre a expressão de COX-2.
- c) Sugere-se que o aumento do número de neutrófilos circulantes pela ação do G-CSF potencializa os efeitos inflamatórios (edema e infiltração neutrofílica) da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *IMUNOLOGIA BÁSICA: Funções E Distúrbios Do Sistema Imune*. 2ed, Rio De Janeiro: Revinter, 2003.

AIZAWA N, IGAWA Y, NISHIZAWA O, WYNDAELE J. Effects Of Nitric Oxide On The Primary Bladder Afferent Activities Of The Rat With And Without Intravesical Acrolein Treatment. *Eur Urol*. 2011; 59:264-71.

American Society Of Clinical Oncology Clinical Practice Guidelines For The Use Of Chemotherapy And Radiotherapy Protectants. *J Clin Oncol* 1999;17:3333-3355.

ANDRADE E SOUSA, L. M. O papel dos neutrófilos na imunidade inata e no desenvolvimento da resposta imune adquirida ao parasita *Leishmania amazonenses*. 2009. Dissertação de Mestrado - Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Minas Gerais.

ARNOLD H, BOURSEAUX F, BROCK N. Neuartige Krebs Chemotherapeutika Aus Der Gruppe Der Zyklischen N-Lost-Phosphamidester. *Naturwissenschaften* 1958; 45:64-6.

ASSREUY, A. M. S. et al. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. *The Journal of urology*, v. 161, n. 6, p. 1988-1993, 1999.

BARRETO, A.R; CAVALCANTE, I.C; CASTRO, M.V; JUNQUEIRA, A.F; VALE, M.R; RIBEIRO, R.A; SOUZ,A M.H; BRITO, G.A. Fucoidin Prevents *Clostridium Difficile* Toxin-A-Induced Ileal Enteritis In Mice. *Dig Dis Sci*. V. 53(4), P. 990-6, 2008.

BELINATI, K.D. Efeitos do ácido clorogênico sobre funções de neutrófilos: estudos in vitro. 2010. 15 p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BENDALL, L.J;BRADSTOCK, K.F.G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agente.Cytokine & Growt fator reviews.V.25;p 355-365;2014

BRADLEY, P.P; CHRISTENSEN, R.D; ROTHSTEIN, G. Cellular And Extracellular Myeloperoxidase In Pyogenic Inflammation. *Blood*. V. 60, P. 618–22, 1982.

BRASIL. Estimativas 2012:Incidência De Câncer No Brasil. Instituto Nacional Do Câncer, Rio De Janeiro, 118 P., 2011.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde. Departamento De Análise Da Situação De Saúde. **Sistema De Informações Sobre Mortalidade**

(SIM). Brasília, DF: MS, 2013. Disponível Em: <[Http://Www.Datasus.Gov.Br](http://www.datasus.gov.br)>. Acesso Em: 10 Dez. 2013.

BRESSAN AL, FONTENELLE E, SILVA RS, GRIPP AC. Imunossupressores Na Dermatologia. Anais Brasileiros De Dermatologia 2010; 85(1): 9-22.

BROCK N, POHL J, STEKAR J. Studies On The Urotoxicity Of Oxazaphosphorine Cytostatics And Its Prevention. I. Experimental Studies On The Urotoxicity Of Alkylating Compounds. Eur J Cancer 17:595–607 1981

BRUNTON LL, CHABNER B, KNOLLMAN BC. As Bases Farmacológicas Da Terapêutica, Goodman E Gilman. 9° Edição, Mcgraw Hill, Nova Iorque, 1996.

CARVALHO, Ana CS et al. Protective effects of fucoidan, a P-and L-selectin inhibitor, in murine acute pancreatitis. Pancreas, v. 43, n. 1, p. 82-87, 2014.

CHABNER, B., LONGO, D., Cancer Chemotherapy And Biotherapy: Principles And Practice. Lippincott Williams & Wilkins 2005

CHAVAKIS, E.; CHOI, E.Y.; CHAVAKIS T. Novel Aspects In The Regulation Of The Leukocyte Adhesion Cascade. Tromb. Haemost., Frankfurt, V. 102, P.191-197, 2009.

CHOI, E.Y.; SANTOSO, S.; CHAVAKIS, T. Mechanisms Of Neutrophil Transendothelial Migration. Frontiers In Bioscience, V.14, P. 1596-1605, 2010.

COLVIN M, BRUNDRETT RB, KAN MN, Et Al. Alkylating Properties Of Phosphoramidate Mustard. Cancer Res 36:1121 1976

COX PJ. Cyclophosphamide Cystitis--Identification Of Acrolein As The Causative Agent. Biochem Pharmacol 1979; 28:2045-9.

CUNHA, T.M.; JUNIOR, W.A.V.; SHIVO, I.R.; NAPIMOGA, M.H. Et Al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. Journal of Leukocyte Biology. V.83;824-832;2008.

CUNHA, T.M, BARSANTE, M.M.; GUERRERO, A.T. Et Al. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. British Journal of Pharmacology. V.154, P.460-470, 2008.

DORNELLES, F.N.; ANDRADE, E.L.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Role of CXCR2 and TRPV1 in functional, inflammatory and behavioural changes in the rat model of cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis. V. 171. P 452-467. 2014

DEVRIES CR, FREIHA FS. Hemorrhagic Cystitis: A Review. J Urol 1990; 143:1-9.

DEWALD, B., BAGGIOLINI, M. (1986). "Methods For Assessing Exocytosis By Neutrophil Leukocytes." Methods Enzymol., 132, 267.

DUNHAM, N. W. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc*, v. 46, p. 208-209, 1957.

EYLES, J. L.; HICKEY, M.J. Et Al. A Key role for G-CSF-induced neutrophil production and trafficking during inflammatory arthritis. *Blood*. V. 112. P. 5193-5201, 2008.

FITTON, J.H. Therapies from Fucoidan; Multifunctional Marine Polymers. *Marine Drugs*. V. 9; p. 1731-1760. 2011.

FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FERLAY, J. Et Al. **GLOBOCAN 2012 V1.0, Cancer Incidence And Mortality Worldwide**. Lyon, France: IARC, 2013. (IARC Cancerbase, 11). Disponível Em: <[Http://Globocan.Iarc.Fr](http://Globocan.Iarc.Fr)>. Acesso Em: 10 Dez. 2013.

FLOWER RJ, PERRETTI M. Controlling Inflammation: A Fat Chance? *J Exp Med*. 2005; 201: 671-74.

FORNI, A.M.; KOSS, L.G.; GELLER, W. Cytological Study Of The Effect Of Cyclophosphamide On The Epithelium Of The Urinary Bladder In Man. **Cancer**, V. 17, P. 1348, 1964

GAMCSIK MP, LUDEMAN SM, SHULMAN-ROSKES EM, Et Al. Protonation Of Phosphoramidate Mustard And Other Phosphoramides. *J Med Chem* 36:3636 1993

GENG, J.G., BEVILACQUA, M.P., MOORE, K.L., MCINTYRE, T.M., PRESCOTT, S.M., KIM, J.M., BLISS, G.A., ZIMMERMAN, G.A., MCEVER, R.P.. Rapid Neutrophil Adhesion To Activated Endothelium Mediated By GMP-140. *Nature*, Oklahoma City, V. 343, N. 6260, P. 757-760, 1990

GIRARD, B.M.; CHEPPUDIRA, B.P.; MALLEY, S.E Et Al. Increased expression of interleukin-6-family members and receptors in urinary bladder with cyclophosphamide-induced bladder inflammation in female rats. *Frontiers in Neuroscience*. V. 5; p. 1-13; 2011.

GIFONI, Markus Andret Cavalcante. Envolvimento da pentraxina 3 (PTX3) na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos. 2008.

GOMES TN, SANTOS CC, SOUZA-FILHO MV, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. Participation Of TNF-Alpha And IL-1 In The Pathogenesis Of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28:1103-8

GONZÁLEZ-AMARO, R. & SÁNCHEZ-MADRID, F. Cell Adhesion Molecules: Selectins And Integrins. *Crit Rev Immunol.*, San Luis Potosí, V. 19, N. 5-6, P. 389-429, 1999.

GRAY, K.J.; ENGELMANN, U.H.; JOHNSON, E.H.; FISHMAN, I.J. Evaluation Of Misoprostol Cytoprotection Of The Bladder With Cyclophosphamide (Cytosan) Therapy. *J. Urol.*, V. 136, N. 6, P. 497-500, 1986.

GUERRA, M. R. Et Al. Risco De Câncer No Brasil: Tendências E Estudos Epidemiológicos Mais Recentes. *Revista Brasileira De Cancerologia*, V. 51, N. 3, P. 227-34, 2005.

HAFEZI-MOGHADAM, A.; THOMAS, K.L.; PROROCK, A.J.; HUO, Y.; LEY, K. L-Selectin Shedding Regulates Leukocyte Recruitment. *J Exp Med*, Charlottesville, V.193, N.7, P. 863-872, 2001.

HAMAZAKI M, TANIGUCHI K, MURATA H. Im- 29. Munohistological Study Of Reactive Follicular Hyperplasia Of Lymph Node In Childhood. *Rinsho Byori: The Japanese Journal Of Clinical Pathology* 1992; 40(4): 423-428.

HARTMAN, H; ABDULLA, A; AWLA, D; LINDKVIST, B; JEPPSSON, B; THORLACIUS, H; REGNÉR, S. P-Selectin Mediates Neutrophil Rolling And Recruitment In Acute Pancreatitis. *Br J Surg*. V.99(2), P.246-55, 2012.

HAYASHI, F., MEANS, T. K. & LUSTER, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil unction. *Blood* 102, 2660–2669 (2003)

HENSLEY, M.L.; SCHUCHTER, M.L.; LINDLEY, C.; MEROPOL, N.J. American Society Of Clinical Oncology Clinical Practice Guidelines For The Use Of Chemotherapy And Radiotherapy Protectants. *J Clin Oncol*, V.17. P.3333–3355, 1999

HILL DL, LASTER JR WR., KIRK MC, Et Al. Metabolism Of Iphosphamide [2-(2-Hloroethylamino)- -(2-Chloroethyl)Tetrahydro-2//L ,3,2-Oxazaphosphorine 2-Oxide]And Production Of A Toxic Iphosphamide Metabolite *Cancer Res* 33: 1016-1022 1973

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER et al. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 25. Wood, leather and some associated industries. Distributed for IARC by WHO, Geneva, Switzerland, 1981.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER et al. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. Lyon, France:: IARC, 1987.

INCA. Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde, Brasil, 2014. Estimativas de câncer. Disponível em: < www.inca.gov.br/estimativa/2014/> Acesso em: 10/Novembro/2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Magnitude Do Câncer No Brasil: Incidência, Mortalidade E Tendência. **Informativo Vigilância Do Câncer**, N. 3, Mai./Nov. 2012.

IRHIMEH, M.R.; FITTON, J.H.; LOWENTHAL, R.M. Pilot Clinical Study To Evaluate The Anticoagulant Activity Of Fucoidan. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 20, 607–610, 2009.

JEMAL, A. Et Al. Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin*, V. 61, P. 69-90, 2011.

KOLACZKOWSHA,E; KUBES, P..Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature*.V.13;p.159-175;2013.

KIMURA M, TOMITA Y, MORISHITA H, TAKAHASHI K. Presence Of Mucosal Change In The Urinary Bladder In Nonhematuric Patients With Long-Term Exposure And/Or Accumulating High-Dose Cyclophosphamide. Possible Significance Of Follow-Up Cystoscopy On Preventing Development Of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Urologia Internationales* 1998; 61(1): 8-11.

KIUCHI, H.; TAKAO, T.; YAMAMOTO, K.; NAKAYAMA, J.; MIYAGAWA, Y.; TSUJIMURA, A.; NONOMURA, N.; OKUYAMA, A. Sesquiterpene lactone arthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model by inhibiting nuclear factor-kappaB phosphorylation. **J Urol**, v. 181, p. 2339-48, 2009

KLEBANOFF SJ: Myeloperoxidase: Friend And Foe. *J Leukoc Biol* 77: 598-625, 2005.

KLIPPEL JH. Cyclophosphamide: Ovarian And Other Toxicities. *Lupus* 1995; 4: 1-2.

KOBAYASHI, S. D. & DELEO, F. R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 1, 309–333 (2009).

KORKMAZ A, OTER S, DEVECI S, OZGURTAS T, TOPAL T, SADIR S Et Al. Involvement Of Nitric Oxide And Hyperbaric Oxygen In The Pathogenesis Of Cyclophosphamide Induced Hemorrhagic Cystitis In Rats. *J Urol*. 2003; 170:2498-502.

KUMMER CL, COELHO TCRB. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores Da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002; 52:498–512.

LANGER, H.F. & CHAVAKIS, T. Leukocyte-Endothelial Interactions In Inflammation. *J. Cell. Mol. Med.*, Bethesda, V.13, N.7, P.1211-1220, 2009.I.

LAWLOR,K.E.; CAMPBELL,I.K.; METCALF,D. .Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting To The Site Of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated. *Nature*, Charlottesville-Virginia, V.7, P.678-689, 2007.PNAS.V.101.P. 11398-11403.2004

LEITE, Caio AVG et al. Target inhibition of IL-1 receptor prevents ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *The Journal of urology*, v. 194, n. 6, p. 1777-1786, 2015.

Li, B.; Lu,F. ;Wei,X. Et al. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules*. V.13.P.1671-1695.2008

LIMA, M. V. A. Et Al. Histological Changes In Bladders Of Patients Submitted To Ifosfamide Chemotherapy Even With Mesna Prophylaxis. *Cancer Chemother Pharmacol*, V. 59, N. 5, P. 643-650, 2007.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P. et al. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, α , β -amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK 1-receptors, and K⁺ ATP channels. *Inflammation Research*, v. 56, p. 487-494, 2007.

