
Cambios en el óxido nítrico, las prostaglandinas y en la actividad de la mieloperoxidasa, inducidos por la acroleína en vejiga urinaria de rata.

Beatriz Linares-Fernández¹ y Anna B. Alfieri².

¹Cátedra de Fisiología, Escuela de Medicina "Dr. Luis Razetti", Facultad de Medicina y

²Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Acroleína, ciclo-oxigenasa-2, mieloperoxidasa, óxido nítrico.

Resumen. Se estudió el papel de la sustancia P, el óxido nítrico(ON) y las prostaglandinas (PGs) en la cistitis inducida por acroleína(ACR), para lo cual se estudiaron los cambios de las actividades de la óxido nítrico sintasa inducible(iNOS) y de la mieloperoxidasa(MPO) vesicales, así como en los niveles de PGs y de metabolitos del ON. Ratas macho Sprague-Dawley recibieron ACR (5mg/Kg, i.p), más uno de los siguientes tratamientos: Grupo 1: Salina, 0,10mL/100g i.p.; Grupo 2: Win-51.708(WIN), 25mg/Kg i.p.; Grupo 3: S-metilisotiourea(MITU), 35 mg/Kg i.p.; Grupo 4: Rofecoxib(ROF), 20mg/Kg v.o.; Grupo 5: Meloxicam(MEL), 25mg/Kg i.p.; Grupo 6: combinación MITU+MEL. La mortalidad inducida por ACR fue parcialmente prevenida por WIN (antagonista NK1) y MITU (inhibidor iNOS). En los animales que sobrevivieron a 24 horas de exposición a ACR se encontraron cambios histológicos inflamatorios en vejiga, que se acompañaron de aumentos en la actividad MPO. También se observaron aumentos de nitratos+nitritos y PGs. El WIN no previno ninguno de estos cambios. El ROF y el MEL (inhibidores COX-2) protegieron parcialmente contra la inflamación vesical, mientras que el tratamiento con MITU fue capaz de prevenir estos cambios así como también el aumento de metabolitos del ON. La combinación MITU+MEL produjo una mayor protección contra los efectos inducidos por ACR. Estos resultados indican que el ON producido vía de la iNOS y las PGs producidas por la COX-1/COX-2, desempeñan un papel en la patogénesis de la cistitis por ACR. La ACR podría estimular a la iNOS y a las COX-1/COX-2, induciendo la migración linfocitaria, aumentos de nitratos+nitritos y de PGs.

Changes in nitric oxide, prostaglandins and mieloperoxidase activity in acrolein-induced cystitis in rats.

Invest Clin 2009; 50(1): 23 - 33

Key words: Acrolein, cyclo-oxygenase-2, mieloperoxidase, nitric oxide.

Abstract. To investigate the role of substance P(sP), nitric oxide (ON) and prostaglandins (PGs) in acrolein(ACR)-induced cystitis, we studied the changes induced by ACR on bladder inducible nitric oxide synthase(iNOS) and mieloperoxidase(MPO) activities, along with PGs and NO metabolites levels. Sprague-Dawley male rats received i.p. ACR (5mg/Kg) plus one of the following treatments: Group 1: saline 0.10 mL/100g i.p.; Group 2: Win-51.708 (WIN) 25mg/Kg i.p.; Group 3: S-metilisothiurea(MITU) 35mg/Kg i.p.; Group 4: Rofecoxib(ROF) 20mg/Kg o.p.; Group 5: Meloxicam(MEL) 25mg/Kg i.p.; Group 6: combination MITU+MEL. ACR-induced mortality was partially prevented by WIN (NK1 antagonist) and MITU (iNOS inhibitor). Animals that survived after 24h of ACR exposure, had histological inflammatory changes in bladder along with increased MPO activity. There was augmentation of nitrates+nitrites and of PGs. WIN didn't prevent any of these effects. ROF and MEL (COX-2 inhibitors) partially protected against bladder inflammation; MITU pre-treatment was able to prevent these changes and those of NO metabolites levels. The MITU+MEL combination produced the highest protection against ACR-induced damage. These results suggest that NO produced via iNOS and PGs produced by COX-1/COX-2, have an important role in the pathogenesis of cystitis induced by ACR. ACR could stimulate iNOS and COX-1/COX-2, producing lymphocyte migration and increases of NO and PGs.

Recibido: 08-02-2008. Aceptado: 12-06-2008.

