

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Avaliação das Alterações Produzidas na Bexiga por
Fármacos em Sistemas Lipossomais Administrados Via
Intravesical**

LORENA MAGALE DANTAS CIRINO

ARACAJU
Março - 2009

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PRODUZIDAS NA BEXIGA
POR FÁRMACOS EM SISTEMAS LIPOSSOMAIS
ADMINISTRADOS VIA INTRAVESICAL**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração Saúde e Ambiente.

LORENA MAGALE DANTAS CIRINO

Orientadoras:

**Prof^a. Francine Ferreira Padilha, D. Sc,
Prof^a. Juliana Cordeiro Cardoso, D. Sc.**

ARACAJU
Março – 2009

C578a	Cirino, Lorena Magale Dantas Avaliação das Alterações Produzidas na Bexiga de Ratas por Fármacos em Sistemas Lipossomais Administrados Via Intravesical / Lorena Magale Dantas Cirino ; orientadores Francine Ferreira Padilha, Juliana Cordeiro Cardoso . – Aracaju, 2009. 91 p. : il. Inclui bibliografia Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, 2009. 1. Resiniferatoxina. 2. Hiperatividade do detrusor. 3. Lipossomas.. 4. Incontinência urinária. 5. Oxibutinina. I. Padilha, Francine Ferreira.. II. Cardoso, Juliana Cordeiro. III. Título. CDU : 614 615.03
-------	---

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PRODUZIDAS NA BEXIGA DE RATAS POR
FÁRMACOS EM SISTEMAS LIPOSSOMAIS ADMINISTRADOS VIA INTRAVESICAL**

Lorena Magale Dantas Cirino

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovada por:

Francine Ferreira Padilha, D.Sc.
Orientador

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.
Orientador

Thiers Deda Gonçalves, D.Sc.
Titular

Sonia Oliveira Lima, D. Sc.
Titular

ARACAJU
Março - 2009

Dedico este trabalho:

Aos meus filhos Paulo e Henrique, por serem a maior motivação para todas as realizações pessoais e profissionais desta vida.

AGRADECIMENTOS

Para realizar este trabalho, foi necessária a participação de muitos, seja com esforço, empenho, resignação, compreensão e até solidariedade de alguns que nada tinham com tudo isso.

Quero agradecer primeiramente a Deus pela força e determinação de superar todos os limites que até então desconhecia e ser capaz de chegar até o final desta jornada. Em segundo lugar à minha família, em especial à minha mãe, Graça e ao meu marido Marcelo pelo apoio nos momentos mais difíceis e compreensão diante das várias ausências necessárias para completar os estudos.

Quero agradecer às minhas orientadoras, as Professoras Doutoras Juliana Cordeiro Cardoso e Francine Ferreira Padilha pelo interesse, pelo empenho em fazer o melhor sempre; por me ajudar a me reerguer quando tudo parecia perdido, e por não me deixar desistir nunca. Obrigada por terem me guiado neste caminho tão cheio de dúvidas, e por terem me ajudado a realizar este trabalho do qual tenho muito orgulho e que vai me acompanhar por toda a vida profissional.

Agradeço especialmente ao Professor Doutor Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Jr, essencial para a realização do trabalho, com paciência, seriedade e cuidado na avaliação de todas as lâminas envolvidas no estudo; Agradeço à Nelly do LBME -ITP, pelo trabalho delicado de elaboração das lâminas;

A Professora Ana Maria Guedes e ao Professor Malone Pinheiro pela parceria nas urinálises e na detecção do lipossoma na urina dos animais;

Ao Sr. Elisandro do Departamento de Física da UFS, pela análise dos lipossomas

Aos amigos do Biotério: Gladstone, João e Max.

Aos amigos do Curso de Mestrado em Saúde e Ambiente da UNIT, pelo apoio pois só quem passa pelo desafio de fazer um mestrado entende tudo o que representa uma defesa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
CAPÍTULO 1. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1. Incontinência urinária.....	17
1.2. Bexiga.....	18
1.3. Fisiologia da micção.....	21
1.4. Hiperatividade do detrusor.....	23
1.5. Tratamento.....	24
1.5.1. Oxibutinina.....	25
1.5.2. Capsaicina.....	26
1.5.3. Resiniferatoxina.....	27
1.6. Lipossomas.....	29
1.7. Avaliação morfológica.....	31
1.8. Urinálise.....	32
1.9. Referências.....	34
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA BEXIGA DE RATAS PRODUZIDAS POR OXIBUTININA E RESINIFERATOXINA EM SISTEMAS LIPOSSOMAIS ADMINISTRADOS VIA INTRAVESICAL.....	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
2.1. Introdução.....	45
2.2. Material e métodos.....	46
2.2.1. Preparação das formulações intra-vesicais.....	46
2.2.2. Avaliação do tamanho de partícula e índice de polidispersividade.....	46
2.2.3. Administração intravesical.....	47
2.2.4. Análise do sedimento urinário.....	48
2.2.5. Extração e histologia da bexiga dos ratos.....	48
2.2.6. Análise estatística.....	50
2.3. Resultados.....	50
2.3.1. Avaliação do tamanho de partícula e índice de polidispersividade.....	50
2.3.2. Achados cirúrgicos.....	52
2.3.3. Macroscopia.....	52
2.3.4. Avaliação histológica.....	56
2.3.5. Urinálise.....	65
2.4. Discussão.....	66
2.5. Conclusão.....	71
2.6. Referências.....	72
CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PRODUZIDAS NA BEXIGA POR CAPSAICINA EXTRAÍDA DE <i>CAPSICUM FRUTESCENS</i> EM SISTEMAS LIPOSSOMAIS.....	75
RESUMO.....	76
ABSTRACT.....	77
3.1. Introdução.....	78
3.2. Material e métodos.....	79
3.2.1. Secagem da planta e obtenção do extrato.....	79

3.2.2. Avaliação da extração por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	79
3.2.3. Obtenção do lipossoma.....	80
3.2.4. Caracterização do lipossoma.....	80
3.2.5. Ensaio Biológico.....	80
3.3. Resultados e discussão.....	82
3.3.1. Extração e quantificação dos marcadores.....	82
3.3.2. Caracterização dos lipossomas.....	83
3.3.3. Avaliação histológica.....	85
3.4. Conclusão.....	87
3.5. Referências.....	88
4.CONCLUSÃO GERAL.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos de animais submetidos à administração intravesical	47
Tabela 2	Classificação dos parâmetros microscópicos da reação inflamatória nas secções da bexiga coradas em hematoxilina-eosina (HE)	49
Tabela 3	Avaliação das secções histológica coradas com HE das bexigas tratadas com salina (SAL), lipossomas (LIP), oxibutinina (OXI), resiniferatoxina (RTX), oxibutinina em lipossomas (OXILIP) e resiniferatoxina em lipossomas (RTXLIP)	62
Tabela 4	Resultados da urinálise realizada após 15 dias da instilação das formulações	65
Tabela 5	Índice de polidispersividade das formulações lipossomais	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Urotélio de rato corado com hematoxilina/eosina no aumento 400 x	20
Figura 2	Visão macroscópica da bexiga e suas camadas	21
Figura 3	Reflexo da micção	22
Figura 4	Avaliação de presença de lipídios na urina	33
Figura 5	Distribuição do tamanho das vesículas lipossomais contendo oxibutinina (A) e resiniferatoxina (B)	51
Figura 6	Índice de polidispersividade das formulações lipossomais após 3 e 42 dias da obtenção das mesmas	51
Figura 7	Hematúria macroscópica e presença de aderências vesicais observadas durante a dissecação em rato do grupo com resiniferatoxina após 7 dias	52
Figura 8	Avaliação do tamanho médio das bexigas dos animais (mm) após 1, 7 e 60 dias após a administração intravesical	53
Figura 9	Avaliação macroscópica das bexigas evidenciando tamanho (mm) e pontos hemorrágicos no grupo salina (SAL) e em 1 (LIP-1), 7 (LIP-7) e 60 (LIP-60) dias após instilação das formulações	54
Figura 10	Avaliação macroscópica das bexigas evidenciando tamanho (mm) e pontos hemorrágicos em 1, 7 e 60 dias após a instilação de oxibutinina (OXI) e resiniferatoxina (RTX)	54
Figura 11	Avaliação macroscópica das bexigas evidenciando tamanho (mm) e pontos hemorrágicos em 1, 7 e 60 após a instilação de oxibutinina em lipossomas (OXILIP) e resiniferatoxina em lipossomas (RTXLIP)	55
Figura 12	Intensidade de pontos hemorrágicos nas bexigas após instilação das formulações (A) após 1 dia; (B) após 7 dias	56
Figura 13	Secções histológicas dos grupos após um dia da instilação das formulações com a coloração Hematoxilina/eosina (aumento 100X) dos grupos salina (SAL-1), lipossoma (LIP-1), Oxibutinina (OXI-1), Resiniferatoxina (RTX-1), Oxibutinina em lipossomas (OXILIP-1), Resiniferatoxina em lipossomas (RTXLIP-1)	58
Figura 14	Secções histológicas dos grupos após 7 dias da instilação das formulações com a coloração Hematoxilina/eosina (aumento 100X) dos grupos salina (SAL-7), lipossoma (LIP-7), Oxibutinina (OXI-7), Resiniferatoxina (RTX-7), Oxibutinina em lipossomas (OXILIP-7),	59

	Resiniferatoxina em lipossomas (RTXLIP-7)	
Figura 15	Secções histológicas dos grupos após 60 dias da instilação das formulações com a coloração Hematoxilina/eosina (aumento 100X) dos grupos salina (SAL-60), lipossoma (LIP-60), Oxibutinina (OXI-60), Resiniferatoxina (RTX-60), Oxibutinina em lipossomas (OXILIP-60), Resiniferatoxina em lipossomas (RTXLIP-60)	61
Figura 16	Secções histológicas dos grupos após 1, 7 e 60 dias da instilação das formulações com a coloração Picrossírius (aumento 100X) dos grupos salina (SAL), lipossoma (LIP-1, LIP-7 e LIP-60 respectivamente), Oxibutinina (OXI-1, OXI-7 e OXI-60, respectivamente), Resiniferatoxina (RTX-1, RTX7 e RTX60, respectivamente), Oxibutinina em lipossomas (OXILIP-1, OXILIP-7 e OXILIP-60, respectivamente), Resiniferatoxina em lipossomas (RTXLIP-1, RTXLIP-7 e RTXLIP-60, respectivamente)	64
Figura 17	Visualização das gotículas de gordura na urina dos ratos. (A) gotículas de gordura, resíduos e cristais de fosfato triplo no grupo OXILIP-60; (B) gotícula corada no grupo OXILIP-60; (C) gotícula corada e gotículas menores não coradas no grupo RTXLIP-60; (D) gotícula corada no grupo RTXLIP-60	65
Figura 18	Cromatograma do extrato contendo capsaicina e diidrocapsaicina (A) e dos padrões de capsaicina e diidrocapsaicina (B)	83
Figura 19	Potencial zeta dos lipossomas sem capsaicina (LIP) e com capsaicina (LIPCPS) durante 60 dias após obtenção das vesículas	84
Figura 20	Tamanho das vesículas sem (A) e com (B) capsaicina nos tempos 1, 7 e 14 dias	85
Figura 21	Secções histológicas das bexigas após 24 horas da instilação das formulações com a coloração Hematoxilina/eosina aumento 100X (A) e aumento 400X (B) dos grupos salina (SAL), lipossoma (LIP), capsaicina (CPS) e capsaicina em lipossomas (LIPCPS)	86
Figura 22	Secções histológicas das bexigas após 24 horas da instilação das formulações com a coloração picrossírius aumento 100X dos grupos salina (SAL), lipossoma (LIP), capsaicina (CPS) e capsaicina em lipossomas (LIPCPS)	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

BH	- Bexiga Hiperativa
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNI	- Contrações Não-Inibidas
EMDA	- Administração Eletromotiva De Drogas
GAG	- Glicosaminoglicanas
HD	- Hiperatividade do Detrusor
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IU	- Incontinência Urinária
IUE	- Incontinência Urinária de Esforço
OMS	- Organização Mundial da Saúde
OXI	- Oxibutinina
OXILIP	- Oxibutinina Associada a Lipossomas
PIV	- Polipeptídeo Intestinal Vasoativo
RTX	- Resiniferatoxina
RTXLIP	- Resiniferatoxina Associada a Lipossomas
CPS	- Capsaicina
TPRV 1	- Receptor Vanilóide Transitório Potencial 1
VR1	- Receptor Vanilóide 1

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PRODUZIDAS NA BEXIGA DE RATAS POR FÁRMACOS EM SISTEMAS LIPOSSOMAIS ADMINISTRADOS VIA INTRAVESICAL

Lorena Magale Dantas Cirino

A incontinência urinária interfere na vida pessoal e social da mulher causando-lhe desconforto e constrangimento. Esta doença incide aproximadamente em 40% das mulheres em menopausa, sendo que uma das causas pode ser atribuída a Hiperatividade do Detrusor (HD). A oxibutinina tem sido extensivamente utilizada no tratamento da bexiga hiperativa. A capsaicina e a resiniferatoxina são descritas como alternativas para o tratamento da bexiga hiperativa pela via intravesical, entretanto, sua administração pode ocasionar reações adversas com sintomas irritativos como dor pélvica e desconforto. Desta forma, o objetivo do trabalho foi desenvolver formulações lipossomais contendo capsaicina, resiniferatoxina ou oxibutinina para administração intravesical e avaliar o impacto histomorfológico destas substâncias na bexiga após a instilação destas formulações. Os lipossomas obtidos ou os fármacos em solução foram instilados via intravesical em ratas e após 1, 7 e 60 dias foram realizados exames histopatológicos das bexigas das ratas para avaliar a presença de reação inflamatória e alterações na estrutura do colágeno vesical. O estudo do sedimento urinário das ratas foi realizado quinzenalmente em busca de marcadores inflamatórios e da presença de lipossomas. O resultado encontrado foi uma importante atenuação da agressão tecidual nos grupos com lipossomas. Verificou-se a presença de lipossomas nas amostras de urina dos animais até o 60º dia. A estratégia de obtenção de sistemas lipossomais para administração intravesical de fármacos utilizados na hiperatividade do detrusor demonstrou ser eficiente, com diminuição da resposta inflamatória.

Palavras-chave: resiniferatoxina, capsaicina, hiperatividade do detrusor, lipossomas, tratamento intravesical, incontinência urinária, oxibutinina.

EVALUATION OF ALTERATIONS PRODUCED IN BLADDER BY DRUGS INTO LIPOSOMAL SYSTEMS FOR INTRAVESICAL ADMINISTRATION

Lorena Magale Dantas Cirino

Urinary incontinence interferes in a social life, causing discomfort and embarrassment and it affects up to 40% of all women at menopause. Overactive Bladder (OB) which is one of the many types of urinary incontinence, concerns pharmacological treatment with anticholinergics, many times associated with unpleasant side effects such as dry mouth, constipation and blurred vision. Capsaicin and resiniferatoxin are described as alternative intravesical treatment to OB. Therefore its administration can cause irritative symptoms as pelvic pain and discomfort. The aim of this work was obtain liposomes with capsaicin, resiniferatoxin or oxybutinin for intravesical administration and evaluate these formulations under histomorphological impact in rat bladder. The drugs alone and encapsulated in liposomes were instilled inside the rat bladder and after 1, 7 and 60 days, bladders were excised and submitted to histopathological analysis looking for inflammatory reaction and collagen alterations. Rat urinalyses were made each 15 days in order to search infection markers and liposomes. As results, an important reduction in tissue damage was seen on the liposome with drug group. Liposomes presence was seen at urine samples until 60 days after intravesical instillation. Liposomal systems strategy for intravesical drug administration for OB treatment seemed efficient with decrease of inflammatory response.

Keywords: resiniferatoxin, capsaicin, oxybutinin, urinary incontinence, overactive bladder, liposomes, intravesical, treatment.

INTRODUÇÃO

A preocupação com os aspectos da menopausa tem ganhado uma crescente importância devido às modificações de papéis que a mulher passou a exercer na sociedade no último século e especialmente nestas últimas décadas (BESSA, 2007).

A sociedade moderna tem trazido muitas vantagens, tais como conforto, acesso a informação, saúde e educação, desenvolvimento das ciências e tecnologias. A melhora das condições de saúde proporcionou um aumento significativo da longevidade. Segundo o IBGE, a expectativa de vida da mulher brasileira passou de 65,7 anos em 1980 para 75,8 anos em 2005, assim surgindo à necessidade da comunidade científica preocupar-se mais com os temas referentes à saúde do idoso. Com o aumento da expectativa de vida, e estimando que a mulher entre na menopausa com cerca de 50 anos de idade (LIMA e GIRÃO, 2003), ela pode passar um terço ou mais de sua vida neste período. Por esse motivo, fez-se necessária a busca de alternativas para melhorar a qualidade de vida da mulher nesta nova fase de sua vida.

Um dos aspectos físicos do início da menopausa é a diminuição da circulação sanguínea nos órgãos pélvicos pela queda dos níveis hormonais. Concomitantemente, ocorre um afrouxamento dos tecidos, favorecendo as distopias (alterações na posição dos órgãos pélvicos) e a incontinência urinária (GIRÃO, 1998; SARTORI, 2001). A menopausa relaciona-se diretamente ao aumento da incidência de incontinência urinária, que chega a ser de 40% neste período (STANTON, 1985).

Neste contexto, a medicina tem avançado muito no campo da uroginecologia. O tratamento da bexiga hiperativa iniciou-se em 1972 com a descoberta da oxibutinina. No século XXI, começaram a aparecer novos fármacos para administração pela via oral, como a tolterodina e a solifenacina (ANDERSSON e CHAPPLE, 2001). Porém, a administração oral destes fármacos traz uma série de efeitos colaterais indesejáveis do tipo boca seca, constipação, visão turva sendo associados ao efeito de primeira passagem no fígado, deste modo o tratamento intravesical torna-se uma excelente via alternativa. Atualmente, o caminho para o tratamento parenteral da bexiga hiperativa é feito também através de adesivos com oxibutinina, através da bomba vesical que consiste em um reservatório inserido na bexiga capaz de liberar a droga desejada de forma constante. Pela via intravesical, podem ser utilizadas a toxina botulínica, a capsaicina (extraída de espécies de pimenta) e a resiniferatoxina, extraída da planta *Euphorbia resinífera*, sendo esta 1000

vezes mais potente que a capsaicina segundo a escala de Scoville (APPENDINO e SZALLASI, 1997).

Novas formas de tratamento têm sido buscadas, tais como a utilização da terapia gênica com o uso das células tronco para esta doença (caráter experimental) e sistemas de liberação prolongada, tais como lipossomas e bioadesivos. Estes sistemas permitem que o princípio ativo seja incorporado em um veículo biológico ou sintético que se adere ao tecido orgânico e que provoca a liberação gradual deste princípio ativo proporcionando um tratamento contínuo e prolongado sem a necessidade de ficar ingerindo comprimidos, sem efeito de primeira passagem, podendo usar doses menores do fármaco (FRÉZARD, et al., 2005). A busca por novos sistemas de liberação sustentada de fármacos administrados intravesicalmente e com efeitos colaterais mínimos pode proporcionar um incremento no número de adesões das pacientes ao tratamento e incluir pacientes que estavam fora de possibilidade terapêutica por não tolerarem o tratamento via oral ou serem resistentes ao tratamento ou por não desejarem o tratamento cirúrgico (FRASER *et al.*, 2002).

Os lipossomas são capazes de encapsular substâncias lipofílicas ou hidrofílicas e através de difusão passiva, interagem com as membranas celulares de forma gradativa, liberando a substância encapsulada de forma lenta (FRÉZARD *et al.*, 2005). Ao mesmo tempo, eles também são capazes de reforçar a proteção urotelial contra a agressão de substâncias tóxicas, minimizando o dano tecidual (FRASER *et al.*, 2003). Substâncias lipofílicas como a capsaicina e a resiniferatoxina necessitam de um veículo com componente alcoólico (etanol) para permitir sua dissolução (TYAGI *et al.*, 2004). Entretanto, o etanol exerce um efeito irritativo na mucosa vesical, tornando-se mais uma razão para a associação lipossomal das substâncias.

A proposta de desenvolver um sistema de liberação prolongada utilizando os fármacos como a oxibutinina, resiniferatoxina e capsaicina surgiu da necessidade de um tratamento com maior durabilidade e menores efeitos colaterais.

Deste modo o objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações vesicais provocadas pela resiniferatoxina, oxibutinina e capsaicina isoladamente e associadas a lipossomas, utilizando modelo animal para aplicação intravesical.

O presente trabalho foi dividido, a em três partes, sendo que a primeira parte discorre sobre a revisão da literatura sobre o tema proposto segunda parte compreende o artigo sobre a resposta inflamatória vesical provocada pela oxibutinina e resiniferatoxina administradas na bexiga na forma pura e associada a lipossomas. A última parte apresenta um artigo sobre a extração da capsaicina da *Capsicum frutescens* pimenta malagueta e sua encapsulação em lipossomas, avaliando *in vitro* e *in-vivo* suas propriedades .

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA

1. REVISÃO DA LITERATURA

A incontinência urinária (IU) é um problema físico e social que atinge principalmente as mulheres no período da menopausa. Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca de tratamentos eficazes, entretanto fazem-se necessários estudos aprofundados na área de uroginecologia que envolvam todos os aspectos relacionados a esta doença, tais como estudos da anatomia da bexiga, fisiopatologia da incontinência urinária por instabilidade vesical e formas de tratamento disponíveis.

1.1 - INCONTINÊNCIA URINÁRIA (IU)

Segundo o COMITÊ DE PADRONIZAÇÃO DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE CONTINÊNCIA (1991), a incontinência urinária é a perda involuntária de urina clinicamente demonstrável que cause problema social ou higiênico. Existe a incontinência urinária de esforço, que é definida como a perda urinária pelo meato uretral quando a pressão vesical excede a pressão máxima de fechamento uretral na ausência de contração do músculo detrusor. Enquanto a incontinência urinária por hiperatividade do detrusor é definida como perda urinária pela presença de contrações espontâneas ou desencadeada por manobras de esforço ou por estímulo dos órgãos dos sentidos, durante o enchimento vesical, estando a paciente orientada a inibir a micção.

A incontinência urinária antigamente era vista como um problema sem solução, e as mulheres simplesmente se conformavam com a condição não procurando atendimento médico. Atualmente ainda não mencionam o problema aos médicos e nem mesmo aos familiares, por vergonha ou embaraço causado pela condição desconfortante (GIRÃO *et al.*, 2002). Com o aumento da expectativa de vida, a medicina focou-se em procurar novas alternativas para o tratamento desta doença. Sabe-se que a prevalência da IU entre as mulheres é alta. Segundo Stanton *et al.* (1985), 26% das mulheres possuem algum tipo de IU no período reprodutivo, sendo que esse índice aumenta para 40% no período pós-menopausa. Trata-se, portanto, de doença com prevalência alta no período da menopausa. A incontinência urinária por bexiga hiperativa acomete não somente as mulheres, mas também os homens tanto na forma de instabilidade vesical como de hiperreflexia do detrusor.

1.2. A BEXIGA

A bexiga é constituída pelo epitélio vesical ou urotélio ou epitélio transicional que consiste em um número variável de camadas de células, sendo que em humanos existem entre 6 e 8 camadas (FRASER *et al.*, 2002). Em todos os mamíferos, existem 3 zonas distintas, que incluem a camada basal, as células intermediárias, e por último uma camada de células “guarda-chuva” que são as maiores células epiteliais do corpo humano (Figura 1). Estas células têm formato poliédrico e podem se esticar e encolher de acordo com a pressão vesical, sua superfície é coberta por uma camada de glicosaminoglicanas (GAG), cuja função é assunto controverso, relacionando-se à permeabilidade do urotélio e dificultando a aderência bacteriana à parede vesical (PARSONS *et al.*, 1990). Entre estas células guarda-chuva, existem fortes junções celulares também responsáveis pela impermeabilização do urotélio. As junções celulares estão localizadas na região apical e lateral da membrana das células superficiais do urotélio. Sua função é impedir a difusão paracelular de substâncias da urina para o sangue e representa uma das barreiras do urotélio. As células das camadas intermediária e basal não apresentam as junções celulares e não constituem uma barreira ao transporte paracelular através do urotélio (KEREC *et al.*, 2005).

Cerca de 70 a 90% da superfície da membrana apical das células superficiais uroteliais é composta de proteínas específicas chamadas uroplaquinas, que estão dispostas em placas que são mais espessas que as áreas de membrana normalmente encontradas (KEREC *et al.*, 2005). Estas são responsáveis pela maior parte do bloqueio da passagem de água e uréia através do urotélio. Constituem a segunda barreira do urotélio à passagem de substâncias da urina para o sangue. Acima das uroplaquinas encontra-se a camada de glicosaminoglicanas. Compreende uma camada delgada de muco na superfície urotelial que tem como função impedir a passagem de substâncias através do urotélio, sendo uma terceira barreira do urotélio à difusão de substâncias (FRASER *et al.*, 2002).