LIOU,J.T.;LEE,M.C.;LIN,Y.C Et Al.P-Selectin is required for neutrophils and macrophage infiltration into injured site and contributes to generation of behavioral hypersensitivity following peripheral nerve injury in mice.*Pain*.V.154,P.2150-2159,2013.

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

MACEDO FY, BALTAZAR F, MOURAO LC. Induction Of COX-2 Expression By Acrolein In The Rat Model Of Hemorrhagic Cystitis. *Exp Toxicol Pathol*. 2008; 59:425–430.

MACEDO, F.Y; BALTAZAR,F.;ALMEIDA,P.R.C. Et Al.Cyclooxygenase-2 expression on ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats.*J. Cancer Res. Clin. Oncol*.V.134;p.19-27;2008.

MACEDO FYB, MOURÃO LTC, FREITAS HC, LIMA-JÚNIOR RCP, WONG DVT, ORIÁ RB Et Al.. Interleukin-4 Modulates The Inflammatory Response In Ifosfamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Inflammation*. 2012; 35:297-307.

MACEDO FYB, MOURÃO LTC, PALHETA JR RC, JUCÁ DM, LIMA JR RCP, NETO JSC Et Al. Cyclooxygenase-2 Contributes To Functional Changes Seen On Experimental Hemorrhagic Cystitis Induced By Ifosfamide In Rat Urinary Bladder. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 67:935–43.

- MARTINS, J.; SILVA, R.; COUTINHO-SILVA, R.; TAKIYA, C.; BATTASTINI, A.; MORRONE, F.; CAMPOS, M. The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. **Br J Pharmacol**, v. 165, p. 183-96, 2012.
- MANIKANDAN R, KUMAR S, DURAIRAJAN LN. Hemorrhagic Cystitis: A Challenge To The Urologist. *Indian Journal Of Urology* 2010; 26(2): 159-166.
- MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M.A.; COSTANTINI, C. Et Al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature*. V.11.P.519-531; 2011.
- MCEVER, R.P; MOORE, K.L; CUMMINGS, R.D. Leukocyte Trafficking Mediated By Selectin-Carbohydrate Interactions. *J Biol Chem*. V. 12, P. 270(19):11025-8, 1995.
- MEBIUS, R.E. & WATSON, S.R. (1993). L- And E-Selectin Can Recognize The Same Naturally Occurring Ligands On High Endothelial Venules. *J. Immunol*. 151, 3252 – 3260.
- MORENO, Susana E. et al. IL-12, but not IL-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 5, p. 3218-3224, 2006.
- MOY B. Cystitis In Patients With Cancer. In: Uptodate Version 20.3 Via [Http://Www.Uptodate.Com/Contents/Cystitis-In-Patients-With-Cancer](http://www.uptodate.com/contents/cystitis-in-patients-with-cancer) (Accessed 15 February 2012).
- NISHII, H.; NOMURA, M.; FUJIMOTO, N.; MATSUMOTO, T. Up-regulation of interleukin-6 gene expression in cyclophosphamide-induced cystitis in mice; An in situ hybridization histochemical study. *International journal of Urology*. V.13;p1339-1343;2006.
- OTER S, KORKMAZ A, OZTAS E, YILDIRIM I, TOPAL T, BILGIC H. Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibition In Cyclophosphamide Induced Hemorrhagic Cystitis In Rats. **Urol Res** 2004; 32:1859.
- PAN, J., XIA, L., YAO, L., MCEVER, R.P. Tumor Necrosis Factor-Alpha- Or Lipopolysaccharide-Induced Expression Of The Murine P-Selectin Gene In Endothelial Cells Involves Novel Kappab Sites And A Variant Activating Transcription Factor/Camp Response Element. *J Biol Chem.*, Oklahoma City, V. 273, N. 16, P. 10068-10077, 1998.
- PATANKAR, M.S., OEHNINGER, S., BARNETT, T., WILLIAMS, R.L. & CLARK, G.F. (1993). A Revised Structure For Fucoidan May Explain Some Of Its Biological Activities. *J. Biol. Chem.*, 268, 21770 – 21776.
- PATEL, K.D.; CUVELEIER, S.L.; WIEHLER, S. Selectins: Critical Mediators Of Leukocyte Recruitment. *Seminar In Immunology*, V.14, P.73-81, 2002.

PEDROSA, A. M. Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: influência do tratamento com hidroxiuréia, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Ceará.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P.. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*. V. 17; N. 11; P. 1381-1390, 2011.

PHILIPS FS, STERNBERG SS, CRONIN AP, VIDAL PM. Cyclophosphamide And Urinary Bladder Toxicity. *Cancer Res* 1961; 21:1577-89.

PINTO, L.G; CUNHA, T.M; VIEIRA, S.M; LEMOS, H.P; VERRI, W.A JR; CUNHA, F.Q; FERREIRA, S.H. IL-17 Mediates Articular Hypernociception In Antigen-Induced Arthritis In Mice. *Pain*. V. 148(2), P. 247-56, 2010.

POMIN, V.H. Fuconomics and galactanomics: current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. *Biochimica et Biophysica Acta*. P. 1971-1979; 2012.

PYERITZ, R.; DROLLER, M.J.; BENDER, W.L.; SARAL, R. An Approach To Control Of Massive Hemorrhage In Cyclophosphamide- Induced Cystitis By Intravenous Vasopressin: A Case Report. *J Urol*. N. 120, P. 253–254, 1978

RAINER, T.H. L-Selectin In Health And Disease. *Resuscitation, Hong Kong*, V. 52, P. 127-141, 2002.

RATLIFF TR, WILLIAMS RD. Hemorrhagic Cystitis, Chemotherapy, And Bladder Toxicity. *J Urol*. 1998; 159:1044. [Pubmed: 9474228]

RIBEIRO RA, FREITAS HC, CAMPOS MC, SANTOS CC, FIGUEIREDO FC, BRITO GA, CUNHA F Q. Tumor Necrosis Factor-Alpha And Interleukin-1 Beta Mediate The Production Of Nitric Oxide Involved In The Pathogenesis Of Ifosfamide Induced Hemorrhagic Cystitis In Mice *Journal Of Urology* 2002; 167:2229- 2234.

RIBEIRO RA, FREITAS HC, CAMPOS MC, SANTOS CC, FIGUEIREDO FC, BRITO GA, Et Al. Tumor Necrosis Factor-Alpha And Interleukin-1beta Mediate The Production Of Nitric Oxide Involved In The Pathogenesis Of Ifosfamide Induced Hemorrhagic Cystitis In Mice. *J Urol*. 2002; 167:2229–34. [Pubmed: 11956484]

RIBEIRO, Ronaldo A. et al. Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches and new insights. *J Exp Integr Med*, v. 2, n. 2, p. 95-112, 2012.

RIOU, D.; COLLIEC-JOUAULT, S.; PINCZON DU SEL, D.; BOSCH, S.; SIAVOSHIAN, S.; LE BERT, V.; TOMASONI, C.; SINQUIN, C.; DURAND, P.; ROUSSAKIS, C. Antitumor And Antiproliferative Effects Of A Fucan Extracted From *Ascophyllum Nodosum* Against A Non-Small-Cell Bronchopulmonary Carcinoma Line. *Anticancer Res*. V. 16, P. 1213–1218; 1996.

ROCHON, Y.P., SIMON, S.I., LYNAM, E.B. & SKLAR, L.A. (1993). A Role For Lectin Interactions During Human Aggregation. *J.Immunol.*, 152, 1385 – 1393.

ROITT, I.M. & DELVES, P.J. *Fundamentos De Imunologia*. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 10ed, 489p, 2004.

SEBER, Adriana et al. Risk factors for severe hemorrhagic cystitis following BMT. *Bone marrow transplantation*, v. 23, n. 1, p. 35-40, 1999

SCAPINI, P.; BAZZONI, F.; CASSATELA, M.A. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression. In human neutrophils *Immunology.Letters*. P. 1-6;2008.

SILVERCU, C.I.; SACKSTEIN, R.G. CSF Induces Membrane Expression of a Myeloperoxidase Glycovariant that Operates as an E-selectin Ligand on Human Myeloid Cells. *PNAS*. V.111; P.10696-10701. 22 July; 2014.

SANTANA DG, SANTOS CA, SANTOS AD, NOGUEIRA PC, THOMAZZI SM, ESTEVAM CS, ANTONIOLLI AR, CAMARGO EA. 2012. Beneficial Effects Of The Ethanol Extract Of *Caesalpinia Pyramidalis* On The Inflammatory Response And Abdominal Hyperalgesia In Rats With Acute Pancreatitis. *J Ethnopharmacol* 142: 445-455.

SCHENKEL, A.R., CHEW, T.W., CHLIPALA, E., HARBORD, M.W., MULLER, W.A. Different Susceptibilities Of PECAM-Deficient Mouse Strains To Spontaneous Idiopathic Pneumonitis. *Exp Mol Pathol.*, Fort Collins, V. 81, N. 1, P. 23-30, 2006.

SEELY, A.J.E.; PASCUAL, J.L.; CHRISTOU, N.V. Science Review: Cell Membrane Expression (Connectivity) Regulates Neutrophil Delivery, Function And Clearance. *Critical Care*, Ottawa, V. 7, P. 291-307, 2003.

SHAW IC, GRAHAM MI. Mesna: A Short Review *Cancer Treat Ver* 14 67-68 1987.

SHIMAOKA M, IKEDA M, IIDA T, TAENAKA N, YOSHIYA I, HONDA T. Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:

SHIMAOKA, M; IKEDA, M; IIDA, T; TAENAKA, N; YOSHIYA, I; HONDA, T.

SKINNER, M.P., LUCAS, C.M., BURNS, G.F., CHESTERMAN, C.N. & BERNDT, M.C. (1991). GMP-140 Binding To Neutrophils Is Inhibited By Sulphated Glycans. *J. Biol. Chem.*, 266, 5371 – 5374.

SMALLEY, D.M. & LEY, K. L-Selectin: Mechanisms And Physiological Significance Of Ectodomain Cleavage. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, Charlottesville, V. 9, N. 2, P. 255-266, 2005.4

SMITH, E; MCGETTRICK, H.M; STONE, M.A; SHAW, J.S; MIDDLETON, J; NASH, G.B; BUCKLEY, C.D; ED RAINGER, G. Duffy Antigen Receptor For Chemokines And CXCL5 Are Essential For The Recruitment Of Neutrophils In A Multicellular Model Of Rheumatoid Arthritis Synovium. *Arthritis Rheum.* V. 58(7), P. 1968-73, 2008.

SOUZA, M.H; TRONCON, L.E; CUNHA, F.Q; OLIVEIRA, R.B. Decreased Gastric Tone And Delayed Gastric Emptying Precede Neutrophil Infiltration And Mucosal Lesion Formation In Indomethacin-Induced Gastric Damage In Rats. *Braz J Med Biol Res.* V. 36(10), P. 1383-90, 2003.

SOUZA-FIHO MV, LIMA MV, POMPEU MM, BALLEJO G, CUNHA FQ, RIBEIRO R DE A. Involvement Of Nitric Oxide In The Pathogenesis Of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Am J Pathol* 1997; 150:247-56.

TAHA, Manal Mohamed Elhassan et al. Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited: Role of arbutin. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 141, n. 1, p. 273-281, 2012.

TEIXEIRA, M.M.; HELLEWELL, P.G. The Effect Of The Selectin Bindingpolysaccharide Fucoidin On Eosinophil Recruitment In Vivo. *Br. J. Pharmacol.*,V. 120, P. 1059-1066, 1997.

TOKITA,Y.; NAKAJIMA,K.; MOCHIDA, H.; IHA, M.; NAGAMINE1, T. Development Of A Fucoidan-Specific Antibody And Measurement Of Fucoidan In Serum And Urine By Sandwich ELISA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (2), 350–357, 2010.

VYKHOVANETS, Eugene V. et al. Molecular imaging of nuclear factor- κ B in bladder as a primary regulator of inflammatory response. *The Journal of urology*, v. 187, n. 1, p. 330-337, 2012.

VARKI, A. (1994). Selectin Ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91,7390 – 7397.

VIEIRA, M. M. Et Al. Use Of Dexamethasone With Mesna For The Prevention Of Ifosfamida-Induced Hemorrhagic Cystitis. *International Journal Of Urology*, V. 10, P. 595-602, 2003.

ULICH, T.R.; WHITCOMB, L.; TANG, W.; O'CONNER TRESSEL, P.; TARPLEY, J.; YI, ES.; LACEY, D. Keratinocyte growth factor amelioratescyclophosphamideinduced ulcerative hemorrhagic cystitis. *Cancer Res*, v. 57, n. 3, p. 472-5, 1997.

WAGNER JG, ROTH RA. Neutrophil Migration Mechanisms, With An Emphasis On The Pulmonary Vasculature. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(3):349-74.

WANG,C.C.;WENG,T.I;WU.E.T;WU.M.H Et AL. Involvement of interleukin-6-regulated nitric oxide synthase in hemorrhagic cystitis and impaired bladder

contractions in Young Rats induced by acrolein, a urinary metabolite of cyclophosphamide. *Toxicological Sciences*. V.131.p.302-310, 2013.

WANG, Jing et al. Effect and mechanism of fucoidan derivatives from *Laminaria japonica* in experimental adenine-induced chronic kidney disease. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, n. 3, p. 807-813, 2012.

WANG, Xin et al. Fucoidan attenuates atherosclerosis in LDLR^{-/-} mice through inhibition of inflammation and oxidative stress. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*, v. 9, p. 6896-6904, 2016.

