



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



LUCAS SOLYANO ALMEIDA DE OLIVEIRA

**GALATO DE ISOPROPILA COMO INIBIDOR DE CISTITE HEMORRÁGICA
INDUZIDA POR IFOSFAMIDA EM MODELO EXPERIMENTAL**

TERESINA

2019



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



LUCAS SOLYANO ALMEIDA DE OLIVEIRA

**GALATO DE ISOPROPILA COMO INIBIDOR DE CISTITE HEMORRÁGICA
INDUZIDA POR IFOSFAMIDA EM MODELO EXPERIMENTAL**

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^o. Dr. Francisco de Assis Oliveira

TERESINA
2019

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

O48g Oliveira, Lucas Solyano Almeida de.
Galato de isopropila como inibidor de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em modelo experimental / Lucas Solyano Almeida de Oliveira. –
– Teresina, 2019.
74 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2020.
Orientação: Profº. Dr. Francisco de Assis Oliveira.
Bibliografia

1. Cistite Hemorrágica. 2. Ifosfamida. 3. Galato de Isopropila. 3. Quimioterapia antineoplásica. 4. Polifenóis. I. Título.

CDD 616.6

Elaborada por Fabíola Nunes Brasilino CRB 3/ 1014

LUCAS SOLYANO ALMEIDA DE OLIVEIRA

**GALATO DE ISOPROPILA COMO INIBIDOR DE CISTITE HEMORRÁGICA
INDUZIDA POR IFOSFAMIDA EM MODELO EXPERIMENTAL**

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^o. Dr. Francisco de Assis Oliveira

Data da Aprovação: _____ de _____ de 2019

Prof^o Dr. Francisco de Assis Oliveira

(Orientador)

Prof^o Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho

(Examinador Interno)

Prof^o Dr. Luciano da Silva Lopes

(Examinador Externo)

TERESINA

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE GRADUAÇÃO

Profa. Dra. Maria do Socorro Leal Lopes

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

COORDENADORA DO PROGRAMA

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, agradece-se a Deus, por me da saúde, sabedoria e determinação para o termino desse Mestrado e o inicio de novos projetos. Segundo, gostaria de agradecer a minha mãe, Ana Lucia, que sempre me incentivou a ir além, sempre financiou meus estudos, apostou na minha determinação, obrigado por todas as nossas vitórias. Além disso, quero agradecer ao meu pai, Sorisvaldo, *in memoriam* por sempre colocar a educação dos filhos em primeiro lugar e, mesmo com convívio de 9 anos juntos apenas, sempre soube do exemplo e caminho que deveria seguir com meus irmãos, dos quais gostaria de agradecer, Matheus Solyano e Manuela Solyana, por todo o apoio e alegrias que vocês proporcionam ao nosso lar.

O agradecimento é estendido a toda minha família, Meu Padrasto, Cortez, que mostrou que nunca é tarde para lutarmos pelos nossos sonhos, a Nide, que durante esses 2 anos fazia meu almoço, e isso foi muito importante para conciliar por um tempo 2 empregos e um mestrado na área que eu queria. Diante disso, não posso deixar de agradecer ao meu orientador, professor, Dr Francisco de Assis, por toda paciência, dedicação, puxões de orelha na hora certa, e sempre acreditou que iríamos fazer um bom trabalho, agradecimentos também a professora Fernanda, e a todos os Professores do Nppm, por contribuírem, com conhecimento, dedicação e força nas tarefas arduas que conduzem a pós-graduação ao melhor resultado, aos Profissionais do NPPM: Josy, Carlos, Adeline e Patricia, por sempre ajudarem quando era necessário.

Quero agradecer aos meus amigos de Laboratorio: Benedito, Sara, Valmor, Bruno, Rodrigo, Diana e Gabi, muito obrigado por tudo meus amigos. Em especial quero agradecer ao Rodrigo Gonçalves, por me ensinar as técnicas e manuseio das bexigas, quero agradecer a Diana por ajudar como aluna de iniciação científica, quero agradecer ao Ian, por toda a ajuda nos experimentos que pareciam infundáveis.

Aos meus amigos Carlos, Everton, Flaviano, Laercio, Daniel, por ajudarem nos experimentos finais e sempre darem aquele apoio, quero agradecer minha amiga Lorena Braz por tudo, desde a graduação até a conclusão desse mestrado, agradecimentos também aos amigos de turma do mestrado: Rodolfo, Ingrid, Lorraine, Ray, Jessica, Isabela, Joselma, José Victor, Monique, Suylane, Mariana e Mikael.

A Minha namorada, Mara, quero agradecer a todo apoio emocional dado durante essa trajetória. Quero agradecer, também, aos meus avós, Gustavo e Maria de Lourdes, por toda

admiração pessoal e inspirações como pessoas, e a minha avó Rosa, por ensinamentos e exemplo de luta e garra.

Lucas Solyano Almeida de Oliveira

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

[...] Os Livros não mudam o mundo, eles mudam as pessoas e estas sim, mudam o mundo.

Mario Quintana

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AE: Azul de Evans
ALDLH1: Aldeido desidrogenase 1
ANOVA: Análise de Variância
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
DMSO: Ácido Dimetil-sulfóxido
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*
GIP : Galato de Isopropila
GSH: Glutationa reduzida
H&E: Hematoxilina e Eosina
H₃PO₄: Ácido Fosfórico
HTAB: Brometo de hexadecitrimetilamônio
i.p: Intraperitoneal
IFOS: Ifosfamida
IL: Interleucina
IL-1 β : Interleucina 1 – beta
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
MDA: Malondialdeído
MESNA: 2-mercaptotoetano-sulfonato de sódio
MPO: Mieloperoxidase
MUV: Massa úmida vesical

NF-kB: Fator nuclear kappa B

NO[•]: Óxido Nítrico

NO₂⁻: Nitrito

NO₃⁻: Nitrato

NOx: Metabólitos do óxido nítrico

O₂^{-•}: Ânion Superóxido

OE: Óleo Essencial

R²: Coeficiente de Correlação

rpm: Rotações por minuto

SOD: Superóxido Dismutase

TBAR's: Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido Tricloroacético

TNF – α: Fator de Necrose Tumoral Alfa

TPA- 2-Otetradecanoilforbol- 13-acetato

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Estruturas químicas da CFA (A) e IFOS (B)	22
Figura 2: Metabolismo da Ifosfamida e efeitos adversos.	23
Figura 3: Mecanismo farmacológico da acroleína no aumento da produção de mediadores inflamatórios.	24
Figura 4: interferência do MESNA no metabólito urotóxico das oxazafosforinas (acroleína).	26
Figura 5: Representação molecular do Galato de Isopropila.	28
Figura 6: Esquema de indução da cistite hemorrágica em camundongos	34
Figura 7: Curva de calibração para doseamento de hemoglobina por espectrofotometria em 450nm.	37
Figura 8: Curva de calibração para doseamento do Azul de Evans por espectrofotometria em 550nm.	38
Figura 9: Efeito do GIP sobre o peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	43
Figura 10: Efeitos do GIP nos parâmetros macroscópicos da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	44
Tabela 1.0: Avaliação histopatológica das bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida: efeito protetor do GIP sobre os parâmetros de edema e hemorragia.	45
Figura 11: Análises Histopatológicas dos grupos experimentais	47
Figura 12: Efeitos do GIP nos níveis de hemoglobina vesical dos animais com cistite	49
Figura 13: Efeito do GIP no extravasamento vascular do Azul de Evans (AE) em bexigas com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.hemorrágica induzida por ifosfamida.	50
Figura 14: Efeito do GIP sobre os níveis de MDA no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	51
Figura 15: Efeito do GIP sobre os níveis de superóxido dismutase (SOD) no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	52

