



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NUCLEO DE PESQUISAS DE PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

RODRIGO LOPES GOMES GONÇALVES

**EFEITO PROTETOR DO α -FELANDRENO CONTRA O DANO VESICAL
INDUZIDO POR IFOSFAMIDA: POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO**

TERESINA

2018

RODRIGO LOPES GOMES GONÇALVES

**EFEITO DO α -FELANDRENO NO DANO VESICAL INDUZIDO POR
IFOSFAMIDA E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção de título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira

TERESINA

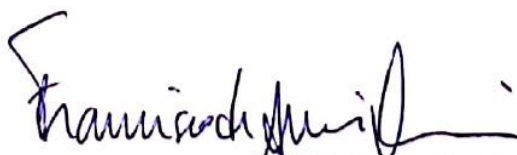
2018

RODRIGO LOPES GOMES GONÇALVES

**EFEITO DO α -FELANDRENO NO DANO VESICAL INDUZIDO POR IFOSFAMIDA
E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO**

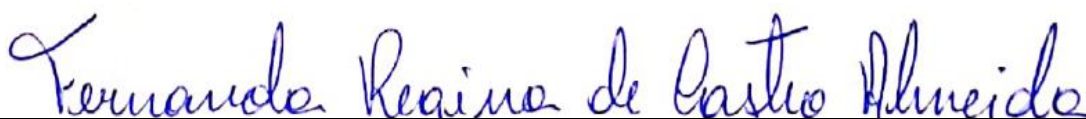
APROVADA EM: 23/10/2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira

(Orientador) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ



Prof^a. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

(Examinador Interno) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ



Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

(Examinador Externo) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCS
Serviço de Processamento
Técnico

G635e Gonçalves, Rodrigo Lopes Gomes.
 Efeito protetor do α -felandreno contra o dano vesical induzido por
ifosfamida : possíveis mecanismos de ação / Rodrigo Lopes Gomes
Gonçalves. -- Teresina, 2018.
 90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, 2018.

Orientação: Prof^o. Dr. Francisco de Assis Oliveira.

Bibliografia

1. Cistite Hemorrágica. 2. α -felandreno. 3. Quimioterapia antineoplásica.
4. Monoterpeno. I. Título.

CDD 615.1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Carla Maria de Carvalho Leite

COORDENADOR DO PROGRAMA

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter proporcionado aos meus pais João Carlos Bastos Gonçalves e Raimunda Lopes Gomes Gonçalves o desejo e a oportunidade de me proporcionar a melhor educação que culminou na realização do sonho de ser Farmacêutico e no seguimento do meu objetivo de ser Mestre. Agradeço a eles por todo amor, carinho e a base que tive para ser uma boa pessoa.

Agradeço também aos meus irmãos Raiamberson e Moisés por torcerem sempre pelo meu sucesso e por serem meu maior incentivo para realizar os meus objetivos.

Aos meus avós Maternos Josefa Vieira Lopes e Rodrigo Dias Gomes (*in memoriam*) por me terem sempre como o grande orgulho da família.

Aos meus tios, primos por sempre me darem forças para seguir diante das dificuldades que não foram poucas.

Aos meus amigos do Confarpi/Jofar que sempre estiveram comigo diante das minhas lutas e conquistas.

À minha segunda família, aquela que me adotou e divide comigo alegrias e tristezas, Ian Jhemes, Sâmia Nayara, Jorge Guilherme, Aline Serra, Allana Thayse, Suelem Furtado, Anna Erica Pinheiro, Rhuan, Waléria Barbosa, Susana Alves, Gutemberg Pinheiro, Higo José, Marina Moura, Fellipe Emmanuel, Andressa Mesquita, Caio Maia e Emanuel Fonteneles

Aos meus queridos alunos da Farmacognosia e da Farmacologia que foram fundamentais para o meu crescimento como professor e amigo.

Aos meus professores da graduação em especial Rianny Maria, Maria Dulce, Anna Erica Vale, Jeorgio Leão, Fernanda Cerqueira, Maria Queiroga, Ulisses Nogueira, Jeamile Bezerra, Ronaldo Costa, Tacyana Pires e Luciane Lima que contribuíram grandemente para a minha formação e plantaram no meu coração o desejo de ser professor.

Aos meus maiores exemplos Profissionais José Vilmore, Vivianne Amorim e Mayara Ladeira por sempre estarem comigo em todos os momentos, foram padrinhos, amigos e incentivadores durante toda esta caminhada.

Ao meu amigo Luiz Junior por me conceder a oportunidade de vivenciar a minha profissão mesmo sabendo do meu interesse futuro em abdicar do meu emprego para me dedicar ao mestrado.

Aos meus amigos de turma: Polyanna, Ana Rita, Simone, Izabela, Layane, Aline, Anna Karoline, Yara, Bryan, Ruan e Sávio por terem sido as melhores companhias ao longo dessa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira, pela orientação, conversas, conselhos, confiança, incentivo e principalmente por me mostrar sempre que eu sou capaz, os seus ensinamentos e puxões de orelha foram muito importantes para o meu amadurecimento. Espero sempre poder contar com a sua amizade.

À profa. Fernanda Regina pelo acolhimento, por me tratar sempre como um filho em seu laboratório, por me ouvir, aconselhar e por me repassar tantos ensinamentos.

Às professoras Rosimeire Ferreira, Rita de Cássia e Aldeídia Pereira o meu agradecimento pelos conselhos e pelo acolhimento. Ao professores: Amilton Raposo, Fernando Aécio, Elisangela Oliveira e Salete Brito, por todos os ensinamentos, paciência e amizade.

Aos amigos de laboratório Benedito Neto, Bruno Gomes, Diana Rezende, Antonio Filho, Lucas Solyano, Valmor Macêdo, Sara Raquel pela torcida, ajuda durante os experimentos e as conversas incentivadoras diante dos obstáculos.

Aos queridos amigos que eu fiz no NPPM em especial Everton, Cely, Rafael, Douglas, Juliana, Alessandra, Francilene, Michel, Nayra, Suylane, Flaviano, Marluce, Lorranya, Pedro, Henrique, Daniel, Layane Carneiro, Tereza e Laércio.

A todos os funcionários que compõem o Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí: Josy, Carlos, Dra. Adelline, Patricia, Gleyce, Kaline e Rosilda, agradeço a cada um de vocês por me ajudarem em muitos momentos e por sempre me proporcionarem alegria e muita descontração.

À Universidade Federal do Piauí, por me proporcionar estrutura para tamanha realização.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao CNPq, FAPEPI e PPSUS-Ministério da Saúde pelo fomento imprescindível para a realização desta pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará, através do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer –LAFICA, pelo treinamento concedido.

Ao Laboratório da Fisiologia da Inflamação e Desordem Gastrointestinal-LAFIDG pelo apoio concedido, a quem saúdo com muita gratidão Luan Kelves, Keolynne e Jand Rolim.

À Associação Piauiense de Combate ao Câncer-APCC (Hospital São Marcos) pela parceria na aquisição dos insumos necessários para a realização desta pesquisa.

Agradeço, enfim, a todos que estiveram presentes nesses dois anos de muito aprendizado.

Rodrigo Lopes Gomes Gonçalves

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

[...] Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.

Augusto Cury

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AE: Azul de Evans
ANOVA: Análise de Variância
AP-1: Proteína 1
CEUA: Comitê de Ética em Uso de Animais
CFA: Ciclofosfamida
CH: Cistite Hemorrágica
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CN: Controle Negativo
CP: Controle Positivo
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DTNB: 5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid])
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPM: Erro Padrão da Média
ERNS: Espécies reativas de nitrogênio
EROS: Espécies reativas de oxigênio
FDA: *Food and Drug Administration*
GSH: Glutathiona reduzida
H&E: Hematoxilina e Eosina
H₃PO₄: Ácido Fosfórico
HOONO : Ácido Peroxinitroso
HTAB: Brometo de hexadecitrimetilamônio
i.p: Intraperitoneal
IFO: Ifosfamida
IL: Interleucina
IL-1 β : Interleucina 1 – beta
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
KCl: Cloreto de Potássio
MDA: Malondialdeído
MESNA: 2-mercaptotoetano-sulfonato de sódio
MPO: Mieloperoxidase
NF-kB: Fator nuclear kappa B

NO :Óxido Nítrico

NO₂: Nitrito

NO₃: Nitrato

NOx: Metabólitos do óxido nítrico

O₂⁻: Ânion Superóxido

OE: Óleo Essencial

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONO₂⁻ Peroxinitrito

PUV: Peso úmido vesical

R²: Coeficiente de Correlação

rpm: Rotações por minuto

SOD: Superóxido Dismutase

TBAR's: Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

TCA: ÁcidoTricloroacético

TNF – α: Fator de Necrose Tumoral Alfa

TPA- 2-Otetradecanoilforbol- 13-acetato

α-Fel: Alfa felandreno

(g): aceleração de gravidade

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Estruturas químicas da CFA (A) e IFO (B)	24
Figura 2: Metabolismo da Ifosfamida e efeitos adversos.	25
Figura 3: Mecanismo farmacológico da acroleína no aumento da produção de mediadores inflamatórios.	26
Figura 4: interferência do MESNA no metabólito urotóxico das oxazafosforinas (acroleína).	28
Figura 5: Representação molecular do monoterpene α -felandreno (2-metil-5-propano-2-ciclohexano-1,3-dieno).	31
Figura 6: Esquema de indução da cistite hemorrágica em camundongos	36
Figura 7: Curva de calibração para doseamento de hemoglobina por espectrofotometria em 450nm.	40
Figura 8: Curva de calibração para doseamento do Azul de Evans por espectrofotometria em 550nm.	41
Figura 9: Efeito do α -felandreno sobre o peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	46
Figura 10: Efeitos do α -felandreno nos parâmetros macroscópicos da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	48
Tabela 01: Avaliação histopatológica das bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e tratados com α -felandreno	49
Figura 11: Análises Histopatológicas dos grupos experimentais.	51
Figura 12: Efeito do α -felandreno nos níveis de hemoglobina vesical dos animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	53
Figura 13: Efeito do α -felandreno no extravasamento vascular do Azul de Evans (AE) em bexigas com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	54
Figura 14: Efeito do α -felandreno sobre os níveis de MPO no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	55
Figura 15: Efeito do α -felandreno sobre os níveis de MDA no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	56
Figura 16: Efeito do α -felandreno sobre os níveis de nitrato/nitrito (NO_x) no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	57

Figura 17: Efeito do α -felandreno sobre os níveis de superóxido dismutase (SOD) no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	58
Figura 18: Efeito do α -felandreno sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	59
Figura 19: Efeito do α -felandreno sobre os níveis de IL-1 β no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	60
Figura 20: Efeito do α -felandreno sobre os níveis da interleucina TNF- α no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	61
Figura 21: Resumo das atividades do α -felandreno na prevenção da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	71

RESUMO

RESUMO

A Cistite hemorrágica é o principal efeito adverso dose-limitante do uso clínico das oxazafosforinas, incluindo a Ifosfamida. Tal evento ocorre através da formação da acroleína, metabólito responsável pela urotoxicidade desses fármacos, resultando em aumento do estresse oxidativo e produção de citocinas pró-inflamatórias, que culminam na degradação do tecido vesical. Diante desta realidade, identifica-se uma necessidade que abre margem para o desenvolvimento de um citoprotetor eficaz que possa vir a ser utilizado como adjuvante na terapia oncológica com oxazafosforinas. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi analisar o efeito protetor do α -felandreno frente a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Esta pesquisa partiu das observações que o α -felandreno possui efeito antiedematogênico e anti-inflamatório, o que pressupõe que este monoterpene é potencialmente útil na pesquisa de novos protótipos que possam combater reações inflamatórias agudas. O modelo de cistite hemorrágica foi induzido por dose única do antineoplásico ifosfamida, precedido de pré-tratamento com salina e α -felandreno (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg, i.p.) em *Mus musculus* (CEUA 279/2016). Para analisar a redução do dano foi avaliado o peso úmido vesical (PUV), teor de hemoglobina e o extravasamento do corante azul de evans na matriz vesical. Para caracterizar o envolvimento da migração neutrofílica, peroxidação lipídica e dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos endógenos foram avaliados os marcadores teciduais Mieloperoxidase (MPO), Malondialdeído (MDA), Nitrito/Nitrato (NOx), Superóxido dismutase (SOD) e Glutathiona Reduzida (GSH), respectivamente. As citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) foram dosadas por técnica de imunoenensaio ELISA. Os dados de inibição foram calculados por normalização em relação ao controle negativo (CN) e significâncias calculadas considerando $p < 0,05$. Os resultados mostram que o pré-tratamento com o α -felandreno (12,5 e 25 mg/kg) restringiu significativamente em $31,59 \pm 0,8$ e $29,90 \pm 0,3$ %, respectivamente, o PUV em comparação ao CN. As análises espectrofotométricas mostraram que o pré-tratamento atenuou de forma significativa em $65,7 \pm 4$ % a hemorragia e em $39,3 \pm 8$ % o extravasamento vascular de proteínas na melhor dose testada (25 mg/kg). As avaliações dos marcadores teciduais de inflamação/estresse oxidativo mostraram que na melhor dose testada (25 mg/kg) o α -felandreno reduziu MPO ($62,13 \pm 1$ %), MDA ($25,9 \pm 2$ %) e NOx ($15,89 \pm 0,1$ %), significativamente em relação ao CN ($p < 0,05$). A prevenção da depleção dos antioxidantes endógenos pelo α -felandreno foi significativa e teve percentual de $88,2 \pm 18$ % e $108,1 \pm 10$ % nos níveis de SOD e GSH respectivamente. Na avaliação de citocinas, o α -felandreno foi capaz de reduzir significativamente os níveis TNF- α ($28,45 \pm 11$ %), mas não alterou de forma significativa os níveis de IL-1 β ($22,7 \pm 4$ %). Assim pode-se concluir que o monoterpene α -felandreno foi capaz de atenuar a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e apresentou potencial inibição de parâmetros do estresse oxidativo e redução nos níveis de TNF- α .

Palavras-Chave: Cistite Hemorrágica; α -felandreno; Quimioterapia antineoplásica; Monoterpeneo.

ABSTRACT

ABSTRACT

Hemorrhagic cystitis is the main dose-limiting adverse effect of the clinical use of oxazaphosphorins, including ifosfamide (IFOS). This event occurs through the formation of acrolein, a metabolite responsible for the urotoxicity of these drugs, resulting in increased oxidative stress and production of proinflammatory cytokines, culminating in tissue degradation of the bladder tissue. Given this reality, it identifies a need that makes room for the development of an effective cytoprotective that may be used as an adjuvant in cancer therapy oxazaphosphorines. In this context, it is known that α -felandrenus has an anti-inflammatory effect, which indicates that this monoterpene is potentially useful in the investigation of new prototypes that can combat acute inflammatory reactions. In this context, the uroprotective effect of monoterpene α -phellandrene was evaluated against the hemorrhagic cystitis model induced by ifosfamide. The hemorrhagic cystitis model was induced by single dose antineoplastic ifosfamide (400 mg / kg ip) preceded by pretreatment with saline and α -phellandrene (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 mg / kg ip) in *Mus musculus* (CEUA 279/2016). In order to analyze the reduction of the damage, the bladder wet weight, hemoglobin content and the Evans blue dye extravasation from the bladder matrix were evaluated (PUV). In order to characterize the involvement of neutrophil migration, lipid peroxidation and involvement of enzymatic and endogenous non-enzymatic antioxidants, the tissue markers Myeloperoxidase (MPO), Malondialdehyde, Nitrite / Nitrate (NOx), Superoxide dismutase (SOD) and Reduced Glutathione (GSH) were evaluated respectively. Inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) were measured by ELISA immunoassay technique. Inhibition data were calculated by normalization in relation to the negative control (CN) and significance calculated considering $p < 0.05$. The results show that pre-treatment with α -phellandrene (12.5 and 25 mg / kg) significantly reduced by 31.59 ± 0.8 and $29.90 \pm 0.3\%$, respectively, PUV in comparison to CN. The spectrophotometric analysis showed that pretreatment significantly reduced bleeding by $65.7 \pm 4\%$ and vascular extravasation of proteins at the best dose tested (25 mg / kg) by $39.3 \pm 8\%$. The evaluation of the tissue markers of inflammation / oxidative stress showed that in the best dose tested (25 mg / kg) α -phellandrene reduced MPO ($62.13 \pm 1\%$), MDA ($25.9 \pm 2\%$) NOx ($15, 89 \pm 0.1\%$), significantly in relation to CN ($p < 0.05$). The prevention of the depletion of endogenous antioxidants by α -phellandrene was significant and showed a percentage of $73.0 \pm 18\%$ and $86.6 \pm 10\%$ in the levels of SOD and GSH respectively. In the assessment of cytokines, α -phellandrene was able to significantly reduce TNF- α levels ($28.45 \pm 11\%$), but did not significantly alter IL-1 β levels ($22.7 \pm 4\%$). The monoterpene α -phellandrene was able to attenuate hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide, it showed potential inhibition of oxidative stress parameters and reduction in levels of TNF- α .

Key-Words: *Cystitis; Hemorrhagic Disorders; α -Phellandrene; Antineoplastic chemotherapy; Monoterpene.*

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Câncer.....	22
1.2 Terapia oncológica.....	23
1.3 Oxazafosforinas: Mecanismo de ação e efeitos adversos	23
1.4 Cistite hemorrágica: fator limitante do uso das Oxazafosforinas	24
1.5 Arsenal terapêutico disponível para o tratamento da cistite hemorrágica..	27
1.6 Produtos Naturais	29
1.7 α -felandreno como protótipo citoprotetor.....	30
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Obtenção do α -felandreno.....	35
3.2 Animais experimentais e eutanásia.....	35
3.3 Modelo experimental de indução de cistite hemorrágica com ifosfamida.....	35
3.4 Avaliação do peso úmido do tecido vesical.....	38
3.5 Análise histopatológica.....	38
3.5.1 Avaliação dos parâmetros macroscópicos.....	38
3.5.2 Preparação e coloração das amostras de tecido.....	38
3.5.3 Avaliação dos parâmetros microscópicos (Histopatológicos)	39
3.6 Quantificação da hemoglobina vesical pelo método da cianometahemoglobina.....	39
3.7 Avaliação do extravasamento vascular de proteínas pela técnica do corante azul de evans.....	40
3.8 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido vesical ..	41
3.9 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) no tecido vesical	42
3.10 Mensuração dos níveis teciduais de nitrito e nitrato (NOx)	42
3.11 Determinação dos níveis de superóxido dismutase (SOD) no tecido vesical.....	42
3.12 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido vesical.	43
3.13 Dosagem dos níveis teciduais de IL-1 β e TNF- α por ELISA	43

3.14 Análise Estatística.....	44
4 RESULTADOS.....	45
4.1 O α -felandreno diminui o peso úmido das bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	46
4.2 Efeito do α -felandreno sobre os parâmetros macroscópicos de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	47
4.3 Efeito do α -felandreno sobre os parâmetros histopatológicos de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	49
4.4 O α -felandreno reduz os níveis de hemoglobina vesical dos animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	53
4.5 O α -felandreno reduz o extravasamento vascular em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	54
4.6 O α -felandreno reduz os níveis de mieloperoxidase (MPO) em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	55
4.7 O α -felandreno reduz os níveis de malondialdeído (MDA) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	56
4.8 O α -felandreno reduz os níveis de nitrato/nitrito (NO _x) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	57
4.9 O α -felandreno mantém os níveis homeostáticos da superóxido dismutase (SOD) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	58
4.10 O α -felandreno mantém os níveis homeostáticos da glutathiona reduzida (GSH) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	59
4.11 O α -felandreno é capaz de modular os níveis teciduais de citocinas inflamatórias.....	60
5 DISCUSSÃO.....	62
6 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer (do grego *karkínos*) é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento anormal de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (INCA, 2017). Há diversos fatores de risco classificados como modificáveis (uso de tabaco e álcool, hábitos alimentares inadequados, inatividade física, agentes infecciosos, radiação ultravioleta, poluição ambiental, radiação ionizante, alimentos contaminados, obesidade) e os não modificáveis, relacionados aos fatores de risco que não dependem do comportamento (idade, gênero, etnia/raça e herança genética) (ANAND et al., 2008; INCA, 2017). Vale salientar que mais de dois terços dos cânceres humanos poderiam ser prevenidos através de mudança adequada do estilo de vida (SURH, 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014), o número anual de casos novos de câncer no mundo passou de 10 milhões em 2000 e, em 2020, ultrapassará 15 milhões, sendo que a maior parte (60%) acontecerá em regiões menos desenvolvidas (MEACHAM, MORRISON, 2013; INCA, 2017).