Y. HU, S. C. CHENG, K. T. CHAN Et Al., "Fucoidin Enhances dendritic Cell-Mediated T-Cell Cytotoxicity Against NY-ESO-1-expressing Human Cancer Cells," *Biochemical And Biophysical Research Communications*, Vol. 392, No. 3, Pp. 329–334, 2010.

Y. YAMASAKI, M. YAMASAKI, H. TACHIBANA Et Al., "Important role of β 1-Integrin in Fucoidan-Induced Apoptosis via Caspase-8 activation," *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, Vol. 76, No. 6, Pp. 1163–1168, 2012.

ZAKI EL, SPRINGATE JE, TAUB M. Comparative Toxicity Of Ifosfamide Metabolites And Protective Effect Of Mesna And Amifostine In Cultured Renal Tubule Cells. *Toxicol In Vitro*. 2003;17:397–402. [Pubmed: 12849722]

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

ZHANG, X.W; LIU, Q; THORLACIUS, H. Inhibition Of Selectin Function And Leukocyte Rolling Protects Against Dextran Sodium Sulfate-Induced Murine Colitis. *Scand J Gastroenterol*. V. 36(3), P. 270-5, 2001.

APÊNDICE A – Artigo intitulado neutrophils contribute to the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide.



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp

Neutrophils contribute to the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide



Amílcar Figueiredo Dornelas-Filho^{a,1}, Venúcia Bruna Magalhães Pereira^{a,1},
Deysi Viviana Tenazoa Wong^a, Lívia Maria Soares Nobre^a, Anielle Torres Melo^a,
Camila Meirelles Souza Silva^a, Carlos Wagner Souza Wanderley^a, Mariana Lima Nour^a,
Lis Caetano Nobrega Costa Araújo^a, Renan Oliveira Silva^a, Francisco Maxwell Martins Pinto^a,
Rudy Diavila Bingana^a, Marcellus Henrique Loiola Ponte Souza^b, Nylane Maria Nunes Alencar^a,
Paulo Goberlânio Barros Silva^c, Ana Paula Negreiros Nunes Alves^c,
Paulo Roberto Carvalho Almeida^d, Fernando Queiroz Cunha^c,
Roberto César Pereira Lima-Júnior^{a,*}

^a Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^b Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^c Department of Dental Clinic, Division of Oral Pathology, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^d Department of Pathology and Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^e Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Ifosfamide
Hemorrhagic cystitis
Neutrophils
Fucoidan
Selectins
Granulocyte colony-stimulating factor

ABSTRACT

Ifosfamide (IFO) is an antineoplastic drug that is commonly used to treat gynecological and breast cancers. Hemorrhagic cystitis (HC) is a common side effect associated with IFO injection, which courses with neutrophil accumulation and affects 6–50% of patients depending on dose intensity. Here, we investigated the role of neutrophils in this inflammatory process. Female Swiss mice ($n = 8/\text{group}$) were injected with saline, IFO (400 mg/kg, i.p.), fucoidan (a P- and L-selectins inhibitor, 100 mg/kg, i.v.) or IFO + fucoidan (1–100 mg/kg) alone or combined with mesna (80 mg/kg i.p.). Another group of mice received anti-Ly6G antibody (500 µg/mouse, once daily for 2 days) for neutrophil depletion before IFO injection. In another experimental setting, animals received granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, 400 µg/kg), IFO (200 mg/kg), G-CSF (25–400 µg/kg, for 5 days) + IFO (200 mg/kg, i.p.) or fucoidan + G-CSF + IFO. Bladder injury was evaluated 12 h after IFO injection. IFO 400 mg/kg significantly increased visceral hyperalgesia, bladder edema, hemorrhage, vascular permeability, MPO, IL-1 β and IL-6 tissue levels, and COX-2 immunostaining and expression versus the saline group ($P < 0.05$). Conversely, fucoidan (100 mg/kg) significantly attenuated these parameters compared to IFO-injected mice ($P < 0.05$). Additionally, fucoidan potentiated mesna protective effect when compared with IFO + mesna group ($P < 0.05$). Accordingly, neutrophil depletion with anti-Ly6G reduced inflammatory parameters and bladder injury compared to IFO ($P < 0.05$). In contrast, G-CSF enhanced IFO (200 mg/kg)-induced HC, which was significantly attenuated by treatment with fucoidan ($P < 0.05$). Therefore, neutrophils contribute to the pathogenesis of HC.

1. Introduction

Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis (HC) [1] is a common and limiting side effect in patients undergoing chemotherapy with alkylating agents, such as the oxazaphosphorines ifosfamide (IFO) and

cyclophosphamide. Liver metabolism of these agents produces acrolein, which lacks anticancer activity and accumulates in the bladder, leading to HC development [2]. Patients with HC generally experience complex symptoms known as “LUTS” (lower urinary tract symptoms), which is characterized by dysuria, urinary urgency, nocturia, suprapubic pain

* Corresponding author at: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, 60430-270 Fortaleza, Ceará, Brazil.

E-mail address: robertocesar@ufc.br (R.C.P. Lima-Júnior).

¹ These authors contributed equally to this study.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.031>

Received 26 November 2017; Received in revised form 15 June 2018; Accepted 21 June 2018
1567-5769/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

and microscopic or macroscopic hematuria [1].

The average incidence of HC ranges from 18% to 40% in the absence of adequate uroprotection [3]. Prophylactic measures, including mesna, bladder irrigation and hyperhydration, are not totally capable of blocking inflammatory events as observed in clinical trials and in experimental conditions [4]. Accordingly, patients treated with standard clinical protocol of mesna show bladder mucosa microscopic alterations, such as edema, exocytosis, and hemorrhage in 100% of cases. Cystoscopic alterations are also detected in 66.7% of patients [5]. Patient recipients of preconditioning high-dose chemotherapy during bone marrow transplantation continue to exhibit severe and life-threatening HC, despite the prophylactic use of mesna [6]. Therefore, the elucidation of HC pathogenesis opens novel perspectives for more effective preventive therapeutic strategies.

A number of studies report the involvement of inflammatory mediators in the pathogenesis of HC, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), cyclooxygenase 2 (COX-2), nitric oxide (NO) and platelet activating factor (PAF), which cause edema and hemorrhage [6–14]. These mediators partially contribute to bladder injury via the recruitment of neutrophils, since neutralization of these inflammatory markers reduces neutrophil accumulation in the bladder and the severity of HC [14]. Notably, the use of the chemokine receptor 2 (CXCR2) antagonist SB225002 prevents painful behaviors, bladder inflammation and voiding dysfunction during cyclophosphamide-induced cystitis in rats. Conversely, IL-8, which activates CXCR2, is an important mediator that is necessary for normal urothelial cell organization. Therefore, CXCR2 modulation may negatively impact urothelial survival [15]. Several redundant and versatile mechanisms other than IL-8 contribute to neutrophil migration to sites of inflammation [16], and P- and L-selectins may be attractive targets.

Fucoidan is a highly sulfated polysaccharide containing L-fucose groups [17]. Fucoidan has been proved to inhibit inflammation, coagulation, thrombosis, angiogenesis, cancer, oxidative-stress, nociception, and virus infections [18]. The pharmacological underlying mechanism has been explored. The anticoagulant and antithrombotic activities is associated to the direct inactivation of thrombin in the presence of heparin cofactor II [19]. Additionally, fucoidan is described to inhibit P- and L-selectin with a high affinity by preventing selectin to bind Sialyl Lewis X with a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 20 nM [20].

Up-regulation of selectins on endothelium is a crucial step to initiate neutrophil recruitment. L-selectin is constitutively expressed on circulating leukocytes, while P- and E-selectin are rapidly expressed on the apical endothelial cell membrane after stimulation, where they bind to ligands on neutrophils [21, 22]. Transitory interaction between selectins and their ligands on polymorphonuclear cells leads to neutrophil tethering and rolling, the initial steps of the leukocyte recruitment to the inflammatory site [23]. Consequently, in the presence of fucoidan, both P- and L-selectins are blocked, causing a reduction on leukocyte migration, which abrogates the inflammatory process [24, 25].

Therefore, the role of neutrophils in the pathogenesis of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis was investigated by P- and L-selectins blockade with fucoidan or neutrophil depletion with anti-Ly6G monoclonal antibody.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female Swiss mice weighing 20–25 g ($n = 8$ /group) were housed in the animal facility of the Department of Physiology and Pharmacology/Federal University of Ceará and the School of Medicine of Ribeirão Preto/University of São Paulo, which provided animals with appropriate sanitary conditions. The animals were housed in controlled environmental conditions ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), under a 12/12 h light/dark cycle with food and water available ad libitum. All procedures were

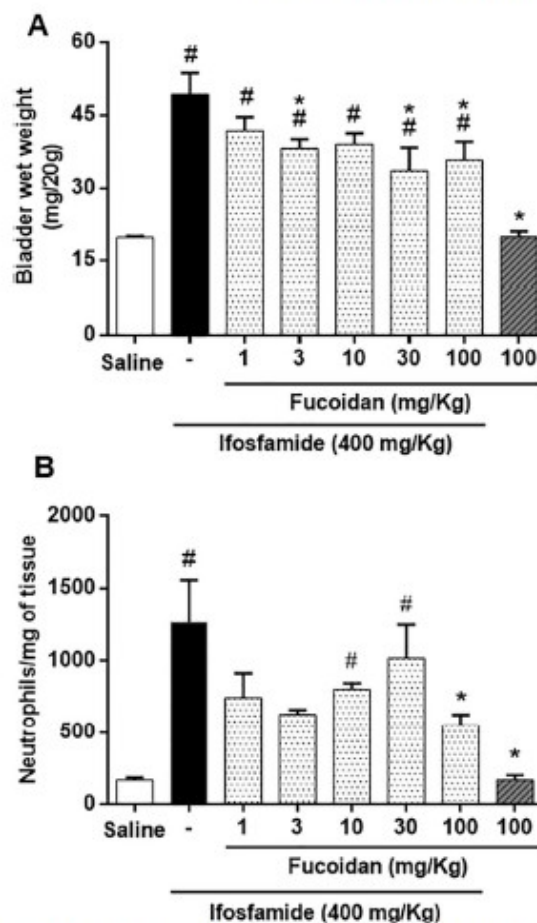


Fig. 1. Fucoidan prevents bladder edema and neutrophil infiltrate during ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. The mice were treated with saline (5 mL/kg i.p.), IFO (400 mg/kg, i.p.), fucoidan (100 mg/kg, i.v.) alone or fucoidan (1, 3, 10, 30 or 100 mg/kg, i.v.) 30 min before IFO. Then, bladders wet weight was measured and the myeloperoxidase activity determined. IFO significantly increased bladder wet weight (A) and neutrophil accumulation (B) compared to the saline group. Fucoidan significantly attenuated these parameters (Panels A and B) compared to the IFO group. The results are reported as means \pm SEM ($n = 8$ /group). [#] $P < 0.05$ vs. saline group (negative control); ^{*} $P < 0.05$ vs. IFO group.

performed in accordance with the NIH guidelines for care and use of laboratory animals. The local Ethics Committee for Animal Experiments approved all procedures (protocol number 83/2014).

2.2. Drugs

Ifosfamide (IFO, Holoxane[®], Baxter, Halle/Westfalen, Germany), Mesna (Mitexan[®], Eurofarma, São Paulo, SP, Brazil), Fucoidan[®] (Fucoidan from *Fucus vesiculosus*, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF, Filgrastim, Genérico Biosintética, São Paulo, SP, Brazil) and anti-Ly6G monoclonal antibody (clone 1A8, catalog BE0075-1, Bio X cell, New Hampshire, USA) were purchased from commercial sources. All drugs were diluted in 0.9% saline.

Table 1
Fucoidan improves macroscopic and microscopic injury during ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis.

Groups	Macroscopic score		Microscopic score
	Edema	Hemorrhage	
Saline	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
IFO (400 mg/kg)	3 (3–3) #	2 (2–3) #	3 (3–3)*
IFO + Fucoidan (1 mg/kg)	2 (0–3)	1 (0–3)	2 (0–3)**
IFO + Fucoidan (3 mg/kg)	1 (0–3)	2 (0–3)	1 (1–2)*
IFO + Fucoidan (10 mg/kg)	2 (1–3)	2 (0–3)	2.5 (1–3)*
IFO + Fucoidan (30 mg/kg)	1.5 (0–3)	1.5 (1–3)	2.5 (1–3)*
IFO + Fucoidan (100 mg/kg)	1 (1–2) *	1 (0–2) *	1 (1–2)**
Mesna + IFO (400 mg/kg)	0.5 (0–3) *	0 (0–2) *	0 (0–0) *
Fucoidan + Mesna + IFO (400 mg/kg)	0 (0–1)*	0 (0–1)*	0 (0–0)*
Fucoidan 100 mg/kg	0 (0–0) *	0 (0–0) *	0 (0–0)*

The results are reported as medians (minimum–maximum) (n = 8 per group) and analyzed using Kruskal-Wallis and Dunn's test. *P < 0.05 vs. saline; #P < 0.05 vs. IFO.

