

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Fabiana Noronha Dornelles

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CXCR2 E TRPV1 NA
CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA EM RATOS**

Florianópolis

2013

Fabiana Noronha Dornelles

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CXCR2 E TRPV1 NA
CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA EM RATOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dornelles, Fabiana Noronha
Participação dos receptores CXCR2 e TRPV1 na cistite
induzida por ciclofosfamida em ratos / Fabiana Noronha
Dornelles ; orientador, João Batista Calixto -
Florianópolis, SC, 2013.
91 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Cistite. 3. Receptores CXCR2. 4.
Receptores TRPV1. I. Calixto, João Batista. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia. III. Título.

“Ninguém ignora tudo

Ninguém sabe tudo.

Todos nós sabemos alguma coisa.

Todos nós ignoramos alguma coisa.

Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

Dedico esse trabalho aos meus pais, Tânia e João, que desde cedo me mostraram a importância da educação, cultivando o aprendizado e a busca pelo conhecimento e estimulando, sempre, a curiosidade e a criatividade.

Agradeço por serem professores excelentes e exemplos no ensinar.

Obrigada pela confiança, pelo incentivo, apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha família, à minha “madrasta” Olga e aos meus amados irmãos, Lucas e Thiago, pelo afeto e amor incondicionais. Por estarem sempre presentes, me apoiando e incentivando.

Ao meu marido Eduardo, por tornar, a cada dia, a minha vida mais leve, doce, alegre e feliz.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Batista Calixto, pelos ensinamentos e pela oportunidade de aprendizado e crescimento científico, profissional e pessoal.

À Prof.^a Maria Martha Campos pela amizade, apoio, confiança e colaboração na realização desse trabalho.

À querida Edinéia, pela colaboração. Pelos ensinamentos e paciência. Pelo auxílio em alguns experimentos e pelas inúmeras ideias, revisões e discussões dos resultados.

À minha querida amiga e colega Marianne, pela amizade, parceria e incentivo, tão importantes e tão sentidos nos momentos de ausência.

À Maíra Bicca e Evelyn Santos pelo suporte técnico na realização dos experimentos de imunofluorescência desta tese.

Aos queridos colegas do Laboratório de Farmacologia Experimental, em especial à Raquel, Juliana, Daniela, Gabriela, Robson, Rodrigo e Allisson pelo convívio agradável.

Ao Pedro, técnico do biotério, e às técnicas de laboratório, Juliana, Aline e Ana Carolina, pelo apoio técnico essencial.

À Patricia, pelo carinho e amizade.

Às minhas queridas amigas, irmãs que escolhi, em especial à Laura Germani, Fernanda e Juliana Porto, Juliana Dill, Juliana Noronha, Jozela Gama, Mariana Kothe, pela amizade, companheirismo e por estarem sempre presentes.

À Regina, pelo Reiki.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina por terem contribuído para a minha formação.

E por fim, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro concedido durante a realização desse trabalho.

RESUMO

A proposta do presente estudo foi avaliar a participação dos receptores CXCR2 e TRPV1 na cistite induzida por ciclofosfamida (CYP) em ratos. A CYP é um quimioterápico cujo principal efeito adverso é a urotoxicidade, caracterizada pelo desenvolvimento de cistite hemorrágica e fibrose da bexiga urinária. A administração sistêmica de CYP causou inflamação da bexiga urinária, disfunção do processo de micção e comportamento de dor visceral. A cistite induzida por CYP foi caracterizada por aumento do peso úmido da bexiga urinária, edema, hemorragia, infiltração de neutrófilos e dano urotelial. Além disso, ocorreu um aumento nos níveis de citocinas inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α . A presença de dor visceral foi evidenciada através do aumento do comportamento nociceptivo, bem como pela presença de hipersensibilidade mecânica referida avaliada na pata e na região abdominal. A cistite induzida por CYP alterou os parâmetros urodinâmicos do processo de micção. Ainda, a cistite induzida por CYP induziu aumento nos níveis do RNAm dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária. Ensaio de imunofluorescência revelaram um aumento na expressão dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária, em especial no urotélio e fibras nervosas, e nos neurônios do GRD (gânglio da raiz dorsal) após o tratamento com CYP. O pré-tratamento dos animais com os antagonistas seletivos dos receptores CXCR2 (SB225002) e TRPV1 (SB366791) reduziu o edema e a hemorragia, o peso úmido, a infiltração de neutrófilos determinada através dos níveis de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), bem como os níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α na inflamação da bexiga urinária. Curiosamente, os antagonistas SB225002 e SB366791, ou a combinação de ambos, reduziu significativamente os escores comportamentais nociceptivos e a hipersensibilidade mecânica na pata e na região abdominal, causados pela CYP. Além disso, o aumento dos níveis de RNAm dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga após a administração de CYP, foi inibido pelo pré-tratamento com o SB225002, SB366791 ou pela combinação de ambos os antagonistas. A disfunção da bexiga urinária, avaliada através de cistometria, foi evidenciada pelo aumento do número de contrações não associadas à micção (CNMs) e nas pressões vesicais e também pela redução da capacidade da bexiga, do volume de urina eliminado e da eficiência de esvaziamento vesical. O pré-tratamento com o antagonista SB225002 ou a sua combinação com SB366791, reduziu as pressões vesicais, enquanto que os antagonistas SB225002 e SB366791, administrados isoladamente ou a

combinação de ambos, causaram um aumento da capacidade da bexiga, do volume eliminado e da eficiência de esvaziamento da bexiga urinária, além de reduzir o número de CNMs. Tomados em conjunto os resultados obtidos no presente estudo sugerem um potencial efeito benéfico dos antagonistas seletivos dos receptores CXCR2 e TRPV1 na inflamação, na dor e nas alterações funcionais da bexiga urinária após a cistite induzida pela CYP.

Palavras-chave: Inflamação da bexiga urinária, ciclofosfamida, receptor CXCR2, receptor TRPV1.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the role of CXCR2 and TRPV1 receptors in the rat model of cyclophosphamide (CYP) induced cystitis. CYP is a chemotherapeutic agent that induces urotoxicity characterized by the development of hemorrhagic cystitis and urinary bladder fibrosis. Systemic administration of CYP induced bladder inflammation, voiding dysfunction and visceral pain behavior. CYP-induced cystitis was characterized by edema, hemorrhage, increased neutrophil infiltration, urothelial damage, increased bladder wet weight. Furthermore, there was an increase in the levels of inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α . Visceral pain was determined by the increase in the nociceptive behavior as well as mechanical hypersensitivity measured by von Frey filaments applied in the paw and abdominal area. CYP-induced cystitis altered bladder contractility and urodynamic parameters involved in voiding function. Also, CYP-induced cystitis increased the mRNA levels of CXCR2 and TRPV1 receptors in the urinary bladder. Immunofluorescence assays revealed an increase in the expression of CXCR2 and TRPV1 receptors in the urinary bladder, particular in the urothelium, and in DRG neurons (dorsal root ganglia) after CYP treatment. Pretreatment of animals with selective antagonists of CXCR2 (SB225002) and TRPV1 (SB366791) receptors significantly reduced the edema and hemorrhage, the bladder wet weight, neutrophil infiltration, myeloperoxidase activity (MPO) and the cytokines levels in the urinary bladder. Interestingly, the administration of the antagonists, SB225002 and SB36679, or the combination of both, significantly reduced the behavioral nociceptive scores and the mechanical hypersensitivity in the paw and in the abdominal area, caused by CYP. In addition, increased levels of CXCR2 and TRPV1 mRNA in the bladder after CYP administration, was inhibited by the pre-treatment with SB225002, SB366791 or the combination of both antagonists. The urinary bladder dysfunction was assessed by cystometry and determined by an increase in the number of non-voiding contractions (NVCs) and in bladder pressure and also by the reduction in bladder capacity, voided volume and bladder efficiency. Of note, the pretreatment with the antagonist SB225002 or its combination with SB366791 significantly reduced the bladder pressure, whereas the antagonists SB225002 and SB366791, administered alone or in combination resulted in an increased bladder capacity, voided volume and bladder efficiency, and reduced the number of NVCs. Taken together, these results indicate a potential role for CXCR2 and TRPV1 receptors

antagonists in inflammation, pain and functional alterations in the bladder after CYP -induced cystitis.

Key-words: bladder inflammation, cyclophosphamide, CXCR2 receptor, TRPV1 receptor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	- adenosina trifosfato
BDNF	- fator neurotrófico derivado do cérebro
CBU	- capacidade da bexiga urinária
CGRP	- peptídeo relacionado ao gene da
CNM	- contração não associada à micção
CYP	- ciclofosfamida
E.P.M.	- erro padrão da média
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
EEV	- eficiência de esvaziamento vesical
g	- grama
GRD	- gânglio da raiz dorsal
h	- hora
H&E	- Hematoxilina e eosina
iNOS	- óxido nítrico sintase induzida
i.p.	- intraperitoneal
IECs	- intervalo entre as contrações
IL-1 β	- Interleucina 1 beta
mg	- miligrama
min	- minuto
MPO	- mieloperoxidase
NF-KB	- fator nuclear kappa B
NGF	- fator de crescimento neural
NO	- óxido nítrico
PARs	- receptores ativados por proteases
PB	- pressão basal
PBS	- salina tamponada com fosfato
PKA	- proteína quinase A
PKC	- proteína quinase C
PL	- pressão limiar
PM	- pressão máxima de micção
PMSF	- Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RNA _m	- Ácido ribonucléico mensageiro
SNC	- Sistema nervoso central
KC	- quimiocina derivada de queratinócito
TNF	- fator de necrose tumoral
SP	- substância P
Trk	- tirosina quinase
TRP	- receptor de potencial transitório vanilóide 1
VE	- volume eliminado
μ l	- microlitro
μ M	- micromolar

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Inflamação da bexiga urinária	1
1.2 Cistite induzida pela CYP.....	2
1.3 Inervação da bexiga urinária.....	5
1.4 Propriedades sensoriais da bexiga urinária	7
1.5 Quimiocinas e seus receptores	9
1.6 Quimiocinas e seus receptores na bexiga urinária.....	12
1.7 Receptores TRPV1 na bexiga urinária	13
1.8 Quimiocinas e receptores TRPV1.....	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Animais.....	23
3.2 Indução da cistite.....	23
3.3 Avaliação da resposta nociceptiva	24
3.3.1 Parâmetros comportamentais.....	23
3.3.2 Análise da hipersensibilidade mecânica através do filamento de von Frey.....	26
3.4 Análises histopatológicas da bexiga urinária.....	27
3.4.1 Análise macroscópica.....	27

3.4.2	Análise microscópica.....	27
3.5	Atividade da enzima MPO na bexiga urinária.....	28
3.6	Dosagem de citocinas na bexiga urinária.....	29
3.7	Expressão dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária.....	29
3.7.1	Extração do RNA total.....	29
3.7.2	Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real).....	30
3.8	Localização dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária e GRD.....	31
3.8.1	Protocolo para imunomarcaçã.....	31
3.9	Avaliação urodinâmica através da cistometria.....	32
3.10	Drogas e reagentes.....	33
3.11	Análise Estatística.....	34
4.	RESULTADOS	35
4.1	Respostas comportamentais nociceptivas induzidas pela CYP.....	35
4.2	Avaliação da hipersensibilidade mecânica periférica induzida pela CYP.....	36
4.3	Avaliação do dano macroscópico induzido pela CYP....	38
4.4	Análise do dano microscópico induzido pela CYP.....	40
4.5	Avaliação da migração de neutrófilos na bexiga urinária após a cistite induzida pela CYP.....	42
4.6	Determinação dos níveis de citocinas na bexiga urinária após a cistite induzida pela CYP.....	43

4.7	Avaliação da expressão dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária.....	44
4.8	Localização dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária e GRD.....	46
4.9	Avaliação dos parâmetros urodinâmicos após a cistite induzida pela CYP.....	49
5.	DISCUSSÃO	53
6.	CONCLUSÃO	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8.	PUBLICAÇÕES	92

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Interações entre as células uroteliais, fibras nervosas eferentes e aferentes e as células intersticiais na bexiga urinária.....	11
Figura 2: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre as respostas comportamentais nociceptivas induzidas pela CYP.....	46
Figura 3: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pela CYP.....	48
Figura 4: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 no dano macroscópico induzido pela CYP.....	50
Figura 5: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 no dano microscópico induzido pela CYP.....	52
Figura 6: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre a atividade da MPO na bexiga após a cistite induzida pela CYP.....	54
Figura 7: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre os níveis das citocinas TNF α e IL-1 β na bexiga após a cistite induzida pela CYP.....	55
Figura 8: Expressão dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária após a cistite induzida pela CYP.....	57
Figura9: Localização dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária.....	59
Figura 10: Localização dos receptores CXCR2 e TRPV1 no GRD..	61
Figura 11: Traçados cistométricos representativos.....	64
Figura 12: Alterações dos parâmetros urodinâmicos de pressão após a cistite induzida pela CYP.....	65

Figura 13: Alterações dos parâmetros urodinâmicos funcionais após a cistite induzida pela CYP..... 66

Figura 14: Mecanismos propostos para a participação dos receptores CXCR2 e TRPV1 na cistite induzida por CYP 82

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Escore comportamental nociceptivo.....	32
Tabela 2: Escore utilizado para avaliação do dano macroscópico na bexiga urinária.....	34
Tabela 3: Escore utilizado para a avaliação do dano microscópico na bexiga urinária	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação da bexiga urinária

As doenças inflamatórias da bexiga urinária, como a cistite e a síndrome da bexiga dolorosa, são bastante comuns e estão associadas com despesas de saúde anuais estimadas em aproximadamente US\$ 750 milhões nos Estados Unidos. Estima-se que aproximadamente um milhão de pessoas apresentam sintomas de doenças inflamatórias da bexiga urinária, os quais são mais prevalentes em mulheres (Rosenberg e Hazzard, 2005).

A cistite é um processo inflamatório da bexiga urinária, caracterizado por alterações na mucosa, hematúria (presença de sangue na urina), disúria (dor ao urinar), aumento da frequência e urgência urinária, além de dor pélvica intensa (Sakthivel *et al.*, 2008). Esses sintomas são frequentemente acompanhados por ansiedade e depressão, afetando diretamente a qualidade de vida dos pacientes. A cistite pode ser causada por infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias, por radiação, medicamentos, agentes químicos (ifosfamida e ciclofosfamida) ou ainda, pode ter origem idiopática (Neheman *et al.*, 2005; Saini *et al.*, 2008; Grover *et al.*, 2011; Vykhoanets *et al.*, 2012). Além disso, a cistite também pode estar associada a outras doenças como o câncer ginecológico, a doença inflamatória pélvica e a doença de Crohn. A cistite pode se tornar uma condição crônica, o que pode tornar necessário múltiplas intervenções e, em casos mais graves, cistectomia (Yoshida *et al.*, 2008).

1.2 Cistite induzida pela CYP

A ciclofosfamida (do inglês *cyclophosphamide* - CYP), uma oxazafosforina, foi desenvolvida nos laboratórios de pesquisa da Asta na Alemanha em 1958 e seus efeitos adversos foram relatados pela primeira vez no início dos anos 60 (Coggins *et al.*, 1960). A CYP é um agente quimioterápico alquilante que atua no ciclo celular de forma não específica, promovendo ruptura do DNA e conseqüentemente, morte celular (Brock, 1989). A CYP é utilizada no tratamento de tumores sólidos, neoplasias de células B (linfoma, mieloma e leucemia linfocítica crônica) e em algumas doenças não neoplásicas, como púrpura trombocitopênica, lúpus, artrite

reumatóide, síndrome nefrítica e granulomatose de Wegener e na prevenção da rejeição de transplante de medula óssea (Levine e Richie, 1989; Morais *et al.*, 1999; Korkmas *et al.*, 2006; Abraham *et al.*, 2008). É um componente essencial utilizado em diferentes combinações de fármacos quimioterápicos.

A CYP é um agente inerte; entretanto, após sua metabolização no fígado há a formação de dois metabólitos: a mostarda de fosoramida, agente ativo e citostático e, a acroleína, excretada pelos rins e altamente tóxica para o urotélio (Olivar e Laird, 1999; Abraham *et al.*, 2008; Rang e Dale, 2008). Dessa forma, o principal efeito adverso do tratamento com CYP é a urotoxicidade, que inclui cistite hemorrágica e fibrose da bexiga urinária (Wong *et al.*, 2000; Korkmas *et al.*, 2007). A grande incidência de cistite hemorrágica em pacientes em tratamento com CYP (2% a 40%, podendo alcançar 68% em pacientes de transplante de medula óssea) e sua mortalidade (4%) limitam o seu uso clínico (Manikandan *et al.*, 2010; Monach *et al.*, 2010). O dano urotelial depende da dose de CYP utilizada e ocorre através do contato direto da acroleína na bexiga urinária, causando perda do epitélio, edema, ulceração, neovascularização, hemorragia, infiltração leucocitária e necrose (Assreuy *et al.*, 1999; Kanat *et al.*, 2006).

Vários métodos para a prevenção e tratamento da cistite induzida por CYP têm sido empregados com resultados variáveis. A manutenção de uma hidratação adequada do paciente e a administração concomitante de 2-mercaptoetano sulfonato de sódio (Mesna) são os métodos mais utilizados para a prevenção da cistite hemorrágica na prática clínica. A hidratação do paciente e a irrigação da bexiga urinária com solução salina através de cateter mantêm o fluxo urinário constante, diminuindo o tempo de exposição do urotélio à acroleína, prevenindo assim, a obstrução do trato urinário por coágulos (Cheuk *et al.* 2007). O fármaco Mesna foi utilizado nos Estados Unidos pela primeira vez em 1984 por Freedman e colaboradores (Freedman *et al.*, 1984). A administração profilática de Mesna neutraliza a ação da acroleína, resultando em detoxificação regional do sistema urinário sem afetar, contudo, a atividade antitumoral da ciclofosfamida (Morais *et al.*, 1999; Oter *et al.*, 2004; Santos Jr *et al.*, 2010). Entretanto, sua ação protetora não é eficaz quando a lesão da bexiga urinária já está estabelecida. Além disso, a cistite hemorrágica ainda ocorre em 10-40% dos pacientes tratados com Mesna (Brock e Pohl, 1983) e sua administração tem sido relacionada com reações de

hipersensibilidade cutânea e sistêmica em pacientes adultos (Khaw *et al.*, 2007; Lin e Keefe, 2012). Outros métodos de prevenção e tratamento da cistite hemorrágica incluem a instilação intravesical de solução salina, formalina, nitrato de prata, prostaglandinas e toxina botulínica, a administração oral de dissulfiram e N-acetilcisteína e a terapia com oxigênio hiperbárico. As medidas mais agressivas envolvem a embolização da artéria hipogástrica, cistectomia e aumento da bexiga urinária (Traxer *et al.*, 2001; Neheman *et al.*, 2005; Chow *et al.* 2006; 2007; Manikandan ., 2010).

Embora diversos estudos tenham sido destinados à determinação dos processos relacionados com a urotoxicidade da ciclofosfamida, os mecanismos envolvidos nestas alterações ainda não são completamente conhecidos. Dessa maneira, uma maior compreensão do processo urotóxico a fim de minimizar o efeito colateral e limitante da utilização clínica da CYP se torna importante. A eliminação desse efeito secundário pode levar a uma melhor tolerância ao medicamento e a uma terapêutica mais eficiente e confortável para os pacientes (Abraham *et al.*, 2008). Nesse contexto, novos agentes terapêuticos eficazes para a prevenção e tratamento da cistite induzida pela CYP se tornam necessários.

A inflamação da bexiga urinária induzida por ciclofosfamida está associada com alterações neuroquímicas e eletrofisiológicas, mudanças nas propriedades organizacionais e funcionais das vias miccionais e alteração da sensibilidade somática referida. Alguns mediadores químicos como as citocinas, neurotrofinas, neuropeptídeos, ciclooxygenase-2 (COX-2), prostanóides e quimiocinas produzidos na bexiga urinária inflamada parecem ser os responsáveis por essas mudanças (Vizzard, 2000; 2001; Malley e Vizzard, 2002; Hu *et al.*, 2003, Birder, 2005; Yoshimura *et al.*, 2006; Yuridullah *et al.*, 2006; Sakthivel *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2008; Arms *et al.*, 2010). Neste contexto, Malley e Vizzard (2002) demonstraram que após a administração de CYP ocorre um aumento rápido e significativo no RNAm das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α na bexiga urinária de ratos. Ainda, níveis elevados dessas citocinas, bem como das citocinas GRO/KC, MCP-1 e IL-18, também foram observados na urina de ratos com inflamação da bexiga urinária (Smaldone *et al.*, 2009; Augé *et al.*, 2013). A administração de CYP também parece aumentar a produção de COX-2 e prostanóides na bexiga urinária (Hu *et al.*, 2003). Interessantemente, a pentoxifilina (inibidor de IL-1 β) e a talidomida (inibidor de TNF- α) reduziram os

eventos inflamatórios na bexiga urinária durante a cistite (Gomes *et al.*, 1995).

As citocinas inflamatórias TNF- α e a IL-1 β parecem mediar a produção de óxido nítrico (NO), outro importante mediador inflamatório na cistite induzida pela CYP, através da indução da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Gomes *et al.*, 1995; Morais *et al.* 1999; Ribeiro *et al.*, 2002; Oter *et al.*, 2004; Linares-Fernandez e Alfieri, 2007). Posteriormente, a inibição específica da iNOS foi capaz de prevenir a cistite induzida pela CYP em roedores (Korkmaz *et al.*, 2007). Durante o processo inflamatório causado pela CYP são produzidas espécies reativas de oxigênio (EROs) que estão relacionadas com o dano urotelial causado pela acroleína (Korkmaz *et al.*, 2007). Citocinas como o TNF- α e a IL-1 β , em conjunto com as EROs, ativam os fatores de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e ativador de proteína 1 (AP-1) responsáveis pela transcrição de genes pró-inflamatórios exacerbando, assim, a resposta inflamatória. Recentemente, foram observados níveis elevados de NF- κ B na bexiga urinária após a injeção de CYP (Vykhovanets *et al.*, 2012). A estimulação de NF- κ B e AP-1 controla a expressão de citocinas, especialmente TNF- α e IL-1 β e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), resultando na produção de EROs adicional, causando danos ao DNA e necrose celular (Korkmaz *et al.*, 2007). Dessa forma, ocorre a ruptura da integridade celular e tecidual, caracterizando o dano urotelial como edema, hemorragia e ulceração.

Além disso, a cistite hemorrágica é caracterizada por uma grande infiltração de leucócitos. Em 1999, Assreuy e colaboradores elucidaram o papel dos neutrófilos na patogênese da cistite induzida por CYP e demonstraram que a inibição da migração de neutrófilos na bexiga urinária estava relacionada com a diminuição da inflamação e do dano urotelial. Posteriormente, uma extensa infiltração de neutrófilos na bexiga com cistite hemorrágica foi relatada, bem como um aumento significativo da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), indicando um maior recrutamento de polimorfonucleares para a bexiga urinária (Vizzard, 2000). Corroborando com esses dados, Santos e colaboradores (2010) relataram uma inibição da inflamação na cistite induzida pela CYP como consequência da diminuição da atividade da MPO na bexiga.

Ainda no contexto das alterações causadas pela ciclofosfamida destaca-se a contribuição das citocinas pró-

inflamatórias na sensibilização das fibras C aferentes da bexiga urinária, facilitando assim a propagação do impulso nociceptivo para a medula espinhal. Assim, a bexiga inflamada apresenta alterações nas propriedades de vias sensoriais aferentes, reduzindo o limiar de resposta a estímulos inócuos ou nocivos (Malley e Vizzard, 2002). De fato, o aumento da sensibilidade à dor e a estímulos somáticos é frequentemente observado em pacientes com cistite. Além de sentir dor com volumes baixos de enchimento da bexiga e dor intensa na região suprapúbica, os pacientes com cistite, apresentam maior sensibilidade à pressão aplicada em tecidos profundos como os músculos (Ness *et al.*, 2005). A hipersensibilidade a estímulos mecânicos e térmicos também tem sido observada em pacientes com distúrbios como doença inflamatória intestinal e vulvodinia (Bohm-Starke *et al.*, 2001; Verne *et al.*, 2001). Dentro deste contexto, a cistite induzida por CYP em roedores é um modelo de dor visceral inflamatória restrito à bexiga urinária e comumente utilizado para mimetizar os sinais observados em humanos (Lantéri-Minet *et al.*, 1995; Olivar e Laird, 1999). Além disso, permite o uso de animais conscientes, favorecendo a avaliação das alterações comportamentais (Boucher *et al.*, 2000).

1.3 Inervação da bexiga urinária

A bexiga urinária é innervada pelos nervos pélvico e hipogástrico com corpos celulares nos gânglios da raiz dorsal (GRD) na região lumbosacral (LS, L6-S2) e toracolombar (TL, T13-L2) da medula espinhal, respectivamente (Applebaum *et al.* 1980). O nervo pélvico representa a maior parte da inervação aferente da bexiga urinária e é responsável pela sensação de distensão e enchimento da bexiga urinária, monitorando o volume urinário e as contrações do músculo detrusor durante a micção. O nervo pélvico é composto pelas fibras A δ mielinizadas e fibras C não mielinizadas. As fibras A δ estão localizadas no músculo detrusor, possuem baixo limiar mecânico e respondem à distensão e à contração da bexiga urinária, convertendo a informação sobre o estado de enchimento do órgão. As fibras C, localizadas principalmente no músculo detrusor e adjacentes às células uroteliais, apresentam um maior limiar mecânico que as fibras A δ , sendo insensíveis ao enchimento do órgão em condições fisiológicas e por isso, chamadas de “silenciosas”. Essas fibras respondem a estímulos nocivos como irritação química ou resfriamento e, em estados patológicos podem

ser sensibilizadas, tornando-se responsivas a estímulos mecânicos (Yoshimura e Chancellor, 2003). O nervo pélvico participa da sensação de distensão da bexiga e do processo de micção, enquanto a estimulação da bexiga urinária por estímulos mecânicos e químicos ativa também o nervo hipogástrico, contribuindo para a regulação do processo de micção e da sensação de dor após o dano ou irritação da bexiga urinária (Meen *et al.* 2001; Mitsui *et al.* 2001; Moss *et al.* 1997; Xu and Gebhart 2008).