No urotélio, encontra-se o receptor vanilóide transitório potencial 1 (TRPV1), que é um canal catiônico não seletivo que responde a vários estímulos nócicos, tais como o calor acima de 43°C ou acidez com pH menor que 6. No trato urinário inferior, a expressão deste

receptor TRPV1, tem sido documentada não apenas nas fibras nervosas, mas também está presente nas camadas muscular, submucosa e mucosa e nas células uroteliais. Este receptor tem um papel importante na fisiopatologia da bexiga nos estados de dor assim como na hiperatividade vesical que acompanha a cistite e nas lesões raquimedulares (SAITOH *et al.*, 2008).

Na sua essência, a membrana apical do urotélio é responsável por 80% da resistência à passagem de água e mais de 95% do fluxo de uréia, amônia e prótons. A urina que está em contato com este urotélio é hipertônica, composta de toxinas e excretas do nosso organismo, que devem ser expelidos. A impermeabilidade a todas as substâncias presentes na urina ou no sangue é a primeira característica deste tipo de tecido (HOHLBRUGGER *et al.*, 1985). A sua geometria apresenta forma esférica e é ideal para que exista um mínimo de superfície tecidual exposta à urina. O movimento através das células uroteliais ocorre de duas maneiras: a via transcelular (através das células) e a via paracelular (através das junções celulares e espaços laterais intracelulares). As junções celulares e as membranas celulares devem ser impermeáveis à urina ou componentes do sangue assim como medicamentos contidos em ambos os compartimentos. As modificações nas células ou na permeabilidade das junções celulares podem levar a alterações na eficácia da barreira urotelial (LEWIS, 1996) e situações envolvendo presença de K⁺ extracelular e hiperosmolaridade promovem a despolarização do músculo liso e geram aumento da atividade do músculo detrusor, enquanto que hipo-osmolaridade produz alterações opostas (GIANNANTONI *et al.*, 2006).

A figura 1 apresenta o epitélio vesical, onde pode ser observado a camada de glicosaminoglicanas, a camada de células guarda-chuva, a camada intermediária e a camada basal.

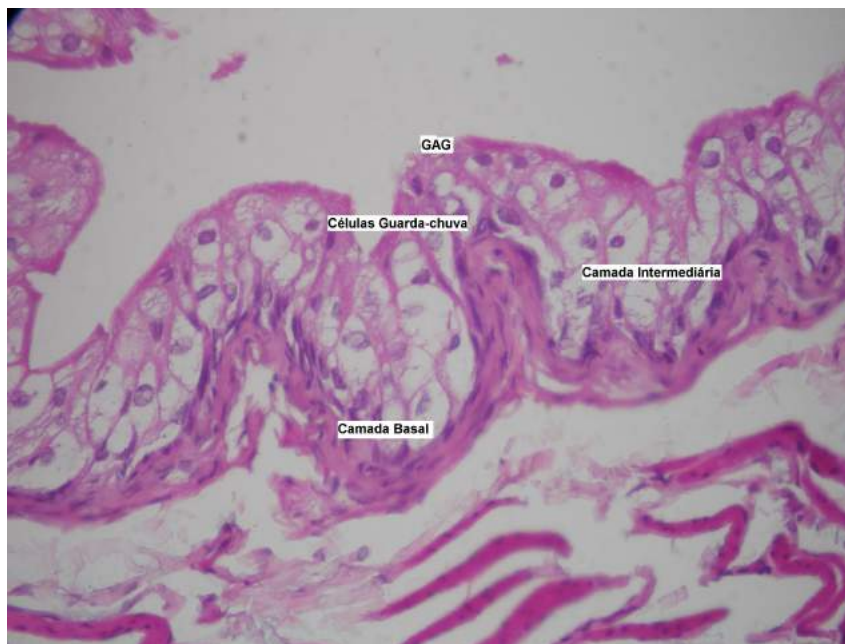


Figura 1. Urotélio de rato corado com hematoxilina/eosina no aumento 400 x.

A figura 2 exhibe a anatomia da bexiga humana, a formação do trígono vesical com limites dos orifícios ureterais e colo vesical. O trígono compreende a porção da bexiga onde a densidade do músculo detrusor é maior. O músculo detrusor corresponde a toda a musculatura lisa envolvendo a bexiga, responsável pela contração vesical e a eliminação da urina através da uretra. O esfíncter interno ou esfíncter uretral, localiza-se no colo vesical é constituído de musculatura lisa, é controlado pelo centro sacral da micção, enquanto o esfíncter externo da uretra, inserido no diafragma urogenital é submetido ao controle do córtex cerebral e atua sob controle voluntário (GIRÃO *et al.*, 2002).

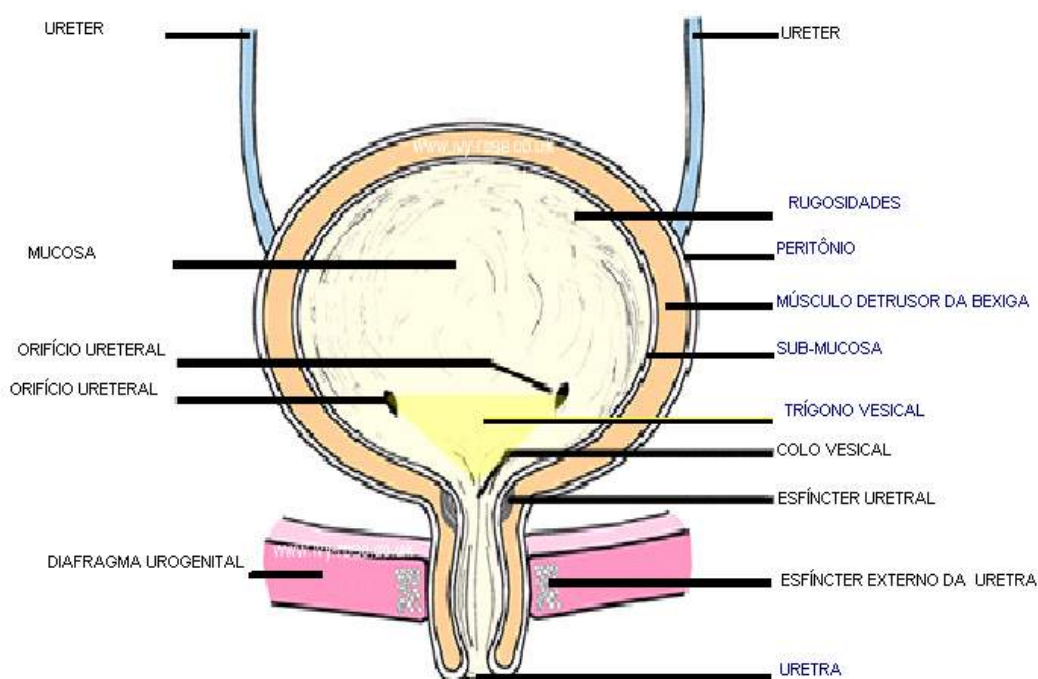


Figura 2. Visão macroscópica da bexiga e suas camadas.
 Fonte: Ivyrose Ltd.2006, online at www.ivy.rose.co.uk

1.3. FISIOLÓGIA DA MICÇÃO

A bexiga é responsável pelo armazenamento da urina e pela sua eliminação através da uretra. Para o seu adequado funcionamento, é necessária a harmonia entre os vários arcos reflexos, circuitos e centros neurológicos, além da integridade das estruturas intrínsecas à bexiga e à uretra (GIRÃO *et al.*, 2002).

O primeiro evento neurológico da micção é o término da atividade eferente inibitória do nervo pudendo, seguido da suspensão do tônus simpático na bexiga, o que permite o relaxamento da musculatura esfíncteriana uretral e a contração do músculo detrusor (BLAIVAS, 1982).

Os circuitos neurológicos envolvidos na micção compreendem quatro alças (BRADLEY *et al.*, 1974). A alça I é um circuito formado entre o córtex cerebral e a substância reticular pontomesencefálica e é responsável pelo controle voluntário da micção. A alça II tem origem na substância reticular e termina no centro sacral da micção. Ela mantém a contração do detrusor por tempo suficiente, permitindo o completo esvaziamento vesical. A alça III é o circuito que interliga o detrusor ao centro sacral e este ao sistema

esfincteriano uretral. Ela coordena a sincronia entre a contração do detrusor e o relaxamento do esfíncter uretral e vice-versa. A alça IV é formada pela comunicação entre o córtex e o centro sacral da micção e tem como função o controle voluntário do esfíncter externo da uretra (Figura 3).

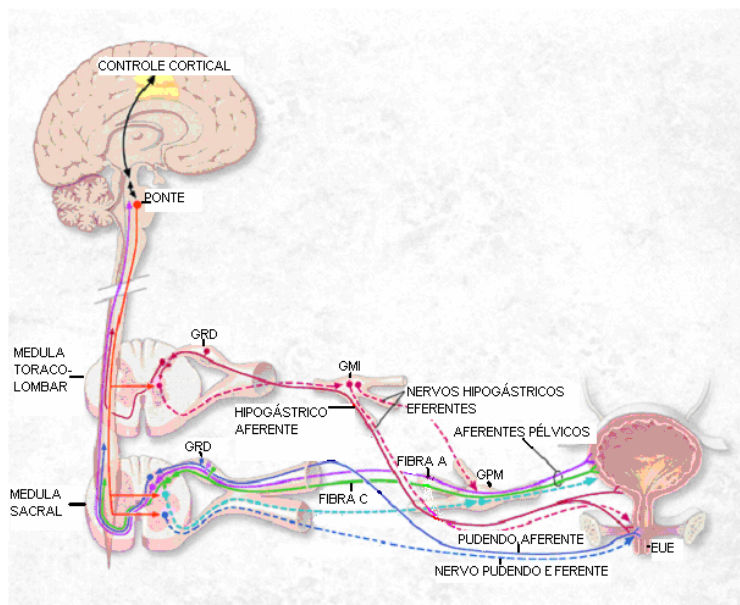


Figura 3. Reflexo da micção. Alças neurológicas do reflexo da micção. Alça I (seta preta); Alça II (setas vermelhas); Alça III (setas verde, azul contínua, lilás e linhas azuis tracejadas); Alça IV (setas ascendentes na medula espinhal).

Fonte: FORD *et al.*, 2006.

Além destas alças principais, outros núcleos têm participação no controle da micção. Os núcleos da base inibem a atividade contrátil do detrusor e quando acometidos, por exemplo, na doença de Parkinson, podem produzir uma hiperreflexia do detrusor. O sistema límbico nas situações de estresse emocional ou em pacientes com perfil psicológico alterado pode fazer com que a bexiga responda com um aumento da frequência e urgência miccional. O cerebelo coordena a ação dos músculos envolvidos com o equilíbrio e a postura durante a micção. Doenças cerebelares associam-se igualmente às contrações não inibidas do detrusor e à perda do equilíbrio (GIRÃO *et al.*, 2002). Estudos eletrofisiológicos em gatos e ratos mostraram a presença de dois caminhos reflexos que controlam a micção, o supraespinhal e o espinhal. Pequenas fibras aferentes mielinizadas (A δ) passam por um centro na ponte e formam uma alça aferente de reflexo miccional (espinobulboespinhal). Em

adição a este reflexo dominante, outro foi detectado em animais normais, o qual consiste de longa resposta latente mediado por fibras C (DE GROAT, KAWATANI, HISAMITSU, 1990). Em animais com transecção da medula, esta via de micção consiste principalmente de fibras C não mielinizadas responsáveis pelo arco reflexo. Estas fibras estão presentes na bexiga em diversas espécies de animais (MAGGIMELI, 1998).

A sensação de enchimento vesical é transmitida pelas fibras A delta que são ativadas por estímulo mecânico. Já as fibras C aferentes que são menores e desmielinizadas, somente respondem a estímulos mecânicos altos. Por outro lado elas são ativadas por estímulos de irritação química ou pelo frio. Os receptores ativados são do tipo TRPV 1, encontrado em terminações neuronais periféricas nociceptivas, que são canais catiônicos não seletivos, com alta permeabilidade ao cálcio que também respondem a estímulos dolorosos do tipo calor maior que 43°C e pH menor que 5,5, assim como toxinas vanilóides como a capsaicina e a resiniferatoxina (SAITOH *et al.*, 2008). Portanto, sua função é sinalizar eventos inflamatórios ou algícos na bexiga ao sistema nervoso central. No estado de irritação, estas fibras tornam-se responsivas a menores graus de distensão da bexiga pelas fibras A-delta que são mecanorreceptivas (CHANCELLOR, 1999).

1.4. HIPERATIVIDADE DO DETRUSOR

Um estudo norte-americano recente demonstrou que a bexiga hiperativa tem uma prevalência de 17% na população adulta (WEIN e RACKLEY, 2006), passando a valores maiores com o aumento da idade, tanto para homens como para mulheres (STASKIN, 2005). Outro estudo realizado no Brasil encontrou uma incidência de 18,6% de bexiga hiperativa na população geral, incluindo homens e mulheres entre 15 e 55 anos (TELOKEN *et al.*, 2006). A incontinência urinária do tipo bexiga hiperativa é subdividida em instabilidade vesical e em hiperreflexia do detrusor. A primeira é a condição na qual se verificam contrações não inibidas do músculo detrusor durante a cistometria (avaliação da pressão intravesical) na ausência de doenças neurológicas. A hiperreflexia do detrusor se refere às contrações não inibidas do músculo detrusor (CNIs) na presença de moléstia neurológica, como por exemplo, a esclerose múltipla, doença de Parkinson, Alzheimer, lesão raquimedular e neuropatia diabética (GIRÃO *et al.*, 2002).

A bexiga hiperativa (BH) pode ocorrer a partir de anormalidades das vias intrínsecas da micção. Podem existir distúrbios dos gânglios vesicais das vias nervosas parassimpaticomiméticas, com a diminuição do polipeptídeo intestinal vasoativo (PIV) que é um neuropeptídeo que age como inibidor destas vias, desencadeando as contrações

vesicais. Distúrbios das células marca-passo vesicais, uma vez que o músculo detrusor nunca está em repouso completo, podem gerar pequenas contrações localizadas as quais podem dar origem à grandes contrações vesicais. Este tipo de BH sugere um distúrbio no mecanismo neuromodulador intrínseco. Podem ocorrer também distúrbios generalizados do músculo liso, como no caso dos pacientes com síndrome do cólon irritável, onde 50% deles têm BH. Outra causa da BH é o aumento da densidade de nervos sensoriais subepiteliais na parede vesical. A abundância de nervos aumenta a avaliação do enchimento vesical, causando a urgência e polaciúria típicos da BH. Pacientes com hiperplasia prostática ou submetidos a cirurgia que envolva a mobilização ou manipulação do colo vesical podem desenvolver BH por interferir no suprimento nervoso autonômico da bexiga, podendo ainda provocar BH a deficiência de prostaciclina. A irritação vesical local por quaisquer agentes e ainda causas psicológicas, pode ser conduzida com hipnoterapia, treinamento vesical e biofeedback, recursos estes também considerados importantes no tratamento da BH (MONTELLA *et al.*, 2006).

1.5. TRATAMENTO

O tratamento da BH pode ser conduzido por medidas comportamentais, como o treinamento vesical e o biofeedback, tratamento com eletroestimulação e tratamento farmacológico sendo este feito com o uso de antidepressivos tricíclicos, fármacos bloqueadores dos canais de cálcio e anticolinérgicos, sendo estes os mais usados. A reposição hormonal também é utilizada como coadjuvante no tratamento da bexiga hiperativa (GIRÃO *et al.*, 2002).

A oxibutinina (OXI) é atualmente o fármaco mais utilizado no tratamento da bexiga hiperativa apresentando-se na forma de comprimidos, como adesivo, para via transdérmica e na forma líquida para instilação livre na cavidade vesical. Recentemente, novos fármacos, como a tolterodina (liberação imediata e prolongada), propiverina (liberação prolongada), solifenacina, darifenacina, cloreto de tróspio e fesoterodina, recentemente descoberta, têm sido propostos para tratamento oral (CHAPPLE *et al.*, 2008). Estes fármacos têm propriedades antimuscarínicas, e agem inibindo os receptores muscarínicos existentes na bexiga e também em outras partes do corpo. Apesar de serem mais usados, os antimuscarínicos são acompanhados de efeitos colaterais desagradáveis do tipo boca seca, sonolência, constipação intestinal, alteração nos níveis tensionais, visão turva por bloqueio do mecanismo de acomodação visual e aumento da frequência cardíaca por bloqueio vagal em graus variados de acordo com o medicamento. Esses efeitos, no caso da administração de oxibutinina pela via oral, se devem à alta concentração sérica do metabólito ativo N-

desetiloxibutinina após o efeito de primeira passagem do fígado. Este incômodo leva à interrupção do tratamento em até 25% das pacientes, dependendo da dosagem utilizada (ANDERSSON e CHAPPLE, 2001). Isto acontece porque os antagonistas dos receptores muscarínicos não exibem seletividade para os receptores M3, subtipo que é mediador da contração detrusora. Os anticolinérgicos também se ligam aos receptores M1 e M2, presentes em várias partes do organismo (THIEL, 2002). Os anticolinérgicos são contraindicados em pacientes com glaucoma, obstrução intestinal e condições afins, miastenia gravis, estados de colite, uropatia obstrutiva, gravidez e lactação, e em cardiopatas (KATZUNG, 1994).

A administração eletromotiva de drogas (AEMD) é outra forma de tratamento para a bexiga hiperativa e funciona facilitando o transporte de fármacos hidrossolúveis criando um campo eletromagnético na bexiga, mas envolve um alto custo na aquisição do equipamento (GIANNANTONI, 2006).

A toxina botulínica é outra forma de tratamento utilizada para os casos de bexiga hiperativa. Esta tem se mostrado eficaz para o tratamento tanto dos casos idiopáticos como neurológicos da bexiga hiperativa, consistindo na injeção de neurotoxina botulínica diretamente em vários pontos do músculo detrusor da bexiga via cistoscópica e com duração de cerca de 6 meses. Esta técnica apresenta como reação adversa a noctúria e a redução progressiva do número de receptores suburoteliais. O resultado é obtido a partir do 5º dia após a injeção, com taxa de sucesso de 73% para os casos de base neurológica e até 86% para os casos de bexiga hiperativa idiopática (KALSI *et al.*, 2008).

O tratamento intravesical constitui uma excelente via porque os efeitos colaterais indesejáveis estão associados à administração medicamentosa pela via oral devido ao efeito de primeira passagem no fígado. Inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos na busca por novos sistemas de liberação para administração via intravesical com o objetivo de minimizar os efeitos colaterais e aumentar assim a adesão das pacientes ao tratamento (CHANCELLOR e DE GROAT, 1999; FRASER *et al.*, 2003; KALSI *et al.*, 2008; GIANNANTONI *et al.*, 2006).

1.5.1. OXIBUTININA (OXI)

A OXI é uma amina terciária que possui efeito antimuscarínico, relaxante muscular fraco e possui ação anestésica local duas vezes mais potente que a lidocaína (BARROSO, 2000). Esta última propriedade é importante quando a via de administração é intravesical. O tempo de meia vida plasmático é de cerca de 2 horas e sua afinidade é maior por receptores tipo M1 e M3. Este fármaco atravessa a barreira hemato-encefálica, produzindo efeitos do

tipo tonturas e alucinações além de alterações cognitivas (ANDERSSON e CHAPPLE, 2001).

É utilizada na forma de sal, cloreto de oxibutinina (massa molecular 393,95 e pKa base livre de 8,04) e seu efeito intravesical têm sido associado à melhora dos parâmetros cistométricos nos casos de bexiga hiperativa tanto em crianças como em adultos. Está associada a uma redução de 76 a 83% dos episódios de urge-incontinência, embora a incidência de efeitos colaterais é igualmente alta até 80% (ANDERSSON e CHAPPLE, 2001).

A utilização da OXI proporciona aumento da capacidade vesical de 25 a 100%. Em estudos em humanos, a OXI se mostrou mais eficaz na administração intravesical do que na administração pela via oral (BRENDLER *et al.*, 1988). Da mesma forma, constitui-se uma boa opção nos casos de pacientes com intolerância ao medicamento pela via oral. Após a administração da mesma dosagem via oral e intravesical, a concentração plasmática do fármaco foi maior depois da administração por esta última, com pico de ação mais tardio (3 horas) que a via oral (1 hora) e níveis séricos mais altos em 6 horas após sua administração (MADERSCACHER *et al.*, 1995).

Em estudo para avaliar os efeitos locais da OXI na mucosa vesical de ratos, não foi detectada qualquer evidência de alteração da mucosa ou da parede vesical diretamente relacionada a exposição à OXI. Apesar de não haver ainda nenhum estudo em humanos de biópsias vesicais após um período longo de uso local da OXI, estes resultados sugerem haver segurança com relação aos efeitos tópicos deste fármaco (BONNEY *et al.*, 1993). Entretanto, em estudo também em ratos, verificou-se que altas concentrações deste fármaco foram irritantes à mucosa vesical destes animais (YOKOYAMA *et al.*, 1996).

1.5.2. CAPSAICINA (CPS)

A capsaicina (CPS) é uma neurotoxina extraída das pimentas e tem sido utilizada em pesquisas neurológicas para estimulação dos nervos sensoriais e para tratar inflamações na bexiga. É encontrada também em apresentações tópicas para tratamento de artrites e neuralgia, assim como em sprays para defesa pessoal (SPICER JR e ALMIRALL, 2005). A CPS exerce seu efeito nas fibras nervosas sensoriais, interagindo com os receptores vanilóides, promovendo a liberação da substância P assim como outras citocinas. A

liberação das citocinas nos neurônios sensoriais periféricos causa sintomas irritativos, provoca sensação de queimadura e intensa dor (CHANCELLOR *et al.*, 1999).

Como neurotoxina, interrompe a condução das fibras aferentes C desmielinizadas, que participam do centro sacral da micção. Esta dessensibilização do neurônio sensitivo é de longa duração e reversível. A duração e o início de sua ação vão depender da dose e do tempo de exposição à substância. Alguns estudos mostram sua eficácia apenas nos casos em que a hiperatividade do detrusor é secundária a uma doença neurológica por bloquear apenas a fibra C eferente.

Num primeiro momento, a CPS provoca as contrações vesicais e depois ocorre o bloqueio das fibras nervosas de forma rápida no início e breves na duração (CHANCELLOR *et al.*, 1999). De Ridder *et al.* (1999) utilizaram injeção direta de capsaicina intravesical e observaram que 44% das pacientes obtiveram uma continência satisfatória e 36% obtiveram melhora na continência e apenas 20% não obtiveram sucesso com o tratamento. A maioria dos estudos clínicos mostraram uma melhora nos parâmetros urodinâmicos em até 2 meses após a instilação da capsaicina intravesical e em alguns casos, a melhora dos parâmetros urodinâmicos perdurou por até 9 meses (De RIDDER *et al.*, 1997; CRUZ *et al.*, 1997, FOWLER *et al.*, 1992).

1.5.3. RESINIFERATOXINA (RTX)

A resiniferatoxina (RTX) é uma neurotoxina 1000 vezes mais potente que a capsaicina e apresenta efeitos colaterais mais brandos em relação a capsaicina. Tais efeitos incluem menor dor e menor liberação de neuropeptídeos inflamatórios. Este fármaco é extraído da resina de plantas, dentre as quais a mais conhecida tem o nome científico de *Euphorbia resinifera*, encontrada no Marrocos. Esta substância se mostrou útil no tratamento de pacientes que não obtiveram sucesso com o tratamento convencional para bexiga hiperativa. Em 1975, a RTX foi isolada e em 1989 foi reconhecida como um ultrapotente análogo da capsaicina (APPENDINO e SZALLASI, 1997).

Como neurotoxina, a RTX interrompe a condução das fibras aferentes C desmielinizadas, que participam do centro sacral da micção. Esta dessensibilização do neurônio sensitivo é de longa duração e reversível. A duração e o início de sua ação vão depender da dose e do tempo de exposição à substância (FRASER *et al.*, 2002).

Quimicamente, a RTX é um éster forbol (APPENDINO e SZALLASI, 1997), pertencente ao grupo homovanil (um elemento estrutural importante para atividade biológica). Os compostos pertencentes a este grupo são chamados de vanilóides.

Com a RTX, a indução das correntes de despolarização nervosa é lenta, no entanto, com uma duração mais prolongada em relação a CPS. Isto ocorre porque a RTX tem massa molecular maior (628,7) do que a CPS (305,1), o que torna a sua penetração na mucosa vesical muito mais lenta. A CPS se liga aos receptores rapidamente, o que faz abrir os canais ligados a estes receptores quase que simultaneamente, ao passo que a RTX ocupa os receptores gradualmente (FRASER *et al.*, 2002).