2.3. Ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis model and animal treatment

The animals were randomly allocated into the following experimental groups, each group in separate cages (n = 8/group): saline (5 mL/kg i.p.), ifosfamide (IFO, 400 mg/kg, i.p.), fucoidan (100 mg/kg, i.v.) alone or fucoidan (1, 3, 10, 30 or 100 mg/kg, i.v.) 30 min before IFO injection. Mesna (80 mg/kg, i.p., 30 min. before and 4 h and 8 h after IFO administration) was used as a positive control. The potentiation protocol included the combination of fucoidan (100 mg/kg, i.v., 1 h before IFO injection) and mesna (80 mg/kg, i.p., 30 min. before and 4 h and 8 h after IFO administration). For the neutrophil depletion protocol [26], anti-Ly6G mAb was used (500 µg/mouse, once daily for 2 days). Then, IFO (400 mg/kg) was injected 36 h after the last dose of anti-Ly6G mAb. Efficiency of blood neutrophil depletion was assessed by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) and characterized by positivity of CD11b and Ly6G markers. In a second experimental setting, animals were pretreated with G-CSF (25, 50, 100, 200 or 400 µg/kg, s.c., once daily for 5 days) and received saline (5 mL/kg, i.p.) or IFO (200 mg/kg, i.p.) 1 h after the last dose of G-CSF. The experiments were independently repeated three times to test the accuracy of the results. Treatments were performed either by intravenous or intraperitoneal routes, as detailed above, and were well tolerated by the animals. All groups were deprived of access to water immediately after IFO injection to ensure HC induction. The mice from all experimental groups were killed 12 h after IFO injection and the bladders were harvested for further analyses, as described below.

2.4. Bladder wet weight evaluation

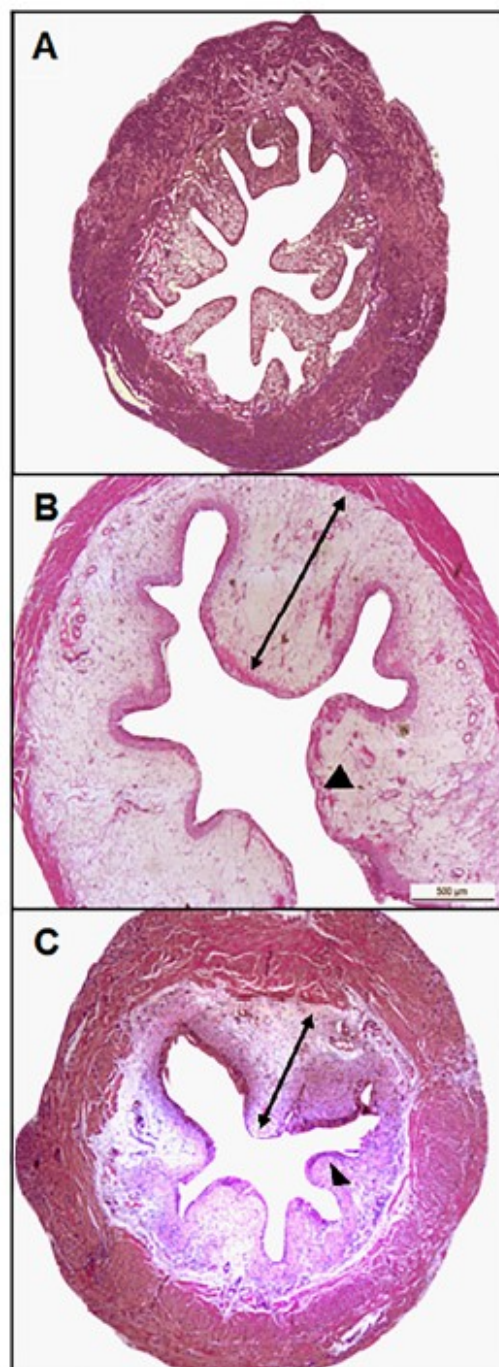
Bladders were dissected, and the remaining urinary content was removed. Bladder wet weight (BWW) was obtained, and the results are expressed in milligrams per 20 g of body weight [mean ± standard error of mean (SEM)].

2.5. Bladder permeability evaluation

Bladder vascular permeability was assessed using Evans' blue dye extravasation, as previously described [9]. Briefly, animals received an intravenous injection of 2.5% Evans' blue dye solution (25 mg/kg) in the retro-orbital plexus 30 min before being killed. Bladders were removed, dissected, and incubated in formalin solution (1 mL/bladder) at 56 °C for 12 h to extract the dye that extravasated to the bladder interstitium. The dye concentration was measured using a spectrophotometer at 630 nm, and the results were plotted on a standard curve. The results are expressed in micrograms of Evans' blue per mg bladder (mean ± SEM).

2.6. Macro and microscopic evaluation

Bladders were carefully examined for macroscopic edema and hemorrhage as follows: normal (0); mild (1+), between normal and



(caption on next page)

Fig. 2. Fucoidan improves microscopic injury during ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. The animals received saline (5 mL/kg i.p.), IPO (400 mg/kg, i.p.) or fucoidan (100, mg/kg, i.v.) 30 min before IPO injection for assessment of histopathological injury. Representative photomicrographs of bladders from saline group (panel A), IPO-injected mice (Panel B) and fucoidan-treated group (Panel C) are presented. The bladders of IPO injected mice displayed extensive area of edema (arrow) and loss of urothelium (arrowheads) (Panel B). Fucoidan prevented the damage, with attenuated edema (arrow) and urothelial preservation (arrowhead). H&E staining, Magnification 40 ×.

moderate; moderate (2+), fluid confined to the internal mucosa; and severe edema (3+), fluid seen externally and internally in the bladder walls. Hemorrhage was scored as follows: normal (0), absence of hemorrhage and vessel dilation; mild (1+), telangiectasia or dilation of bladder vessels; moderate (2+), mucosal hemorrhage; severe (3+), intravesical clots [27].

For microscopic analysis, bladders were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and processed for hematoxylin and eosin staining. Two pathologists (APNNA and PRCA) who were unaware of the treatments analyzed microscopic changes using modified Gray's criteria [28]: Score 0, normal epithelium, no inflammatory cell infiltrate or ulcers; Score 1+, mild loss of epithelial cells, submucosal edema, mild hemorrhage and a few ulcerative sites; Score 2+, moderate mucosal erosion, inflammatory cell infiltrate, fibrin deposition, hemorrhage and multiple ulcerations; and Score 3+, severe mucosal erosion, inflammatory cell infiltrate, fibrin deposition, multiple ulcerations and transmural hemorrhage with severe edema.

2.7. Myeloperoxidase (MPO) assay

MPO activity was measured as a neutrophil marker in inflamed tissues [29]. Briefly, bladders were harvested, homogenized in 0.02 M NaPO₄ buffer (pH 4.7) containing 0.1 M NaCl and 0.015 M Na₂ EDTA, and centrifuged at 800 × g for 15 min at 4 °C. The pellet was subjected to hypotonic lysis (0.2% NaCl solution) followed by a further centrifugation step. The pellet was resuspended in 300 μL of 0.05 M NaPO₄ buffer, pH 5.4, containing 0.5% hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (HTAB, Sigma). MPO activity was developed using the color reagent tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H₂O₂ (0.5 mM). The reaction was stopped with a 2 N H₂SO₄ solution, and the absorbance at 450 nm was determined using a spectrophotometer. Absorbance readings were plotted in a standard curve of neutrophils obtained by the carrageenan-induced peritonitis method, as described below. The isolated neutrophils were processed in the same manner as bladder tissues, and the obtained data are expressed as MPO activity (neutrophils/mg of tissue).

Carrageenan-induced peritonitis assay was used for isolation of neutrophils and construction of a standard curve. Animals were injected with 1 mL of carrageenan (1 mg/mL, i.p.) diluted in sterile saline, and 4 h later the mice were euthanized. The peritoneal cavity was washed with 1.0 mL of sterile phosphate buffered saline (PBS, pH 7.6, composition mmol: NaCl 137, KCl 2.7 and phosphate buffer salts) containing heparin (20 IU/mL). After 30 s of gentle abdominal massage, peritoneal fluid was collected for the quantification of the differential cell count and total number of cells recovered from the lavage. Exudates (50 μL of each sample) were centrifuged at 250 × g for 10 min in a cytospin centrifuge and stained by the May-Grünwald-Giemsa method for the differential cell count. The total cell counts were performed with a Neubauer chamber by light microscopy, after diluting 20 μL of the peritoneal fluid in 180 μL of Turk's solution [30]. Aliquots of 1 × 10⁷ neutrophils/mL of PBS were stored at -70 °C to be used as standard curve in the MPO assay.

2.8. IL-1β and IL-6 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Bladder samples were removed from Swiss mice 12 h after IPO injection and processed to determine interleukin-1β (IL-1β) and

interleukin-6 (IL-6) using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as previously described [31]. Briefly, microtiter plates were coated overnight at 4 °C with an antibody against mouse IL-1 and IL-6 (4 μg/mL, DuoSet ELISA Development Kit, R&D Systems). After blocking the plates, samples were added in duplicate and the standard curve, consisting of purified IL-1 or IL-6, was built in serial dilutions. The plates were incubated at 4 °C for 2 h and washed three times with buffer, and a biotinylated goat anti-mouse antibody (diluted 1:1000 with assay buffer 1% BSA, R&D System, USA) was added to the wells. Plates were incubated at room temperature for 2 h and washed with buffer. Streptavidin-horseradish peroxidase (Streptavidin-HRP) diluted 1:200 (100 μL) was added to each well. A substrate solution (100 μL of a 1:1 mixture of H₂O₂ and tetramethylbenzidine; R&D System, USA) was added, and plates were incubated in the dark at room temperature for 20 min. The enzyme reaction was stopped with 2 N H₂SO₄, and absorbance was measured at 450 nm. The results are expressed as pg/g of tissue and reported as means ± SEM.

2.9. COX-2 immunohistochemistry

COX-2 expression was assessed using immunohistochemistry [9]. Bladder cross-sections (5 μm) were deparaffinized and rehydrated in xylene and graded alcohols. Antigen retrieval was performed, and endogenous peroxidase was blocked (15 min) using 3% (v/v) hydrogen peroxide. Sections were washed in phosphate buffered saline (PBS) and incubated overnight (4 °C) with a primary rabbit anti-mouse COX-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted 1:200 in PBS plus bovine serum albumin (PBS-BSA). The slides were incubated with a biotinylated anti-rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted 1:400 in PBS-BSA. The slides were washed and incubated with an avidin-biotin-horseradish peroxidase conjugate (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, CA, USA) for 30 min, according to the manufacturer's protocol. COX-2 was visualized using the chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Slides were counterstained with Harris's hematoxylin, dehydrated in a graded alcohol series, cleared in xylene and coverslipped. A pathologist (PRCA) blindly scored the staining as follows: 0 = no staining, 1 = weak staining, 2 = moderate staining, 3 = moderate-intense staining and 4 = intense staining.

2.10. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Bladder samples were removed to determine the expression of cyclooxygenase-2 (Cox-2) as describe previously [32]. Total RNA isolation was performed using the Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (Bio-Rad, CA, USA). The yield and quality of total RNA were determined spectrophotometrically at 260 nm and the 260/280 nm ratio, respectively. One microgram of total RNA from the intestinal samples in a final volume of 20 μL was reverse-transcribed into cDNA in the C1000 Touch™ Thermal Cycler system using the iScript™ cDNA synthesis kit from Bio-Rad. Real-time quantitative PCR analysis of the mRNA was performed in an CFX96 Touch™ real-time PCR detection system instrument from Bio-Rad using the iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, CA, USA) as indicated by the manufacturer. All samples were run in duplicate, and the relative mRNA expression level was determined after normalizing all values to β-actin. All samples were evaluated for the dissociation characteristics of the double-stranded DNA during heating (melting curve analysis). The relative gene expression was determined using the 2^{-ΔΔCt} method (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001) with β-actin as the housekeeping gene. The following primer pairs for mouse β-actin and Cox-2 were used: β-actin (Forward - 5'-CATGGAGA AGATCTGGCA-3'; Reverse - 5'-GGTCTTACGGATGCAACG-3') and Cox-2 (Forward - 5'-GTGGAAAAACCTCGTCCAGA-3'; Reverse - 5'-GCT CGGCTTCCA GTAFFAG-3').