Figura 16: Efeito do GIP sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	53
Figura 17 - Efeito do Galato de Isopropila na determinação quantitativa ultrasensível de proteína C-reativa (PCR) em amostras de soro por imunoturbidimetria	54
Figura 18: Efeito do GIP sobre os níveis de IL-1 β no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	55
Figura 19: Efeito do GIP sobre os níveis da interleucina TNF- α no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifofamida.	56
Figura 20: Resumo da atividade do GIP na prevenção da CH induzida por IFOS	63

RESUMO

RESUMO

A Cistite hemorrágica é o principal efeito adverso dose-limitante do uso clínico das oxazafosforinas, incluindo a ifosfamida (IFOS). 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 disso, identifica-se uma necessidade para o desenvolvimento de um citoprotetor eficaz que possa vir a ser utilizado como adjuvante na terapia oncológica com as oxazafosforinas. Os derivados do ácido gálico possuem efeitos antineoplásicos, anti-inflamatórios e antioxidantes, o que pressupõe que o galato de isopropila (GIP) seja potencialmente útil na pesquisa de novos protótipos que possam mitigar reações inflamatórias agudas induzidas por IFOS. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi analisar o efeito protetor do GIP frente à cistite hemorrágica induzida por IFOS em modelo animal. O modelo de cistite hemorrágica foi induzido por dose única do antineoplásico IFOS, precedido de pré-tratamento com salina ou GIP (6,25; 12,5; 25; 50 mg/kg, vo) em *Mus musculus* (CEUA 453/2017). Para analisar a redução do dano foram avaliados a massa úmida vesical (MUV), teor de hemoglobina, o extravasamento do corante azul de Evans na matriz vesical e a Proteína C reativa (PCR) por um método imunoturbidimétrico. As citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) foram dosadas por técnica de imunoenensaio ELISA. Os dados de inibição foram calculados em relação ao controle negativo (CN) e as significâncias calculadas considerando $p < 0,05$. Os resultados mostram que o pré-tratamento com o GIP (12,5 e 25 mg/kg) reduziu significativamente em 29,73% e 36,86%, respectivamente, a massa úmida vesical e atenuou de forma significativa, a hemorragia (30,1% e 54,55%, respectivamente), houve uma redução de sinais inflamatórios nas bexigas dos animais pre-tratados com GIP 25mg/kg, tanto na análise microscópica quanto macroscópica. O GIP (25 mg/kg) reduziu o significativamente o extravasamento vascular de proteínas (42,94%), os níveis de MDA (32,53%), manteve os níveis de SOD a 89,27%, de forma semelhante ao MESNA (fármaco padrão). Em relação aos níveis de GSH, o GIP 25 mg/kg, manteve o valor à 35,87% em relação ao SHAM, além de diminuir a PCR em 56,41%. Na avaliação de citocinas, o GIP na dose de 25 mg/kg foi capaz de diminuir os níveis de TNF- α (88,77%) e IL-1 β 62,87%). Com base no exposto, pode-se concluir que o GIP foi capaz de atenuar os sinais da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos e que representa uma promissora opção terapêutica na modulação dessa condição patológica.

Palavras-Chave: Cistite Hemorrágica; Ifosfamida; Galato de Isopropila; Quimioterapia antineoplásica; Polifenóis

ABSTRACT

ABSTRACT

Hemorrhagic cystitis is the main dose-limiting adverse effect of clinical use of oxazaphosphorins, including ifosfamide (IFOS). This event occurs through the formation of acrolein, metabolite responsible for the urotoxicity of these drugs, resulting in increased oxidative stress and production of proinflammatory cytokines, which culminate in the degradation of the bladder tissue. In view of this, a need is identified for the development of an effective cytoprotector that may be used as an adjunct in oncological therapy with oxazaphosphorins. Gallic acid derivatives have antineoplastic, anti-inflammatory and antioxidant effects, which presupposes that isopropyl gallate (IPG) is potentially useful in the search for new prototypes that can mitigate IFOS-induced acute inflammatory reactions. In this context, the objective of this research was to analyze the protective effect of IPG against IFOS-induced hemorrhagic cystitis in an animal model. The hemorrhagic cystitis model was induced by a single dose of IFOS antineoplastic, preceded by saline or IPG pretreatment (6.25; 12.5; 25; 50 mg / kg, vo) in *Mus musculus* (CEUA 453/2017). In order to analyze the damage reduction, bladder wet mass (BWM), hemoglobin content, Evans blue dye leakage in the bladder matrix and C-reactive protein (CRP) were evaluated by an immunoturbidimetric method. Inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) were measured by ELISA immunoassay. Inhibition data were calculated in relation to the negative control (NC) and the significance calculated considering $p < 0.05$. Results show that pretreatment with IPG (12.5 and 25 mg / kg) significantly reduced bladder wet mass by 29.73% and 36.86%, respectively, and significantly attenuated bleeding (30,1% and 54.55%, respectively), there was a reduction of inflammatory signs in the bladders of animals pre-treated with IPG 25mg / kg, both in the microscopic and macroscopic analysis. IPG (25 mg / kg) significantly reduced vascular protein extravasation (42.94%), MDA levels (32.53%), maintained SOD levels at 89.27%, similar to MESNA (standard drug). Regarding GSH levels, IPG 25 mg / kg maintained the value at 35.87% compared to SHAM, besides reducing CRP by 56.41%. In the cytokine evaluation, 25 mg / kg IPG was able to decrease the levels of TNF- α (88.77%) and IL-1 β 62.87%). Based on the above, it can be concluded that IPG was able to attenuate the signs of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in mice and represents a promising therapeutic option in modulating this pathological condition.

Key-words: Hemorrhagic Cystitis; Ifosfamide; Isopropyl Galate; Antineoplastic chemotherapy; Polyphenols

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Câncer.....	21
1.2 Terapia oncológica	21
1.3 Oxazafosforinas: mecanismo de ação e efeitos adversos	22
1.4 Cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida: fisiopatologia	23
1.5 Tratamentos da cistite hemorrágica.....	26
1.6 Produtos naturais	28
1.7 Compostos Fenólicos	28
1.8 Galato de Isoprolila	29
2- OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3- MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Obtenção do Galato de Isopropila	34
3.2 Animais experimentais e eutanásia	34
3.3 Modelo experimental de indução de cistite hemorrágica com ifosfamida	34
3.4 Avaliação da massa úmida do tecido vesical.....	36
3.5. Análise Histopatológica.....	36
3.5.1 Avaliação dos parâmetros macroscópicos.....	36
3.5.2 Preparação e coloração das amostras de tecido	36
3.5.3 Avaliação dos parâmetros microscópicos (Histopatológicos).....	36
3.6 Quantificação da hemoglobina vesical pelo método da cianometahemoglobina	37
3.7 Avaliação do extravasamento vascular de proteínas pela técnica do corante Azul de Evans.	38
3.8 Determinação quantitativa ultra-sensível de proteína C-reativa (PCR) em amostras de soro por imunoturbidimetria.....	39

3.9 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) no tecido vesical	40
3.10 Determinação dos níveis de superóxido dismutase (SOD) no tecido vesical.....	40
3.12 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido vesical.....	41
3.13 Dosagem dos níveis teciduais de IL-1 β e TNF α por ELISA.....	41
3.14 Análise estatística	42
4 RESULTADOS	44
4.1 O GIP na dose de 25 mg/kg diminui a massa úmida das bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	44
4.2 Efeito do GIP sobre os parâmetros macroscópicos de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	44
4.4 Efeito do GIP na redução dos níveis de hemoglobina vesical dos animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	50
4.5 O GIP reduz o extravasamento vascular em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	51
4.6 O GIP reduz os níveis de malondialdeído (MDA) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	51
4.7 O GIP mantém os níveis homeostáticos da superóxido dismutase (SOD) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	52
4.8 O GIP não mantém os níveis homeostáticos da glutathiona reduzida (GSH) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	53
4.9 O GIP reduz os níveis de proteína C-reativa em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	54
5.0 O GIP é capaz de modular os níveis teciduais de citocinas inflamatórias.	55
6.0 DISCUSSÃO	59
7.0 CONCLUSÃO.....	66
8.0 REFERÊNCIAS	68

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é um problema de saúde pública, apontado como a 3ª causa de morte em todo o mundo, o que equivale a aproximadamente 6 milhões de óbitos a cada ano (NOGUEIRA, et al.2019).