A primeira consequência da ligação da RTX com os receptores vanilóides presentes no urotélio é a excitação neuronal devido à liberação de neuropeptídeos como a substância P (SP), peptídeo gene-relacionado à calcitonina (CGRP) e interleucina (IL). A liberação destes neuropeptídeos gera respostas nos vasos sanguíneos, mastócitos e linfócitos, levando à inflamação neurogênica e reações alérgicas de hipersensibilidade, percebidas como sensação de queimação e dor (SZALLASI e BLUMBERG, 1995). Este fenômeno ocorre em segundos e consiste em uma despolarização e geração de um potencial de ação. Este estágio inicial é admitido ser largamente dependente do influxo de sódio. A excitação neuronal é seguida por uma temporária dessensibilização.

A RTX pode eliminar a necessidade de tratamento cirúrgico ou o uso de outros fármacos no tratamento de disfunções miccionais em pacientes com lesões na medula (FRASER *et al.*, 2002). Seus efeitos podem ser neutralizados pelo antagonista dos receptores TPRV 1, n-4-t-Butilfenil-4-3-cloropiridina-2-il-tetrahidropirazina-1(2H)-carboxamida (BCTC), que é um inibidor potente da ativação do receptor induzida por ácido ou CPS ou RTX em ratos. A RTX também exerce um papel analgésico nos modelos de estudo de dor inflamatória e neuropática em ratos (SAITOH *et al.*, 2008).

Em estudo realizado em mulheres com bexiga hiperativa, a instilação direta a cavidade vesical de solução 50 a 100 nM de RTX em solução alcoólica a 10% durante 30 minutos mostrou como efeitos colaterais apenas prurido ou leve desconforto durante os primeiros minutos do tratamento. Foi verificada uma diminuição entre 33 a 58% da frequência miccional, com resultados logo a partir do primeiro dia de administração, e os efeitos puderam ser observados até 3 meses após a aplicação inicial (CRUZ *et al.*, 1997). LAZZERI *et al.*, (1997) observaram aumento da capacidade vesical média de 175 para 281 mL imediatamente após a instilação direta de RTX intravesical porém com redução dos efeitos após 4 semanas. Entretanto, neste estudo foi utilizada uma dose de 10 nM de RTX, muito inferior a usada em outros trabalhos (PALMA *et al.*, 2004; APOSTOLIDIS *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2000). APOSTOLIDIS *et al.* (2006) realizaram estudos em humanos com hiperatividade vesical, utilizando a dose única intravesical de 50 nM e verificaram melhora dos sintomas de urgência e frequência miccional, melhora dos parâmetros urodinâmicos e da qualidade de vida por até 6 meses.

Estes estudos vêm trazer uma perspectiva diferenciada quanto ao uso da RTX para os pacientes com incontinência urinária por hiperatividade vesical, observando-se resposta de até 6 meses com instilação do fármaco puro, diretamente na cavidade vesical.

1.6. LIPOSSOMAS (LIP)

Como os fármacos utilizados no tratamento da bexiga hiperativa são extremamente irritantes, faz-se necessário o desenvolvimento de formulações que minimizem estes efeitos, contribuindo para a melhora terapêutica.

Os lipossomas foram descobertos em 1961 por Alec D. Bangham, durante experimentos envolvendo fosfolipídios e coagulação sanguínea. A partir daí, eles têm se tornado ferramentas versáteis nas áreas de biologia, bioquímica e medicina (TORCHILIN *et al.*, 2005).

Os lipossomas são preparados a partir do glicerofosfolipídio fosfatidilcolina e colesterol e podem possuir diâmetro médio entre 20 a 5000 nm. São classificados de acordo com o número de camadas lipídicas em lipossoma unilamelar que possuem uma bicamada lipídica ou em lipossoma multilamelar que apresenta mais de uma bicamada lipídica. São vesículas de formato esférico compostas de camadas lipídicas concêntricas, separadas por compartimentos aquosos. Este arranjo espacial ocorre devido à polaridade do fosfolipídio que apresenta regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Estes sistemas tem sido utilizados como veículos para liberação de fármacos, tendo aplicação no tratamento contra o câncer, na terapia gênica, em doenças infecto-parasitárias e no desenvolvimento de vacinas, entre outros, pelo fato destas vesículas se incorporarem à superfície celular e se fundirem às mesmas. São sistemas altamente versáteis, cujo tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos. Estas propriedades também são influenciadas por parâmetros externos tais como temperatura, força iônica e pela presença de certas moléculas. Os lipossomas são considerados sistemas interessantes devido às propriedades gerais de surfactante, pela sua estabilidade estrutural na diluição, pela variação da permeabilidade da bicamada às diferentes moléculas, pela capacidade de encapsular tanto substâncias hidrofílicas como hidrofóbicas e liberá-las no ambiente desejado. As moléculas hidrofílicas são armazenadas nas camadas aquosas, localizadas entre as bicamadas lipídicas e as moléculas hidrofóbicas no interior da bicamada (FRÉZARD *et al.*, 2005).

Os lipossomas puros injetados via intravesical podem reforçar a barreira urotelial de um epitélio disfuncional e aumentar a resistência à penetração de agentes irritantes, funcionando como uma camada extra de proteção ao urotélio (FRASER *et al.*, 2003).

A esterilização dos lipossomas é preferencialmente realizada com filtros Millipore, com poros de tamanho não maior que 0,22 µm uma vez que outros procedimentos podem destruir a integridade da bicamada lipídica. Os filtros são feitos de materiais diferentes como em placa de asbesto, porcelana, filtro de Pasteur e discos de vidro. Os fatores que impedem a passagem de organismos são a porosidade, a carga elétrica do filtro, a carga elétrica dos microrganismos e a natureza do fluido a ser filtrado (KELKAR, 2002).

Um dos maiores desafios para o desenvolvimento de sistemas lipossomais é a estabilidade dos mesmos. Um sistema coloidal pode ser estabilizado eletrostaticamente, estearicamente ou eletroestearicamente. Adicionalmente, os colóides podem sofrer outras modificações como fusão ou mudança de fase após a agregação. A estabilidade física é obtida pela preservação do tamanho dos lipossomas e da quantidade de material encapsulado. Este tipo de estabilidade dependerá de características termodinâmicas e de propriedades coloidais do sistema (BATISTA *et al.*, 2007).

Os fosfolipídios são suscetíveis à hidrólise e oxidação, pois podem conter ácidos graxos insaturados. A maioria das dispersões lipossomais fosfolipídicas utilizadas contém uma cadeia acila insaturada como parte da estrutura molecular. Estas cadeias são vulneráveis à degradação oxidativa. A reação de oxidação pode ocorrer durante o preparo, o armazenamento ou durante o uso. A deterioração oxidativa dos lipídios encerra um processo complexo envolvendo a degeneração de radicais livres e resulta na formação de peróxidos cíclicos e hidroperóxidos (KELKAR *et al.*, 2002).

A instabilidade dos lipossomas no plasma parece ser o resultado da transferência dos lipídios para a albumina e para lipoproteínas de alta densidade. Adicionalmente, parte da proteína é transferida das lipoproteínas para os lipossomas. Tanto a lecitina como o colesterol também realizam trocas com as hemácias. Os lipossomas preparados com fosfolipídios de cadeia mais longa são mais estáveis tanto em soluções tampão como no plasma. A estabilidade lipossomal no plasma aumenta em proporção direta à taxa de colesterol presente nos lipossomas (KELKAR *et al.*, 2002).

O volume interno, eficiência da encapsulação, lamelaridade, potencial zeta, diâmetro e distribuição de tamanho dos lipossomas são parâmetros geralmente estudados durante o desenvolvimento de formulações lipossomais (YU *et al.*, 1999).

O tamanho médio e a distribuição dos lipossomas são parâmetros importantes de propriedades físicas e destino biológico dos lipossomas e das substâncias encapsuladas. O tamanho dos lipossomas, assim como o índice de polidispersividade, pode ser obtido

através da técnica de difusão de luz dinâmica (Dynamic Light Scattering), utilizando um sistema computadorizado (KELKAR *et al.*, 2002).

O potencial zeta é uma propriedade física importante para verificação da estabilidade de suspensões e dispersões. Esta análise traz informações sobre o potencial de membrana das vesículas lipossômicas (FERREIRA *et al.*, 2005). A estabilidade de um sistema coloidal é determinada pela soma das forças atrativas de Van der Waals e a força repulsiva da dupla camada elétrica que existe entre as partículas. O resultado deste equilíbrio (atração/repulsão) pode gerar um residual repulsivo, o qual previne que duas partículas se aproximem umas das outras e se fundam. Caso exista uma colisão entre as partículas com energia suficiente para transpor esta barreira repulsiva, ocorre a adesão entre as mesmas, iniciando o processo de floculação. Entretanto, partículas que possuam repulsão alta o suficiente, a dispersão resistirá a floculação e o sistema coloidal permanecerá estável (BARCHINI *et al.*, 2000).

Outros métodos, tais como, microscopia de luz e microscopia eletrônica com congelação-fratura também podem ser utilizados para caracterização da distribuição de vesículas multilamelares de grande tamanho e observação da estrutura morfológica dos lipossomas.

1.7. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

A avaliação das modificações histomorfológicas no urotélio após a administração intravesical de fármacos é realizada utilizando modelo animal.

SHUPP-BYRNE (1998), comparou grupos de ratos com e sem lesão da medula espinhal, tratados com capsaicina (1 mM) em etanol. Os animais foram avaliados em 30 minutos, 1, 3 e 7 dias após a instilação intravesical. Nas secções do urotélio coradas com hematoxilina/eosina e corante específico para mucina, foi verificado que a capsaicina produziu um adelgaçamento do epitélio e edema submucoso. No grupo controle (etanol) também foram verificadas as mesmas alterações, porém em grau menor que no grupo da capsaicina. Não houve diferença entre o grupo com a medula seccionada e o controle. O grau máximo de alteração foi verificado após 30 minutos, e continuou no grupo de 1 dia, e a recuperação parcial foi notada após 3 dias. A recuperação completa foi observada no grupo do 7º dia.

Em trabalho realizado por VERIT *et al.* (2002) foram estudadas as alterações uroteliais após 5 aplicações intra-vesicais de capsaicina em ratas fêmeas sendo avaliadas após 13 dias. Segundo os autores, as alterações foram semelhantes a uma cistite química, provocando lesão urotelial, edema submucoso, ectasia vascular, congestão vascular e

adelgaçamento do epitélio, porém não evidenciando ulceração da mucosa vesical. Foi verificado infiltração eosinofílica em 25% dos casos.

Outro estudo avaliando a reação inflamatória da capsaicina em solução 1 mM no epitélio vesical mostrou moderado grau de recuperação após 3 dias; no 7º dia, o epitélio mostrava-se semelhante ao dos ratos do grupo controle (BYRNE *et al.*, 1998) .

Em estudo realizado em coelhas, com a administração intravesical de oxibutinina pura e outro grupo com oxibutinina com excipientes (comprimido macerado), diariamente durante 30 dias (dose de 1 mg/kg), quando comparado com o grupo controle (solução salina), evidenciou-se uma incidência de infiltrado eosinofílico nos cortes histológicos do grupo de oxibutinina com excipientes (5/9 animais). A reação inflamatória observada foi classificada como leve com predominância do infiltrado linfocítico, apresentando também neutrófilos, porém de forma localizada na bexiga. A urina foi submetida a cultura após o procedimento para afastar os casos de cistite (LANDAU *et al.*, 1995).

Em outro estudo, foram analisadas alterações histológicas no urotélio de pacientes com bexiga hiperativa após a injeção de toxina botulínica no músculo detrusor da bexiga. As biópsias foram realizadas antes da aplicação, 4 e 16 semanas após a instilação. Foram verificados sinais de inflamação crônica em 59,1% das biópsias basais, em 67,6% das biópsias após a primeira aplicação e em 86,4% das biópsias realizadas em pacientes submetidos a aplicações repetidas de toxina botulínica. Reação de fibrose foi encontrada em 2,2% dos pacientes e infiltrado eosinofílico foi encontrada predominantemente nos pacientes submetidos a injeções repetidas. Não foram verificadas alterações do tipo displasia ou hiperplasia nos cortes histológicos. Não houve diferença histológica entre os grupos com bexiga hiperativa idiopática e neurogênica (APOSTOLIDIS *et al.*, 2008).

1.8 . URIANÁLISE

A avaliação da presença de lipídios na urina pode ser feita através da visualização direta com a microscopia ótica e se apresentam como estruturas redondas e refringentes além do tamanho variável o que facilita sua diferenciação dos eritrócitos (HEINZ, 1993). A gordura na urina, ou simplesmente, lipidúria, pode existir em situações patológicas como na síndrome nefrótica, onde vêm acompanhadas de cilindros (figura 4B). Igualmente podem se apresentar em processos degenerativos ou necrose, eclampsia, diabetes mellitus, glomerulonefrite e em casos de embolia gordurosa após traumas, entre outros (GRAFF, 1987).

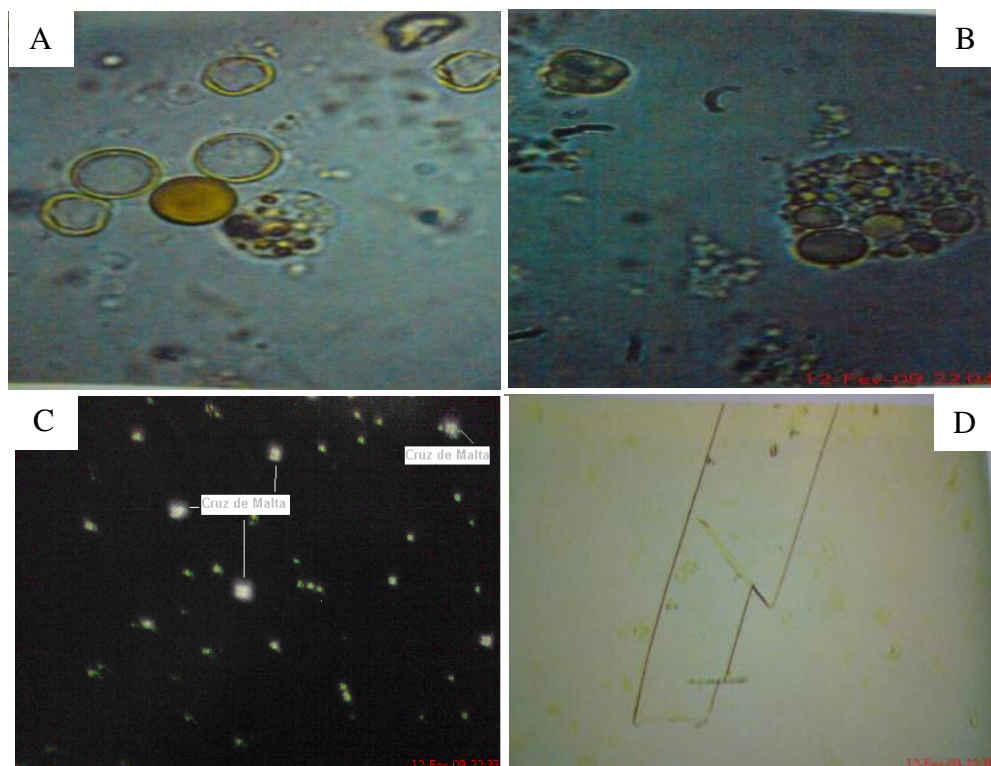


Figura 4. Avaliação de presença de lipídios na urina. (A) gotículas de gordura, evidenciando a presença do duplo halo; (B) gotículas de gordura organizadas em cilindros; (C) ésteres e colesterol ou colesterol livre, visualizados sob luz polarizada, gerando imagens do tipo “Cruz-de-Malta; (D) cristal de colesterol.

Fonte: HEINZ *et al.*, 1994.

As gotículas de gordura presentes na urina aparecem de cor amarelo-castanho e quando submetidas a coloração de Sudan-III apresentam-se com uma cor vermelho-alaranjado. Gotículas de gordura incorporadas a uma célula ou cilindro ou flutuando livremente são compostas por ésteres de colesterol ou por colesterol livre e são anisotrópicas, formando imagens do tipo “Cruz de Malta” quando sob luz polarizada, mas não se tingem com corantes específicos para gordura (Figura 4C). As gotículas que não polarizam a luz, mas se coram com o Sudan III ou com o Oil Red O são formadas por triglicérides ou por gordura neutra (HEINZ, 1994).

Os lipossomas são triglicerídeos, sendo, portanto possível a visualização dos mesmos em amostras de urina coradas com Sudan-III.

Os cristais de colesterol (Figura 4D) formam quadrados incolores de tamanhos variados e ângulos característicos e conservados. Sob luz polarizada podem apresentar uma variedade de cores. Estes cristais se dissolvem facilmente em éter, clorofórmio ou

álcool. São muito raros e predominam na quilúria, quando se observa a obstrução do fluxo linfático abdominal, como é no caso de tumores ou da filariose (GRAFF, 1987).

A urinálise também serve como critério para exclusão de animais com infecção vesical. A infecção pode ser uma complicação decorrente do procedimento de manipulação das vias urinárias através do cateter e pode acontecer mesmo após a antibioticoprofilaxia. A ceftriaxona pode ser administrada pela via intra-muscular, com penetração nas vias urinárias e seu espectro de ação atinge a maioria das bactérias que comumente acometem o trato genito-urinário, tais como, a *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Serratia marcescens* (MONTELLA, 2006). Portanto, este fármaco pode ser utilizado como profilaxia contra infecção por manipulação do trato urinário no presente estudo.

1.9 – REFERÊNCIAS

ANDERSSON, K. E., CHAPPLE, C. R. Oxybutynin And The Overactive Bladder. *World Journal of Urology*, 19, p. 319–323, 2001.

APOSTOLIDIS, A., JACQUES, T. S., FREEMAN, A., KALSI, V., POPAT, R., GONZALES, G., DATTA, S. N., GHAZI-NOORI, S., ELNEIL, S., DASGUPTA, P., FOWLER, C. J. Histological Changes In The Urothelium And Suburothelium Of Human Overactive Bladder Following Intradetrusor Injections Of Botulinum Neurotoxin Type A For The Treatment Of Neurogenic Or Idiopathic Detrusor Overactivity. *European Urology*, 53, p.1245–1253, 2008.

APPENDINO, G., SZALLASI, A. Euphorbium: Modern Research On Its Active Principle, Resiniferatoxin, Revives An Ancient Medicine. *Life Science*, 60, p. 681-696, 1997.

ATIEMO, H., WYNES, J., CHUO, J., NIPKOW, L., SKLAR, G. N., CHAI, T. C. Effect Of Botulinum Toxin On Detrusor Overactivity Induced By Intravesical Adenosine Triphosphate And Capsaicin In A Rat Model. *Urology*, 65 (3), p. 622-626, 2005.

AVELINO, A., CRUZ, F. Peptide Immunoreactivity And Ultrastructure Of Rat Urinary Bladder Nerve Fibers After Topical Desensitization By Capsaicin Or Resiniferatoxin. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 86 p. 37-46, 2000.

BARCHINI, H. P., LEEUWEN, V., LYKLEMA, J. Eletrodynamics of Liposome Dispersions; *Langmuir*, 16, p. 8238-8247, 2000.

BARROSO, U.Jr., MACEDO, A.Jr., SROUGI, M. Efeitos Tópicos Da Oxibutinina Intravesical. Artigo de Revisão EPM, Volume IV- 8ª Edição, Outubro-Dezembro/2000.[on line]. Disponível na Internet via www url: <http://www.uronline.unifesp.br/uronline/ed1000/oxibutinina.htm> , arquivo capturado em 10 de dezembro de 2008.

BATISTA, C. M., CARVALHO, C. M. B., MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas E Suas Aplicações Terapêuticas: Estado Da Arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(2), p.167-179, 2007.

BONEY W. W., ROBINSON R. A., THEOBALD R. J. JR. Topical Effect Of Intravesical Oxybutinin. *Journal of Urology*, 150, p.1522-1525, 1993.

BRENDLER, C. B.; RADERAUGH, L. C.; MOHLER, J. Topical Oxybutynin Chloride For Relaxation Of Dysfunctional Bladders. *Journal of Urology*, 141, p.1350-1352, 1988.

BYRNE, D., DAS, J., SEDOR, B. , HUANG, D. , RIVAS, H. , FLOOD, W. , DE GROAT, M., JORDAN, M., CHANCELLOR, P. Effect Of Intravesical Capsaicin And Vehicle On Bladder Integrity In Control And Spinal Cord Injured Rats . *The Journal of Urology*, 159 (3), p. 1074 – 1078, 1998.

CHANCELLOR, M.B., DE GROAT, W.C. Intravesical capsaicin and resiniferatoxin therapy: Spicing Up The Ways To Treat The Overactive Bladder. *The Journal of Urology*, 162(1), p.3-11, 1999.

CHAPPLE, C. R., KHULLAR, V., GABRIEL, Z., MUSTON, D., BITOUN, C.E., WEINSTEIN, D. The Effects of Antimuscarinic Treatments in Overactive Bladder: An Update of a Systematic Review and Meta-Analysis. *European Urology*. 54, p.543–562, 2008.

CRAFT, R.M., COHEN, S.M., PORRECA, F. Long Lasting Desensitization Of Bladder Afferents Following Resiniferatoxin And Capsaicin In The Rat. *Pain* , 61, p.317-323, 1995.

CRUZ, F., GUIMARAES, M., SILVA, C., REIS, M. Suppression Of Bladder Hyperreflexia By Intravesical Resiniferatoxin [letter]. *Lancet*. 350, p. 640-641, 1997.

CRUZ, F., GUIMARAES, M., SILVA, C. Desensitization Of Bladder Sensory Fibers By Intravesical Capsaicin Has Long-Lasting Clinical And Urodynamic Effects In Patients With Hyperactive Or Hypersensitive Bladder Dysfunction. *The Journal of Urology*. 1997;157:585 - 589.

DE GROAT, W.C., KAWATANI, M., HISAMITSU, T. - Mechanisms Underlying The Recovery Both Urinary Bladder Function Following Spinal Cord Injury. *J. Autonomic Nervous System*, 30, p. 71-77, 1990.

DE RIDDER, D., CHANDRAMANI, 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 Follow-up. *Journal of Urology*, parte 2, 155, p. 2087, 1997.

FORD, A.P.D.W., GEVER, J.R., NUNN, P.A., ZHONG, Y., CEFALU, J.F., DILLON, M.P., COCKAYNE, D.A. Purinoceptors as Therapeutic Targets For Lower Urinary Tract Dysfunction. *British Journal of Pharmacology*, 147, S132–S143, 2006.

FRASER, M.O., LAVELLE, J.P., SACKS, M.S., CHANCELLOR, M.B. The Future of Bladder Control Intravesical Drug Delivery, a Pinch of Pepper, and Gene Therapy_ Review. *Urology*, 4(1), p. 1-11, 2002.

FRASER, M.O., CHUANG, Y.C., TYAGI, P., YOKOHAMA, T., YOSHIMURA, N., HUANG, L. Intravesical Liposome Administration - A Novel Treatment For Hyperactive Bladder In The Rat. *Urology*, 61, p. 656, 2003.

FRÉZARD, F., SCHETTINI, D.A. Liposomes: Physicochemical And Pharmacological Properties, Applications In Antimony-Based Chemotherapy. *Quimica Nova*, 28, (3), p. 511-518, 2005.

FOWLER, C. J., JEWKES, D.M.C., DONARD, W.J., LYNN, B., DE GROAT, W.C. Intravesical Capsaicin For Neurogenic Bladder Dysfunction. *Lancet*, 339, p.1239, 1992.

GIANNANTONI, A., DI STASI, S.M., CHANCELLOR, M.B., COSTANTINI, E., PORENA, M. New Frontiers in Intravesical Therapies and Drug Delivery. *European Urology*, 50, p. 1183–1193, 2006.

GIRÃO, M.J.B.C. incontinência urinária de esforço. In: GIRÃO, M.J.B.C., SARTORI, M.G.S., BARACAT, E.C., LIMA, G.R.(eds) **Cirurgia Vaginal e Uroginecologia**. 2 ed., cap 11, Ed Artes Médicas , 2002.

GRABOVAC V., GUGGI, D., BERNKOP-SCHNURCH, A. Comparison Of The Mucoadhesive Properties Of Various Polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 , p. 1713– 1723, 2005.

GRAFF, S.L., **Análisis de Orina – Atlas Color**. 1 ed. Cap 3. Ed Médica Panamericana, 1987.

HEINZ, R., ALTHOF, S. **El Sedimento Urinario. Atlas** – Técnicas de Estudio – Valoración. 5 ed., cap 2 e cap 3. Editorial Medica Panamericana, 1994.