INTRODUCCIÓN

La ciclofosfámid (CFM), un agente quimioterapéutico utilizado para el tratamiento de enfermedades neoplásicas y autoinmunes ha sido asociada con la producción de cistitis neurogénica. Este importante efecto adverso es responsable de la alta morbilidad asociada al citotóxico, con deterioro de la calidad de vida de los pacientes que lo reciben; de allí el interés por entender su mecanismo etiológico. Existe evidencia que demuestra que la acroleína (ACR), su principal metabolito urinario, está involucrada en la cistitis inducida por la CFM. En efecto, se ha descrito que la administra-

ción a ratas de la mostaza fosforamida (el último metabolito alquilante de la CFM) o la 5,5-dimetil CFM (la cual no se metaboliza a ACR) provoca daños mínimos en las vejigas, mientras que la administración de la CFM (la cual forma ACR), ocasiona un incremento significativo en el peso de las vejigas asociado a presencia de daño y edema en las mismas (1). De hecho, la administración de ACR a animales de laboratorio, tanto por vía intravesical como por vía intraperitoneal (i.p.) es capaz de producir cistitis (2, 3). La ACR también produce la contracción de tiras de vejiga urinaria de rata, al estimular las fibras aferentes primarias sensibles a capsaicina (FAPSC) y este efecto es

reducido significativamente por el pretratamiento combinado con antagonistas NK1 y NK2; concomitantemente, la extravasación de proteínas plasmáticas inducida por CFM es inhibida significativamente por el pretratamiento con antagonistas NK1 ó capsaicina (4), otorgándosele así un papel a la sP en este proceso inflamatorio. Adicionalmente se ha demostrado que la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se encuentra involucrada en la cistitis inducida por CFM y ha sido propuesto que la ACR podría inducir liberación de sP desde las FAPSC y que este péptido estaría involucrado en los pasos iniciales del proceso inflamatorio a través de la estimulación de la síntesis del óxido nítrico (ON) y/o las prostaglandinas (PGs) (5,6). De hecho, la cistitis inducida por CFM puede ser prevenida con fármacos inhibidores de la iNOS y de la ciclooxigenasa-2(COX-2) (7). Con base a estos resultados, en el presente trabajo se investigó el papel de la sP, el ON y las PGs en la cistitis inducida por ACR. Con esa finalidad se estudiaron los cambios de las actividades iNOS y MPO en vejiga urinaria, así como en los niveles de PGs y de metabolitos del ON. Otros parámetros, como alteraciones histológicas inflamatorias en vejiga urinaria y porcentaje de mortalidad de los animales fueron evaluados como parámetros adicionales de toxicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

A ratas macho Sprague-Dawley (250-350g) les fue administrada la ACR en una dosis de 5 mg/kg i.p. y fueron sacrificados después de 24 horas, bajo anestesia con uretano (1,5 mg/kg;0,10mL/100g). Tales dosis y tiempo de exposición a la ACR i.p. fueron elegidos después de evaluar un rango de dosis de ACR (2,5-6 mg/kg) y diferentes tiempos de sacrificio (6-72 horas). Este esquema inductor de cistitis fue seleccionado por ser capaz de producir cambios significativos en vejiga urinaria asociados a baja mortalidad.

El antagonista selectivo Win-51,708 (WIN) fue utilizado para bloquear el receptor NK1 de la sP; la metil-isotiourea (MITU) se utilizó para inhibir la iNOS. El Rofecoxib (ROF), inhibidor altamente selectivo de la COX-2 y el Meloxicam (MEL), inhibidor selectivo de la COX-2, fueron escogidos para inhibir dicha enzima. El ROF fue preparado en forma de suspensión oral, utilizando las tabletas disponibles comercialmente (Vioxx®, de Merck) y el MEL fue utilizado como solución parenteral (Mobic®, Boehringer-Ingelheim). El resto de los fármacos eran de Laboratorios Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) y fueron formulados en agua destilada el día del experimento, a excepción del WIN, que fue preparado en dimetil sulfóxido (DMSO).