Nos homens, os tipos de câncer com maior incidência ocorrem na próstata, pulmões, brônquios, colón, reto e bexiga urinária. Nas mulheres a prevalência é alta nas mamas, nos pulmões, nos brônquios, colón e reto, útero e tireoide. Nas crianças o tipo mais comum de câncer compreende a leucemia, câncer no cérebro e nos linfonodos (YOO; SHIN, 2003). Por sua diversidade, o câncer possui apresentações patológicas com diversas distinções, portanto, os avanços no seu tratamento ocorrem por investigação contínua, avaliação dos resultados dos tratamentos e incorporação na prática médica (MILLER et al., 1981; CICOGNA; NASCIMENTO; LIMA, 2010).

Dentre as principais formas de tratamento do câncer encontram-se a quimioterapia e a radioterapia. De forma irrefutável essas abordagens contribuíram para o aumento da sobrevivência de pacientes com câncer, entretanto, ainda produzem vários efeitos colaterais/adversos, tais como náuseas, vômitos, infecções, mucosite, neuropatia e cistite hemorrágica, os quais afetam negativamente a qualidade de vida dos pacientes, representando prejuízo à eficácia terapêutica (MOURÃO, 2012).

1.2 Terapia oncológica

A combinação de vários fármacos com diferentes mecanismos de ação é uma estratégia efetiva no tratamento do câncer e oferece vários benefícios. Em primeiro lugar, a associação de dois ou mais fármacos com diferentes mecanismos de ação pode retardar as mutações celulares, bem como o processo de adaptação ao câncer. Em segundo lugar, há o efeito sinérgico dos fármacos, ou seja, ação combinada dos medicamentos, que produzem um efeito biológico potencializado (SILVA; CARLOTTO; ROTTA, 2018).

Nessa perspectiva, os fármacos usados em terapia oncológica são divididos de acordo com seus mecanismos de ação, ou seja, em várias classes de agentes farmacológicos, tais como: agentes alquilantes, antimetabólitos, antineoplásicos naturais, antibióticos citotóxicos, hormônios, anti-hormônios, entre outros, onde a maioria desses fármacos, em geral, interagem majoritariamente com o DNA ou seus precursores, inibindo a síntese do novo material genético e causando danos irreparáveis ao metabolismo celular (MILAN et al., 2018).

Dentre as classes dos antineoplásicos, os agentes alquilantes, em especial a classe das oxazafosforinas, tem destaque por sua ação citotóxica promissora sobre uma grande variedade de doenças neoplásicas, o que faz desta classe um arsenal terapêutico muito importante para a terapia do câncer (CHABNER, 2006; MATZ; HSIEH, 2017).

1.3 Oxazafosforinas: Mecanismo de ação e efeitos adversos

As oxazafosforinas são agentes quimioterápicos, alquilantes de DNA do tipo mostarda nitrogenada que têm ação citotóxica e antiproliferativa. A ciclofosfamida (CFA) e a ifosfamida (IFO) (**Figura 1A e 1B**) (oxazafosforinas) estão entre os fármacos citotóxicos mais utilizados em todo o mundo, sendo ativos contra muitos tipos de doenças neoplásicas benignas e malignas. Os cânceres tratados por estes fármacos incluem aqueles que acometem crianças e adultos (MATZ; HSIEH, 2017). Um dos fármacos mais importantes e amplamente utilizado no passado e até o momento é a CFA (JURADO et al., 2008), caracterizado por ser um agente quimioterápico alquilante que atua no ciclo celular de forma não específica, promovendo ruptura do DNA e conseqüentemente, morte celular. A CFA é utilizada em vários tratamentos de tumores e em algumas doenças não neoplásicas, como púrpura trombocitopênica,

lúpus, artrite reumatoide, síndrome nefrítica e granulomatose de Wegener e na prevenção da rejeição de transplante de medula óssea (ABRAHAM et al., 2009).

Em adicional, a IFO é utilizada no tratamento de tumores sólidos, incluindo câncer testicular, rabdomyosarcoma, tumor de Wilms, sarcoma de Ewing, sarcomas ósseos, osteossarcoma e neuroblastoma, bem como algumas formas de linfomas (PERAZELLA, 2012). Estes fármacos produzem resposta clínica em tumores de mama, ovário, linfomas, sendo também frequentemente utilizados em regimes de condicionamento para transplantes de medula óssea (SILVA JUNIOR et al., 2013).

Figura 1. Estruturas químicas da Ciclofosfamida (A) e Ifosfamida (B)



Fonte: (MATZ; HSIEH, 2017).

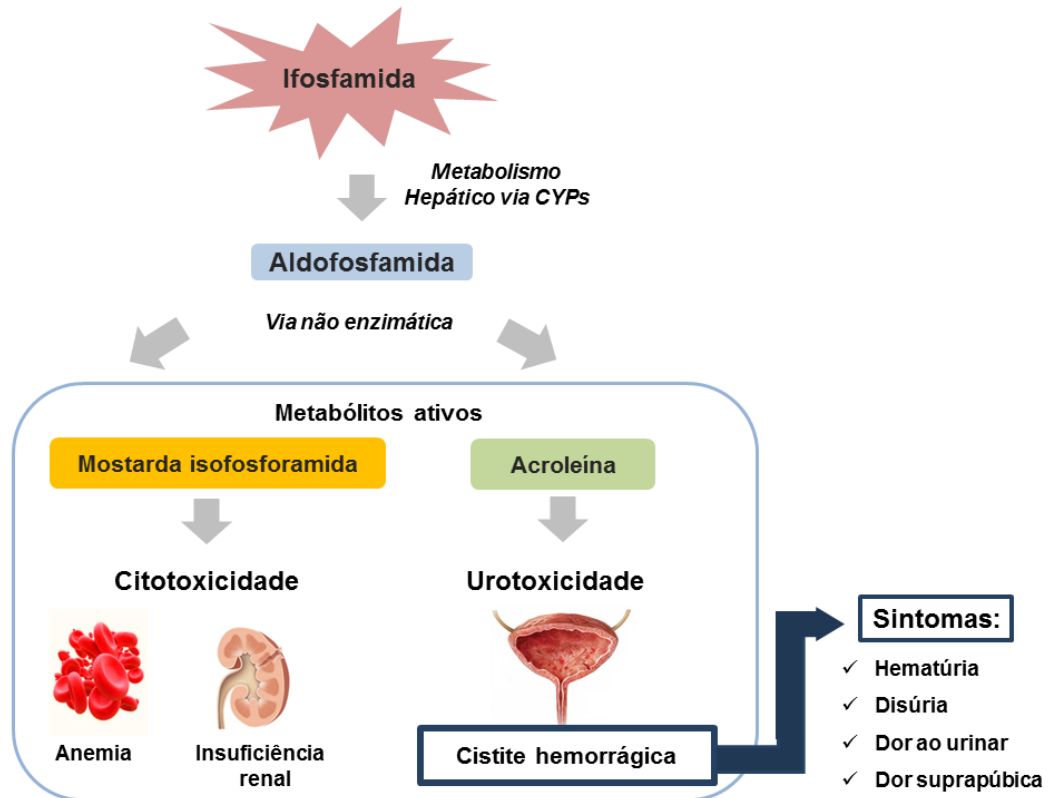
A IFO compartilha com a CFA um perfil tóxico caracterizado por urotoxicidade que é decorrente do seu metabolismo envolver a liberação de seu metabólito tóxico (acroleína), que por sua vez possui alto potencial de agressividade tecidual, e ao se acumular na bexiga induz a formação da cistite hemorrágica (DECKER; KARAM; WILCOX, 2009). Além disso, a IFO é considerada como sendo ainda mais nefrotóxica em comparação com a CFA (SKINNER, 2011).

1.4 Cistite hemorrágica: fator limitante do uso das Oxazafosforinas

A Cistite hemorrágica (CH) é o principal efeito adverso dose-limitante das oxazafosforinas (SILVA JUNIOR et al., 2013). Vale salientar que a CH ocorre em até 70% dos pacientes expostos a altas doses de quimioterapia com CFA ou IFO (CANNON et al., 1991). A CH pode ocasionar constrição ou perfuração da bexiga, anemia, infecções recorrentes do trato urinário, hidronefrose e insuficiência renal, podendo levar à morte (SENCER et al., 1993) (**Figura 2**). Desse modo, a CH representa um grave problema de saúde e, apesar dos tratamentos disponíveis, há

uma prevalência desta patologia em até 40% dos pacientes tratados com oxazafosforinas (SILVA JUNIOR et al., 2013).

Figura 2. Metabolismo da Ifosfamida e efeitos adversos.



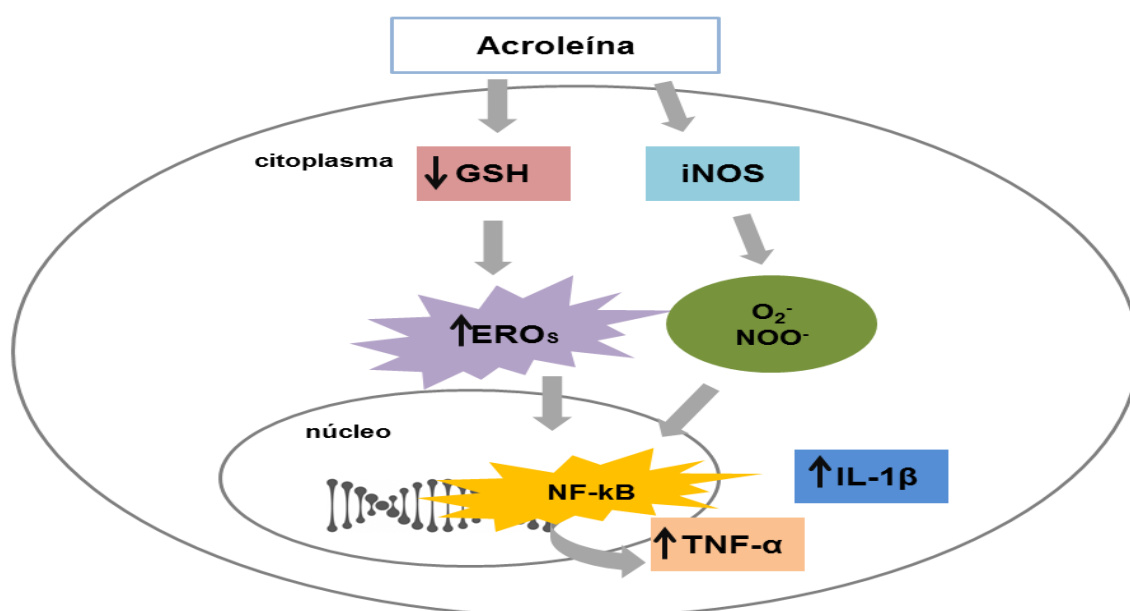
Legenda: CYP's – Complexo da Oxidase Mista do Citocromo P-450 Fonte: baseado em Batista, (2002).

A oxazafosforina Ifosfamida é metabolizada pelas enzimas da oxidase mista do Citocromo P-450 à Aldofosfamida (metabólito ativo) que por sua vez é metabolizado em mostarda Isofosforamida e Acroleína que são metabólitos tóxicos. Em especial a acroleína é excretada pelos rins e se acumula na bexiga provocando destruição do tecido vesical (BATISTA, 2002).

A inflamação vesical induzida pelas oxazafosforinas é mediada por diversos fatores solúveis, incluindo citocinas (IL-1 β e TNF- α) que têm ampla associação ao dano epitelial no tecido vesical. A produção desses fatores é associada principalmente à ação deletéria de metabólitos como a acroleína, um subproduto da degradação das oxazafosforinas (SILVA et al., 2015), a qual é filtrada pelos rins e concentrada na bexiga. Este metabólito ativo provoca intensa apoptose/necrose no urotélio da bexiga que, por sua vez, leva à ulceração (MATZ; HSIEH, 2017).

A acroleína é um metabólito das oxazafosforinas altamente reativo que, em contato com as células deprime os níveis de glutathiona reduzida e quando este protetor tem suas concentrações teciduais diminuídas, o potencial agressor da molécula de acroleína provoca reações que resultam em aumento de espécies reativas de oxigênio e transcrições nucleares de citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, iniciam a cascata inflamatória que faz um reforço positivo na degradação tecidual (SILVA et al., 2015; MATZ; HSIEH, 2017) (**Figura 3**).

Figura 3. Mecanismo farmacológico da acroleína no aumento da produção de mediadores inflamatórios.



Legenda: GSH (Glutathiona Reduzida); iNOS (Óxido Nítrico Sintase Induzível); $O_2^{\bullet -}$ (Ânion superóxido); NOO^{\bullet} (Óxido Nítrico); EROs (Espécies Reativas de Oxigênio); NFkB (Fator de Transcrição Nuclear Kappa B); $TNF-\alpha$ (Fator de Necrose Tumoral alfa) e $IL-1\beta$ (Interleucina 1 beta). Fonte: Baseado em Keles et al., 2014.

Como é possível observar na **Figura 3**, tanto as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) quanto as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN's) têm potencial para a formação de peroxinitrito, que ataca lipídios e proteínas. A produção de EROs/ERN's induz ainda, fatores de transcrição, incluindo NF-kB e ativa a proteína 1 (AP-1), a qual estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (como o $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$) (KELES et al., 2014), e estes mediadores envolvidos nos eventos inflamatórios se correlacionam positivamente com os eventos de lesão tecidual, marcados com intensa infiltração de

neutrófilos e destruição celular presentes na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (RIBEIRO et al., 2002).

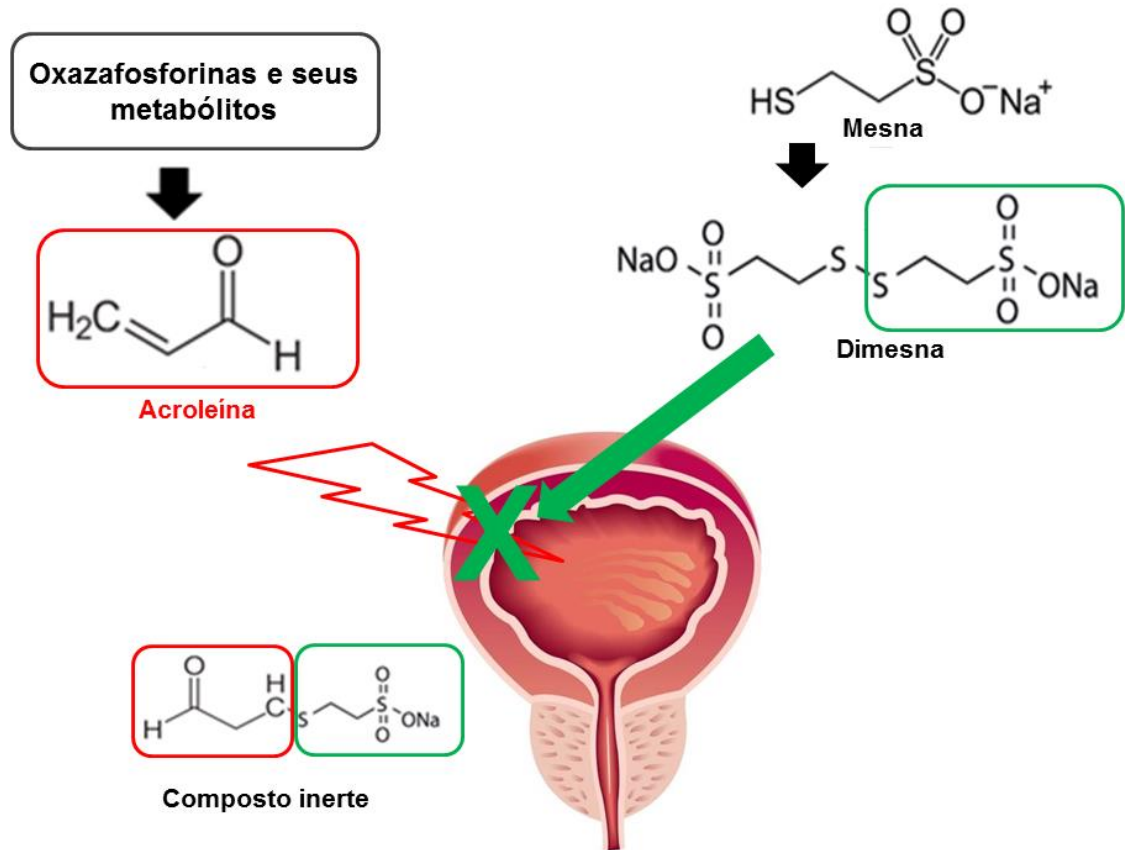
A acroleína induz a morte celular através do aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), além de ativar a óxido nítrico sintase induzível, levando à produção de óxido nítrico (KORKMAZ et al., 2003). Vários estudos mostraram que um aumento nas EROs leva a edema da bexiga, inflamação e extravasamento, indicando que as EROs podem desempenhar um papel crítico em um modelo experimental de cistite induzida por CFA em roedores (Al-MALKI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016).

1.5 Arsenal terapêutico disponível para o tratamento da cistite hemorrágica

Há três agentes aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) na terapia farmacológica da cistite hemorrágica: MESNA, dexrazoxan e amifostina. O estudo da eficácia do dexrazoxane e amifostina ainda é complexo, pois sua ação é sistêmica e inespecífica, neste sentido a principal conduta terapêutica que apresenta eficácia significativa para a cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas é o MESNA (ROSA, 2004). O MESNA (2-mercaptoetano-sulfonato de sódio) é um fármaco adjuvante, utilizado para reduzir o risco de cistite hemorrágica em pacientes tratados com quimioterápicos (ifosfamida ou ciclofosfamida) (ANDRIOLE et a., 1997).

O MESNA (**Figura 4**) é um agente citoprotetor, tendo uso restritamente profilático (FREEDMAN; EHERLICH; LJUNG, 1984), que age por inibir os produtos tóxicos da ifosfamida e ciclofosfamida produzindo substâncias menos nocivas e reduzindo os riscos de hemorragia (SAKURAI et al., 1986). Outrossim, o MESNA também tem a capacidade de inibir a formação de EROs devido à presença de um grupo sulfidrílico em sua estrutura (GRESSIER et al, 1994).

Figura 4 – Interferência do MESNA no metabólito urotóxico das oxazafosforinas (acroleína).



Legenda: O grupo sulfidríla reage com a instauração da molécula de acroleína, formando um composto inerte que se precipita na urina e não é absorvido, portanto não tendo efeito lesivo ao tecido vesical. Fonte: baseado em Mourão (2012).