A inflamação visceral também é acompanhada por um aumento da sensibilidade de estruturas somáticas a estímulos nocivos, o que é chamado de hipersensibilidade referida (Bon *et al.*, 2003). A avaliação direta da dor visceral é uma prática difícil, dessa maneira, a hipersensibilidade referida tem sido utilizada como medida de dor visceral em modelos experimentais de cistite (Jaggar *et al.*, 1999), pancreatite (Xu *et al.*, 2007) e colite (Eijkelkamp *et al.*, 2007). A cistite pode induzir alterações transitórias ou persistentes mediadas por neurotrofinas, principalmente o fator de crescimento neural (NGF), que contribuem para o aumento do estímulo nociceptivo. Acredita-se que o aumento da síntese periférica de NGF desempenha um papel fundamental na hipersensibilidade associada ao processo inflamatório, incluindo inflamação visceral. Através da sua ligação a receptores de tirosina quinase A (trkA) o NGF aumenta a expressão de neuropeptídeos, neurotransmissores e canais iônicos (Guerios *et al.*, 2006). O NGF sensibiliza os neurônios aferentes primários do nervo pélvico e neurônios do corno dorsal da medula espinhal após a administração de CYP, participando assim, do aumento da sensibilidade periférica a estímulos nociceptivos. Semelhante às observações feitas após a administração de CYP, a instilação intravesical de NGF reduziu o limiar dos membros inferiores a estímulos mecânicos, e este efeito foi revertido pelo tratamento com anticorpo anti-NGF (Guerios *et al.*, 2008). Isto sugere que a bexiga parece ser a fonte de NGF, responsável por mudanças na sensibilidade mecânica periférica em resposta a CYP.

1.4 Propriedades sensoriais das células uroteliais

As células epiteliais do trato urinário, conhecidas como células uroteliais, formam o urotélio, um tecido altamente especializado que reveste todo o trato urinário e atua como uma barreira de proteção contra os componentes nocivos da urina (Lavelle *et al.*, 2002; Khandelwal *et al.*, 2009). O urotélio consiste em três camadas distintas de células: uma camada basal, uma camada intermédia, e uma camada de grandes células hexagonais (25-250 μm de diâmetro) altamente diferenciadas, chamadas de células “guarda-chuva”.

Estudos mostram que os mecanismos sensoriais da bexiga urinária são controlados por fibras nervosas bem como por células uroteliais. As células uroteliais têm propriedades mecano e quimio-sensoriais e são capazes de se comunicar com as fibras nervosas aferentes, com o músculo detrusor e com células inflamatórias e do sistema imunológico (Khandelwal *et al.*, 2009). Nesse contexto, evidências sugerem que o urotélio atua tanto como um sensor, expressando receptores e canais iônicos capazes de responder aos estímulos térmicos, químicos e mecânicos, bem como um transdutor liberando mediadores químicos (Birder e De Groat, 2007). Exemplos de receptores neuronais que foram identificados no urotélio e que podem contribuir para a função sensorial do urotélio incluem os receptores para purinas (P2X1-7 e P2Y), adenosina (A1, A2a, A2b, e A3), norepinefrina (α e β), acetilcolina (muscarínicos e nicotínicos), receptores ativados por proteases (PARs), canais mecanosensíveis à amilorida (ENaC), bradicinina (B1 e B2), fator liberador de corticotrofina (CRF2), estrógenos (ER α e ER β), endotelinas, quimiocinas (CX3CR1, CXCR4, CCR2) e vários canais iônicos TRP (TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPM8 e TRPA1) (Ferguson *et al.*, 1997; Burnstock 2001; Birder *et al.*, 2002; Chopra *et al.*, 2005; Beckel *et al.*, 2006; LaBerge *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006; Yuridullah *et al.*, 2006; Vera *et al.*, 2008; Arms *et al.*, 2010; 2013; Birder *et al.*, 2013). A expressão desses receptores permite ao urotélio responder a inúmeros estímulos sensoriais. Esses estímulos incluem a distensão excessiva da bexiga durante o seu enchimento, os fatores solúveis presentes na urina como o EGF (fator de crescimento epidermal) e mediadores químicos como as citocinas e quimiocinas, substância P (SP), peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), acetilcolina, ATP (adenosina trifosfato), óxido nítrico, entre outros, liberados de células inflamatórias e fibras nervosas.

Quando a barreira urotelial está comprometida, água, uréia e substâncias tóxicas podem passar para o tecido subjacente (neurônios adjacentes e camadas musculares) contribuindo para o surgimento de sintomas como urgência, frequência, e dor durante o enchimento e esvaziamento da bexiga urinária. Em alguns estados patológicos, como na cistite induzida por CYP, o rompimento da barreira urotelial está associado com mudanças estruturais e alterações nos níveis de mediadores químicos, tais como NO e ATP. Ainda, esses mediadores são capazes de regular a atividade de neurônios sensoriais adjacentes e, portanto, estimular alterações vasculares locais e a contração da bexiga urinária (De Groat, 2006).

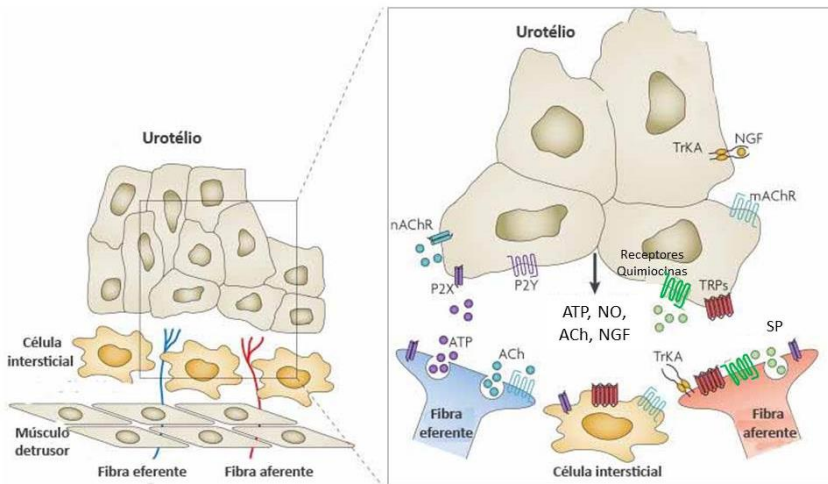


Figura 1: Interações entre as células uroteliais, fibras nervosas eferentes e aferentes e as células intersticiais na bexiga urinária. A estimulação de receptores e canais iônicos nas células uroteliais pode causar a liberação de mediadores que atingem as fibras nervosas e outros tipos de células da bexiga urinária. As células uroteliais também podem ser alvo de neurotransmissores liberados das fibras nervosas e outras células. ATP: adenosina trifosfato; ACh: acetilcolina; NO: óxido nítrico; P2X e P2Y: receptores purinérgicos; NGF: fator de crescimento derivado do nervo; TRPs: receptores de potencial transitório; SP: substância P; TrKA: receptor tirosina quinase A (adaptado de Fowler *et al.*, 2008).

1.5 Quimiocinas e seus receptores

As quimiocinas, ou citocinas quimiotáticas, são pequenas proteínas que participam do processo inflamatório e imune. Assim como as citocinas, as quimiocinas são secretadas pelos leucócitos e células teciduais, tanto de forma constitutiva, como induzida (Baggiolini *et al.*, 2001; Podolon *et al.*, 2002). Esses mediadores químicos estão implicados em uma série de processos biológicos e patológicos, agindo principalmente no controle da migração de leucócitos (Charo e Ransohoff, 2006; Savaurin-Vuaillet e Ransohoff, 2008). As quimiocinas e seus receptores possuem ações fundamentais na circulação das células mononucleares pelo organismo, na organização do sistema imune e na patogênese de diversas doenças. Além das células hematopoiéticas, as células endoteliais, musculares, epiteliais, entre outras, também expressam os receptores para quimiocinas (Rosenkilde e Schwartz, 2004).

As quimiocinas compreendem aproximadamente 50 moléculas formadas por polipeptídeos de 8 a 14-kDa, com 70 a 130 aminoácidos, que contêm duas alças dissulfeto internas (Baggiolini, 2001; Savaurin-Vuaillet e Ransohoff, 2008). São classificadas em quatro famílias de acordo com a presença e posição dos resíduos de cisteína, que formam as pontes dissulfeto, responsáveis pela conformação tridimensional das quimiocinas. Os resíduos de cisteína podem estar imediatamente adjacentes (quimiocinas CC) ou separados por um aminoácido qualquer (quimiocinas CXC). Existem ainda as quimiocinas XC e as quimiocinas CX₃C, que ocorrem em menor número. A nomenclatura é determinada pela estrutura (CC, CXC, XC e CX₃C) seguida de L (para ligante) e um número (Baggiolini, 2001; Le *et al.*, 2004; Moser e Williman, 2004; Jin *et al.*, 2008).

A maioria das quimiocinas é produzida em condições patológicas pelas células sanguíneas no sítio inflamatório, agindo no recrutamento de células imunes para a região afetada. Entretanto, algumas quimiocinas também estão envolvidas na manutenção da homeostasia, participando da maturação dos leucócitos, do controle da migração de linfócitos, da regulação da apoptose e da angiogênese (Jin *et al.*, 2008, Mélik-Parsadaniantz e Róstene, 2008). Além disso, as quimiocinas também parecem estar envolvidas no processo de modulação da dor (Abbadie *et al.*, 2009).

Depois de liberadas as quimiocinas exercem seus efeitos sobre receptores acoplados à proteína G, que possuem sete domínios transmembranares. A interação das quimiocinas com seus receptores leva à ativação de diversas vias de sinalização intracelular, o que resulta no influxo de cálcio e no rearranjo da actina celular, promovendo, assim, quimiotaxia (Rosenkilde e Schwartz, 2004; Charo e Ransohoff, 2006). Os receptores de quimiocinas são divididos em diferentes famílias, de acordo com o tipo de quimiocinas a que se ligam (Baggiolini, 2001; Abbas *et al.*, 2003; White *et al.*, 2005; Charo e Ransohoff, 2006). A nomenclatura é definida como CC, CXC, C, ou CX₃C, seguidas de R (para receptor) e um número (Baggiolini, 2001).

As quimiocinas CC têm a função de atrair células mononucleares aos locais de inflamação crônica. A principal representante deste grupo é a quimiocina CCL2 ou MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos), que induz os monócitos a deixarem a corrente sanguínea em direção ao tecido adjacente, tornando-se macrófagos teciduais. A MCP-1 é um potente agonista para monócitos, células dendríticas, linfócitos T de memória e basófilos. Outras quimiocinas do tipo CC incluem a CCL3 ou MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófagos), CCL4 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES) (Bone-Larson *et al.*, 2000; Ben-Baruch, 2006; Charo e Ransohoff, 2006). A fractalkina (CX3CL1) é a única quimiocina CX₃C identificada e seu receptor (CX3CR1) tem sua expressão associada à quimiotaxia e à adesão celular (Abbas *et al.*, 2003; Le *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Charo e Ransohoff, 2006). As linfocinas (XCL1 e XCL2) e seu receptor (XCR1) são os únicos representantes da família das quimiocinas XC bem caracterizados. Essas quimiocinas têm a função de atrair as células T precursoras para o timo (Abbas *et al.*, 2003; White *et al.*, 2005; Charo e Ransohoff, 2006).

As quimiocinas CXC (α -chemokines) apresentam cisteínas separadas por um aminoácido (X). Também podem ser classificadas em função da sequência específica ELR (glutamato-leucina-arginina), que pode estar presente imediatamente antes da primeira cisteína, como ELR⁺ e ELR⁻. A presença dessa sequência de aminoácidos influencia as funções angiogênica (ELR⁺CXC) e angiostática (ELR⁻CXC) das quimiocinas. (Strieter *et al.*, 2006). De forma geral, as quimiocinas do tipo CXC induzem a migração de neutrófilos e linfócitos (Le *et al.*, 2004). O protótipo desse grupo é a interleucina 8 (IL-8/CXCL8), uma quimiocina ELR⁺, que possui a função de atrair leucócitos polimorfonucleares para os sítios de

inflamação aguda. Além disso, ativa monócitos e pode direcionar estas células para lesões vasculares, levando à proliferação de células endoteliais (Van Damme *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Charo e Ransohoff, 2006). Outros exemplos desse grupo são a CXCL1/GRO- α e CXCL2/GRO- β . Esta classe de quimiocinas se liga a receptores CXC, classificados como CXCR1 a CXCR7. São expressos em diferentes células, apresentando seletividade para determinadas quimiocinas. Os receptores CXCR1 e CXCR2, ambos expressos na superfície de neutrófilos, apresentam grande homologia. Esses receptores interagem com a IL-8/CXCL8 e com outras quimiocinas ELR⁺. O receptor CXCR2 se liga também a CXCL1/GRO- α , CXCL2/GRO β , CXCL3/GRO- γ , CXCL5/ENA-78 e CXCL6 (Bone-Larson *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2003; White *et al.*, 2005; Charo e Ransohoff, 2006).

A maior parte dos receptores para as quimiocinas age sobre proteínas G do tipo inibitórias (G_i) ativando mecanismos de sinalização intracelular como as fosfolipases (A₂, β_2 e β_3 , D) e proteínas quinases (IP₃ quinase, proteína quinase C e tirosina quinase). Isso resulta no acúmulo de mediadores lipídicos como o IP₃, no influxo de cálcio e na ativação de pequenas GTPases, que coordenam os processos de adesão celular, polimerização da actina, eventos contráteis e polarização celular, permitindo o movimento celular (Rose *et al.*, 2004).

Um único receptor pode reconhecer e ser ativado por diferentes quimiocinas dentro de uma mesma subfamília, caracterizando uma superposição de seletividade. Ainda, alguns receptores podem se ligar tanto a CXC como CC quimiocinas, de modo semelhante (Gerard e Rollins, 2001; Le *et al.*, 2004). O padrão da expressão celular dos receptores determina quais os tipos de células que respondem a determinadas quimiocinas. Os receptores de quimiocinas podem ser regulados negativamente pela exposição contínua a quimiocinas, o que causa dessensibilização. Este parece ser o provável mecanismo de finalização das respostas iniciadas por fatores quimiotáticos (Abbas *et al.*, 2003).

O papel das quimiocinas já foi descrito em doenças autoimunes (artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico); rejeição de transplantes (rim, coração); infecções (agudas e crônicas, tanto bacterianas como virais); inflamação e alergias (asma, artrite, colite, psoríase), neoplasias (recrutamento de leucócitos, angiogênese), doenças vasculares (aterosclerose,

hipertensão) e na manutenção da dor (Gerard e Rollins, 2001; Moser *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2008; Manjavachi *et al.*, 2010). Neste contexto, tem sido sugerido que agentes capazes de bloquear os receptores de quimiocinas poderiam constituir uma nova classe de medicamentos, reduzindo as respostas inflamatórias e álgicas em diferentes situações clínicas (Baggiolini, 2001; Gerard e Rollins, 2001; Le *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Manjavachi *et al.*, 2010). O potencial de diferentes antagonistas dos receptores de quimiocinas foi avaliado para o tratamento de artrite reumatóide, mieloma múltiplo, colite e de processos dolorosos (Le *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Bento *et al.*, 2008; Manjavachi *et al.*, 2010).

1.6 Quimiocinas e seus receptores na bexiga urinária

Nos últimos anos tem se demonstrado crescente interesse acerca do papel das quimiocinas e seus receptores na inflamação da bexiga urinária. Foram relatadas alterações na expressão da quimiocina fractalkina (CX3CL1) e seu receptor (CX3CR1) na bexiga urinária após o tratamento agudo ou crônico com CYP (Yuridullah *et al.*, 2006). Outras quimiocinas também parecem estar envolvidas na patologia da cistite em humanos e roedores como, por exemplo, CXCL9, CXCL10 e CXCL11, que se ligam a um receptor comum, o CXCR3 (Sakthivel *et al.*, 2008). Além disso, o receptor CXCR4 e a quimiocina CXCL12 foram recentemente identificados na inflamação da bexiga urinária induzida pela CYP. Alguns estudos demonstraram que o receptor CXCR4 é expresso constitutivamente na bexiga e sua expressão no urotélio aumenta de forma marcante após a administração de CYP (Vera *et al.*, 2008; Arms *et al.*, 2010). Ainda, o bloqueio desse receptor na bexiga aumentou a capacidade da mesma, bem como o volume de urina eliminada em animais normais e, de maneira acentuada, em animais tratados com CYP. Dessa forma, o receptor CXCR4 parece ter papel importante na função da bexiga urinária normal e inflamada.

Os receptores quimiotáticos CXCR2 são expressos principalmente nos neutrófilos, ligando-se a IL-8 (CXCL-8) (Podolin *et al.*, 2002; Rose *et al.*, 2004). Os receptores CXCR2 foram identificados em diferentes tipos celulares e clonados a partir de diferentes espécies, inclusive de humanos (Murphy e Tiffany, 1991; Dunstan *et al.*, 1996; Catusse *et al.*, 2003a; Hipkin *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2007). O receptor CXCR2 apresenta afinidade também por outras quimiocinas $GRO\alpha$, CXCL5 e CXCL7

(Lee *et al.*, 1992; Petersen *et al.*, 1994; Ahuja e Murphy, 1996; Podolin *et al.*, 2002; Reutershan, 2006; Rose *et al.*, 2004).

Os receptores CXCR2 têm sido implicados em diversas desordens inflamatórias e alterações nociceptivas. Neste contexto, diversas evidências demonstraram que a CXCL8 (IL-8) é capaz de induzir alterações nociceptivas marcantes em modelos animais (Verri *et al.*, 2006). O composto SB225002 (N-(2-hidroxy-4-nitrofenil)-N'-(2-bromofenil) uréia) foi identificado em 1998 como o sendo o primeiro antagonista não-peptídico seletivo e competitivo para o receptor CXCR2. Posteriormente, sua capacidade de inibir a ligação da IL-8 ao CXCR2 em concentrações nanomolares foi determinada (White *et al.*, 1998; Catusse *et al.*, 2003). Outros estudos confirmaram a seletividade do SB225002 para o receptor CXCR2 e demonstraram seus efeitos sobre a migração de neutrófilos (Rosenkilde e Schwartz, 2004; Bizzarri *et al.* 2006). Como os neutrófilos estão envolvidos em diversas alterações patológicas, os antagonistas seletivos do receptor CXCR2, como o SB225002, podem representar alternativas terapêuticas potenciais (Reutershan *et al.*, 2006; Chapman *et al.*, 2007; Bento *et al.*, 2008; Manjavachi *et al.*, 2010).

1.7 Receptores TRPV1 na bexiga urinária

Os canais iônicos da família TRP (receptores de potencial transitório) são subunidades peptídicas com seis domínios transmembranares que se unem como tetrâmeros para formar poros que são permeáveis a cátions de maneira não seletiva. O receptor TRPV1 (receptor de potencial transitório vanilóide 1) é sensível ao pH ácido ($\leq 5,9$) e ao calor ($\geq 43^{\circ}\text{C}$) (Caterina *et al.*, 1997) e pode ser ativado por compostos pungentes, como a capsaicina e resiniferatoxina, e substâncias endógenas chamadas endovanilóides como a anandamida e derivados da lipoxigenase (Zygmunt *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000). A ativação desse receptor causa um aumento do influxo de cálcio, através do aumento da permeabilidade do canal iônico, causando um potencial de ação que se propaga ao sistema nervoso central, produzindo a sensação dolorosa (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Gunthorpe e Chizh, 2009).

Como dito anteriormente, a inervação aferente da bexiga urinária é constituída por pequenas fibras mielinizadas A δ e fibras amielinizadas do tipo C. Em condições normais, as fibras A δ são

responsáveis pela início do reflexo de micção, ou seja, o envio de sinais sobre a plenitude da bexiga para o sistema nervoso central. As fibras C são consideradas silenciosas em condições normais, mas são ativadas em condições neuropáticas e inflamatórias, contribuindo para o desenvolvimento da hiperatividade da bexiga urinária (Chancellor e de Groat, 1999). O receptor TRPV1 é expresso em ambas as fibras aferentes da bexiga urinária, participando da transmissão nociceptiva e da sensação mecânica na cistite (Daly *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Charrua *et al.*, 2010). Estudos experimentais utilizando camundongos nocaute para o receptor TRPV1 sugerem que o receptor funciona como um sensor mecânico na bexiga, influenciando o limiar de micção (Birder *et al.*, 2002). Além disso, parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento da hiperatividade da bexiga na cistite (Charrua *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Desta forma, os agonistas vanilóides, como a capsaicina e a resiniferatoxina têm sido utilizados intravesicalmente para dessensibilizar as fibras C aferentes, o que tem melhorado a continência, a urgência e a frequência urinária, a dor e, conseqüentemente, a qualidade de vida dos pacientes com hiperatividade da bexiga urinária e cistite (Chancellor e De Groat 1999; De Ridder *et al.*, 1997; De Ridder e Baert, 2000; Avelino *et al.*, 2002; Matsuoka *et al.*, 2012).

A maior parte da informação acerca da expressão do receptor TRPV1 em processos inflamatórios vem de modelos somáticos. Durante a inflamação somática, a expressão do receptor TRPV1 em neurônios dos gânglios da raiz dorsal pode ser alterada (Ji *et al.*, 2002, Chung *et al.*, 2011). Após a inflamação induzida por BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) a expressão do TRPV1 é aumentada em fibras nervosas da bexiga urinária de rato (Saban *et al.*, 2011). Além disso, pacientes com hiperatividade da bexiga de origem neurogênica apresentam um maior número de fibras imunorreativas ao TRPV1 na bexiga urinária (Brady *et al.*, 2004).

O receptor TRPV1 parece ser expresso não apenas nas fibras nervosas aferentes que inervam a bexiga, mas também em células não neuronais, como as células uroteliais, musculares e células intersticiais (Birder *et al.*, 2001;. Ost *et al.*, 2002;. Brady *et al.*, 2004;. Lazzeri *et al.*, 2004, 2005; Apostolidis *et al.*, 2005; Avelino e Cruz, 2006; Liu e Kuo, 2007; Charrua *et al.*, 2009). A expressão do receptor TRPV1 na bexiga urinária também parece ser responsável pela regulação da atividade muscular e diferenciação celular (Avelino e Cruz, 2006). Nas fibras nervosas, foi mostrado que o

receptor TRPV1 está intensamente co-localizado com CGRP e SP bem como com os receptores PARs (Dattilio & Vizzard 2005). A presença do TRPV1 em células uroteliais já foi confirmada em camundongos e ratos (Birder *et al.*, 2001, Kullmann *et al.*, 2009) e em humanos (Charrua *et al.*, 2009), apresentando funcionalidade em ambos os casos, isto é, sensíveis à capsaicina, ao pH e ao calor. No entanto, ainda existem controvérsias a respeito da expressão do TRPV1 em células uroteliais, pois alguns pesquisadores não detectaram a sua expressão ou funcionalidade, relatando diferenças entre as espécies estudadas (Everaerts *et al.*, 2010).

O principal estímulo para a ativação do TRPV1 em células uroteliais ainda é desconhecido. Diferentemente do que ocorre com as células neuronais, os prótons não parecem ser o estímulo, já que o pH da urina em estado fisiológico é ácido. No entanto, pode-se dizer que o TRPV1 é ativado em estados patológicos, como na inflamação da bexiga urinária e, portanto, se torna mais sensível à urina ácida, o que poderia levar a um aumento da atividade reflexa da bexiga urinária. Corroborando com esta hipótese, Birder e colaboradores (2001) demonstraram que a capsaicina e prótons H^+ estimulam o influxo de cálcio através do canal, causando a liberação de NO pelo urotélio da bexiga inflamada (Birder *et al.*, 2001). Além disso, a estimulação do receptor TRPV1 com capsaicina induz a liberação de ATP nas células uroteliais também (Charrua *et al.*, 2009). Isto é interessante porque a secreção de ATP pelas células uroteliais é um comunicador chave entre o urotélio e as fibras sensoriais. Esta liberação ocorre durante o enchimento da bexiga e atua sobre os receptores P2X expressos nas fibras sensoriais, contribuindo para a sensação de plenitude da bexiga (Birder, 2010). Além disso, o estiramento induzido pela liberação de ATP a partir do urotélio foi diminuído em animais nocautes para TRPV1 em comparação com animais controle (Birder *et al.*, 2002). Esses achados podem ter grande relevância clínica, pois pacientes com cistite apresentam uma maior expressão de TRPV1 no urotélio (Liu & Kuo 2007) e níveis elevados de ATP na urina (Sun *et al.*, 2001, Sun & Chai, 2006). Estes dados suportam a ideia de que estímulos mecânicos e químicos são capazes de ativar indiretamente os aferentes da bexiga urinária através da liberação de mediadores pelo urotélio. Evidências recentes mostraram o aumento da expressão e da função do receptor TRPV1 (medida eletrofisiologicamente) em células uroteliais isoladas de pacientes com diagnóstico de bexiga hiperativa (Li *et al.*, 2011; Birder *et al.*, *in press*). Assim, parece provável que o TRPV1 urotelial participe de

maneira similar aos neurônios na detecção de estímulos irritantes na inflamação da bexiga urinária.

