

CARACTERIZAÇÃO DO MODELO INFLAMATÓRIO DE CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS SWISS

SILVA JUNIOR, Raimundo N.C.¹

FIALHO, Eder M.S.²

ASSUNÇÃO, Anne Karine M.³

MACHADO, Joleen L.³

ARRUDA, Diego⁴

FURTADO, Pablo Gustavo R.⁵

GONÇALVES FILHO, Antonio⁶

NASCIMENTO, Flavia Raquel F.^{6*}

Resumo: A Cistite Hemorrágica é um problema de saúde importante no mundo causado pelo uso da oxazoforinas. Apesar dos tratamentos disponíveis, há uma incidência de 2 até 40% em pacientes tratados com Ciclofosfamida (CYP). O objetivo deste trabalho foi caracterizar um modelo experimental de cistite induzida por CYP em camundongos Swiss. Para isto, camundongos fêmeas foram distribuídos em 5 grupos com 7 animais, onde 4 grupos sofreram eutanásia após 0,5, 6, 12 e 24h da aplicação de 150mg/kg de CYP via intraperitoneal. O grupo controle recebeu salina tamponada pela mesma via. Foram avaliados o peso da bexiga e seu aspecto histopatológico, o hemograma, e a contagem celular de medula óssea e linfonodo ilíaco. Os resultados demonstraram que houve aumento significativo do peso da bexiga nos tempos de 6 e 12h. Houve aumento na inflamação aguda nestes dois tempos. Após 24 horas houve diminuição da resposta inflamatória aguda e início da fibrose. O número de leucócitos foi menor em todos os tempos em relação ao controle. Da mesma forma, o número de células da medula óssea foi menor nos tempos de 6, 12 e 24h. Por outro lado, o número de células do linfonodo aumentou após 12 horas. Concluímos que houve aumento progressivo da inflamação até as 12h e que após 24h já há um processo de resolução do quadro inflamatório. Sendo assim, sugerimos a utilização do tempo de 12h como padrão experimental por ser o de maior disponibilidade de parâmetros elevados para avaliação da inflamação.

Descritores: Cistite; Ciclofosfamida; Camundongo; Modelo experimental.

Abstract: Characterization of cyclophosphamide-induced cystitis inflammatory model in Swiss mice. The Hemorrhagic Cystitis (HC) is an important health problem over the world caused by oxazoforines. Despite the available treatments, still have an incidence of 2 to 40% of HC in patients following treatment with Cyclophosphamide (CYP). The aim of this work was characterize a model of CYP-induced cystitis in Swiss mice. Female mice were divided in 5 groups with 7 animals each, 4 groups were killed 0.5, 6, 12 and 24h after an injection of CYP (150mg/kg). The control group received phosphate buffered saline at the same way. In each time the bladders were collected, weighted and prepared to histopathology analyses. The complete blood count was evaluated. The cell number from lymph nodes and bone marrow was quantified. The results showed that bladder weight was increased at 6th and 12th hour pos cystitis induction. There was acute inflammation increased after 6 and 12h. After 24h there was an initial fibrosis. The leucocytes count was decreased in all times. The cells number was decreased at 6th, 12th, and 24th hours in bone marrow and it was increased at 12th in lymph nodes. We concluded that there is an increase in inflammatory parameters until the 12th hour pos CYP injection which are decreased at 24th hour. We suggest using the time of 12h as the standard experimental time because of the biggest availability parameters for evaluating.

Descriptors: Cyclophosphamide; Cystitis; Mice; Experimental model.

¹ Graduando de medicina da Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

² Doutorando em Patologia Experimental, Fiocruz-BA.

³ Doutorandas em Clínica Médica, USP.

⁴ Mestre em Ciências da Saúde.

⁵ Doutor em Patologia.

⁶ Professores doutores da UFMA.

INTRODUÇÃO

A ciclofosfamida (CYP) é um agente alquilante de DNA do tipo mostarda nitrogenada que faz parte do grupo das oxazoforinas. Os agentes alquilantes foram sintetizados no século 19 e classificados como agentes de guerra química até por volta da Segunda Guerra Mundial, quando Gilman, Goodman e T.F. Dougherty iniciaram os estudos de sua ação citotóxica sobre os tecidos linfoides inaugurando a era da moderna terapia do câncer²⁵.

A CYP, que foi sintetizada pela primeira vez em 1954 por Friedman e Seligman¹⁴, é hoje o agente alquilante mais utilizado no mundo. É um composto que pode ser usado por via intravenosa ou, sendo bem absorvido, por via oral. Uma vez na circulação, ela necessita de ativação bioquímica pelo citocromo P450 no fígado onde logo após é clivada em mostarda de fosforamida, responsável pelos efeitos desejados, e acroleína. Sua ação é citotóxica a todos os tipos celulares, mas atua preferencialmente e de forma acentuada em tecidos de proliferação rápida como elementos da medula óssea e mucosa intestinal. Apesar de não estar claro o mecanismo de citotoxicidade da CYP, sabe-se que é secundário à ação danosa ao DNA⁸.

A utilização da CYP vem crescendo desde seu lançamento como Endoxan® e Procytox® na década de 60⁴¹. Já em 1995 era utilizada por aproximadamente 500.000 pessoas por ano no mundo⁵¹. A CYP é hoje utilizada clinicamente como antineoplásico em uma variedade de cânceres incluindo linfomas, mielomas, leucemia, micose fungóide, neuroblastoma, adenocarcinoma, retinoblastoma, e carcinoma de mama⁶. É utilizada também como imunossupressor em transplantes e doenças reumáticas como artrite reumatóide, granulomatose de Wegener e síndrome nefrótica⁹.

Os principais efeitos tóxicos dose-dependentes da CYP são: a aplasia medular, sendo que tem menor efeito sobre o número de plaquetas em relação aos outros agentes alquilantes, a esterilidade, o linfoma e a leucemia, podendo afetar até 5% dos pacientes^{32,33}, a neoplasia de bexiga⁵, a ulceração da mucosa oral e a desnudação intestinal, a alopecia acentuada, há casos de fibrose pulmonar e a doen-

ça venoclusiva do fígado, a toxicidade no Sistema Nervoso Central, representada por náuseas e vômitos⁸ e, finalmente, e não menos importante, a cistite hemorrágica estéril, que ocorre em aproximadamente 4% dos casos tratados por via intravenosa³⁷. É também uma medicação com alta morbidade ocupacional⁴² e potencial teratogênico⁵³.