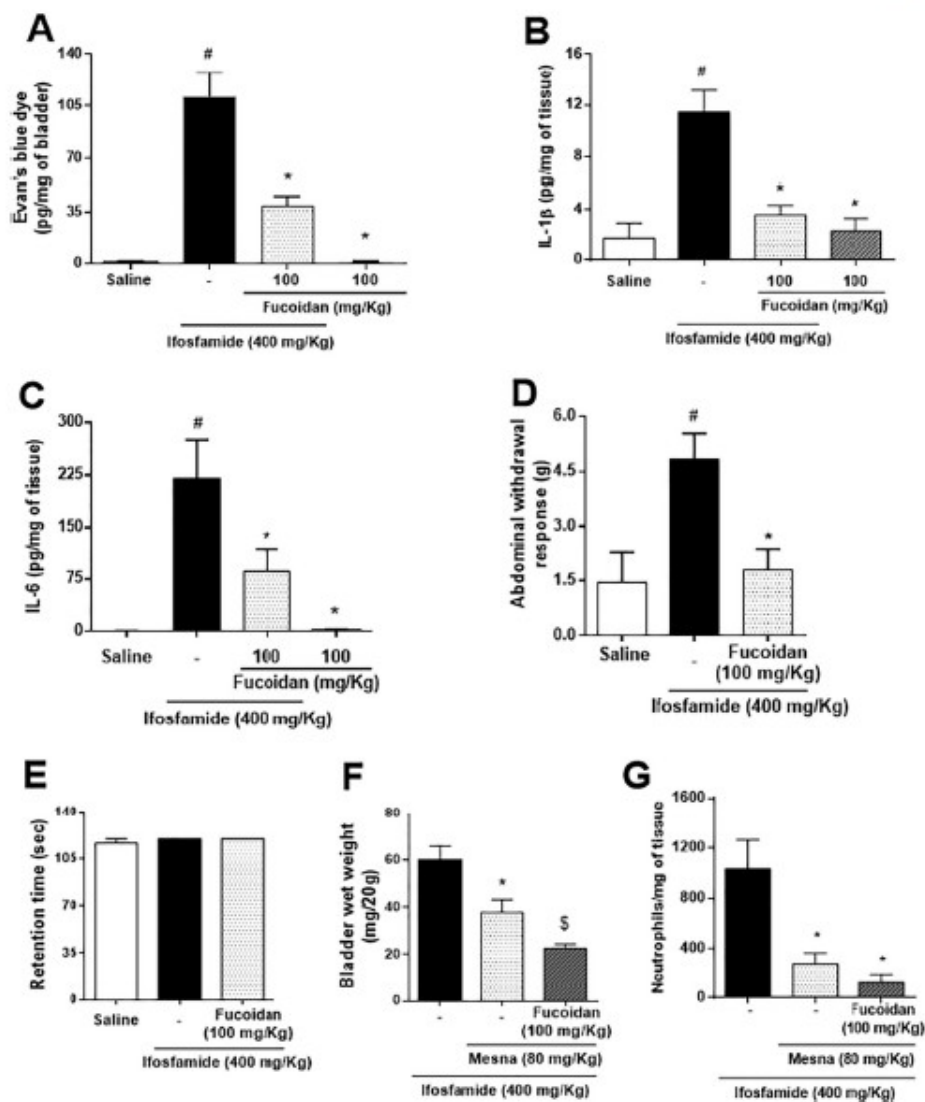


Fig. 3. Fucoidan attenuates inflammation and hyperalgesia and potentiates mesna uroprotection. The mice were treated with saline (5 mL/kg i.p.), IFO (400 mg/kg, i.p.) or fucoidan (100 mg/kg, i.v.) 30 min before IFO. Mesna (80 mg/kg, i.p.) was used as a positive control and administered 30 min before and 4 and 8 h after IFO injection. The animals were euthanized 12 h after IFO and the bladders were collected and processed for permeability assay (A) or detection of IL-1 and IL-6 (B and C). Intensity of hyperalgesia was examined 1 h before and 12 h after IFO administration (D). Alternatively, animals were subjected to rotarod test 12 h after IFO administration (panel E). IFO increased vascular permeability (A), IL-1 β and IL-6 tissue levels (B and C, respectively) compared to the saline group. Fucoidan 100 mg/kg significantly reduced vascular permeability (A) and IL-1 β and IL-6 levels (B and C, respectively) compared to the IFO group. IFO also increased the nociceptive response versus the saline group, which was prevented by fucoidan (100 mg/kg) (D). Saline, IFO or fucoidan injection did not interfere with the normal motor coordination (E). The combination of mesna and fucoidan 100 mg/kg showed a more pronounced reduction in bladder wet weight (F) and issue accumulation of neutrophils (G) compared with the standard protocol based on mesna. The results are reported as means \pm SEM (n = 8 per group). [#]P < 0.05 vs. saline group; ^{*}P < 0.05 vs. IFO group; [§]P < 0.05 vs. mesna.

2.11. Evaluation of sensitivity to mechanical stimulation of the abdomen

Electronic von Frey testing (force transducer with a 0.7 mm² polypropylene tip) was performed to assess visceral nociception after an injection of ifosfamide as previously described [33] and later adapted [34]. The appearance of any of the following behaviors on application

of the tip was considered a withdrawal response: (a) sharp retraction of the abdomen; (b) immediate licking or scratching of site of application of the tip; (c) jumping; or (d) flinching of the hind paw. Care was taken not to stimulate the same point in succession to avoid desensitization. Stimulation in the area of the external genitalia and the lower abdomen was avoided. Nociceptive responses were obtained before animal

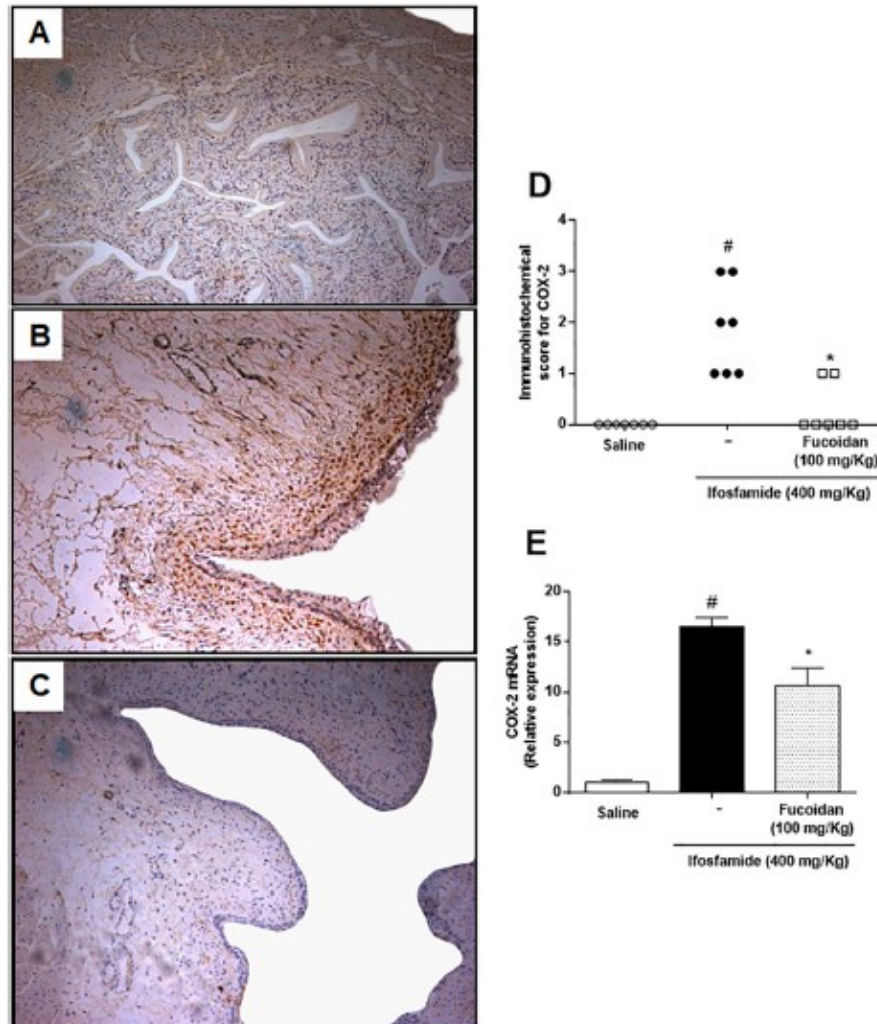


Fig. 4. COX-2 expression is reduced by fucoidan. Animals (n = 7/group) were pretreated with saline (5 mL/kg i.p.), IFO (400 mg/kg, i.p.) or fucoidan (100 mg/kg, i.v.) 30 min before IFO. The mice were euthanized 12 h after IFO injection, and bladders were harvested for COX-2 immunohistochemistry and quantitative real-time measurement of COX-2 mRNA expression. Representative COX-2 immunoeexpression in bladder of animals injected with saline (A). Bladder of an animal injected with IFO, showing extensive immunostaining of urothelium and connective tissue (B). Bladder of an animal pretreated with fucoidan showing a significant reduction in urothelial and mucosal COX-2 immunostaining (C). Semi-quantitative immunostaining quantification of COX-2 (D) and quantitative mRNA expression of the enzyme (E) revealed increased COX-2 in IFO-injected animals, which was prevented by fucoidan (D and E). Semi-quantitative data are expressed as medians (min-max) and analyzed using the Kruskal Wallis test and Dunn's test. Parametric data are expressed as means ± SEM and analyzed using ANOVA and Newman-Keuls post hoc test. *P < 0.05 vs. saline; *P < 0.01 vs. IFO.

treatment (baseline or T0) and 12 h (T1) after the i.p. administration of saline or ifosfamide. The results are expressed in grams for the difference (T0–T1) between the applied forces (mean ± SEM).

2.12. Rota-rod test

The motor coordination test was performed according to a previously described method [35]. The apparatus consisted of a horizontal bar with a diameter of 5 cm, subdivided into four compartments (Insight, RT-2002, Brazil). The mice were placed on the bar rotating at a speed of 4rpm. Animals that were able to remain on the rod longer than 120 s were selected 24h before the test. Each animal was tested on the rota-rod for its

permanency during a 2-min period 12 h after IFO injection.

2.13. Statistical analysis

Data were analyzed using Graph Pad PRISM™ software, version 6.0. The results are expressed as means ± SEM (standard error of the mean) for parametric data or medians (minimum–maximum) for non-parametric data. Statistical analyses between groups were performed using the Student's t-test (flow cytometry data), analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test (parametric data) or Kruskal Wallis test followed by Dunn's test (scores of damage) as appropriate. A P value < 0.05 was considered significant.

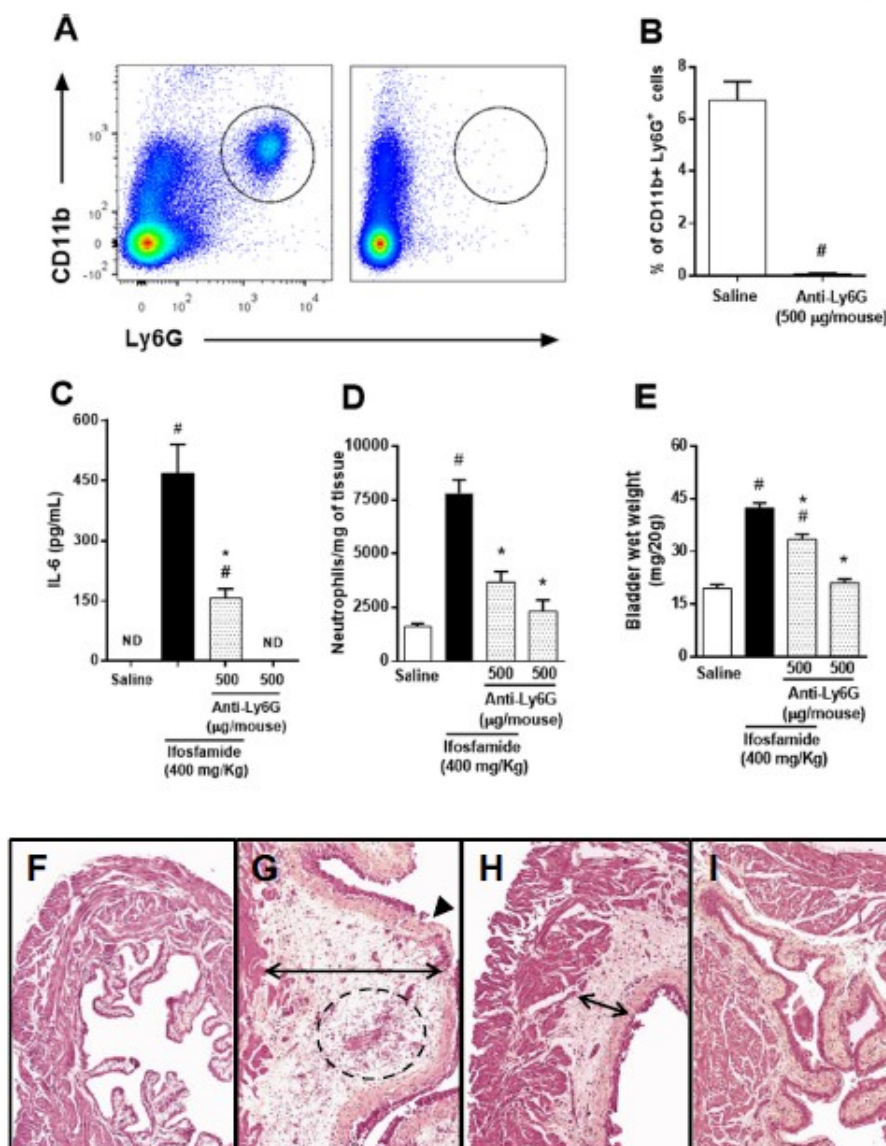


Fig. 5. Anti-Ly6G monoclonal antibody prevents ifosfamide-induced inflammation and tissue damage. Mice were treated with anti-Ly6G (500 µg/mouse) once daily for 2 days and ifosfamide (IFO, 400 mg/kg) was administered 36 h after the last injection of anti-Ly6G for induction of hemorrhagic cystitis. Anti-Ly6G reduced the frequency of neutrophils in peripheral blood (Panels A and B). Neutrophil depletion significantly decreased IL-6 level (C), neutrophil infiltration (D) and bladder wet weight (E) compared with IFO-injected group. Panels F–I depict representative photomicrographs of saline (F), IFO (G), anti-Ly6G + IFO (H) and anti-Ly6G (I). Arrowheads indicate ulcers and mucosal denudation, arrows represent the extension of mucosal edema and dashed line circle denote areas of hemorrhage and inflammation in bladders from IFO-treated animals (Panel G), which are attenuated by anti-Ly6G (Panel H). Data are expressed as means \pm SEM and analyzed with ANOVA and Newman-Keuls post hoc test. Data from B was analyzed using the Student's *t*-test. **P* < 0.05 vs. saline; **P* < 0.01 vs. IFO.

3. Results

3.1. Effect of different doses of fucoidan in bladder wet weight and vesical neutrophil infiltration on ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis

IFO (400 mg/kg, i.p.) significantly increased bladder wet weight by

166% (52 ± 9.5 mg/20 g body weight, Fig. 1A) and neutrophil accumulation (1269 ± 288.3 neutrophils/mg of tissue, Fig. 1B) compared to the saline group (bladder wet weight: 19.6 ± 0.8 ; neutrophil infiltration: 167 ± 17.1 , *P* < 0.05). In addition, fucoidan (3, 30 and 100 mg/kg) significantly attenuated IFO-induced bladder edema by 20%, 32% and 27%, respectively (38.2 ± 1.9 ; 33.5 ± 4.8 ;

Table 2

Anti-Ly6G mAb attenuates macroscopic and microscopic injury during ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis.