A cistite aumenta os níveis de ligantes endógenos do TRPV1 como a anandamida (Dinis *et al.*, 2004) na bexiga urinária. Além disso, o número de neurônios sensoriais que expressam o receptor TRPV1 aumenta após a inflamação da bexiga com ciclofosfamida (Avelino *et al.*, 2013). Isto pode estar relacionado com níveis elevados de fatores neurotróficos, como o NGF, produzidos pelo processo inflamatório da bexiga (Guérios *et al.*, 2006; Vizzard, 2000b). O NGF aumenta a tradução do receptor TRPV1 (Ji *et al.*, 2002) e libera-o do controle inibitório do fosfatidilinositol-4 ,5-bifosfato (PIP₂) (Chuang *et al.*, 2001). Além disso, a ativação da proteína quinase A (PKA) (De Petrocellis *et al.*, 2001), da proteína quinase C (PKC) (Cesare *et al.*, 1999.; Premkumar e Ahern *et al.*, 2000), e da proteína quinase dependente de Ca⁺²/calmodulina (CaMKII) (Jung *et al.*, 2004) por mediadores inflamatórios podem aumentar a atividade do receptor TRPV1 através da sua fosforilação. Também deve ser mencionado que o aumento da expressão dos receptores PAR2-4 recentemente detectado em fibras nervosas e células uroteliais da bexiga inflamada que expressam TRPV1 (Dattilio e Vizzard, 2005), pode contribuir para sensibilizar o receptor TRPV1 através da fosforilação mediada por PKC (Amadesi *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2004).

Embora a participação do receptor TRPV1 em estados patológicos esteja mais evidente, sua função na fisiologia da bexiga urinária ainda é controversa. A capsazepina, mesmo em concentrações muito elevadas, não teve efeito na atividade funcional da bexiga urinária (Dinis *et al.*, 2004). Por conseguinte, a frequência das contrações vesicais reflexas dos animais selvagens e nocautes para o receptor foi similar (Silva *et al.*, 2004; Charrua e Avelino, observações não publicadas). Todavia, estes dados diferem dos apresentados por Birder e colaboradores (2002) que concluíram que a deleção do gene para o receptor TRPV1 aumenta a capacidade de armazenamento da bexiga e a frequência das contrações não associadas à micção (CNMs). Através de análises cistométricas foi observado que animais com deleção gênica para o receptor TRPV1 apresentaram menor eliminação de urina em comparação com os animais controle (Birder *et al.*, 2001). Ainda, esses animais, apresentaram respostas neurais alteradas para a distensão da bexiga urinária, demonstrando o papel do TRPV1 na excitabilidade dos aferentes da bexiga (Daly *et al.*, 2007). No entanto, estes dados

são conflitantes, pois animais nocautes para TRPV1 apresentaram parâmetros urodinâmicos normais (Charrua *et al.*, 2007). Em conjunto, estes resultados apoiam um papel mais amplo para o TRPV1 na bexiga urinária, incluindo o seu envolvimento na função de micção além da sensação de dor (Birder e Andersson, 2013).

O bloqueio farmacológico ou a deleção gênica do receptor TRPV1 demonstrou que este receptor é essencial para o desenvolvimento da hiperatividade da bexiga e da dor na cistite (Charrua *et al.*, 2007). A administração do antagonista TRPV1, o GRC-6211, reduziu a hiperatividade da bexiga e a frequência de micção em modelos de inflamação aguda e crônica (Charrua *et al.*, 2009). Estudo recente mostrou que animais nocaute para o receptor TRPV1 apresentaram aumento da capacidade da bexiga urinária e redução na expressão de c-fos na medula espinhal, em resposta à distensão da bexiga (Andersson *et al.*, 2010), além de inibição do desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica visceral (Daly *et al.*, 2007; Lei *et al.*, 2013).

Trabalhos recentes relataram que o antagonista seletivo do receptor TRPV1, o SB366791, é capaz de diminuir a liberação de citocinas inflamatórias e a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (Varga *et al.*, 2005; Paszcuk *et al.*, 2008). Também foi verificada uma diminuição do edema, bem como da atividade da MPO e da resposta nociceptiva espontânea induzida pela tripsina na pata de ratos (Paszcuk *et al.*, 2008). Ainda, o SB366791 diminuiu o influxo de cálcio em células neuronais, de maneira dose-dependente (Varga *et al.*, 2005). Nesse contexto, a avaliação do receptor TRPV1, através do seu bloqueio farmacológico com o antagonista SB366791, se torna importante na busca um maior entendimento acerca do seu papel na inflamação da bexiga urinária.

1.8 Quimiocinas e receptores TRPV1

Como relatado anteriormente, durante o processo inflamatório diversos mediadores são gerados como a bradicinina, NGF e prostaglandina E2, contribuindo para o desenvolvimento de hiperalgesia através da regulação da expressão, sensibilidade e funcionalidade do receptor TRPV1. Alguns mecanismos moleculares, envolvendo esses mediadores já foram identificados como responsáveis pelo aumento da percepção da dor mediada pelo receptor TRPV1 como: aumento da produção de ligantes endógenos do TRPV1, aumento da sensibilidade do receptor devido

à fosforilação da PKC, inibição da adaptação devido à fosforilação da PKA e remoção do inibidor endógeno PIP2 pela PLC.

Recentemente, foi demonstrado que as quimiocinas secretadas durante o processo inflamatório parecem estar envolvidas no aumento da percepção da dor, através da sensibilização dos receptores periféricos TRPV1. Em 2005, Zhang e Oppenheim demonstraram que a exposição de células neuronais às quimiocinas aumentava a sensibilidade do receptor TRPV1. Neste contexto, o mesmo grupo relatou que a quimiocina CCL3 foi capaz de promover a sensibilização do receptor TRPV1 *in vitro*, através do aumento do influxo de cálcio em células neuronais. Além disso, a injeção intraplantar de CCL3 na pata de rato diminuiu o limiar nociceptivo em resposta ao estímulo doloroso de calor, reforçando os resultados obtidos *in vitro* (Zhang *et al.*, 2005). Ainda, um trabalho recente demonstrou que a quimiocina CCL2 (MCP-1) aumenta a função do receptor TRPV1 bem como a expressão do seu RNAm em neurônios do GRD, contribuindo para o desenvolvimento da hiperalgesia (Kao *et al.*, 2012).

Estudos comportamentais com roedores sugerem que as quimiocinas como CCL2, CCL3 e KC (quimiocina derivada de queratinócitos) aumentam a sensação de dor através da ativação de receptores TRPV1 (Oh *et al.*, 2001; Cunha *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Três possíveis mecanismos têm sido propostos para explicar essa sensibilização. O primeiro sugere que os receptores de quimiocinas sensibilizam os receptores TRPV1 nos neurônios sensoriais contribuindo assim para o aumento da percepção da dor (Zhang *et al.*, 2005). Dessa maneira, o padrão da expressão do receptor de quimiocina CCR1 nos neurônios do GRD parcialmente se sobrepõe com a expressão do receptor TRPV1 e aproximadamente 40% dos neurônios expressam ambos os receptores. O pré-tratamento com a quimiocina CCL3 (MIP-1 α ; Proteína inflamatória de macrófago - 1 α), ligante endógeno do receptor CCR1, aumenta a sensibilidade do receptor TRPV1 à capsaicina em ensaios *in vitro* de influxo de cálcio. Esses efeitos parecem ser resultado da remoção do inibidor endógeno do TRPV1, o PIP2, e da fosforilação do receptor pela PKC (Zhang *et al.*, 2008). A injeção intraplantar de CCL3 em camundongos diminuiu o limiar de retirada da pata após estímulo de calor, indicando a relevância do estudo *in vitro*. As quimiocinas e seus receptores em neurônios de pequeno diâmetro, indiretamente sensibilizam o receptor TRPV1, sugerindo que esse processo contribui para a hiperalgesia durante a

inflamação. A segunda hipótese é que o influxo de cálcio induzido pela quimiocina seria suficiente para causar a despolarização dos neurônios sensoriais e gerar um sinal que vai ser reconhecido como dor pelo sistema nervoso central (SNC) (Oh *et al.*, 2001). Finalmente, é provável que as citocinas e quimiocinas geradas no processo inflamatório induzam a produção de prostaglandina, bradicinina, e outros mediadores celulares que podem sensibilizar indiretamente o receptor TRPV1 (Cunha *et al.*, 2005). Dessa maneira, pode-se dizer que durante o processo inflamatório, a ativação dos receptores de quimiocinas contribui para a sensibilização do receptor TRPV1, facilitando a transmissão dolorosa e causando hiperalgesia.

Diante do exposto, a ativação e/ou sensibilização do receptor TRPV1 poderia consistir em um evento secundário à ativação dos receptores quimiotáticos CXCR2 na cistite induzida por CYP. Dessa forma, buscamos avaliar a participação dos receptores CXCR2 e TRPV1 nas alterações estruturais, sensoriais e funcionais da bexiga urinária induzidas por CYP.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a participação do receptor CXCR2 para quimiocinas bem como a sua interação com os receptores TRPV1, nas alterações fisiopatológicas associadas à cistite hemorrágica induzida pela CYP.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do bloqueio farmacológico dos receptores CXCR2 e TRPV1 nas alterações nociceptivas na cistite induzida pela CYP;
- Analisar o efeito do bloqueio farmacológico dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre o processo inflamatório vesical causado pela CYP;
- Avaliar o efeito do bloqueio farmacológico dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre os níveis de citocinas na bexiga de animais tratados com CYP;
- Caracterizar a expressão do RNAm dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga após o tratamento com CYP;
- Determinar a localização dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga e nos neurônios do GRD após o tratamento com CYP.
- Avaliar a participação dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre as alterações urodinâmicas na cistite induzida pela CYP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando ratos Wistar fêmeas (150 a 220 g), provenientes do biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) da UFSC e criados em condições estéreis. Os animais foram alojados em grupos de 5 animais por caixa (42 x 34 x 17 cm) e mantidos em câmaras ventiladas (ALESCO[®]) em temperatura e umidade controladas ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 60 a 80% de umidade), em ciclo de 12h claro/escuro; com água e ração fornecidos *ad libitum*. Os experimentos descritos foram conduzidos de acordo com as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institute of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América (Publication No. 85-23, revisado em 1996). Durante os procedimentos experimentais, a temperatura do laboratório foi mantida em $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Foi utilizado um tempo mínimo de adaptação ao novo ambiente de pelo menos 1 h, no qual os animais continuaram com livre acesso à água e à ração. Os procedimentos de imobilização antes dos tratamentos foram realizados de acordo com os princípios descritos por Waynforth e Flecknell (2004), de forma a não produzir estresse ao animal. Para eutanásia, foi utilizada câmara de CO_2 , um método altamente recomendado, que apresenta a rapidez, a eficácia e a facilidade necessárias. O número de animais e a intensidade dos estímulos foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes do estudo. Todos os protocolos experimentais utilizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFSC (processo PP00607).

3.2 Indução da cistite

A indução da cistite foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Boucher e colaboradores (2000). Inicialmente, os animais foram anestesiados com isoflurano (2% em 100% de O_2 , durante 2 minutos) e receberam uma injeção de CYP (200 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.). Os animais do grupo controle receberam solução salina (NaCl 0,9 %, 10 ml/kg, i.p.). A administração intraperitoneal de CYP não produz lesão ou inflamação em outros tecidos abdominais, exceto sobre a bexiga urinária (Olivar e Laird, 1999). O modelo de cistite hemorrágica

induzida por CYP apresenta a vantagem de não necessitar cirurgia ou intubação. Além disso, por causar dor, mimetiza os sintomas de dor visceral em humanos.

Na etapa de avaliação do efeito dos antagonistas seletivos dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre as alterações observadas na cistite induzida por CYP, as doses dos mesmos foram escolhidas com base em estudos iniciais ou publicações prévias do nosso grupo de pesquisa (Marotta *et al.*, 2009; Manjavachi *et al.*, 2010; Paszcuk *et al.*, 2008). Diferentes grupos de animais foram tratados 30 min antes da administração de CYP com o antagonista seletivo dos receptores CXCR2, o SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), com o antagonista seletivo dos receptores TRPV1, o SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.) ou com a combinação de ambos os antagonistas (0,3 mg/kg, i.p., cada). O grupo de animais controle recebeu veículo nos mesmos esquemas de administração.

3.3 Avaliação das respostas nociceptivas

3.3.1 Parâmetros comportamentais

A avaliação da resposta nociceptiva foi realizada de acordo com a metodologia descrita previamente por Boucher e colaboradores (2000). A CYP induz modificações marcantes no comportamento de ratos e essas estão diretamente relacionadas com a dose de CYP utilizada. As alterações comportamentais consistem na diminuição da taxa/frequência respiratória, fechamento dos olhos e ocorrência de posturas específicas. A intensidade dos distúrbios comportamentais está ligada com a evolução do processo inflamatório da bexiga, o que sugere que essas modificações no comportamento representam a expressão da dor sentida pelos animais (Boucher *et al.*, 2000).

Os animais foram colocados individualmente em caixas acrílicas transparentes (9 x 7 x 11 cm) para observação e foram ambientados durante um período de 1 hora antes da realização do teste comportamental. Os experimentos foram realizados entre 8 e 18 horas a fim de minimizar as variações nas respostas comportamentais. A nocicepção visceral associada à cistite hemorrágica foi avaliada através dos seguintes parâmetros comportamentais: (I) frequência respiratória; (II) abertura dos olhos e

(III) postura específica de imobilidade. Os animais foram observados em diferentes intervalos de tempo (1 - 48 h) após a injeção de CYP. Para avaliação da taxa de respiração, a cada decréscimo de 10 ciclos/min foi atribuído 1 ponto (controle: 140 ciclos/min). Para a avaliação da abertura e o fechamento dos olhos, cinco graus da escala foram definidos: 0 para a abertura completa, que corresponde aos olhos normais; 10 para olhos completamente fechados; 5 para os olhos semifechados e 2 e 7 para posições intermediárias. A postura específica de imobilidade foi determinada como “*rounded-back*” (costas arredondadas) ou “*limpness*” (flacidez, corpo alinhado ao chão), a qual foi atribuída a pontuação de 10. Quando nenhuma postura específica de imobilidade foi observada a pontuação foi de zero. As respostas nociceptivas foram avaliadas como a somatória desses parâmetros (Tabela 1). Todos os experimentos foram realizados de forma que o avaliador não tivesse conhecimento dos tratamentos realizados em cada grupo experimental.

Tabela 1: Escore comportamental nociceptivo

FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA	
Score	Avaliação
0	Normal (animal controle: 140 ciclos/min)
1	decréscimo de 10 ciclos/min
FECHAMENTO DOS OLHOS	
Score	Avaliação
0	Olhos abertos
2	Intermediário
5	Olhos semifechados
7	Intermediário

10	Olhos completamente fechados
POSTURA DE IMOBILIDADE	
Escore	Avaliação
0	Normal
10	Imobilidade, costas arredondadas ou corpo alinhado ao chão

3.3.2. Análise da hipersensibilidade mecânica através do filamento de von Frey

Sabe-se que a inflamação da bexiga urinária está relacionada com a sensibilização de áreas somáticas. Em humanos, essa sensibilidade periférica tem sido observada na pele do abdômen e na região pélvica, enquanto que em ratos está associada com uma hipersensibilidade na base da cauda, nas patas traseiras e na região abdominal (Ness *et al.*, 2005; Augé *et al.*, 2013).

Para avaliar a hipersensibilidade mecânica periférica, os animais foram colocados individualmente em compartimentos de acrílico transparente individuais (9 x 7 x 11 cm) localizados em uma plataforma de arame elevada, para permitir o acesso à região da pata e do abdômen. Os animais foram ambientados por 30 min antes dos testes comportamentais. A frequência de resposta de retirada foi obtida através de 10 aplicações (duração de 1 s cada e intervalo de 10 s entre cada aplicação) do filamento de von Frey 8 g na pata direita e 26 g na região abdominal (VFH, Stoelting, Chicago, EUA). A resposta foi considerada positiva quando a pata foi bruscamente retirada ou quando o animal lambeu ou encolheu a pata. Os seguintes comportamentos foram considerados respostas positivas à estimulação da região abdominal: retração acentuada do abdômen, saltar, lambeu ou coçar imediatamente a região abdominal. O limiar mecânico foi avaliado após a indução da cistite por CYP em diferentes intervalos de tempo (1, 4, 8, 24 e 48 h).

3.4 Análise histopatológica da bexiga urinária

3.4.1 Análise macroscópica

Os animais foram submetidos à eutanásia 24 h após a administração de CYP (200 mg/kg, i.p.) e as bexigas urinárias foram removidas para a análise macroscópica. As bexigas urinárias foram dissecadas e pesadas e o edema vesical foi quantificado através do aumento do peso úmido do tecido e expresso em gramas por 100 g de peso corporal. Foi feito um corte em “Y” na bexiga, a fim de visualizar toda a parte interna da mesma e o tecido foi analisado sob uma lupa cirúrgica. A aparência da bexiga urinária foi graduada de acordo com a escala estabelecida por Gray e colaboradores (1986) para a presença de edema e hemorragia (Tabela 2):

Tabela 2: Escore utilizado para avaliação do dano macroscópico na bexiga urinária

	ESCORE	EDEMA	HEMORRAGIA
Normal	0	Nenhum	Nenhum
Leve	1	Intermediário	Dilatação dos vasos da bexiga
Moderado	2	Restrito à mucosa interna	Hematomas na mucosa
Severo	3	Mucosa interna e externa	Coágulos intravesicais

3.4.2 Análise Microscópica

Vinte e quatro horas após a administração de CYP os animais foram anestesiados, submetidos à eutanásia e perfundidos pela via transcardíaca com solução de PBS (solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2 a 7,4) e paraformaldeído 4%. As bexigas urinárias foram removidas, fixadas em paraformaldeído 4% por 48 h, desidratadas em etanol 70% por 24 h e diafanizadas em xilol. A seguir, os tecidos foram incluídos em parafina, seccionados a uma

espessura de 5 μm , transferidos para lâminas de vidro, desparafinizados e corados com o hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscópio óptico. As alterações histológicas foram classificadas de acordo com os critérios de Gray e colaboradores (1986), como seguem:

Tabela 3: Escore utilizado para a avaliação do dano microscópico na bexiga urinária

ESCORE MICROSCÓPICO	
Escore	Avaliação
0	Epitélio normal, sem sinais de inflamação
1	Alterações discretas: diminuição do epitélio por descamação, achatamento das dobras da mucosa, edema e hemorragia leve, poucas ulcerações
2	Alterações severas: erosão da mucosa, infiltração de células inflamatórias, edema e hemorragia acentuados, deposição de fibrina, múltiplas ulcerações

3.5 Atividade da enzima MPO na bexiga urinária

O recrutamento de neutrófilos para a bexiga urinária foi quantificado indiretamente através da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), segundo o método descrito por Andrade e colaboradores (2011), com algumas modificações. Para isso, após a eutanásia dos animais as bexigas urinárias foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (1-48h), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram homogeneizadas a 5 % (peso/volume) em tampão EDTA/NaCl (pH 4,7) e centrifugadas a 10000 rpm por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O precipitado resultante foi ressuspenso em tampão 1 gelado (pH 7,4; NaCl 0,1 M, NaPO_4 0,02 M e NaEDTA 0,015 M). Adicionou-se então NaCl 0,2 % gelado e após 30 s NaCl 1,6 % contendo glicose 5 % (gelado). A

solução foi centrifugada a 10000 rpm, por 15 min a 4 °C. O precipitado formado foi ressuspensão em tampão 2 gelado [pH 5,4; NaPO₄ 0,05 M e hexadeciltrimetilamônio (H-TAB) 0,5 %] e as amostras obtidas foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido. Após o último descongelamento, as amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm por 15 min a 4 °C, e 25 µl do sobrenadante foram usados para o ensaio de MPO. A reação enzimática foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB; 1,6 mM), NaPO₄ (80 mM) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 0,3 mM). A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 690 nm e os resultados expressos em densidade óptica (DO) por mg de tecido.

3.6 Dosagem de citocinas na bexiga urinária

Os níveis de IL-1β e de TNFα teciduais foram avaliados utilizando o método previamente descrito por Bento e colaboradores (2008), com algumas modificações. Após o tratamento com CYP (200 mg/kg, i.p.), os animais foram submetidos à eutanásia e as bexigas urinárias coletadas em diferentes intervalos de tempo (1-48h). Os tecidos foram homogeneizados em salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4; NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, filtrado a 0,2 mm) contendo: NaCl 0,4 M, PMSF 0,1 M, EDTA 10 mM, 0,05% de Tween 20, 0,5% de BSA e 2 µg/ml de aprotinina A. Posteriormente, foram centrifugados a 3000 g, por 10 min a 4 °C, sendo o sobrenadante obtido utilizado para o ensaio. Os níveis de citocinas foram determinados através de kits de ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*), de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems®, Minneapolis, MN, EUA). A quantificação de proteínas presentes nas amostras foi realizada através do método de Bradford (Bradford, 1976). Os resultados foram expressos em pg/mg de tecido.

3.7 Expressão dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária

3.7.1 Extração do RNA total

Para a extração do RNA total (RNAt), amostras de bexiga urinária foram coletadas nos períodos de 1, 4, 8, 24 e 48h após a administração de CYP, e foram rapidamente colocadas em Trizol®

(Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) na proporção de 1 ml do reagente para cada 100 mg de tecido. Os tecidos foram homogeneizados com triturador automático. Ao homogenato foram adicionados 200 µl de clorofórmio sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (12000 x g, 15 min, 4 °C). A fase aquosa contendo RNA_t foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 500 µl de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso em temperatura ambiente durante 10 min. A mistura foi centrifugada (12000 x g, 15 min, 4 °C) sendo o pellet resultante ressuspensão em 1 ml de etanol 75% gelado. Após a centrifugação (7000 x g, 5 minutos 4 °C) o pellet contendo RNA foi dissolvido em água tratada com 0,1 % de dietilpicrocarbonato (DEPC), sendo a concentração e a pureza determinadas pelo espectofotômetro NanoDrop 1100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). O RNA foi aliqotado e estocado a - 70 °C até o momento do uso. Após a obtenção do RNA, foi realizado o ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real, como descrito abaixo).

3.7.2 Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

Com o objetivo de determinar o efeito da CYP sobre os níveis de RNAm para os receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time PCR*). Para a reação da transcrição reversa, foi utilizada a enzima *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Amostras de bexiga urinária contendo 2 µg de RNA total foram incubadas com 1 µg de oligo dT (500 µg/ml), 1 µl de dNTPs mix (10 mM) e água ultrapura para um volume final de 12 µl. Para a obtenção do DNA complementar (DNAc) as amostras foram aquecidas a 65 °C por 5 minutos, resfriadas a 4 °C por 5 minutos para a adição de 4 µl de tampão de primeira fita [(250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂), 2 µl de DTT (0,1 M)] e 1 µl de inibidor de RNase. A mistura foi incubada a 37 °C por 50 min e a reação foi inativada a 75 °C por 15 min. O DNAc foi estocado a 4 °C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação de PCR foi realizada para promover a amplificação do DNAc para o CXCR2, TRPV1 e para a β-actina. Para tal, o DNAc foi amplificado em duplicata utilizando o kit Master Mix TaqMan[®] Universal PCR (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil), com primers específicos para ratos com

marcação 3' quencher MGB e FAM, para o CXCR2 (Rn03993699_s1), para o TRPV1 (Rn01460299_s1) e 3' quencher MGB e VIC para o controle endógeno β -actina ACTB (Rn00667869_m1) (Applied Biosystems). A reação de PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços (Applied Biosystems). Cada reação continha: 1 μ l de DNAC (300 ng), 5 μ l de Master Mix (2x), 0,5 μ l de primer (sonda TaqMan) e 3,5 μ l de água ultrapura em um volume final de 10 μ l. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus; Applied Biosystems) para 55 ciclos. Os parâmetros do termociclador foram os seguintes: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 55 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a quantificação relativa (QR). A expressão do gene alvo foi calibrada em relação a condições encontradas em animais controle.

3.8 Localização dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária e GRD

3.8.1 Protocolo para imunomarcção

Num outro conjunto de experimentos, os animais foram perfundidos pela via transcardíaca com PBS (0,1 M; pH 7,4), seguido de solução de paraformaldeído (PFA 4%), 24h após a administração da CYP. Após a perfusão, a bexiga urinária e o gânglio da raiz dorsal (GRD; L6-S2) foram removidos e fixados em paraformaldeído 4% por 4 h e subsequentemente crioprotetidos em solução de sacarose 30% por 12 h a 4 °C. Após, as amostras foram incorporadas e congeladas em meio específico Tissue-Tek® (Sakura® Finetek, Torrance, Califórnia, EUA) e as fatias congeladas de bexiga urinária e GRD (6 μ m) foram obtidas com o auxílio de um criostato. Imediatamente após esta etapa, os cortes foram montados em lâminas de vidro limpas e previamente gelatinizadas com gelatina porcina (1%, pH 7,4). Subsequentemente, os cortes foram processados conforme descrito a seguir. Após lavagem (3x) com PBS, as lâminas foram incubadas durante 30 min com um tampão de bloqueio 1% de albumina de soro bovino (BSA 1%) diluída em PBS para bloqueio dos sítios inespecíficos. Uma solução mista de anticorpos primários foi aplicada: anticorpo monoclonal de coelho anti-CXCR2 (1:100) e anticorpo policlonal de camundongo anti-TRPV1 (1:200) e incubados durante a noite (14 a 16 horas) a 4 °C.