O MESNA exerce seu efeito protetor através de um antagonismo químico da acroleína (MOURÃO, 2012). Após a administração, o MESNA é rapidamente oxidado à DIMESNA que, por possuir alta hidrofiliabilidade, é rapidamente eliminado pelos rins. Dentro da urina, no compartimento vesical, a ligação dissulfeto entre as duas moléculas que compõem o DIMESNA é hidrolisada e os grupamentos tiois das duas moléculas de MESNA livres reagem com a dupla ligação da molécula de acroleína formando um composto inativo que por sua vez é excretado na urina (DECHANT, et al., 1991; TAKAMOTO; SAKURA; NAMERE, 2004; MOURÃO, 2012).

Entretanto, a alta solubilidade do MESNA facilita o seu rápido *clearance* renal. Dessa forma, sua meia-vida plasmática é curta (aproximadamente 1,5 horas) quando comparada à meia-vida da ifosfamida (entre 6-7 horas) (SHAW; GRAHAM, 1987), o que torna necessário a administração através de infusão contínua deste fármaco

visando proporcionar proteção profilática adequada e contínua à bexiga (KATZ et al., 1995). Segundo Rosa (2004), o MESNA possui um custo muito elevado. Salienta-se ainda que este agente citoprotetor não seja efetivo quando a cistite hemorrágica já está estabelecida (FREEDMAN; EHERLICH; LJUNG, 1984). Além disso, verifica-se a presença da CH em 10-40% dos pacientes tratados com esse fármaco (KANAT et al., 2006). Portanto, há carência de novos agentes efetivos para a prevenção da cistite hemorrágica causada por ifosfamida ou ciclofosfamida.

Diante desta realidade, identifica-se a necessidade do desenvolvimento de um citoprotetor eficaz que possa vir a ser utilizado como adjuvante na terapia oncológica com oxazafosforinas com a finalidade de diminuir os danos causados ao paciente.

1.6 Produtos naturais

Indubitavelmente, a natureza é fonte de inúmeros fármacos com imenso potencial contra várias doenças humanas, incluindo o câncer (KOEHN; CARTER, 2005). De fato, cerca de 50% dos produtos farmacêuticos são derivados de fontes vegetais e esta vasta reserva, ainda pouco explorada, pode ser utilizada para a obtenção de novos agentes quimioterápicos para tratamento de variadas enfermidades (MELNICK, 2006).

Muitos agentes citoprotetores têm sido extraídos da natureza, visto que nela é possível encontrar uma grande quantidade de compostos orgânicos com potencial farmacológico, sendo o reino vegetal majoritário no fornecimento desta diversidade química, através dos metabólitos secundários (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Desde a antiguidade, os produtos naturais, principalmente os derivados de plantas, têm constituído importante fonte para a obtenção de agentes terapêuticos. Diante disso, o uso clínico dos produtos naturais (e seus derivados) representa uma importante ferramenta para a descoberta de novos alvos terapêuticos como: receptores, enzimas, transportadores ou canais iônicos envolvidos em processos fisiológicos e patológicos (CALIXTO et al., 2017).

Os Óleos essenciais (OE) são derivados do metabolismo secundário das plantas, constituindo-se de misturas complexas e são compostos por cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações, contudo apenas dois ou três componentes principais se apresentam em concentrações elevadas (20-70%) e os

outros em concentrações vestigiais. Geralmente os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos OE (ANDRE et al., 2018). Dentre as classes de metabólitos secundários destacam-se os terpenos, que representam uma das maiores classes de metabólitos secundários fornecidos pela natureza (SOMANI et al., 2015). Os terpenos são os constituintes de óleos essenciais presentes em espécies de plantas aromáticas, os quais possuem uma grande diversidade de subclasses com distintas estruturas químicas formadas por unidades de isoprenos (que possui esqueleto com 05 átomos de carbono, entre os quais estão os Monoterpenos (C10), Sesquiterpenos (C15), Diterpenos (C20 – C40) (SOUZA et al., 2014; SOMANI et al., 2015).

1.7 α -felandreno como protótipo citoprotetor

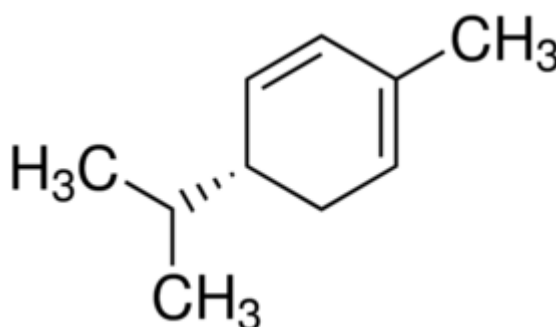
Os monoterpenos se destacam por possuírem muitas atividades biológicas e baixa toxicidade relativa (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010). Na indústria farmacêutica, além de sua aplicação como excipiente/adjuvante para melhorar a penetração na pele, eles também são apontados com potencial terapêutico para tratar diversas doenças (GUIMARÃES, 2014).

O crescente interesse na possível aplicação desses compostos na terapêutica é atribuído às suas diversas atividades biológicas, e neste contexto, evidenciamos a promissora investigação do potencial farmacológico de um monoterpene em especial (α -felandreno) visto que o mesmo possui baixa toxicidade sistêmica (cerca de 5,7 g/kg em ratos) (OPDYKE, 1978) e propriedades farmacológicas promissoras como atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (PADUCH et al., 2007; LIMA, 2011; SANTOS, 2015). Além disso existem estudos que destacam a sua presença como composto representativo na atividade biológica de óleos essenciais de espécies como *Schinus polygamus* (Cav.) Cabr. (ERAZO et al., 2006) e *Zingiber officinale* Ros. (VENDRUSCOLO et al., 2006).

O α -felandreno (2-metil-5-propano-2-ciclohexano-1,3-dieno), com massa molar 136,23 g/mol (MERCK, 1976), é um monoterpene cíclico (**Figura 5**) encontrado nos óleos essenciais de várias espécies vegetais dentre as quais se destacam: *Schinus terebinthifolius* Raddi (15.7%) (NASCIMENTO et al., 2012); *Cupressus atlantica* Gaussen (5,5%) (ARJOUNI et al., 2011); *Solanum erianthum* D. Don (17,5%) (ESSIEN et al., 2012); *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen. (10.8%) (ASBAGHIAN et al.,

2011); *Myrica gale* L. (8,0%) (POPOVICI et al., 2008) e *Anethum graveolens* L. (32%) (HAJHASHEMI; ABBASI; 2008). Em algumas plantas, os teores de α -felandreno encontram-se acima dos 25%, o que representa um bom parâmetro de rendimento para um óleo essencial (MAHBOUBI; MAHDIZADEH; TABAR, 2016; SIQUEIRA et al., 2016a).

Figura 5. Representação molecular do monoterpeneo α -felandreno (2-metil-5-propan-2-ciclohexa-1,3-dieno).



Fonte: Pubchem

Para este monoterpeneo, a literatura relata achados farmacológicos importantes, como efeito antinociceptivo (LIMA et al., 2011) e atividade antiedematogênica ao inibir edemas de pata e orelha induzidos por diversos agentes pró-inflamatórios, incluindo carragenina, histamina, prostaglandina e substância P, óleo de cróton, TPA e ácido araquidônico (SIQUEIRA et al., 2016b). O efeito anti-inflamatório exercido por este monoterpeneo provavelmente envolve ainda diminuição da migração neutrofílica e a estabilização da degranulação mastocitária (SIQUEIRA et al., 2016a), o que indica que o α -felandreno é potencialmente útil na pesquisa de novos agentes com potencial anti-inflamatório, o que abre margem para sua aplicação no estudo da atenuação do dano inflamatório vesical causado pela quimioterapia com oxazafosforinas em avaliação aguda. Diante disso, o presente estudo teve por objetivo a avaliação da modulação do dano tecidual pelo α -felandreno frente a um modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito uroprotetor do α -felandreno na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o potencial protetor do α -felandreno na prevenção do dano tecidual causado pela quimioterapia com ifosfamida através de observações macroscópicas e histopatológicas;
- ✓ Quantificar os níveis de hemorragia vesical através da quantificação de hemoglobina tecidual por ensaio espectrofotométrico;
- ✓ Investigar o efeito modulador do α -felandreno sobre o extravasamento vascular de proteínas com a técnica do Azul de Evans;
- ✓ Quantificar os níveis de mieloperoxidase para avaliar o envolvimento dos leucócitos polimorfonucleares na inflamação da cistite hemorrágica induzida por quimioterápico;
- ✓ Averiguar o efeito do α -felandreno sobre os parâmetros do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica tecidual através do marcador Malondialdeído (MDA) e dosagem de Nitrito (NO_2^-)/Nitrato (NO_3^-),
- ✓ Avaliar a atividade do α -felandreno sobre antioxidantes endógenos (Superóxido Dismutase –SOD e Glutathiona Reduzida – GSH);
- ✓ Dosar os níveis de Interleucina 1- beta ($\text{IL-1}\beta$) e Fator de Necrose Tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) nos animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do α -felandreno

O α -felandreno (obtido por via sintética) foi fornecido pelo Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, membro do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba.

3.2 Animais experimentais e eutanásia

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* de linhagem albina (Swiss), machos, com peso variando entre 25 a 30g, randomicamente distribuídos em grupos de 5 (cinco) animais, a fim de permitir a análise estatística dos resultados.

Os animais foram obtidos do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos à temperatura de 24 ± 1 °C e ciclo claro/escuro de 12 h com água e ração *ad libitum*, sendo eles colocados em jejum de 6h antes da realização dos experimentos.

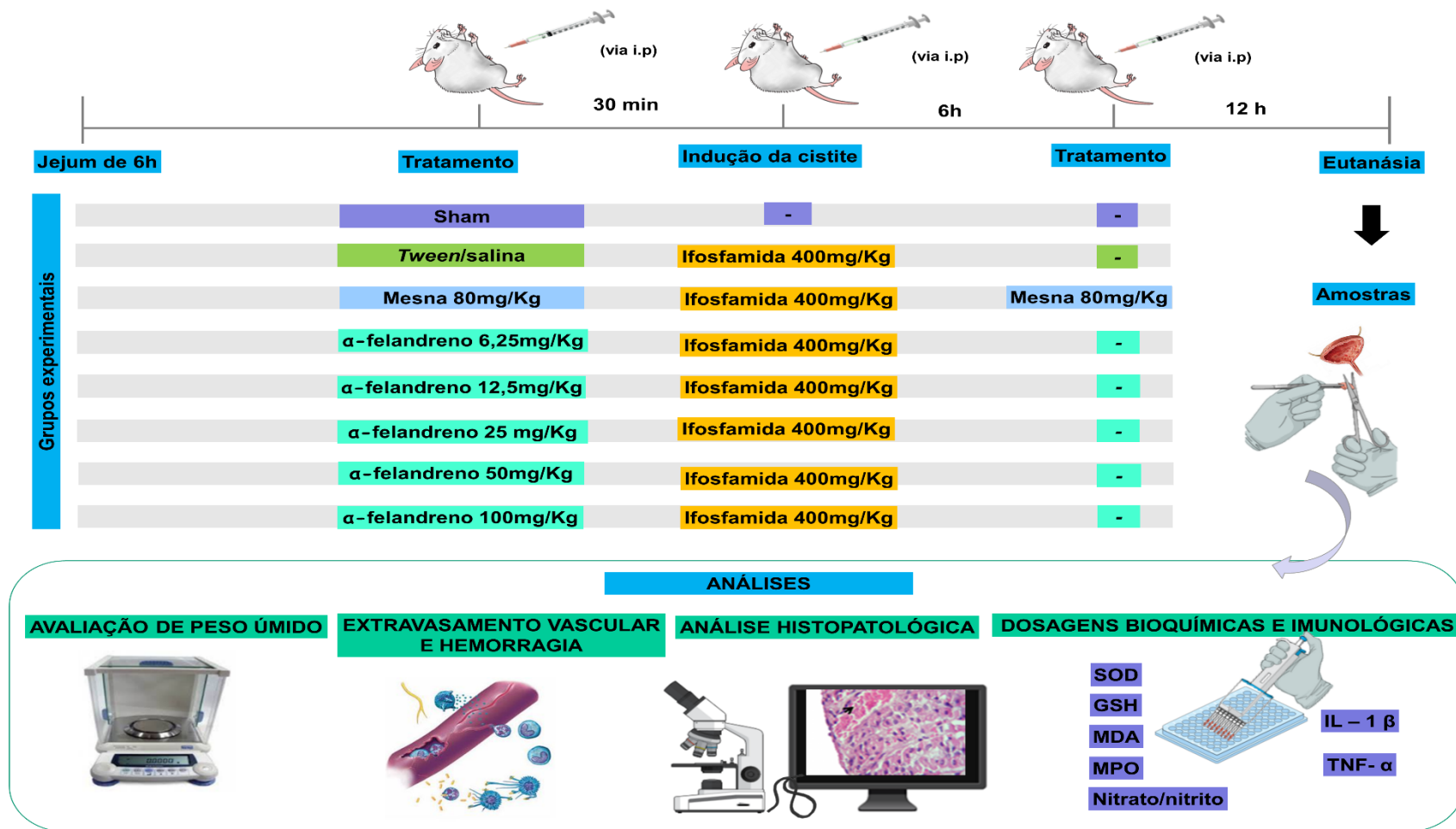
Os procedimentos referentes à eutanásia foram realizados por sobredose de anestésico (tiopental sódico, 150 mg/kg e lidocaína 10 mg/kg, por via intraperitoneal), sob supervisão da médica veterinária Adeline de Andrade Carvalho (CRMV-PI 866-VP) em conformidade com as diretrizes do CONCEA e com o parágrafo 1º. do Art. 14 da Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012 do CFMV. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com animais – CEUA/UFPI sob o protocolo Nº 279/16.

3.3 Modelo experimental de indução de cistite hemorrágica com ifosfamida

Os camundongos foram distribuídos em 8 (oito) grupos de 5 (cinco) animais, onde a indução da cistite hemorrágica foi feita com uma única dose de Ifosfamida (400mg/kg) i.p. Os animais foram pré tratados com α -felandreno que foi preparado em *Tween* salina (Polissorbato 80 0,05% + NaCl 0,9%) para ser administrado por via i.p. nas respectivas doses 6,25; 12,5 ; 25; 50 e 100 mg/kg. O controle Negativo (CN) consistiu no pré tratamento com veículo (*Tween* salina) e o controle positivo (CP) consistiu em pré e pós tratamento (80 mg/kg) com 2-mercaptoetano-sulfonato de sódio (MESNA) i.p. Após 12 horas os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico conforme anteriormente determinado. O delineamento das atividades

farmacológicas foi realizado através de induções de cistite hemorrágica precedidas de pré-tratamento com o α -felandreno (SILVA-JUNOR, 2013).

Figura 6– Esquema de indução da cistite hemorrágica em camundongos



Legenda: O tratamento com MESNA se deu em duas etapas, pré tratamento como descrito na tabela e pós tratamento seis horas após a indução.

3.4 Avaliação do peso úmido do tecido vesical

Após a eutanásia dos animais, conforme protocolo descrito anteriormente, a bexiga foi removida, esvaziada e pesada em balança analítica, o edema vesical foi reportado como aumento do peso úmido vesical, que por sua vez foi expresso como peso da bexiga/20 g do peso do animal após tratamento.

3.5. Análise Histopatológica

3.5.1 Avaliação dos parâmetros macroscópicos

Esta avaliação foi realizada seguindo as premissas estabelecidas por Gray et al., (1986), onde são definidos parâmetros de observação semi-quantitativos baseados em observações de estados morfológicos.

Edema:

Severo (+3): *edema interno e externo;*

Moderado (+2): *edema interno (mucosa);*

Leve (+1): *Edema intermediário;*

Normal (0): *Nenhuma alteração reportável;*

Hemorragia

Severo (+3): *coágulo intravesical;*

Moderado (+2): *hematomas na mucosa;*

Leve (+1): *telangiectasia ou dilatação dos vasos vesicais;*

Normal (0): *Nenhuma alteração reportável*

3.5.2 Preparação e coloração das amostras de tecido

Após a eutanásia dos animais, conforme protocolo descrito anteriormente, a bexiga foi removida, esvaziada e fixada em Formalina Tamponada 10% (pH ~7,2). Após 48 horas de fixação, as amostras foram processadas através da desidratação em gradientes crescentes de álcool e xilol seguido de inclusão em parafina líquida, emblocamento e microtomia em cortes de 4µm que foram re-hidratados e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E).

3.5.3 Avaliação dos parâmetros microscópicos (Histopatológicos)

O tecido vesical das bexigas obtido dos animais foi fixado em formalina tamponada e preparado com técnicas padrão de confecção de lâminas histológicas, seguindo os parâmetros definidos por Gray et al (1986), sendo utilizado uma escala semi-quantitativa para o tratamento dos dados abaixo apresentados.

(0)- Histologia Normal: *Caracterizada por epitélio normal, ausência de infiltrado inflamatório e ausência de úlceras.*

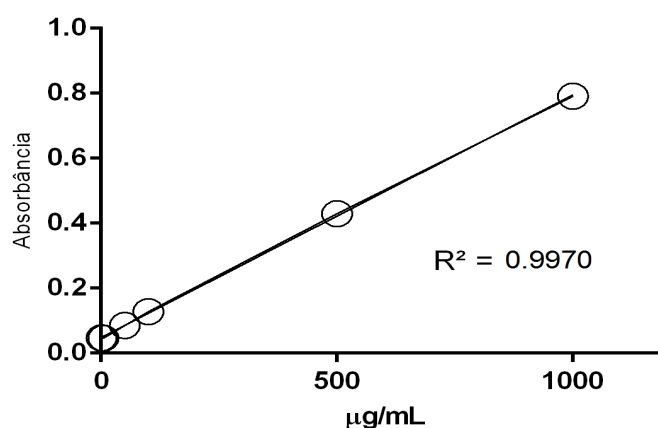
(+1)- Alterações Discretas: *Caracterizadas por redução no número de células epiteliais uroteliais em decorrência de descamação, apagamento das dobras de mucosa habituais em virtude do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras.*

(+2)- Alterações Intensas: *Caracterizada por exulceração da mucosa, múltiplas úlceras, edema acentuado, infiltrado inflamatório, depósito de fibrina e hemorragia.*

3.6 Quantificação da hemoglobina vesical pelo método da cianometahemoglobina

Para quantificar a hemorragia no tecido vesical, foi usado um teste colorimétrico. O método se baseia na oxidação do ferro (Fe^{2+}) da molécula de hemoglobina pelo ferricianeto de potássio em pH fracamente alcalino, formando a metahemoglobina, que é convertida em cianometahemoglobina após a reação com o cianeto de potássio, exibindo coloração avermelhada proporcional a concentração de hemoglobina na amostra. Neste ensaio foi utilizada uma adaptação do kit (Labtest, Minas Gerais -Br) que consiste em uma formulação do reagente criado por Harold & Drabkin (1935). As bexigas foram incubadas nesse reagente (100 mg de tecido vesical por mL de reagente,) e após 1 hora de incubação foram centrifugadas com aceleração de 10.000 (g) por 10 minutos. Os sobrenadantes foram extraídos e centrifugados novamente em 10.000 (g) por mais 10 minutos. A absorbância do sobrenadante foi quantificada por leitor de microplacas em comprimento de onda de 450 nm e a concentração de hemoglobina foi calculada através da curva analítica (**Figura 7**), validada com padrão de hemoglobina (LABTEST / CLSI) e os resultados foram expressos em μg de hemoglobina/mg de tecido.

Figura 7. Curva de calibração para doseamento de hemoglobina por espectrofotometria em 450 nm.



Legenda: Os dados de linearidade foram calculados a partir de diluição de um padrão de hemoglobina com os padrões de pureza exigidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ao intervalo de concentração entre 1 a 1000µg/mL (1, 5, 50, 100 ,500, e 1000 µg/mL).