Groups	Macroscopic score		Microscopic score
	Edema	Hemorrhage	
Saline	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
IFO 400 mg/kg	3 (2–3) [#]	3 (1–3) [#]	3 (3–3) [#]
IFO + Anti-Ly6G	1 (1–2) [*]	1.5 (1–3)	2 (2–2) [*]
Anti-Ly6G	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)

The results are reported as medians (minimum–maximum) (n = 8 per group) and analyzed using Kruskal–Wallis and Dunn's test. ^{*}P < 0.05 vs. saline; [#]P < 0.05 vs. IFO.

35.8 ± 3.7 mg/20 g body weight, respectively, Fig. 1A) and prevented neutrophil accumulation at the dose 100 mg/kg (552.7 ± 71.9 neutrophils/mg of tissue, Fig. 1B) compared to the IFO group (P < 0.05).

3.2. Fucoidan improved macroscopic and microscopic bladder injury

IFO (400 mg/kg, i.p.) induced significant (P < 0.05) macroscopic (edema: 3[3–3] and hemorrhage: 2[2–3]) and histopathological injury (3[3–3]) compared to the saline group (edema: 0[0–0]; hemorrhage: 0[0–0]; and histopathology: 0[0–0]) (Table 1). Such damage was prevented in animals treated with fucoidan (100 mg/kg) (edema: 1[1–2]; hemorrhage: 1[0–2]; and histopathology: 1[1–2]) compared to IFO (P < 0.05, Table 1). Additionally, microscopic damage was decreased by fucoidan 1 mg/kg (2[0–3]) and 3 mg/kg (1[1–2]) compared to IFO (P < 0.05). All of these parameters were also attenuated by mesna, which was used as a positive control. Similar results were observed in the group treated with the combination of fucoidan (100 mg/kg) and mesna (Table 1). The injection of IFO induced a pronounced edema, loss of epithelial cell lining, hemorrhage and inflammatory infiltrate (Fig. 2B) in contrast to normal saline controls (Fig. 2A). The preventive effect of fucoidan is also depicted in Fig. 2C, which shows mild edema, a preserved epithelial surface and reduced inflammatory infiltration.

3.3. Fucoidan attenuated inflammatory parameters and visceral hyperalgesia

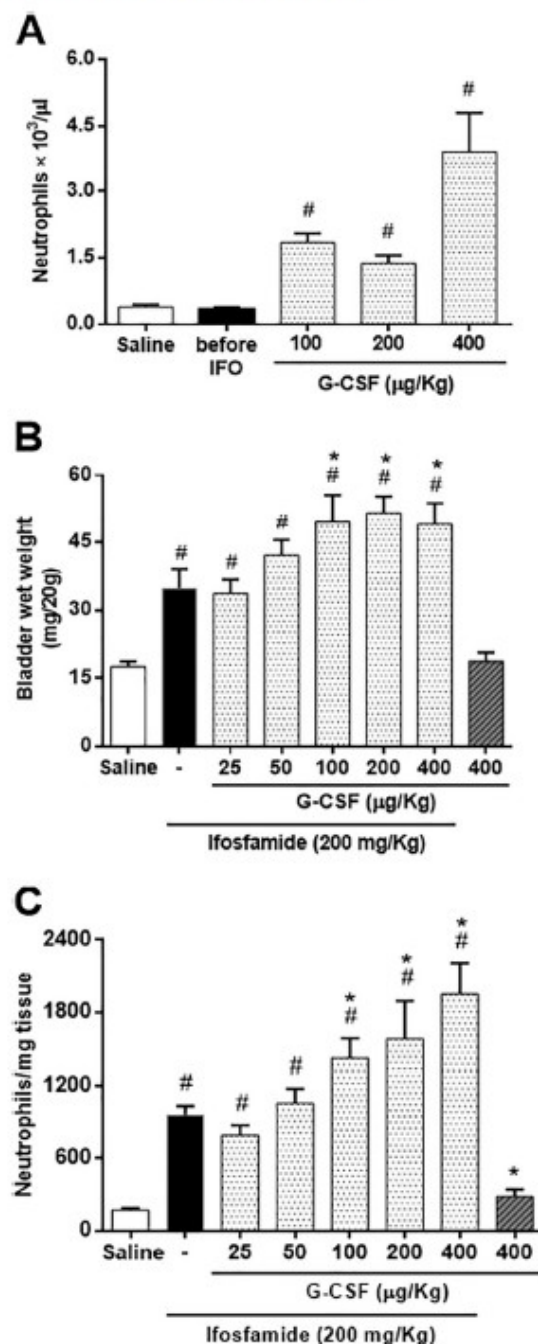
As shown in Fig. 3A, IFO (400 mg/kg, i.p.) significantly increased vascular permeability (111 ± 16.4 µg/mg of tissue) compared to the saline group (0.0 ± 0.0, P < 0.05) and fucoidan significantly (P < 0.05) reduced this parameter compared to the IFO group. IL-1β and IL-6 tissue levels were also significantly increased in the IFO group (11.4 ± 1.7 and 220 ± 55.3 pg/mg, respectively) compared to saline-injected animals (IL-1β: 1.7 ± 1.1 pg/mg and IL-6: 0.7 ± 0.4 pg/mg, Fig. 3B and C, respectively). In addition, fucoidan reduced IL-1β and IL-6 levels (3.6 ± 0.7 and 86 ± 31.3 pg/mg, respectively) versus the IFO group (P < 0.05).

Nociceptive responses were also abrogated in fucoidan treated animals. IFO induced a pronounced increase in hyperalgesia intensity (4.8 ± 0.7 g) compared to the saline group (1.4 ± 0.8 g), and fucoidan prevented (1.8 ± 0.5 g) the nociceptive response compared to the IFO group (P < 0.05) (Fig. 3D). The injection of either saline, IFO or fucoidan did not interfere with normal motor coordination (P > 0.05, Fig. 3E).

Interestingly, as shown respectively in Fig. 3F and G, mesna prevented the increase in bladder wet weight and tissue accumulation of neutrophils (Fig. 3F and G). Such protective effect was potentiated by the association with fucoidan (P < 0.05 vs mesna + IFO, Fig. 3F and G).

IFO significantly increased COX-2 immunostaining (2[1–3], Fig. 4B and D) and the relative expression of COX-2 mRNA (16.55 ± 1.9, Fig. 4E) compared to the saline group (COX-2 immunostaining: 0[0–0],

Fig. 4A and D; and COX-2 mRNA expression: 1.06 ± 0.46, Fig. 4E, P < 0.05). Consistently, with its anti-inflammatory effect, fucoidan reduced COX-2 immunostaining (0[0–1], Fig. 4C and D) and expression (1.064 ± 4.59, Fig. 4E) versus IFO-injected mice.



(caption on next page)

Fig. 6. G-CSF induces neutrophilia and enhances the IFO-induced inflammatory response in the bladder. The animals were treated with saline (5 ml/kg), IFO (200 mg/kg, i.p.) or pretreated with G-CSF (25, 50, 100, 200 or 400 µg/kg, s.c., once daily for 5 days). Animals received saline or ifosfamide (IFO, 200 mg/kg, i.p.) 1 h following the last dose of G-CSF. Blood samples were collected from the retro-orbital plexus, and the total number of circulating neutrophils was quantified, indicating a marked neutrophilia following G-CSF injection (A). Bladder wet weight (B) and the number of infiltrating neutrophils into the bladder (C) were also determined. IFO injection induced a pronounced edema (B) and neutrophil accumulation (C) in the bladder compared to the saline group. G-CSF pretreatment (100, 200 and 400 µg/kg) enhanced these parameters compared to the IFO group (B and C). Data are expressed as means ± SEM and analyzed with ANOVA and Newman-Keuls post hoc test. * $P < 0.05$ vs. saline; ** $P < 0.01$ vs. IFO.

Table 3
G-CSF enhances macroscopic and microscopic injury during ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis.

Groups	Macroscopic score		Microscopic score
	Edema	Hemorrhage	
Saline	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
IFO 200 mg/kg	1.5 (1–3) [#]	1 (1–2) [#]	1 (0–1)
IFO + G-CSF (25 µg/kg)	0.5 (0–1)	1 (0–1)	1 (0–2)
IFO + G-CSF (50 µg/kg)	1 (0–2)	1 (0–3)	1 (0–2)
IFO + G-CSF (100 µg/kg)	2 (1–3) [#]	2 (1–3) [#]	2 (1–2) [*]
IFO + G-CSF (200 µg/kg)	2 (2–3) [#]	2 (1–3) ^{#*}	1.5 (1–2) [*]
IFO + G-CSF (400 µg/kg)	3 (2–3) ^{**}	2 (1–3) ^{**}	2 (1.5–2) [*]
Fucoidan (100 mg/kg) + IFO + G-CSF (400 µg/kg)	1 (0–2) ^{#*}	0.5 (0–3) ^{#*}	0.5 (0–1) ^{#*}
G-CSF (400 µg/kg)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)

Data are reported as medians (minimum–maximum) (n = 8 per group) and analyzed using Kruskal-Wallis and Dunn's test. [#] $P < 0.05$ vs. saline; * $P < 0.05$ vs. IFO; ^{*} $P < 0.05$ vs. IFO + G-CSF 400 µg/kg.

3.4. Neutrophil depletion prevented ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis

Blood samples from mice treated with anti-Ly6G antibody showed reduced neutrophil cell frequency (99% of reduction) versus non-depleted mice (Fig. 5A and B), which contributed to decrease IL-6 levels (156.4 ± 23.7 pg/mL, Fig. 5C), neutrophil infiltration (3688 ± 467.6 neutrophils/mg of tissue, Fig. 5D) and bladder wet weight (33.5 ± 1.4 mg/20 g of body weight, Fig. 5E) in comparison with IFO-injected animals (Fig. 5C: 468.5 ± 72 pg/mL; Fig. 5D: 7817 ± 622.6 neutrophils/mg of tissue; and Fig. 5E: 42.5 ± 1.4 mg/20 g of body weight, respectively). Macroscopic and microscopic parameters of bladder injury were also significantly attenuated in neutrophil-depleted mice (Table 2). Anti-Ly6G alone showed similar basal parameters of saline group ($P > 0.05$, Fig. 5C–E and Table 2). Representative photomicrographs of bladders harvested from animals treated with saline (Fig. 5F), IFO (Fig. 5G), anti-Ly6G plus IFO (Fig. 5H) or anti-Ly6G alone (Fig. 5I) confirmed the reduced tissue injury, edema, hemorrhage and mucosal ulceration in neutrophil-depleted animals.

3.5. G-CSF increased the total number of circulating neutrophils and enhanced IFO-induced bladder wet weight and neutrophil infiltration

To increase the number of circulating neutrophils, G-CSF was injected in different doses. As observed in Fig. 6A, G-CSF (100, 200 and 400 µg/kg, s.c.) increased the total neutrophil count in the bloodstream (369%, 248% and 894%, $P < 0.05$, respectively) compared to the saline group (Fig. 6A). To better investigate whether the increased number of circulating neutrophils would be associated with a worsened bladder injury, the dose of IFO was reduced to produce a mild disease. Interestingly, a low dose of IFO (200 mg/kg, i.p.) increased bladder wet weight (31.3 ± 4.6 mg/20 g of body weight, Fig. 6B), neutrophil

infiltration (961.5 ± 88.5, Fig. 6C), macroscopic and microscopic damage (Table 3) compared to the saline group ($P < 0.01$, Fig. 6B and C and Table 3). Conversely, treatment with G-CSF in doses > 50 mg/kg enhanced bladder wet weight, tissue accumulation of neutrophils, macroscopic and microscopic damage compared to IFO ($P < 0.05$, Fig. 6B and C and Table 3). Representative photomicrographs of enhanced tissue damage associated with G-CSF injection during hemorrhagic cystitis are shown in Fig. 7. Normal bladder, IFO-associated lesion and G-CSF potentiated injury are respectively depicted in Fig. 7A, B and C.

3.6. Fucoidan protected from G-CSF plus ifosfamide-associated bladder damage

G-CSF (400 µg/kg, s.c.) associated with IFO (200 mg/kg, i.p.) enhanced neutrophil migration (1570 ± 224.4 neutrophils/mg of tissue), bladder wet weight (49.3 ± 4.5), microscopic injury and macroscopic scores of edema and hemorrhage (Table 3) compared to IFO (Fig. 8A and B and Table 3, $P < 0.05$), which was attenuated by fucoidan (neutrophil infiltration: 654.1 ± 134.7 neutrophils/mg of tissue; bladder wet weight: 31.0 ± 2.4, Fig. 8A and B and Table 3).

Despite the increased number of neutrophils in the bloodstream after G-CSF injection, there was no infiltration of neutrophils in the small intestine, liver, kidney and bladder in non-deleterious conditions when compared to saline group (Fig. 9A–D).

4. Discussion

This study demonstrated a deleterious role of neutrophils on the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide. Previous studies indicated that bladder injury in hemorrhagic cystitis is characterized by increased bladder wet weight, vascular permeability, macroscopic and microscopic damage, inflammatory cell infiltration, muscle hypo-contraction, and cystometry alterations [7, 9, 14, 36]. There is also evidence of a role for inflammatory markers, such as TNF-α, IL-1β, nitric oxide and several other mediators, in the pathogenesis of hemorrhagic cystitis [6, 14]. Conversely, the function of neutrophils in the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide is not completely understood despite the well-described infiltration of these inflammatory cells during that disease. Therefore, we examined whether the modulation of P- and L-selectins using fucoidan or neutrophil depletion with anti-Ly6G antibody would prevent tissue damage. We verified that fucoidan at 100 mg/kg was the only dose capable of reducing macro and microscopic damage, bladder wet weight and MPO activity. Then, this dose was used for subsequent anti-inflammatory and antinociceptive studies.