A etiologia do câncer é multifatorial, e permanece não elucidada. A interação entre fatores de risco ambientais e o perfil genético individual pode inibir ou favorecer o início e desenvolvimento do processo carcinogênico. Nas últimas décadas, destaque tem sido atribuído à influência dos padrões alimentares e de seus constituintes dietéticos na modulação do risco de vários cânceres, por seu impacto e possibilidade de intervenção (GE et al., 2015; SHIVAPPA et al., 2015; WIRTH et al., 2015).

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 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 et al, 2018).

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

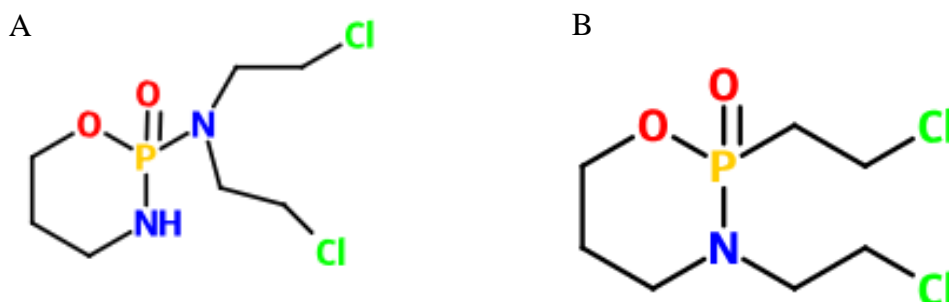
Dentre as classes dos antineoplásicos, os agentes alquilantes, em especial a classe das oxazafosforinas, tem destaque por sua ação citotóxica sobre uma grande variedade de doenças neoplásicas, o que faz desta classe um arsenal terapêutico muito importante para a terapia do câncer (CHABNER, 2015; MATZ; 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 (IFOS) (**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 consequentemente, 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).

A IFOS é utilizada no tratamento de tumores sólidos, incluindo câncer testicular, rabiomiossarcoma, 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 CFA (A) e IFOS (B)



Fonte: baseado em (MATZ; HSIEH, 2017).

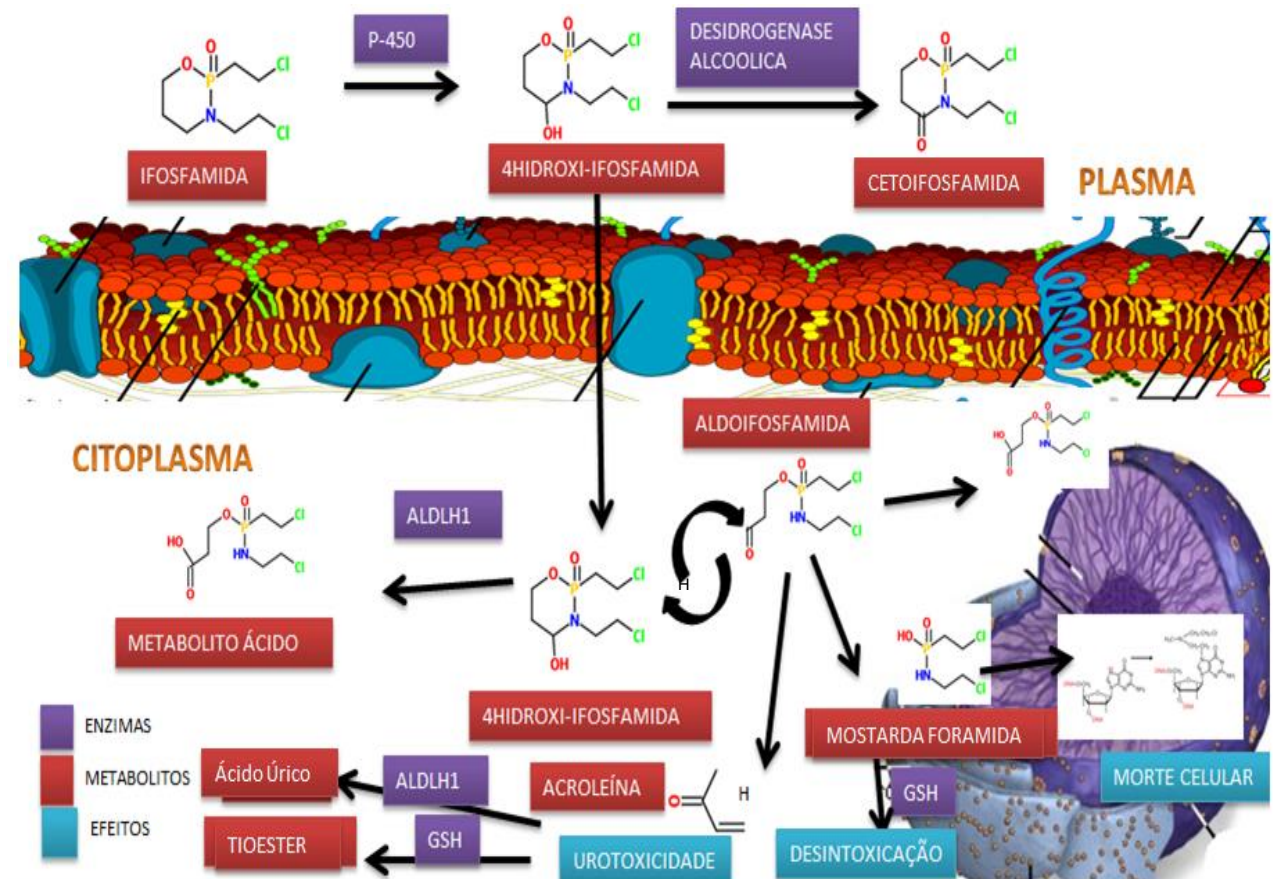
A IFOS compartilha com a CFA um perfil tóxico caracterizado por urotoxicidade que é decorrente do seu metabolismo envolver a liberação de seu metabólito tóxico (acroleína), que por sua vez possui alto potencial de agressividade tecidual, e ao se acumular na bexiga induz a formação da cistite hemorrágica (DECKER; KARAM; WILCOX, 2009).

1.4 Cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida: fisiopatologia

A cistite hemorrágica (CH) é o resultado da ativação de mecanismos moleculares inflamatórios que levam a uma reação difusa da morte celular: a piroptose. As principais causas de piroptose da bexiga são patógenos bacterianos ou virais, radiação ionizante ou acroleína, um metabólito urinário de ciclofosfamida ou ifosfamida (COLOMBEL, et al, 2019).

A IFOS e outras oxazafosforinas sofrem oxidação no carbono de posição 4 (adjacente ao nitrogênio cíclico) para fornecerem o correspondente 4-hidroxifosfamida, que espontaneamente sofre reversibilidade com abertura do anel para fornecer a aldofosfamida (**Figura 2**), assim, a desidrogenase alcoólica mediante a oxidação da 4-hidroxifosfamida gera cetoifosfamida. Posteriormente, a oxidação via aldeído hidrogenase (ALDLH1) produz o correspondente ácido, também representa um modelo de metabólico inativo (SANTOS 2007). Alternativamente, a eliminação do fosforil a partir do aldeído fornece a mistura de acroleína e mostarda foramida que é responsável pela alquilação do DNA e posterior morte celular. Nesse contexto, a acroleína é excretada pelos rins e se acumula na bexiga provocando destruição no tecido vesical (BATISTA, 2002).

Figura 2. Metabolismo da Ifosfamida.