Após lavagem com PBS (3x, 5 minutos), os cortes foram incubados com os anticorpos secundários Alexa Fluor[®] 488 (verde) Alexa Fluor[®] 568 (Vermelho), numa solução de mistura, ambos na concentração de 1:250. Os núcleos (azul) foram corados com Hoechst (0,5 ml/ml). Após as incubações, os cortes foram lavados novamente com PBS (3x, 5 minutos) montados com Tissue-Tek[®] e lamínula limpa. As imagens foram obtidas utilizando um modelo de microscópio de fluorescência BX41 (Olympus America Inc., Center Valley, PA, EUA).

3.9 Avaliação urodinâmica através da cistometria

Com o objetivo de aprofundar o estudo acerca da participação dos receptores CXCR2 e TRPV1 na hiperatividade urinária induzida pela CYP, o processo miccional foi avaliado através da análise dos parâmetros urodinâmicos, utilizando a técnica de cistometria. Este protocolo experimental foi realizado 24h após a indução da cistite com CYP. Após anestesia intraperitoneal com uretano (0,9 - 1,2 g/kg), um cateter de polietileno (PE-60; Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) foi inserido através de uma pequena incisão feita no corpo da bexiga urinária. O cateter intravesical foi conectado por meio de uma torneira de três vias a um transdutor de pressão (ADInstruments, Castle Hill, Austrália) para registrar a pressão intravesical e a uma bomba de infusão (Insight Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil) para permitir a infusão contínua de solução salina para o interior da bexiga urinária. A pressão intravesical foi registrada continuamente usando um programa de aquisição de dados (PowerLab 8/30; ADInstruments). Após a implantação do cateter, os animais foram mantidos aquecidos e em repouso durante 30-60 minutos para a estabilização da bexiga urinária. Após este período, os animais receberam infusão contínua de salina (NaCl, 37 °C) a uma taxa de 0,1 ml/min.

Os parâmetros cistométricos avaliados foram: pressão de micção (PM, pressão intravesical máxima durante a micção), pressão basal (PB, menor pressão intravesical entre as micções), pressão limiar (PL, pressão intravesical imediatamente antes da micção) e intervalo entre as contrações (IC). A amplitude e o número de contrações não associadas à micção (CNMs) também foram avaliadas. Baseado em estudo prévio realizado por Ogawa e colaboradores (2008), as CNMs foram definidas como a pressão

intravesical rítmica maior que 5 mmHg (aproximadamente 7cm H₂O) em relação à pressão basal sem a liberação de salina da uretra.

O volume de salina eliminado pela uretra (VE) foi coletado e medido. A fim de determinar o volume residual (VR), a infusão de salina foi interrompida no início de uma contração de micção e o VR medido pela retirada de salina através do cateter intravesical e pelo esvaziamento do conteúdo intravesical pela pressão manual sobre a bexiga urinária. A capacidade da bexiga urinária (CBU) foi calculada como a soma do VE e do VR. A eficiência no esvaziamento vesical (EEV) foi estimada em porcentagem de acordo com a equação: $EE = [(VE/CBU) \times 100]$.

Os parâmetros urodinâmicos foram calculados a partir de ciclos de micção obtidos durante 30 minutos. Inicialmente foram comparados os ciclos de micção de dois grupos experimentais: animais controle (salina) e animais tratados com CYP. Posteriormente, o efeito do bloqueio dos receptores CXCR2 e TRPV1 foi avaliado comparando os ciclos de micção do grupo de animais tratados com CYP com o grupo de animais tratados com CYP pré-tratados com os antagonistas.

3.10 Drogas e reagentes

As seguintes drogas foram utilizadas: uretano, aprotinina, hematoxilina, eosina, EDTA, HTAB, peróxido de hidrogênio, TMB, Tween 20, Tween 80 e parafina foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). TNF- α e IL-1 β DuoSet kits foram obtidos da R&D systems (Minneapolis, MN, EUA). SB225002 (N-(2-hidroxi-4-nitrofenil)-N9-(2-bromofenil)-uréia foi sintetizado como descrito anteriormente (White *et al.*, 1998) e dissolvido em solução de NaCl 0,9% contendo 1% de Tween 80, O SB366791 (4'-cloro-3-methoxycinnamanilide) foi obtido da Tocris Cookson (Cookson Inc., Ellisville, MO, EUA) e diluído em 2% de etanol absoluto em solução de NaCl 0,9%. Os animais do grupo controle receberam o veículo correspondente ao protocolo experimental empregado. Anticorpo monoclonal de camundongo anti-TRPV1 e anticorpo policlonal de coelho anti-CXCR2 foram obtidos da Abcam (Cambridge, MA, USA). Os anticorpos secundários Alexa fluor[®] 488 e Alexa fluor[®] 568 foram obtidos da Invitrogen Life Technologies (Grand Island, NY, EUA).

3.11 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (e.p.m) de 6-8 animais. As porcentagens de inibição ou de aumento estão apresentadas como a média \pm erro padrão da média das inibições ou do aumento máximo obtidos para cada experimento individual. A significância estatística entre os grupos foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls ou ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. A análise estatística para os experimentos comportamentais foi realizada por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste de Newmann-Keuls. Os valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes. Todas as comparações estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da resposta nociceptivas induzidas pela CYP

Inicialmente, foi demonstrado que, a administração de CYP (200 mg/kg, i.p.) induziu alterações comportamentais marcantes como: fechamento dos olhos, diminuição da taxa de frequência respiratória e posturas específicas de imobilidade, avaliadas através do escore nociceptivo (Figura 2). O pré-tratamento dos animais com o antagonista seletivo do CXCR2, o SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) ou com o antagonista seletivo do TRPV1, o SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.) causou diminuição significativa das alterações comportamentais nociceptivas induzidas pela CYP ($20,9 \pm 0,4\%$ e $40,6 \pm 0,4\%$, respectivamente). Além disso, a combinação dos antagonistas (SB225002 e SB366791; 0,3 mg/kg cada, i.p.) diminuiu de maneira acentuada o comportamento nociceptivo induzido pela CYP ($80,9 \pm 0,4\%$). Foram observadas, ainda, diferenças significativas entre os tratamentos individuais com SB225002 ou SB366791 e a combinação de ambos ($75,8 \pm 0,5\%$ e $67,8 \pm 0,7\%$, respectivamente). Os antagonistas SB225002 e SB366791 não provocaram qualquer efeito significativo *per se* na atividade locomotora, de acordo com a avaliação no campo aberto (dados não mostrados).

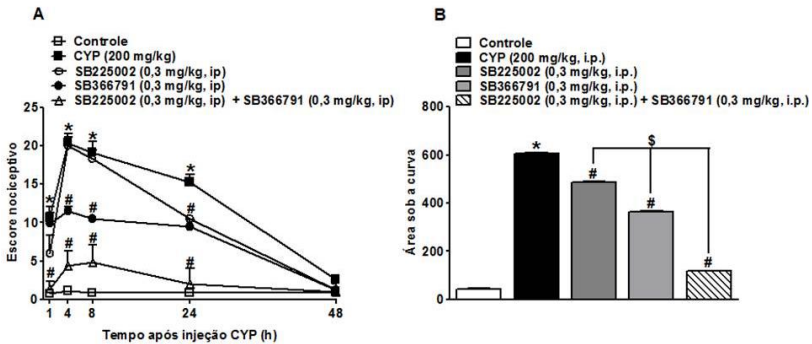


Figura 2: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre as respostas nociceptivas induzidas pela CYP. (A) Efeito do pré-tratamento com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.) ou SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) combinado com SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.) na resposta comportamental nociceptiva induzida pela CYP (200 mg/kg, i.p.) em ratos. **(B)** Representa as áreas sob as curvas do painel A. Cada grupo representa a média de seis a oito animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com CYP; § $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado apenas com um antagonista, SB225002 ou SB366791. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls.

4.2 Avaliação da hipersensibilidade mecânica periférica induzida pela CYP

Com o intuito de explorar o potencial uso dos antagonistas seletivos dos receptores CXCR2 e TRPV1 no controle da hipersensibilidade periférica na cistite induzida pela CYP, o presente estudo verificou se o pré-tratamento com o SB225002 e/ou SB366791 seria capaz de prevenir e/ou reverter a hipersensibilidade mecânica periférica causada por este quimioterápico. Assim, a hipersensibilidade foi avaliada através da aplicação de filamentos de Von Frey na pata traseira (8 g) e na região do abdômen (26 g), em diferentes tempos após a indução da cistite (1-48 h). Os resultados mostram que a administração de CYP causa uma hipersensibilidade mecânica periférica proeminente na pata traseira direita (Figura 3 A e B) e na região abdominal (Figura 3 C e D), caracterizada pelo aumento no percentual de retirada em resposta a estimulação

mecânica com os filamentos de von Frey de 8,0 e 26,0 g, respectivamente. A hipersensibilidade mecânica foi evidenciada a partir de 1 h e persistiu por até 24 horas após o tratamento com CYP. O pré-tratamento com o antagonista seletivo CXCR2, o SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) reduziu a hipersensibilidade mecânica tanto na pata ($50,0 \pm 2,0\%$) como na região abdominal ($44,0 \pm 1,0\%$). Da mesma forma, o tratamento com o antagonista seletivo TRPV1, o SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.) reduziu a hipersensibilidade mecânica, na pata ($45,0 \pm 1,0\%$), e na região abdominal ($36,0 \pm 2,0\%$). Ainda, a combinação dos antagonistas também causou uma redução significativa nas frequências de resposta da pata e da região abdominal ($62,0 \pm 1,0\%$ e $67,0 \pm 2,0\%$, respectivamente), apresentando maior eficácia em relação aos tratamentos não combinados.

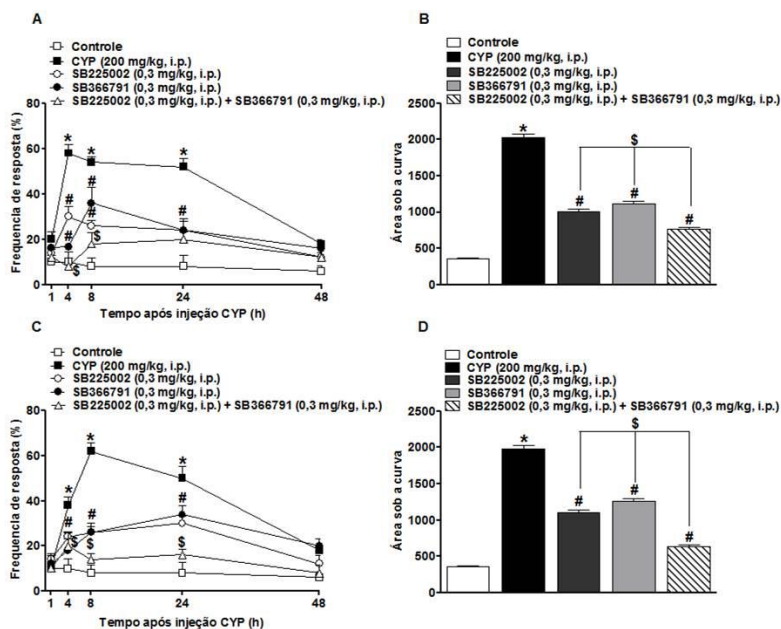


Figura 3: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre a hipersensibilidade mecânica referida induzida pela CYP. Efeito do pré-tratamento com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.), ou SB225002 combinado com SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.), cada na hipersensibilidade mecânica induzida pela CYP (200 mg/kg, ip), avaliada na pata (A) ou na região abdominal (C) em diferentes intervalos de tempo após a administração de CYP (1-48h). (B e D) representam as áreas sob as

curvas dos painéis A e C, respectivamente. Os dados são apresentados como a média percentual de resposta de frequência. Cada coluna representa a média de seis a oito animais, e as linhas verticais indicam o EPM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com CYP; \$ $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado apenas com um antagonista, SB225002 ou SB366791. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

4.3 Avaliação do dano macroscópico induzido pela CYP

O dano macroscópico foi avaliado através da presença de edema e hemorragia (índice de severidade) e do peso úmido da bexiga. O edema e a hemorragia foram significativamente maiores no grupo CYP (escore $2,7 \pm 0,2$ e $2,7 \pm 0,2$, respectivamente) em comparação ao grupo controle (escore 0) (Figura 4 A). O pré-tratamento com os antagonistas SB225002 ou SB366791 não apresentou efeito significativo sobre o edema e a hemorragia induzidos pela CYP (Figura 4A). Entretanto, a combinação de ambos os antagonistas causou uma redução significativa do edema ($45,4 \pm 10,5\%$) e da hemorragia ($54,4 \pm 9,1\%$) induzida pela CYP (Figura 4 A). Além disso, diferenças significativas foram observadas entre os antagonistas administrados isoladamente e a sua combinação ($40,0 \pm 12,0\%$ e $44,4 \pm 11,0\%$, respectivamente). As imagens representativas das bexigas dos diferentes grupos experimentais estão mostradas na Figura 4C.

O peso úmido da bexiga foi utilizado como um indicador adicional do edema vesical induzido pela CYP. Os animais tratados com CYP apresentaram espessamento da parede da bexiga urinária e uma evidente diminuição do lúmen vesical. Como demonstrado na Figura 4 B, a média do peso úmido da bexiga urinária do grupo CYP foi significativamente maior do que a média do grupo controle (4,3 vezes). Esse aumento foi prevenido pela administração do antagonista do receptor CXCR2, o SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) ou do antagonista do receptor TRPV1, o SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.) ($27,2 \pm 2,4\%$ e $32,6 \pm 3,3\%$, respectivamente). Da mesma forma, a combinação de ambos os antagonistas reduziu o peso úmido da bexiga de animais tratados com CYP ($47,7 \pm 1,4\%$) e foi significativamente diferente dos antagonistas administrados isoladamente ($25,4 \pm 6,2\%$ e $22,7 \pm 8\%$, respectivamente).

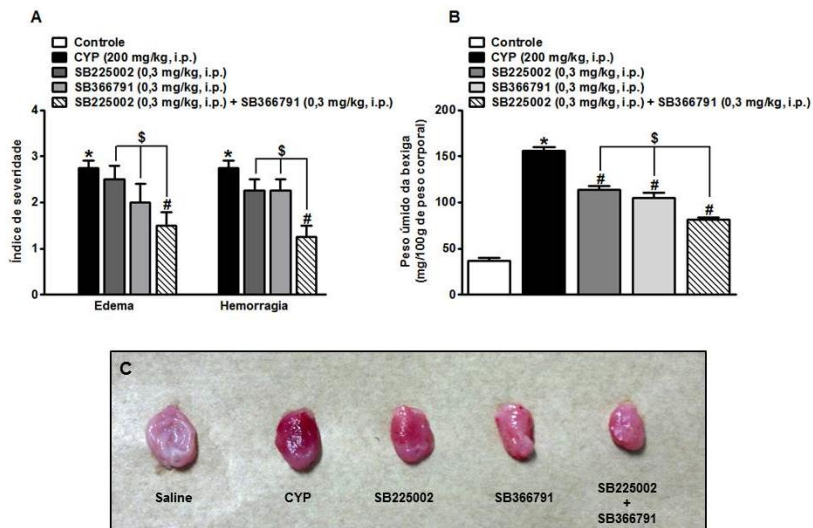


Figura 4: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 no dano macroscópico induzido pela CYP. Efeito do pré-tratamento com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.), ou SB225002 combinado com SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.), cada sobre o edema e a hemorragia avaliados macroscopicamente **(A)** e o peso úmido da bexiga **(B)** 24 horas após a cistite induzida pela CYP (200 mg/kg, i.p.). As imagens das bexigas urinárias são representativas dos diferentes grupos experimentais **(C)**. Cada coluna representa a média de seis a oito animais, e as linhas verticais indicam o EPM * $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo controle (salina); # $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo tratado com CYP. § $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo tratado apenas com um antagonista, SB225002 ou SB366791 (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls ou Bonferroni).

4.4 Análise do dano microscópico induzido pela CYP

Para detectar possíveis alterações histopatológicas decorrentes da cistite induzida por CYP realizamos a análise histológica qualitativa da bexiga urinária. De acordo com os critérios histopatológicos descritos por Gray (1986), a análise microscópica da bexiga urinária dos animais 24h após o tratamento com CYP (Figura 5 B) comparada à bexiga urinária de animais controle (Figura 5 A), revelou extensa cistite caracterizada por inflamação aguda com congestão vascular, edema pronunciado, hemorragia intensa, deposição de fibrina, infiltração de neutrófilos e redução no número de camadas de células uroteliais (Figura 5 B). Essas alterações foram atenuadas pelo pré-tratamento dos animais com os antagonistas dos receptores CXCR2, o SB225002 (0,3 mg/kg; i.p.) e TRPV1, o SB366791 (0,3 mg/kg; i.p.) e com a combinação de ambos os antagonistas (Figura 5 C, D e E, respectivamente). As pontuações do escore macroscópico são mostradas no painel F.

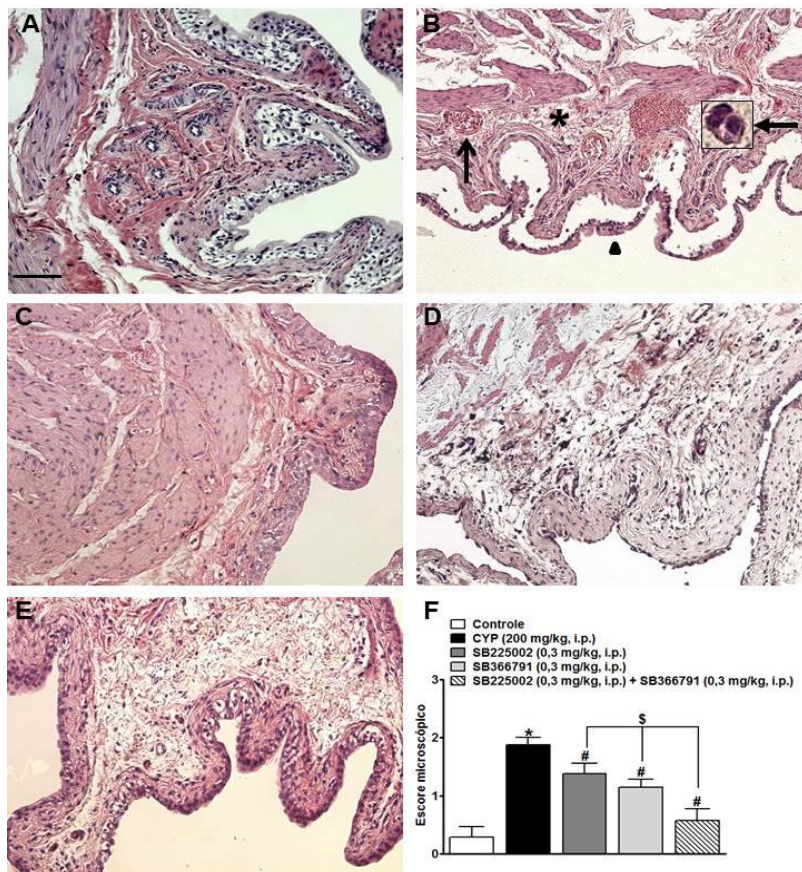


Figura 5: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre o dano macroscópico induzido pela CYP. Efeito do pré-tratamento com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.), ou SB225002 combinado com SB366791 (0,3 mg/kg, i.p., cada) sobre as alterações histopatológicas da bexiga urinária na cistite induzida pela CYP (200 mg/kg, i.p., 24 horas). As imagens histológicas foram coradas com H&E e são representativas dos grupos controle (A), CYP (B), SB225002 (C), SB366791 (D) e SB225002 + SB366791 (E). Dano no uretério (cabeça de seta), infiltração de neutrófilos (seta fechada, inserção aumento de 100x), congestão e dilatação de vasos sanguíneos (seta aberta), edema (asterisco). Escore macroscópico representativo das alterações histopatológicas da bexiga urinária (F). Cada coluna representa a média de seis a oito animais, e as linhas verticais indicam o EPM * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (salina); # $p < 0,05$, comparado com o grupo tratado com CYP $^{\S}p < 0,05$, comparado com o grupo tratado apenas com um antagonista, SB225002 ou SB366791 (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keulls).

4.5 Avaliação da migração de polimorfonucleares na bexiga urinária após a cistite induzida pela CYP

A migração de neutrófilos foi determinada através da medida indireta da atividade da enzima MPO. A cistite induzida pela CYP é caracterizada por um aumento dependente do tempo da atividade da enzima MPO na bexiga urinária em comparação com o grupo controle (Figura 6 A). Esse aumento foi máximo 8 horas após a administração de CYP (aumento de 5,3 vezes) em comparação ao grupo controle e este intervalo de tempo foi adotado para os experimentos com os antagonistas. O pré-tratamento com os antagonistas dos receptores CXCR2, o SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) e TRPV1, o SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.) ou a combinação de ambos os antagonistas (0,3 mg/kg, i.p., cada) resultou numa diminuição da atividade da MPO na bexiga urinária ($39,4 \pm 4,5\%$; $31,8 \pm 6,8\%$ e $47,0 \pm 9,0\%$, respectivamente) em comparação com o grupo tratado com CYP (Figura 6 B). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os compostos administrados individualmente ou a sua combinação.

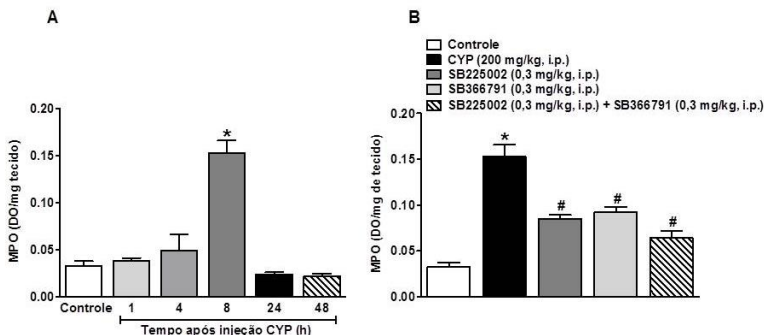


Figura 6: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre a atividade da MPO na bexiga após a cistite induzida pela CYP. (A) Alterações tempo-dependente da atividade da MPO na bexiga após a administração de CYP (200 mg/kg, i.p.). (B) Efeito do pré-tratamento com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.), ou SB225002 combinado com SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.) sobre a atividade da MPO, 8h após a cistite induzida pela CYP (200 mg/kg, i.p.). Cada coluna representa a média de seis a oito animais, e as linhas verticais indicam o EPM. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle (salina); # $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado com CYP; \$ $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado apenas com um antagonista SB225002 ou SB366791 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni).

4.6 Determinação dos níveis de citocinas na bexiga urinária após a cistite induzida pela CYP

As citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β são mediadores cruciais envolvidos na cistite hemorrágica induzida pela CYP (Malley e Vizzard, 2002). Como mostrado na Figura 7, a administração de CYP induziu um aumento significativo na produção de IL-1 β (A) e de TNF- α (C) na bexiga urinária no período de 4 e 8 horas, respectivamente, após a injeção de CYP. O pré-tratamento com o antagonista CXCR2, o SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), reduziu significativamente os níveis de IL-1 β ($48,2 \pm 3,2\%$; Figura 7 A) e TNF- α ($44,2 \pm 2,6\%$; Figura 7 B) na bexiga urinária. Da mesma forma, o pré-tratamento com o antagonista TRPV1, o SB366791, também diminuiu significativamente os níveis de IL-1 β e TNF- α ($40,7 \pm 6,3\%$ e $40 \pm 4,6\%$, respectivamente, Figura 7 A e B) na bexiga urinária. Ainda, a combinação dos antagonistas também reduziu os níveis de citocinas inflamatórias na bexiga urinária ($57 \pm 2,3\%$ e $60,6 \pm 3,2\%$, para a IL-1 β e TNF- α , respectivamente). Todavia, a combinação dos antagonistas não induziu diferença significativa sobre os níveis de citocinas, em comparação com os antagonistas administrados isoladamente.

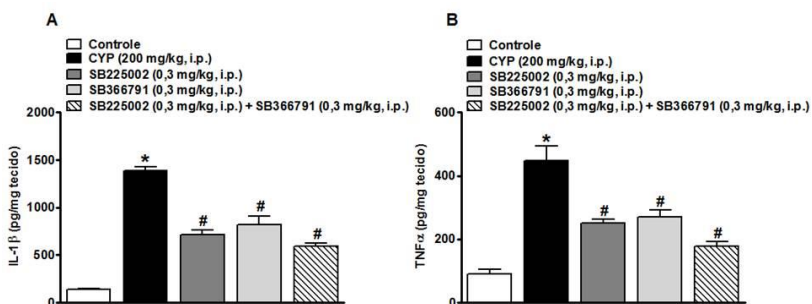


Figura 7: Efeito dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 sobre os níveis das citocinas TNF α e IL-1 β na bexiga após a cistite induzida pela CYP. Efeito do pré-tratamento com SB225002 (0,3 mg / kg, i.p.), SB366791 (0,3 mg / kg, i.p.), ou SB225002 combinado com SB366791 (0,3 mg/kg, i.p., cada) sobre os níveis das citocinas IL-1 β (A) ou TNF- α (B) na bexiga urinária, 4 e 8 h, respectivamente, após a indução da cistite pela CYP (200 mg/kg, i.p.). Cada coluna representa a média de seis a oito animais, e as linhas verticais indicam o EPM. *P<0,05 comparado com o grupo controle (salina). #P<0,05: comparado com o grupo tratado com CYP. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni).