El día del experimento los animales recibieron ACR (5 mg/kg, i.p.) más uno de los siguientes tratamientos: Grupo 1: Salina, 0,10 mL/100g i.p.; Grupo 2: WIN, 25mg/kg i.p.; Grupo 3: MITU, 35 mg/kg i.p.; Grupo 4: ROF, 20mg/kg v.o; Grupo 5: MEL, 25 mg/kg i.p.; Grupo 6: Tratamiento combinado con MITU y MEL, según régimen de administración individuales. El grupo control estuvo conformado por animales que sólo recibieron solución salina, 0,10mL/100g i.p. Las dosis de cada antagonista e inhibidor fueron fraccionadas en 3 partes y administradas a diferentes tiempos (tomando en consideración sus parámetros farmacocinéticos) (5, 8, 9), con la finalidad de asegurar niveles plasmáticos adecuados durante el período de 24 horas de exposición a la ACR. Cada grupo experimental estuvo conformado por 8 animales que completaron con vida las 24 horas de exposición a ACR, así como el procedimiento de obtención de muestras biológicas. Adicionalmente, los efectos *per se* del WIN, MITU, ROF, MEL y DMSO fueron determinados en animales no tratados (8 animales/experimento).

La orina de los animales de cada grupo fue recolectada utilizando jaulas metabóli-

cas individuales, desde la hora 18 a la 24 posterior a la administración de la ACR. Al finalizar el período de 24 horas, los animales fueron anestesiados y se tomaron muestras sanguíneas del ventrículo izquierdo colocándolas en tubos con citrato de sodio; inmediatamente fueron sacrificados y las vejigas fueron removidas. El plasma fue obtenido por centrifugación de las muestras sanguíneas. Todas las muestras (tejidos, orina y plasma) fueron congeladas a -60°C hasta el momento del análisis, con la excepción de las vejigas destinadas a la realización de estudios histológicos, las cuales fueron fijadas inmediatamente con formaldehído. En todo momento se siguieron los lineamientos sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos. Se realizaron esfuerzos para minimizar el estrés y el sufrimiento de los animales y para hacer uso de un número mínimo de estos.

Actividad iNOS en vejiga urinaria

La actividad de la iNOS fue determinada en la vejiga urinaria a través de la formación de $L\text{-}^3\text{H}$ -citrulina a partir de $L\text{-}^3\text{H}$ -arginina, utilizando un estuche comercial para ensayo de NOS, de Calbiochem® (San Diego, CA, USA). El día del experimento las vejigas fueron descongeladas, cortadas y homogenizadas en buffer 250mM Tris-HCl, pH:7,4, que contenía EDTA 10 mM y EGTA 10 mM e inhibidores de proteasas. Posteriormente, el homogenado fue centrifugado por 1 minuto a 4°C , a máxima velocidad. El sobrenadante fue incubado por 1 hora junto a la mezcla de reacción constituida por: buffer Tris-HCl (pH:7,4), tetrahidrobiopterina 6 μM , FAD, 2 μM , FMN 2 μM , NADPH 10 mM y $L\text{-}^3\text{H}$ -arginina 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$. El tiempo de reacción fue de una hora a temperatura ambiente, tiempo en el cual la formación de citrulina es lineal. La reacción fue terminada con el añadido de buffer Hepes 50 mM, pH 5,5, conteniendo EDTA 5 mM. El exceso

de $L\text{-}^3\text{H}$ -arginina fue removido utilizando una resina catiónica Dowex equilibrada, mediante centrifugación a 10.000 rpm por 30 segundos, transfiriéndose el eluato a un vial de centelleo. Allí se añadió el líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo líquido. La concentración de proteínas fue medida según el método de Lowry (10) y la actividad de la iNOS expresada como picomoles de citrulina/mg de proteína/minuto.

Cuantificación de nitratos+nitritos urinarios y plasmáticos

Los niveles de nitratos+nitritos fueron determinados en la orina y plasma obtenidos de ratas controles y tratadas. El día del ensayo, las proteínas de las muestras fueron precipitadas y los nitratos fueron convertidos en nitritos, utilizando perlas de cadmio para producir la reducción no enzimática. Los nitritos se cuantificaron mediante la reacción de Griess (ácido sulfanílico 1%, en ácido fosfórico al 15% y N-(1-naftil)-etilendiamino 0,1%) (11). La reacción produjo un cromóforo rosado cuya intensidad del color fue proporcional a la concentración de nitritos, cuantificada espectrofotométricamente a 540 nm. La creatinina fue determinada por medio de una modificación de la reacción de Jaffé, utilizando ácido pícrico en solución alcalina. Los nitratos+nitritos fueron expresados como $\mu\text{mol}/\text{g}$ creatinina en orina y pmol/mL en plasma.