HOBLE, H.J., JANIG, W., KOLTZENBURG, M. Activation of unmyelinated afferent fibres y mechanical stimulation and inflammation of the urinary bladder in the cat. *Journal of Physiology*, 425, p. 545 – 562, 1990.

HOHLBRUGGER.G., LENTSCH,P. Intravesical ions, osmolality and ph influence the volume pressure response in the normal rat bladder and this is more pronounced after DMSO. *European Urology* ,11, p.127-30, 1985.

JR.O.S., ALMIRALL J.R. Extraction of capsaicins in aerosol defense sprays from fabrics. *Talanta*, 67, p. 377–382, 2005.

KALSI,V., APOSTOLIDIS, A., GONZALES, G., ELNEIL, S., DASGUPTA, P., FOWLER, C.J. Early effect on the overactive bladder symptoms following botulinum neurotoxin type a injections for detrusor overactivity. *European Urology*, 54 , p. 181–187, 2008.

KARNKA, R., RAYANAKORN, M., WATANESK, S., VANEESORN, Y. Optimization of high performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. *Analytical Sciences*, 18, p. 661-665, 2002.

KATZUNG, B.G. Bloqueadores dos receptores colinérgicos. In: KATZUNG, B.G. (ed) **Farmacologia Básica e Clínica**. 5 ed., cap 8, Ed Guanabara Koogan, 1994.

KELKAR, V.S., GADAGE, R., GADAGE, A. Liposomes: slow release vehicles. Express Pharma Pulse [on line]. Disponível na internet via url: www.expresspharmaonline.com/20020808/drugdel.shtml - 08/08/2002. Arquivo capturado em 31 de março de 2009.

KEREC, M., BOGATAJ, M., VERANI, P., MRHAR A. Permeability of pig urinary bladder wall: the effect of chitosan and the role of calcium. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25, p. 113- 121, 2005.

KIM, J.H., RIVAS, D.A., SHENOT, P.J., GREEN, B., KENNELLY, M., ERICKSON, J.M., O'LEARY, M., YOSHIMURA, N., CHANCELLOR, M.B. Intravesical resiniferatoxin for refractory detrusor hyperreflexia: a multicenter, blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Spinal Cord Medicine*, 26, p.358-363, 2003.

LABANA, S., PANDEY, R., SHARMA, S., KHULLER, G.K. Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20, p.301-304, 2002.

LANDAU, E.H., FUNG, L.C.T., THORNER, P.S., MITTELM, M.W., JAYANTHI, V.R., CHURCHILL, B.M., McLORIE, G.A., STECKLER R.A., KHOURY, A.E. Histologic studies of intravesical oxybutynin in the rabbit. *Journal of Urology*, 153, p. 2022-2024, 1995.

LAZZERI, M., BENEFORTI, P., TURINI, D. Urodynamic effects of intravesical resiniferatoxin in humans: preliminary results in stable and unstable detrusor. *Journal of Urology*, 158, p.2093-2096, 1997.

LECCI, A., CARINI, F., TRAMONTANA, M. Urodynamic effects induced by intravesical capsaicin in rats and hamsters. *Autonomic Neuroscience Basic Clinics*, 91, p.37-46, 2001.

LEWIS, S.A. Epithelial electrophysiology. In: WILLS N.K., REUSS, L., LEWIS, S.A.(eds) **Epithelial Transport: A Guide To Methods And Experimental Analysis**. 1ed, p. 93–117, editors London: Chapman & Hall; 1996.

LISH, P.M., LABUDDE, J.A., PETERS, E.L., ROBBINS, S.I. Oxybutynin - A muscolotropic antispasmodic drug with moderate anticholinergic action. *Arch Int Pharmacodyn*, 156, p. 467, 1965.

MADERSCACHER, H., KNOLL, M. Intravesical application of oxybutynine: mode of action in controlling detrusor hypereflexia. *European Urology*, 28, p. 340-344, 1995.

MANNES, A.J., BROWN D.C., KELLER J.,CORDES, L.,ECKENHOFF, R. G.,CAUDLE, R. M.,IADAROLA, M. J., MENGQ, Q. C. Measurement of resiniferatoxin in serum samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 823, p. 184–188, 2005.

MONTELLA,J.M. Tratamento da bexiga hiperativa. In: BENT, A.E.,CUNDIFF, G.W., OSTERGARD, D.R., SWIFT, S.E. **Ostergard, Uroginecologia e Disfunções do Assoalho Pélvico**. 5ª ed cap.20, Ed. Guanabara Koogan, 2006.

NICOLI, S., PENNA, E., PADULA, C., COLOMBO, P.,SANTI, P. New transdermal bioadhesive film containing oxybutynin:in vitro permeation across rabbit ear skin. *International Journal of Pharmaceutics* , 325 , p. 2–7, 2006.

OLIVEIRA, R.B., GIMENEZ, V.M.M., GODOY, S.A.P. Intoxicações com espécies da família euphorbiaceae. *Revista Brasileira de Biociências*, 5, supl. 1, p. 69-71, jul. 2007.

PALMA, P., AGULLO, E.M., THIEL, M. Síndrome da bexiga hiperativa. In: PALMA, P.,NETTO Jr, N.R.(eds) **Uroginecologia Ilustrada**. 1 ed, cap 3 Ed Roca , 2005.

PANDITA, R.K., ANDERSSON, K.E. Intravesical adenosine triphosphate stimulates the micturition reflex in awake, freely moving rats. *The Journal of Urology*,168, p. 1230–1234, 2002.

PARSONS, C. L., BOYCHUK, D., JONES, S., HURST, R., CALLAHAN, H., Bladder surface glycosaminoglycans: an epithelial permeability barrier. *The Journal of Urology*, 143(1), n.1, p.139-142, 1990.

RIBEIRO, R.M., ROSSI, P., BARROS, J.P. Hiperatividade do detrusor In: GIRÃO, M.J.B.C., SARTORI, M.G.S., BARACAT, E.C., LIMA, G.R.(eds) **Cirurgia Vaginal e Uroginecologia**. 2 ed., cap 12, Ed Artes Médicas , 2002.

STANTON, S.L Introduction to the preoperative evaluation of incontinent patient . In: OSTERGARD DR & BENT AE (eds). **Gynecologic Urology and Urodynamics: Theory and Practice**. 2ª ed, chap. 3, Baltimore, Willians & Wilkins, p. 69, 1985.

STASKIN, D.R. Overactive bladder in the elderly: a guide to pharmacological management. *Drugs Aging* , 22, p.1013–1028, 2005.

TELOKEN, C.,WEBER, F.A., CARAVER, F., TELOKEN, P.E., MORAES, J.F.,SOGAN, P.R.,GRAZIOTIN, T.M., Overactive bladder: prevalence and implications in brazil. *European Urology*, 49(6), p. 1087-1092, 2006.

TYAGI, P., CHANCELLOR, M.B., LI, Z., GROAT, W.C., YOSHIMURA, N., FRASER, M.O., HUANG, L. Urodynamic and immunohistochemical evaluation of intravesical capsaicin delivery using thermosensitive hydrogel and liposomes. *The Journal of Urology*, 171, p.483-489, January 2004.

SAITOH, C., KITADA, C., UCHIDA, W., CHANCELLOR, M.B., DE GROAT, W.C., YOSHIMURA N. The differential contractile responses to capsaicin and anandamide in muscle strips isolated from the rat urinary bladder. *European Journal of Pharmacology*, 570, p. 182–187, 2007.

SAITOH, C., CHANCELLOR, M.B., DE GROAT W.C., YOSHIMURA, N. Effects of intravesical instillation of resiniferatoxin on bladder function and nociceptive behavior in freely moving, conscious rats . *The Journal of Urology*, 179, p. 359-364, January 2008.

SPICER JR O., ALMIRALL, J.R. Extraction of capsaicins in aerosol defense sprays from fabrics. *Talanta*, 67, p. 377–382, 2005.

THIEL M. **Resiniferatoxina No Tratamento Da Instabilidade Do Detrusor Refratária Aos Anticolinérgicos**. Tese de Mestrado, UNICAMP/ Campinas, SP, Brasil, 2002.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. *Nature Rev. Drug Disc London*, 4, p. 145-160, 2005.

VERIT, A., ARSLAN, O., ZARDALI, I.,YENI, E.,UNAL, D. Topical Effects Of Intravesical Capsaicin On Rat Bladder. *Brazilian Journal of Urology*, 28 (2), p. 154-158, 2002.

WEIN, A.J., RACKLEY, R.R. Overactive Bladder: A better understanding of pathophysiology, diagnosis and management. *The Journal of Urology*, 175, p. S5–S10, 2006.

YOKOYAMA, O., ISHIURA, Y., OHKAWA, M. Urodynamic effects of intravesical oxybutynin chloride in conscious rats. *The Journal of Urology*, 155, p. 768-771, 1996.

YU, M., KRASNOPOL, S., STEPANOV, A.E., SHVETS, I. Some aspects of the technology for liposomal medicinal preparations. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 33(10), p. 20–23, 1999.

**CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA BEXIGA DE RATAS
PRODUZIDAS POR OXIBUTININA E RESINIFERATOXINA EM SISTEMAS
LIPOSSOMAIS ADMINISTRADOS VIA INTRAVESICAL.**

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA BEXIGA DE RATAS PRODUZIDAS POR OXIBUTININA E RESINIFERATOXINA EM SISTEMAS LIPOSSOMAIS ADMINISTRADOS VIA INTRAVESICAL

Lorena Magale Dantas Cirino

O uso de lipossomas para a liberação lenta de medicamentos tem apresentado resultados promissores em diversas áreas da medicina. Neste estudo, a via intravesical foi utilizada para a administração de lipossomas contendo fármacos, buscando comparar as alterações histológicas causadas pela oxibutinina (OXI) e pela resiniferatoxina (RTX), associadas ou não aos lipossomas. Os ensaios biológicos foram realizados em ratas da espécie Wistar sendo instilados pela via intravesical através de catéter, oxibutinina (1,5 mM) ou resiniferatoxina (100 nM) separadamente e associados a lipossomas. As bexigas foram removidas e submetidas à análise histológica após 1, 7 e 60 dias após instilação das formulações. Foram realizadas urinálises dos animais para verificar a presença de infecção e de lipossomas durante o tempo de estudo. Como resultado, a RTX mostrou-se mais agressiva, produzindo reação inflamatória atingindo todas as camadas da bexiga. Após 60 dias, verificou-se ainda a presença de alterações uroteliais, substituição do colágeno vesical por fibrose e aderências abdominais, não vistas no grupo OXI. Os grupos contendo lipossomas mostraram reação inflamatória mínima e dilatação vesical estatisticamente significativa ($p < 0,05$) após os 60 dias de estudo. A urinálise confirmou a presença de lipossomas na urina das ratas 60 dias após a administração intravesical das formulações. Conclui-se que a RTX possui maior toxicidade vesical que a OXI. A administração intravesical de OXI ou RTX em lipossomas minimizou a reação inflamatória, otimizando e prolongando a presença destes fármacos na bexiga das ratas.

Palavras-chave: resiniferatoxina, oxibutinina, hiperatividade do detrusor, lipossomas, tratamento intravesical, incontinência urinária.

EVALUATION OF ALTERATIONS PRODUCED IN RAT BLADDER BY OXIBUTININ AND RESIFINERATOXIN IN LIPOSOMAL SYSTEMS FOR INTRAVESICAL ADMINISTRATION

Lorena Magale Dantas Cirino

The use of liposomes for drug release has been presenting interesting results in many medicine fields. In this study, intravesical liposome administration containing drugs was used, in order to compare hystological changes caused by oxybutinin (OXI) and resiniferatoxin (RTX) separately and associated to liposomes. The biological essay was performed using Wistar female rats by instillation through intravesical catheter oxybutinin (1.5 mM) or resiniferatoxin (100 nM) solutions or in liposomes formulations. The bladders were removed and submitted to histological analysis in 1, 7 and 60 days after instillation of formulations. Urinalysis was made in order to verify the presence of infection and liposomes during the study. RTX showed more bladder damage, with inflammatory reaction reaching all bladder layers. After 60 days, there were urothelial alterations, collagen substitution by fibrosis and also abdominal adherence, not seen in the OXI group. The liposome groups showed minimal inflammatory reaction and statistically significative increased bladder size after 60 days ($p<0.05$). Urinalysis confirmed liposome presence in urine of rat after 60 days of intravesical administration of the formulations. Therefore, RTX produces more bladder damage than OXI. The OXI or RTX intravesical administration in liposomes minimized inflammatory reaction, optimizing and extending the drug effect on rats bladders.

Keywords: urinary incontinence, overactive bladder, liposomes, treatment, oxybutinin , resiniferatoxin.

2.1. INTRODUÇÃO

A incontinência urinária interfere na vida pessoal e social da mulher causando-lhe desconforto e constrangimento. Esta doença incide aproximadamente em 40% das mulheres em menopausa, e uma das causas pode ser atribuída a Hiperatividade do Detrusor (HD). Esta HD é definida como perda urinária pela presença de contrações espontâneas ou desencadeada por manobras de esforço ou por estímulo dos órgãos dos sentidos, durante o enchimento vesical, estando a paciente orientada a inibir a micção (Sociedade Internacional de Continência, Comitê de Padronização, 1991).

A primeira escolha para o tratamento da HD é o uso de anticolinérgicos pela via oral, sendo que este tratamento está associado a efeitos colaterais indesejáveis do tipo boca seca, constipação e visão turva (BENT *et al.*, 2006). Tem se procurado vias alternativas de administração dos medicamentos, buscando minimizar seus efeitos colaterais, aumentar a adesão das pacientes ao tratamento e visando a inclusão de pacientes que não toleram o tratamento pela via oral. A instilação intravesical constitui-se uma excelente via pela ação do medicamento diretamente no órgão-alvo, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos do medicamento (GIANNANTONI *et al.*, 2006).

A oxibutinina (OXI) é um anti-colinérgico capaz de inibir as contrações do músculo detrusor que tem sido extensivamente utilizado no tratamento de pacientes com bexiga hiperativa (ANDERSSON E CHAPPLE, 2001). A resiniferatoxina (RTX) é um fármaco que possui atividade agonista dos receptores vanilóides, resultando em dessensibilização e bloqueio neuromuscular, utilizando doses extremamente baixas (SZALLASI *et al.*, 1996). A RTX tem seu uso indicado não só nos casos refratários de HD, mas também nos casos idiopáticos (NICOLI *et al.*, 2006) e se mostra como um fármaco promissor no campo da uroginecologia. Estes fármacos, porém, possuem uma ação agressiva ao urotélio, podendo gerar desconforto ao paciente (HASHIM *et al.*, 2005). Além disso, a RTX possui baixa solubilidade em água, sendo na maioria das vezes dissolvida em etanol a 30%, que também tem efeito agressor na mucosa vesical (TYAGI *et al.*, 2006). Desta forma, a busca por formulações que eliminem a utilização de solventes tóxicos e que protejam o urotélio da ação agressiva do fármaco tem sido proposta para minimizar estes efeitos adversos.

O objetivo deste estudo foi avaliar sistemas lipossomais contendo RTX e OXI verificando as possíveis alterações causadas no urotélio pela administração intravesical e a presença destes na urina após 60 dias da administração.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES INTRAVESICAIS

A solução de oxibutinina (OXI) foi preparada na concentração de 1,5 mM em salina (YOKOYAMA *et al.*, 1996) para instilação direta. A solução de resiniferatoxina (RTX) utilizada para administração intravesical em ratas foi preparada na concentração de 100 nM de RTX em etanol diluído a 30% em salina (AVELINO e CRUZ, 2000; APOSTOLIDIS *et al.*, 2006).

Os lipossomas foram preparados adicionando o fosfolípido da Nanosolv (fosfatidilcolina 75% /Lipoid GMBH/ Lote 776095-1/ Gerbras), em 10 mL das soluções em etanol diluído a 30% em salina contendo OXI ou RTX. A proporção utilizada de fármaco:fosfolípido foi de 1:10 (m:m). As dispersões foram submetidas à agitação mecânica até sua total homogeneização. O solvente foi eliminado em rotaevaporador até formar uma película na superfície do recipiente (AVELINO e CRUZ, 2000; FRÉZARD *et al.*, 2005).

O filme formado foi re-dissolvido utilizando soro fisiológico a 0,9%. A reconstituição gerou uma dispersão de cor branca que foi passada no filtro de nylon Milipore® de 0,22 µm para limitar o tamanho das vesículas formadas (processo de extrusão) sem destruir as vesículas e ao mesmo tempo realizar a esterilização a frio da formulação (KELKAR *et al.*, 2000). A dispersão final foi acondicionada a 4°C em frascos âmbar até a instilação intravesical nas ratas. As concentrações finais das formulações lipossomais foram de 15 mM de OXI e 100 nM de RTX .

Uma formulação de lipossoma (10 mg.mL⁻¹) sem fármacos também foi obtida pelo mesmo procedimento descrito anteriormente.

2.2.2. AVALIAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE

O tamanho dos lipossomas e o índice de polidispersividade foram determinados através da técnica de difusão de luz dinâmica (Dynamic Light Scattering - DLS), utilizando um sistema computadorizado Malvern Zetasizer Nanoseries (Nano-ZS - Malvern, UK) em comprimento de onda de 633 nm e temperatura de 25°C. A amostra foi diluída na proporção de 1:10 em água destilada, sendo realizado o procedimento com 3 e 42 dias após a preparação do lipossoma.

2.2.3. ADMINISTRAÇÃO INTRAVESICAL

Os animais utilizados foram ratas Wistar, com idade de dois meses, pesando 190 ± 30 g. Foram utilizados 6 animais em cada subgrupo, os quais foram submetidos aos procedimentos para administração intravesical das formulações e sacrificados em diferentes tempos como descrito na tabela 1. Os grupos salina (SAL) e lipossoma (LIP) foram utilizados como controles negativos.

Tabela 1. Grupos de animais submetidos à administração intravesical

Grupos	Tempo de Estudo		
	1 dia	7 dias	60 dias
Solução salina a 0,9%	SAL-1	SAL-7	SAL-60
Lipossoma (10 mg.mL^{-1})	LIP-1	LIP-7	LIP-60
Oxibutinina 1,5 mM	OXI-1	OXI-7	OXI-60
Resiniferatoxina 100 nM	RTX-1	RTX-7	RTX-60
Oxibutinina em lipossoma 15 mM	OXILIP-1	OXILIP-7	OXILIP-60
Resiniferatoxina em lipossoma 100 nM	RTXLIP-1	RTXLIP-7	RTXLIP-60

As ratas foram mantidas em gaiolas com seis animais cada, identificadas e separadas por grupo experimental e tiveram acesso a ração padrão Labina® e água *ad libitum*. As recomendações da Lei Nacional nº 6.638 de 5 de novembro de 1979, para manuseio de animais foram respeitadas, e o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tiradentes através do Parecer Consubstanciado com número de protocolo 060208.

As ratas foram submetidas à anestesia com quetamina na dose de 70 mg.kg^{-1} e midazolan na dose de 4 mg.kg^{-1} , ambas sendo administradas pela via subcutânea, segundo o protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG para anestesia em animais de pequeno porte. Em seguida, foi administrado antibiótico ceftriaxone intramuscular na dose de 57 mg.kg^{-1} para a prevenção de cistite pela manipulação do trato genito-urinário. Após 30 minutos foi realizada a limpeza do meato uretral com povidine tópico, e então se realizou a cateterização vesical, utilizando catéter intra-venoso nº22. O cateter foi totalmente introduzido para alcançar a bexiga do animal. Uma vez o catéter posicionado, a bexiga foi preenchida com as formulações anteriormente descritas.

2.2.4 ANÁLISE DO SEDIMENTO URINÁRIO

A coleta do material foi realizada de forma direta. Os animais reagem imediatamente com a liberação dos esfíncteres no momento que são manipulados. Desta forma, após higienização de superfície de aço inox com álcool 70º, os animais foram manipulados e o conteúdo vesical eliminado sobre esta superfície. As fezes foram depositadas em local diferente da urina também sobre a mesma superfície. A urina foi aspirada com uma seringa estéril e colocada em recipiente adequado para urianálise. Os exames foram realizados imediatamente após a coleta.

Este procedimento foi realizado após a instilação intravesical das formulações e foram coletadas amostras de urina das ratas no 15º, 30º, 37º, 45º, 52º e 60º dias, com tempo experimental de 60 dias.

O exame foi realizado utilizando microscópio óptico no aumento de 100x para avaliação da presença de células e cristais e 400x para verificação da presença de piócitos, bactérias e gotículas de gordura. Foram utilizadas tiras reativas para urianálise Biocolor (Bioeasy, lote URS 7090057) para a identificação da densidade urinária, sangue, pH, nitrito e leucócitos.

Foi assumido como critério de exclusão a presença de bactérias numerosas, piúria ou hematúria tanto pela microscopia como pela tira de urianálise.

A presença de lipossomas na urina foi realizada pela visualização direta de gotículas de gordura livres na amostra, de coloração amarelo-acastanhada, evidenciando a presença do duplo halo. Para melhor visualização das gotículas, utilizou-se 2 gotas da coloração Sudam III sobre a lâmina com a amostra de urina, homogeneizou-se a amostra, a mesma foi submetida a aquecimento até 50ºC para observação no microscópio óptico. As gotículas gordurosas após coloração com Sudam III devem se apresentar em tom vermelho-alaranjado. Foram consideradas positivas as amostras contendo gotículas de gordura compatíveis com as características descritas por HEINZ *et al.*, 1994.

2.2.5 EXTRAÇÃO E HISTOLOGIA DA BEXIGA DOS RATOS

As ratas foram sacrificadas por deslocamento cervical. O procedimento de dissecação foi guiado com auxílio de cateterismo vesical. A laparotomia mediana baixa foi realizada, seguida de abertura da parede abdominal por planos e afastamento dos músculos abdominais, exposição da bexiga e ressecção da mesma na sua totalidade.

Os animais foram sacrificados em 1, 7 e 60 dias após a instilação intravesical das diferentes formulações.

As peças cirúrgicas excisadas foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10% por um período mínimo de 24 h. Na macroscopia, o corte foi realizado no sentido longitudinal, na região mediana da bexiga e realizou-se a aferição do tamanho das bexigas em milímetros. A presença de focos hemorrágicos, de coloração vermelha a violácea, foi classificada como 0, na ausência de focos hemorrágicos; 1+ quando a área hemorrágica correspondia a menos de 50% da peça e 2+ quando a área hemorrágica correspondia a mais de 50% da peça.

Após fixação as amostras foram desidratadas com etanol, diafanizadas com xileno e banhadas em parafina. A última etapa foi conduzida por inclusão na parafina. Cortes de aproximadamente 3 µm de espessura foram realizados e os espécimes, processados de acordo com diferentes protocolos de histoquímica (hematoxilina-eosina e picrossírius).

Para avaliação da morfologia e disposição das fibras colágenas depositadas na parede da bexiga, secções histológicas foram submetidas previamente ao método de coloração histoquímica do picrossírius e analisadas sob microscopia óptica com luz polarizada para a descrição da fibroplasia detendo-se na identificação do colágeno.

As secções coradas com hematoxilina-eosina (HE) foram classificadas tanto na porção superficial quanto profunda da parede vesical utilizando os parâmetros morfológicos descritos na tabela 2.

Tabela 2. Classificação dos parâmetros microscópicos da reação inflamatória nas secções da bexiga coradas em hematoxilina-eosina (HE).

Parâmetro analisado	Classificação do parâmetro
Intensidade do processo inflamatório	células inflamatórias na parede da bexiga, independente de seu fenótipo, constituírem: +1: menos de 10% da população celular +2: entre 10% a 50% da população celular +3: mais de 50% da população celular.
Tipagem celular	(N) neutrófilos; (E) eosinófilos; (L) linfócitos; (P) plasmócitos; (M)

	macrófagos; (G) células gigantes multinucleadas.
Categorização da reação inflamatória (fenótipo inflamatório predominante)	IA: Inflamação aguda: predominância de leucócitos polimorfonucleares (N e/ou E). IS: Inflamação subaguda: leucócitos polimorfonucleares (N e E) e mononucleares (L, P e M) presentes em quantidade semelhante. ICI: Inflamação crônica inespecífica: predominância de L e/ou P. ICE: Inflamação crônica específica (granulomatosa): predominância de M e/ou G.
Edema	(+) presente ou (-) ausente
Hiperemia	(+) presente ou (-) ausente
Integridade do urotélio	(+) íntegro ou (-) ulcerado
Necrose	(+) presente ou (-) ausente
Outros	(H) hialinização; (ME) metaplasia escamosa; (HE) hiperplasia epitelial; (U) úlcera; (F) fibrose

2.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Foram utilizados os testes estatísticos ANOVA, seguido do teste de Tukey para os valores encontrados na avaliação macroscópica entre os grupos em relação ao tamanho das bexigas, considerando significativo o valor de $p < 0,05$.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. AVALIAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE

Os lipossomas contendo OXI e RTX apresentaram diâmetro médio de vesícula de 21,04 nm e 20,55 nm logo após a sua obtenção (Figura 5A e B). Após 42 dias do preparo, foi observado que os lipossomas contendo resiniferatoxina (Figura 5B) apresentaram um tamanho vesicular maior (50,75 nm) que o verificado no 3º dia.