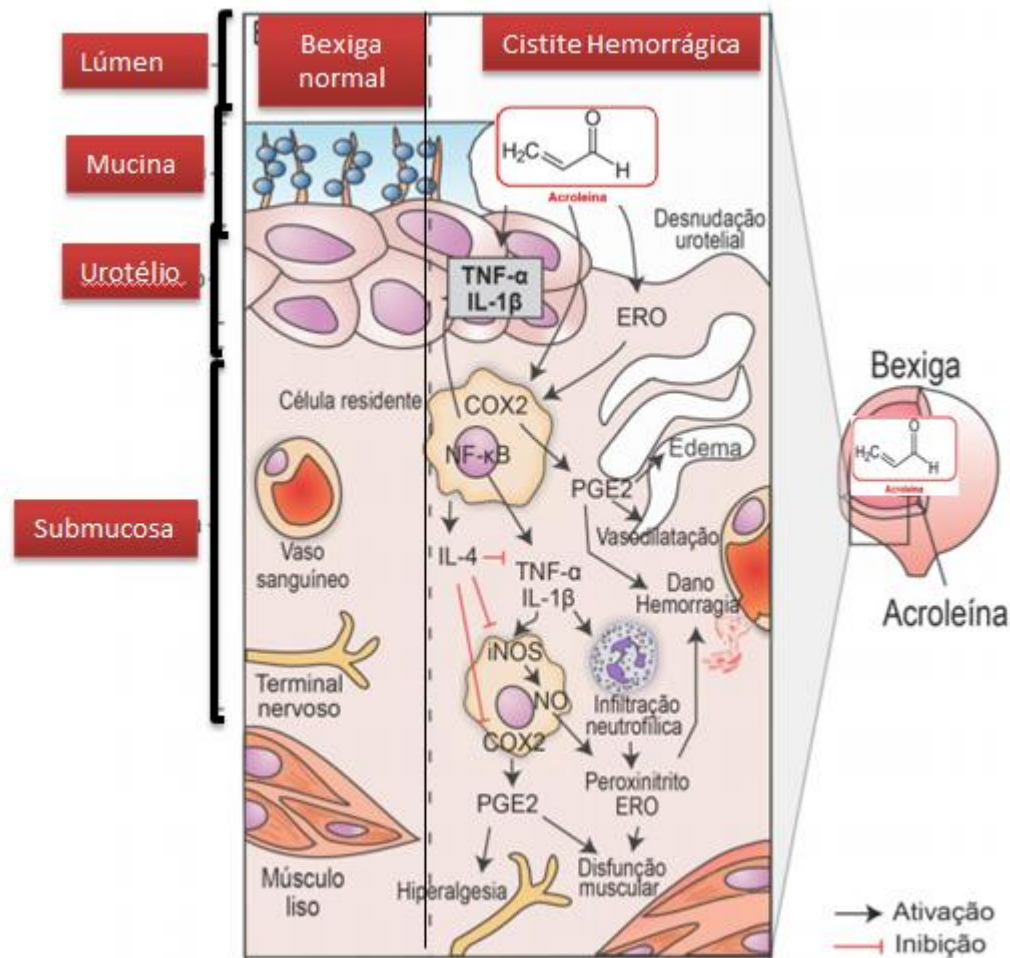
Legenda: P450 – Complexo da Oxidase Mista do Citocromo P-450, ALDH1 – Aldeído hidrogenase 1. GSH – Glutaciona Reduzida . Fonte: baseados em Batista, (2002) e SANTOS, (2007).

A inflamação vesical induzida pelas oxazafosforinas é mediada por diversos fatores solúveis, incluindo citocinas (IL-1 β e TNF) 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 altamente reativa, em contato com as células deprime os níveis de glutaciona 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. Representação esquemática da participação da Acroleína na patogênese da cistite hemorrágica.



Legenda: iNOS (Óxido Nítrico Sintase Induzível); EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) NFκB (Fator de Transcrição Nuclear Kappa B); TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) e IL-1β (Interleucina 1 beta); IL-4 (Interleucina 4); PGE2 (prostaglandina E2); COX2 (cicloxigenase2). Fonte: Baseado em Keles et al., 2014.

Como é possível observar na **Figura 3**, a bexiga normal (à esquerda) e a bexiga com Cistite hemorrágica diferem quanto à histologia do urotélio, pois no segundo caso ocorre uma desnudação urotelial e na submucosa tanto as espécies Reativas de Oxigênio (EROs) quanto as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) têm potencial para a formação de peroxinitritos, que atacam lipídios e proteínas. A produção de EROs/ERNs induzem ainda a Cicloxigenase-2

(COX-2) que levam a produção de PGE₂, causando vasodilatação, hemorragia e edema, assim também, fatores de transcrição, incluindo NF- κ B, a qual estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (como o TNF- α e IL-1 β) (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).

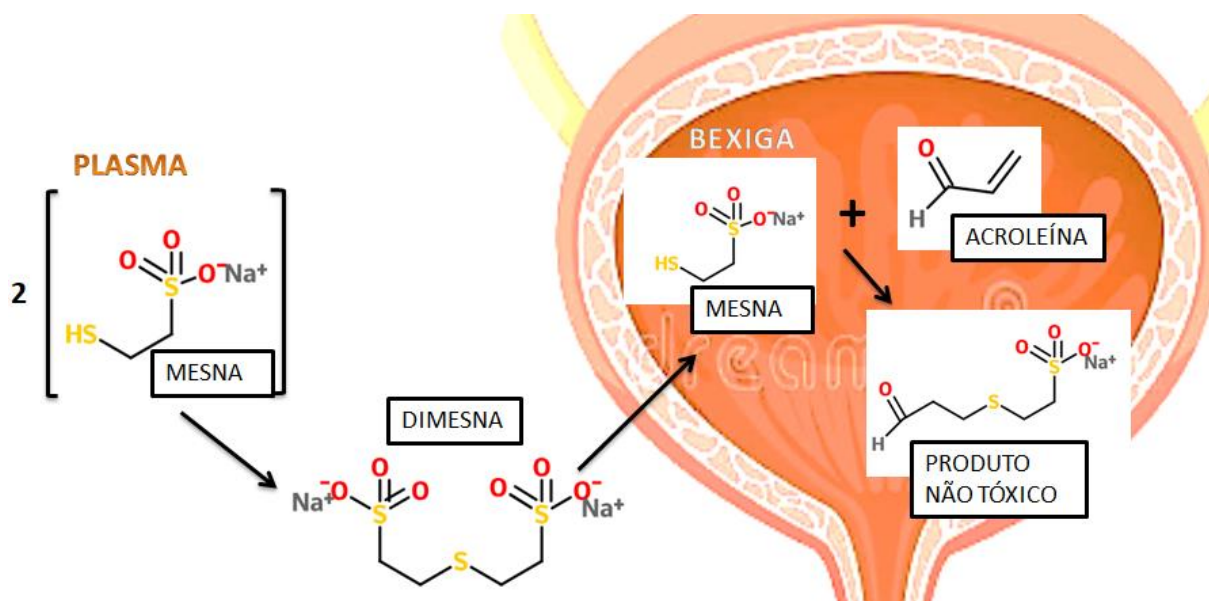
A acroleína induz a morte celular através do aumento das EROs, além de ativar a óxido nítrico sintase induzível, levando à produção de óxido nítrico (KORKMAZ et al., 2003) e posteriormente de ERNs. Vários estudos mostraram que um aumento nas EROs leva a edema da bexiga, inflamação e extravasamento, indicando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

1.5 Tratamentos da cistite hemorrágica

A prescrição de mesna e hiperidratação venosa com irrigação vesical é a medida profilática mais utilizada, com resultados inconstantes. Num estudo randomizado de uma coorte de 34 pacientes, em 1991, com a associação de busulfano e ciclofosfamida, os autores demonstram uma diminuição do risco de cistite hemorrágica 38-29%, o que não é significativo (ATIKSON, 1991). Em outro estudo retrospectivo de 199 doentes tratados em 1994 com busulfano e ciclofosfamida antes da transplantação da medula óssea, Turkeri et al 1995, demonstraram que a irrigação preventiva contínuo minimiza o risco de cistite hemorrágica (53% versus 23%) (TURKERI, et al 1995). Parece também que a irrigação contínua é útil para reduzir a duração média da cistite hemorrágica (10 versus 18 dias) e, portanto, da hospitalização (30 versus 39 dias). Estes são estudos antigos, antes do uso sistemático do mesna, que mostram uma porcentagem de cistite hemorrágica mais de 20% maior do que a observada atualmente (COLOMBEL, et al, 2019).