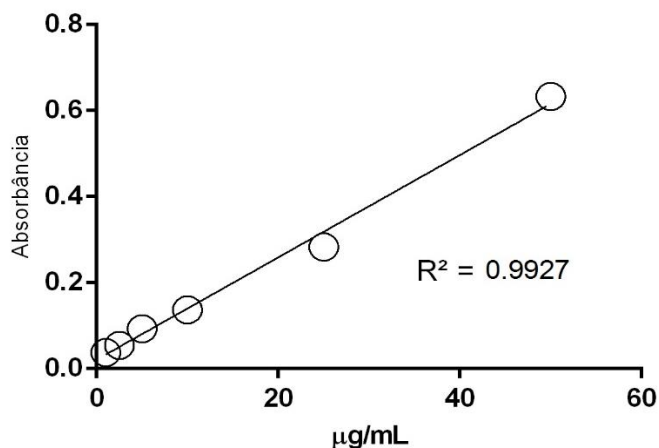
A curva de calibração da técnica mostra um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99, portanto é considerada linear para estabelecer uma relação entre concentração do analito na amostra e a absorbância avaliada, o que permite o doseamento exato da hemoglobina nas amostras.

3.7 Avaliação do extravasamento vascular de proteínas pela técnica do corante Azul de Evans.

A permeabilidade vascular vesical foi avaliada pela técnica do extravasamento do corante Azul de Evans que consiste em uma substância que se liga à albumina plasmática. Ocorrendo o extravasamento de albumina para o interstício e consequentemente a formação de edema, o corante estará presente. Neste caso foram utilizados grupos de 5 animais. Administrou-se 25mg/kg de Azul de Evans por via intravenosa no plexo caudal meia hora antes da eutanásia dos animais. Posteriormente, os animais foram eutanasiados e as bexigas retiradas, dissecadas e incubadas em tubos de ensaio contendo solução de formamida (1 mL/bexiga) a 56°C durante seis horas (*overnight*) para extração do corante. O corante total extraído foi determinado por sua vez pela medida na mudança da absorbância a 550 nm em espectrofotômetro de microplacas. Ao mesmo tempo, a curva absorbância-concentração foi determinada. O peso úmido vesical foi medido como parâmetro e expresso em ng de azul de Evans/mg de tecido (média \pm EPM) (MACÊDO et al.,

2011). Para a quantificação do Azul de Evans, fez-se necessário o delineamento de uma curva de calibração que está expresso na Figura 8.

Figura 8. Curva de calibração para doseamento do Azul de Evans por espectrofotometria em 550 nm.



Legenda: Os dados de linearidade foram calculados a partir de diluição de um padrão de Azul de Evans ao intervalo de concentração entre 1 a 50µg/mL (1; 2,5; 5; 10; 25 e 50 µg/mL).

Os resultados encontrados mostram um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99, portanto é considerado linear para estabelecer uma relação entre concentração do analito na amostra e a absorbância avaliada, o que permite a quantificação exata do Azul de Evans nas amostras.

3.8 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido vesical

Para dosagem da concentração de mieloperoxidase, as bexigas foram pesadas e colocadas em um tampão de fosfato de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (HTAB, pH 6,0) para preparar um homogenato a 10%. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 4500 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi utilizado para a análise. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida através da técnica descrita por Bradley; Chistensen; Rothstein, (1982), utilizando 0,0005% de peróxido de hidrogênio como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio é degradado, ocorre a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dionisidina em um composto de cor marrom que é doseável

espectrofotometricamente a 550 nm. Os resultados foram expressos como unidade (U) de MPO/mg de tecido.

3.9 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) no tecido vesical

Os níveis de MDA no tecido vesical foram determinados pelo método de Mihara; Uchiyama, (1978). As amostras foram homogeneizadas em KCl gelado 1,15% para preparar um homogenato a 10%. Em seguida, alíquotas de 250 µL do homogenato foram adicionadas a tubos contendo 1,5 mL de H₃PO₄ a 1% e 500 µL de uma solução de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Posteriormente, os tubos foram aquecidos, por um período de 45 minutos, em um banho de água a 100°C e a mistura reacional foi, então, resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 mL de n-butanol. Após a adição de n-butanol, as amostras foram agitadas em um misturador “vortex” por um minuto, e posteriormente centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi mensurado a uma absorvância de 520 e 535 nm, sendo o resultado obtido pela diferença da absorvância nas duas leituras. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido vesical.

3.10 Mensuração dos níveis teciduais de nitrito e nitrato (NO_x)

Para mensuração de NO_x, faz-se sua medida de forma indireta, através de seus metabólitos, nitrito e nitrato, utilizando o reagente de Griess, de acordo com o método descrito por Green e colaboradores (1982). As amostras de tecido foram homogeneizadas em KCl 0,15 M (1 mL/100 mg de tecido), e o homogenato foi centrifugado sob refrigeração. Depois, 100 µL do sobrenadante foram misturados com 100 µL de reagente de Griess. A absorvância a 540 nm foi medida após 10 minutos de incubação. Os níveis de nitrato / nitrito foram expressos como µM de nitrito e nitrato (NO_x).

3.11 Determinação dos níveis de superóxido dismutase (SOD) no tecido vesical

A concentração da superóxido dismutase foi mensurada utilizando um ensaio espectrofotométrico modificado (Das et al., 2000). Neste método, a atividade enzimática é calculada pela quantidade de SOD capaz de inibir a formação de nitrito em 50%. Para isso, o tecido vesical foi homogeneizado em 1 mL / 100 mg de tampão de fosfato de potássio (50 nM, pH 7,4). Cem microlitros do homogenato foram

adicionados a 1110 μL de tampão de fosfato, 75 μL de L-metionina (20 mM), 40 μL de Triton X-100 (1% v / v), 75 μL de cloreto de hidroxilamina (10 mM) e 100 μL de EDTA (50 μM). Esta solução foi incubada num banho maria a 37°C durante 5 minutos, depois foram adicionados 80 μL de solução de riboflavina (50 μM) e expostos à luz durante 10 minutos. A partir desta solução, foram retirados 100 μL da amostra e outros 100 μL de reagente de Griess foram adicionados em poços, e após 10 minutos, a absorbância foi lida a 550 nm por espectrofotometria em um leitor de ELISA. Além disso, a quantidade de proteínas totais foi determinada com um kit comercial da Labtest. Os resultados foram expressos como unidades de SOD/ μg de proteína (uSOD/ μg).

3.12 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido vesical

A concentração GSH foi determinada de acordo com o método proposto por Sedlak & Lindsay (1968). A determinação da glutathiona reduzida baseia-se na reação do DTNB [5,5 ditídio-bis-(ácido-2-nitrobenzóico)], com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido, o ácido 2-nitro-5-benzóico. Amostras do tecido vesical foram homogeneizadas em EDTA 0,02 M para conseqüente preparação de um homogenato a 10%. A seguir, alíquotas de 400 μL do homogenato foram adicionadas a 320 μL de água destilada e a 80 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Em seguida, o material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, 400 μL do sobrenadante foi retirado e misturado a 800 μL de tampão TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 20 μL de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi por fim agitada por 3 minutos e a absorbância foi mensurada a 412 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em μg de GSH/g de tecido.

3.13 Dosagem dos níveis teciduais de IL-1 β e TNF α por ELISA

O ensaio imunoenzimático foi realizado a temperatura ambiente 25 \pm 5 °C usando 100 μL de cada componente da reação. O TNF α e a IL-1 β foi avaliada por meio de kits padrão (R&D Systems, Inc) conforme diretrizes do produto. Os anticorpos e demais substratos foram diluídos em BSA (Albumina Sérica Bovina Isolada 1 % em PBS pH 7,4), e o tecido vesical foi homogenizado a 10 % em BSA 0,5% em PBS (pH 7,4).

As placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem PBS pH 7,4 + 0,05 % de Tween 20) entre as etapas.

Para realização do ELISA, revestiu-se cada poço da placa com a concentração ótima do anticorpo de captura pela incubação em overnigh (temperatura ambiente 25 ± 5 °C). Após bloqueio com BSA por 1 h, seguido de lavagem, as amostras e padrões foram distribuídos (padrões em duplicata) e incubados por 2 h. Após lavagem, adicionou-se o anticorpo biotilado de detecção e incubou-se por 2 h. Decorrido o tempo de incubação e sucedido de lavagem, a estreptoavidina foi incubada durante 20 minutos (sucedido de lavagem) e então a reação foi revelada pela incubação por 20 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz de substrato cromogênico TMB (tetrametilbenzidina + peróxido de hidrogênio), seguida de adição de inibidor da reação (H₂SO₄ 1M 100μL). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro de microplacas e os dados foram calculados a partir da curva dos padrões em concentração seriada, onde os resultados foram expressos em pg/mL.

3.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM (variáveis com distribuição normal). O teste de análise de variância (ANOVA) seguido de *post test* de comparações múltiplas de Newman-Keuls, Bonferroni's ou teste t de Student para comparar os grupos. O teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de comparação múltipla de Dunn's foi utilizado para comparar as médias quando as medições não paramétricas foram necessárias. Foi utilizado o programa Graphpad Prism 6.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) onde o valor de $p < 0,05$ foi usado para indicar diferenças estatisticamente significativas.

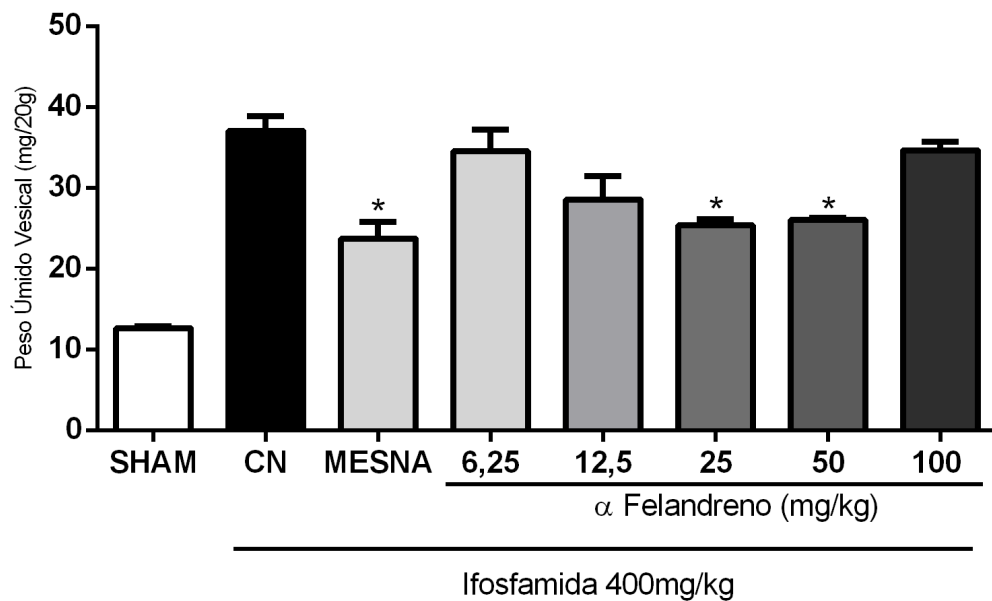
RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 O α -felandreno diminui o peso úmido das bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A **figura 9** demonstra que a administração de α -felandreno diminuiu significativamente ($31,59 \pm 0,8$ e $29,90 \pm 0,3\%$) o peso úmido vesical quando comparado com o controle negativo para as doses de 25 e 50 mg/kg, respectivamente. Além disso, os dados demonstram perda da atividade com o aumento da dose, onde a doses menores e a maior (6,25; 12,5 e 100 mg/kg) não demonstraram atividade significativa nesta avaliação.

Figura 9: Efeito do α -felandreno sobre o peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

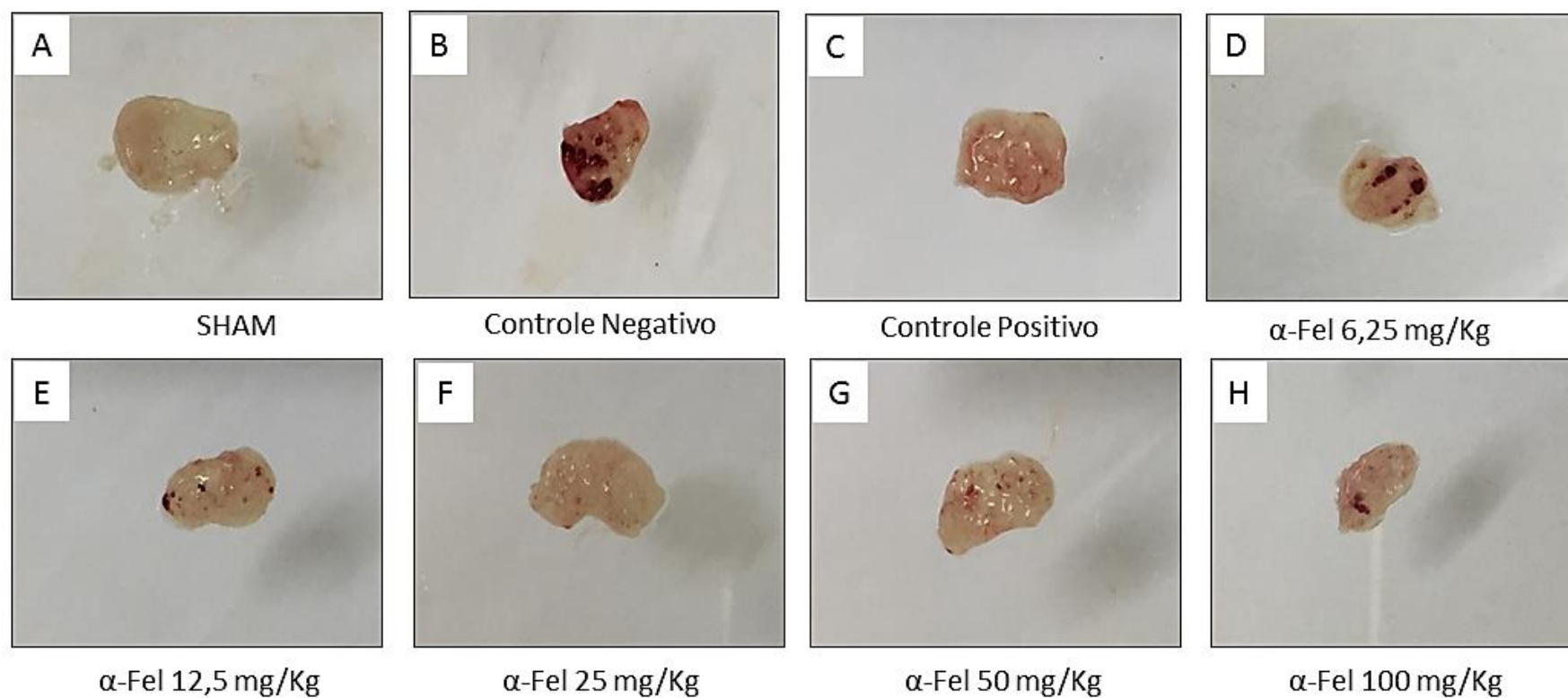


Legenda: Os dados estão expressos como média \pm E.P.M, (n=5) da relação do peso úmido das bexigas em relação ao peso do animal após o protocolo experimental (mg/20g de animal). Os valores foram comparados com o Controle Negativo (CN) (Tween/Salina), por Análise de variância (ANOVA), "one way" seguido do Teste de Bonferroni para um $p < 0,05$.

4.2 Efeito do α -felandreno sobre os parâmetros macroscópicos de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A **figura 10** demonstra imagens macroscópicas das bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Observa-se que as bexigas em condições fisiológicas (**seção A**) possuem pouca vascularização, além de aspecto liso e cor característica. Entretanto, no tecido vesical com cistite hemorrágica as alterações macroscópicas são bastante severas (**seção B**) e a bexiga se apresenta com edemas visíveis e múltiplos pontos de hemorragia. A utilização do MESNA foi capaz de reduzir acentuadamente a lesão (**seção C**). De modo semelhante, o pré-tratamento com o α -felandreno foi capaz de atenuar as lesões, especialmente nas doses de 25 e 50 mg/kg (**seções D a H**).

Figura 10: Efeitos do α -felandreno nos parâmetros macroscópicos da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Legenda: A – Grupo “Sham”, recebeu apenas salina como placebo, sem indução de cistite hemorrágica; B – Grupo Controle Negativo, recebeu indução de cistite hemorrágica e foi tratado com o veículo de diluição do fármaco testado (Tween/Salina); C – Grupo Controle Positivo, recebeu MESNA (2-mercaptotoetano-sulfonato de sódio) como padrão de pré e pós-tratamento; D, E, F, G e H – Grupos Teste, receberam pré-tratamento com o monoterpeneo α -felandreno (α -Fel)(6,25;12,5; 25; 50; 100 mg/kg). Todos os tratamentos foram por via intraperitoneal (ip), a escolha da imagem se deu por meio da seleção de uma bexiga considerada mediana entre seu grupo. O grupo SHAM consistiu apenas na administração de veículo aos animais não tratados.

4.3 Efeito do α -felandreno sobre os parâmetros histopatológicos de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A **Tabela 1** demonstra os parâmetros histopatológicos (edema e hemorragia) de tecido vesical dos animais. O α -felandreno, nas doses de 25 e 50 mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente o edema quando comparado com o grupo controle negativo. Entretanto, quando observado o parâmetro hemorragia, apenas a dose de 25 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente o dano hemorrágico (**Figura 10**).