A cistite induzida por CYP é causada pela excreção renal de urina contendo um de seus metabólitos, a acroleína, que é tóxica. Por ser um reservatório, a bexiga urinária pode sofrer danos porque fica mais tempo em contato com a acroleína, presente na urina já a partir de 30 minutos após aplicação intravenosa da CYP. Essa deposição gera a expressão de mediadores inflamatórios tais como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 6 (IL-6) e Ciclooxigenase tipo 2 (COX-2)⁴⁴ e causa edema, dilatação vascular e incremento da fragilidade capilar na mucosa da bexiga, levando à hemorragia³⁸ comumente dentro das primeiras 48h. Em casos crônicos, a fibrose progressiva de parede vesical leva a uma diminuição da capacidade de armazenamento da bexiga, que se torna pequena, fibrótica e não continente³⁶.

A irritação causada pela acroleína gera também incremento das contrações reflexas da bexiga em ratos, levando ao aumento da frequência urinária e urgência miccional¹⁷, além de dor, referida em humanos, comprovada por meio de testes comportamentais em modelos animais^{4,39,40} e aumento da densidade das fibras sensitivas da parede da bexiga²⁰. Em alguns casos, há sensibilização periférica e central gerando cronificação dessa dor e alodínea²⁸. Atualmente estima-se até 3% de prevalência dos sintomas de síndrome de bexiga dolorosa na população americana com uma proporção de mulheres de 5:1 em relação aos homens³⁰.

Atualmente trabalha-se com dois termos para as duas principais entidades nosológicas da bexiga simuladas por modelos animais que utilizam a CYP: Cistite hemorrágica, expressa em um modelo que utiliza usualmente uma aplicação de CYP, é análoga à inflamação aguda que ocorre em humanos e pode ser provocada também por outros quimioterápicos, radiação, infecção ou mesmo doenças inflamatórias³⁸ e Cistite Intersticial/

Síndrome da Bexiga Dolorosa (IC/PBS), chamada assim devido o componente neuropático do fenômeno, que em modelos animais utiliza várias doses de CYP para gerar um processo inflamatório crônico¹⁸ e assim simular um estado mórbido que ocorre em humanos. Na Cistite Intersticial a etiologia gira em torno, principalmente, de infecção e autoimunidade, e a patogenia, de disfunção urotelial, ativação de mastócitos e *up-regulation* de nervos sensoriais da bexiga⁴⁷.

A Cistite hemorrágica (CH) em humanos possui uma incidência de 2 a 40% em pacientes tratados com Ciclofosfamida³⁸. Ela é a forma mais severa de acometimento gênito-urinário entre as doenças induzidas por quimioterapia em humanos e é caracterizada por disúria e hematúria micro ou macroscópica, associadas à dor hipogástrica e aumento da frequência urinária com urgência miccional. Há perda de sangue com consequências variadas de acordo com sua intensidade, desde deficiência de ferro na CH moderada, até instabilidade hemodinâmica na severa⁴⁵.

Para evitar essa condição é prescrito o uso de MESNA, usualmente quando o tratamento é realizado por via intravenosa, e/ou a hiper-hidratação, usada geralmente no tratamento oral. Apesar de ser comprovada a utilidade do MESNA na profilaxia da cistite hemorrágica, através da ligação na acroleína e anulação de sua toxicidade¹³, é conhecido também que mesmo sobre esse regime é possível desenvolver cistite⁴¹. Além deste problema na eficiência no MESNA, ainda há efeitos colaterais no seu uso, como hipersensibilidade cutânea e reações sistêmicas³⁵. Devido a esse quadro a cistite hemorrágica ainda é muito estudada, não só para desvendar os seus mecanismos, mas para desenvolver possíveis antagonistas mais eficientes e baratos.

Na tentativa de elucidar os mecanismos dessa forma de cistite hemorrágica foi estabelecido o modelo experimental *in vivo* em roedores utilizando CYP para a indução da CH. Nesse modelo a análise dos parâmetros ocorre na vigência da inflamação, podendo-se testar compostos profiláticos, utilizados antes da indução e compostos terapêuticos, utilizados após, candidatos a agir na

gênese da inflamação ou na prevenção da ação da acroleína²¹. Esse modelo é utilizado tanto para trabalhos que investigam a CH quanto a IC/PBS. Apesar de o modelo seguir o mesmo mecanismo da cistite hemorrágica em humanos, outros fatores como os ligantes de CXCR3 estão presentes tanto em pacientes com Cistite Intersticial quanto em camundongos que tiveram cistite aguda induzida por CYP⁴⁶, mesmo a CYP não figurando na etiologia da IC/PBS em humanos.

Camundongos vêm sendo utilizados para modelos experimentais de pesquisas biomédicas desde o início do século 20⁴⁹. Esses animais destacam-se entre as outras espécies de uso científico, como os mais conhecidos e aproveitados para compor uma infinidade de modelos existentes¹¹. É uma espécie de destaque, mesmo entre os roedores, por ser pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curto, ser de fácil domesticação e manutenção⁴⁸. Graças a isso, ele utiliza menor proporção de compostos experimentais nos ensaios e possui maior quantidade de protocolos científicos e reagentes industriais disponíveis.

A classificação genética das espécies de camundongos utilizadas nos modelos experimentais (*Mus musculus*) se dá pelo modelo de cruzamento. Há dois sistemas: *inbred* ou isogênico, onde os animais possuem cerca de 99% de consanguinidade e portanto, são utilizados em modelos que requerem uniformidade genética e o *outbred* ou heterogêneo, onde o cruzamento é feito de maneira a obter grande variabilidade genética⁴⁸.

Estima-se que entre janeiro de 2002 e julho de 2005 aproximadamente 33% de toda publicação do banco de dados americano Pubmed utilizando camundongos foi realizada com linhagens heterogêneas¹⁰. Apesar de sua grande participação em trabalhos, os animais *outbred* são caracterizados como estoque e não como linhagem em grande parte dos laboratórios. Isso demonstra menor reconhecimento pela comunidade a despeito de suas características únicas e essenciais aos tipos de trabalhos que delas se beneficiam.

Esses camundongos contam com um grande *pool* genético, característica muito importante por ser similar à diversidade da população humana. As

linhagens *outbred* podem ser utilizadas preferencialmente para desenvolvimento de novos modelos, estudos toxicológicos e para identificar traços quantitativos de loci, onde se espera descobrir efeitos complexos que poderiam ser omitidos por uma população sem diversidade genética. Como desvantagens, podemos citar a necessidade de muitos animais para pesquisas que exigem grande poder de análise e o desconhecimento das variações genéticas em cada população¹⁰.