O mesna é um agente citoprotetor, tendo uso restritamente profilático (FREEDMAN et al., 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 sulfidrilico, **figura 4**, em sua estrutura (GRESSIER et al, 1994).

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



Legenda: O grupo sulfidril 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 et al., 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, utilizadas em protocolos de quimioterapia contra o câncer.

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 com a finalidade de diminuir os danos causados ao paciente.

1.6 Produtos naturais

As plantas produzem uma quantidade imensurável de compostos bioativos, classificados como metabólitos secundários, os quais são dotados de estruturas químicas de altíssima complexidade e com um espectro de funções bastante complexo, uma vez que não cumprem um papel específico no metabolismo, no crescimento e na divisão celular do organismo produtor, mas apresentam potencial citoprotetor e anti-inflamatório (VIANA et al, 2018).

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).

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, dentre eles os compostos fenólicos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

1.7 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são derivados do metabolismo secundário de plantas, sendo a maior parte derivada do metabolismo da glicose por diferentes reações bioquímicas, que constituem a via do ácido chiquímico ou do acetato (CORREIA, et al 2015).

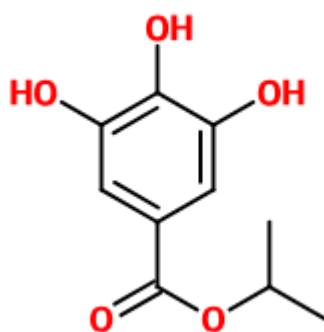
Compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos grupos mais numerosos de metabólitos secundários de plantas, com mais de 8000 estruturas conhecidas. Fenóis naturais podem ser desde moléculas simples (ácido benzoico e cinâmico) até componentes altamente polimerizados (lignina, tanino), com os flavonoides, representando o subgrupo mais comum e

extensamente distribuído (BARBOSA, 2010). Esses metabólitos têm sido muito estudados, pela sua influencia na qualidade dos alimentos e pela sua constituição que apresenta propriedades antioxidantes. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes aos alimentos e conseqüentemente ao organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças, (SOARES, 2002). Logo, dentre essas moléculas se enquadram os derivados do ácido gálico.

1.8 Galato de Isopropila

O metabolito ácido gálico deriva da via do ácido chiquimíco, um intermediário do metabolismo secundário, e é um componente de taninos hidrolisáveis em plantas (BARBOSA, 2010). Segundo CORREIA et al (2015), pode-se encontrar relatos da utilização do ácido gálico no tratamento da microalbuminúria, e seletiva citotoxicidade contra uma variedade de tumores celulares.

Figura 5- Representação molecular do Galato de Isopropila (GIP) (3,4,5-trihidroxibenzoato de isopropila). Adaptado de (CORREIA, et al 2015).



Nesse contexto, há um grande interesse no uso de produtos naturais como antioxidantes para a preservação de alimentos e principalmente na investigação de seus efeitos em condições fisiopatológicas, onde ocorre o envolvimento de EROs e de ERNs (AUROMA,2002). Esses compostos vegetais são considerados como coadjuvantes na redução do risco no desenvolvimento de doenças como arteriosclerose, diabetes, hipertensão, doenças coronarianas, doenças neurológicas degenerativas e câncer ou na redução de mutagenicidade (BARBOSA, 2010). A proteção contra doenças por substâncias fenólicas é mediada por

propriedades antioxidantes, tais como ação de captura de EROs e ERNs (ABODU; MASOUD, 2018).

Já foi descrito na literatura que os derivados do ácido gálico podem exercer efeito anti-inflamatório através da diminuição da migração neutrofílica e a estabilização da degranulação mastocitária (CORREIA, et al 2015), o que indica que o galato de isopropila é potencialmente útil no desenvolvimento de novos protótipos anti-inflamatórios e agentes que possam combater reações inflamatórias agudas (BARBOSA, 2010), o que abre margem para a aplicação desse protótipo farmacológico no estudo da atenuação do dano inflamatório vesical causado pela quimioterapia com oxazafosforinas, assim reduzindo os sinais da CH.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do galato de isopropila (GIP) na cistite hemorrágica induzida pelo antineoplásico ifosfamida (IFOS) em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a redução do dano tecidual causado pela IFOS, após pré-tratamento oral com GIP através da análise histopatológica do tecido vesical de camundongos Swiss;
- Determinar os níveis de hemorragia e proteinúria do conteúdo vesical, através de ensaios titulométricos por colorimetria, para avaliação da prevenção de danos vesicais pelo GIP;
- Investigar o efeito do GIP sobre o extravasamento vascular.
- Averiguar o efeito do GIP sobre os parâmetros do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica tecidual através do marcador malondialdeído (MDA).
- Averiguar o efeito do GIP sobre os parâmetros do estresse oxidativo através da dosagem das enzimas antioxidantes glutatona reduzida (GSH) e superóxido dismutase (SOD) no modelo de indução de cistite vesical.
- Determinar o nível de inflamação aguda através da análise da proteína C reativa (PCR).
- Dosar as citocinas do homogenato vesical para avaliar os níveis da Interleucina 1-beta ($IL-1\beta$) e Fator de Necrose Tumoral alfa ($TNF-\alpha$).

MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do Galato de Isopropila

O galato de isopropila (GIP) foi cedido pelo prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, 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.

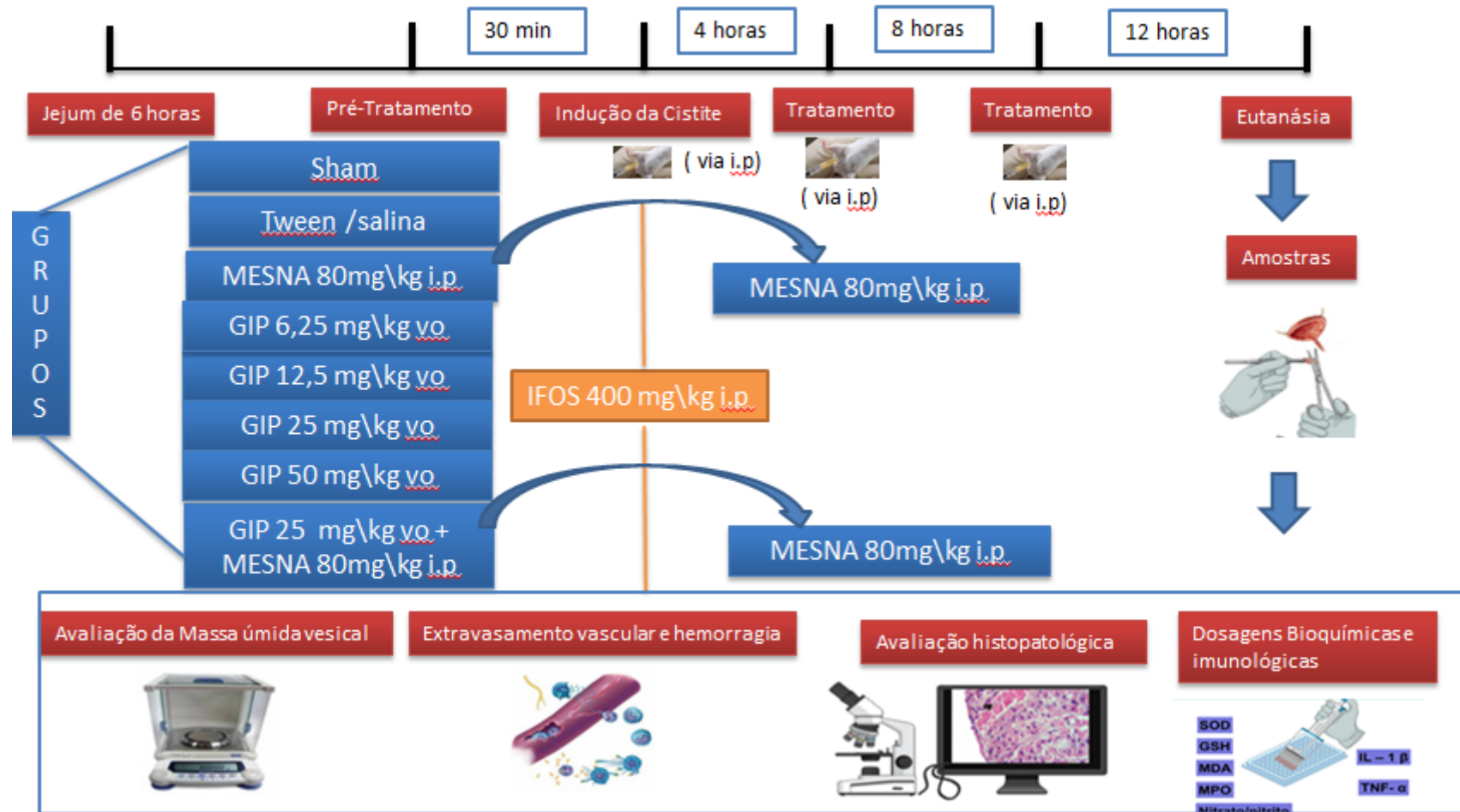
Os animais foram obtidos do Biotério central da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos à temperatura de 24 ± 1 °C e ciclo claro/escuro de 12 h com água e ração *ad libitum*, sendo eles colocados em jejum de 6h antes da realização dos experimentos.