Tabela 1: Avaliação histopatológica das bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e tratadas com α -felandreno

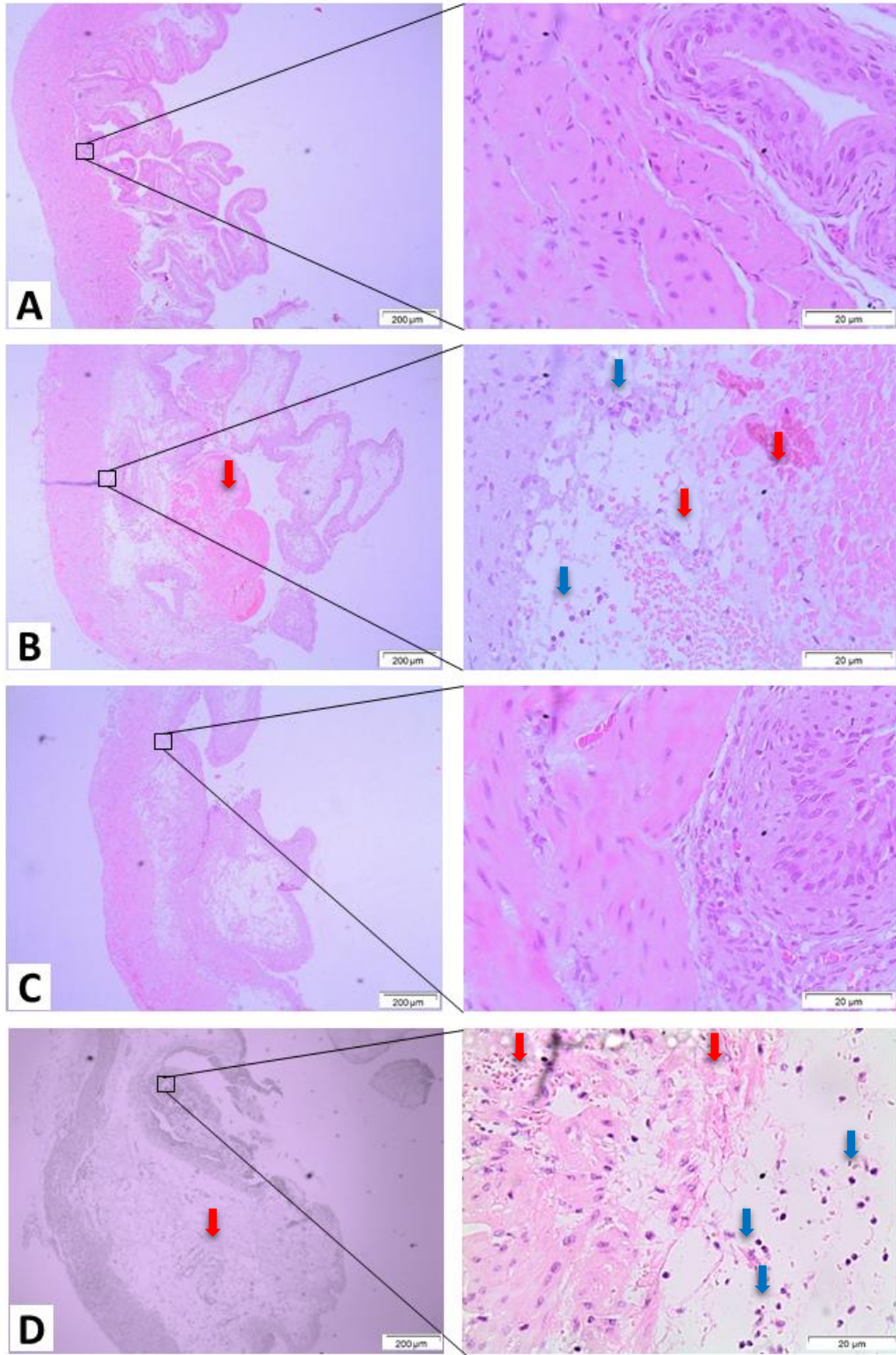
Grupos	Edema	Hemorragia
Veículo (SHAM)	0 (0-0)	0 (0-0)
Veículo +IFO (CN)	3,0 (3-3)	3,0 (3-3)
MESNA + IFO	0,6 (0-1)*	0,4 (0-1)*
α Fel 6,25 + IFO	1,8 (1-3)	1,4 (1-2)
α Fel 12,5 + IFO	1,2 (0-2)	1,4 (1-2)
α Fel 25 + IFO	1 (0-2)*	0,8 (0-2)*
α Fel 50+ IFO	1 (0-2)*	1,8 (1-3)
α Fel 100+ IFO	1,4 (1-2)	2,4 (2-3)

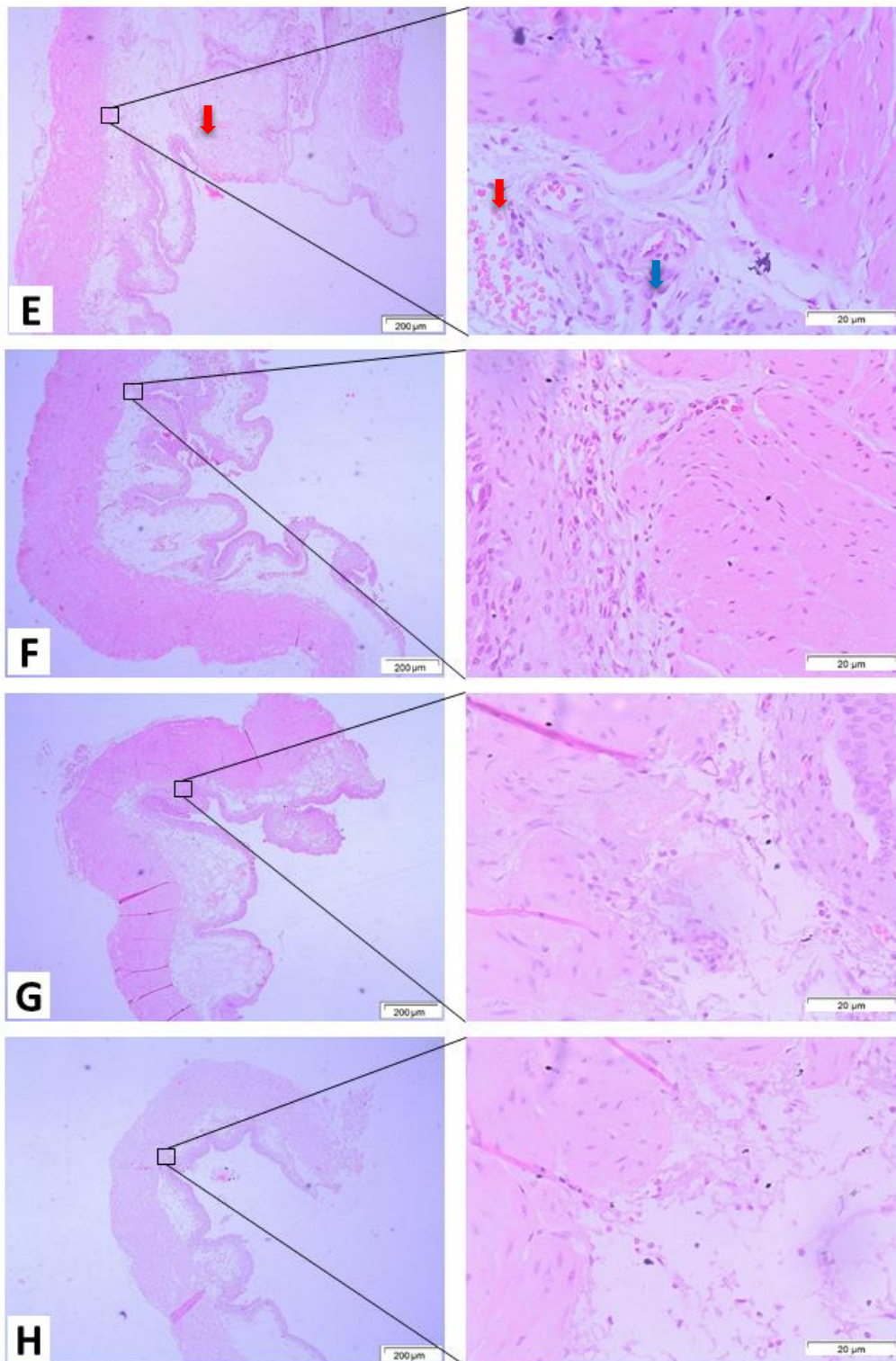
Legenda: Os dados (n=5) foram expressos no formato de média \pm limite e foram comparados com o controle negativo* (que recebeu apenas a indução com Ifosfamida e veículo) através do teste estatístico de Kruskal Wallis seguido de post teste de Dunn's para comparação entre grupos, considerando $p < 0,05$. (α Fel= α -felandreno).

A **Figura 11** demonstra o efeito do α -felandreno sobre os parâmetros histopatológicos das bexigas de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. O grupo Sham (**painel A**) apresenta pouca vascularização, possui aspecto liso e cor característica, ausência de ulcerações e edema (escore 0). O grupo Controle Negativo (**painel B**) demonstra alterações microscópicas severas e a bexiga se apresenta com edemas pronunciados e múltiplos pontos de hemorragia, perda celular, infiltrado de polimorfonucleados e ulceração acentuada (escore +3). O grupo MESNA (**painel C**) demonstra uma redução pronunciada das perdas celulares, hemorragia e

edema em relação ao grupo do controle negativo (escore +1). O grupo α -felandreno (α -Fel) 6,25 mg/kg (**painel D**) apresenta discreta diferença em relação ao grupo do controle negativo (escore +2). O grupo α -felandreno (α -Fel) 12,5 mg/kg (**painel E**) apresenta uma redução discreta das perdas celulares, hemorragia e edema, em relação ao grupo do controle negativo (escore +2). O grupo α -Fel 25 mg/kg (**painel F**) apresenta uma redução pronunciada das perdas celulares, hemorragia e edema, mostrando uma proteção aparente maior que o grupo 12,5 mg/kg (escore +1). O grupo α -Fel 50 mg/kg (**painel G**) demonstra uma redução aparente da hemorragia e edema em relação ao grupo do controle negativo, porém as perdas celulares se intensificaram (escore +2). O grupo α -Fel 100 mg/kg (**painel H**) apresenta uma redução aparente da hemorragia e edema em relação ao grupo do controle negativo, porém as perdas celulares estão acentuadas (escore +2).

Figura 11: Análises histopatológicas dos grupos experimentais.



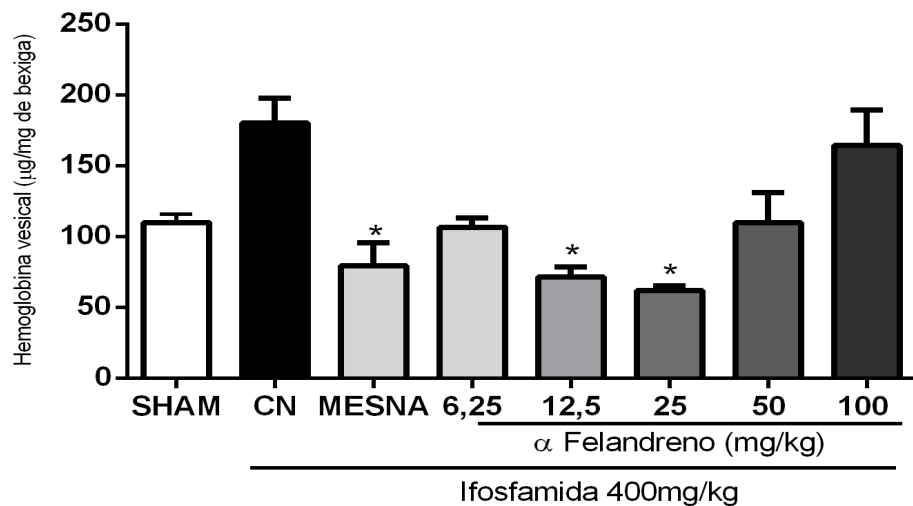


Legenda: Seção A: Grupo Sham, os animais foram tratados apenas com veículo; Seção B: Grupo Controle Negativo: os animais receberam pré tratamento com o veículo e receberam indução da cistite; Seção C: Grupo MESNA: os animais receberam pré e pós tratamento com MESNA e receberam indução da cistite; Seção D,E,F e G: Grupos teste que receberam as respectivas doses de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg como pré tratamento e receberam indução da cistite com dose única da Ifosfamida 400 mg/kg. Os tecidos foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). (↓) Hemorragia; (↓) Polimorfos nucleados.

4.4 O α -felandreno reduz os níveis de hemoglobina vesical dos animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A **Figura 12** apresenta os resultados da avaliação da hemoglobina tecidual pela técnica da cianometahemoglobina. Os dados demonstram uma redução de $40,7 \pm 6,3$; $60,4 \pm 7,2$; $65,65 \pm 3,5$ e $39,1 \pm 21$ % para as respectivas doses de 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/kg quando comparado com CN, porém apenas as doses de 12,5 e 25 mg/kg do α -felandreno e o grupo MESNA tiveram uma redução da hemoglobina vesical em níveis significativos, considerando $p < 0,05$.

Figura 12: Efeito do α -felandreno nos níveis de hemoglobina vesical dos animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

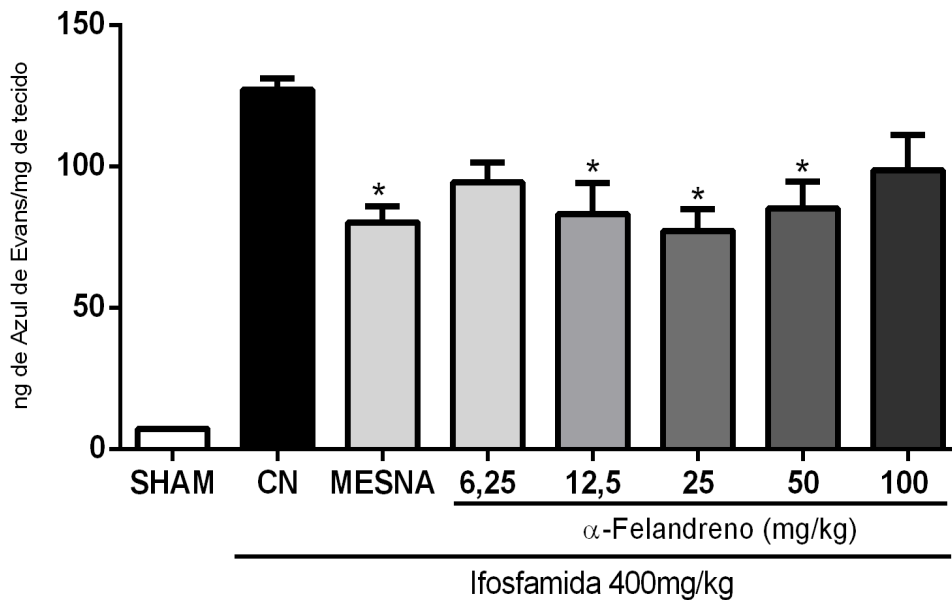


Legenda: Os dados estão expressos em µg de hemoglobina por 100 mg de tecido no formato de Média \pm E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Teste de Bonferroni para um $p < 0,05$.

4.5 O α -felandreno reduz o extravasamento vascular em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A **Figura 13** demonstra que o α -felandreno, nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg, foi capaz de reduzir o extravasamento vesical do azul de Evans em $34,7 \pm 11$; $39,3 \pm 8$ e $33,1 \pm 10$ %, respectivamente, considerando $p < 0,05$.

Figura 13: Efeito do α -felandreno no extravasamento vascular do Azul de Evans (AE) em bexigas com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

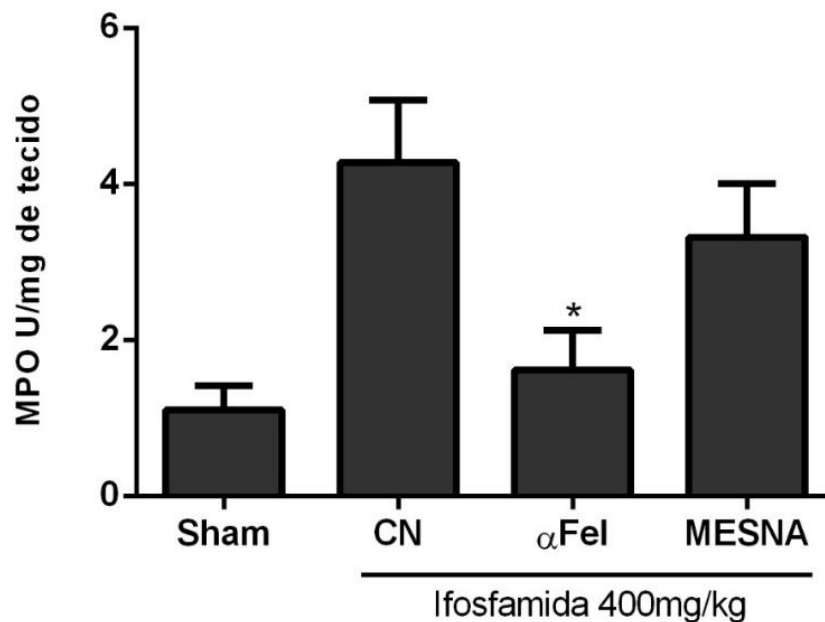


Legenda: Os dados estão expressos em ng de AE por mg de bexiga no formato de Média \pm E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Teste de Bonferroni para um $p < 0,05$.

4.6 O α -felandreno reduz os níveis de mieloperoxidase (MPO) em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A **Figura 14** demonstra que o α -felandreno, na melhor dose (25 mg/kg) reduziu significativamente os níveis de MPO ($62,13 \pm 1 \%$) nas lesões vesicais induzidas por ifosfamida ($P < 0.05$) quando comparado com o grupo negativo. Entretanto, o tratamento com MESNA não apresentou diferença estatística quanto a esse parâmetro.

Figura 14: Efeito do α -felandreno sobre os níveis de MPO no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

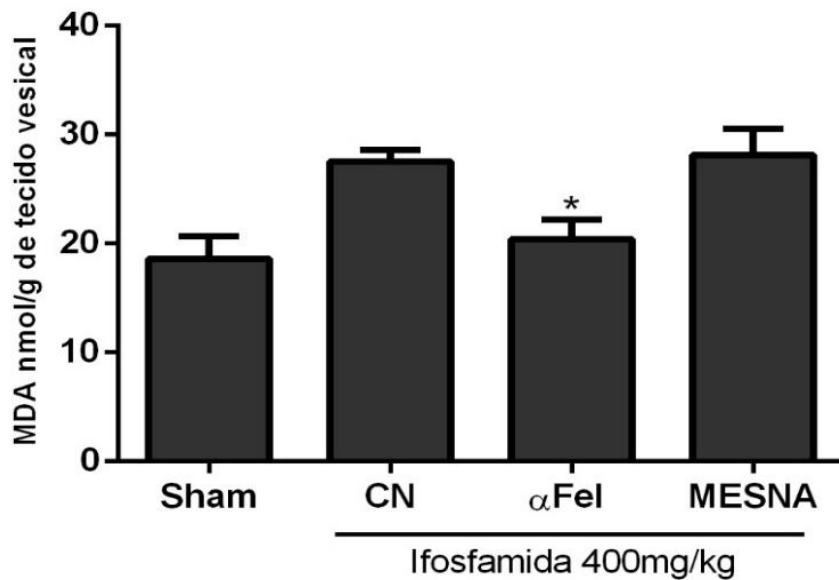


Legenda: Os dados estão expressos em Unidade de mieloperoxidase (U) por mg de tecido vesical no formato de Média \pm E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Student-Newman-Keuls para um $p < 0,05$.

4.7 O α -felandreno reduz os níveis de malondialdeído (MDA) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

Na **Figura 15** observa-se que o α -felandreno na dose de 25 mg/kg reduziu significativamente os níveis de MDA ($25,9 \pm 2$ %) quando comparado com o grupo lesivo ifosfamida ($P < 0.05$). Entretanto, o tratamento com MESNA não apresentou diferença estatística quanto a esse parâmetro.

Figura 15: Efeito do α -felandreno sobre os níveis de MDA no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

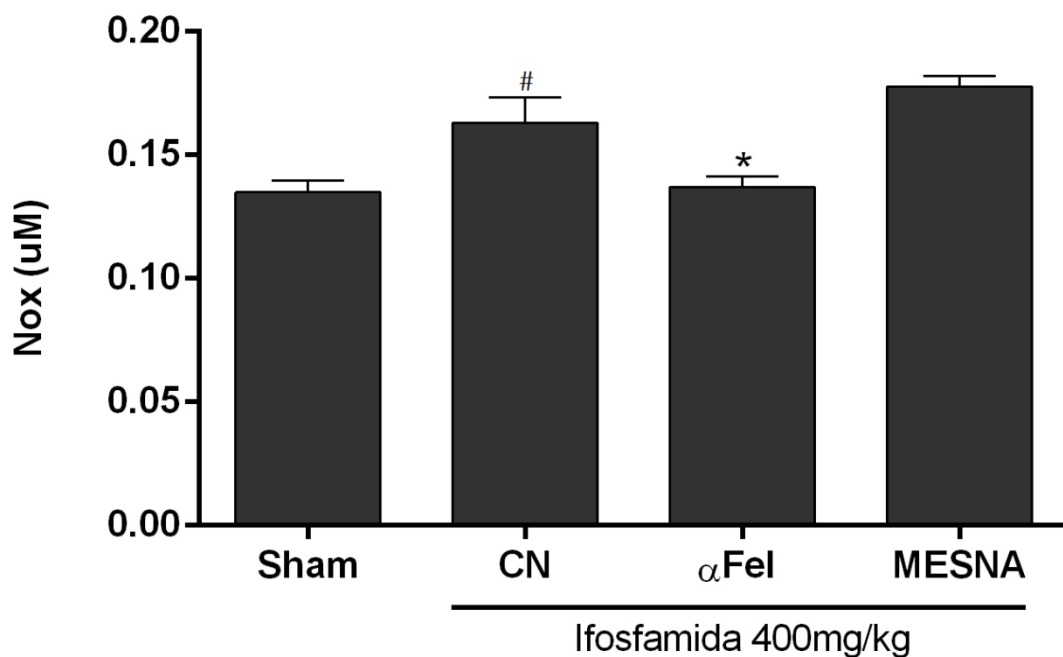


Legenda: Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Student-Newman-Keuls para um $p < 0,05$.