4.7 Avaliação da expressão dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária

A Figura 8 A mostra que a injeção de CYP (200 mg/kg, i.p.) produziu um aumento significativo e dependente do tempo na expressão do RNAm do receptor CXCR2 na bexiga urinária. Esse aumento foi significativo 1 h após a indução da cistite (5,5 vezes maior) e máximo em 24 horas após a administração de CYP (13,2 vezes maior). Desse modo, adotamos o tempo de 24 h para avaliar a expressão do receptor CXCR2 em resposta aos antagonistas (Figura 8 B). O pré-tratamento com o antagonista CXCR2, o SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), mas não com o antagonista TRPV1, o SB366791, foi capaz de produzir uma redução significativa ($41,7 \pm 5,6\%$) na expressão do RNAm do CXCR2 na bexiga urinária. De maneira interessante, a combinação dos antagonistas reduziu amplamente ($76,0 \pm 2,8\%$) a expressão do RNAm do CXCR2 na bexiga urinária em comparação com o grupo tratado com CYP e em comparação com os animais tratados apenas com o SB225002 ($58,4 \pm 9,5\%$).

De modo similar, a administração de CYP (200 mg/kg, i.p.) aumentou, de maneira significativa, a expressão do RNAm do receptor TRPV1 na bexiga urinária dos animais (Figura 8 C). Esse aumento foi evidente 1 e 24 horas após a indução da cistite (5,6 vezes maior). Assim, adotamos o tempo de 24h para avaliar a expressão do receptor TRPV1 em resposta aos antagonistas (Figura 8 D). É interessante notar que o pré-tratamento com o antagonista CXCR2, o SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), produziu uma redução significativa ($49,9 \pm 3,8\%$) na expressão do RNAm do receptor TRPV1 na bexiga urinária dos animais com cistite induzida pela CYP. Além disso, o pré-tratamento com o antagonista TRPV1, o SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.), também diminuiu de maneira significativa ($74,4 \pm 3,9\%$) a expressão do RNAm do receptor TRPV1 na bexiga urinária. Interessantemente, a combinação dos antagonistas reduziu significativamente ($92,1 \pm 3,2\%$) a expressão do RNAm do receptor TRPV1 na bexiga urinária em comparação com o grupo tratado com CYP, mas não em comparação com os animais tratados apenas com um dos antagonistas.

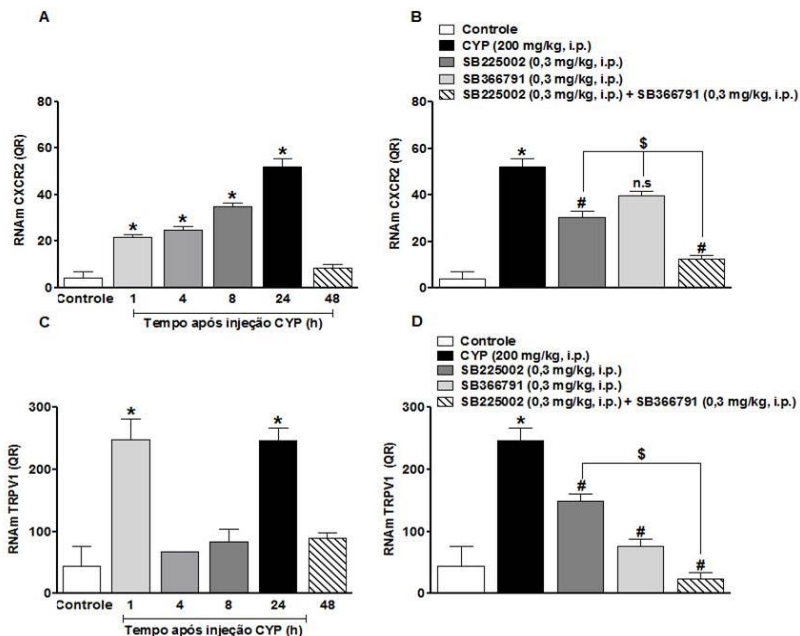


Figura 8: Expressão dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária após a cistite induzida pela CYP. Alteração tempo-dependente da expressão do RNAm do receptor CXCR2 (A) e TRPV1 (C) na bexiga urinária após a administração de CYP (200 mg/kg, i.p.). Efeito do pré-tratamento com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.), ou SB225002 combinado com SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.), cada sobre a expressão do RNAm do receptor CXCR2 (B) e TRPV1 (D). Cada coluna representa a média de seis animais, e as linhas verticais indicam o EPM. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle (salina); # $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado com CYP; \$ $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado apenas com um dos antagonistas, SB225002 ou SB366791 (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.8 Localização dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária e GRD

A seguir, a localização dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária e no gânglio da raiz dorsal (GRD) foi avaliada através de técnica de imunofluorescência com dupla marcação para os receptores. As Figuras 9 e 10 mostram imagens representativas de seções da bexiga urinária e GRD, respectivamente. A cor verde indica a marcação para o receptor CXCR2, a cor vermelha para o receptor TRPV1 e a cor laranja indica a co-localização desses receptores. Os núcleos celulares foram corados com Hoescht (azul).

Na bexiga urinária dos animais controle, tratados com solução salina, ambos os receptores CXCR2 e TRPV1 podem ser fracamente localizados nas fibras nervosas que inervam o músculo detrusor, na região da lâmina própria e nas células superficiais do urotélio (Figura 9 C e E, respectivamente). Após o tratamento com CYP, os receptores CXCR2 e TRPV1 aparecem localizados no urotélio, no epitélio vascular e nas fibras nervosas que inervam o músculo detrusor (Figura 9 D e F). A marcação para o receptor CXCR2 aparentemente é mais pronunciada nas células superficiais do urotélio, enquanto que a marcação para o receptor TRPV1 aparece nas células basais do urotélio e na região da lâmina própria (Figura 9 D e F). A co-localização dos receptores foi verificada através da sobreposição das imagens (Figura 9 G e H). Os receptores CXCR2 e TRPV1 parecem estar co-localizados nas fibras nervosas que inervam o músculo detrusor e no epitélio vascular da bexiga urinária após o tratamento com CYP (Figura 9 H).

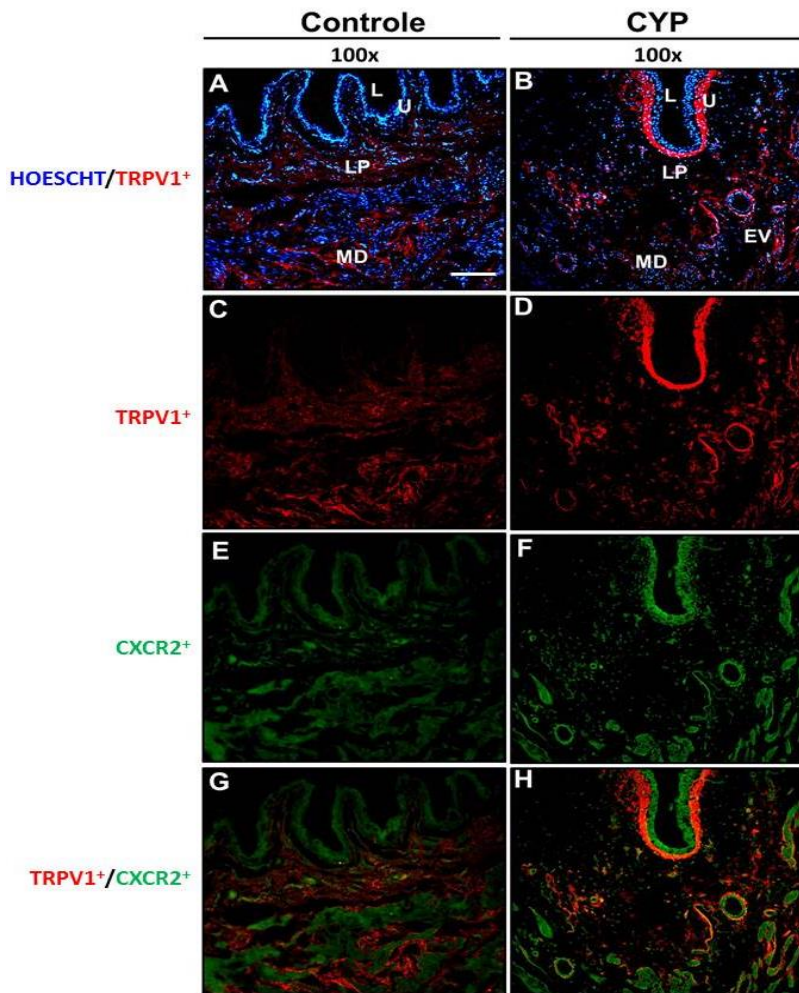


Figura 9: Localização dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária. Presença dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária de animais controle (**A-D**) ou tratados com CYP 24h (**E-H**). Os painéis representam a imunorreatividade para os receptores TRPV1 (vermelho; **C e D**) e CXCR2 (verde; **E e F**). A co-localização dos receptores é representada pela cor laranja nas imagens sobrepostas (**G e H**). Os núcleos celulares (azul) foram corados com Hoechst (0,5 ml / ml) (**A e B**). L: lúmen; U: urotélio; LP: lâmina própria; MD: músculo detrusor; EV: epitélio vascular. Os painéis são imagens representativas de um mínimo de três seções por ratos, 4-6 animais/grupo. Ampliação x 100. Escala: 100 µm.

Além disso, a localização dos receptores CXCR2 e TRPV1 foi avaliada no gânglio da raiz dorsal (GRD) de animais tratados com solução salina (controle) ou com CYP. No GRD dos animais controle, ambos os receptores parecem estar fracamente marcados (Figura 10 B, C e D). Entretanto, em animais tratados com CYP ocorreu um significativo aumento da marcação para os receptores CXCR2 e TRPV1 no GRD (Figura 10 F, G e H). Os receptores estão co-localizados no GRD dos animais controle e tratados com CYP, como mostram os painéis D e H.

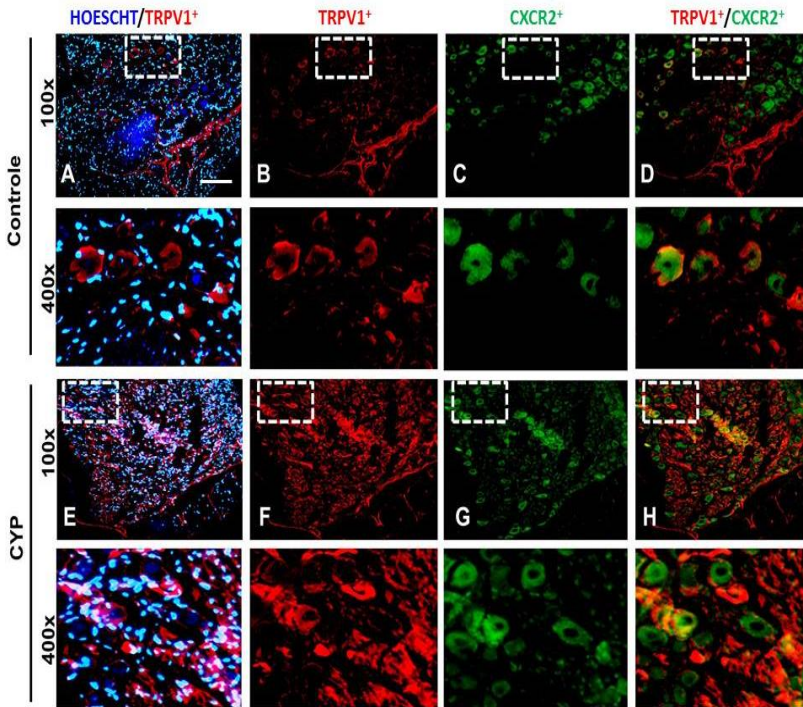


Figura 10: Localização dos receptores CXCR2 e TRPV1 no GRD. Presença dos receptores CXCR2 e TRPV1 no GRD de animais controle (A-D) e tratados com CYP, 24h (E-H). Os painéis representam a imunorreatividade para TRPV1 (vermelho; B e F) CXCR2 (verde; C e G). A co-localização dos receptores é representada pela cor laranja nas imagens sobrepostas. Os núcleos (azul) foram corados com Hoechst (0,5 ml/ml). Os painéis são imagens representativas de um mínimo de três seções por ratos, 4-6 animais/grupo. Ampliação original: x 100 e x 400, respectivamente. Escala: 100 µm.

4.9 Avaliação dos parâmetros urodinâmicos após a cistite induzida pela CYP

A seguir, a atividade funcional da bexiga urinária foi verificada através da avaliação dos parâmetros urodinâmicos utilizando a técnica de cistometria. O grupo de animais tratado com CYP apresentou um aumento significativo da pressão basal (PB: $124,5 \pm 5,5\%$), da pressão limiar (PL: $123,8 \pm 4,3\%$), e da pressão máxima (PM: $118,3 \pm 3,3\%$) (Figuras 11 B e 12 A-C). Além disso, os animais tratados com CYP exibiram alterações funcionais marcantes, tais como redução da capacidade de armazenamento da bexiga urinária (CB: $50 \pm 2\%$), do intervalo de tempo entre as contrações de micção (IEC: $73,4 \pm 2,4\%$), do volume eliminado (VE: $73,6 \pm 3,1\%$) e da eficiência de esvaziamento urinário (EE: $90,4 \pm 2,0\%$) (Figura 13 A-D). Durante a fase de enchimento da bexiga urinária, os animais tratados com CYP apresentaram um maior número de contrações não associadas à micção (CNMs) em comparação aos animais controle ($15,3 \pm 0,5$ e $3,6 \pm 0,5$, respectivamente) (Figura 13). O pré-tratamento com o antagonista CXCR2, o SB225002, mas não com o antagonista TRPV1, o SB366791, reduziu significativamente a PB ($36,1 \pm 5,5\%$) e a PL ($33,7 \pm 7,8\%$) (Figuras 11 C e D e 12 A-C). Além disso, o tratamento com SB225002 ou com SB366791 reduziu significativamente a PM ($31,7 \pm 1,5\%$ e $29,8 \pm 2,3\%$, respectivamente, Figuras 11 C e D e 12 C) e o número de CNMs ($32,6 \pm 2,7\%$ e $28,2 \pm 2,4\%$, respectivamente, Figura 13) e aumentou a CB ($52 \pm 4\%$ e $42 \pm 6\%$, respectivamente), o VE ($102,2 \pm 13\%$ e $97,7 \pm 15,4\%$, respectivamente) e a EM ($388,3 \pm 66\%$ e $341,8 \pm 66\%$, respectivamente) (Figura 13). A combinação dos antagonistas reduziu o número de CNMs ($60,9 \pm 2,4\%$; Figura 13), a PB ($60,7 \pm 2,7\%$), a PL ($61,1 \pm 1,2$) bem como a PM ($53,2 \pm 1,2\%$) (Figura 11 E, 12 A-C) e aumentou significativamente o IEC ($213,7 \pm 10,3\%$), a CB ($76 \pm 6\%$), o VE ($194,4 \pm 7,8\%$) e a EE ($644,2 \pm 29,3\%$) (Figura 11 E, Figura 13).

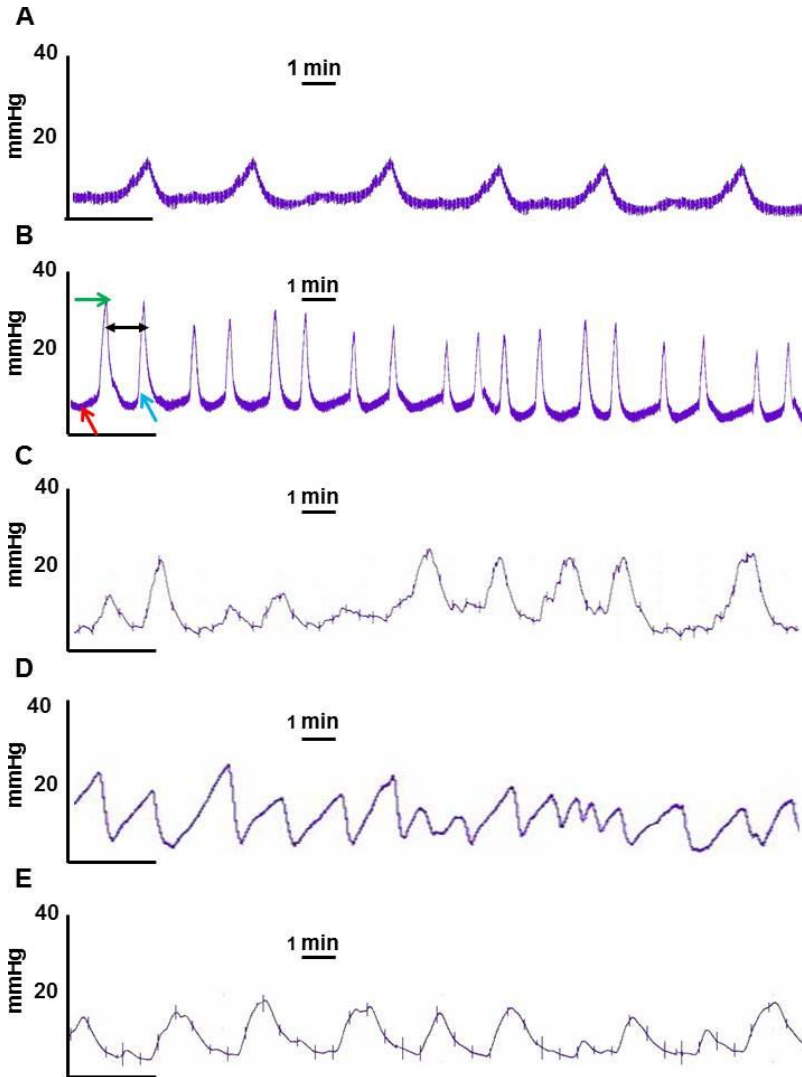


Figura 11: Traçados cistométricos representativos. Os traçados cistométricos representam os grupos tratados com **(A)** solução salina (controle), **(B)** CYP (200 mg/kg, i.p.), **(C)** SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), **(D)** SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.) e **(E)** SB225002 combinado com SB366791 (0,3 mg/kg, i.p., cada) e indicam as alterações nos parâmetros urodinâmicos como pressão basal (PB; seta vermelha), pressão limiar (PL; seta azul), pressão máxima de esvaziamento (PM; seta verde), intervalo entre as contrações (IEC; seta preta).

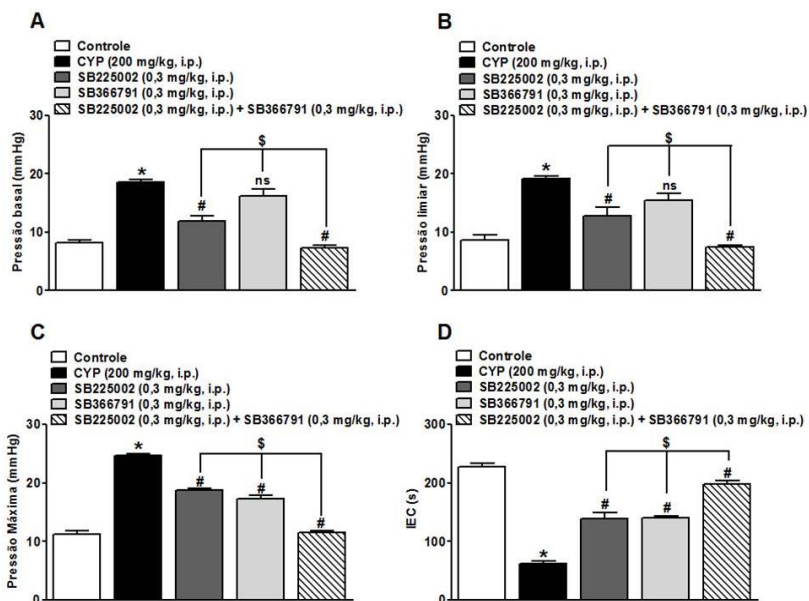


Figura 12: Alterações dos parâmetros urodinâmicos de pressão após a cistite induzida pela CYP. Efeito do pré-tratamento com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), SB366791 (0,3 mg / kg, i.p.) ou SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) associado com SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.) sobre a pressão basal (PB; A), a pressão limiar (PL; B), pressão máxima (PM; C) e o intervalo de tempo entre as contrações de micção (IEC; D). Cada coluna representa a média de cinco animais, e as linhas verticais indicam o EPM. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle (salina); # $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado com CYP; \$ $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado apenas com um dos antagonistas, SB225002 ou SB366791 (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni).

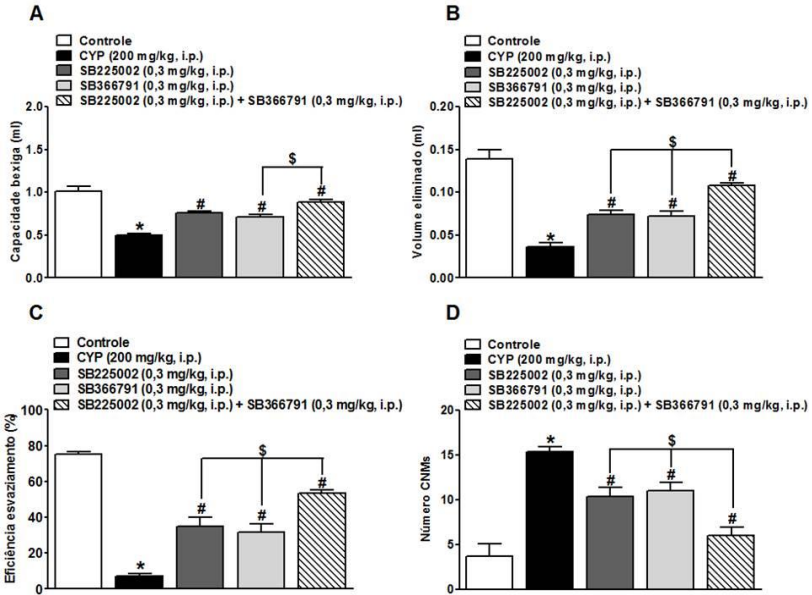


Figura 13: Alterações dos parâmetros urodinâmicos funcionais após a cistite induzida pela CYP. Efeito do pré-tratamento com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), SB366791 (0,3 mg/kg, i.p.) ou SB225002 associado com SB366791 (0,3 mg/kg, i.p. cada) sobre a capacidade da bexiga urinária (CBU; A), volume eliminado (VE; B), a eficiência de esvaziamento (EE; C) e o número de contrações não associadas a micção (CNMs; D). Cada coluna representa a média de seis animais, e as linhas verticais indicam o SEM. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle (salina); # $P < 0,05$ comparado com o grupo tratado com CYP; § $P < 0,05$ comparado com grupo tratado apenas com um dos antagonistas, SB225002 ou SB366791 (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni).

5. DISCUSSÃO

A ciclofosfamida (CYP) é um agente antitumoral, cuja metabolização no fígado origina a acroleína, um metabólito urotóxico. Assim, o efeito secundário mais importante do uso da CYP é a cistite hemorrágica causada pela urotoxicidade da acroleína. Esta patologia é caracterizada por lesão urotelial, edema, hemorragia, ulceração, neovascularização, infiltração de leucócitos, hiperatividade da bexiga e dor suprapúbica (Assreuy *et al.*, 1999., Hu *et al.*, 2005; Korkmaz *et al.*, 2007). Desta forma, o presente estudo foi realizado com o intuito de avaliar a participação dos receptores CXCR2 e TRPV1 nas alterações nociceptivas, moleculares e funcionais, no modelo experimental de cistite induzida pela CYP.

A administração intraperitoneal de CYP induz alterações marcantes no comportamento dos animais que são compatíveis com a sensação de dor (Boucher *et al.*, 2000). Assim, Boucher e colaboradores (2000) utilizaram este modelo experimental para avaliar as mudanças comportamentais características de dor, as quais incluem o fechamento dos olhos, a diminuição da frequência respiratória e a presença de posturas específicas de imobilidade. Similar a este estudo, também observamos estas alterações comportamentais, as quais perduraram por um período de até 24 horas após a administração de CYP. Além disso, o presente trabalho avaliou os efeitos dos antagonistas seletivos dos receptores CXCR2 e TRPV1, o SB225002 e o SB366791, respectivamente, sobre o comportamento nociceptivo provocado pela CYP. Estudos anteriores demonstraram que esses antagonistas produziram efeitos antinociceptivos significativos em diferentes modelos de dor espontânea (Manjavachi *et al.*, 2010; Marotta *et al.*, 2009, Niiyama *et al.*, 2009). Corroborando com esses resultados, observamos que ambos os antagonistas, bem como sua combinação, reduziram os parâmetros relacionados com o comportamento de dor em ratos tratados com CYP. Embora alguns estudos tenham sugerido a participação dos receptores TRPV1 na regulação do movimento (Lee *et al.*, 2006; Garami *et al.*, 2011), a ação antinociceptiva dos antagonistas, no presente estudo, parece não ser uma consequência de uma ação na função motora, visto que ambos os compostos não apresentaram efeitos significativos sobre a atividade locomotora avaliada no teste do campo aberto. Corroborando com esta hipótese, resultados prévios mostram que a administração do antagonista seletivo CXCR2, o SB225002, não afetou

significativamente a atividade locomotora de camundongos no teste de campo aberto e também não alterou a coordenação motora dos animais no teste de rotarod (Manjavachi *et al.*, 2010).