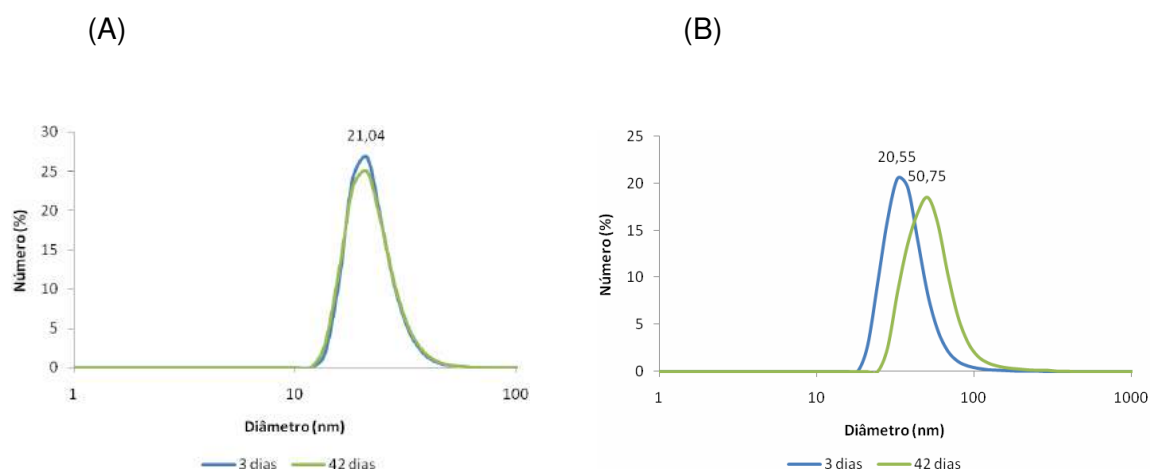


Figura 5. Distribuição do tamanho das vesículas lipossomais contendo oxibutinina (A) e resiniferatoxina (B).

O índice de polidispersividade da formulação de OXI não variou após 42 dias do preparo, porém apresentou-se alto, em torno de 0,5. Na formulação contendo RTX houve diminuição no índice de polidispersividade, ficando após 42 dias da obtenção das vesículas menor que 0,3 (Figura 6).

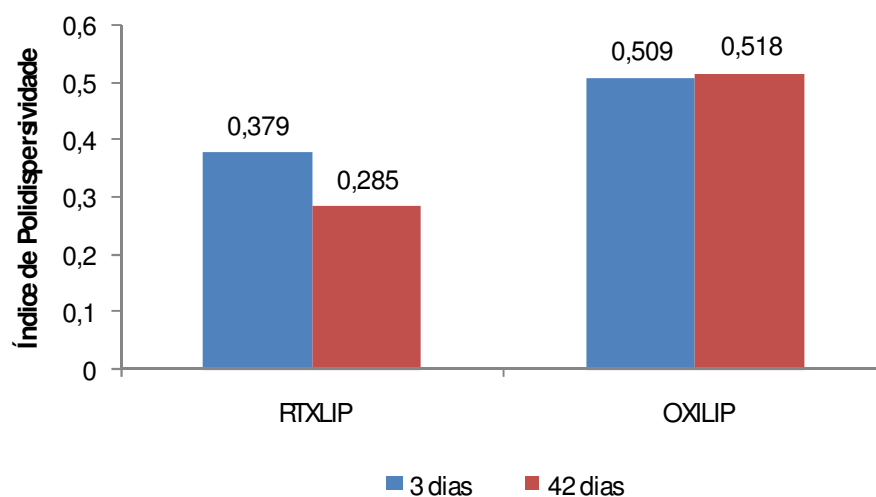


Figura 6. Índice de polidispersividade das formulações lipossomais após 3 e 42 dias da obtenção das mesmas.

2.3.2. ACHADOS CIRÚRGICOS

A maioria dos animais não apresentou alterações na cavidade abdominal verificadas durante a laparotomia. Somente no grupo RTX-7, três animais apresentaram aderência da bexiga a outras estruturas abdominais e em dois destes animais foi verificada hematúria macroscópica (Figura 7).

Neste estudo foram excluídos 4 animais (dois do grupo OXILIP-60 e dois do grupo RTX-60) com o diagnóstico de infecção urinária após o procedimento de manipulação das vias urinárias, 3 deles diagnosticados através da urianálise e 1 através do exame clínico (piúria macroscópica). A piúria macroscópica foi evidenciada pela presença de secreção purulenta na urina, visível a olho nu e ocorreu em um dos ratos do grupo de LIP-7. Estes animais foram excluídos da análise histomorfológica, pois a instalação de uma infecção nas vias urinárias pode alterar os achados histológicos.



Figura 7. Hematúria macroscópica e presença de aderências vesicais observadas durante a dissecação em rato do grupo com resiniferatoxina após 7 dias.

2.3.3. MACROSCOPIA

Após avaliação macroscópica foram evidenciadas alterações no tamanho da bexiga conforme pode ser observado nas figuras 8 a 11.

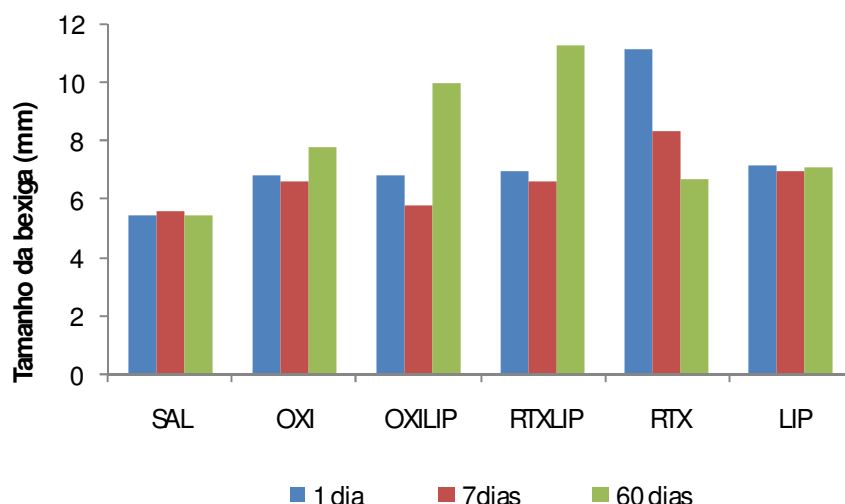


Figura 8. Avaliação do tamanho médio das bexigas dos animais (mm) 1, 7 e 60 dias após a administração intravesical das formulações.

A figura 8 apresenta a média do tamanho das bexigas dos animais estudados ao longo do tempo. Todos os grupos apresentaram tamanho de bexiga semelhante entre si após um dia da instilação das formulações, com exceção do grupo de RTX-1 que apresentou tamanho superior aos demais ($p < 0,05$ em relação a todos os grupos).

O tamanho das bexigas do grupo SAL e LIP não apresentaram variação no decorrer de 60 dias de experimento ($p = 0,0785$). Os grupos LIP-1, LIP-7 e LIP-60 não mostraram alteração significativa de diâmetro da peça em relação ao grupo controle ($p = 0,4$; $p = 0,6$ e $p = 0,7$ para cada grupo, respectivamente) (Figuras 8 e 9).

A OXI não apresentou interferência no tamanho da bexiga em 1 e 7 dias após administração da mesma, sendo os valores encontrados semelhantes aos do grupo salina ($p = 0,94$ e $p = 0,082$ respectivamente). Porém, a OXI-60 apresentou um pequeno aumento no tamanho das bexigas, diferindo estatisticamente do grupo salina ($p = 0,0003$), mas bem menor que o encontrado no grupo OXILIP-60 ($p = 0,001787$). O grupo OXILIP apresentou em 1 e 7 dias valores similares ao grupo SAL ($p = 0,70$ e $0,97$), LIP-1 ($p = 1,00$) e LIP-7 ($p = 0,22$), diferindo apenas após 60 dias de experimento ($p < 0,0004$) (Figuras 8 a 11).

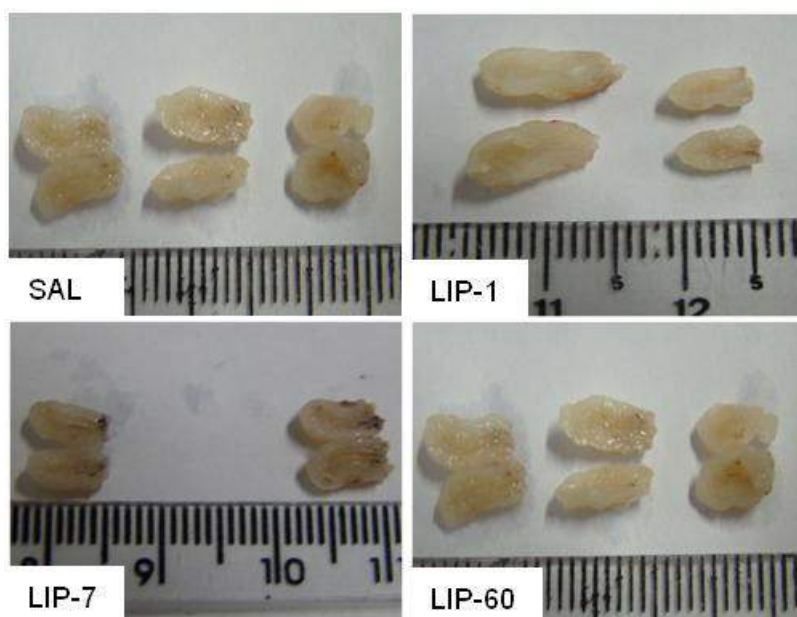


Figura 9. Avaliação macroscópica das bexigas evidenciando tamanho (mm) e pontos hemorrágicos no grupo salina (SAL) e em 1 (LIP-1), 7 (LIP-7) e 60 (LIP-60) dias após instilação das formulações.

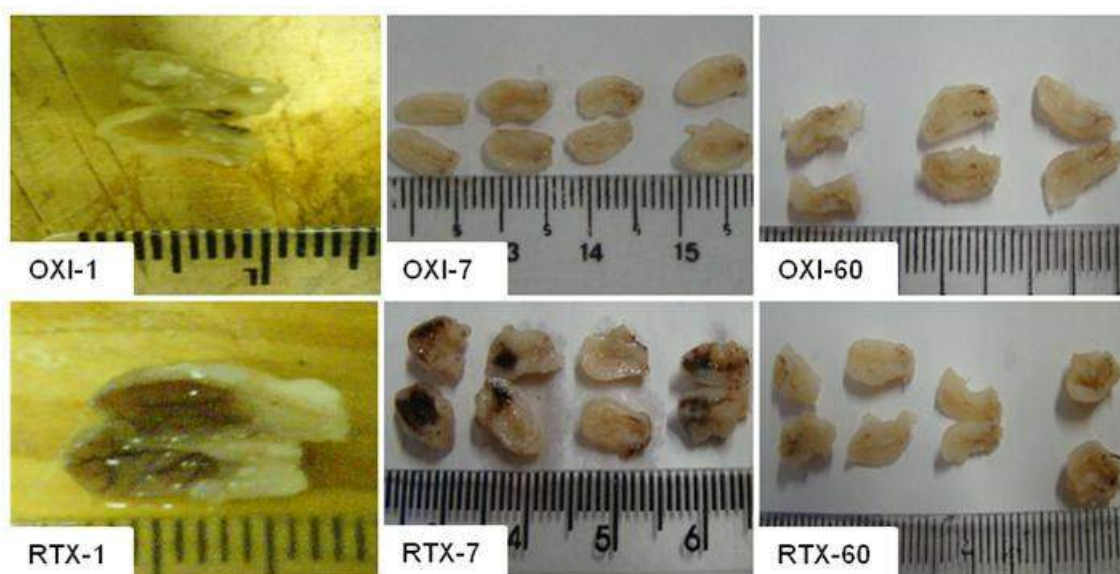


Figura 10. Avaliação macroscópica das bexigas evidenciando tamanho (mm) e pontos hemorrágicos em 1, 7 e 60 dias após a instilação de oxibutinina (OXI) e resiniferatoxina (RTX).

O efeito da RTX sobre o tamanho vesical já pode ser observada dentro das primeiras 24 horas após a administração, porém com diminuição gradativa nos tempos 7 e 60 dias. A RTX apresentou inicialmente um aumento significativo da bexiga em relação aos demais grupos, sendo que no tempo 7 dias o tamanho da bexiga diminuiu, porém ainda

apresentando diferença significativa em relação ao grupo SAL ($p=0,0001$), mas não sustentando este comportamento após 60 dias de administração da formulação, onde as bexigas apresentaram tamanho estatisticamente igual ao controle ($p=0,13$) (Figuras 8 a 10). Apenas o grupo RTX mostrou comportamento involutivo ao longo do tempo, com dilatação imediata após 1 dia, comparável ao grupo RTXLIP-60 e voltando em 60 dias às dimensões iguais ao grupo SAL (Figuras 8 a 11).

Os grupos tratados com lipossomas contendo RTX e OXI inicialmente não apresentaram influência no tamanho da bexiga (1 e 7 dias) quando comparados ao grupo salina e lipossoma ($p>0,05$). Após 60 dias, as formulações lipossomais contendo fármacos apresentaram um aumento no diâmetro de bexiga semelhante, embora tenha sido observada uma tendência de valores maiores para o grupo RTXLIP-60, porém sem diferença estatística ($p=0,09$). Os dois grupos RTXLIP-60 e OXILIP-60 diferiram dos demais grupos apresentando tamanho de bexiga maior (Figuras 8, 10 e 11).

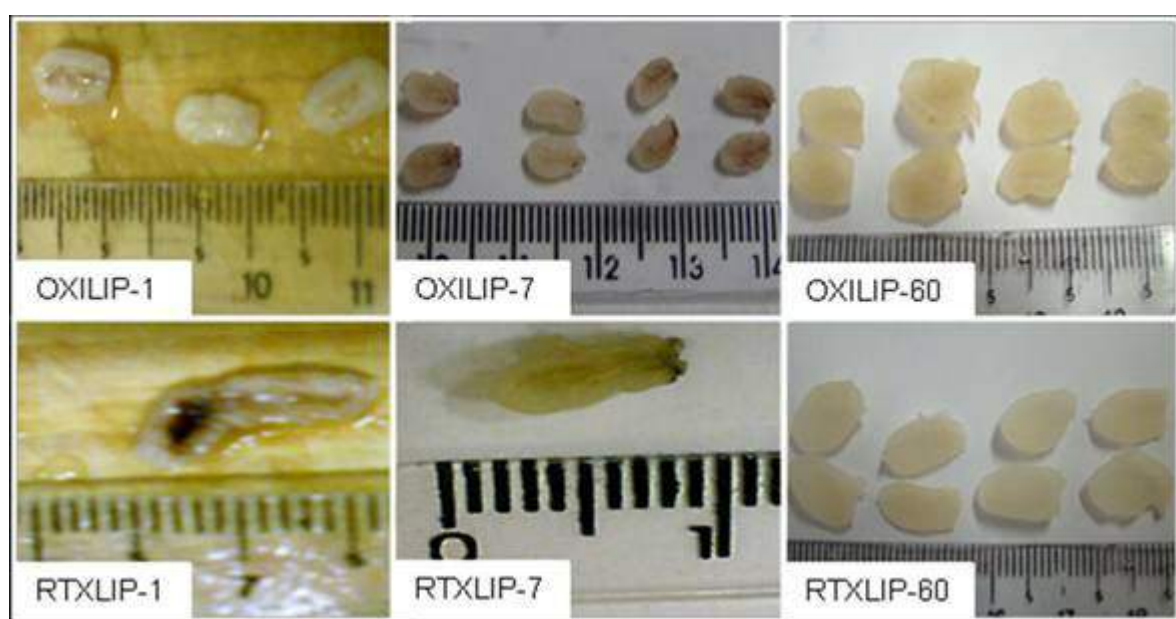


Figura 11. Avaliação macroscópica das bexigas evidenciando tamanho (mm) e pontos hemorrágicos em 1, 7 e 60 após a instilação de oxibutinina em lipossomas (OXILIP) e resiniferatoxina em lipossomas (RTXLIP).

Em relação a presença de focos hemorrágicos, os grupos que apresentaram maior potencial hemorrágico foram os da RTX. No grupo RTX-1, todas as bexigas foram classificadas como +2, e apenas uma como +1 (Figura 12A). Após 7 dias, duas foram classificadas como +2, três bexigas passaram a +1 e apenas uma foi classificada como 0 (Figura 12B). No grupo OXI-1, duas bexigas apresentaram focos hemorrágicos +1 e as

demais não apresentaram focos hemorrágicos (Figura 12A). Após 7 dias, todas foram classificadas como 0 (Figura 12B). Em RTX-LIP-1, 4 bexigas apresentavam focos +1, uma como 0 e outra como +2 (Figura 12A), e sem focos hemorrágicos em todos animais após 7 dias (Figura 12B). No grupo OXILIP-1 apenas uma apresentou focos hemorrágicos do tipo +1 (Figura 12A) e após 7 dias todas foram classificadas como 0 (Figura 12B). Em 60 dias, nenhuma bexiga apresentou focos hemorrágicos macroscópicos.

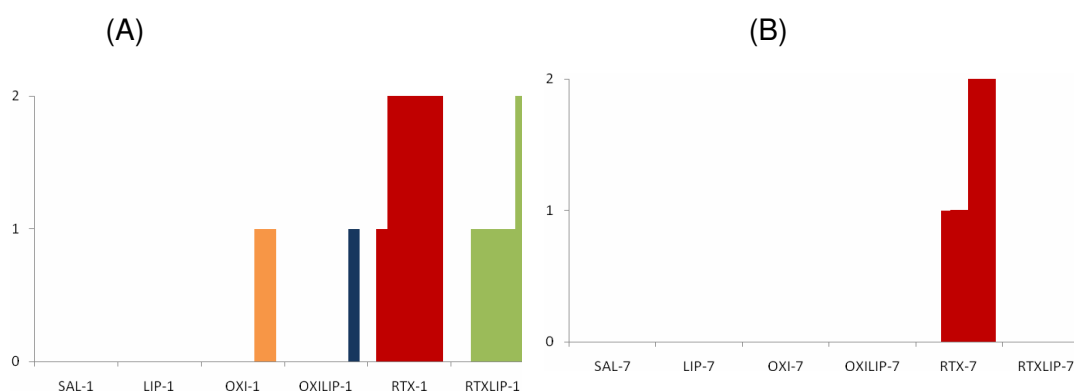


Figura 12. Intensidade de pontos hemorrágicos nas bexigas após instilação das formulações (A) após 1 dia; (B) após 7 dias. Cada barra (■) corresponde a um animal do grupo.

2.3.4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Na análise histológica das bexigas, observou-se importante diferença entre os grupos. As principais alterações encontram-se expostas nas figuras 13, 14 e 15.

No grupo LIP-1 pode ser observado a integridade do epitélio e presença de hiperemia acentuada (figura 13 LIP-1(A-B)), porém sem reação inflamatória evidente. O grupo OXI-1 apresentou áreas de ulceração e adelgaçamento do urotélio (figura 13 OXI-1(A)), com hemorragia intensa e hiperemia (figura 13 OXI-1 (B)). Neste grupo o infiltrado

inflamatório foi moderado, composto por linfócitos e plasmócitos com presença de edema tecidual (figura 13 OXI-1(C)). No grupo RTX-1 foram observadas áreas de ulceração, adelgaçamento do epitélio e necrose do mesmo (figura 13 RTX-1(A-C)). Este grupo apresentou reação inflamatória aguda com presença de neutrófilos e mastócitos, além de hemorragia intensa, hiperemia vascular e edema (figura 13 RTX-1(C-D)). No grupo OXILIP-1 tem-se um epitélio íntegro, porém, adelgado com discreto infiltrado inflamatório mononuclear, presença de edema e hiperemia, porém, sem áreas de ulceração ou hemorragia (figura 13 OXILIP-1(A-D)). O grupo RTXLIP-1 apresentou epitélio preservado, escassas áreas hemorrágicas e infiltrado inflamatório crônico localizado, com presença de edema moderado (figura 13 RTXLIP-1(A-D)).



Figura 13. Secções histológicas das bexigas após um dia da instilação das formulações com a coloração Hematoxilina/eosina (aumento 100X) dos grupos salina (SAL-1), lipossoma (LIP-1), Oxibutinina (OXI-1), Resiniferatoxina (RTX-1), Oxibutinina em lipossomas (OXILIP-1), Resiniferatoxina em lipossomas (RTXLIP-1).



Figura 14. Secções histológicas das bexigas após 7 dias da instilação das formulações com a coloração Hematoxilina/eosina (aumento 100X) dos grupos salina (SAL-7), lipossoma (LIP-7), Oxibutinina (OXI-7), Resiniferatoxina (RTX-7), Oxibutinina em lipossomas (OXILIP-7), Resiniferatoxina em lipossomas (RTXLIP-7).

No grupo LIP-7 foi observado epitélio íntegro e presença de hiperemia discreta (figura 14 LIP-7(A)), sem evidência de infiltrado inflamatório (figuras 14 LIP-7(B-D)). No

grupo OXI-7, o epitélio já se encontrava reconstituído (figura 14 OXI-7(A, B e D)), porém com reação inflamatória intensa caracterizada por infiltrado linfocitário, presença de plasmócitos e polimorfonucleares (figura 14 OXI-7(A-B)). Neste grupo também foi verificado reação de granulação focal, hiperemia e áreas de hialinização, com presença em algumas secções de eosinófilos subepiteliais (figura 14 OXI-7(C)). O grupo RTX-7 apresentou áreas de desnudamento epitelial (figura 14 RTX-7(D)), infiltrado inflamatório crônico moderado (figura 14 RTX-7(A, C e D)) e edema intersticial (figura 14 LIP-7(C)). Em OXILIP-7 foi observado um epitélio íntegro (figura 14 OXILIP-7(A, C e D)), presença de hiperemia (figura 14 OXILIP-7(B)) e infiltrado inflamatório discreto mononuclear, próximo aos vasos sanguíneos, além de edema intersticial focal (figura 14 OXILIP-7(D)). Em RTXLIP-7 o epitélio apresentou-se preservado (figura 14 RTXLIP-7(A, B e D)), com hiperemia (figura 14 RTXLIP-7(C)) e infiltrado inflamatório crônico de característica residual e focal, sem presença de edema (figura 14 RTXLIP-7(A e C)) .

O grupo LIP-60 mostrou-se com todas as características da normalidade, com epitélio íntegro e ausência de infiltrado inflamatório ou edema. Uma das bexigas exibiu focos de hiperemia leve (figura 15 LIP-60(C)). No grupo de OXI-60, foi observada apenas uma reação de hiperemia discreta (figura 15 OXI-60(D)), presença de escassos linfócitos dispersos (figura 15 OXI-60(B e C)), ausência de eosinofilia e o epitélio encontrava-se íntegro (figura 15 OXI-60(A-D)). Em RTX-60 houve aparecimento de uma reação de hiperplasia no epitélio, assim como metaplasia escamosa, representada pela presença de grânulos de querato-hialina na superfície urotelial (figura 15 RTX-60(B)). Foi observado também infiltrado inflamatório crônico moderado, sem edema ou hiperemia (figura 15 RTX-60(A)), com presença de áreas de fibrose. No grupo OXILIP-60, o epitélio apresentou-se íntegro (figura 15 OXILIP-60(C e D)), com discreta reação inflamatória sub-epitelial linfocitária (figura 15 OXILIP-60(A)), hiperemia (figura 15 OXILIP-60(B e D)), com edema sub-epitelial e camadas musculares (figura 15 OXILIP-60(C e D)). Em RTXLIP-60 o epitélio também se mostrou íntegro (figura 15 RTXLIP-60(C e D)), com presença de infiltrado inflamatório linfocitário escasso (figura 15 RTXLIP-60(B)), na região sub-epitelial e presença de edema (figura 15 RTXLIP-60(C e D)).