As particularidades do modelo animal de indução da cistite por CYP tornam-no propício ao teste de possíveis anti-inflamatórios que atuam de maneira sistêmica ou diretamente no trato urinário inferior de humanos, além de buscar um tratamento mais eficaz que os atualmente disponíveis para os estados mórbidos relacionados à bexiga. Há, porém, margem para seu aperfeiçoamento através da aproximação com o perfil epidemiológico da doença em humanos e da utilização da espécie mais viável, os camundongos. É possível simular de maneira mais fidedigna o processo de inflamação e seu antagonismo ao utilizar a linhagem heterogênea, aproximando-se do padrão populacional humano natural, e o gênero feminino, devido à prevalência maior de sintomas de síndrome da bexiga dolorosa nas mulheres e à ação imunomoduladora dos hormônios sexuais. Deste modo, através da análise de parâmetros inflamatórios sistêmicos e locais, esse trabalho se propõe a padronizar um modelo inflamatório de cistite utilizando camundongos de linhagem Swiss fêmeas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 35 camundongos, fêmeas, da linhagem Swiss, obtidos no Biotério central da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil, pesando 40g em média, com idade entre 4-8 meses. Os animais foram mantidos a temperatura média de 26 +/- 2°C e umidade relativa de 44-56%, respeitando-se ciclos normais de dia e noite. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram avalia-

dos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (Protocolo: 012975/2008-43).

Este trabalho demonstrou variação nos ciclos das fêmeas de camundongo dentro de cada grupo e ausência de anestro, conforme desejado para mimetizar a condição humana. Esses animais foram divididos em grupos de sete fêmeas que foram acondicionadas em uma mesma gaiola, porém, apesar dos tempos variáveis em que cada grupo esteve em mesma gaiola, parece não ter transcorrido tempo hábil para que ocorresse o Efeito Whitten, quando cerca de 20 a 30 animais fêmeas são acondicionados próximos por certo tempo, tendendo a apresentar ciclos erráticos e anestro⁵².

Indução da cistite e eutanásia dos animais

Para definição da dose de CYP a ser aplicada nos camundongo foi realizada uma revisão na literatura no site PubMed utilizando todas as palavras: *cystitis*, *cyclophosphamide* e *mice*. Foram encontrados 84 trabalhos, destes, foram retirados aqueles que tratavam de outras drogas, somente da acroleína ou que não disponibilizavam as doses utilizadas. Os trabalhos de mesma autoria contaram apenas uma vez. Restaram 35 trabalhos, todos com aplicações em doses únicas (Tabela 1). Foi escolhida a dose de 150 mg/kg, que foi uma das mais prevalentes, devido ao uso anterior em nosso laboratório e ao encontrado na literatura que associa doses superiores a 200mg/kg de CYP a problemas cardiovasculares e dislipidemia¹⁵.

Tabela 1-Doses encontradas em trabalhos com cistite em camundongos. Revisão de literatura realizada no banco de dados PubMed com as palavras *cystitis*, *cyclophosphamide* e *mice*.

Doses (mg/kg)	Nº de trabalhos
150	9
200	8
300	9
+ de uma dose	5
outras	4
Total	35

Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais com sete fêmeas acondicionadas em mesma gaiola por período inferior a dois meses

em média. Nos quatro primeiros grupos da cinética foi induzida cistite com ciclofosfamida (Sigma®) em dose de 150mg/Kg, via intraperitoneal, e então realizada a eutanásia após 0,5 horas no primeiro grupo, 6 horas no segundo, 12 horas no terceiro e 24 horas no quarto, o quinto grupo, que corresponde ao controle, recebeu 200µL de PBS via ip. e a eutanásia foi realizada após 24h (Tabela 2).

Em todos os grupos foi realizada a anestesia dos animais com associação do cloridrato de xilasina (10 mg/kg) e cloridrato de quetamina (25 mg/kg) por via intramuscular, em dose crescente, induzindo primeiramente sedação e analgesia para a retirada do sangue por via retro orbital e em seguida para a eutanásia. Durante o procedimento, foi realizada laparotomia xifo-púbica para adentrar a cavidade e permitir a retirada da bexiga vazia, linfonodo ilíaco e fêmur esquerdo dos animais, respectivamente.

Avaliação do exame histológico e peso da bexiga

As bexigas foram retiradas dos animais após a eutanásia, seccionadas anteriormente seguindo o plano sagital, pesadas e acondicionada para conservação em formol 10% tamponado, depois foram colocadas em parafina para confecção dos blocos, realizados os cortes de cinco micrômetros seguidos da coloração das lâminas com hematoxilina e eosina. O estudo das lâminas foi realizado por um patologista, utilizando microscópio óptico tetra-ocular (OLYMPUS® CH-30), desconhecendo o grupo do animal correspondente à lâmina estudada e que atribuiu valores para parâmetros de inflamação aguda, crônica, proliferação fibroblástica, fibrose, extensão do infiltrado na parede e neoformação capilar segundo critérios estabelecidos por Ramzi⁴³ (1999).

Na inflamação aguda, houve subdivisão e atribuição de notas de acordo com a presença de neutrófilos, congestão vascular e edema. Neste item o valor atribuído foi a soma dos escores, a saber, escore 0 quando ausentes, escore 1 quando presentes em menos de 50% do campo e escore 2 quando em mais de 50%. O valor final do critério inflamação aguda variou de um a quatro conforme a soma dos escores: inflamação aguda

ausente (soma 0), discreta (soma 1 ou 2), moderada (soma 3 ou 4) e acentuada (soma 5 ou 6). Nos demais critérios foram atribuídos valores de um a quatro de acordo com a intensidade: ausente, valor 1, leve, valor 2, moderada, valor 3 e acentuada, valor 4. No item extensão do infiltrado de parede, foi atribuído valor de acordo com a profundidade alcançada²⁷.

Avaliação do hemograma

O hemograma foi realizado para avaliação da ação sistêmica da CYP nos animais e do reflexo inflamatório sistêmico da cistite. Deu-se por meio da realização do exame de hemograma (Analisador hematológico pocH-100i™) a partir de sangue coletado por via retro-orbital, após sedação e analgesia, durante a preparação para a eutanásia. Foram analisadas a contagem total de leucócitos (WBC), a contagem de hemácias (RBC), a concentração de hemoglobina (HGB), o hematócrito (HCT), o volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e a contagem de plaquetas (PLT).