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 N° 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 N° 453/17.

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 Galato de isopropila que foi preparado de acordo com a formulação: GIP 0,25% p/v, DMSO 0,1% e NaCl 0,9% como veículo, para ser administrado por via oral. nas respectivas doses: 6,25; 12,5 ; 25 e 50 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 4 horas e 8 horas após a indução da cistite (80 mg/kg i.p) com 2-mercaptoetano-sulfonato de sódio (mesna). 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 Galato de Isopropila (SILVA-JUNIOR, 2013)

Figura 6– Esquema de indução da cistite hemorrágica em camundongos



Legenda: O tratamento com MESNA se deu em 3 etapas, pré tratamento e pós tratamento 4 e 8 horas após a indução conforme prerrogativas clínicas.

3.4 Avaliação da massa úmida do tecido vesical

Após a eutanásia dos animais, 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, 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.

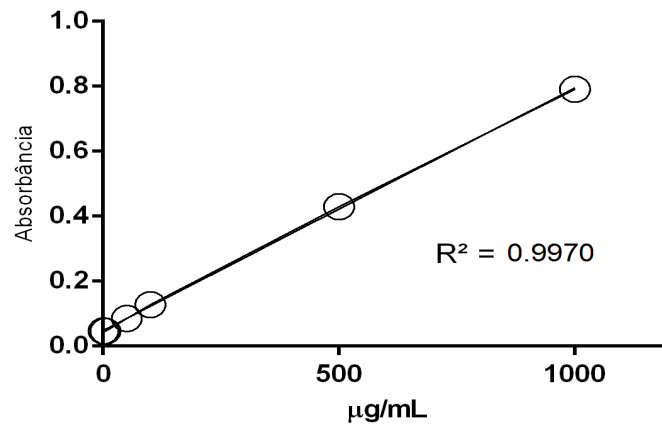
(+1)- Alterações Discretas: Caracterizadas por redução no número de células epiteliais uroteliais em decorrência de descamação, apagamento das dobras de mucosa habituais em virtude do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras.

(+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 homogeneizadas nesse reagente (100 mg de tecido vesical por mL de reagente,) após 1 hora de incubação, as bexigas 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).

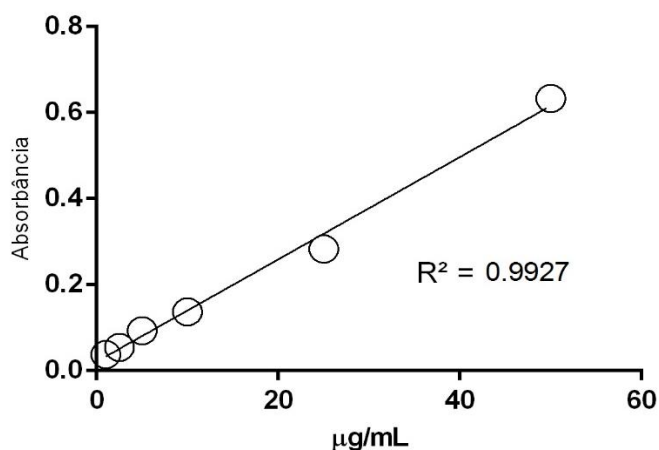
A curva de calibração da técnica mostra um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99, portanto é considerada linear para estabelecer uma relação entre concentração do analito na amostra e a absorbância avaliada, o que permite o doseamento exato da hemoglobina nas amostras.

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 substancia que se liga à albumina plasmática. Ocorrendo o extravasamento de albumina para o interstício e conseqüentemente a formação de edema, o corante estará presente. Neste caso foram utilizados grupos de 05 animais. Administrou-se (25 mg/kg) de Azul de Evans por via intravenosa no plexo caudal meia hora antes da eutanásia do animal que passaram pelo processo de indução. 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 expressa 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 quantitativa ultra-sensível de proteína C-reativa (PCR) em amostras de soro por imunoturbidimetria.

A proteína C-reativa é considerada, atualmente, o melhor marcador do processo inflamatório agudo arterial implicado na gênese da aterosclerose. Para a sua determinação utilizou-se o mesmo protocolo de indução de Cistite e grupos com 5 animais utilizados, o soro foi retirado do plexo retro orbital meia hora antes do sacrifício. Assim, O produto *PCR Ultra Turbiquest Plus* é um método imunoturbidimétrico facilmente aplicável a analisadores automáticos capazes de medir absorbâncias em 540 nm (530 a 550 nm), permitindo a realização da medição junto aos demais exames bioquímicos. A medição imunoturbidimétrica apresenta excelente desempenho operacional e permite a avaliação de grande número de amostras em curto intervalo de tempo. O produto *PCR Ultra Turbiquest Plus Ref. 335* possui sensibilidade otimizada que permite a determinação da PCR na região de interesse com

elevada precisão e exatidão, permitindo a sua utilização como marcador de processo inflamatório. Dessa forma, o calibrador PCR ultra sensível rastreável ao Material de Referência CRM 470/RPPHS (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM) é aplicável na transferência de exatidão para sistemas analíticos.

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 bexigas 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 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 absorvância foi lida a 550 nm por espectrofotometria em um leitor de placa. 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 consequente 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 800µL 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-1β e TNFα por ELISA

O ensaio imunoenzimático foi realizado a temperatura ambiente 25±5 °C usando 100 µL de cada componente da reação. O TNFα e a IL-1β foram avaliados por meio de kit 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), 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 overnight (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 µg/mL.

3.14 Análise estatística

Os resultados são mostrados 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. O valor de $p < 0,05$ foi usado para indicar diferenças estatisticamente significativas.