Determinación de los niveles urinarios de PGE2

Los niveles de PGE_2 fueron medidos utilizando un estuche comercial (Oxford Biomedical Research), el cual opera en base a la competencia entre la enzima conjugada con PGE_2 y la PGE_2 en la muestra, por un número limitado de sitios de unión (anticuerpos) en la placa. Para ello se utilizaron las muestras de orina recolectadas tal y como fue descrito previamente. Brevemen-

te, las muestras de orina fueron descongeladas y centrifugadas a 10.000 rpm; el sobrenadante fue añadido en la placa del ensayo. Inmediatamente se añadió la enzima conjugada, se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, la placa fue lavada vigorosamente 3 veces con buffer de lavado, con la finalidad de eliminar tanto enzima conjugada libre como muestra no ligada. Finalmente, se añadió el sustrato de la enzima y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. La reacción de la enzima con su sustrato generó un cromóforo, cuya absorbancia fue determinada a 650 nm, mediante un espectrofotómetro de placas. Los resultados fueron expresados en ng de PGE₂/mL de orina.

Actividad mieloperoxidasa en vejiga urinaria

La actividad MPO fue determinada según la metodología descrita por Stucchi y col (12) para la mucosa colónica, con algunas modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Brevemente, se prepararon homogenados con 50 mg de vejiga fresca en buffer fosfato frío que contenía bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0,5%. Los homogenados fueron congelados, descongelados y sonicados 3 veces, para posteriormente ser centrifugados a 40,000 g, por 15 min. El sobrenadante se usó para la reacción final, la cual se realizó mediante el añadido de buffer fosfato de sodio que contenía o-dihidrocloruro de dianisidina y peróxido de hidrógeno 0,0005%, e incubación por 40 minutos (tiempo en el cual la producción del cromóforo es lineal). El cambio en absorbancia fue medido a 450 nm. Los resultados fueron expresados en términos de actividad específica, como absorbancia por mg de tejido, en 40 minutos, a 25°C.

Estudios histológicos

Las vejigas de los animales de los grupos control y de tratamiento se tomaron

para los estudios histológicos. Las muestras frescas provenientes de los animales inmediatamente después de su sacrificio fueron fijadas por 12-16 horas en solución tamporada neutra de formaldehído, embebidas en parafina, seccionadas en cortes de 3-4 micras y teñidas usando hematoxilina-eosina y ácido tricrómico. Todos los cortes fueron examinados para buscar evidencias de cualquier cambio con respecto a los controles, particularmente los asociados con inflamación.

Análisis estadístico

Los resultados fueron reportados como la media \pm error estándar de la media (EEM), y fueron analizados utilizando Análisis de Varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Duncan, con la excepción del análisis de la mortalidad, para lo cual se utilizó una Prueba de Chi Cuadrado (χ^2). Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos

RESULTADOS

Mortalidad y evaluación histológica

La ACR a una dosis de 5 mg/kg i.p. por 24 horas, produjo una mortalidad que osciló entre el 28-33% (promedio 29,8%) (Tabla I). Sólo los animales que completaron las 24 horas de exposición a ACR fueron considerados y utilizados para estudios posteriores. En contraste con las vejigas de los animales controles, aquellas de los animales tratados con la ACR (5 mg/kg, i.p., mostraron cambios histológicos en el urotelio, edema intersticial moderado, con infiltración de neutrófilos y mastocitos corroborándose así el daño inducido por este agente. Cuando se administraron los tratamientos con el inhibidor de la iNOS (MITU), o con los inhibidores de la COX-2 (ROF or MEL) o con la combinación de MITU+SE ME observaron menores cambios histológicos compatibles con inflamación. Los trata-

TABLA I
EFEECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE LA MORTALIDAD Y CAMBIOS
HISTOLÓGICOS Y EN LA ACTIVIDAD MPO EN VEJIGA URINARIA INDUCIDOS POR LA ACR