A dor visceral é um dos principais sintomas da cistite hemorrágica e é um fator limitante para a qualidade de vida dos pacientes em tratamento quimioterápico com a CYP (Morais *et al.*, 1999). A inflamação da bexiga está associada a uma maior sensibilidade mecânica devido à convergência dos *inputs* viscerais e somáticos no sistema nervoso. Este fenômeno é conhecido como hipersensibilidade visceral e pode ser avaliado por meio de estimulação mecânica com filamentos de von Frey, cuja redução do limiar mecânico é interpretada como indicativo de dor visceral (Cervero e Laird, 2004; Rudick *et al.*, 2007). Uma característica importante da sensibilidade visceral é a dor referida ou periférica, que é a percepção da dor em locais distintos da área de inflamação visceral (Wang *et al.*, 2008). A hipersensibilidade referida é proporcional à intensidade do comportamento de dor visceral expresso pelos animais. O aumento da sensibilidade mecânica referida na pata traseira e na região abdominal após o tratamento com CYP foi previamente demonstrado (Guérios *et al.*, 2008; Studeny *et al.*, 2008; Cheppudira *et al.*, 2009). Neste contexto, o presente trabalho avaliou a sensibilidade mecânica na pata traseira e na região abdominal de animais tratados com CYP. Os resultados mostram que a cistite hemorrágica está relacionada com um aumento duradouro da sensibilidade mecânica periférica, efeito que persistiu até 24 horas após a administração de CYP. Corroborando com achados prévios (Studeny *et al.*, 2008), a sensibilidade mecânica periférica, tanto na pata quanto na região abdominal, retornou ao nível basal 48h após a administração da CYP.

Em outra etapa do presente estudo, avaliamos o envolvimento dos receptores CXCR2 e TRPV1 no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica. De maneira similar aos resultados observados nos parâmetros comportamentais, o desenvolvimento da sensibilidade mecânica periférica, tanto na região abdominal quanto na pata, foi significativamente atenuado pelo bloqueio farmacológico dos receptores CXCR2 e TRPV1. Esta observação está de acordo com estudos previamente publicados confirmando a participação de quimiocinas e seus receptores bem como dos receptores TRPV1 na dor visceral (Meyer-Siegler *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2011; Frias *et al.*, 2012; Lei e Malykhina, 2012). Neste contexto, Wang e

colaboradores (2008) determinaram que a hipersensibilidade mecânica em tecidos periféricos foi abolida em animais nocaute para o receptor TRPV1 na inflamação da bexiga induzida por CYP ou acroleína. Da mesma maneira, a deleção gênica do receptor TRPV1 atenuou a hipersensibilidade mecânica em modelos de dor neuropática (Tóth *et al.*, 2011; Christoph *et al.*, 2006). A participação dos receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR2 foi recentemente determinada na sensibilidade visceral referida, após a inflamação da bexiga urinária (Arms *et al.*, 2010, 2013; Foster *et al.*, 2011). Nesse contexto, sabe-se que a administração exógena de quimiocinas é capaz de induzir hipersensibilidade referida em resposta a estímulos mecânicos e térmicos (Oh *et al.*, 2001; Milligan *et al.*, 2004). Além disso, Foster e colaboradores mostraram que a inibição do receptor quimiotático CCR2, através do uso de antagonista seletivo, é capaz de prevenir a hipersensibilidade mecânica referida na pata e na região abdominal de ratos tratados com CYP (Foster *et al.*, 2011). Os resultados demonstrando a atenuação das respostas nociceptivas após o tratamento com os antagonistas seletivos em conjunto com a observação do aumento dos níveis de RNAm dos receptores CXCR2 e TRPV1 (dados discutidos detalhadamente adiante) após a administração de CYP, reforçam a hipótese da participação dos receptores CXCR2 e TRPV1 no desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica em tecidos periféricos induzido pela CYP. É interessante notar que a combinação de ambos os antagonistas foi capaz de reduzir significativamente o aumento da expressão dos receptores CXCR2 e TRPV1, bem como os níveis elevados de TNF- α e IL-1 β na bexiga inflamada, eventos que parecem correlacionar-se com o processo de atenuação das respostas nociceptivas.

A avaliação da bexiga urinária a nível macroscópico e microscópico permitiu compreender algumas das alterações fisiopatológicas na cistite induzida pela CYP. Foram observados danos como presença de edema celular, ulcerações, descamação do epitélio, deposição de fibrina e infiltração de neutrófilos. Adicionalmente, notamos a presença de sangue na urina (hematúria) dos animais tratados com CYP. Estas alterações são indicativas da presença de cistite hemorrágica, resultante do rompimento de vasos sanguíneos e do urotélio devido ao processo inflamatório causado pela CYP. Ainda, a bexiga urinária apresentou aumento do seu peso úmido, que parece estar relacionado com o edema vesical e hipertrofia decorrente do processo inflamatório. De fato, como observado, a parede da bexiga urinária pareceu

hipertrófica. Este fenômeno é bastante comum na cistite induzida por CYP e pode ser atribuído a mudanças no perfil de expressão de fatores de crescimento, tais como o NGF (Zang e Qiao, 2012). Os resultados mostram que o tratamento sistêmico com os antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1, administrados isoladamente ou em combinação, atenuou significativamente os índices de inflamação da bexiga induzida pela CYP.

A partir do momento que o estabelecimento da inflamação da bexiga foi constatado, avaliamos a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) neste tecido, como uma medida indireta da migração de neutrófilos. Como relatado anteriormente (Linares-Fernández e Alfieri, 2007), a administração de CYP causou um aumento significativo na atividade da MPO na bexiga, o que se correlaciona com o aumento da migração de neutrófilos para a bexiga. Os nossos dados mostram que a atividade da MPO induzida pela CYP foi significativamente diminuída pelo pré-tratamento dos animais com os antagonistas seletivos dos receptores CXCR2 e TRPV1, administrados isoladamente ou em combinação. Estes resultados confirmam estudo prévio, o qual relatou que o bloqueio do receptor CXCR2 com o SB225002 reduziu a atividade da MPO e o influxo de neutrófilos no cólon de ratos com colite induzida por TNBS (2,4,6-trinitrobenzeno-sulfônico) (Bento *et al.*, 2008). Além disso, o bloqueio farmacológico do receptor TRPV1 pela capsazepina reduziu a atividade da MPO no pâncreas de ratos com pancreatite aguda induzida por ceruleína (Nathan *et al.*, 2001). Entretanto, a ativação do receptor TRPV1 durante um processo inflamatório pode ser considerado um mecanismo de proteção tecidual. A este respeito, a deleção do gene TRPV1 ou o seu bloqueio exacerbou a inflamação renal induzida por lipopolissacarídeo (LPS), incluindo o aumento da infiltração de neutrófilos e macrófagos, bem como os níveis de quimiocinas e citocinas (Wang e Wang, 2013). Além disso, em um modelo de inflamação das vias aéreas induzida por LPS, a infiltração de neutrófilos e macrófagos e a atividade da MPO foram significativamente maiores em camundongos nocaute para o receptor TRPV1 em comparação com animais selvagens (Helyes *et al.*, 2007). Dessa maneira, a ativação do receptor TRPV1 durante um processo inflamatório pode constituir um mecanismo de proteção ou dano, dependendo do modelo inflamatório investigado.

Estudos anteriores demonstraram a participação das citocinas TNF- α e IL-1 β no processo inflamatório na cistite induzida

pela CYP (Hu *et al.*, 2003; Korkmaz *et al.*, 2007; Kiuchi *et al.*, 2009., Smaldone *et al.*, 2009). Os presentes dados mostram um aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β na bexiga, corroborando com os relatos anteriores de Malley e Vizzard (2002), que reportaram um aumento rápido e significativo da expressão de citocinas, tais como IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 e TNF- α na bexiga após administração da CYP. De interesse, Sakthivel e colaboradores (2008) relataram que o bloqueio da quimiocina CXCL10 reduziu a expressão de TNF- α . Da mesma forma, nossos resultados mostram que o bloqueio do receptor CXCR2 diminuiu os níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β , bem como a migração de células inflamatórias na bexiga urinária, o que parece estar relacionado com a diminuição da intensidade da cistite.

Estudos mostram que os receptores de quimiocinas (Yuridullah *et al.*, 2006;. Sakthivel *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2008., Arms *et al.*, 2010; 2013) e os receptores TRPV1 (Dattilio e Vizzard, 2005; Dang *et al.*, 2013) têm sua expressão aumentada após o tratamento com CYP. A partir disso, buscamos avaliar as alterações na expressão do receptor CXCR2 e TRPV1 na cistite induzida pela CYP. Por conseguinte, os níveis de RNAm para os receptores CXCR2 e TRPV1 foram determinados na bexiga após a administração da CYP, através da técnica de PCR em tempo real. Nossos resultados demonstram que ocorre um aumento na expressão do RNAm do receptor CXCR2 após a cistite induzida pela CYP. Esse efeito foi dependente do tempo, sendo evidente 1h após a administração da CYP, atingindo o seu pico máximo 24 horas após a administração do quimioterápico. Diferentemente do que foi observado com o RNAm do receptor CXCR2, a expressão do RNAm do receptor TRPV1 aumentou apenas nos tempos de 1 e 24h após a administração da CYP. Ambos os receptores tiveram sua expressão retornando a valores basais 48h após a administração da CYP. Curiosamente, o bloqueio do receptor CXCR2 com o antagonista seletivo SB225002 reduziu significativamente a expressão do RNAm do receptor CXCR2 na bexiga. Além disso, o tratamento dos animais com a combinação dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1, mas não com o antagonista TRPV1 administrado isoladamente, atenuou significativamente a expressão do RNAm do receptor CXCR2 após a administração da CYP. Portanto, a inibição do receptor CXCR2 parece interferir na regulação pós-transcricional da expressão gênica do receptor e este efeito parece ter a participação dos receptores TRPV1. De fato, é possível que o bloqueio do receptor CXCR2 possa reduzir a expressão de seu

RNA_m através da modulação das vias de sinalização do receptor, o que resultaria no aumento da expressão de diferentes componentes inflamatórios, incluindo o próprio receptor. Corroborando com esses dados, estudos prévios demonstraram que a inibição farmacológica do receptor CXCR2 é capaz de reduzir a expressão do seu RNA_m (Qu *et al.*, 2009; Brait *et al.*, 2011). Foi relatado que a expressão do RNA_m do receptor CXCR2 reduziu significativamente após o tratamento com seu antagonista seletivo, o SB225002, em um modelo experimental de neovascularização coroidal (Qu *et al.*, 2009). Além disso, Brait e colegas (2011) demonstraram que a administração de SB225002, reduziu, de maneira acentuada, a expressão do RNA_m do receptor CXCR2, assim como a infiltração de neutrófilos no cérebro após lesão de isquemia-reperusão. De grande interesse, foi o achado de que o bloqueio dos receptores TRPV1 com antagonistas CXCR2 e TRPV1, bem como a sua combinação, interferiu na expressão do RNA_m do receptor TRPV1 na bexiga urinária. Dessa maneira, o presente trabalho mostrou pela primeira vez a regulação da expressão do receptor TRPV1 por antagonistas dos receptores TRPV1 e CXCR2. Todavia, estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos neste processo.

Baseado nos dados descritos na literatura e nos nossos dados acerca da regulação da expressão dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária, buscamos determinar a localização desses receptores na bexiga urinária de animais normais ou com cistite induzida pela CYP. Nossos resultados mostram que os receptores TRPV1 e CXCR2 estão localizados no urotélio, na região da lâmina própria e nas fibras nervosas que inervam o músculo detrusor dos animais tratados com solução salina (controle). Após a administração da CYP, os receptores CXCR2 e TRPV1 estão fortemente localizados, no urotélio, no epitélio vascular e nas fibras nervosas que inervam o músculo detrusor. A marcação para o receptor CXCR2 parece ser mais pronunciada nas células superficiais do urotélio, enquanto que o receptor TRPV1 se localiza principalmente nas células basais do urotélio e na região da lâmina própria. Curiosamente, os receptores CXCR2 e TRPV1 foram co-localizados nas fibras nervosas que inervam o músculo detrusor e no epitélio vascular após o tratamento com CYP. Assim, os nossos dados mostram que ambos os receptores são expressos em diferentes níveis na bexiga e tem sua expressão aumentada nessas estruturas após a cistite. Estes resultados podem sugerir uma interação entre os receptores na atividade funcional da bexiga

urinária. Neste contexto, tem sido relatado que as células uroteliais podem expressar diversos receptores e canais iônicos de modo similar aos encontrados nos neurônios sensoriais. Dessa forma, o urotélio poderia ser um alvo para os transmissores liberados pelas fibras nervosas da bexiga ou, ainda, os mediadores químicos liberados pelas células uroteliais poderiam alterar a excitabilidade aferente da bexiga (Birder *et al.*, 2001; 2005). Portanto, a interação entre os receptores CXCR2 e TRPV1 localizados em células uroteliais e fibras nervosas poderia ser importante no desenvolvimento da dor e da inflamação da bexiga urinária.

As células uroteliais participam da detecção de estímulos físicos e químicos e são capazes de se comunicar com as fibras nervosas aferentes (Birder *et al.*, 2005; Khandelwal *et al.*, 2009; Birder e Andersson, 2013). Como mencionado anteriormente, as células uroteliais expressam inúmeros receptores e canais iônicos semelhantes aos que são encontrados nos nociceptores e mecanorreceptores localizados em outros lugares do corpo. Além disso, estas células secretam mediadores capazes de modular, ativar ou inibir os neurônios sensoriais. Os receptores já identificados no urotélio incluem os receptores para purinas, adenosina, norepinefrina, acetilcolina, receptores ativados por proteases (PARs), bradicinina, neurotrofinas, CRF, estrógenos, endotelinas, quimiocinas e vários canais TRP (Ferguson *et al.*, 1997; Burnstock, 2001; Birder *et al.*, 2002; Chopra *et al.*, 2005; Beckel *et al.*, 2006; LaBerge *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006; Yuridullah *et al.*, 2006; Vera *et al.*, 2008; Arms *et al.*, 2010; 2013; Birder *et al.*, 2013). A expressão destes receptores permite ao urotélio responder a estímulos como a distensão durante o enchimento da bexiga urinária e a mediadores químicos encontrados na urina e liberados das fibras nervosas e células inflamatórias.

A clonagem e o desenvolvimento subsequente de animais nocaute para o receptor TRPV1 (Caterina *et al.*, 1997, 2000) forneceu melhores ferramentas para o estudo desse alvo terapêutico na bexiga urinária. Através do uso de camundongos nocaute para o receptor TRPV1, mostrou-se que o receptor desempenha um papel importante na regulação do reflexo de micção e na hipersensibilidade mecânica referida durante a cistite (Birder *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008), funcionando como um sensor mecânico. Além disso, o receptor TRPV1 é um importante alvo terapêutico para o tratamento da hiperatividade da bexiga induzida pela cistite (Charrua *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; De Groat e Yoshimura,

2009). Estudos prévios sugerem que o receptor TRPV1 não está expresso apenas nas fibras nervosas aferentes que inervam a bexiga, mas também nas células uroteliais e até mesmo nas células intersticiais e do músculo detrusor (Birder *et al.*, 2001; Ost *et al.*, 2002; Brady *et al.*, 2004; Lazzeri *et al.*, 2004, 2005; Apostolidis *et al.*, 2005; Avelino e Cruz, 2006; Liu e Kuo, 2007). Entretanto, a literatura descreve diferentes padrões de expressão do TRPV1 na bexiga de ratos e humanos (Everaerts *et al.*, 2008). Ainda, alguns trabalhos com camundongos nocaute para o receptor TRPV1 não conseguiram demonstrar uma expressão específica do receptor no urotélio desses animais (Yamada *et al.*, 2009; Charrua *et al.*, 2009). Algumas das diferenças observadas entre os estudos podem estar relacionadas com a inespecificidade de alguns anticorpos utilizados. Tem sido relatado que alguns anticorpos anti-TRPV1 que se encontram disponíveis comercialmente apresentam imunorreatividade no tecido da bexiga de animais nocaute para o receptor, causando sinais inespecíficos em experimentos de imunohistoquímica e de Western blot (Everaerts *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2009). Ainda, as diferenças entre as espécies utilizadas nos estudos, incluindo ratos, camundongos e humanos, podem influenciar potencialmente a expressão do TRPV1.

A hiperatividade da bexiga urinária e a dor visceral, causadas por condições patológicas tais como lesão medular e cistite crônica, são induzidas em parte pela hiperexcitabilidade das fibras C nas vias aferentes da bexiga urinária (Yoshimura e Chancellor, 2003; Yoshimura *et al.*, 2002). Um possível mecanismo envolvido na sensibilização aferente em condições patológicas é o aumento na produção de fatores neurotróficos, tais como NGF, na bexiga urinária, na medula espinhal e nos GRD lumbosacrais (Steers *et al.*, 1991, 1996; Vizzard, 2000b; Seki *et al.*, 2002, 2004; Hu *et al.*, 2005). Estudos mostram que o NGF está envolvido na regulação da expressão e sensibilidade dos receptores TRPV1 em neurônios sensoriais (Amaya *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Saban *et al.*, 2011). Além disso, estudo recente demonstrou o aumento da expressão do receptor TRPV1 nos neurônios GRD na cistite induzida por CYP (Dang *et al.*, 2013). O aumento da expressão dos receptores de quimiocinas CX3CR1, CXCR3, CXCR4 e CCR2 foi demonstrado nos neurônios GRD após a inflamação da bexiga urinária (Yuridullah *et al.*, 2006; Sakthivel *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2008; Arms *et al.*, 2010, 2013). No presente estudo, observamos que os receptores CXCR2 e TRPV1 têm suas expressões aumentadas nos neurônios do GRD, possivelmente nas mesmas

fibras nervosas. Assim, a regulação positiva da expressão e a sensibilização dos receptores CXCR2 e TRPV1 nos neurônios do GRD poderiam contribuir para a exacerbação da sinalização aferente observada na hiperatividade da bexiga urinária induzida por CYP.

Em seguida, com o intuito de aprofundar os estudos acerca do possível envolvimento dos receptores TRPV1 e CXCR2 nas alterações sensoriais da bexiga, avaliamos o processo de micção através da técnica de cistometria. As alterações nas sensações viscerais da bexiga, como dor durante o enchimento, que acompanham a cistite, estão relacionadas com mudanças nas propriedades das vias aferentes da bexiga, o que faz com que os neurônios respondam de maneira exagerada a estímulos inócuos. Estas alterações podem ser mediadas, em parte, por mediadores inflamatórios como as citocinas (Erickson *et al.*, 2002; Malley e Vizzard, 2002), neuropeptídeos (Vizzard, 2001; Birder *et al.*, 2005), fatores de crescimento (Vizzard, 2000; Yoshimura *et al.*, 2006), e quimiocinas (Yuridullah *et al.*, 2006; Sakthivel *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2008; Arms *et al.*, 2010). Confirmando e ampliando estudos anteriores (Hu *et al.*, 2003; Klinger e Vizzard, 2008), mostramos que animais com cistite induzida pela CYP apresentam mudanças importantes no processo de micção, avaliadas através de alterações nos parâmetros urodinâmicos, tais como aumento da frequência de micção e do número de contrações não associadas à micção, alterações nas pressões vesicais e diminuição do volume urinário eliminado. Evidências sugerem que o receptor TRPV1 pode contribuir para o desenvolvimento da hiperatividade da bexiga agindo como um sensor de distensão mecânica e irritação química (Éveraerts *et al.*, 2008). De fato, o bloqueio ou a deleção gênica deste receptor diminui a hiperatividade vesical induzida pela CYP, evidenciado pelo aumento do intervalo entre as contrações e da capacidade de armazenamento da bexiga (Birder *et al.*, 2002; Charrua *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2012). Além disso, estudos prévios demonstram que o bloqueio dos receptores de quimiocinas CXCR4 e CCR2 com antagonistas seletivos reduziu a hiperatividade da bexiga induzida pela CYP, como demonstrado pelo aumento do volume de esvaziamento, da capacidade de armazenamento da bexiga e do intervalo entre as contrações de micção (Arms *et al.*, 2010; 2013).

No presente estudo, observamos que a administração dos antagonistas SB225002 e SB366791 ou a combinação de ambos,

reduziu de maneira acentuada a hiperatividade vesical induzida pela CYP. Estes efeitos podem ser observados através do aumento da capacidade de armazenamento da bexiga, do intervalo entre as contrações, do volume e eficiência de micção e das pressões da bexiga. Outra alteração funcional importante observada na hiperatividade vesical induzida pela CYP é o aumento do número de contrações não associadas à micção (CNMs) (Studený *et al.*, 2008). As CNMs são representadas por um aumento da atividade espontânea das células do músculo detrusor durante a fase de enchimento da bexiga. Nossos resultados demonstram que o bloqueio dos receptores CXCR2 e TRPV1 reduziu o número de CNMs, sugerindo que ambos os receptores parecem contribuir para o aumento dessas contrações e, conseqüentemente, para o estabelecimento de hiperatividade da bexiga. Uma vez mais, estes dados sugerem que o estabelecimento da hiperatividade vesical pode ser causado, pelo menos em parte, pela regulação positiva da expressão e interação entre os receptores CXCR2 e TRPV1.

De maneira interessante, a relação proposta entre estes receptores na fisiopatologia da cistite induzida por CYP é evidente na maioria dos resultados apresentados. A combinação de ambos os antagonistas mostrou uma interação sinérgica ou aditiva. O sinergismo ocorre quando o efeito da combinação dos antagonistas é maior do que a soma dos seus efeitos separadamente, na mesma dose, como observado nas alterações comportamentais, na análise histológica e nos níveis do RNAm do receptor TRPV1. A interação aditiva ocorreu quando o efeito da combinação dos antagonistas foi igual à soma dos efeitos dos antagonistas administrados separadamente, observado em outros resultados. No entanto, a ação dupla da combinação dos antagonistas em diferentes parâmetros inflamatórios e nociceptivos não nos permitem definir adequadamente a relação entre os receptores CXCR2 e TRPV1 na cistite induzida por CYP.

Outro aspecto interessante evidenciado no presente estudo foi a demonstração do efeito prolongado dos antagonistas na cistite induzida por CYP, ou seja, 24 horas após a administração dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 os efeitos destes compostos sobre a inflamação e a dor da bexiga induzida por CYP ainda foi observado. Nossos resultados corroboram com estudos anteriores do nosso grupo que demonstraram o efeito prolongado dos antagonistas dos receptores CXCR2 e TRPV1 em diferentes modelos animais de inflamação e dor (Marotta *et al.*, 2009,.

Manjavachi *et al.*, 2010). Nesse contexto, Marotta e colaboradores (2009) demonstraram que o pré-tratamento com SB225002 ou SB366791 diminuiu a nocicepção e a inflamação induzida por PAF, por até 8h. Além disso, Manjavachi e colegas (2010) relataram que o tratamento de camundongos com o SB225002 produziu efeitos antinociceptivo e antiinflamatório, que durou até 6 h, na inflamação induzida por carragenina e por até 24 horas no modelo de inflamação induzida por CFA. Portanto, o efeito duradouro do SB225002 e SB366791 sugere que estes antagonistas podem ter uma meia vida de concentração plasmática longa. Estudos farmacocinéticos seriam necessários para confirmar esta hipótese.

Analisados em conjunto, os resultados apresentados nesse trabalho (Figura 14) contribuem para o entendimento de alguns dos mecanismos envolvidos na patologia da cistite induzida pela CYP. Nossos dados sugerem que a interação funcional entre os receptores CXCR2 e TRPV1 parece modular a inflamação, a dor e a hiperatividade da bexiga urinária na cistite induzida pela CYP.

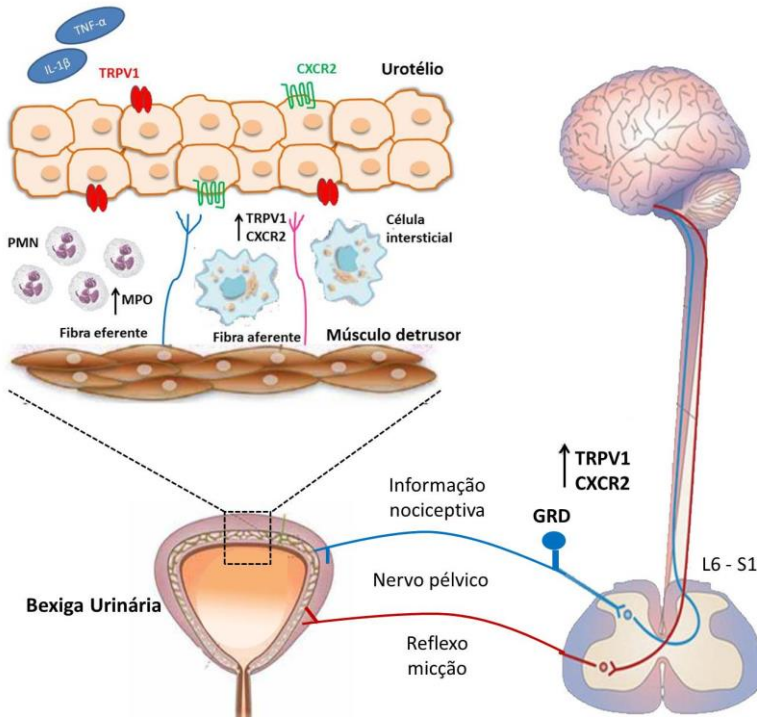


Figura 14: Mecanismos propostos para a participação dos receptores CXCR2 e TRPV1 na cistite induzida por CYP. A CYP induz inflamação da bexiga urinária através do aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, como a IL-1 β e o TNF- α , e da migração de neutrófilos na bexiga urinária. Os danos teciduais causados pela CYP incluem perda urotelial, edema e hemorragia. Além disso, ocorre um aumento na expressão dos receptores CXCR2 e TRPV1 no urotélio e fibras aferentes que inervam a bexiga urinária bem como nos neurônios do GRD (L6-S1), indicando uma possível participação desses receptores localizados nestas estruturas na transmissão da informação nociceptiva e nas alterações urodinâmicas do processo de micção e, conseqüentemente no desenvolvimento de dor visceral e hiperatividade da bexiga urinária na cistite induzida pela CYP. GRD: gânglio da raiz dorsal; PMN: polimorfonuclear (neutrófilo); MPO: mieloperoxidase.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, é possível sugerir um potencial efeito benéfico dos antagonistas seletivos dos receptores CXCR2 e TRPV1 na dor, inflamação e alterações funcionais da bexiga após a administração de CYP.