4.8 O α -felandreno reduz os níveis de nitrato/nitrito (NOx) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A **Figura 16** demonstra que a administração de ifosfamida elevou os níveis vesicais de nitrato/nitrito (NOx) quando comparados ao Sham. Por outro lado, o pré-tratamento com α -felandreno na dose de 25 mg/kg reduziu significativamente o NOx ($15,89 \pm 0,1 \%$) quando comparado com o controle negativo ($P < 0.05$). Entretanto, o tratamento com MESNA não apresentou diferença estatística quanto a esse parâmetro.

Figura 16: Efeito do α -felandreno sobre os níveis de nitrato/nitrito (NOx) no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

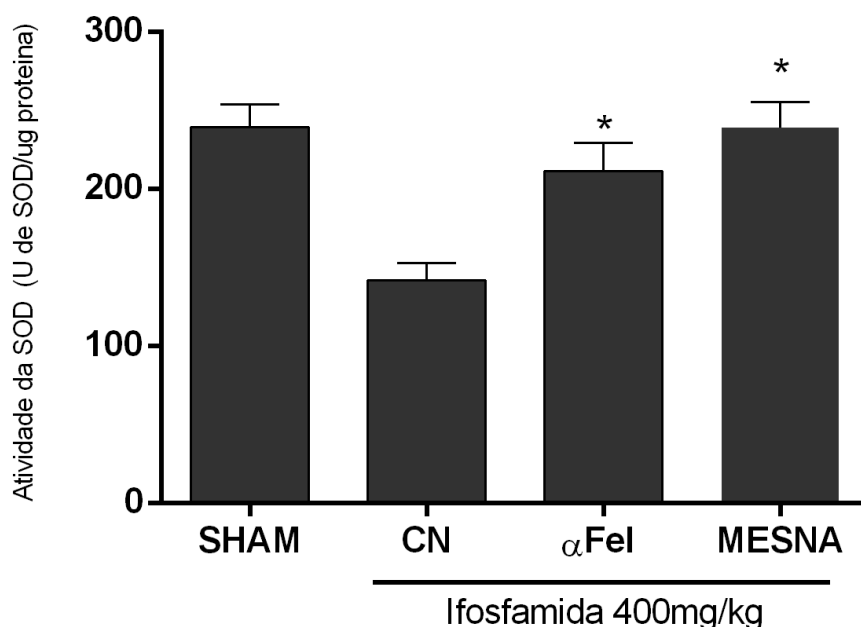


Legenda: Os dados estão expressos em μM de nitrito/nitrato, no formato de Média \pm E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o Sham[#] e controle negativo (Tween/Salina)^{*} por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Student-Newman-Keuls para um $p < 0,05$.

4.9 O α -felandreno mantém os níveis homeostáticos da superóxido dismutase (SOD) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A **Figura 17** demonstra que o tratamento com ifosfamida reduziu os níveis vesicais de SOD a $(59,2 \pm 11 \%)$ quando comparados ao Sham (normalizado como 100%). Entretanto, o pré-tratamento com α -felandreno na dose de 25 mg/kg foi capaz de manter os níveis de SOD a $88,17 \pm 18\%$. A análise estatística mostra ainda que o pré-tratamento oferece uma resposta de proteção de $49 \pm 18 \%$ à depleção dos níveis de GSH quando comparado com o grupo CN ($p < 0.05$). De modo semelhante, o tratamento com MESNA também foi capaz de manter os níveis enzimáticos de SOD ($99,87 \pm 16 \%$) e quando comparado com o controle negativo o MESNA preveniu a perda de $68,79 \pm 16 \%$ dos níveis de GSH.

Figura 17: Efeito do α -felandreno sobre os níveis de superóxido dismutase (SOD) no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

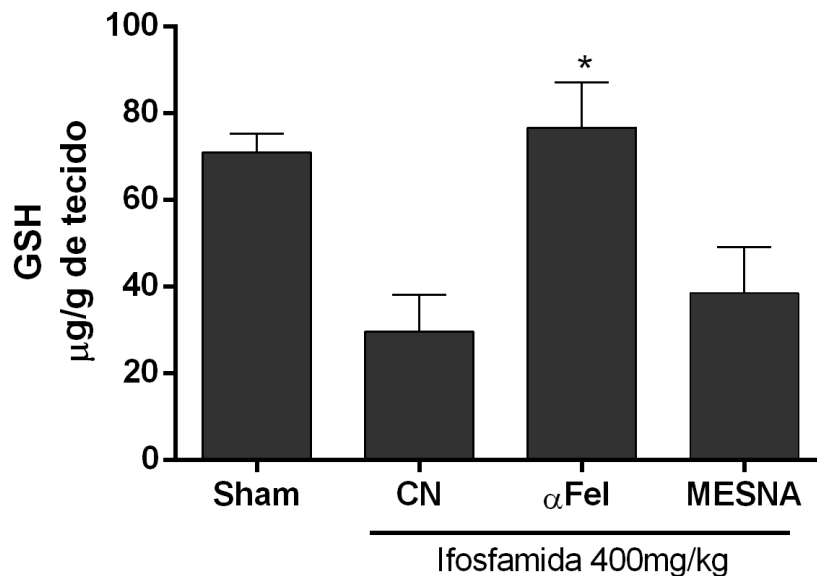


Legenda: Os dados estão expressos em Unidade de SOD/ μ g de proteína, no formato de Média \pm E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Student-Newman-Keuls para um $p < 0,05$.

4.10 O α -felandreno mantém os níveis homeostáticos da glutatona reduzida (GSH) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A **Figura 18** demonstra que o tratamento com ifosfamida reduziu os níveis vesicais de GSH a $(41,82 \pm 8 \%)$ quando comparados ao Sham (normalizado como 100%). Entretanto, o pré-tratamento com α -felandreno na dose de 25 mg/kg foi capaz de manter os níveis de GSH similares ao do grupo Sham. A análise estatística mostra ainda que o pré-tratamento oferece uma resposta significativa na proteção à depleção dos níveis de GSH quando comparado com o grupo do controle negativo. O MESNA não apresentou efeito significativo neste grupo.

Figura 18: Efeito do α -felandreno sobre os níveis de glutatona reduzida (GSH) no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

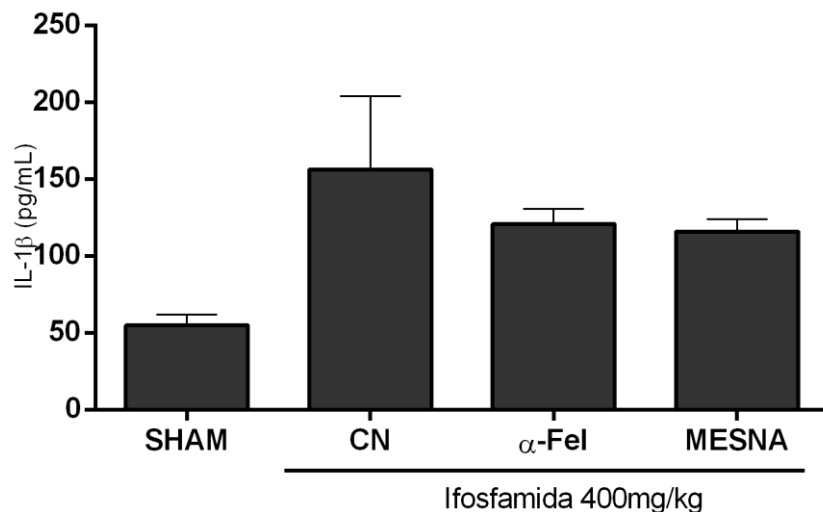


Legenda: Os dados estão expressos em μg de GSH por g de tecido, no formato de Média \pm E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Student-Newman-Keuls para um $p < 0,05$.

4.11 O α -felandreno é capaz de modular os níveis teciduais de citocinas inflamatórias

A **Figura 19** demonstra que o tratamento com ifosfamida aumentou os níveis vesicais de IL-1 β ($283,32 \pm 21$ %) quando comparados ao Sham (normalizado em 100%). Entretanto, o pré-tratamento com α -felandreno na dose de 25 mg/kg inibiu ($22,7 \pm 4$ % em relação ao CN) o aumento dos níveis de IL-1 β à $219,6 \pm 4$ %, e este achado não foi estatisticamente significativo quando em comparação com o CN ($p < 0,05$). A análise estatística mostra ainda que o MESNA não apresentou efeito significativo na redução da expressão desta citocina.

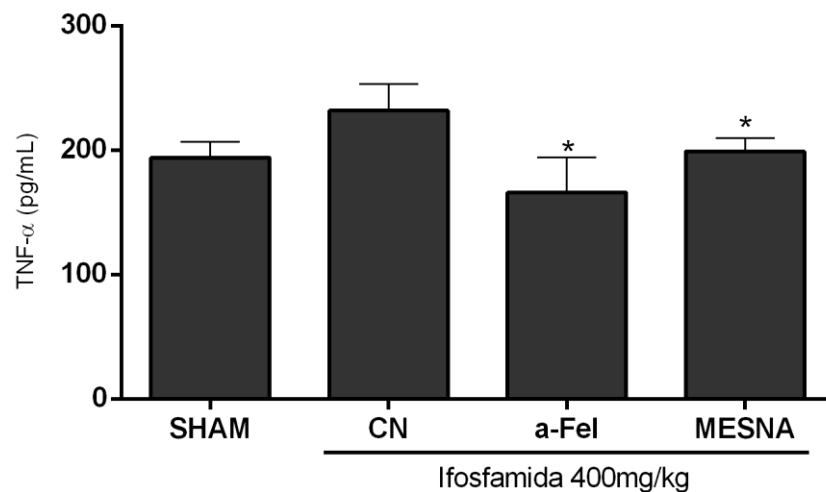
Figura 19: Efeito do α -felandreno sobre os níveis da interleucina IL-1 β no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Legenda: Os dados estão expressos em pg de IL-1 β por mL do homogenato do tecido vesical no formato de Média \pm E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Student-Newman-Keuls para um $p < 0,05$.

A **Figura 20** demonstra que o tratamento com ifosfamida aumentou os níveis vesicais de TNF- α ($119,46 \pm 9\%$) quando comparados ao Sham (normalizado em 100%). Entretanto, o pré-tratamento com α -felandreno na dose de 25 mg/kg inibiu ($28,45 \pm 11,5\%$ em relação ao CN) o aumento dos níveis de TNF- α à $85,47 \pm 11\%$, sendo uma redução significativa quando em comparação com o CN ($p < 0,05$). A análise estatística mostra ainda que o MESNA apresentou efeito significativo na redução da expressão desta citocina.

Figura 20: Efeito do α -felandreno sobre os níveis da interleucina TNF- α no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Legenda: Os dados estão expressos em pg de TNF- α por mL do homogenato do tecido vesical no formato de Média \pm E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Student-Newman-Keuls para um $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A cistite hemorrágica é o principal adverso ocasionado pelos quimioterápicos da classe das oxazafosforinas, e este quadro patológico se dá através da toxicidade do metabólito acroleína, onde este efeito adverso é considerado um fator limitante da terapêutica do câncer com esta modalidade de quimioterapia (SOUZA, et al., 2000; DECKER; KARAM; WILCOX, 2009). O metabólito acroleína pode se acumular na bexiga e, conseqüentemente, causar inflamação aguda e cistite hemorrágica, que por sua vez, promove uma ruptura da membrana intraluminal, viabilizando o seu contato com as camadas mais profundas do epitélio, o que induz deslocamento das células uroteliais a desenvolverem um típico processo inflamatório robusto, resultando histologicamente em edema subepitelial, infiltração de neutrófilos, hemorragia e destruição de tecido endotelial (THEMAN et al., 1987; GONZALEZ et al., 2005; MACEDO, 2010).

Para decidir a via de administração do fármaco, a via oral e intraperitoneal foram utilizadas em delineamentos de *screening*, porém foi obtida muita variabilidade de resposta nas análises das administrações pela via oral (dados não mostrados), tomando esta variação como um ponto negativo e ainda levando em consideração que as terapias paliativas para o manejo deste efeito adverso na clínica utilizam a via parenteral. Assim, o delineamento farmacológico foi realizado utilizando a via intraperitoneal).

A formação do edema característico, pode ser observada no nosso estudo, onde a análise indireta do peso úmido vesical médio do grupo controle negativo apresenta uma elevação considerável em relação ao grupo placebo (sham) e neste modelo o MESNA e o α -felandreno mostraram ser capazes de prevenir o surgimento do edema. Ainda neste contexto da indução inflamatória, em contraste com os resultados observados com os parâmetros macroscópicos, obteve-se uma resposta de redução do edema para as doses de 25 e 50 mg/kg, porém a atividade do α -felandreno sobre a hemorragia só se pronunciou de forma significativa na dose de 25 mg/kg. Estes mesmos resultados podem ser observados visualmente através das macroscopias que representam a mediana do seu grupo.

Esses dados ainda corroboram com os achados histológicos que demonstram que administração de ifosfamida provoca uma cistite hemorrágica com intensa

destruição celular e, neste contexto, é possível observar também que tanto o MESNA quanto o α -felandreno são capazes de atenuar a progressão da lesão, especialmente para as doses de 25 e 50 mg/kg, onde é possível ver uma diminuição da destruição celular, hemorragia e migração leucocitária. Assim a atividade citoprotetora do α -felandreno se evidencia nas avaliações de parâmetros observacionais, portanto, para delinear melhor esta avaliação, parâmetros quantitativos foram avaliados com base em premissas lógicas, para estabelecer dados mais sólidos de marcadores de dano tecidual que quantifiquem a lesão vesical em abordagem espectrofotométrica.

Dessa maneira, um dos achados clássicos da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas é a presença marcante de um extravasamento maciço de hemácias maduras e reticulócitos, caracterizado pela presença de macro e micro hematúria (CAMPOBASSO; BERRINO, 1972; FREITAS et al., 2017). Este parâmetro de hemorragia foi abordado de forma quantitativa através do doseamento da hemoglobina tecidual, que por sua vez é diretamente proporcional aos rompimentos vasculares ocorridos na bexiga. Assim, a quantidade e tamanho desses depósitos de hemoglobina na matriz extracelular do tecido vesical é proporcional à extensão do dano vesical ocasionado pelo metabólito do antineoplásico ifosfamida.

Os dados da avaliação revelaram uma atividade protetora do α -felandreno na hemorragia vesical, especificamente para as doses de 12,5 e 25 mg/kg, sendo observado uma reversão do efeito protetor deste monoterpene em doses superiores a 50 mg/kg, o que contribui portanto, para estabelecer uma margem terapêutica para sua utilização. Este efeito ainda pode ser acompanhado de alterações histológicas importantes, como diminuição da densidade epitelial, da densidade muscular e aumento aparente de grandes vasos no tecido vesical, determinando que as doses muito altas de α -felandreno podem ter seu efeito benéfico revertido por uma possível toxicidade intrínseca do próprio terpeno em doses elevadas. Este efeito se comporta como o descrito fenômeno de Hormese, que é muito observado quando se trabalha com derivados naturais (COOK; CALABRESE, 2007).

A parede dos vasos (endotélio) representa uma forma de interface protetora que separa o sangue dos tecidos, onde esta barreira é permeável à água, eletrólitos e pequenas moléculas, sendo que o calor, traumas ou os próprios mediadores da inflamação podem alterar a integridade e funcionalidade desta barreira, aumentando a permeabilidade aos elementos intravasculares (proteínas) (MESQUITA, 2008;

FRANCISCHETTI, 2010). A cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas já foi bem caracterizada e em modelo animal foi demonstrado que dentre seus metabólitos, a acroleína destaca-se como o agente irritativo do epitélio urotelial e que sua deposição pode causar um processo caracterizado por edema, ulceração, hemorragia e necrose no uroepitélio (BROCK, 1979; SILVA-JUNIOR, 2013).

Para quantificar de forma mais precisa a extensão do edema do tecido vesical, foi utilizado o corante azul de Evans, pelo fato de que este substrato cromogênico liga-se com alta afinidade à albumina sérica e este complexo tem sido frequentemente utilizado para avaliar de forma quantitativa a extensão do extravasamento vascular que acompanha a inflamação tecidual, consistindo em um método barato, preciso e eficiente, e que pode ser adaptado para avaliar o extravasamento em uma variedade de condições patológicas experimentais, em especial condições inflamatórias (KRZYZANOWSKA, 2010; RAMESH; MAHALASKHMI; SALAWADI, 2014).

Assim os resultados da avaliação da extensão da cistite hemorrágica com o azul de Evans demonstram que o α -felandreno nas doses de 12,5, 25 e 50 mg / kg é capaz de diminuir o extravasamento vascular de proteínas, assim consolidamos que o monoterpeneo α -felandreno possui potencial protetor da progressão da cistite hemorrágica induzida pelo antineoplásico ifosfamida. Este achado é compatível com o padrão de atividades anti-inflamatórias expressadas por monoterpeneos com estrutura química relacionada ao α -felandreno (ROMERO; ROMERO, 2014) como o Timol (RIELLA et al., 2012), Carvacrol (SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013) e Linalol (PEANA, et al., 2002).

Na cascata inflamatória, o neutrófilo é o primeiro tipo de leucócitos a entrar na lesão, estimulado por citocinas pró inflamatórias como as interleucinas 1, 2, 6, 7 e TNF α (Fator de Necrose Tumoral) (OLIVEIRA, et al., 2011), e podem constituir até 50% de todas as células presentes na lesão (FRANCISCHETTI, 2010; MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016). Assim, para melhor caracterizar o efeito citoprotetor do α -felandreno, recorreu-se à avaliação da mieloperoxidase para estabelecer o efeito protetor do monoterpeneo α -felandreno na inibição da formação da cistite hemorrágica.

A mieloperoxidase (MPO) é uma heme proteína produzida por neutrófilos e monócitos, que por sua vez é liberada pela ativação e pela degranulação dos leucócitos polimorfonucleares, sendo um marcador de estresse oxidativo endotelial onde há o envolvimento de neutrófilos (VELOSSA et al., 2013). A MPO por sua vez,

tem envolvimento em uma série de doenças degenerativas e vários autores discutem o envolvimento desse marcador em reações inflamatórias, e que esta enzima seja um alvo em potencial para doenças inflamatórias com degeneração celular (LEFKOWITZ; LEFKOWITZ, 2008).

Para esta avaliação foi utilizada a dose que melhor obteve resultados na avaliação funcional (25 mg/kg) e os dados mostram que o pré-tratamento com α -felandreno foi capaz de reduzir os níveis teciduais de mieloperoxidase de forma significativa no tecido vesical, mostrando que este terpeno é capaz de atenuar a migração neutrofílica para o tecido vesical durante uma inflamação induzida pelos metabólitos da ifosfamida. Esses achados sugerem que o α -felandreno é capaz de diminuir o processo de inflamação vesical induzido pela acroleína, dados esses que corroboram com as propriedades anti-inflamatórias delineadas por avaliações anteriores de nossa equipe, que apontou este monoterpeno como detentor de atividade anti-inflamatória (SIQUEIRA et al., 2016b).