Tratamiento	Mortalidad (%)	Descripción histológica de la vejiga	Actividad MPO Absorbancia/mg proteína/40 min
SALINA	0	Urotelio intacto, sin edema intersticial	0,53 ± 0,11
ACR	30 ^{ooo}	En comparación con vejigas controles, hay presencia de edema moderado en submucosa y capas serosas, con alta infiltración de neutrófilos y mastocitos	2,32 ± 0,31 ^o
ACR+ WIN	17*	Edema leve en las capas submucosas y serosas, con infiltración de neutrófilos y mastocitos. No diferente de la ACR sola	1,53 ± 0,19
ACR+ MITU	22	Edema leve en las capas submucosas y serosas, con menos infiltración de neutrófilos comparado con ACR sola	1,34 ± 0,12*
ACR+ ROF	30	Edema leve en las capas submucosas, con baja infiltración de neutrófilos en relación con ACR sola	0,75 ± 0,15**
ACR+ MEL	25	Edema leve en las capas submucosas y serosas con baja infiltración de neutrófilos y mastocitos, en comparación con ACR sola	1,06 ± 0,17**
ACR+ MITU+MEL	10***	En comparación con ACR sola, hay edema leve en las capas submucosas con baja infiltración de neutrófilos. Algunas zonas de los tejidos están intactas, presentando un aspecto similar al de los controles	1,28 ± 0,17*

Los animales recibieron los diferentes tratamientos. Posteriormente fueron sacrificados bajo anestesia. Las vejigas fueron removidas y utilizadas para el estudio histológico o para la determinación de la actividad MPO. Se reporta la mortalidad observada por grupo de tratamiento; para la realización de los estudios histológicos, bioquímicos y de actividad enzimática se completaron grupos de 8 animales sobrevivientes en cada tratamiento.

Para mortalidad: ^{ooo}Significativamente diferente de los valores controles a $p < 0,001$. * significativamente diferente de los valores de ACR a $p < 0,05$. *** significativamente diferente de los valores de ACR a $p < 0,001$.

Para actividad MPO: se muestran los valores promedio ± EEM de 8 animales que completaron con vida la exposición a ACR y la toma de muestra tisular (vejiga). ^o significativamente diferente de los valores controles a $p < 0,05$. * significativamente diferente de los valores de ACR a $p < 0,05$. ** significativamente diferente de los valores de ACR a $p < 0,01$.

mientos con MITU+MEL y con WIN fueron capaces de reducir significativamente la mortalidad asociada con la administración de la ACR ($P=0,0004$ y $p=0,03$, respectivamente) indicando una protección sistémica (Tabla I). Salvo la ACR, ninguno de los fármacos utilizados mostró efecto *per se* sobre la vejiga urinaria.

Actividad MPO en vejiga urinaria

La determinación de la actividad MPO en las vejigas de ratas tratadas con ACR (5mg/kg i.p.; 24 horas) puso en evidencia que el agente tóxico es capaz de inducir un aumento significativo en dicha actividad, en un 377% ($p < 0,05$) (Tabla I). La inhibición del receptor de sp no fue capaz de prevenir este incremento, mientras que la MITU, el MEL y el ROF previnieron parcialmente los cambios en la actividad enzimática inducidos por el agente citotóxico, resultando en un aumento moderado de la actividad MPO del 45%, 30% y 12% ($p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,01$), respectivamente. El tratamiento

combinado con MITU+MEL no produjo protección adicional a la conferida por los tratamientos separados (47% de aumento con respecto a los controles; $p < 0,05$).

Actividad de la iNOS y niveles de nitratos+nitritos urinarios y plasmáticos

La ACR fue capaz de inducir un incremento significativo en los metabolitos del ON, tanto urinarios (144%) como plasmáticos (117%), comparado con los controles ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente) (Tabla II). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre la actividad de la iNOS en vejiga urinaria (pmol citrulina/mg proteína/min $1,1 \pm 0,2$ en controles vs. $1,0 \pm 0,2$ en tratados). El incremento en los metabolitos del ON fue prevenido significativamente por el pretratamiento con MITU o con la combinación de MITU+MEL ($p < 0,05$). El bloqueo del receptor NK_1 o la inhibición de la enzima COX-2 no evitó los cambios en la producción del ON inducida por ACR (Tabla II).

TABLA II
CAMBIOS EN LOS METABOLITOS DEL ON Y EN LA PGE2 INDUCIDOS POR ACR. EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON EL ANTAGONISTA Y LOS INHIBIDORES