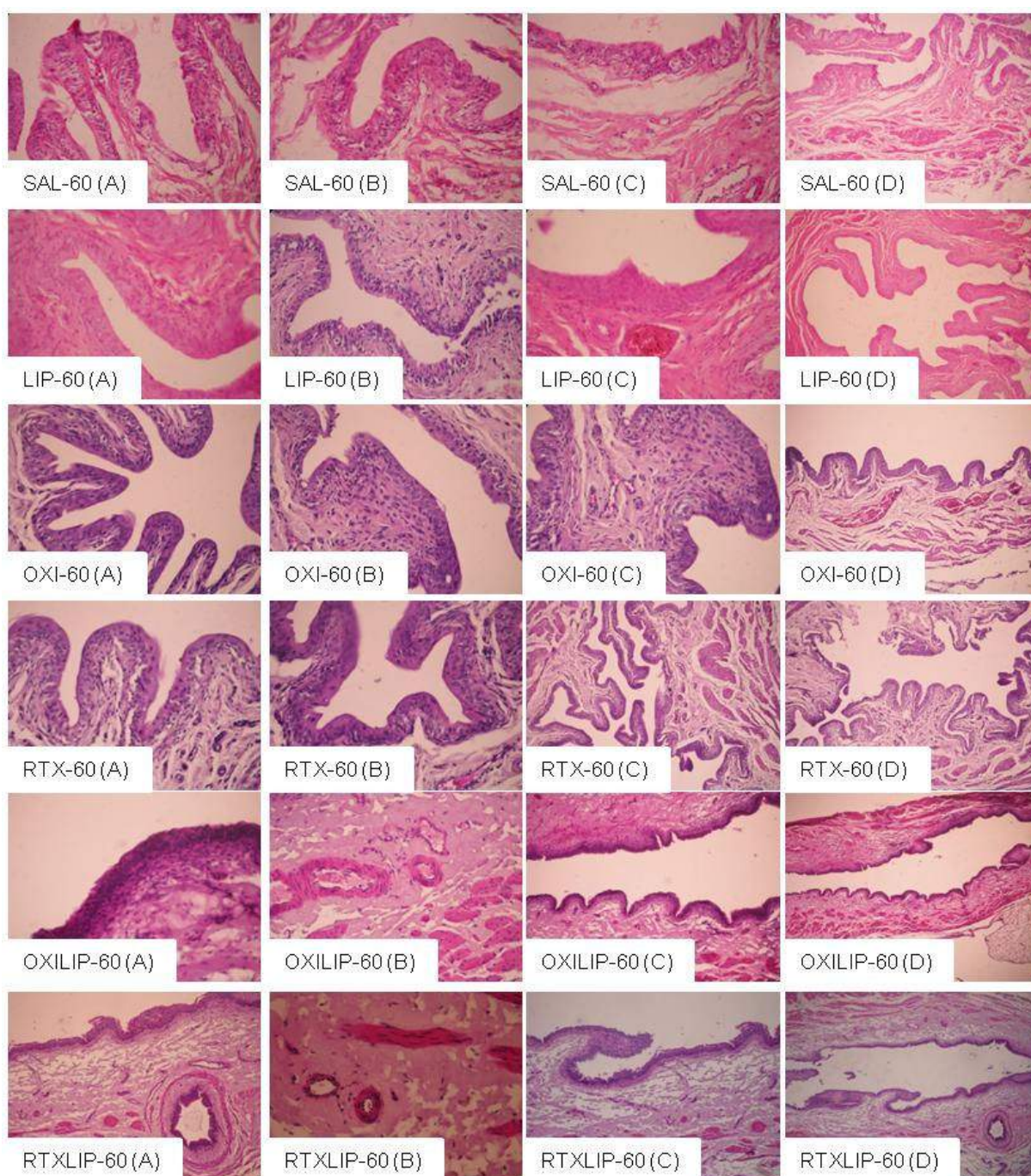


Figura 15. Secções histológicas das bexigas após 60 dias da instilação das formulações com a coloração Hematoxilina/eosina (aumento 100X) dos grupos salina (SAL-60), lipossoma (LIP-60), Oxibutinina (OXI-60), Resiniferatoxina (RTX-60), Oxibutinina em lipossomas (OXILIP-60), Resiniferatoxina em lipossomas (RTXLIP-60).

Tabela 3: resultados histológicos avaliados de acordo com cada sub-grupo do estudo.

Avaliação	Coloração	SAL 1	SAL 7	SAL 60	LIP 1	LIP 7	LIP 60	OXI 1	OXI 7	OXI 60	RTX 1	RTX 7	RTX 60	OXI LIP 1	OXI LIP 7	OXI LIP 60	RTX LIP 1	RTX LIP 7	RTX LIP 60
Reação inflamatória	HE	-	-	-	-	-	-	+3	+2	+1	+3	+2	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Tipagem	HE	-	-	-	-	-	-	L +P	N +E +L+P	L	N +M	L +P	L +P	L +P	L + P	L	L +P	L +P	L
Categorização	HE	-	-	-	-	-	-	IA	IS	ICI	IA	IS	ICI	ICI	ICI	ICI	ICI	ICI	ICI
Edema	HE	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Hiperemia	HE	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Integridade urotelial	HE	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Necrose	HE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
outros	HE	-	-	-	-	-	-	U	H	-	U	H/U	H + ME +F	-	-	-	-	-	-

Reação inflamatória: +1 = leve; +2 = moderada; +3 = intensa; Tipagem celular: L : linfócitos; P : plasmócitos; N: neutrófilos; E : eosinófilos; M : macrófagos; Categorização: ICI : infiltrado crônico inespecífico; IA : inflamação aguda; IS: inflamação sub-aguda; Edema: Presente(+); ausente (-); Hiperemia: presente(+); ausente (-); Integridade urotelial: presente(+); ausente (-); Necrose: presente(+); ausente (-); Outros: U: ulceração; H: hialinização; ME: metaplasia escamosa; F: fibrose;

A tabela 3 resume os principais achados histomorfológicos, bem como a classificação do tipo de reação inflamatória presente em cada grupo estudado, observado nas secções submetidas a coloração HE.

A análise das bexigas do grupo SAL-1, 7 e 60 em picrossírius sob luz polarizada apresentaram predominância das fibras tipo I, de coloração dourada /avermelhada. Foi observado também de fibras colágeno do tipo III. As fibras encontradas apresentaram-se longas e com espaço interfibrilar pequeno. No grupo LIP-1, LIP-7 e LIP-60 não foram verificadas diferenças em relação ao grupo SAL (Figura 16).

No grupo OXI-1 houve perda do colágeno tipo I nas áreas de reação inflamatória e predomínio de fibras tipo III. Após 7 dias, foi observado uma rarefação das fibras colágenas. Na periferia houve o aparecimento de colágeno tipo I e tipo III na região sub-epitelial. Após 60 dias novamente foi encontrado o predomínio das fibras tipo I sem sinais de fibrose ou edema (Figura 16).

No grupo OXILIP-1 foi verificado perda do colágeno tipo I, porém em proporção menor que no grupo OXI-1, e predominância de fibras do tipo III, retornando ao padrão compatível com o grupo SAL após 7 e 60 dias. Em RTX-1 houve perda do colágeno tipo I, em proporção menor que no grupo OXI-1, prevalecendo as fibras do tipo III. Após 7 dias, foi observado ainda predominância de colágeno tipo III depositado nas áreas onde houve hialinização e fibras do tipo I nas camadas mais profundas do tecido vesical. Após 60 dias, a fibra do tipo I tornou a ser predominante, com uma rede entrelaçada densa de fibras grossas e longas. Em RTXILIP-1 manteve-se o padrão de perda do colágeno do tipo I, prevalecendo o tipo III, com grau de perda menor que o da RTX-1, retornando ao padrão compatível com o grupo SAL após 7 e 60 dias.

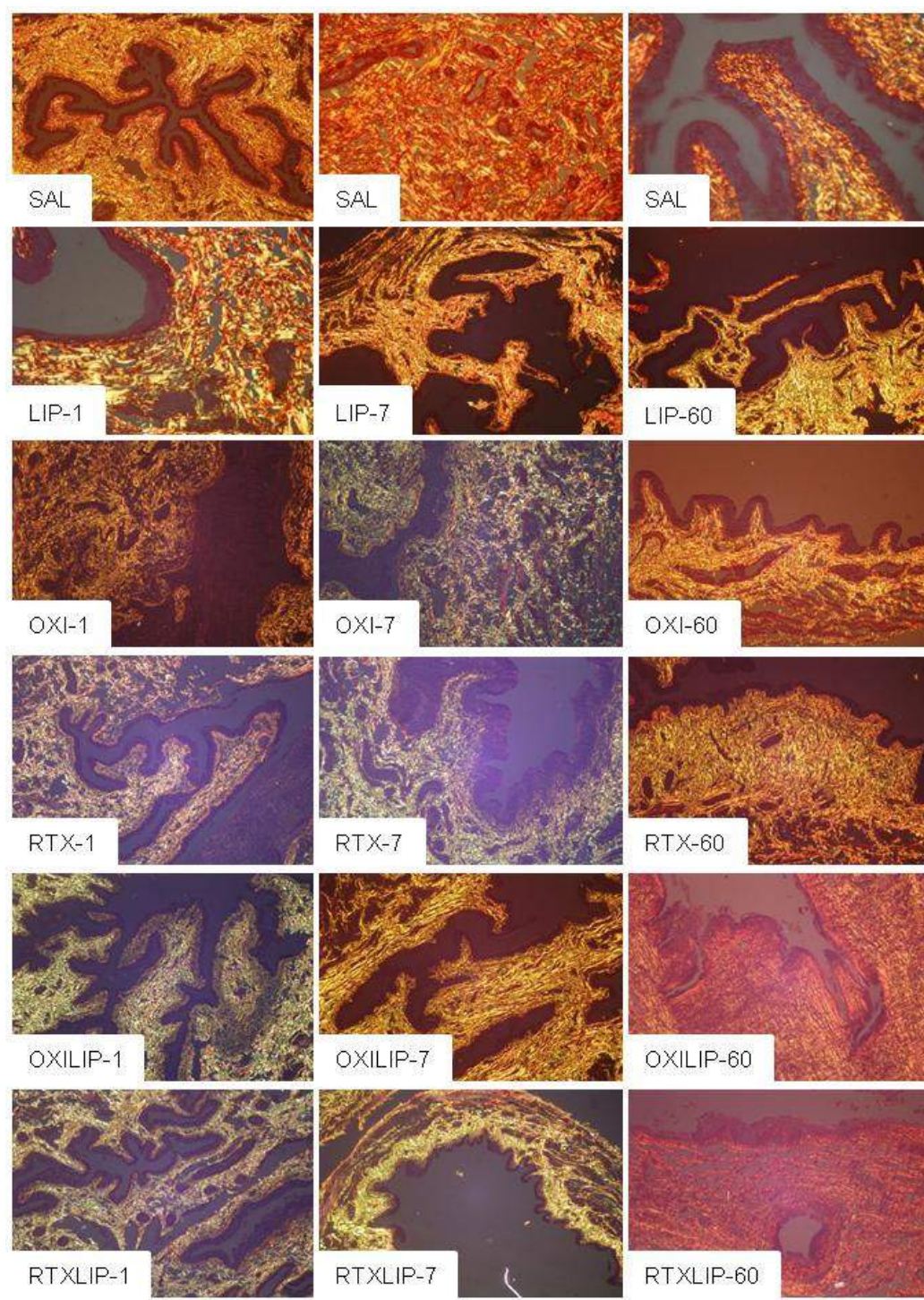


Figura 16. Secções histológicas das bexigas após instilação das formulações (1, 7 e 60 dias) em coloração Picrossírius (aumento 100X) dos grupos salina (SAL), lipossoma (LIP-1, LIP-7 e LIP-60), Oxibutinina (OXI-1, OXI-7 e OXI-60), Resiniferatoxina (RTX-1, RTX7 e RTX60), Oxibutinina em lipossomas (OXILIP-1, OXILIP-7 e OXILIP-60), Resiniferatoxina em lipossomas (RTXLIP-1, RTXLIP-7 e RTXLIP-60).

2.3.5. URINÁLISE

Os resultados de urinálise das amostras coletadas no 15º dia encontrados na maioria dos animais estudados foram semelhantes e dentro da normalidade (tabela 4). Foram excluídos do estudo 3 animais por apresentarem sinais de infecção urinária na microscopia.

Tabela 4. Resultados da urinálise realizada após 15 dias da instilação das formulações.

Parâmetro avaliado	Valores encontrados
Presença de células	Raras ou ausentes
Presença de bactérias	Raras ou ausentes
Plácitos	<1 por campo
Hemácias	0

No grupo LIP, gotículas de gordura foram encontradas em todas as amostras até o final do estudo. No RTXLIP, as gotículas de gordura foram igualmente identificadas em todas as lâminas até o 60º dia. Entretanto, no grupo de OXILIP, a partir do 51º dia, foi observado em 2 amostras ausência de gotículas de gordura e presentes nas demais amostras. Este resultado se manteve na avaliação com 60 dias. Na figura 17, são visualizadas as imagens das gotículas de gordura em suas formas de apresentação.

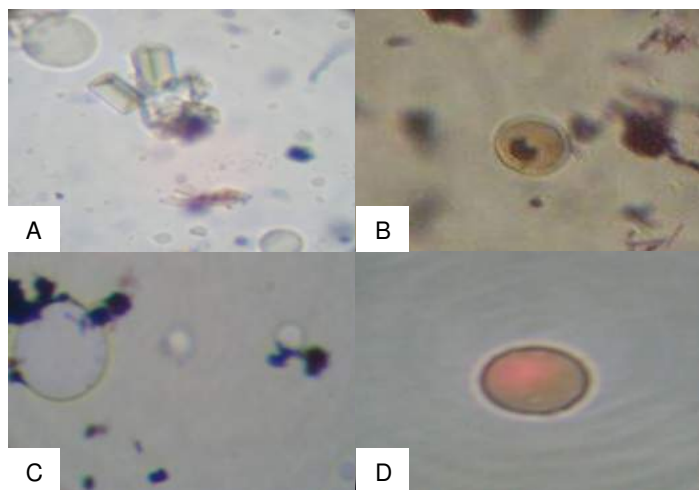


Figura 17. Visualização das gotículas de gordura na urina dos ratos. (A) gotículas de gordura, resíduos e cristais de fosfato triplo no grupo OXILIP-60; (B) gotícula corada no grupo OXILIP-60; (C) gotícula corada e gotículas menores não coradas no grupo RTXLIP-60; (D) gotícula corada no grupo RTXLIP-60.

2.4. DISCUSSÃO

A utilização de formulações diferenciadas com a finalidade de diminuir a toxicidade ou ação deletéria de determinados fármacos, como os bioadesivos e lipossomas, têm sido propostas e têm obtido sucesso nas terapias intra-vesicais, expandindo sua utilização para diversas doenças urinárias (GIANNANTONI et al., 2006). O uso de lipossomas como agente carreador de capsaicina (fármaco também utilizado na terapia intravesical), tem demonstrado efetividade clínica e diminuição dos efeitos não desejados do fármaco que também possui característica irritante (CHANCELLOR e DE GROAT, 1999).

As formulações lipossomais são instáveis e podem sofrer agregação das vesículas com o passar do tempo. O valor do índice de polidispersidade deve-se manter abaixo de 0,2 para que o sistema seja considerado estável fisicamente (CENTES e VEREMTTE, 2008; SONG e KIM, 2006). Os valores encontrados nos lipossomas contendo RTX foram próximos de 0,3 com tendência a queda após 42 dias da preparação da formulação. O tamanho das vesículas destas formulações aumentou com o tempo. Estes resultados sugerem que pode estar ocorrendo uma reorganização no tamanho das vesículas para acomodação energética do sistema e conseqüentemente uma tendência para a estabilização física da formulação. Apesar do aumento no tamanho das vesículas, estas ainda se encontram com dimensões da ordem de nano, favorecendo sua interação com o sistema biológico.

A formulação lipossomal contendo OXI apresentou um índice de polidispersividade alto (em torno de 0,5), porém estável durante o período avaliado. Apesar do índice alto, não houve alteração no tamanho das vesículas, permanecendo as mesmas com diâmetro médio em torno de 20 nm. O valor alto de polidispersidade evidencia uma dispersão heterogênea no tamanho das vesículas (CENTES E VERMETTE, 2008; SONG E KIM, 2006).

Na avaliação macroscópica das bexigas, a ação da RTX pode ser observada dentro das primeiras 24 horas após a administração, provavelmente decorrente de edema associado ao relaxamento do músculo detrusor e conseqüente aumento do tamanho vesical. Em trabalho realizado em humanos, APOSTOLIDIS *et al.* (2006) observaram um maior intervalo entre as micções, melhora dos parâmetros cistométricos de primeiro desejo miccional e capacidade cistométrica máxima já nas primeiras 24 horas após a instilação intravesical de RTX. No presente estudo, a macroscopia das bexigas evidenciou no grupo RTX-1 uma dilatação vesical comparável ao resultado final do grupo RTX-LIP-60, mostrando a potência do fármaco mesmo em doses nanomolares. A RTX apresentou perda da dilatação de forma progressiva, associada a substituição das fibras colágenas por fibrose e conseqüente perda de elasticidade. No estudo de SILVA *et al.* (2001), o qual os autores

descrevem que não houve dano tecidual, a biopsia vesical é feita tardiamente (7 meses após a última instilação intravesical).

A partir da análise dos focos hemorrágicos macroscópicos, verificou-se uma maior agressividade da RTX ao epitélio vesical, com a recuperação parcial da bexiga após 7 dias. Neste grupo, a presença de aderências e hematúria em alguns animais pode ser explicada pela intensa reação inflamatória com focos hemorrágicos observados nos cortes histológicos (Figura 13), envolvendo todas as camadas da bexiga. A reação transpõe o órgão e acometeu estruturas adjacentes, gerando fibrose e a aderência entre as estruturas.

O uso da substância encapsulada em lipossomas proporcionou uma proteção à bexiga, minimizando a agressão da RTX. A RTX foi preparada em etanol, substância também irritante ao epitélio vesical (TYAGI *et al.*, 2004). A presença de uma bexiga com foco hemorrágico classificado como +2 no grupo RTXLIP-1 pode sugerir que a substância pode não se encontrar totalmente encapsulada nos lipossomas ou já liberada e, portanto agindo diretamente no urotélio, causando lesão. Segundo FRÉZARD *et al.* (2005), no processo de encapsulação deve ser verificado se a substância lipofílica (RTX) está efetivamente incorporada à membrana e não simplesmente adsorvida na sua superfície ou associada na forma de microcristais em suspensão com os lipossomas. No caso de substâncias hidrossolúveis (OXI), é teoricamente impossível atingir níveis de encapsulação de 100% devido à necessidade da coexistência de compartimentos aquosos interno e externo.

A cinética de liberação da substância através de difusão simples com lipossomas de mesmo tamanho é exponencial, e determinada pelo coeficiente de permeabilidade da substância e pelo tamanho do lipossoma. Quanto menor for o coeficiente de permeabilidade ou quanto maior o tamanho dos lipossomas, mais lenta será a liberação da substância dos lipossomas (FRÉZARD *et al.*, 2005). O grupo OXI mostrou um grau moderado de irritação, quando comparado à intensa reação inflamatória do grupo RTX, apresentando recuperação total após 7 dias da instilação. A formulação lipossomal conferiu a proteção necessária à substância, praticamente eliminando a formação de focos hemorrágicos macroscópicos mesmo no grupo de 1 dia.

Em estudo realizado em humanos (SILVA *et al.*, 2001), a RTX foi instilada na cavidade vesical nas concentrações de 50 e 100 nM por repetidas vezes. Neste trabalho, os pacientes relataram que a infusão não foi dolorosa e a cistoscopia, realizada entre 7 e 23 meses após a última instilação, todas as bexigas se mostraram com aspecto normal. As biópsias também foram realizadas durante a cistoscopia e evidenciaram epitélio íntegro, infiltrado inflamatório mínimo ou ausente, não houve casos de metaplasia, displasia ou carcinoma urotelial. O presente estudo, utilizando concentração semelhante e instilação

única, apresentou resultados discordantes de Silva *et al.* (2001), provavelmente porque as biópsias foram realizadas muito tardiamente em relação à data da infusão (7 a 23 meses após) e o número de pacientes estudados (n=7) também foi muito pequeno para afastar qualquer alteração urotelial a longo prazo. Outros estudos realizados em humanos utilizaram doses de RTX variando de 50 a 100 nM (APOSTOLIDIS *et al.*, 2006; PALMA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002; THIEL, 2002), nos quais os pacientes referiram grau de desconforto nulo ou mínimo após instilação, também não correspondendo à intensidade da resposta inflamatória verificada. Esta ausência de dor, apesar da resposta inflamatória gerada pelo fármaco, provavelmente pode ocorrer devido à rápida despolarização gerada pela RTX sem que haja excitação nervosa prévia, como a provocada pela capsaicina (FRASER *et al.*, 2002).

Em relação à dor causada pela instilação intravesical direta, a OXI possui propriedades anestésicas, com potência duas vezes maior que a lidocaína (BARROSO JR. *et al.*, 2000) e a RTX é um bloqueador neuromuscular de ação imediata, utilizado em estudos em animais, com resultados satisfatórios para o tratamento de dor em casos de câncer (MENENDEZ *et al.*, 2006). A RTX também tem sido utilizada no tratamento da dor de uma forma geral, com injeção perineural (NEUBERT *et al.*, 2008). Estas propriedades anestésicas acabam encobrendo a agressão vesical. Portanto, a ausência de queixas algícas do paciente durante a instilação intravesical não significa ausência de dano, pois não reflete a intensidade da reação inflamatória produzida, observada nas secções histológicas deste estudo. A primeira consequência da ligação da RTX com os receptores vanilóides presentes no urotélio é a excitação neuronal devido à liberação de neuropeptídeos como a substância P (SP), peptídeo gene-relacionado à calcitonina (CGRP) e interleucina (IL). A liberação destes neuropeptídeos gera respostas nos vasos sangüíneos, mastócitos e linfócitos, levando à inflamação neurogênica e reações alérgicas de hipersensibilidade (SZALLASI e BLUMBERG, 1995).

Foi observado, porém, que existe a toxicidade urotelial, devido ao baixo índice terapêutico da RTX e a necessidade da veiculação em solução alcoólica, que também vai exercer uma ação irritativa no epitélio vesical (TYAGI *et al.*, 2004). Por outro lado, os efeitos farmacológicos da RTX podem ser observados até 6 meses depois da instilação do fármaco puro, diretamente na cavidade vesical segundo APOSTOLIDIS *et al.* (2006).

No estudo de SILVA *et al.* (2002) foi realizada instilação de RTX intravesical em humanos na dose de 50 nM e realizada avaliação dos parâmetros urodinâmicos após 30 e 90 dias e dos parâmetros de primeiro desejo miccional, capacidade cistométrica máxima (capacidade máxima da bexiga em armazenar urina antes do seu esvaziamento), além do sintoma de frequência miccional (aumento do número de micções diárias) (MONTELLA,

2006). O autor relata uma melhora na avaliação de 30 dias e mostraram sinais de retrocesso da resposta na avaliação após 90 dias. No trabalho realizado por PALMA *et al.* (2004), o estudo urodinâmico foi realizado antes e 30 dias após a instilação intravesical de RTX 50 nM e foi verificado um aumento da capacidade cistométrica máxima, porém sem diferença estatística significativa e uma diminuição significativa na amplitude das contrações involuntárias do músculo detrusor após a instilação intravesical de RTX 50 nM.

Os dados do trabalho realizado por SILVA *et al.* (2002) demonstraram um pico de ação rápido em 30 dias seguido de um declínio de seus efeitos após 90 dias. O trabalho de PALMA *et al.* (2004), também obteve resultados pouco significativos em relação aos parâmetros urodinâmicos 30 dias após a instilação. A resposta ao medicamento, portanto, pode ficar comprometida pela intensidade da reação inflamatória causada pelo mesmo, ocorrendo a perda de fibras colágenas da parede vesical, e substituição das mesmas por fibrose.

No estudo realizado por SAITOH *et al.* (2008), foram analisadas a capacidade vesical e a resposta à dor em ratos, utilizando doses de 0,3 e 3 μ M de RTX, onde foi verificada uma diminuição da capacidade vesical e aumento da resposta álgica, provavelmente devido a intensa reação inflamatória e fibrose causadas pela administração da RTX em doses muito maiores que a utilizada no presente estudo.

Histologicamente, em 7 dias foi observado recuperação total do epitélio vesical em todos os grupos com abrandamento da reação inflamatória. No grupo OXI-7 foi observado reação de hialinização e infiltrado eosinofílico subepitelial em metade das lâminas. A hialinização é descrita como achado histológico de marcador de lesão celular. Este processo consiste no depósito de proteínas entre os tecidos ou dentro das células. O colágeno fibroso presente nos tecidos cicatriciais pode ser hialinizado (COTRAN *et al.*, 1994). Esta reação pode ter ocorrido devido à dose mais alta de OXI intravesical utilizada e pela presença da substância livre em solução, atuando diretamente sobre o epitélio. Entretanto, mesmo com a dose de 6 mg/mL de OXI, a toxicidade da RTX em doses terapêuticas ainda foi maior, podendo ser utilizada em doses menores para a instilação direta na cavidade vesical em estudos posteriores.