The capacity of fucoidan to modulate neutrophil migration was assessed using the MPO assay. Interestingly, pharmacological antagonism of P- and L-selectins prevented neutrophil accumulation in the bladder. These results are consistent with experimental models of asthma, arthritis, acute pancreatitis, and ischemic diseases in which similar approaches were used [24, 37, 38]. Neutrophils contribute to local inflammatory responses via the production of reactive oxygen species (ROS), phagocytosis, extrusion of neutrophil extracellular traps (NETs) [39], and the release of several cytokines, such as TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12, interferon gamma, and macrophage inflammatory protein [40, 41]. Blockade of CXCR2 receptors, which contribute to neutrophil recruitment, prevents neutrophil accumulation and TNF-α and IL-6 production. Therefore, the decrease in neutrophil accumulation in the bladder likely contributed to the lower production of inflammatory markers, such as IL-1β, IL-6 and COX-2, which reduced bladder damage. These findings were consistently confirmed by the depletion of neutrophils with anti-Ly6G monoclonal antibody, which indicates that targeting neutrophils to prevent hemorrhagic cystitis is a potential therapeutic strategy. Although mesna is the standard prophylactic measure for hemorrhagic cystitis, mucosal ulcerations remain

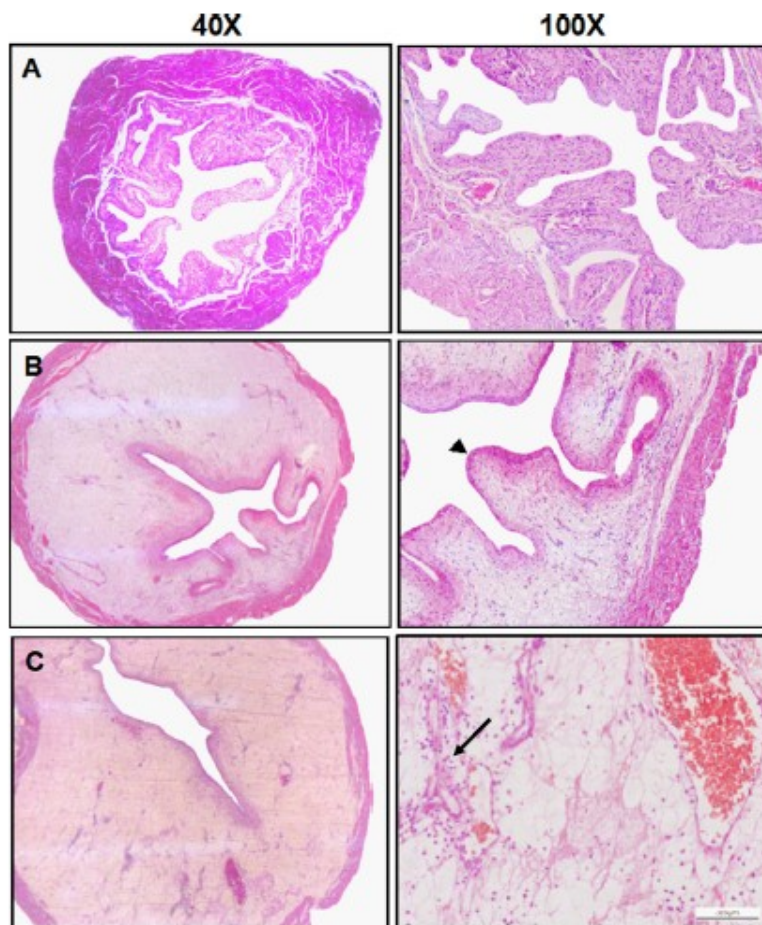


Fig. 7. G-CSF enhances microscopic injury during ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. Representative photomicrographs of bladders harvested from saline (5 mL/kg, i.p., Panel A), Ifosfamide (IPO, 200 mg/kg, i.p., Panel B) or G-CSF (400 μ g/kg) + IPO (200 mg/kg, i.p., Panel C). Arrowhead indicates urothelial layer, and arrows point out leukocyte infiltration. IPO (200 mg/kg) caused a mild to moderate histopathological injury of the bladder compared to saline, while bladders of mice that received G-CSF pretreatment displayed an enhanced damage and neutrophil accumulation compared to the IPO group. H&E staining. Magnification 40 \times (left column) and 100 \times (right column).

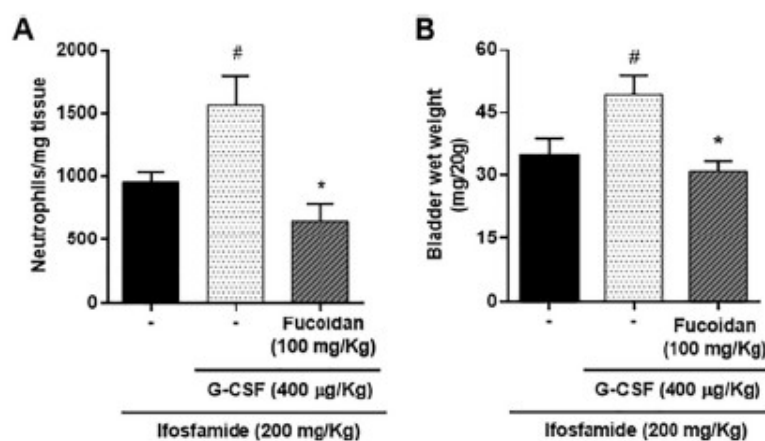


Fig. 8. Fucoidan prevents G-CSF-enhanced bladder inflammation. The animals were treated with ifosfamide (200 mg/kg, i.p.), G-CSF (400 μ g/kg, s.c., once daily for 5 days) + ifosfamide or fucoidan (100 mg/kg, i.v.) + G-CSF + IPO. G-CSF enhanced with IPO-associated neutrophil migration (A) and bladder wet weight (B) compared to IPO injection alone. In addition, fucoidan prevented the increase in both parameters (A and B). Data are expressed as means \pm SEM and analyzed with ANOVA and Newman-Keuls post hoc test. [#] $P < 0.05$ vs. ifosfamide; ^{*} $P < 0.01$ vs. G-CSF + IPO.

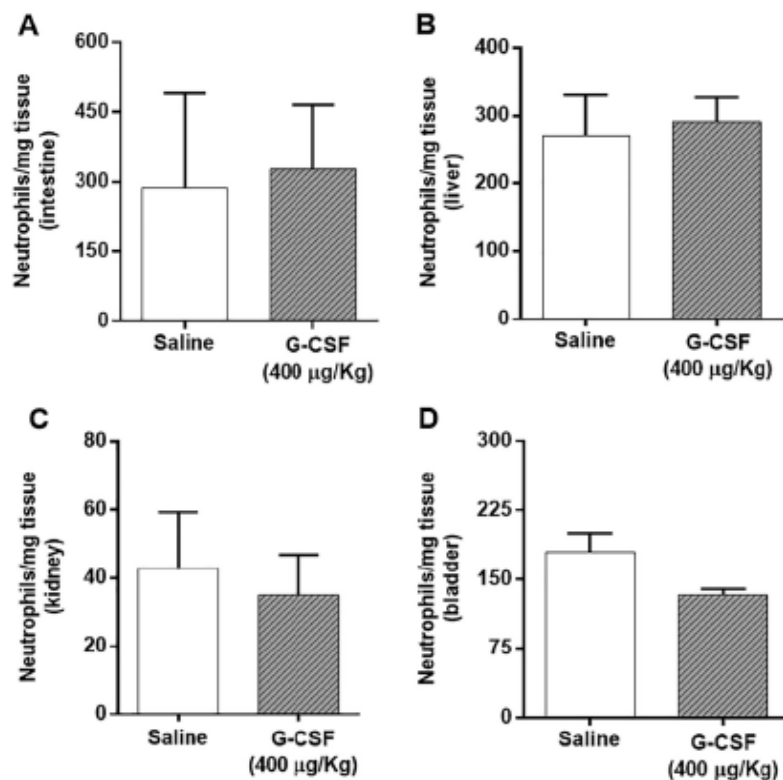


Fig. 9. G-CSF per se does not cause neutrophil infiltration in target organs. The mice received saline (5 mL/kg) or G-CSF (400 µg/kg, s.c., once daily for 5 days). On day 5, the animals were euthanized to investigate neutrophil infiltration in target organs. G-CSF-treated mice showed basal accumulation of neutrophils in the small intestine (A), liver (B), kidney (C) or bladder (D) similarly to that of the saline group ($P > 0.05$). Data are expressed as means \pm SEM and analyzed with Student's *t*-test.

observed by cystometry [5]. Notably, the combination of mesna and fucoidan improved the protection described for each drug, suggesting different complementary protective mechanisms. Therefore, the combination of drugs that target different mechanisms of damage could be a better strategy to prevent the establishment of disease.

The role of IL-1 and IL-6 in hemorrhagic cystitis was reported previously [9, 13, 14]. Increase of IL-6 levels was demonstrated following intravesical acrolein instillation [13]. The same studies also demonstrated that an IL-6-neutralizing serum attenuated several parameters of tissue damage, including bladder wet weight and histopathological injury, reversed detrusor muscle hypocontractility and reduced iNOS protein expression [9, 13]. A significant decrease in bladder wet weight of animals treated with an anti-IL-1 serum and reduced iNOS expression was also reported [9]. More recently, targeted inhibition of IL-1 receptors was demonstrated to attenuate hemorrhage, edema, neutrophil infiltration, visceral hyperalgesia and bladder dysfunction in ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis, which confirmed the deleterious role of IL-1 [14]. Taken together, these results reinforce our findings of the contribution of neutrophils in orchestrating tissue injury.

Noteworthy, fucoidan also abrogated hyperalgesia. Neutrophils are associated with hyperalgesia in a carrageenan-induced paw edema animal model, and fucoidan injection prevents nociceptive responses [42]. Furthermore, fucoidan was demonstrated to reduce the production of hyperalgesic prostaglandins, which suggests that neutrophils are an important source of these lipid mediators [42]. Several studies demonstrated that visceral hyperalgesia accompanies the experimental

hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide or ifosfamide [34, 41, 43, 44], and COX-2 is significantly overexpressed during bladder injury [45, 46]. Therefore, we propose that the modulation of neutrophil migration contributes to the control of hyperalgesia during hemorrhagic cystitis, likely via the reduction of COX-2-derived prostaglandin production. We also demonstrated that the antihyperalgesic effect of fucoidan was not a false-positive response, since animal motor coordination remained unaltered. The rota-rod test confirms that the animals' capacity of responding to nociceptive stimuli in the von Frey test is not affected by the treatment received, which could cause animal sedation or impairment of neuronal transmission.

Considering that the modulation of neutrophil migration prevented the establishment of hemorrhagic cystitis, we examined whether the increase in neutrophil accumulation would potentiate bladder damage. Animals were injected with G-CSF, which is clinically used in oncology to recover the bone marrow capacity to produce granulocytes and release them into the bloodstream during chemotherapy-induced neutropenia. Considering that IPO at the dose of 400 mg/kg induces a severe form of hemorrhagic cystitis, the dose was strategically reduced to 200 mg/kg to cause a mild to moderate disease and to better characterize whether increased number of circulating neutrophils would contribute to enhance tissue injury. Treatment with G-CSF led to a pronounced rise in blood neutrophils and the accumulation of these cells in the bladder, which potentiated edema formation during hemorrhagic cystitis. Accordingly, the pro-inflammatory role of G-CSF in the pathogenesis of inflammatory arthritis was previously described,

since G-CSF promotes neutrophil trafficking into inflamed joints [47, 48]. Notably, G-CSF knockout animals or G-CSF-neutralizing antibody-treated wild-type mice are protected from damage [47, 48].

The first steps of neutrophil rolling are mediated by the interaction between P-selectin on endothelial cells and Sialyl-Lewis X (SLe^x) glycoproteins on neutrophils, followed by binding of neutrophil L-selectin to its respective endothelial ligands, PNA^d and MAdCAM-1 [49, 50]. G-CSF administration in healthy volunteers is found to increase the expression of SLe^x on neutrophils, which remains up-regulated after the end of G-CSF treatment, contributing to enhance neutrophil rolling [50]. Accordingly, the deleterious effect of G-CSF administration on ifosfamide-induced HC was attenuated by fucoidan treatment, which reinforces the fucoidan capacity to prevent selectin binding to SLe^x. Remarkably, G-CSF injection caused no accumulation of neutrophils in target organs, including bladder, kidney, intestine and liver. It indicates that in the absence of a deleterious stimulus, such as ifosfamide that damages the bladder, G-CSF is not able to induce neutrophil migration and tissue injury by itself. It is reasonable to infer that acrolein, an urotoxic metabolite of ifosfamide, breaks the epithelial cell lining, exposing the connective tissue to urine and bacteria, which triggers the local release of inflammatory mediators and leukocyte recruitment. Eventually, these cells contribute to bladder injury and hemorrhagic cystitis [6]. In our opinion, the positive feedback inflammatory loops make neutrophils as a critical active player in the establishment of the disease.

5. Conclusions

Therefore, these results suggest that neutrophils contribute to the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide. In addition, P- and L-selectins are promising targets to prevent the deleterious effect of neutrophils in chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis.

Acknowledgments

We are grateful to Maria Silvandira Freire for her technical assistance. This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number: 310568/2017-0) and FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico, grant number: PR2-0101-00054.01.00/15). RCPLJ is a CNPq research fellow.