Tratamiento	Metabolitos plasmáticos del ON (pmol/mL)	Metabolitos urinarios del ON ($\mu\text{mol/g Cr}$)	PGE2 urinaria (ng/mL)
SALINA	$7,78 \pm 0,28$	$0,36 \pm 0,10$	$2,69 \pm 0,26$
ACR	$16,88 \pm 1,08^{\circ}$	$0,88 \pm 0,19^{\circ}$	$4,73 \pm 0,22^{\circ}$
ACR + WIN	$13,98 \pm 1,05$	$0,69 \pm 0,01$	$4,58 \pm 0,18$
ACR + MITU	$7,38 \pm 1,04^{**}$	$0,16 \pm 0,06^*$	$4,72 \pm 0,23$
ACR + ROF	$19,00 \pm 4,79$	$0,85 \pm 0,10$	$4,54 \pm 0,26$
ACR + MEL	$17,30 \pm 3,12$	$0,84 \pm 0,16$	$4,17 \pm 0,20$
ACR + MITU + MEL	$9,78 \pm 2,34^*$	$0,09 \pm 0,02^{**}$	$2,92 \pm 0,38^{**}$

Las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas individuales 18 h luego de recibir la ACR. Toda la orina producida en las siguientes 6 h fue recolectada (tiempo del efecto máximo de la ACR). Al final de las 24 h luego de la administración de la ACR, los animales se anestesiaron y se obtuvo una muestra sanguínea por punción cardíaca. Las muestras de orina y de plasma fueron congeladas a -60°C hasta el momento de ser analizadas.

Se muestran los valores promedio \pm EEM de 8 animales que completaron con vida la exposición a ACR, la recolección de orina y la toma de muestra sanguínea.

$^{\circ}$ Significativamente diferente de los valores controles a $p < 0,05$. $^{\circ\circ}$ significativamente diferente de los valores controles a $p < 0,01$. * significativamente diferente de los valores de ACR a $p < 0,05$. ** significativamente diferente de los valores de ACR. $p < 0,01$.

Cuantificación de PGE2 en orina

La ACR indujo un incremento significativo (76%) en los niveles de PGE2 urinaria ($p < 0,05$). Este incremento no fue prevenido por el pretratamiento con WIN, MITU, ROF ó MEL; sólo con la combinación de MITU+MEL hubo una prevención significativa del aumento de PGE2 (88% de prevención; $p < 0,01$) (Tabla II).

DISCUSIÓN

La ACR, un aldehído altamente reactivo y uno de los metabolitos de la CFM, ha sido relacionada con la producción de la cistitis neurogénica inducida por este antineoplásico (1). Este importante efecto adverso asociado al uso de la CFM es responsable del significativo deterioro de la calidad de vida de los pacientes que deben recibirlo, lo cual muchas veces dificulta su administración o lleva al abandono prematuro del tratamiento; por este motivo existe gran interés en entender su mecanismo etiológico y así poder manejarlo adecuadamente. El papel que juega la ACR en la generación de la cistitis hemorrágica ha sido sugerido desde el año 1.979, cuando Cox encontró que tanto la mostaza fosforamida (último metabolito alquilante de la CFM), como la 5,5-dimetil CFM (la cual se metaboliza sin formar productos tóxicos), provocaban daños mínimos en vejiga (1). Se ha propuesto que la ACR actúa como un irritante químico, induciendo la liberación de sP desde las FAPSC; este péptido liberado estaría entre los desencadenantes del proceso inflamatorio en el cual mediadores como el ON o las PGs también estarían involucrados (6). De hecho, se ha encontrado que en la cistitis inducida por CFM ocurre un incremento del ARNm de la COX-2 así como de las PGs urinarias y que dichos efectos pueden ser prevenidos con el pretratamiento con fármacos inhibidores de la COX y de la NOS (7-13).

En el presente estudio se evaluó el papel de la sP, del ON y de las PGs en la cistitis inducida por la ACR. El tratamiento con ACR a una dosis de 5 mg/kg, i.p., produjo una mortalidad cercana al 30%. Este parámetro de mortalidad fue considerado para la determinación de toxicidad y de prevención asociada a los tratamientos utilizados. Sin embargo, para los estudios histológicos, bioquímicos y de actividad enzimática se completaron grupos de 8 animales sobrevivientes a cada tratamiento, y estos son los que se reportan. La ACR produjo cambios significativos en vejiga urinaria, evidenciados como edema moderado con infiltración de neutrófilos, asociados con aumento de la actividad MPO. Se ha descrito que la ACR puede causar, entre otras, la muerte de células vesicales por oncosis (14), y esto podría explicar el daño observado y el edema en los tejidos.