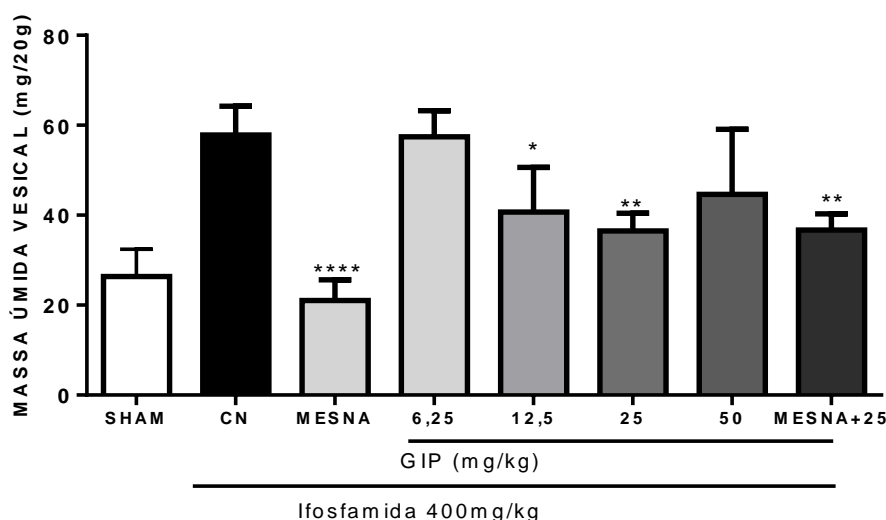
RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 O GIP na dose de 25 mg/kg diminui a massa úmida das bexigas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

A **figura 9** demonstra que a administração de galato de isopropila (GIP) diminuiu significativamente (29,73% e 36,86%) a massa úmida vesical quando comparado com o controle negativo para a dose de 12,5 e 25 mg/kg, respectivamente, já o grupo mesna não apresentou diferenças significativas ao comparar com o grupo mesna+GIP (25mg/kg). Além disso, os dados demonstram perda da atividade com o aumento ou redução da dose, onde as doses de (6,25 e 50 mg/kg) de GIP não demonstraram atividade nesta avaliação

Figura 9 - Efeitos do GIP sobre a massa úmida vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

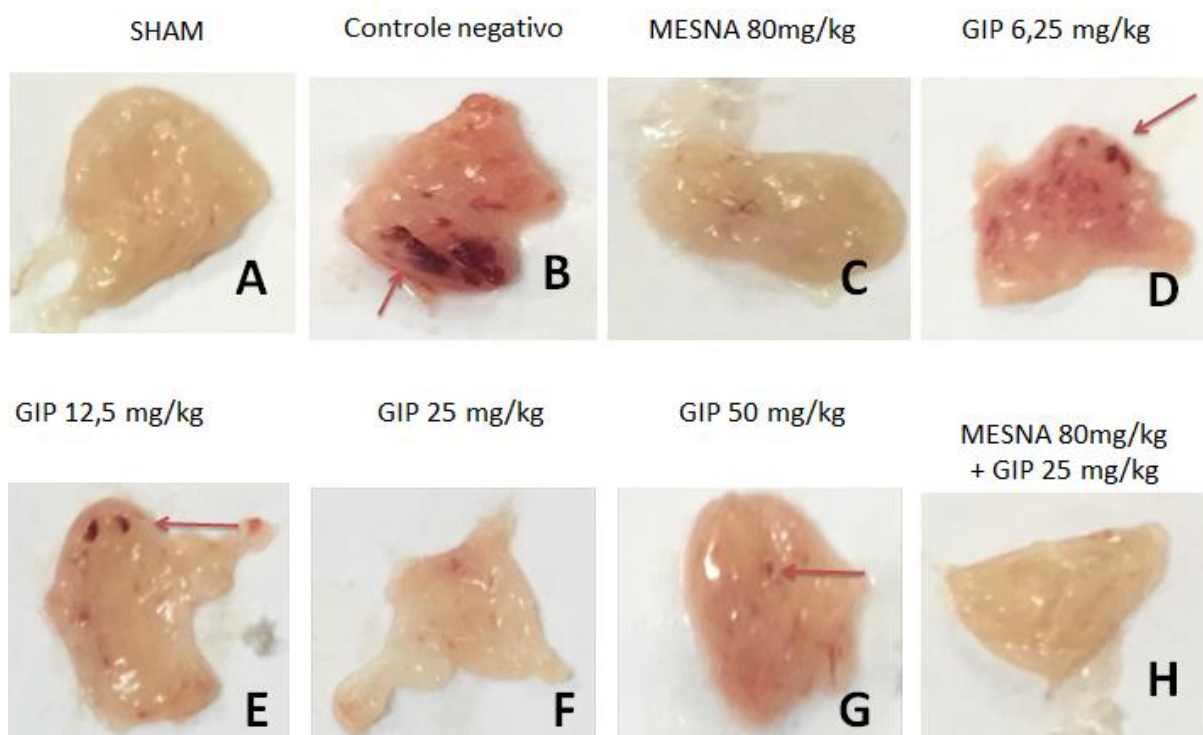


Legenda: Os dados estão expressos como média \pm E.P.M, (n=5) da relação da massa úmida das bexigas em relação a massa do animal após o protocolo experimental (mg/20g de animal). Os valores foram comparados com o Controle Negativo (CN) (Tween/Salina), por Análise de variância (ANOVA), “one way” seguido do Teste de Bonferroni para um *p<0,05. ** p<0,001, ***p<0,001, ****p<0,0001

4.2 Efeito do GIP sobre os parâmetros macroscópicos de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

A **figura 10** apresenta 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 aparente. A utilização do mesna foi capaz de reduzir acentuadamente a lesão (**seção C**). De modo semelhante, o pré-tratamento com o GIP atenuou as lesões aparentes, especialmente nas doses de 12,5 e 25 mg/kg (**seção E e F**) e também foi capaz de mitigar as lesões de forma sinérgica ao mesna (**seção H**).

Figura 10: Efeitos do GIP 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 – Grupos Teste, receberam pré-tratamento com o GIP (6,25 ;12,5; 25; 50 mg/kg); H – Grupo recebeu o tratamento do GIP a 25 mg/kg e ,concomitantemente, MESNA como padrão pré e pós tratamento. Os tratamentos do MESNA foram por via intraperitoneal (ip), e os do GIP por

via oral a escolha da imagem se deu por meio da seleção de uma bexiga considerada mediana entre seu grupo, as setas vermelhas indicam formação de coágulo e focos hemorrágicos.

A **Tabela 1** demonstra os parâmetros histopatológicos (edema e hemorragia) de tecido vesical dos animais. O GIP, nas doses de 12,5 e 25 mg/kg, diminuiu significativamente o dano hemorrágico quando comparado com o grupo controle negativo. Entretanto, quando observado o parâmetro do edema, apenas a dose de 25 mg/kg foi capaz de reduzir o edema e hemorragia (**Figura 10**).

Tabela 1: Atividade do Galato de Isopropila (GIP) por via oral, no edema e hemorragia induzida por ifosfamida, os resultados são reportados por médias e valores mínimos e máximos (n=5).