No trabalho de LANDAU *et al.* (2005), o estudo histológico revelou a presença de eosinófilos subepitelial no epitélio vesical em coelhos que receberam OXI intravesical na forma de comprimido macerado, e não na forma de pó, sugerindo que o excipiente do comprimido possa ter desencadeado uma reação alérgica em alguns animais. No presente trabalho, a forma utilizada foi a OXI pura dissolvida em solução salina e também foi verificada a presença de infiltrado eosinofílico subepitelial em 30% das secções do grupo OXI-7. A eosinofilia subepitelial verificada sugere uma reação alérgica própria à OXI.

O dano epitelial mostrou-se maior no grupo RTX, demandando mais de 7 dias para sua total regeneração, além da reação inflamatória mais intensa, atingindo integralmente a parede vesical, produzindo alterações em cada uma de suas camadas sendo encontradas metaplasia escamosa no urotélio, fibrose e hialinização na sub-mucosa e no músculo detrusor e aderência do órgão a outras estruturas abdominais pela reação inflamatória ultrapassando os limites da camada serosa. No grupo OXI, esse infiltrado atingiu mais de 50% das camadas da bexiga.

De uma forma geral, verificou-se um padrão de agressividade decrescente ao urotélio, respeitando a seqüência RTX > OXI > RTX LIP > OXI LIP > LIP > SAL. A partir dos resultados deste estudo, observou-se que a reação inflamatória gerada pela instilação de OXI e RTX de forma livre na cavidade vesical foi capaz de causar dano tecidual significativo.

Em relação às fibras colágenas, o grupo OXI apresentou maior perda de fibras colágenas e maior lentidão na recuperação das fibras tipo I, predominando apenas na avaliação de 60 dias. No grupo RTX, a recuperação das fibras tipo I já começa a ser vista com 7 dias. Esta perda substancial do colágeno nos grupos OXI e RTX pode justificar a reação de hialinização visualizada na avaliação histomorfológica, pelo depósito maciço de proteína na bexiga. Embora num primeiro momento a substância exerça sua função no urotélio, em um segundo momento, tais reações inflamatórias podem inclusive, em pacientes submetidos a repetidas aplicações, comprometer a elasticidade vesical, e a própria função do órgão, o que pode produzir efeito antagônico ao desejado, diminuindo a capacidade vesical e a contratilidade do mesmo devido ao dano provocado capaz de atingir todas as camadas da bexiga.

Os resultados encontrados nos fármacos em sistemas lipossomais (OXI LIP e RTX LIP) sugerem que os mesmos se encontravam em atividade após 60 dias, provavelmente devido a encapsulação com a liberação lenta dos fármacos (FRÉZARD *et al.*, 2005) e à proteção extra conferida ao urotélio pelos lipossomas, ocorrendo uma diminuição da resposta inflamatória (FRASER *et al.*, 2003).

Os lipossomas puros são capazes de exercer um efeito protetor ao epitélio vesical, complementando a barreira protetora urotelial e aumentando sua resistência aos agentes agressores (GIANNANTONI *et al.*, 2006). Da mesma forma, TYAGI *et al.* (2004) demonstraram que os lipossomas ao serem associados à capsaicina, foram capazes de liberar esta substância com a mesma eficácia de uma solução etanólica, porém com acentuada redução da toxicidade vesical. Os lipossomas podem ser paulatinamente incorporados à bicamada lipídica celular, promovendo a liberação gradual das substâncias.

A associação dos fármacos aos lipossomas (OXILIP e RTXILIP) foi capaz de diminuir substancialmente a agressão vesical em ambos os grupos, acelerando sua regeneração, inclusive da matriz colagênica. A persistência da reação inflamatória leve e a presença do edema mesmo após 60 dias indicam a presença de um agente agressor ao urotélio, sugerindo a presença do fármaco em contato com a superfície urotelial.

Igualmente na urinálise, a confirmação da presença de gotículas de gordura na urina após 60 dias demonstra a presença de lipossomas na cavidade vesical, sugerindo que os fármacos se encontram em atividade após este período provavelmente devido a encapsulação dos mesmos que promove uma liberação mais lenta do fármaco, minimizando a resposta inflamatória e otimizando a atuação das substâncias na bexiga (TYAGI *et al.*, 2004). A urinálise realizada neste estudo foi importante para acompanhar a evolução dos animais, buscando sinais de infecção uma vez que houve manipulação do trato urinário assim como para o acompanhamento da eliminação dos lipossomas.

São necessários mais estudos para avaliar o tempo máximo de liberação lipossomal na urina e estudos histológicos para verificar o tempo total necessário à involução do processo inflamatório, assim como a utilização de doses menores de ambos os fármacos visando minimizar a agressão tecidual. Da mesma forma estudos urodinâmicos com as formulações lipossomais seriam necessários para comprovar os efeitos cistométricos destas formulações.

2.5. CONCLUSÃO

A RTX em doses terapêuticas apresentou maior toxicidade vesical que a OXI administrada em dose alta. Após 60 dias, verificou-se a presença de fibrose e metaplasia escamosa no epitélio vesical no grupo RTX. Ambas as substâncias administradas diretamente na cavidade vesical provocaram perda substancial da matriz colagênica vesical nas doses administradas.

Os lipossomas contendo estas substâncias conferiram uma proteção extra ao urotélio, minimizando a reação inflamatória, otimizando e prolongando o efeito destes fármacos na bexiga dos animais. Após administração intravesical em dose única, os lipossomas puros ou carreando substâncias encapsuladas permaneceram presentes na cavidade vesical até 60 dias após o procedimento.

2.6. REFERÊNCIAS

ANDERSSON, K.E., CHAPPLE, C.R. Oxybutynin and the Overactive Bladder. *World Journal of Urology*, 19, p. 319–23, 2001.

APOSTOLIDIS, A., GONZALES, G.E., FOWLER C.J. Effect Of Intravesical Resiniferatoxin (Rtx) On Lower Urinary Tract Symptoms, Urodynamic Parameters, And Quality Of Life Of Patients With Urodynamic Increased Bladder Sensation. *European Urology*, 50, p. 1299–1305, 2006.

AVELINO, A., CRUZ, F. Peptide Immunoreactivity And Ultrastructure Of Rat Urinary Bladder Nerve Fibers After Topical Desensitization By Capsaicin Or Resiniferatoxin. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 86, p. 37-46. 2000.

CHANCELLOR, M.B., DE GROAT, W.C. Intravesical Capsaicin And Resiniferatoxin Therapy: Spicing Up The Ways To Treat The Overactive Bladder - Review . *The Journal of Urology*, 162(1), p. 3-11, jul. 1999.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L.(eds). Inflammation and Repair. In: Robbins, **Pathologic Basis of Disease**. 5 ed., chap 3. W.B.Saunders, 1994.

FRASER, M.O., LAVELLE, J.P., SACKS, M.S., CHANCELLOR, M.B. The Future of Bladder Control”Intravesical Drug Delivery, a Pinch of Pepper, and Gene Therapy_ *Review. Urology. Winter*, 4(1), p. 1-11, 2002.

GIANNANTONI, A., DI STASI, S.M., CHANCELLOR, M.B., COSTANTINI, E., PORENA, M. New Frontiers in Intravesical Therapies and Drug Delivery. *European Urology*, 50, p.1183–1193, 2006.

HASHIM, H., ABRAMS, P. Treatment Of Overactive Bladder Syndrome And Detrusor Overactivity . *Reviews in Gynaecological Practice* ,5 , p. 243–250, 2005.

KARNKA R, RAYANAKORN M, WATANESK S, VANEESORN Y. Optimization of High performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. *Analytical Sciences*, 18, p.661-665, 2002.

LANDAU, E.H., FUNG, L.C.T., THORNER, P.S., MITTELM, M.W., JAYANTHI, V.R., CHURCHILL, B.M., McLORIE, G.A., STECKLER, R.E., KHOURY, A.E. Histologic Studies Of Intravesical Oxybutynin In The Rabbit. *The Journal Of Urology*, 153, p. 2022-2024, June 1995.

MANNES, A.J., BROWN D.C., KELLER J., CORDES, L., ECKENHOFF, R. G., CAUDLE, R. M., IADAROLA, M. J., MENG, Q. C. Measurement Of Resiniferatoxin In Serum Samples By

High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography B*, 823, p. 184–188, 2005.

MENÉNDEZ, L., JUÁREZ, L., GARCÍA, E., SUÁREZ, O.G., HIDALGO, A., BAAMONDE, A.. Analgesic Effects Of Capsazepine And Resiniferatoxin On Bone Cancer Pain In Mice. *Neuroscience Letters* , 393 (1), p. 70-73, 2006.

MONTELLA, J.M. Tratamento da Bexiga Hiperativa. In: MONTELLA, A.E., CUNDIFF, G.W., OSTERGARD, D.R., SWIFT, S.E. **Ostergard, Uroginecologia e Disfunções do Assoalho Pélvico**. 5ª ed cap.20, Ed. Guanabara Koogan, 2006.

NEUBERT, J.K., MANNES, A.J., KARAI, L.J., JENKINS, A.C., ZAWATSKI, L., ABU-ASAB, M., IADAROLA, M. Perineural Resiniferatoxin Selectively Inhibits Inflammatory Hyperalgesia. *Molecular Pain*, 43, p., 2008

NICOLI, S., PENNA, E., PADULA, C., COLOMBO, P., SANTI, P. New Transdermal Bioadhesive Film Containing Oxybutynin: In Vitro Permeation Across Rabbit Ear Skin *International Journal of Pharmaceutics* , 325 , p. 2–7, 2006.

PALMA, P.C.R., THIEL, M., RICCETTO, C.L.Z., DAMBROS, M., MIYAOKA, R., NETTO JR, N.R. Resiniferatoxin For Detrusor Instability Refractory To Anticholinergics. *Brazilian Journal of Urology*, 30 (1), p.53-58, January - February, 2004.

SAITOH, C., CHANCELLOR, M.B., DE GROAT W.C., YOSHIMURA, N. Effects of Intravesical Instillation of Resiniferatoxin on Bladder Function and Nociceptive Behavior in Freely Moving, Conscious Rats . *The Journal of Urology*, 179, p. 359-364, January 2008.

SILVA, C., RIO, M.E., CRUZ, F. Desensitization Of Bladder Sensory Fibers By Intravesical Resiniferatoxin, A Capsaicin Analog: Long-Term Results For The Treatment Of Detrusor Hyperreflexia. In: *Congress of the European Society for Urological Research nº 15*, 38 (4), p. 444-452, Istanbul , Turquie , 2000.

SILVA C, RIBEIRO MJ, CRUZ F. The Effect Of Intravesical Resiniferatoxin In Patients With Idiopathic Detrusor Instability Suggests That Involuntary Detrusor Contractions Are Triggered By C-Fiber Input. *The Journal of Urology*, 168, p. 575-579, 2002.

SILVA C, AVELINO A, SOUTO-MOURA C, CRUZ F. A Light- And Electronmicroscopic Histopathological Study Of Human Bladder Mucosa After Intravesical Resiniferatoxin Application. *British Journal of Urology International* , 88(4): p.355–360, 2001.

SZALLASI, A. e BLUMBERG, P.M. Vanilloid Receptors: New Insights Enhance Potential As A Therapeutic Target. *Pain*, 61, p 195, 1996.

TYAGI, P., CHANCELLOR, M.B., LI, Z., GROAT, W.C., YOSHIMURA, N., FRASER, M.O., HUANG, L. Urodynamic and Immunohistochemical Evaluation Of Intravesical Capsaicin Delivery Using Thermosensitive Hydrogel And Liposomes. *The Journal of Urology*,171, p.483-489, January 2004.

WACHTER, S., WYNDAELE, J.J. Intravesical Oxybutynin: A Local Anesthetic Effect On Bladder C Afferents *The Journal of Urology*,169, p.1892–1895, May 2003.

YOKOYAMA O., ISHIURA, Y.,NAKAMURA, Y.,OHKAWA M. Urodynamic Effects of Intravesical Oxybutynin Chloride in Conscious Rats. *The Journal of Urology*, 155 (2), p. 768-771, 1996.

**CAPÍTULO 3 - ALTERAÇÕES PRODUZIDAS NA BEXIGA DE RATAS POR
CAPSAICINA EXTRAÍDA DE *CAPSICUM FRUTESCENS* EM SISTEMAS
LIPOSSOMAIS.**

ALTERAÇÕES PRODUZIDAS NA BEXIGA DE RATAS POR CAPSAICINA EXTRAÍDA DE *CAPSICUM FRUTESCENS* EM SISTEMAS LIPOSSOMAIS

RESUMO

A capsaicina é um fármaco extraído da pimenta *Capsicum frutescens*, atualmente utilizada no tratamento da incontinência urinária por administração intravesical. Este fármaco provoca irritação e edema local devido às suas características irritantes e por ser veiculado em soluções alcoólicas. A incorporação deste fármaco em lipossomas pode diminuir a irritação local e melhorar suas características de liberação. O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise preliminar do efeito dos lipossomas contendo capsaicina em urotélio de ratas, na concentração de 3 mM. A capsaicina foi extraída da pimenta utilizando acetonitrila, e o extrato submetido à CLAE para quantificação do fármaco. O lipossoma foi obtido utilizando extrato seco e fosfolípido na proporção de 1:10. A caracterização do lipossoma pela determinação do potencial zeta, índice de polidispersividade e tamanho de partícula. Para o ensaio *in vivo*, ratas Wistar foram submetidas a instilação das formulações contendo lipossomas, capsaicina, lipossomas associados a capsaicina e o controle com solução salina; após 24 horas foi realizada a avaliação histomorfológica do tecido vesical. O tamanho das vesículas ficou entre 68 e 105 nm, com índice de polidispersividade menor que 0,2 e potencial zeta foi em torno de -30 mV. Os resultados indicam que as formulações apresentaram estabilidade após 14 dias do preparo. O estudo histológico das bexigas do grupo com capsaicina revelou uma reação inflamatória intensa em quase todas as camadas da bexiga, e destruição de parte do epitélio. O grupo com lipossomas e capsaicina mostrou reação inflamatória leve e áreas de hiperemia sem maiores danos à bexiga. Verificou-se que as formulações lipossomais mantiveram-se estáveis durante o período estudado e a presença dos lipossomas foi capaz de proteger a bexiga da ação irritativa da capsaicina.

Palavras-chave: capsaicina, lipossoma, incontinência urinária.

RAT BLADDER ALTERATIONS OF CAPSAICIN EXTRACTED FROM *CAPSICUM FRUTESCENS* IN LIPOSOMAL SYSTEMS

ABSTRACT

Capsaicin is a drug extracted from the pepper *Capsicum frutescens*, nowadays used as treatment option in urinary incontinence for intravesical administration. This drug causes irritation and local edema due to its irritant characteristics and due the need to be inserted in alcoholic solutions. The drug incorporation in liposomes can decrease the local irritation and improve its characteristics of delivery. The objective of this work was the preliminar analysis of alterations produced by liposomes containing capsaicin in rat bladder at a 3 mM. The capsaicin was extracted from the pepper using acetonitrile, and the extract was submitted to HPLC for drug quantification. Liposomes were obtained using dry extract and phospholipids at the proportion 1:10. Liposome characterization was carried out by determination of pH, refractions index, surface tension, zeta potential and size of vesicles. For *in vivo* assay, Wistar rats were submitted to intravesical instillation of liposome; capsaicin and lipossomes with capsaicin formulations. Saline instillation was used in control group. After 24hours, bladders were removed and the histological analysis performed. The vesicle size ranged from 68 to 105 nM with polidispersivity index smaller than 0.2 and zeta potential around -30 mV. Liposome formulations maintained stability during the study. Histological analysis of capsaicin group showed intense inflammatory reaction in almost all bladder layers and ulcer formation. Liposome group with capsaicin showed smooth inflammatory reaction and hiperemia. Liposome system was capable of protecting the bladder against capsaicin irritative action.

Keywords: capsaicin, liposomes, urinary incontinence

3.1. INTRODUÇÃO

A capsaicina é responsável pelo sabor pungente das pimentas, provocado inicialmente pela excitação dos receptores vanilóides ativando os terminais periféricos causando sintomas irritativos (FUJIMOTO *et al.*, 2005; BARBERO *et al.*, 2008), sendo muito utilizada no tratamento da incontinência urinária. Esta doença consiste em uma condição onde existe perda involuntária da urina e acomete geralmente mulheres no climatério (GUARISI *et al.*, 2001; SILVA e SANTOS, 2005; GARCÌA *et al.*, 2005).

O tratamento da incontinência urinária utilizando capsaicina é realizado por administração intravesical com resultados efetivos, porém com irritação e edema local. Além disso, este fármaco possui características apolares o que o torna pouco solúvel em solventes com compatibilidade biológica, tais como tampões e salina. Segundo TYAGI *et al.* (2004) este fármaco é dissolvido em etanol, veículo que também tem potencial irritante, portanto havendo a necessidade de desenvolver formulações que possam minimizar os efeitos irritantes do fármaco e apresentar efetividade.

Desta forma, faz-se necessária a utilização de estratégias para a veiculação da capsaicina, diminuindo os efeitos adversos produzidos pelo mesmo e facilitando a sua incorporação na formulação pretendida. Os lipossomas tem sido muito utilizados como veículo por terem capacidade de encapsular substâncias com diferentes polaridades, serem biodegradáveis e biocompatíveis (GIANNANTONI *et al.*, 2006; CENTIS E VERMETTE, 2008; SALVATI, *et al.*, 2007).

Lipossomas são vesículas esféricas formadas de uma dupla camada lipídica e tem sido utilizado em aplicações analíticas, terapêuticas e pesquisa, inclusive com incorporação da capsaicina (MANOJLOVIC *et al.*, 2008; GIANNANTONI *et al.*, 2006; CENTIS e VERMETTE, 2008; SALVATI *et al.*, 2007).

O objetivo do presente trabalho foi extrair a capsaicina e diidrocapsaicina da *Capsicum frutescens*, obter lipossomas contendo estas substâncias e avaliar o potencial protetor do urotélio destes lipossomas em modelo animal.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL:

A pimenta fresca da espécie *Capsicum frutescens* foi adquirida no Mercado da cidade de Aracaju/SE. Para preparação dos lipossomas foi utilizado fosfolípido da Nanosolv (fosfatidilcolina 75% /Lipoid GMBH/ Lote 776095-1/ Gerbras).

MÉTODOS:

3.2.1 Secagem da planta e obtenção do extrato

A pimenta foi seccionada e foram retiradas as sementes e a placenta. Estas foram desidratadas em estufa a 55°C por 24-30 horas. Após a desidratação, o material foi triturado e peneirado em tamis de 60 mesh.

O pó de pimenta foi pesado e inserido em tubos de ensaio na proporção de 0,3 g de pimenta para 10 mL de acetonitrila. Os tubos de ensaio foram submetidos a ondas de ultra-som durante 60 minutos. Após a extração, o material foi filtrado e o solvente evaporado.

3.2.2 Avaliação da extração por CLAE

A quantificação dos capsainóides foi realizada segundo KARNKA *et al.* (2002), conforme descrito a seguir:

Clean-up:

Uma pré-coluna C-8 foi condicionada com 0,5 mL de água milli-q, posteriormente com 0,5 mL de metanol, seguido de 0,5 mL de acetonitrila. A amostra (0,5 mL) foi diluída na pré-coluna condicionada e lavada por três vezes consecutivas com acetonitrila (0,5 mL). As frações foram reunidas e filtradas em membrana millipore de 0,45 µm, diretamente em vials. A amostra obtida foi analisada em CLAE com volume de injeção de 20 µL.

A cromatografia foi realizada utilizando uma coluna C-8. Foram injetados 20 µL de amostra e eluídos utilizando acetonitrila como fase móvel.

3.2.3. Obtenção do lipossoma

Uma solução de capsaicina foi obtida na concentração de $4,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ em etanol absoluto. Os lipossomas foram preparados homogeneizando-se o fosfolipídio em 10 mL da solução de capsaicina, ficando uma proporção molar de 1:10 (fármaco:fosfolipídio). As dispersões foram submetidas à agitação mecânica até sua total homogeneização. O solvente foi eliminado em rotaevaporador até formar uma película na superfície do recipiente (AVELINO E CRUZ, 2000; FRÉZARD E SCHETTINI, 2005). Este filme foi redissolvido utilizando 50 mL de salina. A reconstituição gerou uma dispersão de cor branca que foi passada no filtro de nylon Milipore® de $0,22 \mu\text{m}$ para limitar o tamanho das vesículas formadas (processo de extrusão). A dispersão final foi acondicionada a 4°C até o momento das análises. A concentração final de capsaicina foi de 3 mM. Foram preparados também lipossomas sem capsaicina da mesma maneira que descrito anteriormente.

3.2.4. Caracterização do lipossoma

Determinação do potencial zeta

O potencial zeta (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK) das amostras de lipossomas com e sem capsaicina foi determinado através da medição da mobilidade eletroforética das partículas carregadas a 25°C . As amostras foram diluídas na proporção de 1:10, sendo realizado o procedimento com 24 horas após a preparação do lipossoma, com 7 dias e 14 dias.

Avaliação do tamanho de partícula e índice de polidispersividade.

O tamanho dos lipossomas foi obtida através da técnica de difusão de luz dinâmica (Dynamic Light Scattering - DLS), utilizando um sistema computadorizado Malvern Zetasizer Nanoseries (Nano-ZS - Malvern, UK), a amostra foi diluída na proporção de 1:10 em água destilada, com comprimento de onda de 633 nm e temperatura de 25°C . Além do tamanho das vesículas, o índice de polidispersividade foi determinado pelo equipamento.

3.2.5. Ensaio biológico

Os animais utilizados foram ratas Wistar, com idade de dois meses, pesando 190 ± 30 g. Foram utilizados 6 animais em cada subgrupo, os quais foram submetidos aos

procedimentos para administração intravesical das formulações e sacrificados após 24h. Os grupos salina e lipossoma foram utilizados como controles negativos.

Os animais foram divididos em 4 grupos para análise após 24 horas da instilação intravesical: grupo controle negativo com solução salina (SAL); grupo contendo lipossomas (LIP); grupo contendo capsaicina (CPS) e grupo contendo capsaicina + lipossomas (CPSLIP).

As ratas foram mantidas em gaiolas em grupos de seis animais identificados e separados por grupo experimental com acesso a ração padrão Labina® e água *ad libitum*. As recomendações da Lei Nacional nº 6.638 de 5 de novembro de 1979, para manuseio de animais foram respeitadas, e o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tiradentes através do Parecer Consubstanciado com número de protocolo 060208.

As ratas foram submetidas à anestesia com ketamina na dose de 70 mg.kg⁻¹ e midazolan na dose de 4 mg.kg⁻¹, ambas sendo administradas pela via subcutânea, segundo o protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG para anestesia em animais de pequeno porte. Em seguida, foi administrado antibiótico ceftriaxone intramuscular na dose de 57 mg.kg⁻¹ para a prevenção de cistite pela manipulação do trato genito-urinário. Após 30 minutos foi realizada a limpeza do meato uretral com povidine tópico, e então se realizou a cateterização vesical, utilizando cateter intra-venoso (Jelco) nº22. O cateter foi totalmente introduzido para alcançar a bexiga do animal, posicionado adequadamente para o preenchimento da bexiga com as formulações anteriormente descritas.

As ratas foram sacrificadas por deslocamento cervical. O procedimento de dissecação foi guiado com auxílio de cateterismo vesical. A laparotomia mediana baixa foi realizada, seguida de abertura da parede abdominal por planos e afastamento dos músculos abdominais, exposição da bexiga e ressecção da mesma na sua totalidade.

Os animais foram sacrificados após 24 horas da instilação intravesical das diferentes formulações.

As peças cirúrgicas excisadas foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10% por um período mínimo de 24 h. Após fixação as amostras foram desidratadas com etanol, diafanizadas com xileno e banhadas em parafina. A última etapa foi conduzida por inclusão na parafina. Cortes de aproximadamente 3 µm de espessura foram realizados e os espécimes, processados de acordo com diferentes protocolos de histoquímica (hematoxilina-eosina e picrossírius).