Conflicts of interest

The authors declare they do not have any financial, personal, or professional interests to disclose.

References

- B. Moy, Cystitis in patients with cancer, UpToDate, 2018 <https://www.uptodate.com/contents/cystitis-in-patients-with-cancer>, Accessed date: 20 May 2018.
- F.S. Phillips, S.S. Sternberg, A.P. Cronin, P.M. Vidal, Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity, *Cancer Res.* 21 (1961) 1577–1589.
- M.L. Hensley, L. Schuchter, C. Lindley, N. Meropol, G. Cohen, G. Broder, W. Gradishar, D. Green, R. Langdon, R.B. Mitchell, R. Negtin, T. Saatzowski, J.T. Thigpen, D. Vonhoff, T. Wasserman, E. Winer, D. Pfister, American society of clinical oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants, *J. Clin. Oncol.* 17 (1999) 3333–3355, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.1999.17.10.3333>.
- M.M. Morais, J.N. Belarmino-Filho, G.A.C. Brito, R.A. Ribeiro, Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis - comparison of the effects of dexamethasone and Mesna, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (1999) 1211–1215, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1999001000006>.
- M.V.A. Lima, F.V. Ferreira, F.Y.B. Macedo, G.A. De Castro Brito, R.A. Ribeiro, Histological changes in bladders of patients submitted to ifosfamide chemotherapy even with mesna prophylaxis, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 59 (2007) 643–650, <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-006-0307-5>.
- R. Ribeiro, R. Limajunior, C. Leite, J. Mota, F. Macedo, M. Lima, G. Brito, Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis pathogenesis, pharmacological approaches and new insights, *J. Exp. Integr. Med.* 2 (2012) 95, <http://dx.doi.org/10.5455/jaim.080312.ir.010>.
- T.N.A. Gomes, C.C. Santos, M.V.P. Souza-Filho, F.Q. Cunha, R.A. Ribeiro, Participation of TNF- α and IL-1 in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis, *Braz. J. Med. Biol. Res.* (1995) 1103–1108.
- M.V. Souza-Filho, M.V. Lima, M.M. Pompeu, G. Ballega, F.Q. Cunha, R.D.A. Ribeiro, Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis, *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 247–256.
- R.A. Ribeiro, H.C. Freitas, M.C. Campos, C.C. Santos, F.C. Figueiredo, G.A.C. Brito, F.Q. Cunha, Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice, *J. Urol.* 167 (2002) 2229–2234, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)65134-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(05)65134-8).
- A. Korkmaz, S. Oter, S. Dovedi, T. Topal, S. Sadir, H. Bilgic, Involvement of nitric oxide and hyperbaric oxygen in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats, *J. Urol.* 170 (2003) 2498–2502, <http://dx.doi.org/10.1097/01.ju.0000085593.31396.d8>.
- S. Oter, A. Korkmaz, E. Oztas, I. Yildirim, T. Topal, H. Bilgic, Inducible nitric oxide synthase inhibition in cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats, *Urol. Res.* 32 (2004) 185–189, <http://dx.doi.org/10.1007/s00240-003-0398-y>.
- F.Y.B. Macedo, F. Baltazar, P.R.C. Almeida, F. Távora, F.V. Ferreira, F.C. Schmitt, G.A.C. Brito, R.A. Ribeiro, Cyclooxygenase-2 expression on ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134 (2008) 19–27, <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-007-0237-6>.
- C.C. Wang, T.L. Wang, E.T. Wu, M.H. Wu, R. Sen Yang, S.H. Liu, Involvement of interleukin-6-regulated nitric oxide synthase in hemorrhagic cystitis and impaired bladder contractions in young rats induced by acrolein, a urinary metabolite of cyclophosphamide, *Toxicol. Sci.* 131 (2013) 302–310, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/dfs270>.
- C.A.V.G. Leite, V.T.L. Alencar, D.L.R. Melo, J.M.S.C. Mota, P.H. Melo, L.T.C. Mourão, D.V.T. Wong, P.J.C. Magalhães, A.A. Santos, G.A.C. Brito, R.C.P. Lima-Junior, F.Q. Cunha, R.A. Ribeiro, Target inhibition of IL-1 receptor prevents ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice, *J. Urol.* 194 (2015) 1777–1786, <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2015.07.088>.
- S. Tseng-Rogenold, M. Liebert, Interleukin-8 is essential for normal urothelial cell survival, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 297 (2009) F816–F821, <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.90733.2008>.
- S. Nourshargh, R. Alon, Leukocyte migration into inflamed tissues, *Immunity* 41 (2014) 694–707, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>.
- L. Chollet, P. Saboural, C. Chauvierre, J.N. Villemin, D. Létourneur, F. Chaubet, P. Laurénzo, Fucoidans in nanomedicine, *Mar. Drugs* 14 (2016), <http://dx.doi.org/10.3390/md14080145>.
- A. Cumashi, N.A. Ushakova, M.E. Preobrazhenskaya, A. D'Incecco, A. Piccoli, L. Totani, N. Tlari, G.E. Morozovitch, A.E. Berman, M.I. Bilan, A.I. Usov, N.E. Ustyuzhanina, A.A. Grachev, C.I. Sanderson, M. Kelly, G.A. Rabinovitch, S. Jacobelli, N.E. Nikanov, A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds, *Glycobiology* 17 (2007) 541–552, <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwm014>.
- B. Li, F. Lu, X. Wei, R. Zhao, Fucoidan: structure and bioactivity, *Molecules* 13 (2014) 1674–1695, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules13081671>.
- L. Bachevalier, I. Bertholon, D. Lavigne, R. Vaary, M. Jandrot-Pearus, F. Chaubet, D. Létourneur, Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets, *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* 1790 (2009) 141–146, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.10.008>.
- R. Petri, M. Phillips, P. Kubas, The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective, *J. Immunol.* 180 (2008) 6439–6446, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6439>.
- D.C. Bullard, L. Qin, I. Lorenza, W.M. Quinlan, N.A. Doyle, R. Bosse, D. Verweber, C.M. Doerschuk, A.L. Beaudet, P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal in pulmonary alveoli, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 1782–1788, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI117856>.
- K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky, S. Nourshargh, Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 678–689, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2156>.
- M. Shimooka, M. Ikeda, T. Iida, N. Tamaki, I. Yoshida, T. Honda, Fucoidan, a potent inhibitor of leukocyte adhesion, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153 (1996) 307–311, <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.153.1.8542135>.
- V.H. Pom in, Fucanomics and galactanomics: marine distribution, medicinal impact, concepts, and challenges, *Mar. Drugs* 10 (2012) 793–811, <http://dx.doi.org/10.3390/md10040793>.
- P. Conde, M. Rodriguez, W. Van Der Touw, A. Jimenez, J. Miller, M. Brahmachary, H. Chen, P. Boros, T.J. Yun, P. Riquelme, A. Rastrojo, B. Aguado, HHS Public Access 42 (2015) 1143–1158, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.009>.DC SIGN.
- K.J. Gray, U.H. Engelmann, E.H. Johnson, I.J. Fishman, Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (cytoxan) therapy, *J. Urol.* 136 (1986) 497–500, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)44929-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(17)44929-9).
- J.P. Martins, R.B.M. Silva, R. Coutinho-Silva, C.M. Takiya, A.M.O. Barnastini, F.R. Morzone, M.M. Campos, The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mice, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 183–196, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01535.x>.
- J.C. Alves-Filho, A. De Freitas, M. Russo, F.Q. Cunha, Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis, *Crit. Care Med.* 34 (2006), <http://dx.doi.org/10.1097/01.CCM.0000198527.71819.E1>.
- T.S.F. Saleh, J.B. Calixto, Y.S. Medeiros, Anti-inflammatory effects of theophylline,

- cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy, *Br. J. Pharmacol.* 118 (1996) 811–819, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15472.x>.
- [31] M.L.P. Melo, G.A.C. Brito, R.C. Soares, S.B.L.M. Carvalho, J.V. Silva, P.M.G. Soares, M.L. Vale, M.H.L.P. Souza, F.Q. Cunha, R.A. Ribeiro, Role of cytokines (TNF- α , IL-1 β and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 61 (2008) 775–784, <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-007-0534-4>.
- [32] D.V.T. Wong, R.C.P. Lima-Júnior, C.R.M. Carvalho, V.F. Borges, C.W.S. Wanderley, A.X.C. Ben, C.A.V.G. Leite, M.A. Teixeira, G.L.P. Batista, R.L. Silva, T.M. Cunha, G.A.C. Brito, P.R.C. Almeida, F.Q. Cunha, R.A. Ribeiro, L. Alexopoulos, The adaptor protein Myd88 is a key signalling molecule in the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis, *PLoS One* 10 (2015), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0139985>.
- [33] J.M.A. Laird, L. Martínez-Caso, E. García-Nicas, F. Cerveto, A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse, *Pain* 92 (2001) 335–342, [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00275-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00275-5).
- [34] L.M.S. Pereira, R.C.P. Lima-Júnior, A.X.C. Ben, C.G. Teixeira, L.S. Grassi, R.P. Medeiros, R.D. Marques-Neto, R.B. Callado, K.S. Aragão, D.V.T. Wong, M.L. Vale, G.A.C. Brito, R.A. Ribeiro, Blockade of TRPA1 with HC-030031 attenuates visceral nociception by a mechanism independent of inflammatory resident cells, nitric oxide and the opioid system, *Eur. J. Pain (United Kingdom)* 17 (2013) 223–233, <http://dx.doi.org/10.1002/j.1532-2149.2012.01777.x>.
- [35] J.L. Maia, R.C.P. Lima-Júnior, C.M. Melo, J.P. David, J.M. David, A.R. Campos, F.A. Santos, V.S.N. Rao, Oleoic acid, a pentacyclic triterpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: possible mechanisms, *Pharmacol. Res.* 54 (2006) 282–286, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2006.06.003>.
- [36] C.K.L.P. Batista, G.A.C. Brito, M.L.P. Souza, B.T.A. Leitão, F.Q. Cunha, R.A. Ribeiro, A model of hemorrhagic cystitis induced with acrolein in mice, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39 (2006) 1475–1481, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2006001100011>.
- [37] M.H.L.P. Souza, L.E.A. Troncon, F.Q. Cunha, R.R. Oliveira, Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36 (2003) 1383–1390, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2003001000015>.
- [38] L.G. Pinto, T.M. Cunha, S.M. Vieira, H.P. Lemos, W.A. Verril, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice, *Pain* 148 (2010) 247–256, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2009.11.006>.
- [39] S. Nourshargh, S.A. Renshaw, B.A. Imhof, Reverse migration of neutrophils: where, when, how, and why? *Trends Immunol.* 37 (2016) 273–286, <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.03.006>.
- [40] O. Cepielá, M. Ostafin, U. Demkow, Neutrophils in asthma—a review, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 209 (2015) 13–16, <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.004>.
- [41] F.N. Dornelles, E.L. Andrade, M.M. Campos, J.R. Galvão, Role of CXCR2 and TRPV1 in functional, inflammatory and behavioural changes in the rat model of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 452–467, <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12467>.
- [42] T.M. Cunha, W.A. Verril, L.R. Schivo, M.H. Napimoga, C.A. Parada, S. Poole, M.M. Teixeira, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception, *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008) 824–832, <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0907654>.
- [43] R.C.P. Lima-Júnior, D.L.M. Sousa, G.A.C. Brito, G.M. Cunha, M.H. Chaves, V.S.N. Rao, F.A. Santos, Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant terpenes, α , β -myrrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK1-receptors, and K⁺ATP channels, *Inflamm. Res.* 56 (2007) 487–494, <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-007-7023-4>.
- [44] T. Miki, M. Matsumami, S. Nakamura, H. Okada, H. Matsuya, A. Kawabata, ONO-8130, a selective prostaglandin EP1 receptor antagonist, relieves bladder pain in mice with cyclophosphamide-induced cystitis, *Pain* 152 (2011) 1373–1381, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.02.019>.
- [45] F.Y.B. Macedo, F. Balzaar, L.C. Mourão, P.R.C. Almeida, J.M.S.C. Mos, F.C. Schmitt, R.A. Ribeiro, Induction of CDX-2 expression by acrolein in the rat model of hemorrhagic cystitis, *Exp. Toxicol. Pathol.* 59 (2008) 425–430, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2007.10.010>.
- [46] F.Y.B. Macedo, L.T.C. Mourão, R.C. Palheta, D.M. Juci, R.C.P. Lima, J. De Sá, C. Neto, P.J.C. Magalhães, A.A. Santos, M.H.L.P. Souza, G.A.C. Brito, R.A. Ribeiro, Cyclooxygenase 2 contributes to functional changes seen on experimental hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide in rat urinary bladder, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67 (2011) 935–943, <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-010-1392-z>.
- [47] K.E. Lawlor, I.K. Campbell, D. Metcalf, K. O'Donnell, A. van Nieuwenhuijze, A.W. Roberts, I.P. Wicks, Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 11398–11403, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404328101>.
- [48] J.L. Eyles, M.J. Hickey, M.U. Norman, B. A. Groler, A.W. Roberts, S.F. Drake, W.G. James, D. Metcalf, I.K. Campbell, I.P. Wicks, A key role for G-CSF-induced neutrophil production and trafficking during inflammatory arthritis, *Blood* 112 (2008) 5193–5201, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-02-139535>.
- [49] R. Sackstein, The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm, *Curr. Opin. Hematol.* 12 (2005) 444–450, <http://dx.doi.org/10.1097/01.moh.0000177827.78280.79>.
- [50] A. Ohsaka, K. Saito, In vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor increases the surface expression of Sialyl-Lewis^x on neutrophils in healthy volunteers, *Acta Haematol.* 100 (1998) 187–190.