Quantificação das células de linfonodo ilíaco e medula óssea

Avaliou-se a contagem celular de um linfonodo da cadeia ilíaca, que é responsável pela drenagem da bexiga e reto, localizado na bifurcação da artéria aorta para artérias ilíacas, e da medula óssea retirada sempre do fêmur da pata esquerda. Os dados foram obtidos pela contagem do material em microscópico óptico utilizando-se o hemocítômetro (câmara de Neubauer) e corante azul de Tripán. Para isso eles tiveram alíquotas de 10µL retiradas e coradas em 10µL de solução contendo Azul de Tripán para contagem em câmara de Neubauer, considerando-se o resultado de todos os campos multiplicado pelo fator 10⁴. Os linfonodos foram preparados para contagem após sua trituração em ambiente estéril e suspensão em meio RPMI e a células de medula óssea, obtidas depois de lavado do canal medular com 01 (um) mL de PBS no fêmur esquerdo dos animais com PBS.

Análise estatística

Os dados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M.) ou $\pm$ desvio padrão da média (D.P.). A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Tukey ou teste *t* de Student, sendo o nível de significância $< 0,05$.

RESULTADOS

Avaliação do peso da bexiga

A avaliação do peso das bexigas demonstrou que houve aumento nos tempos de 6 e 12 horas após a indução, quando comparados ao controle e aos demais tempos que foram estatisticamente iguais entre si (Figura 1).

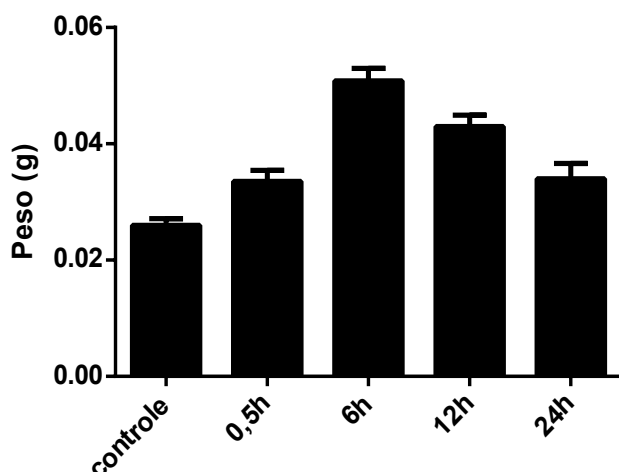


Figura 1-Peso das bexigas dos animais com cistite. As bexigas foram retiradas seguindo a eutanásia de camundongos Swiss, após 0,5, 6, 12 e 24 horas do tratamento com CYP e 24 horas após receber PBS no controle. As bexigas foram esvaziadas e pesadas. Os dados representam a média $\pm$ S.E.M. * $p<0,05$ em relação ao controle (n=7/grupo).

Avaliação do exame histológico da bexiga

A avaliação dos valores atribuídos nos escores histológicos indicou que no parâmetro inflamação aguda o controle e o tempo de 0,5 horas foram semelhantes, houve aumento significativo nos três últimos tempos em relação ao controle. O grupo de 6 horas foi significativamente maior que o de 24 horas e semelhante ao de 12 horas, e o grupo de 12 horas foi semelhante ao grupo

de 24 horas. Na inflamação crônica, extensão do infiltrado na parede e neoformação capilar, houve igualdade entre o tempo de 0,5 horas e o controle e aumento nos três últimos tempos, estatisticamente semelhantes entre si. Na proliferação fibroblástica e fibrose houve aumento significativo do tempo de 24 horas em relação aos demais, semelhantes entre si (Figura 2).

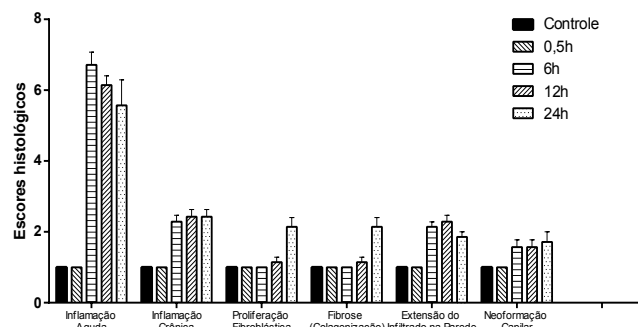


Figura 2-Análise histológica da cinética da inflamação em bexiga induzida por CYP. As bexigas foram retiradas seguindo a eutanásia de camundongos Swiss, após 0,5, 6, 12 e 24 horas do tratamento com CYP e 24 horas após receber salina no controle. As bexigas foram conservadas em formol 10% tamponado e depois colocadas em parafina para confecção dos blocos, foram obtidos os cortes de cinco micrômetros e em seguida realizada a coloração das lâminas com HE. Os dados representam a média $\pm$ S.E.M. * $p<0,05$ em relação ao controle, $\$p<0,05$ em relação ao tempo de 0,5h, $\#p<0,05$ em relação ao tempo de 6h e $\square p<0,05$ em relação ao tempo de 12h (n=7/grupo).

Avaliação do hemograma

A avaliação do hemograma demonstrou que, na contagem de leucócitos dos animais de cada grupo, os tempos que receberam CYP foram significativamente menores que o controle, havendo pequena diminuição nos tempos 0,5 e 6 horas e maior nos tempos de 12 e 24 horas. Na contagem de hemácias, houve diminuição do grupo 24 horas em relação ao de 0,5 horas. Na avaliação da concentração de hemoglobina e no hematócrito houve ligeiro aumento nos tempos de 0,5, 6 e 12 horas. No volume corpuscular médio houve diminuição significativa do grupo 24 horas em relação ao de 12 horas. Nos parâmetros restantes não houve diferença estatística em relação ao controle (Tabela 2).