Devido à migração celular ser um fator importante para amplificação do sinal inflamatório na bexiga urinária, seu controle adequado torna-se crucial para a atenuação da cistite induzida por CYP. Diversos mediadores quimiotáticos são liberados por células epiteliais e inflamatórias durante o processo inflamatório e coordenam a infiltração leucocitária para a bexiga urinária. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a prevenção do dano urotelial, bem como a diminuição do infiltrado celular, estão diretamente relacionados a menores níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β . Esse conjunto de fatores provavelmente levou a uma acentuada redução da ativação das vias pró-inflamatórias intracelulares, resultando na atenuação do processo inflamatório induzido pela CYP.

Em conjunto, nossos resultados demonstraram que o bloqueio farmacológico dos receptores CXCR2 e TRPV1 diminuiu a inflamação da bexiga urinária induzida pela CYP, reduzindo a infiltração de neutrófilos e a produção de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas, o que resultou em uma consequente melhora no quadro de saúde dos animais. Pela primeira vez, relatamos que os receptores CXCR2 estão expressos na bexiga urinária e sua modulação parece estar relacionada com a ativação de receptores TRPV1. Além disso, demonstramos que o aumento da expressão dos receptores CXCR2 e TRPV1 na bexiga urinária após a cistite induzida pela CYP parece estar relacionado com o aumento do comportamento de dor e da hipersensibilidade visceral referida. Ainda, ambos os receptores parecem estar envolvidos no desenvolvimento de hiperatividade da bexiga urinária.

Em conclusão, nossos dados sugerem que os antagonistas seletivos dos receptores CXCR2 e TRPV1, SB225002 e SB366791, respectivamente, especialmente quando administrados em conjunto, apresentam grande potencial na prevenção da inflamação da bexiga, da hipersensibilidade visceral e da hiperatividade vesical na cistite induzida por CYP.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADIE C, BHANGOO S, DE KONINCK Y, MALCANGIO M, MELIK PARSADANIANTZ S, WHITE FA. Chemokines and pain mechanisms. **Brain Res Rev.** 60(1):125-134, 2009.

ABBAS AK, LICHTMAN AH. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. 2003.

ABRAHAM P., RABI S. Protein nitration, PARP activation and NAD⁺ depletion may play a critical role in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in the rat. **Cancer Chemother Pharmacol.** 64(2):279-285, 2009.

AHUJA S.K., MURPHY P.M. The CXC chemokines growth-related oncogene (Gro) α , GRO β , GRO γ , neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. **J Biol Chem.** 271(34): 20545–20550, 1996.

AMADESI S., NIE J., VERGNOLLE N., COTTRELL G.S., GRADY E.F., TREVISANI M., MANNI C., GEPPETTI P., MCROBERTS J.A., ENNES H., DAVIS J.B., MAYER E.A., BUNNETT N.W. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. **J Neurosci.** 24(18):4300-4312, 2004.

AMAYA F., SHIMOSATO G., NAGANO M., UEDA M., HASHIMOTO S., TANAKA Y., SUZUKI H., TANAKA M. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. **Eur J Neurosci.** 20(9):2303-2310, 2004.

ANDERSSON K.E, SARAWATE C., KAHLER K.H., STANLEY E.L., KULKARNI A.S. Cardiovascular morbidity, heart rates and use of antimuscarinics in patients with overactive bladder. **BJU Int.** 106(2):268-274, 2010.

ANDRADE E.L., FORNER S., BENTO A.F., LEITE D.F., DIAS M.A., LEAL P.C., KOEPP J., CALIXTO J.B. TRPA1 receptor modulation

attenuates bladder overactivity induced by spinal cord injury. **Am J Physiol Renal Physiol.** 300(5):1223-1234, 2011.

APODACA G., BALESTREIRE E., BIRDER L.A. The uroepithelial-associated sensory web. **Kidney Int.** 72:1057–1064, 2007.

APOSTOLIDIS A., BRADY C.M., YIANGOU Y., DAVIS J., FOWLER C.J., ANAND P. Capsaicin receptor TRPV1 in urothelium of neurogenic human bladders and effect of intravesical resiniferatoxin. **Urology.** 65: 400–405, 2005.

APPLEBAUM A.E., VANCE W.H., COGGESHALL R.E. Segmental localization of sensory cells that innervate the bladder. **J Comp Neurol.** 15;192(2):203-9, 1980.

ARMS L., GIRARD B.M., MALLEY S.E., VIZZARD M.A. Expression and function of CCL2/CCR2 in rat micturition reflexes and somatic sensitivity with urinary bladder inflammation. **Am J Physiol Renal Physiol.** 305(1):F111-122, 2013.

ARMS L., GIRARD B.M., VIZZARD M.A. Expression and function of CXCL12/CXCR4 in rat urinary bladder with cyclophosphamide-induced cystitis. **Am J Physiol Renal Physiol.** 298 (3): 589-600, 2010.

ASSREUY A.M., MARTINS G.J., MOREIRA M.E., BRITO G.A., CAVADA B.S., RIBEIRO R.A, FLORES C.A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J Urol.** 161(6):1988-1993, 1999.

AUGÉ C., CHENE G., DUBOURDEAU M., DESOUBZDANNE D., CORMAN B., PALEA S., LLUEL P., VERGNOLLE N., COELHO A. M. Relevance of the cyclophosphamide-induced cystitis model for pharmacological studies targeting inflammation and pain of the bladder. **European Journal of Pharmacology.** 707: 32–40, 2013.

AVELINO A., CHARRUA A., FRIAS B., CRUZ C., BOUDES M., DE RIDDER D., CRUZ F. Transient receptor potential channels in bladder function. **Acta Physiol (Oxf).** 207(1):110-122, 2013.

AVELINO A., CRUZ C., NAGY I., CRUZ F. Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract. **Neuroscience**. 109(4):787-798, 2002.

AVELINO A., CRUZ F. TRPV1 (vanilloid receptor) in the urinary tract: expression, function and clinical applications. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 373(4):287-299, 2006.

BAGGIOLINI M. Chemokines in pathology and medicine. **J Intern Med**. 250(2):91-104, 2001.

BARSANTE MM, CUNHA TM, ALLEGRETTI M, CATTANI F, POLICANI F, BIZZARRI C., TAFURI W.L., POOLE S., CUNHA F.Q., BERTINI R., TEIXEIRA M.M. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. **Br J Pharmacol**. 153(5):992-1002, 2008.

BECKEL J.M., KANAI A., LEE S.J., DE GROAT W.C., BIRDER L.A. Expression of functional nicotinic acetylcholine receptors in rat urinary bladder epithelial cells. **Am J Physiol Renal Physiol**. 290(1):F103-110, 2006.

BEN-BARUCH A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: The roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. **Semin Cancer Biol**. 16: 38–52, 2006.

BEN-BARUCH A., GRIMM M., BENGALI K., EVANS G.A., CHERTOV O., WANG J.M., HOWARD O.M., MUKAIDA N., MATSUSHIMA K., OPPENHEIM J.J. The differential ability of IL-8 and neutrophil-activating peptide-2 to induce attenuation of chemotaxis is mediated by their divergent capabilities to phosphorylate CXCR2 (IL-8 receptor B). **J Immunol**. 158(12):5927-5933, 1997.

BENTO A.F., LEITE D.F., CLAUDINO R.F., HARA D.B., LEAL P.C., CALIXTO J.B. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. **J Leukoc Biol**. 84(4):121312-121321, 2008.

BIELEFELDT K., LAMB K., GEBHART G.F. Convergence of sensory pathways in the development of somatic and visceral

hypersensitivity. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 291:G658–G665, 2006.

BIRDER L., ANDERSSON K.E. Urothelial signaling. **Physiol Rev.** 93(2):653-680, 2013.

BIRDER L.A. Urothelial signaling. **Auton Neurosci.** 16;153(1-2):33-40, 2010.

BIRDER L.A., DEGROAT W.C. Mechanisms of disease: Involvement of the urothelium in bladder dysfunction. **Nat Clin Prac.** 4:46–54, 2007.

BIRDER L.A., KANAI A.J., DE GROAT W.C., KISS S., NEALEN M.L., BURKE N.E., DINELEY K.E., WATKINS S., REYNOLDS I.J., CATERINA M.J. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** 98: 13396–13401, 2001.

BIRDER L.A., NEALEN M.L., KISS S., DE GROAT W.C., CATERINA M.J., WANG E., APODACA G., KANAI A.J. Beta-adrenoceptor agonists stimulate endothelial nitric oxide synthase in rat urinary bladder urothelial cells. **J Neurosci.** 15;22(18):8063-8070, 2002.

BIRDER L.A., WOLF-JOHNSTON A.S., SUN Y., CHAI T.C. Alteration in TRPV1 and muscarinic (M3) receptor expression and function in idiopathic overactive bladder urothelial cells. **Acta Physiol. In press.**

BIRDER LA. More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. **Am J Physiol Renal Physiol.** 289(3):F489-495, 2005.

BIZZARRI C., BECCARI A.R., BERTINI R., CAVICCHIA M.R., GIORGINI S., ALLEGRETTI M. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. **Pharmacol Ther.** 112(1):139-149, 2006.

BOHM-STARKE N, HILLIGES M, BRODDA-JANSEN G, RYLANDER E, TOREBJÖRK E. Psychophysical evidence of

nociceptor sensitization in vulvar vestibulitis syndrome. **Pain**. 94: 177–183, 2001.

BOISVERT W.A., CURTISS L.K., TERKELTAUB R.A. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in atherosclerosis. **Immunol Res**. 21(2-3):129-137, 2000.

BON K., LICHTENSTEIGER C.A., WILSON S.G., MOGIL J.S. Characterization of cyclophosphamide cystitis, a model of visceral and referred pain in the mouse: species and strain differences. **J Urol**. 170: 1008–1012, 2003.

BONE-LARSON CL, SIMPSON KJ, COLLETTI LM, LUKACS NW, CHEN SC, LIRA S, KUNKEL SL, HOGABOAM CM. Chemokines - The role of chemokines in the immunopathology of the liver. **Immunol Rev**. 177:8-20, 2000.

BOUCHER M., MEEN M., CODRON J.P., COUDORE F., KEMENY J.L, ESCHALIER A. Cyclophosphamide-induced cystitis in freely-moving conscious rats: behavioral approach to a new model of visceral pain. **J Urol**. 164(1):203-208, 2000.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 72:248-254, 1976.

BRADY CM, APOSTOLIDIS AN, HARPER M, YIANGOU Y, BECKETT A, JACQUES TS, FREEMAN A, SCARAVILLI F, FOWLER CJ, ANAND P. Parallel changes in bladder suburothelial vanilloid receptor TRPV1 and pan-neuronal marker PGP9.5 immunoreactivity in patients with neurogenic detrusor overactivity after intravesical resiniferatoxin treatment. **BJU Int**. 93(6):770-776, 2004.

BRAIT V.H., RIVERA J., BROUGHTON B.R., LEE S., DRUMMOND G.R., SOBEY C.G. Chemokine-related gene expression in the brain following ischemic stroke: no role for CXCR2 in outcome. **Brain Res**. 4; 1372:169-179, 2011.

BROCK N., POHL J. The development of mesna for regional detoxification. **Cancer Treat Rev**. 10:33-4, 1989.

BURNSTOCK G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. **Trends Pharmacol Sci.** 22:182–188, 2001.

CATERINA M.J., LEFFLER A., MALMBERG A.B., MARTIN W.J., TRAFTON J., PETERSEN-ZEITZ K.R., KOLTZENBURG M., BASBAUM A.I., JULIUS D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science.** 288(5464):306-313, 2000.

CATERINA M.J., SCHUMACHER M.A., TOMINAGA M., ROSEN T.A., LEVINE J.D., JULIUS D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature.** 389:816-824, 1997.

CATUSSE J., FAYE P., LOILLIER B., CREMERS B., FRANCK R.M., LUCCARINI J.M., PRUNEAU D., PAQUET J.L. Cloning and characterization of guinea pig interleukin-8 receptor. **Biochem Pharmacol.** 66(7):1171-1180, 2003.

CERVERO F., LAIRD J.M. (2004). Understanding the signaling and transmission of visceral nociceptive events. *J Neurobiol* 61:45–54.

CESARE P., DEKKER L.V., SARDINI A., PARKER P.J., MCNAUGHTON P.A. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron.** 23(3):617-624, 1999.

CHANCELLOR MB, DE GROAT WC. Intravesical capsaicin and resiniferatoxin therapy: spicing up the ways to treat the overactive bladder. **J Urol.** 162(1):3-11, 1999.

CHAPMAN R.W., MINNICOZZI M., CELLY C.S., PHILLIPS J.E., KUNG T.T., HIPKIN R.W., FAN X., RINDGEN D., DENO G., BOND R., GONSIOROK W., BILLAH M.M., FINE J.S., HEY J.A. A novel, orally active CXCR1/2 receptor antagonist, Sch527123, inhibits neutrophil recruitment, mucus production, and goblet cell hyperplasia in animal models of pulmonary inflammation. **J Pharmacol Exp Ther.** 322(2):486-493, 2007.

CHARO I.F., RANSOHOFF R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med.** 354:610-621, 2006.

CHARRUA A., CRUZ C.D., CRUZ F., AVELINO A. Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 is essential for the generation of noxious bladder input and bladder overactivity in cystitis. **J Urol.** 177(4):1537-1541, 2007.

CHARRUA A., REGUENGA C., CORDEIRO J.M., CORREIADE-SÁ P., PAULE C., NAGY I., CRUZ F., AVELINO A. Functional transient receptor potential vanilloid 1 is expressed in human urothelial cells. **J Urol.** 182: 2944–2950, 2009.

CHEPPUDIRA B.P, GIRARD B.M., MALLEY S.E, DATTILIO A., SCHUTZ K.C., MAY V., VIZZARD M.A. Involvement of JAK-STAT signaling/function after cyclophosphamide-induced bladder inflammation in female rats. **Am J Physiol Renal Physiol.** 297(4):F1038-F1044, 2009.

CHEUK D.K., LEE T.L., CHIANG A.K., HA S.Y., LAU Y.L., CHAN G.C. Risk factors and treatment of hemorrhagic cystitis in children who underwent hematopoietic stem cell transplantation. **Transpl Int.** 20(1):73-81, 2007.

CHOPRA B., BARRICK S.R., MEYERS S., BECKEL J.M., ZEIDEL M.L., FORD A.P., DE GROAT W.C., BIRDER L.A. Expression and function of bradykinin B1 and B2 receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. **J Physiol.** 562:859–871, 2005.

CHOW Y. C., YANG S., HUANG C. J., TZEN C. Y., HUANG P. L., SU Y. H., WANG P. S. Epinephrine promotes hemostasis in rats with Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Urology.** 67(3):636-641, 2006.

CHOW Y.C., YANG S., HUANG C.J., TZEN C.Y., SU Y.H., WANG P.S. Prophylactic intravesical instillation of epinephrine prevents cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Exp Biol Med.** 232:565–570, 2007.

CHRISTOPH T., GRÜNWELLER A., MIKA J., SCHÄFER M.K., WADE E.J., WEIHE E., ERDMANN V.A., FRANK R., GILLEN C., KURRECK J. Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. **Biochem Biophys Res Commun.** 350(1):238-43, 2006.

CHUANG H.H., PRESCOTT E.D., KONG H., SHIELDS S., JORDT S.E., BASBAUM A.I., CHAO M.V., JULIUS D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**. 21;411(6840):957-962, 2001.

CHUANG Y.C., TYAGI P., HUANG H.Y., YOSHIMURA N., WU M., KAUFMAN J., CHANCELLOR M.B. Intravesical immune suppression by liposomal tacrolimus in cyclophosphamide-induced inflammatory cystitis. **NeuroUrol Urodyn**. 30(3):421-427, 2011.

CHUNG M.K., JUNG S.J., OH S.B. Role of TRP channels in pain sensation. **Adv Exp Med Biol**. 704:615-636, 2011.

CHUNTHARAPAI A., KIM K.J. Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. **J Immunol**. 155(5):2587-2594, 1995.

COGGINS P.R., RAVDIN R.G., EISMAN S.H. Clinical evaluation of a new alkylating agent: cytoxan (cyclophosphamide). **Cancer**. 13:1254-1260, 1960.

CORROW K.A., VIZZARD M.A. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in bladder afferent pathways with cyclophosphamide-induced cystitis. **Neuroscience**. 163(4):1353-1362, 2009.

CROCITTO L.E., SIMPSON J.F., WILSON T.G. Bladder augmentation in the prevention of cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in the rat model. **Br J Urol**. 78:530-533, 1996.

CUNHA, T. M., VERRI JR., W. A., SILVA, J. S., POOLE, S., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**. 102:1755-1760, 2005.

DAI Y, MORIYAMA T, HIGASHI T, TOGASHI K, KOBAYASHI K, YAMANAKA H, TOMINAGA M, NOGUCHI K. Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. **J Neurosci**. 24(18):4293-4294, 2004.

DALY D., RONG W., CHESS-WILLIAMS R., CHAPPLE C., GRUNDY D. Bladder afferent sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice. **J Physiol.** 583(2):663-674, 2007.

DANG K., BIELEFELDT K., GEBHART G.F. Cyclophosphamide-induced cystitis reduces ASIC channel, but enhances TRPV1 receptor function in rat bladder sensory neurons. **J Neurophysiol.** 2013. [*in press*].

DATTILIO A., VIZZARD M.A. Up-regulation of protease activated receptors in bladder after cyclophosphamide induced cystitis and colocalization with capsaicin receptor (VR1) in bladder nerve fibers. **J Urol.** 173(2):635-639, 2005.

DE GROAT W.C. Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. **Br J Pharmacol.** 147 Suppl 2:S25-40, 2006.

DE GROAT W.C. The urothelium in overactive bladder: passive bystander or active participant? **Urology.** 64(6 Suppl 1):7-11, 2004.

DE GROAT W.C., YOSHIMURA N. Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease. **Handb Exp Pharmacol.** 194: 91-138, 2009.

DE RIDDER D., BAERT L. Vanilloids and the overactive bladder. **BJU Int.** 86(2):172-180, 2000.

DE RIDDER D., CHANDIRAMANI V., DASGUPTA P., VAN POPPEL H., BAERT L., FOWLER C.J. Intravesical capsaicin as a treatment for refractory detrusor hyperreflexia: a dual center study with long-term followup. **J Urol.** 158(6):2087-2092, 1997.

DINIS P., CHARRUA A., AVELINO A., YAQOUB M., BEVAN S., NAGY I., CRUZ F. Anandamide-evoked activation of vanilloid receptor 1 contributes to the development of bladder hyperreflexia and nociceptive transmission to spinal dorsal horn neurons in cystitis. **J Neurosci.** 15;24(50):11253-11263, 2004.

DUNSTAN C.A., SALAFRANCA M.N., ADHIKARI S., XIA Y., FENG L., HARRISON J.K. Identification of two rat genes orthologous to the human interleukin-8 receptors. **J Biol Chem.** 271(51):32770-32776, 1996.

EIJKELKAMP N., KAVELAARS A., ELSENBURCH S., SCHEDLOWSKI M., HOLTSMANN G., HEIJNEN C.J. Increased visceral sensitivity to capsaicin after DSS induced colitis in mice: spinal cord c-Fos expression and behavior. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 293: 749–757, 2009.

ERICKSON D.R., XIE S.X., BHAVANANDAN V.P., WHEELER M.A., HURST R.E., DEMERS L.M., KUSHNER L., KEAY S.K. A comparison of multiple urine markers for interstitial cystitis. **J Urol.** 167: 2461–2469, 2002.

EVERAERTS W., GEVAERT T., NILIUS B., DE RIDDER D. On the origin of bladder sensing: Tr(i)ps in urology. **NeuroUrol Urodyn.** 27: 264–273, 2008.

EVERAERTS W., SEPÚLVEDA M.R., GEVAERT T., ROSKAMS T., NILIUS B., DE RIDDER D. Where is TRPV1 expressed in the bladder, do we see the real channel? **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 379(4):421-425, 2009.

EVERAERTS W., VRIENS J., OWSIANIK G., APPENDINO G., VOETS T., DE RIDDER D., NILIUS B. Functional characterization of transient receptor potential channels in mouse urothelial cells. **Am J Physiol Renal Physiol.** 298(3):F692-F701, 2010.

FERGUSON D.R., KENNEDY I., BURTON T.J. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism? **J Physiol.** 505 (Pt 2):503-11, 1997.

FOSTER R., JUNG J., FAROOQ A., MCCLUNG C., RIPSCH M.S., FITZGERALD M.P., WHITE F.A. Sciatic nerve injury induces functional pro-nociceptive chemokine receptors in bladder-associated primary afferent neurons in the rat. **Neuroscience.** 183:230-237, 2011.

FREEDMAN A., EHRLICH R.M., LJUNG B.M. Prevention of cyclophosphamide cystitis with 2-mercaptoethane sodium sulfonate: a histologic study. **J Urol.** 1984. 132(3):580-2.

FRIAS B., CHARRUA A., AVELINO A., MICHEL M.C., CRUZ F., CRUZ C.D. Transient receptor potential vanilloid 1 mediates nerve growth factor-induced bladder hyperactivity and noxious input. **BJU Int.** 110(8):E422-E428, 2012.

FU W., ZHANG Y., ZHANG J., CHEN W.F. Cloning and characterization of mouse homolog of the CXC chemokine receptor CXCR1. **Cytokine.** 31(1):9-17, 2005.

GARAMI A., PAKAI E., OLIVEIRA D.L., STEINER A.A., WANNER S.P., ALMEIDA M.C., LESNIKOV V.A., GAVVA N.R., ROMANOVSKY A.A. Thermoregulatory phenotype of the Trpv1 knockout mouse: thermoeffector dysbalance with hyperkinesia. **J Neurosci.** 1(5):1721-1733, 2011.

GERARD C., ROLLINS B.J. Chemokines and disease. **Nat immunol.** 2 (2):106-115, 2001.

GOMES T.N., SANTOS C.C., SOUZA-FILHO M.V., CUNHA F.Q., RIBEIRO R.A. Participation of TNF-alpha and IL-1 in the pathogenesis of cyclophosphamide- induced hemorrhagic cystitis. **Braz J Med Biol Res.** 28:1103-8, 1995.

GRAY K.J., ENGELMANN U.H., JOHNSON E.H., FISHMAN I.J. Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (Cytoxan). **J Urology.** 136: 497-500, 1986.

GROVER S., SRIVASTAVA A., LEE R., TEWARI A.K., TE A.E. Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis. **Ther Adv Urol.** 3(1):19-33, 2011.

GUERIOS S.D., WANG Z.Y., BJORLING D.E. Nerve growth factor mediates peripheral mechanical hypersensitivity that accompanies experimental cystitis in mice. **Neurosci Lett.** 16; 392(3):193-197, 2006.

GUERIOS S.D., WANG Z.Y., BOLDON K., BUSHMAN W., BJORLING D.E. Blockade of NGF and trk receptors inhibits increased peripheral mechanical sensitivity accompanying cystitis in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 295(1):R111-R122, 2008.

GUNTHORPE M.J., CHIZH B.A. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. **Drug Discov Today**. 1(2):56-67, 2009.

HELYES Z., ELEKES K., NÉMETH J., POZSGAI G., SÁNDOR K., KERESKAI L., BÖRZSEI R., PINTÉR E., SZABÓ A., SZOLCSÁNYI J. Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 292(5):L1173-1181, 2007.

HIPKIN R.W., DENO G., FINE J., SUN Y., WILBURN B., FAN X., GONSIOROK W., WIEKOWSKI M.T. Cloning and pharmacological characterization of CXCR1 and CXCR2 from *Macaca fascicularis*. **J Pharmacol Exp Ther**.; 310(1):291-300, 2004.

HU V.Y., MALLEY S., DATTILIO A., FOLSOM J.B., ZVARA P., VIZZARD M.A. COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 284(2):574-585, 2003.

HU V.Y., ZVARA P., DATTILIO A., REDMAN T.L., ALLEN S.J., DAWBARN D., STROEMER R.P., VIZZARD M.A. Decrease in bladder overactivity with REN1820 in rats with cyclophosphamide induced cystitis. **J Urol**. 173(3):1016-21, 2005.

HWANG S.W., CHO H., KWAK J., LEE S.Y., KANG C.J., JUNG J., CHO S., MIN K.H., SUH Y.G., KIM D., OH U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proc Natl Acad Sci USA**. 97:6155–6160, 2000.

JAGGAR S.I., SCOTT H.C., RICE A.S. Inflammation of the rat urinary bladder is associated with a referred thermal hyperalgesia which is nerve growth factor dependent. **Br J Anaesth**. 83(3):442-8, 1999.

JI R.R., SAMAD T.A., JIN S.X., SCHMOLL R., WOOLF C.J. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**. 36(1):57-68, 2002.

JIN T, XU X, HERELD D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. **Cytokine**. 44(1):1-8, 2008.

JUNG J., SHIN J.S., LEE S.Y., HWANG S.W., KOO J., CHO H., OH U. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. **J Biol Chem**. 279(8):7048-7054, 2004.

KANAT O., KURT E., YALCINKAYA U., EVRENSEL T., MANAVOGLU O. Comparison of uroprotective efficacy of mesna and amifostine in Cyclophosphamide- induced hemorrhagic cystitis in rats. **Indian Journal of Cancer**. 43(1):12-15, 2006.

KAO D.J., LI A.H., CHEN J.C., LUO R.S., CHEN Y.L., LU J.C. WANG H.L. CC chemokine ligand 2 upregulates the current density and expression of TRPV1 channels and Nav1.8 sodium channels in dorsal root ganglion neurons. **J Neuroinflammation**. 9:189, 2012.