Ainda no contexto da caracterização da atividade citoprotetora do α -felandreno, a investigação do efeito deste monoterpeno sobre a presença de marcadores de degeneração tecidual na progressão da cistite hemorrágica, foi avaliada através do doseamento dos níveis teciduais de malondialdeído. Os radicais livres têm a capacidade de modificar as reações que ocorrem nas células e causar deterioração de lipídios, proteínas e nucleotídeos presentes nas células do tecido (SUBRAMANYAM et al., 2018). O teste mais amplamente utilizado para a avaliação da peroxidação lipídica é o doseamento da concentração de MDA tecidual, pois o mesmo é um dos principais produtos finais da peroxidação lipídica, que é usado como um biomarcador da lesão da membrana celular causada principalmente pelo ataque de radicais livres de hidroxila OH^{\bullet} (GODINHO et al., 2018; SUBRAMANYAM et al., 2018).

Para investigar o papel do dano tecidual decorrente do processo inflamatório pela lesão induzida por antineoplásico, a avaliação dos níveis de MDA foi realizada para quantificar indiretamente a peroxidação lipídica no tecido vesical e o efeito do α -felandreno na atenuação do estresse oxidativo celular, mostrando que o pré-tratamento com este monoterpeno foi capaz de reduzir significativamente os níveis teciduais de MDA no tecido vesical, frente ao modelo experimental de cistite hemorrágica. Estes dados corroboram com achados na literatura, pois Cabral et al.,

(2015) demonstraram que o α -felandreno possui elevada atividade antioxidante, avaliada através da presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Assim, os resultados mostram que o α -felandreno possui atividade moduladora da agressão celular decorrente da peroxidação lipídica, e que esta atividade lhe confere propriedades bastante promissoras em relação ao MESNA, pois este apenas se ativa em ambiente ácido (na urina) por meio de hidrólise e age como um quelante químico da acroleína, formando um produto estável e não tóxico, que por sua vez é eliminado pela urina, não causando danos ao tecido vesical (TAKAMOTO; SAKURA; NAMERE, 2004; CHABNER; LONGO, 2015; TELES et al., 2017).

O MESNA também é utilizado na clínica para o tratamento da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas (SOUZA et al., 2000). Possui atividade antioxidante que é atrelada ao seu grupo tiol, tendo ação de proteção à agressividade química de compostos carbonilantes, sendo comparada à N-acetil-cisteína e cisteína em modelo de carbonilação de proteínas do soro (MACALLISTER et al., 2013), e possui relatos de diminuição dos níveis de MPO e redução de EROS em doses de 300 a 400 mg/kg (MILLER; MURLEY; GRDINA 2014; TRIANTAFYLLIDIS et al., 2016). Por outro lado, sua atividade em prevenir a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, segundo Rosa (2004), não é tão eficaz por conta de sua meia vida baixa (>0,5 horas), além de ter um custo muito alto.

Os achados na literatura tornam mais consistentes o potencial citoprotetor do α -felandreno, pois em delineamentos anteriores foi demonstrado que este monoterpene possui potencialidade de reduzir os níveis de mieloperoxidase e citocinas pró inflamatórias (IL-1 β e TNF α) no modelo de inflamação por edema de pata (SANTOS, 2015), o que fornece subsídios para teorizar que a redução da cistite hemorrágica pelo α -felandreno tem relação positiva com a modulação de sistemas endógenos de regulação inflamatória e proteção antioxidante. Neste contexto, a pesquisa de um fármaco que traga atividades citoprotetoras dependentes de modulações das defesas antioxidantes endógenas é uma proposta com boas premissas (SOUSA et al., 2000).

Assim, para avaliar a interação do α -felandreno com mecanismos celulares envolvidos na extensão da inflamação, avaliamos o efeito deste monoterpene na modulação dos níveis de espécies reativas de nitrogênio (equilíbrio nitrosativo), através dos metabólitos nitrito/nitrato (NO x), já que a mensuração do radical NO \cdot

torna-se difícil pelo fato deste radical possuir uma meia-vida curta, sendo a mensuração de seus metabólitos nitrito/nitrato (NO_x) mais adequada para avaliar a produção de NO[•] (ALMEIDA, 2014).

O estresse nitrosativo é um processo que ocorre em paralelo com o estresse oxidativo, e acontece quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e o consumo dessas espécies, podendo causar danos nas membranas celulares como peroxidação lipídica, mudanças na estrutura e função de proteínas decorrentes da sua oxidação ou ainda danos à estrutura do DNA (KURUTAS, 2015; KIM et al., 2015; GOMES, 2017). As ERNs merecem atenção especial como agentes oxidantes endógenos, sendo a principal delas o óxido nítrico (NO[•]), um radical livre abundante no organismo que atua como importante molécula de sinalização em vários processos biológicos, entretanto o excesso de produção de NO[•] pode se tornar prejudicial, já que a reação do NO[•] com o O^{2•-} forma o peroxinitrito (ONO^{2•-}), uma molécula altamente reativa, que pode reagir com grupamentos de proteínas, lipídios ou DNA e ocasionar graves danos às células.

Neste contexto, o α -felandreno mostrou-se capaz de reduzir os níveis de moléculas reativas derivadas do óxido nítrico (NO_x) no tecido vesical, característica esta que não foi compartilhada pelo fármaco padrão em utilização no mercado (MESNA), e este potencial protetor da formação de espécies químicas danosas no meio tecidual é visto como sendo uma característica promissora para um citoprotetor, (SOUSA et al., 2000).

A relação entre o estresse oxidativo e nitrosativo é tênue, pois os elementos podem se combinar para formar compostos altamente reativos e em alta velocidade, como pode ser observado na formação de peroxinitrito (ONO^{2•-} por reação de O^{2•-} com NO[•]) (VASCONCELOS et al., 2011). Por outro lado, tem-se um complexo sistema de defesa endógeno para proteger os tecidos da lesão celular induzida por EROs e ERN's. Esse sistema antioxidante pode ser dividido em enzimático, onde se destacam enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutatona peroxidase e a tioredoxina; não enzimático hidrofílico, composto por proteínas, ácido úrico, ácido ascórbico, selênio e zinco; e não enzimático lipofílico, em que se destaca o α -tocoferol (KURUTAS, 2016; COSTA, 2016). A SOD é a enzima antioxidante que mais merece destaque visto que sua função enzimática final resulta tanto na diminuição de ERO's quanto de ERN's. Sua ação de dismutação do ânion superóxido (O^{2•-}) é capaz de

diminuir o substrato para a formação de peroxinitrito ($\text{ONO}^{2\cdot-}$), porém, a atividade da SOD é reduzida quando há elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio, especialmente ($\text{O}^{2\cdot-}$) (VASCONCELOS et al., 2011).

Com base nestas observações, que qualificam a atividade da SOD como um bom marcador de estresse oxidativo, este estudo delineou sua atividade, onde o monoterpeneo α -felandreno foi capaz de manter os níveis da SOD em comparação com o controle negativo, mostrando que este monoterpeneo é capaz de prevenir o consumo da atividade da enzima SOD pela formação de espécies reativas de oxigênio. Estes dados confirmam os de Santos (2015) que mostrou que o α -felandreno diminuiu o desgaste da atividade da SOD em um modelo de inflamação clássica (edema de pata em camundongo).

As defesas antioxidantes também possuem mecanismos não enzimáticos, dessa forma, a glutathiona (GSH), um tripeptídeo encontrado intracelularmente em altas concentrações, é um agente de grande importância na biotransformação e eliminação de radicais livres. Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), que por sua vez é altamente polarizável, sendo um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos de alta reatividade, tornando a GSH um bom redutor (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). A combinação de suas particularidades (ubiquidade e abundância nas células) e das propriedades químicas do grupo sulfidril suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra espécies reativas de oxigênio e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive, sendo, portanto, uma molécula citoprotetora (SANTOS, 2016).

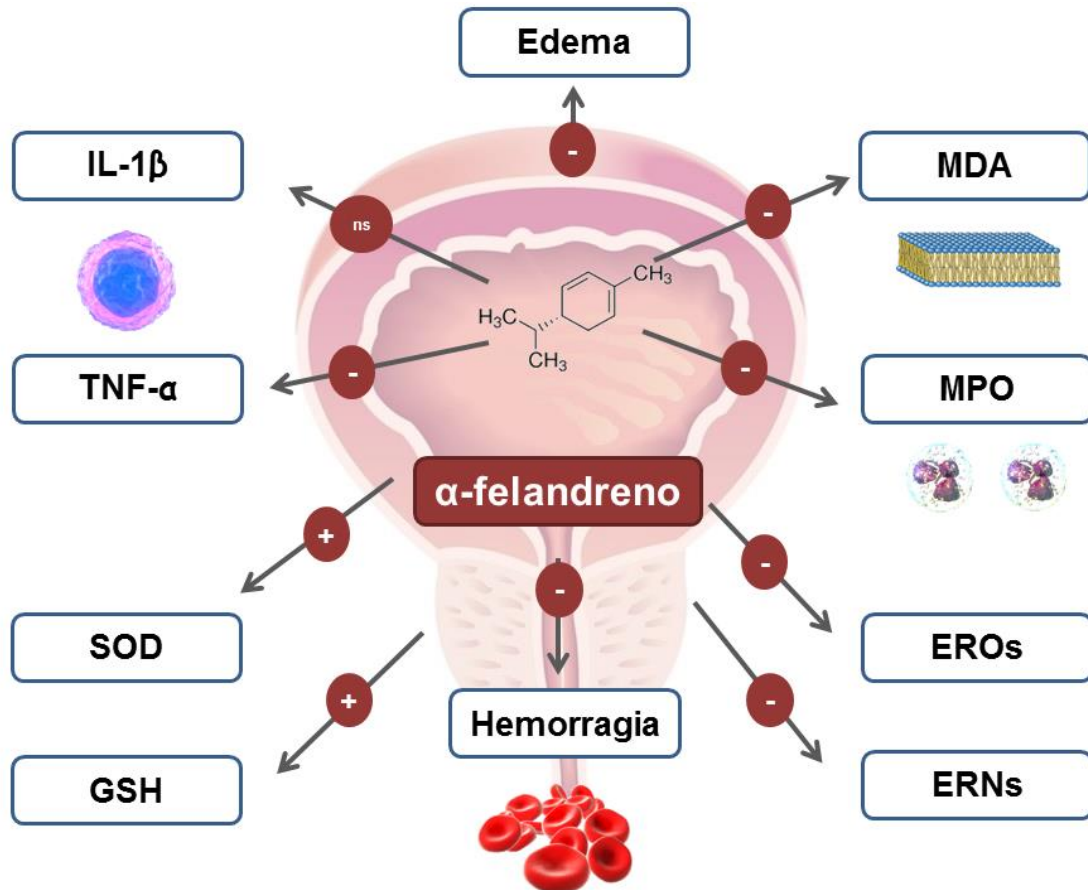
Sabe-se que os níveis intracelulares de GSH dependem do balanço entre o seu consumo (oxidação) e de sua síntese e neste contexto é sabido que o metabólito das oxazafosforinas (acroleína) reage rapidamente com compostos intracelulares, particularmente com a GSH (KEHRER; BISWAL, 2000). Em adicional se reconhece que a acroleína livre induz geração de radicais livres de oxigênio, como ânion superóxido e radical hidroxil, bem como pode iniciar a peroxidação lipídica (BATISTA, 2002). Dessa forma este trabalho doseou os níveis teciduais de GSH e os achados apontaram que tanto o MESNA quanto o monoterpeneo α -felandreno foram capazes de manter os níveis teciduais de GSH, visto que o tratamento com o monoterpeneo preveniu a perda de GSH em condições de indução da cistite, o que demonstra que

tanto o MESNA quanto o α -felandreno interferem na progressão da formação de compostos oxidantes induzidos pela acroleína no tecido vesical, onde o MESNA atua por meio de reações envolvendo seu grupo sulfidrílica (CHABNER; LONGO, 2015; TELES et al., 2017) e o α -felandreno pelo seu potencial antioxidante já previamente determinado (CABRAL, 2015). O MESNA, apesar de sua atividade antioxidante graças à seu grupo sulfidrílico, não apresentou atividade nesta avaliação (CHABNER; LONGO, 2015; TELES et al., 2017).

No processo de progressão do dano urotelial induzido pela ação tóxica da acroleína, tem-se uma sinalização inflamatória das células epiteliais e do tecido conjuntivo com os macrófagos teciduais, promovendo um aumento local de citocinas pró-inflamatórias, principalmente do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da interleucina 1 β (IL-1 β) (RIBEIRO et al., 2012). O Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina inflamatória que é produzida em resposta à infecções/agressões teciduais, sendo considerado o mediador primário da inflamação (ULLOA; TRACEY, 2005). O excesso de TNF- α torna-se deletério, induzindo a ativação de outras citocinas, bem como do sistema oxidativo celular, os quais promovem inflamação, ativação dos neutrófilos, aumentando sua habilidade em destruir microrganismos, ativa mastócitos, amplifica e prolonga a inflamação, além de estimular a fagocitose e a produção de oxidantes culminando em destruição tecidual (VARELLA; FORTE 2018; LIU et al., 2018). A IL-1 possui função similar à do TNF- α e induz a resposta inflamatória sistêmica em resposta a um agravo inicial (STUMPF, 2014).

Na conjuntura da importância destas citocinas na progressão do dano tecidual, este trabalho analisou os níveis teciduais de TNF- α e IL-1 β através da técnica do ELISA sanduíche, mostrando que o monoterpeneo α -felandreno é capaz de diminuir de forma significativa o aumento das concentrações teciduais do (TNF- α).

Figura 21: Resumo das atividades do α -felandreno na prevenção da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Legenda: IL-1 β (Interleucina 1 beta); TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa); SOD (Superóxido Dismutase); GSH (Glutaciona reduzida); Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN's); Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's); Mieloperoxidase (MPO); Malondialdeído (MDA); (-) diminui; (+) aumenta; (ns) resposta não significativa.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- ✓ Evidenciou-se o potencial protetor do α -felandreno na prevenção do dano tecidual causado pelo quimioterápico ifosfamida.
- ✓ Foi possível observar o efeito deste monoterpene na atenuação da hemorragia, edema e migração neutrofílica no processo inflamatório da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida;
- ✓ Demonstrou-se o efeito redutor do α -felandreno sobre os parâmetros do estresse oxidativo peroxidação lipídica tecidual através do marcador Malondialdeído (MDA) e dosagem de Nitrito (NO_2^-)/Nitrato (NO_3^-),
- ✓ Esclareceu-se a atividade redutora do α -felandreno sobre antioxidantes endógenos (Superóxido Dismutase –SOD e Glutathiona Reduzida – GSH);
- ✓ O α -felandreno mostrou potencial efeito inibidor da elevação dos níveis teciduais de Fator de Necrose Tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) na inflamação tecidual causado pela quimioterapia com ifosfamida.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, P.; RABI, S.; SELVAKUMAR, D. Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress and bladder injury in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rat. **Cell biochemistry and function**, v. 27, n. 1, p. 56–62, 2009.

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407–426, 2010.

AL-MALKI, A. Synergistic effect of lycopene and melatonin against the genesis of oxidative stress induced by cyclophosphamide in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 6, p. 5705, 2014.

ALMEIDA, T.C. **EVALUATION OF INTERFERENCE FACTORS IN PRE-ANALYTICAL MEASUREMENT OF METABOLITES OF NITRIC OXIDE AND DETERMINATION OF REFERENCE INTERVALS FOR A HEALTHY POPULATION**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

ANDRE, W.P.P; RIBEIRO, W.L.C; OLIVEIRA, L.M.B; MACEDO, I.T.F; RONDON, F.C.M.; BEVILAQUA, C.M.L. Óleos essenciais e seus compostos bioativos no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1522, 2018.

ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A.B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.B.; THARAKAN, S.T.; LAI, O.S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B.B. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2097–2116, 2008.

ANDRIOLE, G.L.; SANDLUND, J.T.; MISER, J.S.; ARASI, V. LINEHAN, M.; MAGRATH, I.T. The efficacy of mesna (2-mercaptoethane sodium sulfonate) as a uroprotectant in patients with hemorrhagic cystitis receiving further oxazaphosphorine chemotherapy, **Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 5, p. 799–803, 1997.

ARJOUNI, M.Y.; BAHRI, F.; ROMANE, A.; EL FELS, M.A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Cupressus atlantica*. **Natural Product Communications**. v. 6, n. 10, p. 1519–1522, 2011.

ASBAGHIAN, S.; SHAFAGHAT, A.; ZAREA, K.; KASIMOV, F.; SALIMI, F. Comparison of volatile constituents, and antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *Thymus caucasicus*, *T. kotschyanus* and *T. vulgaris*, **Natural Product Communications**, v. 6, n. 1, p. 137 –140, 2011.

BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R. D.; MUSCARÁ, M.N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.

BATISTA, C.K.L.P. **MODELO DE CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR INJEÇÃO INTRAVESICAL DE ACROLEÍNA – EFEITO UROPROTETOR DE COMPOSTOS TIÓIS (MESNA, GLUTATIONA E AMIFOSTINA)**. 2002. 189 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Departamento de Fisiologia e Farmacologia da

Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618–22, set. 1982.

BROCK, N.; STEKAR, J.; POHL, J.; NIEMEYER, U.; SCHEFFLER, G. Acrolein, the causative factor of urotoxic side-effects of cyclophosphamide, ifosfamide, trofosfamide and sufosfamide. **Arzneimittel-Forschung**, v. 29, n. 4, p. 659–61, 1979.

CABRAL, C.; POÇAS, J.; GONÇALVES, M.J.; CAVALEIRO, C.; CRUZ, M.T.; SALGUEIRO, L. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 65, n. 1, p. 56–61, 2015.

CALIXTO, J.B.; KASSUYA, C.A.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. **Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions**. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 106, p. 179 - 208, 2017.

CAMPOBASSO, O.; BERRINO, F. Early effects of cyclophosphamide on mouse bladder epithelium. **Pathologia et microbiologia**, v. 38, n. 2, p. 144–57, 1972.
CANNON, J.; LINKE, C.A.; COS, L.R. Cyclophosphamide-associated carcinoma of urothelium: modalities for prevention. **Urology**, v.38, n. 5, p.413-6, 1991.

CARLOS, J.; VELLOSA, R.; PARABOCZ, G.C.; MANENTE, F.A.; RIBAS, J.T.; LIMA, L.W. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de ciências farmacêuticas básicas e aplicadas**, v. 34, n. 3, p. 305–312, 2013.

CARR, A.C.; VISSERS, M.C.; COOK, J. Relief from cancer chemotherapy side effects with pharmacologic vitamin C. **New Zealand medical journal**, v. 127, p. 66–70, 2014.

CICOGNA, E.C.; NASCIMENTO, L.C.; LIMA, R.A.G. Children and Adolescents with Cancer: experiences with Chemotherapy. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 18, n. 5, p.864-872, 2010.

CHABNER, B.A.; LONGO, D.L. **Manual de Oncologia de Harrison**. 2. ed. 2015.

CHABNER, B.A. Agentes Antineoplásicos. In: GOODMAN L.S.; GILMAN A. **As Bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006.

COSTA, N.A. **Avaliação da atividade eritrocitária da superóxido dismutase 1 como biomarcador precoce do desenvolvimento de lesão renal aguda em pacientes com choque séptico**. 2016. 77 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2016.

COOK, R.; CALABRESE, E.J. The importance of hormesis to public health. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 4, p.955-963, ago. 2007.

DAS, K; SAMANTA, L; CHAINY, G.B.D. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 37, p. 201-204, 2000.

DECHANT, K.L.; BROGDEN, R.N.; PILKINGTON, T.; FAULDS, D. Ifosfamide/MESNNA. A review of its antineoplastic activity, pharmacokinetic, properties and therapeutic efficacy in cancer. **Drugs**, v. 42, p. 428-467, 1991.

DECKER, D.B.; KARAM, J.A.; WILCOX, D.T. Pediatric hemorrhagic cystitis. **Journal of Pediatric Urology**, Londres, p. 254-264, 2009.