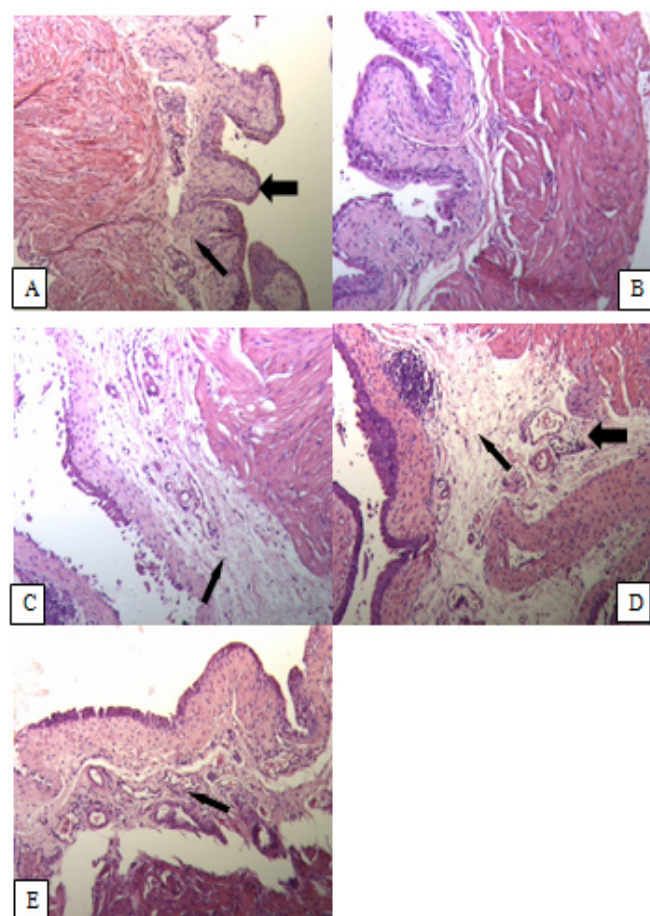


Figura 3-Cortes histológicos de bexiga. As bexigas foram retiradas após eutanásia dos animais com 0,5, 6, 12 e 24 horas do tratamento com CYP e 24 horas após receber salina no controle. (HE x100). **(A)** Corte da bexiga de um animal do grupo controle mostrando o urotélio (seta grossa) e a mucosa (seta fina) íntegros. **(B)** Corte de bexiga de animal do grupo 0,5h, similar ao controle. **(C)** Corte de bexiga de animal do grupo 6h mostrando edema importante (seta fina). **(D)** Corte de bexiga de animal do grupo 12h mostrando edema (seta fina) e infiltrando celular (seta grossa). **(E)** Corte de bexiga de animal do grupo 24h mostrando zona de neof ormation vascular. (n=7/grupo).

Tabela 2-Análise dos parâmetros do hemograma após tratamento com CYP. O hemograma foi realizado a partir de sangue coletado por via retro-orbital momentos antes da eutanásia, realizada 0,5, 6, 12 e 24 horas após tratamento com CYP e 24 horas após injeção de salina. Os dados representam a média±D.P.. *p<0,05 em relação ao controle, §p<0,05 em relação ao tempo de 12h, #p<0,05 em relação ao tempo de 0,5h (n=7/grupo).

	Controle	0,5h	6h	12h	24h
WBC (x10 ³ /μL)	9,5±1,2	4,8±0,5*	4,8±0,8*	3,2±0,6*	3,5±0,4*
RBC (x10 ⁶ /μL)	10,7±0,5	11,5±0,4	11,4±0,2	11,2±0,3	10,5±0,6#
HGB (g/dL)	15,1±0,8	16,9±0,9*	16,6±0,6*	16,3±0,5*	15,2±0,8
HCT %	53,9±1,5	56,9±1,1*	57,2±1,2*	57,3±0,3*	53,5±1,2
MCV (fL)	49,8±0,9	50,1±0,6	50,3±0,7	50,6±0,9	49,4±0,7§
MCH (pg)	14,0±0,3	14,5±0,2	14,6±0,4	14,5±0,3	14,4±0,3
MCHC (g/dL)	28,2±0,6	28,9±0,3	29,1±0,4	28,7±0,5	28,8±0,5
PLT (x10 ³ /μL)	1103,4±224,0	1245,1±112,0	1426,2±57,0	1282,7±58,0	1229,8±85,0

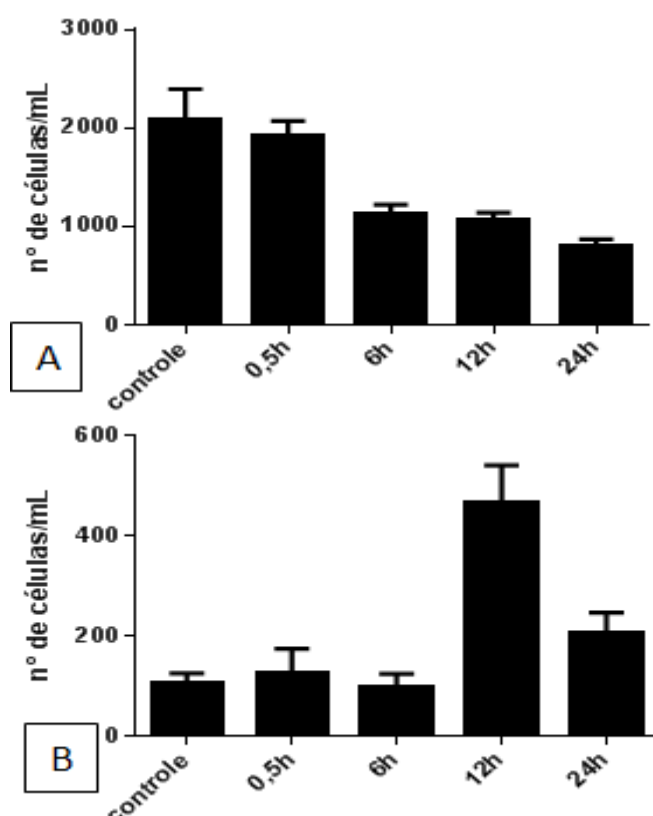


Figura 4-Cinética da contagem de células da medula óssea e linfonodo ilíaco após tratamento com CYP. **(A)** Células da medula obtidas do fêmur de camundongos Swiss. **(B)** Células do linfonodo obtidas da cadeia ilíaca de camundongos Swiss. Ambas foram obtidas após 0,5, 6, 12 e 24 horas do tratamento com CYP. As células foram então coradas com Azul de Tripán e contadas ao microscópio ótico. Os dados representam a média±S.E.M. *p<0,05 em relação ao controle (n=7/grupo).

Contagem de células

A contagem de células da medula demonstrou que houve uma redução tempo-dependente do número de células, a qual foi significativa em

relação ao controle após 6, 12 e 24 horas do tratamento com a CYP (Figura 4A). Na análise da celularidade do linfonodo ilíaco observou-se que os grupos com eutanásia nos tempos de 0,5, 6 e 24h e controle não possuem diferença estatística entre si. Porém o grupo de 12h mostrou aumento significativo em relação aos demais (Figura 4B).