Para análise da morfologia e disposição das fibras colágenas depositadas na parede da bexiga, secções histológicas foram submetidas previamente ao método de coloração

histoquímica do picrossírius e analisadas sob microscopia óptica com luz polarizada para análise descritiva da fibroplasia detendo-se na identificação do colágeno.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Extração e quantificação dos marcadores

A determinação do teor dos ativos no extrato é imprescindível para o desenvolvimento das formulações já que os valores de rendimento não garantem sua presença no extrato. Desta forma, a quantificação dos ativos torna-se determinante para a eficiência biológica do extrato. A concentração de capsaicina e diidrocapsaicina nos extratos foi de 1,42 mg/g e 0,57 mg/g respectivamente. Estas concentrações de capsainóides estão dentro dos valores encontrados por KARNKA *et al.*, (2002), grupo que desenvolveu o método de quantificação. Estes autores encontram entre 0,2-6,9 mg/g de capsaicina e 0,17-5,10 mg/g de diidrocapsaicina em uma outra variedade de pimenta (*Chili pods*).

Os cromatogramas referentes à amostra extraída (A) e aos padrões (B) estão apresentados na figura 18. No cromatograma da amostra pode-se observar que a etapa de clean up foi efetiva, eliminando possíveis interferentes no cromatograma.

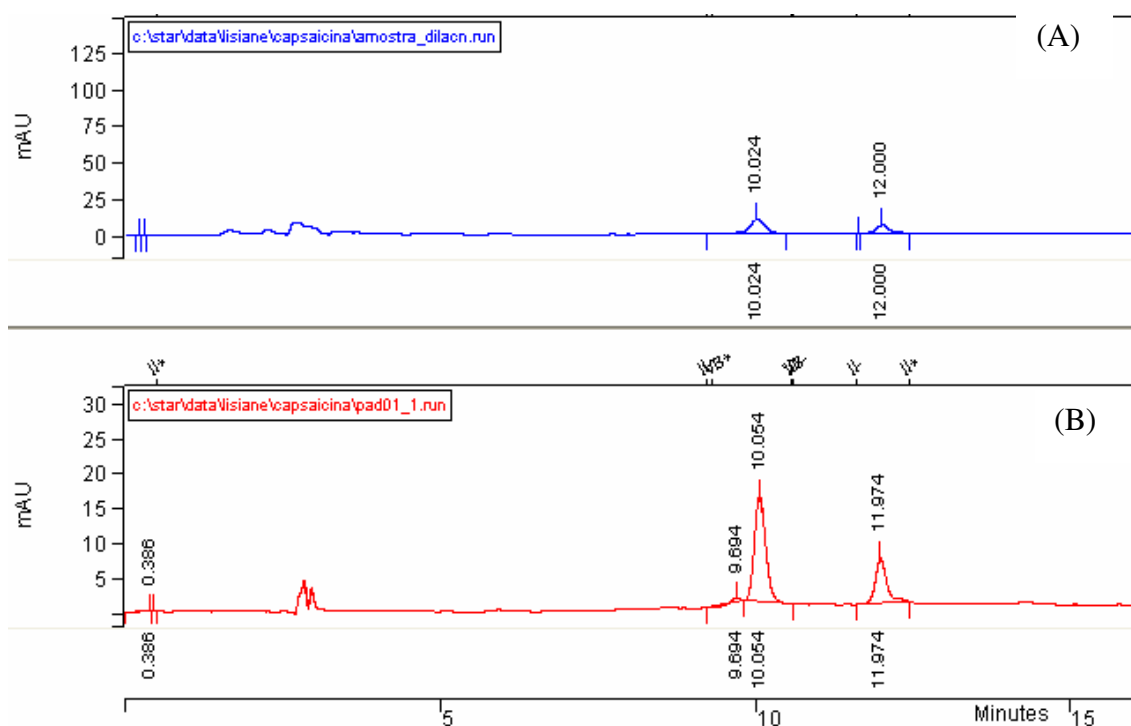


Figura 18. Cromatograma do extrato contendo capsaicina e diidrocapsaicina (A) e dos padrões de capsaicina e diidrocapsaicina (B).

3.3.2. Caracterização dos lipossomas

Os fosfolipídios (compostos anfifílicos contendo duas cadeias de hidrocarbonetos longas) quando colocados em solução aquosa se hidratam e formam espontaneamente vesículas com dupla camada de lipídios. As características físicas dos lipossomas dependem do pH, da força iônica e da presença de cátions divalentes (GENNARO, 2000; FERREIRA *et al.*, 2005).

As interações dos fármacos com a bicamada lipídica dependem das propriedades do próprio fármaco. A polaridade do mesmo indica a sua localização na membrana lipídica. A capsaicina é um fármaco de polaridade intermediária, pois é extraído com solventes apolares como a acetonitrila, porém apresenta-se parcialmente solúvel em solventes polares (etanol 30%). Vesículas contendo fármacos com baixa solubilidade em água são preparadas dissolvendo o princípio ativo na fase lipofílica. Quando o fármaco é hidrofílico, o mesmo é dissolvido na solução aquosa de hidratação do filme lipídico (MAESTRELLI *et al.*, 2005). Neste caso, optou-se em dissolver a capsaicina no fosfolipídio em etanol para garantir sua total solubilização. Desta forma, é provável que a capsaicina esteja localizada na interface da matriz lipídica, tanto internamente como externamente caso a molécula não tenha sido totalmente vesiculada.

Os sistemas lipossomais são dispersões coloidais e por isso comportam-se físico-quimicamente como partículas parcialmente solúveis. Os lipossomas podem sofrer fusão, agregação ou se romper durante o período de estocagem (GENNARO, 2000).

Um dos motivos da instabilidade do sistema é o potencial elétrico em sua superfície. Vesículas com uma camada elétrica maior apresentam um maior potencial zeta. Esta camada dificulta a aproximação de uma vesícula com a outra, impedindo a fusão ou agregação das mesmas. A medida que potencial zeta se afasta de zero, mais estável será a dispersão, pois as partículas tendem a se repelir umas as outras.

A formulação lipossomal sem o fármaco apresentou diminuição do potencial zeta (Figura 19) ao final de 7 dias (-40 mV). Esta diminuição demonstrou uma estabilização do sistema, porém após 14 dias, o potencial volta a subir (-34 mV).

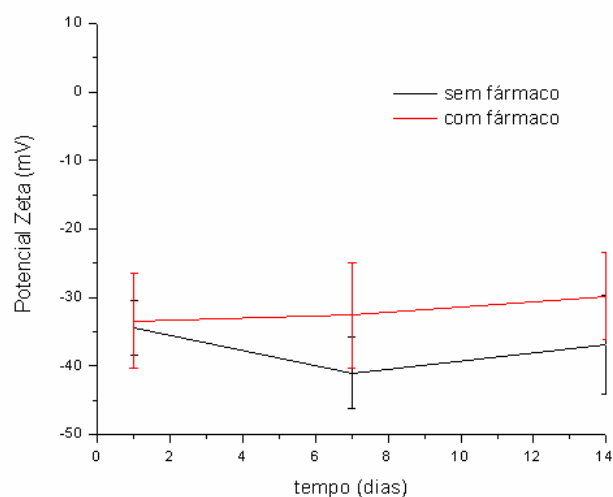


Figura 19. Potencial zeta dos lipossomas

Problemas de estabilidade nas formulações coloidais são geralmente esperados nos valores de pH menores que 4,0 (alta concentração de cargas positivas) ou maiores que 7,5 (concentração de cargas negativas aumentada). O limite de potencial zeta para a instabilidade de sistemas coloidais fica entre -30 mV e +30 mV.

O potencial zeta das formulações contendo ou não o fármaco permaneceu menor que -30 mV após 14 dias de experimento. Apesar dos valores obtidos encontrarem-se próximos ao limiar da estabilidade, foi observado que permaneceu constante. Segundo CENTES E VERMETTE (2008) a floculação ocorre entre 5 e 15 mV.

A medida do tamanho das vesículas é outro parâmetro importante para a observação da estabilidade do sistema coloidal.

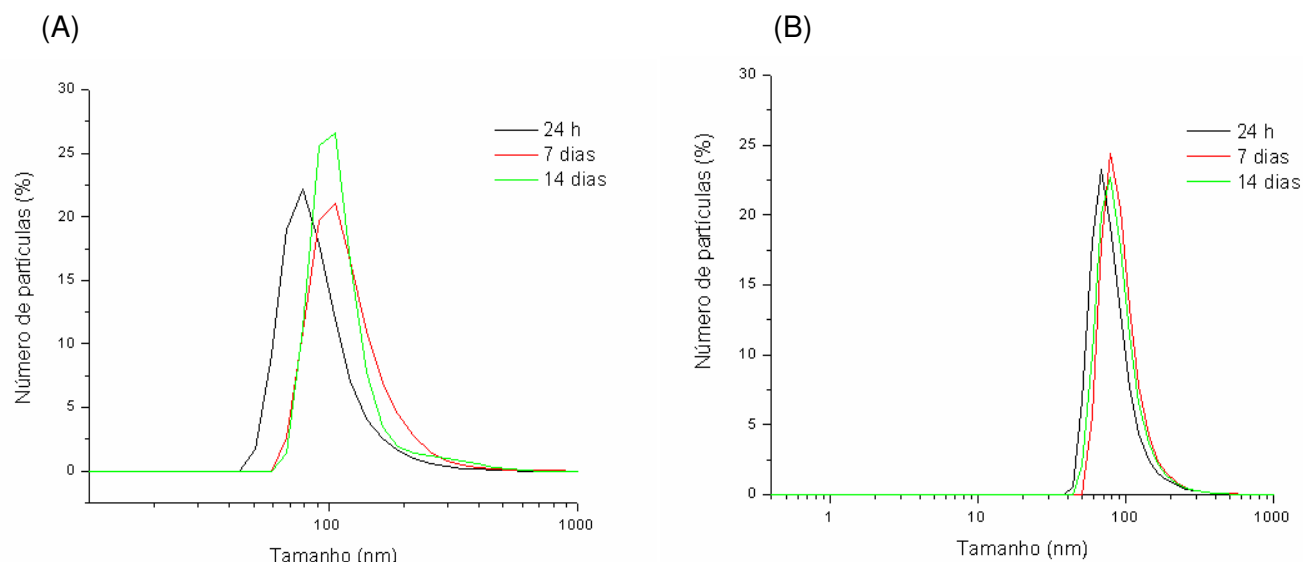


Figura 20: Tamanho das vesículas sem (A) e com (B) capsaicina nos tempos 1, 7 e 14 dias.

O tamanho das vesículas após 14 dias de preparo não variou, excetuando as vesículas sem capsaicina que após uma semana apresentaram ligeiro aumento. O tamanho médio das vesículas foi inferior a 100 nm, sendo que as formulações contendo capsaicina apresentaram tamanho menor (68 a 78 nm) do que as vesículas sem o fármaco (78 a 106 nm) (Figura 20). O diâmetro médio encontrado nas vesículas estudadas está de acordo com as encontradas na literatura (CENTES E VERMETTE, 2008; SONG E KIM, 2006).

O índice de polidispersividade (IP) determina o nível de homogeneidade dos tamanhos das vesículas. Valores de $IP < 0,2$ indicam uma homogeneidade das vesículas ao passo que $IP > 0,3$ indicam uma heterogeneidade da partícula (CENTES E VERMETTE, 2008; SONG E KIM, 2006). Os valores de IP foram da ordem de 0,2 para as formulações com e sem capsaicina, demonstrando homogeneidade do tamanho das vesículas no sistema lipossomal. Foi observado também que após 14 dias o índice permaneceu constante (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de polidispersividade das formulações lipossomais

Tempo (dias)	Índice de polidispersividade	
	Lipossoma sem capsaicina	Lipossoma com capsaicina
1	0,279	0,273
7	0,257	0,273
14	0,261	0,276

3.3.3 Avaliação Histológica

Em relação a análise histológica dos tecidos, no grupo LIP, verifica-se apenas áreas de hiperemia discreta, sem infiltrado inflamatório, com aspecto muito semelhante ao grupo SAL, desprovido de alterações histológicas (Figura 21, LIP 1 e 2). No grupo CPS, após 24 horas, observa-se uma reação inflamatória intensa, com áreas de edema, ulceração e hemorragia (Figura 21, CPS A e B). O infiltrado inflamatório atinge a camada muscular na sua totalidade até a superfície urotelial. Evidenciou-se a presença de neutrófilos, linfócitos e plasmócitos. Na coloração picrossírius foi verificado a predominância de fibras do tipo III, lise do colágeno com aumento do espaço interfibrilar (Figura 22).

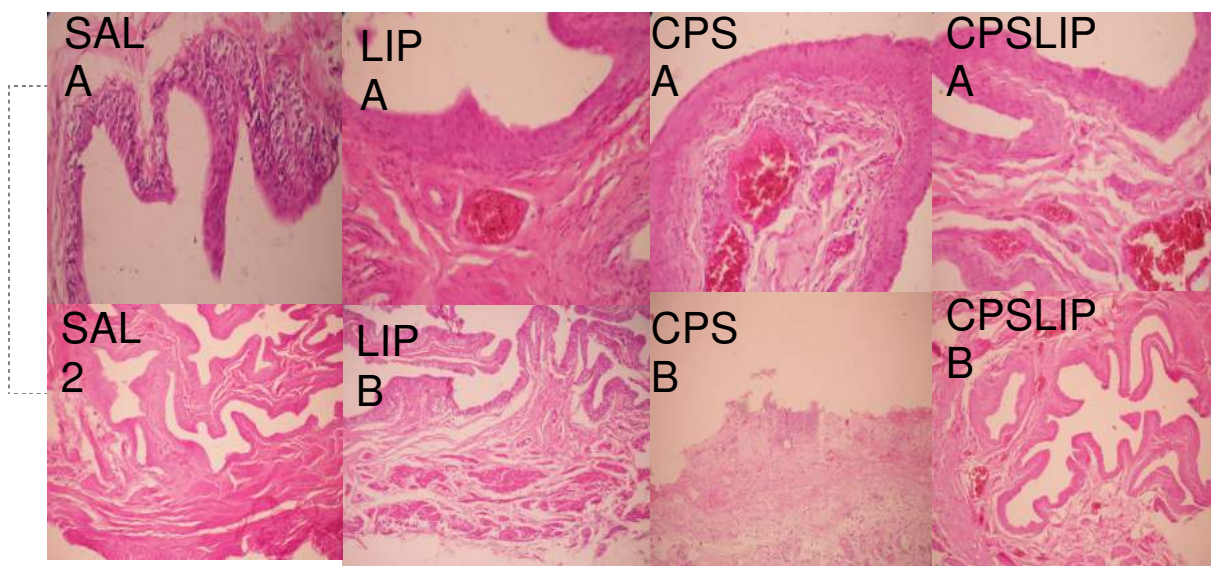


Figura 21. Secções histológicas das bexigas após 24 horas da instilação das formulações com a coloração Hematoxilina/eosina aumento 100X (A) e aumento 400X (B) dos grupos salina (SAL), lipossoma (LIP), capsaicina (CPS) e capsaicina em lipossomas (LIPCPS).

No grupo com CPSLIP, foi observado edema e hiperemia, não se evidenciando áreas de ulceração ou infiltrado inflamatório. Na coloração picrossírius, o aspecto do tecido foi semelhante ao grupo controle.

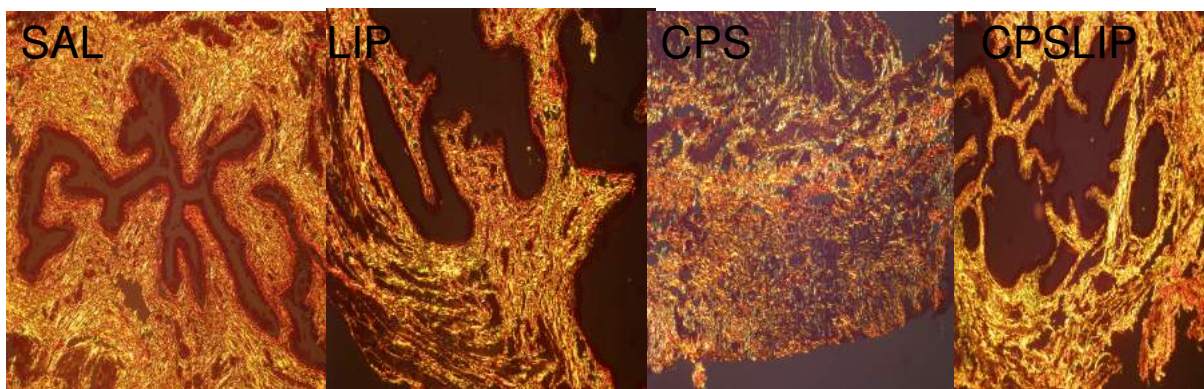


Figura 22. Secções histológicas das bexigas após 24 horas da instilação das formulações com a coloração picrossírius aumento 100X dos grupos salina (SAL), lipossoma (LIP), capsaicina (CPS) e capsaicina em lipossomas (LIPCPS).

Foi verificada uma agressão tecidual importante no grupo CPS, com presença maciça de neutrófilos, linfócitos e plasmócitos. A lesão ocorreu em quase todas as camadas, consonante com o trabalho de SHUPP BYRNE *et al.*, (1998), onde também foi utilizada capsaicina intravesical em solução etanólica a 30%, na concentração 1 mM. Neste estudo, foi feita a avaliação em 30 minutos, 24 horas, 72 horas e 7 dias. A recuperação epitelial completa foi verificada após 7 dias, entretanto, não houve a formação de áreas ulceradas. Isto se deu provavelmente pela dose menor de capsaicina utilizada. No trabalho de VERIT *et al.* (2002), foi realizada instilação intravesical de capsaicina em ratos na dose de 2, 4 e 40 mM, durante 30 minutos, seguida de lavagem da cavidade vesical após os dias 0,2,5,7,e 10. No 10º dia as bexigas foram extraídas e o exame histológico demonstrou adelgaçamento do epitélio, edema, infiltrado inflamatório agudo, hiperemia em todos os grupos, sem porém, encontrar áreas de ulceração. No grupo com 40 mM, foi encontrado infiltrado eosinofílico em apenas um animal, sugerindo uma possível reação alérgica. Neste estudo a análise histológica se deu apenas no 10º dia, além de ter sido realizada lavagem vesical após 30 minutos de cada instilação, retirando o contato da capsaicina com o urotélio.

O grupo CPSLIP na coloração HE mostrou uma reação mais modesta (Figura 21), compreendendo um infiltrado inflamatório crônico residual e hiperemia moderada. Não foi visualizado áreas de edema ou hemorragia, apresentando epitélio íntegro. Na coloração picrossírius, o colágeno apresentou-se semelhante ao controle negativo.

3.4 CONCLUSÃO

A extração da capsaicina e diidrocapsaicina a partir da *Capsicum frutescens* foi eficiente. Os sistemas lipossomais propostos apresentaram estabilidade após 14 dias de

preparo com tamanho médio de vesículas menores que 100 nm. A associação da capsaicina aos lipossomas foi capaz de reduzir a agressão tecidual, com dano mínimo após 24 horas da instilação.

3.5 REFERÊNCIAS

AVELINO, A., CRUZ, F. Peptide Immunoreactivity And Ultrastructure Of Rat Urinary Bladder Nerve Fibers After Topical Desensitization By Capsaicin Or Resiniferatoxin. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 86, p. 37-46, 2000.

BARBERO, G.F., LIAZID, A., PALMA, M., BARROSO, C.G., Fast Determination Of Capsaicinoids From Peppers By High-Performance Liquid Chromatography Using A Reversed Phase Monolithic Column. *Food Chemistry*, 107, p. 1276-1282, 2008.

BARCHINI, H.P., LEEUWEN, V., LYKLEMA, J. Eletrodynamics Of Liposome Dispersions; *Langmuir*, 16, p. 8238-8247, 2000.

CENTIS, V., VERMETTE, P. Physico-Chemical Properties And Cytotoxicity Assessment Of PEG-Modified Liposomes Containg Human Hemoglobin. *Biointerfaces*, 65, p. 239-246, 2008.

FERREIRA, H., LÚCIO, M., SIQUET, C., REIS, S. Utilização de Modelos Membranares na Avaliação da Atividade de Fármacos. *Química*, 99, p. 39-50, 2005.

FRÉZARD, F., SCHETTINI, D.A., Liposomes: Physicochemical And Pharmacological Properties, Applications In Antimony-Based Chemotherapy. *Química Nova*, 28(3), p. 511-518, 2005.

FUJIMOTO, S., MORI, M., TSUSHIMA, H., KUNIMATSU, M. Capsaicin-Induced, Capsazepine-Insensitive Relaxation Of The Guinea- Pig Ileum. *European Journal of Pharmacology*, 530, p. 144-151, 2006.

GARCÍA, C.M., GUZMÁN, F., MORA, E., BUITRAGO G., REYES, L.E., GÓMEZ, A., Capsaicina Intravesical: Una Alternativa En Pacientes Con Vejiga Hiperactiva Idiopática De Difícil Manejo. *Revista Medica*, 13, p. 70-74, 2005.

GENNARO, A. R., REMINGTON. **A Ciência E A Prática Da Farmácia**; 20 ed., p. 950-952: Ed. Guanabara Koogan, 2000.

GIANNANTONI, A., STASI, S.M.D., CHANCELLOR, M.B., CONSTANTINI, E., PORENA, M. New Frontiers In Intravesical Therapies And Drug Delivery. *European Urology*, v. 50, p. 1183-1193, 2006.

GUARISI, T., NETO, A.M.P., OSIS, M.J., PEDRO, A.O., PAIVA, L.H.C. Incontinência Urinária Entre Mulheres Climatéricas Brasileiras: Inquérito Domiciliar. *Revista Brasileira de Saúde Pública*, 35, p. 428-435, 2001.

KARNKA, R., RAYANAKORN. M., WATANESK, S., VANEESORN, Y. , Optimization Of High-Perfomrface Liquid Chromatographic Parameters For The Determination Of Capsaicinoide Compounds Using The Simplex Method. *Analytical Sciences*, 18, p. 661-665, 2002.

MAESTRELLI, F., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.L., RABASCO, A.M., MOURA, P. Preparation And Characterisation Of Liposomes Encapsulating Ketoprofen-Cyclodextrin Complexes For Transdermal Drug Delivery. *International Journal Of Farmaceutics*, 298, p. 55-67, 2005.

MANOJLOVIC, V., WINKLER, K ., BUNJES, V., NEUB, A., SCHUBERT, R., BUGARSKI, B., LENEWEIT, G. Membrane Interactions Of Ternary Phospholipid/Cholesterol Bilayers And Encapsulation Efficiencies Of A RIP II Protein; *Colloids and Surfaces*, 64, p.284-296, 2008.

SALVATI, A., RISTORI, S., PIETRANGELI, D., OBERDISSE, J., CALAMI, L., MARTINI, G., RICCIARDI, G. Insertion Of Magnesiun(II)-Octacarboranyl(Hexylsulfanyl)Porphyrzine Into Liposomes: A Physico-Chemical Study. *Biophysical Chemistry*, 131, p. 43-51, 2007.

SILVA, A.P.M., SANTOS, V.L.C.G. Prevalência Da Incontinência Urinária Em Adultos E Idosos Hospitalizados. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 39, p. 36-45, 2005.

SHUPP-BYRNE, A., DAS, J., SEDOR, B., HUANG, D., RIVAS, H., FLOOD, W., DE GROAT, M., JORDAN, M., CHANCELLOR, P. Effect Of Intravesical Capsaicin And Vehicle On Bladder Integrity In Control And Spinal Cord Injured Rats . *The Journal of Urology*, 159(3), p. 1074 – 1078, 1998.

TYAGI, P., CHANCELLOR, M. B., LI, Z., GROAT, W.C.D., YOSHOMURA, N., FRASER, M. O., HUANG, L. Urodynamic and immunohistochemical evaluation of intravesical capsaicin delivery using thermosensitive hydrogel and liposomes; *The Journal Of Urology*, 171, p.483-489, 2004.

VERIT, A., ARSLAN, O., OZARDALI, Y., YENI, E., UNAL D. Topical Effects Of Intravesical Capsaicin On Rat Bladder. *Brazilian Journal of Urology*. 28 (2), p.154-158, March - April, 2002.

4. CONCLUSÃO GERAL

Após o desenvolvimento do presente trabalho, conclui-se que o uso de lipossomas promove uma proteção à bexiga diante da toxicidade de fármacos como a oxibutinina, resiniferatoxina e capsaicina, atenuando a lesão tecidual de forma significativa. Após 7 dias, vê-se a reconstituição epitelial em todos os grupos estudados, exceto no grupo com resiniferatoxina, que mostrou um dano tecidual maior, seguido pela oxibutinina, quando comparado aos demais grupos.

Após 60 dias, ainda existe reação inflamatória nas bexigas após a administração de fármacos com e sem lipossomas.

Os lipossomas administrados pela via intravesical continuam presentes na cavidade vesical após 60 dias da instilação inicial.

Os sistemas lipossomais mostraram-se estáveis *in vitro* durante o período estudado, mantendo o tamanho das gotículas menor que 100nm.

Diante dos resultados, tem-se a veiculação de fármacos pela via intravesical associados a lipossomas como uma segura opção ao tratamento da bexiga hiperativa.