ERAZO, S.; DELPORTE, C.; NEGRETE, R.; GARCIA, R.; ZALDIVAR, M.; ITURRA, G.; CABALLERO, E.; LOPEZ, J.L.; BACKHOUSE, N. Constituents and biological activities of *Schinuspolygamus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p.395-400. 2006.

ESSIEN, E.E.; OGUNWANDE, I.A.; N. SETZER, W.N.; EKUNDAYO, O. Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxicity studies on *S. erianthum* and *S. macranthum* essential oils, **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 4, p. 474–480, 2012.

FRANCISCHETTI, I. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Brazilian Journal Of Cardiovascular Surgery**, São José do Rio Preto, v. 25, n. 4, p. 575-584, 2010.

FREEDMAN, A.; EHERLICH, R.M.; LJUNG, B.M. Prevention of cyclophosphamide cystitis with 2-mercaptoethane sodium sulfonate: a histologic study. **The Journal of Urology**, v. 132, n. 3, p. 580-583, 1984.

FREITAS, T. M. DE; FERREIRA, F. C. S.; RODRIGUES, F. A. DE P.; COSTA, K. H. A.; HAVT, A.; BINDA, A. H. **EFEITO UROPROTETOR DO 6-GINGEROL NA**

CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDO POR IFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS.

XXXVI Encontro de Iniciação Científica, v. 2, n. 1, p. 1169, 2017.

GODINHO, J.; SA-NAKANISHI, A. B. DE; MOREIRA, L. S.; OLIVEIRA, R. M. W. DE; HUZITA, C. H.; MELLO, J. C. P.; SILVA, A. O. F. DA; NAKAMURA, C. V.; PREVIDELLI, I. S.; RIBEIRO, M. H. D. M.; MILANI, H. Ethyl-acetate fraction of *Trichilia catigua* protects against oxidative stress and neuroinflammation after cerebral ischemia/reperfusion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 221, p.109-118, 2018.

GOMES, Bruna Rafaela Bezerra. **Análise da produção de Espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio durante a febre e a antipirese em ratos.** 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

GONZALEZ, R.R.; FONG, T.; BELMAR, N.; SABAN, M.; FELSEN, D.; TE, A. Modulating bladder neuro-inflammation: RDP58, a novel anti-inflammatory peptide, decreases inflammation and nerve growth factor production in experimental cystitis. **The Journal of Urology**, 2005.

GRAY, K.J.; ENGELMANN, U.H.; JOHNSON, E.H.; FISHMAN, I.J. Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (Cytosan) therapy. **The Journal of urology**, v. 136, n. 2, p. 497–500,1986.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–8,1982.

GRESSIER, B; CABANIS, A; LEBEGUE, S. et al. Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: Comparison in vitro of some thiol-containing drugs. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 16, n. 1, p. 9-13 1994.

GUIMARÃES, A.G. Aplicação De Terpenos Como Agentes Analgésicos: Uma Prospecção Tecnológica. **Proceeding of ISTI/SIMTEC**, v. 2, n. 1, 33–39, 2014.

HAJHASHEMI, V.; ABBASI, N. Hypolipidemic activity of *Anethum graveolens* in rats, **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 3, p.372 –375, 2008.

HAMILTON, G.; RATH, B. A short update on cancer chemoresistance. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 164, p. 456–460, 2014.

HAROLD, J.; DRABKIN, L. Spectrophotometric studies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 51–65, 1935.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro; EAD/INCA; 2017.

JURADO, J.M.; JURADO GARCÍA, J.M.; SÁNCHEZ, A.; PAJARES, B.; PÉREZ, E.; ALONSO, L.; ALBA, E. Combined oral cyclophosphamide and bevacizumab in heavily pre-treated ovarian cancer. **Clinical & translational oncology**, v. 10, n. 9, p. 583–6, 2008.

KAKDE, D.; JAIN, D.; SHRIVASTAVA, V.; KAKDE, R.; PATIL, A.T. cancer therapeutics- opportunities, challenges and advances in drug delivery. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 01, n. 09, 01-10, 2011.

KANAT, O; KURT, E; YALCINKAYA, U; EVRENSEL, T; MANAVOGLU, O. Comparison of uroprotective efficacy of mesna and amifostine in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Indian Journal of Cancer**, v. 43, n. 1, p. 12–5, 2006.

KATZ, A.; EPELMAN, S.; ANELLI, A.; GORENDER, E.F.; CRUZ, S.M.; OLIVEIRA, R.M.; MARQUES, L.A.A. A prospective randomized evaluation of three schedules of MESNA administration in patients receiving an ifosfamide-containing chemotherapy regimen: sustained efficiency and simplified administration. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 121, n. 1, p. 128-131, 1995.

KEHRER, J.P.; BISWAL, S.S. The molecular effects of acrolein. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 57, n. 1, p. 6–15, set. 2000.

KELES, I; BOZKURT, M.F.; CEMEK, M.; KARALAR, H.; HAZINI, U.M.; ALPDAGTAS, S.; KELES, H.; YILDIZ, T.; CEYLAN, C.; BUYUKOKUROGLU, M.E. Prevention of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis by resveratrol: a comparative experimental study with mesna. **International Urology and Nephrology**, v. 46, n. 12 p. 2301-2310, 2014.

KIM, G.H.; KIM, J.E.; RHIE, S.J. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325-340, 2015.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. Rediscovering natural products as a source of new drugs, **Discovery medicine**, v. 5, p. 159–164, 2005.

KORKMAZ, A.; OTER, S.; DEVECI, S.; OZGURTAS, T.; TOPAL, T.; SADIR, S.; BILGIC, H. Involvement of nitric oxide and hyperbaric oxygen in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. **The Journal of Urology**, v. 170, n. 6, p. 2498-2502, 2003.

KRZYZANOWSKA, A.G.I; MARTIN, Y.; AVENDANO, C.; PIEDRAS, M.J. Evaluation of Evans Blue extravasation as a measure of peripheral inflammation. **Nature Protocol Exchange**, p.1-7, 15 dez. 2010.

KUMAR, V.; ABUR, A.; JON, A. **Patologia**: bases patológicas da doença. Rio de Janeiro: Elsevier, 9ª ed. 2016.

KURUTAS, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 71, 25 dez. 2015.

KURUTAS, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition journal**, v. 15, n. 1, p. 71, 2016.

LEFKOWITZ, D.L.; LEFKOWITZ, S.S. Microglia and myeloperoxidase: A deadly partnership in neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 726–731, set. 2008.

LIMA, D.F.; BRANDÃO, M.S.; MOURA, J.B.; LEITÃO, J.M.R.S.; CARVALHO, F.A.A.; MIÚRA, L.M.C.V.; LEITE, J.R.S.A.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, F.R.C. Antinociceptive activity of the monoterpene alpha-phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 283-292, 2011.

LIMA, M. DA S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTANA, W. A. DE; MARTINS KANETO, C.; PEREIRA SOARES, M. B.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. **European journal of pharmacology**, v. 699, n. 1–3, p. 112–7, 2013.

LIU, Y.; MU, F.; LIU, L.; SHAN, C. Effects of Kangfuxin solution on IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α in gingival crevicular fluid in patients with fixed orthodontic gingivitis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 16, n. 1, p. 300–304, jul. 2018.

MACALLISTER, S.L.; MARTIN-BRISAC, N.; LAU, V.; YANG, K.; O'BRIEN, P.J. Acrolein and chloroacetaldehyde: An examination of the cell and cell-free biomarkers of toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 202, n. 1–3, p. 259–266, 2013.

MACEDO, F.Y.B. **EFEITO PROTETOR DA INTERLEUCINA- 4 (IL- 4) NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS**. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MACEDO, F.Y.B.; MOURÃO, L.T.C.; PALHETA, R.C.; JUCÁ, D.M.; LIMA, R.C.P.; NETO, J.S.C.; MAGALHÃES, P.J.C.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.H.L.P.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A. Cyclooxygenase-2 contributes to functional changes seen on experimental hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide in rat urinary bladder. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 935–43, abr. 2011.

MAHBOUBI, M.; MAHDIZADEH, E.; TABAR, R.H. The chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Pycnocycla spinosa* and *Pycnocyca flabellifolia* essential oils. **Naturforsch**, v. 71, n.11, p.403-408 2016.

MATZ, E.L.; HSIEH, M.H. Review of Advances in Uroprotective Agents for Cyclophosphamide- and Ifosfamide-induced Hemorrhagic. **Cystitis Urology**, v. 100, p. 16–19, fev. 2017.

MEACHAM, C.E.; MORRISON, S.J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. **Nature**, v. 501, p.328-37, 2013.

MEDEIROS, A.C.; DANTAS FILHO, A.M. Healing of surgical wounds. **Journal of Surgical and Clinical Research**, v. 7, n. 2, p. 87–102, 2016.

MELNICK, S.J. Developmental therapeutics: review of biologically based CAM therapies for potential application in children with cancer: part I. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 28, p.221–230, 2006.

MERCK Index. 9th ed. Rahway, New Jersey: Merck and Co., Inc., p. 932, 1976.

MESQUITA JR, D.; ARAÚJO, J.A.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.; CRUVINEL, W.M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Revista Brasileira de Medicina**, v.(nd), p.66-81, 2008.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 271–278, maio 1978.

MILLER, A.B.; HOOGSTRATEN, B.; STAQUET, M.; WINKLER, A. Reporting results of cancer treatment. **Cancer**, v. 47, p. 207-214, 1981.

MILLER, R.C.; MURLEY, J.S.; GRDINA, D.J. Metformin Exhibits Radiation Countermeasures Efficacy When Used Alone or in Combination with Sulfhydryl Containing Drugs. **Radiation Research**, v. 181, n. 5, p. 464–470, 2014.

MILAN, A.J.G; ALVAREZ, Y.G; SOL, M.G; CABREIRA, P.L. Patrón de consumo de antineoplásicos utilizados para el tratamiento del cáncer en La Habana del 2011-2015. **Horizonte sanitário**, vol. 17, n.1, 2018.

MOURÃO, L.T.C. **ENVOLVIMENTO DE ÓXIDO NÍTRICO E DE CANAIS DE POTÁSSIO DEPENDENTES DE ATP NO EFEITO PROTETOR DA AMIFOSTINA SOBRE AS ALTERAÇÕES MOTORAS FUNCIONAIS E INFLAMATÓRIAS DA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA**. 2012. 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2012.

NASCIMENTO, A.F.; CAMARA, C.A.; MORAES, M.M.; RAMOS, C.S. Essential oil composition and acaricidal activity of *Schinus terebinthifolius* from Atlantic Forest of Pernambuco, Brazil against Tetranychusurticae, **Natural Product Communications**, v. 7, n. 1, p. 129–132, 2012.

OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255–265, 2011.

OLIVEIRA, M.G.; CALMASINI, F.B.; ALEXANDRE, E.C.; DE NUCCI, G.; MÓNICA, F.Z.; ANTUNES, E. Activation of soluble guanylyl cyclase by BAY 582667 improves bladder function in cyclophosphamide-induced cystitis in mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 311, n. 1, pág. F85–F93, 2016.

OPDYKE, D.L.J. Monographs on fragrance raw materials. Alpha-phellandrene. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 16, p. 843-844, 1978.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Estimativa 2030** – Incidência de Câncer Mundial, 2014.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, jan. 2007.

PADUCH, R.; SZERSZEŃ, M.K.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 55, n. 1, p. 315–327, 2007.

PEANA, A.T.; D'AQUILA, P.S.; PANIN, F.; SERRA, G.; PIPPIA, P.; MORETTI, M.D.L. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 9, n. 8, p. 721–6, dez. 2002.

PERAZELLA, M.A. Onco-nephrology: renal toxicities of chemiotherapeutic agents. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, p. 1713–1721, 2012

POPOVICI, J.; BERTRAND, C.; BAGNAROL, E.; FERNANDEZ, M.P.; COMTE, G. Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity, **Natural Product Research**, v. 22, n. 12, p. 1024–1032, 2008.

RAMESH, B.N.; MAHALAKSHMI; A.M.; SHALAWADI, M. Vascular permeability and Evans blue dye: a physiological and pharmacological approach. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 11, n. 4, p. 106-113, 2014.

RIBEIRO, R.A.; FREITAS, H.C.; CAMPOS, M.C.; SANTOS, C.C.; FIGUEIREDO, F.C.; BRITO, G.A.C.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **The Journal of urology**, v. 167, n. 5, p. 2229–34, maio 2002.

RIBEIRO, R.A.; LIMA-JUNIOR, R.C.P.; LEITE, C.A.V.G. Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis : pathogenesis , pharmacological approaches and new insights. **Journal of Experimental and Integrative Medicine**, v. 2, n. 2, p. 95–112, 2012.

RIELLA, K.R.; MARINHO, R.R.; SANTOS, J.S.; PEREIRA-FILHO, R.N.; CARDOSO, J.C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C.; THOMAZZI, S.M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656–63, 28 set. 2012.

ROMERO, R.B.; ROMERO, A.L. Inibição de Ciclooxygenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) por Monoterpenos : um Estudo in Silico Cyclooxygenase 1 (COX-1) and 2 (COX-2) Inhibition by Monoterpenes : an in Silico Study. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e Saúde**, v. 16, n. 4, p. 307–316, 2014.

ROSA, D.D. Uso de Citoprotetores Use of Cytoprotectans. **Oncologia Baseada em Provas**, v. 1, n. 1, p. 43–50, 2004.

SAK, K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents, **Chemotherapy Research and Practice**, v. 22, n. 3, p. 1-11, 2012.

SAKURAI, M. et al. The protective effect of 2-mercapto-ethane sulfonate (MESNA) on hemorrhagic cystitis induced by high-dose ifosfamide treatment tested by a randomized crossover trial. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 2, p. 153–156, 1986.

SANTOS, J.F. **EFEITO CARDIOPROTETOR DO TIMOL EM CORAÇÕES DE RATOS SUBMETIDOS À LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO**. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2016.

SANTOS, W.C. **α -FELANDRENO APRESENTA EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO: ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS ANTIOXIDANTES, INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E DA LIBERAÇÃO DE TNF- α E IL-1 β** . 2015. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–205, 1968.

SENCER, S.F.; HAAKE, R.J.; WEISDORF, D.J. Hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation. **Transplantation**. v. 56, p. 875-879, 1993.

SHAW, I.C.; GRAHAM, M.I. Mesna—a short review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 14, n. 2, p. 67–86, jun. 1987.

SILVA, A.A.; CARLOTTO, J.; ROTTA, I. **Padronização da ordem de infusão de medicamentos antineoplásicos utilizados no tratamento dos cânceres de mama e colorretal**. Einstein. São Paulo-SP; v. 16, n. 2, p. 1-9, 2018.

SILVA JUNIOR, R.N.C.; FIALHO, E.M.S.; ASSUNÇÃO, A.K.M.; MACHADO, J.L.; ARRUDA, D.; FURTADO, P.G.R.; GONÇALVES FILHO, A.; NASCIMENTO, F.R.F. Caracterização do modelo inflamatório de cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos Swiss. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 55–67, 2013.

SILVA, D.L.F.; BRAGA FILHO, J.A.F.; SOUSA, A.K.S.; FORTES, T.; AMARAL, F.M.M.; SILVA, L.A.; GUERRA, R.N.M.; GONÇALVES FILHO, A.; PEREIRA, W.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Potencial anti-inflamatório das folhas de *Chenopodium*. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 17, n. 1, p. 25–32, 2015.

SILVA, F.V.; GUIMARÃES, A.G.; SILVA, E.R.S.; SOUSA-NETO, B.P.; MACHADO, F.D.F.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ARCANJO, D.D.R.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, R.C.M. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 11, p. 984–91, nov. 2012.

SIQUEIRA, H.D.S.; NETO, B.S.; SOUSA, D.P.; GOMES, B.S.; DA SILVA, F.V.; CUNHA, F.V.M.; WANDERLEY, C.W.S.; PINHEIRO, G.; CÂNDIDO, A.G.F.; WONG, D.V.T.; RIBEIRO, R.A.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; OLIVEIRA, F.A. α -Phellandrene, a cyclic monoterpene, attenuates inflammatory response through neutrophil migration inhibition and mast cell degranulation. **Life Sciences**, v. 160, n. 1, p. 27–33, 2016a.

SIQUEIRA, H.D.S.; NETO, B.S.; SOUSA, D.P.; GOMES, B.S.; CUNHA, F.V.M. OLIVEIRA, F. Antiedematogenic effect of alpha-phellandrene in animal models. **Current Bioactive Compounds**, v. 12, n. 2, p. 107-113, 2016b.

SKINNER, R. Nephrotoxicity – what do we know and what don't we know? **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 33, p.128–34, 2011.

SOMANI, S.J.; IVERSEN, T.Z.; OKERA, M.; MUHIC, A.; KRISTENSEN, G.; FEYER, P.; HERRSTEDT, J. Phytochemicals and Their Potential Usefulness in Inflammatory Bowel Disease. **Phytotherapy Research**, v. 29, n.13, 2015.

SOUZA, C.A.; VIGORITO, A.C.; ARANHA, F.J.P; OLIVEIRA, G.B.; EID, K.A.B.; RUIZ, M.A. Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 2, p.123-128, 2000.

SOUZA, M.T.S.; GUIMARÃES, A.G.; ARAUJO, A.A.S.; JÚNIOR, L.J.Q. Monoterpenos com atividade anti-inflamatória: uma prospecção tecnológica. **Geintec**, v. 4, n. 2, p. 867–875, 2014.

SUBRAMANYAM, D.; GURUNATHAN, D.; GAAYATHRI, R.; PRIYA, V.V. Comparative evaluation of salivary malondialdehyde levels as a marker of lipid peroxidation in early childhood caries. **European journal of dentistry**, v. 12, n. 1, p. 67–70, 2018.

SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 768-780, 2003.

TAKAMOTO, S.; SAKURA, N.; NAMERE, A. Monitoring of urinary acrolein concentration in patients receiving cyclophosphamide and ifosfamide. **Journal**

Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 806, p. 59-63, 2004.

TELES, K.A.; SOUZA, P.M.; LIMA, F.A.C.; ARAÚJO, G.A.; R.A.C. Rotina de administração de ciclofosfamida em doenças autoimunes reumáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 6, p. 596-604, 2017.

THEMAN, H., OBERDORF, E., BROCK, N., POHL, J. Electron microscopic investigations of cyclophosphamide-induced lesions of the urinary bladder of the rat and their prevention by MESNA. **Urologia Internationalis**, v. 42, n. 1, p. 37-43, 1987.

ULLOA, L.; TRACEY, K.J. The “cytokine profile”: a code for sepsis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 56–63, 2005.

VARELLA, P.P.V; FORTE, W.C.N. Citocinas : revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 244, p. 1–7, 2018.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; SILVA, M.A.M.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; RABELO, L.A.; FONTES, G. Original Article Markers of Redox Imbalance in the Blood of Hypertensive Patients of a Community in Northeastern Brazil. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v. 97, n. 2, p. 141–147, 2011.

VELLOSA, J.C.R.; PARABOCZ, G.C.; MANENTE, F.A.; RIBAS, J.T.; LIMA, L.W. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Ponta Grossa, p. 305-312, 2013.

VENDRUSCOLO, A.; TAKAKI, I.; BERSANI-AMADO, L.E.; DANTAS, J.A.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Antiinflammatory and antinociceptive activities of zingiberofficinale roscoe essential oil in experimental animal models. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 38, p. 58-59, 2006.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

YASEEN, Z.; MICHOUDET, C.; BAVEREL, G.; DUBOURG, L. *In vivo* mesna and amifostine do not prevent chloroacetaldehyde nephrotoxicity *in vitro*. **Pediatric Nephrology**, v. 23, p. 611-619, 2008.

YOO, K.Y.; SHIN, H.R. Cancer epidemiology and prevention. **Korean Journal of Epidemiology**, v. 25, p. 1-15, 2003.