DISCUSSÃO

Neste estudo foi confirmado o efeito inflamatório da CYP na bexiga. Houve uma elevação significativa do peso da bexiga vazia após 6 e 12 horas da aplicação da CYP em relação ao controle e aos demais tempos estudados (Figura 1). O resultado pode indicar indiretamente, um processo inflamatório, já que esse aumento pode representar edema, congestão vascular e/ou infiltrado leucocitário no local²⁷. Esses dados estão em conformidade com o que está preconizado na literatura: infiltrado de neutrófilos a partir de cerca de seis horas após o estímulo inflamatório, que no caso acredita-se ser a acroleína, presente já a partir de 30 minutos após a aplicação de CYP via ip¹⁶.

Na análise histológica das lâminas (Figura 2) foi confirmado o processo inflamatório inferido pelo aumento de peso da bexiga. A análise da inflamação aguda mostra aumento significativo em relação ao controle a partir de 6 horas, seguindo por 12 horas e diminuindo no tempo de 24 horas. Nos parâmetros inflamação crônica, extensão do infiltrado na parede e neoformação vascular, houve aumento significativo entre os três últimos tempos em relação ao controle, não havendo diferença entre os três tempos.

Já em relação à proliferação fibroblástica e colagenização, o tempo de 24 horas foi significativamente maior em relação aos demais, que foram iguais ao controle, indicando que nesse tempo a inflamação já se encontrava em processo de resolução mais avançado conforme já descrito anteriormente¹⁶.

A CYP é eliminada rapidamente, mas, enquanto possui taxa de ligação a proteínas plasmáticas de apenas 13%, seus metabólitos se ligam em proporção de 50%, o que é determinante em sua meia-vida mediana de eliminação que é de 6 a 9 horas⁵. Sendo que CYP e seus metabólitos são

quase todos recuperados na urina 24 horas após o início do tratamento¹⁹. Em modelo animal foi demonstrado que desses metabólitos destaca-se a acroleína como o agente irritativo do uroepitélio. Sua deposição pode causar um processo caracterizado respectivamente por edema, ulceração, hemorragia e necrose no uroepitélio⁷.

Ribeiro⁴⁵ et al (2012) citaram quatro fases que ilustram o processo inflamatório típico na bexiga: A fase inicial é caracterizada pelo acúmulo da acroleína na bexiga causando dano ao urotélio. Na segunda fase, de sinalização (inflamatória), as células epiteliais e do tecido conjuntivo, como os macrófagos, promovem um aumento local de citocinas inflamatórias, principalmente do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da interleucina-1 β , pela via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B). Destaca-se aqui o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da expressão de enzimas inflamatórias, como a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e a cicloxigenase-2 (COX-2). A combinação de óxido nítrico (NO) e radicais superóxidos pode levar à produção do radical livre peroxinitrito (ONOO⁻). Na fase ulcerativa (sintomática) há o desnudamento do epitélio e o aparecimento de úlceras que causam LUTS e disfunção vesical. A última etapa, de resolução, dá início à reparação tecidual, possivelmente a partir da sinalização dos fibroblastos e aumento local de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de queratinócitos²⁷.

Assim, o momento ideal para a eutanásia dos animais pode variar conforme os parâmetros escolhidos para análise e o tipo de ação do antagonista testado: Podemos supor que a primeira fase seria propícia para verificar a eficácia de compostos diluidores, a segunda, para realização de trabalhos que aferissem marcadores inflamatórios, e a terceira, o pico inflamatório e sintomático, para testar compostos que anulassem sua toxicidade ou fossem anti-inflamatórios. Destacamos aqui que a quarta fase traria um panorama de todo o processo por conter características que indicam se houve deposição, por ter a presença de citocinas e por demonstrar o grau da inflamação por meio da extensão da fibrose.

Vários tempos de eutanásia são relatados pela literatura em trabalhos com cistite induzida por CYP, havendo modelos utilizando ratos e camundongos^{1,34}. Esse comportamento da inflamação com incremento em 6 e 12 horas após aplicação da CYP, está em conformidade com o descrito na literatura em camundongos segundo trabalhos que demonstram pico da inflamação após 12 horas da indução da cistite^{12,26} e com o adotado por outros protocolos que escolhem o tempo de 6 horas para a eutanásia dos animais³. Chama a atenção uma diferença entre esses protocolos que comumente encontra-se nas doses que são maiores nos trabalhos com tempos menores. Em humanos, CYP é administrada em uma ampla faixa de doses que pode variar de 2 a 6 mg/kg até mais 6000mg/m²¹⁹. Isto reforça a discussão desse trabalho que se alinha com os grupos de eutanásia mais tardia e doses menores.

Por meio da contagem de células do linfonodo ilíaco, que compõe a cadeia drenante da bexiga, foi verificado aumento significativo no tempo de 12 horas após a aplicação de CYP na dose de 150mg/kg em relação ao controle e demais tempos (Figura 4). Esse aumento pode representar indiretamente atividade inflamatória na bexiga que estaria sendo fonte de antígenos, induzindo proliferação e quimiotaxia de células inflamatórias para este linfonodo, e gerando hiperplasia²⁹.

Neste estudo foi demonstrado que houve diminuição no número de células na medula óssea nos grupos que realizaram a eutanásia 6, 12 e 24 horas após a injeção de CYP via Intraperitoneal (Figura 4) e que estes mesmos grupos tiveram proporcional diminuição no total de leucócitos circulantes (Tabela 4). Porém houve uma discordância de dados no grupo que sofreu eutanásia no grupo de 30 minutos após a injeção de CYP, onde não houve diminuição significativa na contagem de células da medula em relação ao controle (Figura 3), mas houve diminuição na contagem de leucócitos em relação ao controle (Tabela 2).

A Ciclofosfamida causa mielotoxicidade tanto em humanos quanto em camundongos. Ela se dá nas linhagens eritrocítica, preferencialmente, granulocítica, linfocítica, e com menor atuação na megacariocítica⁸, principalmente, em relação

às outra oxazoforinas. Epstein²² et al (2009) demonstraram em camundongos de linhagem CBA que, após 48 horas da aplicação de CYP ip. na dose de 250mg/kg, o número de neutrófilos e linfócitos circulantes apresentavam acentuada queda, porém, menor que a queda demonstrada pelos mesmos tipos celulares ainda na medula óssea.