En concordancia con estudios previos que demostraron incrementos de PGs inducidos por ACR en vías respiratorias de bovino (15) y relajación de aorta de rata evocada por la ACR debido a un mecanismo dependiente de ON (16), en el presente estudio se encontró que la ACR induce un incremento de PGs urinarias y de metabolitos del ON (urinarios y plasmáticos), que fueron parcialmente prevenidos por un inhibidor selectivo de la iNOS. Sin embargo, no se observó ningún cambio de la actividad de la iNOS en vejiga, después de 24 horas de exposición al tóxico, lo que sugiere que la iNOS se debe inducir durante la primera fase del proceso inflamatorio (lo que produce el aumento de la síntesis del ON), pero más tarde la enzima es inactivada o destruida probablemente por la misma ACR. De hecho, se ha descrito que esta sustancia es capaz de conjugarse rápidamente *in vitro* con los grupos sulfidrilo libres de enzimas, lo cual provoca una rápida reducción de su actividad (17).

En este estudio, WIN no proporcionó protección contra los cambios histológicos, bioquímicos y enzimáticos en vejiga inducidos por ACR; sin embargo, hubo una reducción importante de la mortalidad en los animales tratados con este fármaco (17% vs 30% observado con ACR sola; $p=0,03$). Este resultado sugiere que el bloqueo de los receptores NK1 en otros tejidos, como los pulmones, el corazón o el riñón es capaz de prevenir parcialmente los daños sistémicos inducidos por el tóxico, reduciendo la mortalidad, pero sin prevenir la cistitis. De hecho, otros grupos han demostrado que ratas expuestas por 10 minutos a ACR en el aire tuvieron una reducción de sP en la tráquea, dependiente de la dosis, indicando que el agente induce liberación del neuropéptido desde las fibras aferentes primarias de las vías respiratorias (19). Esto permite sugerir que la ACR sistémica podría inducir liberación de sP en pulmones, corazón y otros órganos vitales, induciendo cambios sistémicos importantes que pueden ser parcialmente prevenidos por el WIN, reflejándose como una reducción de la mortalidad, pero sin conferir protección contra la cistitis, probablemente por la alta capacidad de la ACR de concentrarse en vejiga urinaria. Estos resultados sugieren que, a diferencia del modelo de cistitis por CFM (7), la sP no es un mediador importante de los daños inducidos por la ACR i.p.

La administración de la MITU (un inhibidor selectivo de la iNOS) produjo una reducción moderada de la mortalidad de los animales expuestos a ACR. Este tratamiento, solo o combinado con MEL, impidió el aumento de los metabolitos del ON, reafirmando que esta isoforma de la NOS es la responsable del aumento de este mediador observado con el tratamiento con ACR. El ON juega un papel importante, pero no único en este modelo de citotoxicidad; situación similar fue observada en el modelo de cistitis por CFM (7). Asimismo, la MITU fue

capaz de prevenir los cambios en la actividad de la MPO, asociándose a una menor infiltración de neutrófilos en vejiga urinaria. No hubo cambios en la producción de PGs.

El tratamiento con los inhibidores de la ciclooxigenasa (iCOX) (MEL y ROF) no fue capaz de prevenir la mortalidad inducida por ACR. En los animales sobrevivientes tampoco previno el aumento de los metabolitos del ON, ni de las PGs. En cuanto a la actividad de la MPO, ambos iCOX fueron capaces de inhibirla significativamente, asociándose a este efecto una menor migración de células inflamatorias, corroborada histológicamente. El hecho de que los inhibidores de la COX1 y de la COX2 no hayan disminuido significativamente la producción de PGE2 pero sí hayan prevenido la inflamación (evaluada histológicamente y como actividad MPO en vejiga) parece indicar que otras prostaglandinas diferentes a la PGE2 u otros mecanismos mediados por COX podrían tener un papel relevante en este modelo de cistitis. La falta de prevención en la producción de metabolitos del ON observada con los iCOX sugiere al menos en este modelo, no hay una modulación cruzada de las actividades de la COX y la NOS, a diferencia de lo reportado por otros autores (19).

Por último, la combinación de la MITU + MEL confiere gran protección, con una reducción de la mortalidad (10% vs 30% con ACR sola; $p=0,0004$). Este tratamiento combinado fue capaz de prevenir el aumento de la producción de metabolitos ON, de PGs urinarias, de la actividad MPO, así como de daños histológicos en la vejiga. Tales resultados sugieren que la inhibición combinada de la iNOS y la COX es efectiva para controlar el proceso inflamatorio inducido por ACR, ya que la menor producción de ON y de inflamación podría conducir a una inducción más moderada de la COX-1/COX-2, así como a niveles de activi-

dad que pueden ser prevenidos por las dosis de iCOX utilizadas.