KHANDELWAL P., ABRAHAM S.N., APODACA G. Cell biology and physiology of the uroepithelium. **Am J Physiol Renal Physiol**. 297: F1477–F1501, 2009.

KHAW S.L., DOWNIE P.A., WATERS K.D., ASHLEY D.M., HEATH J.A. Adverse hypersensitivity reactions to mesna as adjunctive therapy for cyclophosphamide. **Pediatr Blood Cancer**. 49(3):341-3, 2007.

KIUCHI H., TAKAO T., YAMAMOTO K., NAKAYAMA J., MIYAGAWA Y., TSUJIMURA A., NONOMURA N., OKUYAMA A. Sesquiterpene lactone parthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model by inhibiting nuclear factor-kappaB phosphorylation. **J Urol**. 181(5):2339-2348, 2009.

KLINGER M.B., VIZZARD M.A. Role of p75NTR in female rat urinary bladder with cyclophosphamide-induced cystitis. **Am J Physiol Renal Physiol**. 295(6):F1778-1789, 2008.

KORKMAZ A., TOPAL T., OTER S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. **Cell Biol Toxicol**. (5):303-312, 2007.

KULLMANN F.A., SHAH M.A., BIRDER L.A., DE GROAT W.C. Functional TRP and ASIC-like channels in cultured urothelial cells from the rat. **Am J Physiol Renal Physiol.** 296(4):F892-F901, 2009.

LABERGE J., MALLEY S.E., ZVAROVA K., VIZZARD M.A. Expression of corticotropin-releasing factor and CRF receptors in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 291(3):R692-703, 2006.

LAVELLE J., MEYERS S., RAMAGE R., BASTACKY S., DOTY D., APODACA G., ZEIDEL M.L. Bladder permeability barrier: recovery from selective injury of surface epithelial cells. **Am J Physiol Renal Physiol.** 283: F242–F253, 2002.

LAZZERI M., VANNUCCHI M.G., SPINELLI M., BIZZOCO E., BENEFORTI P., TURINI D., FAUSSONE-PELLEGRINI M.S. Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) expression changes from normal urothelium to transitional cell carcinoma of human bladder. **Eur Urol.** 48(4):691-698, 2005.

LAZZERI M., VANNUCCHI M.G., ZARDO C., SPINELLI M., BENEFORTI P., TURINI D., FAUSSONE-PELLEGRINI M.S. Immunohistochemical evidence of vanilloid receptor 1 in normal human urinary bladder. **Eur Urol.** 46: 792–798, 2004.

LE Y., ZHOU Y., IRIBARREN P., WANG J.M. Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease. **Cell & Molec Immunol.** 1(2):95-104, 2004.

LEE J., DI MARZO V., BROTCHE J.M. A role for vanilloid receptor 1 (TRPV1) and endocannabinoid signalling in the regulation of spontaneous and L-DOPA induced locomotion in normal and reserpine-treated rats. **Neuropharmacology.** 51(3):557-65, 2006.

LEE J., HORUK R., RICE G.C., BENNETT G.L., CAMERATO T., WOOD W.I. Characterization of two high affinity interleukin-8 receptors. **J Biol Chem.** 267(23):16283–16287, 1992.

LEI Q., MALYKHINA A.P. Colonic inflammation up-regulates voltage-gated sodium channels in bladder sensory neurons via activation of peripheral transient potential vanilloid 1 receptors. **Neurogastroenterol Motil.** 24(6):575-585, 2012.

LEI Q., PAN X.Q., VILLAMOR A.N., ASFAW T.S., CHANG S., ZDERIC S.A., MALYKHINA A.P. Lack of transient receptor potential vanilloid 1 channel modulates the development of neurogenic bladder dysfunction induced by cross-sensitization in afferent pathways. **J Neuroinflammation**. 11; 10:3, 2013.

LEVINE A.L., RICHIE P.J. Urological complications of cyclophosphamide. **J Urol**. 141:1063–1069, 1989.

LI M., SUN Y., SIMARD J.M., CHAI T.C. Increased transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) signaling in idiopathic overactive bladder urothelial cells. **Neurourol Urodyn**. 30: 606–611, 2011.

LIN C.Y., KEEFE M. Mesna-induced photodistributed dermatosis. **Clin Exp Dermatol**. 37(4):358-60, 2012

LINARES-FERNÁNDEZ B.E., ALFIERI A.B. Cyclophosphamide induced cystitis: role of nitric oxide synthase, cyclooxygenase-1 and 2, and NK(1) receptors. **J Urol**. 177(4):1531-1536, 2007.

LIU H.T., KUO H.C. Increased expression of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 in the bladder predicts the response to intravesical instillations of resiniferatoxin in patients with refractory idiopathic detrusor overactivity. **BJU Int**. 100(5):1086-1090, 2007.

LOETSCHER P., SEITZ M., CLARK-LEWIS I., BAGGIOLINI M., MOSER B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. **FASEB J**. 8(13):1055-1060, 1994.

MALLEY S.E., VIZZARD M.A. Changes in urinary bladder cytokine mRNA and protein after cyclophosphamide-induced cystitis. **Physiol Genomics**. 9(1):5-13, 2002

MALYKHINA A.P., QIN C., GREENWOOD-VAN M.B., FOREMAN R.D., LUPU F., AKBARALI H.I. Hyperexcitability of convergent colon and bladder dorsal root ganglion neurons after colonic inflammation: mechanism for pelvic organ crosstalk. **Neurogastroenterol Motil**. 18:936–948, 2006.

MANIKANDAN R., KUMAR S., DORAIRAJAN L.N. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. **Indian J Urol.** 26(2):159-66, 2010.

MANJAVACHI M.N., QUINTÃO N.L., CAMPOS M.M., DESCHAMPS I.K., YUNES R.A., NUNES R.J., LEAL P.C., CALIXTO J.B. The effects of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice. **Eur J Pain.** 14:23–31, 2010.

MAROTTA D.M., COSTA R., MOTTA E.M., FERNANDES E.S., MEDEIROS R., QUINTÃO N.L., CAMPOS M.M., CALIXTO J.B. Mechanisms underlying the nociceptive responses induced by platelet-activating factor (PAF) in the rat paw. **Biochem Pharmacol.** 77(7):1223-1235, 2009.

MATSUOKA P.K., HADDAD J.M., PACETTA A.M., BARACAT E.C. Intravesical treatment of painful bladder syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Int Urogynecol J.** 23(9):1147-53, 2012.

MEEN M., COUDORE-CIVALE M.A., ESCHALIER A., BOUCHER M. Involvement of hypogastric and pelvic nerves for conveying cystitis induced nociception in conscious rats. **J Urol.** 166(1):318-22, 2001.

MÉLIK-PARSADANIANTZ S., ROSTÈNE W. Chemokines and neuromodulation. **J Neuroimmunol.** 198(1-2):62-68, 2008.

MEYER-SIEGLER K.L., ORDORICA R.C., VERA P.L. Macrophage migration inhibitory factor is upregulated in an endotoxin-induced model of bladder inflammation in rats. **J Interferon Cytokine Res.** 24(1):55-63, 2004.

MILLIGAN E.D., ZAPATA V., CHACUR M., SCHOENIGER D., BIEDENKAPP J., O'CONNOR K.A., VERGE G.M., CHAPMAN G., GREEN P., FOSTER AC., NAEVE G.S., MAIER S.F., WATKINS L.R. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. **Eur J Neurosci.** 20: 2294–2302, 2004.

MITSUI T., KAKIZAKI H., MATSUURA S., AMEDA K., YOSHIOKA M., KOYANAGI T. Afferent fibers of the hypogastric nerves are

involved in the facilitating effects of chemical bladder irritation in rats. **J Neurophysiol.** 86(5):2276-84, 2001.

MONACH P.A., ARNOLD L.M., MERKEL P.A. Incidence and prevention of bladder toxicity from cyclophosphamide in the treatment of rheumatic diseases: a data-driven review. **Arthritis Rheum.** 62(1):9-21, 2010.

MORAIS M.M., BELARMINO-FILHO J.N., BRITO G.A.C., RIBEIRO R.A. Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis - comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 32: 1211-1215, 1999.

MOSER B., WILLIMAN K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. **Ann Rheum Dis.** 63 (suppl) 84-89. 2004.

MOSS N.G., HARRINGTON W.W., TUCKER M.S. Pressure, volume, and chemosensitivity in afferent innervation of urinary bladder in rats. **Am J Physiol.** 272 (2Pt 2):R695-703, 1997.

MURPHY P.M., TIFFANY H.L. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. **Science.** 13; 253(5025):1280-1283, 1991.

NATHAN J.D., PATEL A.A., MCVEY D.C., THOMAS J.E., PRPIC V., VIGNA S.R., LIDDLE R.A. Capsaicin vanilloid receptor-1 mediates substance P release in experimental pancreatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** (5):G1322-1328, 2001.

NEHEMAN A., NATIV O., MOSKOVITZ B., MELAMED Y., STEIN A. Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced haemorrhagic cystitis. **BJU International.** 96(1):107-109, 2005.

NESS T.J., POWELL-BOONE T., CANNON R., LLOYD L.K., FILLINGIM R.B. Psychophysical evidence of hypersensitivity in subjects with interstitial cystitis. **J. Urol.** 173 1983–1987, 2005.

NIIYAMA Y., KAWAMATA T., YAMAMOTO J., FURUSE S., NAMIKI A. SB366791, a TRPV1 antagonist, potentiates analgesic effects of systemic morphine in a murine model of bone cancer pain. **Br J Anaesth.** 102(2):251-258, 2009.

OH, S. B., TRAN, P. B., GILLARD, S. E., HURLEY, R. W., HAMMOND, D. L., MILLER, R. J. Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. **J Neurosci.** 21, 5027–5035, 2001.

OLIVAR T., LAIRD J. M.A. Cyclophosphamide cystitis in mice: behavioral characterization and correlation with bladder inflammation. **European Journal of Pain.** 3: 141–149, 1999.

OST D., ROSKAMS T., VAN DER AA F., DE RIDDER D. Topography of the vanilloid receptor in the human bladder: more than just the nerve fibers. **J Urol.** 168: 293–297, 2002.

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.** 32(3):185-9, 2004.

PASZCUK A.F., QUINTÃO N.L., FERNANDES E.S., JULIANO L., CHAPMAN K., ANDRADE-GORDON P., CAMPOS M.M., VERGNOLLE N., CALIXTO J.B. Mechanisms underlying the nociceptive and inflammatory responses induced by trypsin in the mouse paw. **Eur J Pharmacol.** 26(581): 204-215, 2008.

PETERSEN F., FLAD H.D., BRANDT, E.J. Neutrophil-activating peptides NAP-2 and IL-8 bind to the same sites on neutrophils but interact in different ways. Discrepancies in binding affinities, receptor densities, and biological effects. **J Immunol.** 152(5): 2467–2478, 1994.

PODOLIN P., BOLOGNESE B., FOLEY J., SCHMIDT D., BUCKLEY P., WIDDOWSON K., JIN Q., WHITE J., LEE J., GOODMAN R., HAGEN T., KAJIKAWA O., MARSHALL L., HAY D., SARAU H. A potent and selective nonpeptide antagonist of CXCR2 inhibits acute and chronic models of arthritis in the rabbit. **J Immunol.** 169(11):6435-6444, 2002.

PREMKUMAR L.S., AHERN G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature.** 408(6815):985-990, 2000.

QU Y., ZHOU F., XU X.Y. Selective non-peptide CXCR2 antagonist SB225002 inhibits choroidal neovascularization in rat model. **Zhonghua Yan Ke Za Zhi.** 45(8):742-745, 2009.

QUAN J.M., MARTIN T.R., ROSENBERG G.B., FOSTER D.C., WHITMORE T., GOODMAN R.B. Antibodies against the N-terminus of IL-8 receptor A inhibit neutrophil chemotaxis. **Biochem Biophys Res Commun.** 219(2):405-411, 1996.

RAMBEAUD M., PIGHETTI G.M. Differential calcium signaling in dairy cows with specific CXCR1 genotypes potentially related to interleukin-8 receptor functionality. **Immunogenetics.** 59(1):53-58, 2007.

RANG H.P., DALE M.M., RITTER J.M., MOORE P.K. *Farmacologia.* Elsevier Editora Ltda. 6ª ed. 2008.

Reiland J, Furcht LT, McCarthy JB (1999). CXCR2-chemokines stimulate invasion and chemotaxis in prostate carcinoma cells through the CXCR2 receptor. *Prostate* 1;41(2):78-88.

REUTERSHAN J. CXCR2--the receptor to hit? **Drug News Perspect.** 19(10):6156-23, 2006.

RIBEIRO R.A., FREITAS H.C., CAMPOS M.C., SANTOS C.C., FIGUEIREDO F.C., BRITO G.A., CUNHA F.Q. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **J Urol.** 167(5):2229-34, 2002.

ROSE J., FOLEY J., MURPHY P., VENKATESAN S. On the mechanism and significance of ligand-induced internalization of human neutrophil chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. **J Biol Chem.** 24372-24386, 2004.

ROSENBERG M.T., HAZZARD M. Prevalence of interstitial cystitis symptoms in women: a population based study in the primary care office. **J Urol.** 174(6):2231-4, 2005.

ROSENKILDE M.M., SCHWARTZ T.W. The chemokine system: a major regulator of angiogenesis in health and disease. **APMIS.** 112(7-8):481-495, 2004.

RUDICK C.N., CHEN M.C., MONGIU A.K., KLUMPP D.J. Organ cross talk modulates pelvic pain. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 293:R1191–R1198, 2007.

SABAN MR, DAVIS CA, AVELINO A, CRUZ F, MAIER J, BJORLING DE, SFERRA TJ, HURST RE, SABAN R. VEGF signaling mediates bladder neuroplasticity and inflammation in response to BCG. **BMC Physiol.** 7;11:16, 2011.

Sadir S, Deveci S, Korkmaz A, Oter S. Alpha-tocopherol, beta-carotene and melatonin administration protects cyclophosphamide-induced oxidative damage to bladder tissue in rats. *Cell Biochem Funct.* 2007; 25(5):521-6.

SAINI R., GONZALEZ R.R., TE A.E. Chronic pelvic pain syndrome and the overactive bladder: the inflammatory link. **Curr Urol Rep.** 9: 314, 2008.

SAKTHIVEL S.K., SINGH U.P., SINGH S., TAUB D.D., NOVAKOVIC K.R., LILLARD JW J.R. CXCL10 blockade protects mice from cyclophosphamide-induced cystitis. **J Immune Based Ther Vaccines.** 6:6, 2008.

SANTOS A.A. JR., LEAL P.C., EDELWEISS M.I., LOPES T.G., CALIXTO J.B., MORRONE F.B., CAMPOS M.M. Effects of the compounds MV8608 and MV8612 obtained from *Mandevilla velutina* in the model of hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 382(5-6):399-407, 2010.

SAVARIN-VUAILLAT C., RANSOHOFF R.M. Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? **Neurotherapeutics.** 4(4):590-601, 2007.

SEKI, S., SASAKI, K., FRASER, M.O., IGAWA, Y., NISHIZAWA, O., CHANCELLOR, M.B., DE GROAT, W.C., YOSHIMURA, N. Immunoneutralization of nerve growth factor in lumbosacral spinal cord reduces bladder hyperreflexia in spinal cord injured rats. **J Urol.** 168: 2269-2274, 2002.

SEKI, S., SASAKI, K., IGAWA, Y., NISHIZAWA, O., CHANCELLOR, M.B., DE GROAT, W.C., YOSHIMURA, N. Suppression of detrusor

sphincter dyssynergia by immunoneutralization of nerve growth factor in lumbosacral spinal cord in spinal cord injured rats. **J Urol.** 171: 478- 482, 2004.

SILVA A., CHARRUA A., DINIS P., CRUZ F. TRPV1 knockout mice do not develop bladder overactivity during acute chemical bladder inflammation. Program No. 288.16. Society for Neuroscience, CD-ROM. 2004.

SMALDONE M.C., VODOVOTZ Y., TYAGI V., BARCLAY D., PHILIPS B.J., YOSHIMURA N., CHANCELLOR M.B., TYAGI P. Multiplex analysis of urinary cytokine levels in rat model of cyclophosphamide-induced cystitis. **Urology.** 73(2):421-426, 2009.

STEERS, W.D., CIAMBOTTI, J., ETZEL, B., ERDMAN, S., DE GROAT, W.C. Alterations in afferent pathways from the urinary bladder of the rat in response to partial urethral obstruction. **J Comp Neurol.** 310: 401-410, 1991.

STEERS, W.D., CREEDON, D.J., TUTTLE, J.B. Immunity to nerve growth factor prevents afferent plasticity following urinary bladder hypertrophy. **J Urol.** 155:379-385, 1996.

STRIETER R.M., BURDICKA M.D., MESTASA J., GOMPERTSC B., KEANE M.P., BELPERIO J.A. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. **Eur J Cancer.** 42: 768-778, 2006.

STUDENY S., CHEPPUDIRA B.P., MEYERS S., BALESTREIRE E.M., APODACA G., BIRDER L.A., BRAAS K.M., WASCHEK J.A., MAY V., VIZZARD M.A. Urinary bladder function and somatic sensitivity in vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-/- mice. **J Mol Neurosci.** 36(1-3): 175-187, 2008.

SUN Y., CHAI T.C. Augmented extracellular ATP signaling in bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. **Am J Physiol Cell Physiol.** 290(1):C27-34, 2006.

SUN Y., KEAY S., DEDEYNE P., CHAI T. Stretch-activated release of adenosine triphosphate by bladder uroepithelia is augmented in interstitial cystitis. **Urology.** 57 (6 Suppl 1):131, 2001.

TAKAHASHI M., JEEVAN A., SAWANT K., MCMURRAY D.N., YOSHIMURA T. Cloning and characterization of guinea pig CXCR1. **Mol Immunol.** 44(5):878-888, 2007.

TÓTH D.M., SZOKE E., BÖLCSKEI K., KVELL K., BENDER B., BOSZE Z., SZOLCSÁNYI J., SÁNDOR Z. Nociception, neurogenic inflammation and thermoregulation in TRPV1 knockdown transgenic mice. **Cell Mol Life Sci.** 68(15):2589-2601, 2011.

TRAXER O., DESGRANDCHAMPS F., SEBE P., HAAB F., LE DUC A., GATTEGNO B., THIBAUT P. Hemorrhagic cystitis: etiology and treatment. **Prog Urol.** 11(4):591-601. 2001.

VAN DAMME J., STRUYF S., OPDENAKKER G. Chemokine–protease interactions in cancer. **Semin Cancer Biol.** 14:201–208, 2004.

VARGA A., NÉMETH J., SZABÓ A., MCDUGALL J.J., ZHANG C., ELEKES K., PINTÉR E., SZOLCSÁNYI J., HELYES Z. Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. **Neurosci Lett.** 9;385 (2):137-142, 2005.

VERA P.L., ICZKOWSKI K.A., WANG X., MEYER-SIEGLER K.L. Cyclophosphamide-induced cystitis increases bladder CXCR4 expression and CXCR4-macrophage migration inhibitory factor association. **PLoS One.** 3(12):e3898, 2008.

VERNE G.N., ROBINSON M.E., PRICE D.D. Hypersensitivity to visceral and cutaneous pain in the irritable bowel syndrome. **Pain.** 93(1):7-14, 2001.

VERRI W.A. JR, CUNHA T.M., PARADA C.A., POOLE S., CUNHA F.Q., FERREIRA S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther.** 112(1):116-138, 2006.

VIZZARD M.A. Alterations in neuropeptide expression in lumbosacral bladder pathways following chronic cystitis. **J Chem Neuroanat.** 21(2):125-38, 2001.

VIZZARD M.A. Alterations in spinal cord Fos protein expression induced by bladder stimulation following cystitis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 279: 295–305, 2000a.

VIZZARD M.A. Changes in urinary bladder neurotrophic factor mRNA and NGF protein following urinary bladder dysfunction. **Exp Neurol.** 161(1):273-284, 2000b.

VYKHOVANETS E.V., MACLENNAN G.T., VYKHOVANETS O.V., CHERULLO E.E., PONSKY L.E., GUPTA S. Molecular imaging of nuclear factor- κ B in bladder as a primary regulator of inflammatory response. **J Urol.** 187(1):330-7, 2012.

WAYNFORTH H.B., FLECKNEL P.A. Experimental and surgical technique in the rat. Elsevier. 2004.

WANG Y., WANG D.H. TRPV1 Ablation Aggravates Inflammatory Responses and Organ Damage during Endotoxic Shock. **Clin Vaccine Immunol.** 20(7):1008-1015, 2013.

WANG Z.Y., WANG P., MERRIAM F.V., BJORLING D.E. Lack of TRPV1 inhibits cystitis induced increased mechanical sensitivity in mice. **Pain.** 139:158–16, 2008.

WHITE F.A., BHANGOO S.K., MILLER R.J. Chemokines: integrators of pain and inflammation. **Nat Rev Drug Discov.** 4(10):834-844, 2005.

WHITE J.R., LEE J.M., YOUNG P.R., HERTZBERG R.P., JUREWICZ A.J., CHAIKIN M.A., WIDDOWSON K., FOLEY J.J., MARTIN L.D., GRISWOLD D.E., SARAU H.M. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. **J Biol Chem.** 273(17):10095-10098, 1998.

WONG T.M., YEO W., CHAN L.W., MOK T.S. Hemorrhagic pyelitis, ureteritis, and cystitis secondary to cyclophosphamide: case report and review of the literature. **Gynecol Oncol.** 76(2):223-5. 2000.

XU G.Y., WINSTON J.H., SHENOY M., YIN H., PENDYALA S., PARICHA P.J. Transient receptor potential vanilloid 1 mediates

hyperalgesia and is up-regulated in rats with chronic pancreatitis. **Gastroenterology**. 133: 1282–1292, 2007;

XU L., GEBHART G.F. Characterization of mouse lumbar splanchnic and pelvic nerve urinary bladder mechanosensory afferents. **J Neurophysiol**. 99(1):244-53, 2008.

YAMADA T, UGAWA S, UEDA T, ISHIDA Y, KAJITA K, SHIMADA S. Differential localizations of the transient receptor potential channels TRPV4 and TRPV1 in the mouse urinary bladder. **J Histochem Cytochem**. 57: 277–287, 2009.

YOSHIDA T., KAWASHIMA A., UJIKE T., UEMURA M., NISHIMURA K., MIYOSHI S. Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced hemorrhagic cystitis. **Int J Urol**. 15(7): 639-641, 2008.

YOSHIMURA N., BENNETT N.E., HAYASHI Y., OGAWA T., NISHIZAWA O., CHANCELLOR M.B., DE GROAT W.C., SEKI S. Bladder overactivity and hyperexcitability of bladder afferent neurons after intrathecal delivery of nerve growth factor in rats. **J Neurosci**. 18;26(42):10847-10855, 2006.

YOSHIMURA N., CHANCELOR M.B. Neurophysiology of lower urinary tract and dysfunction. **Rev Urology**. 5: S3-S10, 2003.

YU W., ZACHARIA L.C., JACKSON E.K., APODACA G. Adenosine receptor expression and function in bladder uroepithelium. **Am J Physiol Cell Physiol**. 291(2):C254-265, 2006.

YURIDULLAH R., CORROW K.A., MALLEY S.E., VIZZARD M.A. Expression of fractalkine and fractalkine receptor in urinary bladder after cyclophosphamide (CYP)-induced cystitis. **Auton Neurosci**. 126–127: 380–389, 2006.

ZHANG F., YANG H., WANG Z., MERGLER S., LIU H., KAWAKITA T., TACHADO S.D., PAN Z., CAPÓ-APONTE J.E., PLEYER U., KOZIEL H., KAO W.W., REINACH P.S. Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through MAPK signaling. **J Cell Physiol**. 213(3):730-739. 2007.

ZHANG G., LIN R.L., WIGGERS M., SNOW D.M., LEE L.Y. Altered expression of TRPV1 and sensitivity to capsaicin in pulmonary myelinated afferents following chronic airway inflammation in the rat. **J Physiol.** 586 (Pt 23):5771-5786, 2008.

ZHANG N., INAN S., COWAN A., SUN R., WANG J.M., ROGERS T.J., CATERINA M., OPPENHEIM J.J. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 102(12):4536-4541, 2005.

ZHANG N., OPPENHEIM J.J. Crosstalk between chemokines and neuronal receptors bridges immune and nervous systems. **J Leukoc Biol.** 78(6):1210-1214, 2005.

ZHANG Q.L., QIAO L.Y. Regulation of IGF-1 but not TGF- β 1 by NGF in the smooth muscle of the inflamed urinary bladder. **Regul Pept.** 177(1-3):73-78, 2012.

ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.** 16: 109-110, 2002.

ZYGMUNT P.M., PETERSSON J., ANDERSSON D.A., CHUANG H., SØRGÅRD M., DI MARZO V., JULIUS D., HÖGESTÄTT ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature.** 400(6743):452-427, 1999.

8. PUBLICAÇÕES

Artigo relacionado à tese

DORNELLES F.N., ANDRADE E.L., CAMPO M.M, CALIXTO J.B. Role of CXCR2 and TRPV1 in functional, inflammatory and behavioral changes in the rat model of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **British J Pharm.** 2013. *In press.*

Artigo não relacionado à tese

VIANA A.F., MACIEL I.S., DORNELLES F.N., FIGUEIREDO C.P., SIQUEIRA J.M., CAMPOS M.M., CALIXTO J.B. Kinin B1 receptors mediate depression-like behavior response in stressed mice treated with systemic E. coli lipopolysaccharide. **J Neuroinflammation.** 7:98, 2010.