Os primeiros resultados demonstrando a queda tanto na celularidade da medula quanto no número de leucócitos nos tempos finais. Esses dados estão de acordo com o preconizado por Hellman³¹ (1976) que demonstraram que a CYP em 24 horas mata grande parte das células precursoras na medula, além de diminuir o potencial eritropoiético das células restantes. Mas, o resultado do primeiro tempo indica uma ausência de ação citotóxica da CYP nas células medulares e presença desta mesma nos leucócitos circulante em um tempo precoce já que a leucopenia é normalmente um produto da deficiência das células precursoras.

Isso pode ser explicado pelo aumento precoce na multiplicação de leucócitos circulantes estimulada pela inflamação na bexiga, já que a acroleína já está presente no urotélio no tempo de 0,5 horas após aplicação, tornando-os alvos preferenciais da CYP⁸ enquanto ela ainda não alcançou a medula, ou devido à natureza dos parâmetros do hemograma que podem exigir maior poder estatístico de pesquisa^{10,23}.

A aplicação única de CYP na dose escolhida de 150 mg/kg parecer não ser capaz de provocar queda na concentração de hemoglobina e no hematócrito em relação ao controle, o que sugeriria perda de sangue (Tabela 2). Esse resultado é favorável ao demonstrado por Stillwell⁵⁰ et al (1988) que relataram hematúria, provocada por cistite induzida por CYP até dentro das primeiras 48 horas de tratamento, e assim possibilita um tempo maior do que o estudado para o início da perda de sangue. Porém, chamamos atenção para o esperado em cistite que é a queda nesses parâmetros secundária à hemorragia na bexiga e a sua possível diminuição resultante da ação da CYP nos precursores da eritropoese impedindo a liberação de novas hemácias na circulação³¹.

Essa variação de tempos está também relacionada à linhagem, já que há relatos de respos-

tas diferentes ao modelo de indução da cistite com CYP de acordo com aquela utilizada, como na diferença de intensidade na resposta inflamatória aguda entre a linhagem ICR e a C57Bl/6n²⁴ e na toxicidade tardia seguida ao tratamento com CYP entre DBA/2 e C57Bl/6².

Na linhagem e doses utilizadas, e de acordo com os dados, entendemos que o tempo de 12 horas deve ser o padronizado para a eutanásia dos animais. Defendemos que possibilita a aferição de um maior número de parâmetros inflamatórios. Assim não sugerimos o tempo preconizado por AL-YAHYA¹ et al (2009), que com mesma dose e linhagem desse trabalho, utilizou o tempo de 24 horas, mas baseado em trabalhos prévios de sua linha de pesquisa que demonstravam máximo dano na bexiga neste tempo.

CONCLUSÕES

Segundo a dose de CYP e gênero dos animais, estudados no modelo proposto, esse trabalho demonstrou a ação sistêmica da CYP por meio da diminuição na contagem celular da medula óssea nos três últimos grupos e do número de leucócitos em todos os grupos em relação ao controle. Não conseguiu representar uma possível hemorragia na bexiga por meio dos parâmetros do hemograma. Mas, obteve sucesso em demonstrar a cinética da inflamação com início em 0,5 horas, similar ao controle, crescimento por volta de 6 e 12 horas, demonstrado pelos aumentos na contagem do linfonodo, peso da bexiga e inflamação aguda e declínio às 24 horas com presença de fibrose. Defendemos a utilização do tempo de 12 horas como padrão para a eutanásia por ser o tempo mais recente a conter quase completamente os parâmetros inflamatórios.

REFERÊNCIAS

1. AL-Yahya AA, Al-Majed AA, Gado AM, Daba MH, Al-Shabanah OA, Abdallah AR. Acacia senegal gum exudate offers protection against cyclophosphamide-induced urinary bladder cytotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009; 2 (4): 207-213.
2. Anton E. Delayed toxicity of cyclophosphamide on the bladder of DBA/2 and C57Bl/6 female mouse. *International Journal of Experimental Pathology* 2002; 83(1): 47-53.
3. Boeira VT, Leite CE, Santos AA, Edelweiss MI, Calixto JB, Campos MM, Morone FB. Effects of the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* and its isolated compounds on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mouse Naunyn-Schmiedeberg's. *Archives of Pharmacology* 2011; 384 :265-275.
4. Boucher M, Meen M, Codron JP, Coudore F, Kemeny JL, Eschalier A. Cyclophosphamide-induced cystitis in freely-moving conscious rats: behavioral approach to a new model of visceral pain. *Journal of Urology* 2000; 164(1): 203-208.
5. Bressan AL, Fontenelle E, Silva RS, Gripp AC. Imunossupressores na dermatologia. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2010; 85(1): 9-22.
6. Bristol-Myers Squibb CO. Cytosan ® Package insert Bristol-Myers Squibb Company Princeton NJ, 2003.
7. Brock N, Stekar J, Pohl J, Niemeyer U, Scheffler G. Acrolein, the causative factor of urotoxic side effects of cyclophosphamide, ifosfamide, trofosfamide and sulfosamide *Arzneimittelforschung* 1979; 29: 659-661.
8. Brunton LL, Chabner B, Knollman BC. As bases farmacológicas da terapêutica, Goodman e Gilman. 9ª edição, McGraw Hill, Nova Iorque, 1996.
9. Chabner BA, Ryand DP, Pax-Ares L, Garcis-Carbonero A, Calaresi P. Antineoplastic Agents. In: Brunton LL, Chabner B, Knollman BC. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Goodman and Gilman's, 10th ed McGraw Hill, NewYork, p 1389-1459, 2001.