Los resultados de este estudio indican que el ON producido por vía de la iNOS así como las PGs producidas por la actividad COX-1/COX-2 desempeñan un papel en la patogénesis de la cistitis inducida por ACR. La administración i.p. de ACR es capaz de estimular a la iNOS y a las isoformas de la COX, induciendo la migración de linfocitos en la vejiga, provocando aumentos de nitratos+nitritos en la orina y en plasma y de PGs urinarias. El hecho de que los iCOX no fueron capaces de prevenir estos cambios sugiere que al menos en este modelo no hay modulación cruzada entre PGs y ON.

AGRADECIMIENTO

Este estudio fue parcialmente financiado por el proyecto C.D.C.H. PG0605221-2005, otorgado a ABA.

REFERENCIAS

1. **Cox P.** Cyclophosphamide cystitis-Identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharm* 1979; 28:2045-2049.
2. **Bjorling DE, Elkahwaji JE, Bushman W, Janda LM, Boldon K, Hopkins WJ, Wang ZY.** Acute acrolein-induced cystitis in mice. *Br J Urol Int* 2007; 99(6):1523-1529.
3. **Sakata T, Smith RA, Garland EM, Cohen SM.** Rat urinary bladder epithelial lesions induced by acrolein. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1989; 9(2):159-169.
4. **Ahluwalia A, Maggi CA, Santicioli P, Lecci A, Giuliani S.** Characterization of the capsaicin-sensitive component of cyclophosphamide-induced inflammation in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* 1994; 111(4):1017-1022.
5. **Alfieri AB, Malavé A, Cubeddu L.** Nitric oxide synthases and cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Naunyn-Schiedemberg's Arch Pharmacol* 2001; 363(3):353-357.
6. **Alfieri AB, Cubeddu LX.** Nitric oxide and NK1-tachykinin receptors in cyclophosphamide-induced cystitis, in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295(2):824-829.
7. **Linares-Fernández BE, Alfieri AB.** Cyclophosphamide induced cystitis: role of nitric oxide synthase, cyclooxygenase-1 and 2, and NK(1) receptors. *J Urol* 2007; 177(4):1531-1536.
8. **Halpin RA, Geer LA, Zhang KE, Marks TM, Dean DC, Jones AN, Melillo D, Doss G, Vyas K P.** The absorption, distribution, metabolism and excretion of rofecoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in rats and dogs. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(10):1244-1254.
9. **Busch U, Schmid J, Heinzel G, Schmaus H, Baierl J, Huber C, Roth W.** Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans, 1: *Drug Metab Dispos* 1998; 26(6):576-584.
10. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-275.
11. **Green. LC, Wagner, DA, Glogowski. J, Skipper, PL, Wishnok, JS, Tannenbaum SR.** Analysis of nitrate, nitrite, and (¹⁵N)nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.
12. **Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McClun J, Shebani K, Moore F, O'Brien M, Becker JM.** NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am J Physiol* 2000; 279:G1298-G1306.
13. **Hu V, Malley S, Dattilio A, Folsom J, Zvara P, Vizzard M.** COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284:R574-R585.
14. **Rudra PK, Krokan HE.** Acrolein cytotoxicity and glutathione depletion in n-3 fatty acid-sensitive and-resistant human tumor cells. *Anticancer Res* 1999; 19:461-469.
15. **Douppnik C, Leikauf G.** Acrolein stimulates eicosanoid release from bovine airway

- epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1990; 274:L573-L581.
16. **Tsakadze NL, Srivastava S, Awe SO, Adeagbo AS, Bhatnagar A, D'Souza SE.** Acrolein-induced vasomotor responses of rat aorta. *Am J Physiol Heart Circul Physiol* 2003; 285(2):H724-H734.
 17. **Scott TR, Kirsch RE.** Inhibition of rat liver glutathione S-transferase isoenzymes by acrolein. *Biochem Int* 1988; 16(3):439-442.
 18. **Springall DR, Edginton JA, Price PN, Swanston DW, Noel C, Bloom SR, Polak JM.** Acrolein depletes the neuropeptides CGRP and substance P in sensory nerves in rat respiratory tract. *Environ Health Perspect* 1990; 85:151-157.
 19. **Timoshenko AV, Lala PK, Chakraborty C.** PGE2-mediated upregulation of iNOS in murine breast cancer cells through the activation of EP4 receptors. *Int J Cancer* 2004; 108(3):384-389.