10. Chia R, Achilli F, Festing MFW, Fisher EMC. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature Genetics* 2005; 37(11): 1181-1186.
11. Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de Laboratório: O Camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 2007; 28(1):11-23.
12. Choi SH, Byun Y, Lee G. Expressions of Uroplakins in the Mouse Urinary Bladder with Cyclophosphamide-Induced Cystitis. *Journal of Korean Medicine Science* 2009; 24: 684-689.
13. Chow YC, Yang S, Huang CJ, Tzen CY, Huang PL, Su YH, Wang PS. Epinephrine promotes hemostasis in rats with cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis *Urology* 2006; 67:636-641.
14. Colvin OM. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications *Current Pharmaceutical Design* 1999; 5:555-560.
15. Conklin DJ, Haberzettl P, Lesgards JF, Prough RA, Srivastava S, Bhatnagar A. Increased sensitivity of glutathione S-transferase P-null mice to cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2009; 331(2): 456-469.
16. Contran RS, Kumar V, Collins T, Robbins: Bases patológicas das doenças- Patologia Sétima edição Editora Guanabara Koogan, 2005.
17. Cruz CD, Avelino A, McMahon SB, Cruz F. Increased spinal cord phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases mediates micturition overactivity in rats with chronic bladder inflammation. *European Journal of Neuroscience* 2005; 21(3): 773-781.
18. Dang K, Lamb K, Cohen M, Bielefeldt K, Gebhart GF. Cyclophosphamide-induced bladder inflammation sensitizes and enhances P2X receptor function in rat bladder sensory neurons. *Journal of Neurophysiology* 2008; 99(1): 49-59.
19. De Jonge ME, Huitema ADR, Rodenhuis S, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics* 2005; 44(11): 1135-1164.
20. Dickson A, Avelino A, Cruz F, Ribeiro-da-Silva A. Peptidergic sensory and parasympathetic fiber sprouting in the mucosa of the rat urinary bladder in a chronic model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuroscience* 2006; 141(3): 1633-1647.
21. Eichel L, Scheidweiler K, Kost J, Shojai J, Schwarz E, Messing E, Wood R. Assessment of murine bladder permeability with fluorescein: validation with cyclophosphamide and protamine. *Urology* 2001; 58:113-118.
22. Epstein OI, Dygai AM, Sergeeva SA, Zhdanov VV, Khriukova TY, Stavrova LA, Zyuz'kov GN. Experimental study of ultralow-dose antibodies to cyclophosphamide on cyclophosphamide myelotoxicity. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2009; 147(3):323-327.
23. Festing MFW, Diamanti P, Turton JA. Strain differences in haematological response to chloramphenicol succinate in mice: implications for toxicological research *Food and Chemical Toxicology* 2001; 39: 375-383.
24. Fraiser L, Kehrer JP. Murine strain differences in metabolism and bladder toxicity of cyclophosphamide. *Toxicology* 1992; 75(3): 257-272.
25. Gilman A. The initial clinical trial of the nitrogen mustard. *American Journal of Surgery* 1963; 105:574-578.
26. 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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1995; 28(10): 1103-1108.

27. Gonçalves Filho A. Efeitos do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L na cistite induzida pela ciclofosfamida. 2013. 47f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
28. Grover S, Srivastava A, Lee R, Tewari AK, Te AE. Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis. *Therapeutic Advances in Urology* 2011; 3(1): 19-33.
29. Hamazaki M, Taniguchi K, Murata H. Immunohistological study of reactive follicular hyperplasia of lymph node in childhood. *Rinsho byori: The Japanese journal of clinical pathology* 1992; 40(4): 423-428.
30. Hano P, Nordling J, Fall M. Bladder Pain Syndrome. *Medical Clinics of North America* 2011; 95(1): 55-73.
31. Hellman S, Grate HE. Effect of Cyclophosphamide on the Murine Hematopoietic Stem Cell Compartment as Measured by Different Assay Techniques. *Blood* 1971; 38(6): 706-714.
32. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 1981; 26: 165.
33. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 1987; 7: 182-184.
34. Juszczak K, Krolczyk G, Filipek M, Dobrowolski ZF, Thor PJ. Animal models of overactive bladder: cyclophosphamide (CYP)-induced cystitis in rats. *Folia Medica Cracoviensa* 2007; 48: 113-123.
35. Khaw SL, Downie PA, Waters KD, Ashley DM, Heath JA. Adverse hypersensitivity reactions to Mesna as adjunctive therapy for cyclophosphamide. *Pediatric Blood & Cancer* 2007; 49: 341-343.
36. 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.
37. Klippel JH. Cyclophosphamide: Ovarian and other toxicities. *Lupus* 1995; 4: 1-2.
38. Manikandan R, Kumar S, Durairajan LN. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. *Indian Journal of Urology* 2010; 26(2): 159-166.
39. Méen M, Coudore-Civiale MA, Eschalié A, Boucher M. Involvement of hypogastric and pelvic nerves for conveying cystitis induced nociception in conscious rats. *Journal of Urology* 2001; 166: 318-322.
40. Méen M, Coudore-Civiale MA, Parry L, Eschalié A, Boucher M. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in nociception in the cyclophosphamide-induced vesical pain model in the conscious rat. *European Journal of Pain* 2002; 6(4): 307-314.
41. Monach PA, Arnold LM, Merkel PA. Incidence and Prevention of Bladder Toxicity From Cyclophosphamide in the Treatment of Rheumatic Diseases. *Arthritis & Rheumatism* 2010; 62(1): 9-21.
42. NIOSH. National Occupational Exposure Survey (1981-83) National Institute for Occupational Safety and Health Last updated: 7/1/90 <http://www.cdc.gov/noes/noes1/x3688sic.html>. 1990.
43. Ramzi S. Robbins basis of disease 6^a ed Philadelphia: W B Saunders Company, 1999.
44. 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.

45. Ribeiro RA, Lima-Junior RCP, Leite CAVG, Mota JMSC, Macedo FYB, Lima MVA et al. Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches and new insights. *Journal of Experimental and Integrative Medicine* 2012; 2: 95-112.
46. Sakthivel SK, Singh UP, Singh S, Taub DD, Novakovic KR, Lillard JWJR. CX-CL10 blockade protects mice from cyclophosphamide-induced cystitis. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines* 2008; 28(6): 6.
47. Sant GR. Etiology, pathogenesis, and diagnosis of interstitial cystitis. *Reviews In Urology* 2002; 4(1): S9-S15.
48. Santos BF. Criação e manejo de camundongos In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, p115-118, 2002.
49. Soares MBP, Carvalho LCP, Santos RR. Banco de embriões de camundongos geneticamente modificados biotecnologia. *Ciência e desenvolvimento* 2001; 20:50-53.
50. Stillwell TJ, Benson Junior RC. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. A review of 100 patients. *Cancer* 1988; 61(3): 451-457.
51. Travis LB, Curtis RE, Glimelius B, Holowaty EJ, Van Leeuwen FE, Lynch CF, et al. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1995; 87(7): 524-530.
52. Whitten WK. Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *Journal of Endocrinology* 1959; 18:102-107.
53. Zhang J, Tian Q, Zhou SF. Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. *Current Drug Therapy* 2006; 1:55-84.
- *Autora para correspondência:**
Profa. Dra. Flávia R F Nascimento,
E-mail: nascimentofrf@yahoo.com.br