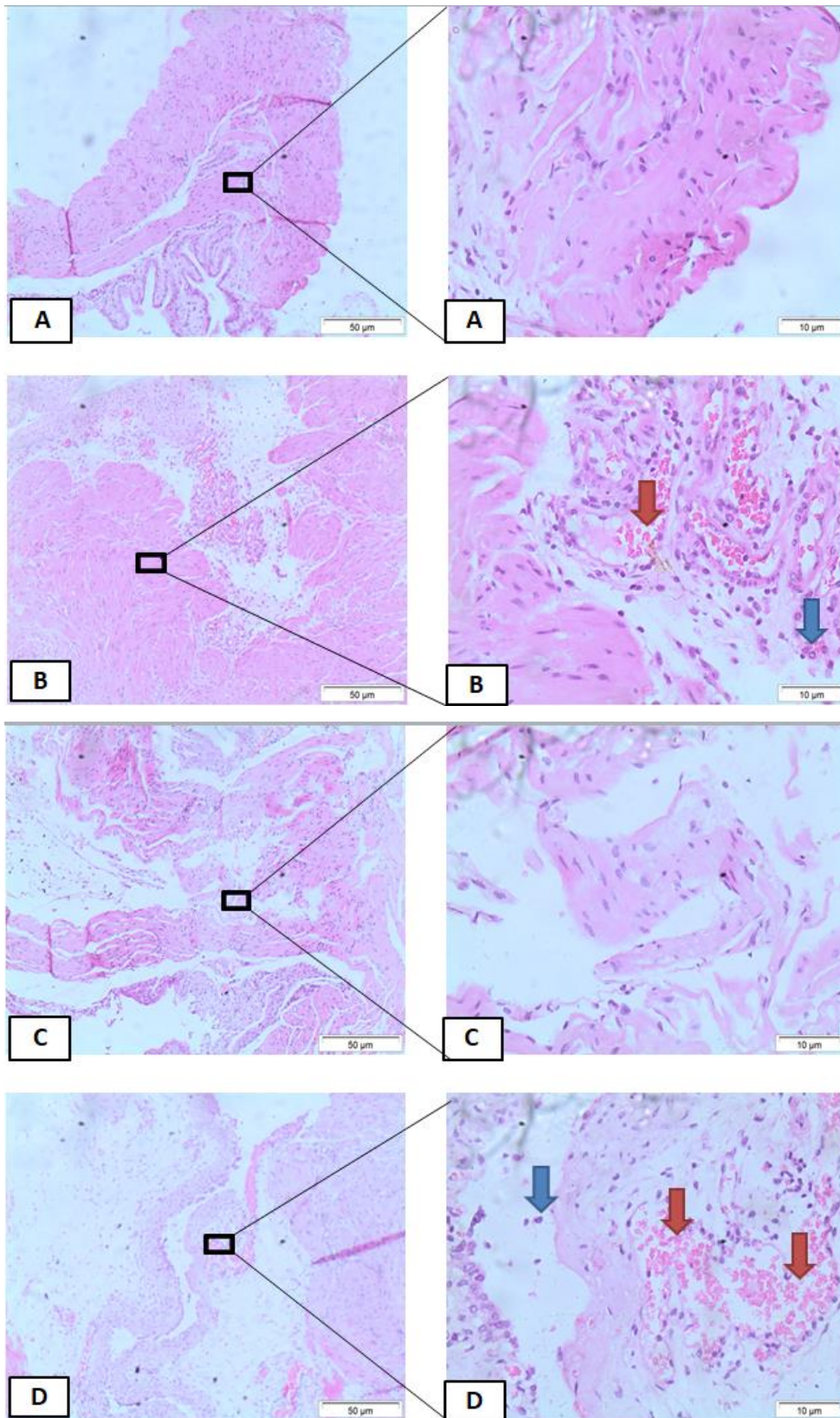
Legenda: Os dados (n=5) foram expressos no formato de média \pm limite e foram comparados com o controle negativo* (que recebeu apenas a indução com Ifosfamida e veículo) através do teste estatístico de Kruskal Wallis seguido de post teste de Dunn's para comparação entre grupos, considerando $p < 0,05$.

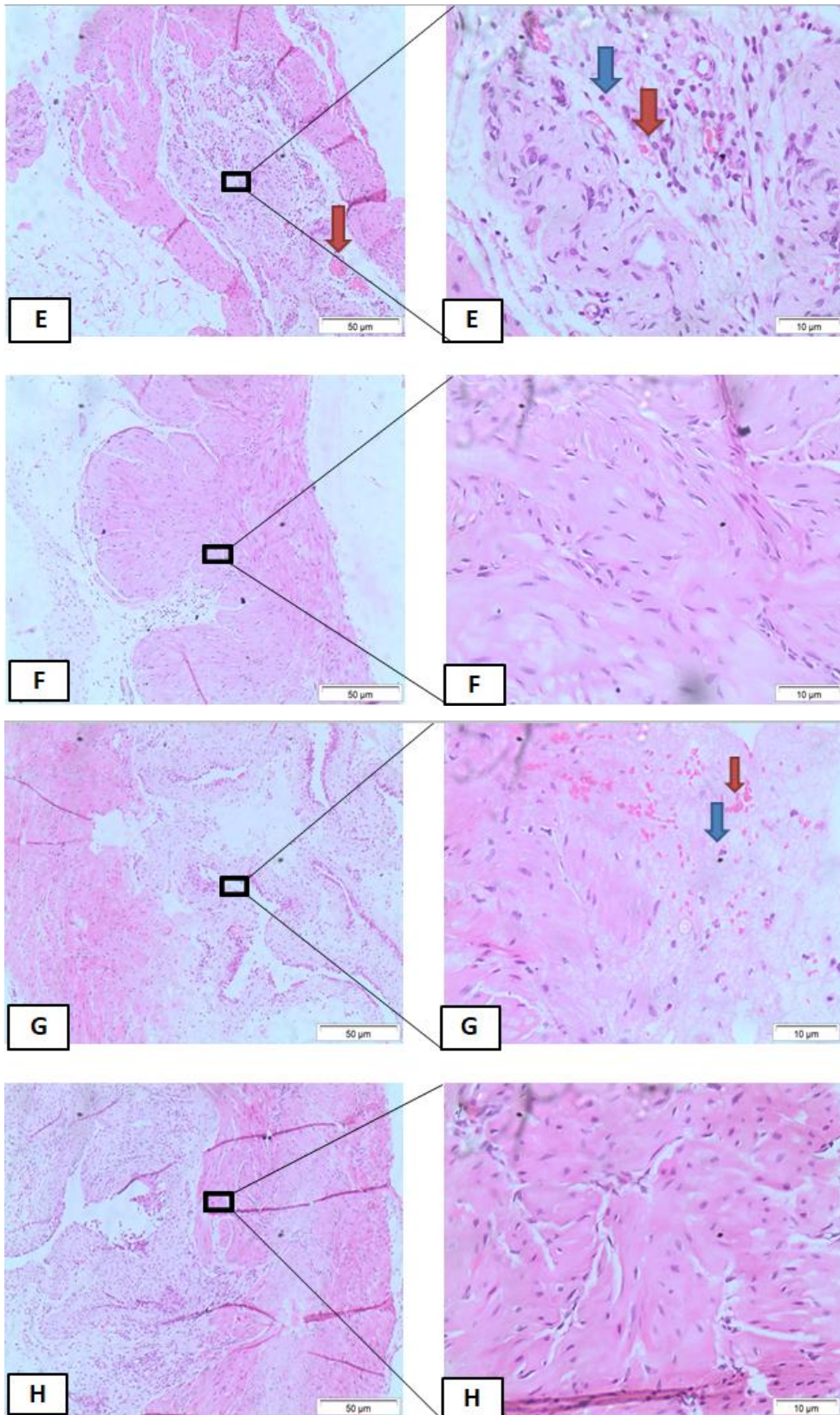
Grupos	Edema	Hemorragia
Veículo (SHAM)	0 (0-0)	0 (0-0)
Veículo + IFO (CN)	3(3-3)	3(3-3)
MESNA + IFO (CP)	0,6 (0-1)*	0,4 (0-1)*
GIP 6,25 mg/kg + IFOS	2,4 (2-3)	2,4 (2-3)
GIP 12,5 mg/kg + IFOS	1,4 (1-2)	1,0 (0-2)*
GIP 25 mg/kg + IFOS	0,7 (0-2)*	0,8 (0-2)*
GIP 50 mg/kg + IFOS	1,4 (0-2)	1,8 (1-3)
MESNA + GIP 25 mg/kg + IFOS	0,6(0-1)*	0,6(0-1)*

A **Figura 11** demonstra o efeito do GIP 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 GIP 6,25

mg/kg (painel D) apresenta discreta diferença em relação ao grupo do controle negativo (escore +2). O grupo GIP 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 GIP 25 mg/kg (painel F) apresenta uma redução pronunciada das perdas celulares, hemorragia e edema. O grupo GIP 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 GIP 25 mg/kg + MESNA 80mg/kg (painel H) mostra diminuição da hemorragia e edema em relação ao grupo do controle negativo, porém sem diferenças significativas em relação ao MESNA 80mg/kg e ao GIP 25 mg/kg isolado.

Figura 11: Análises histopatológicas dos grupos experimentais





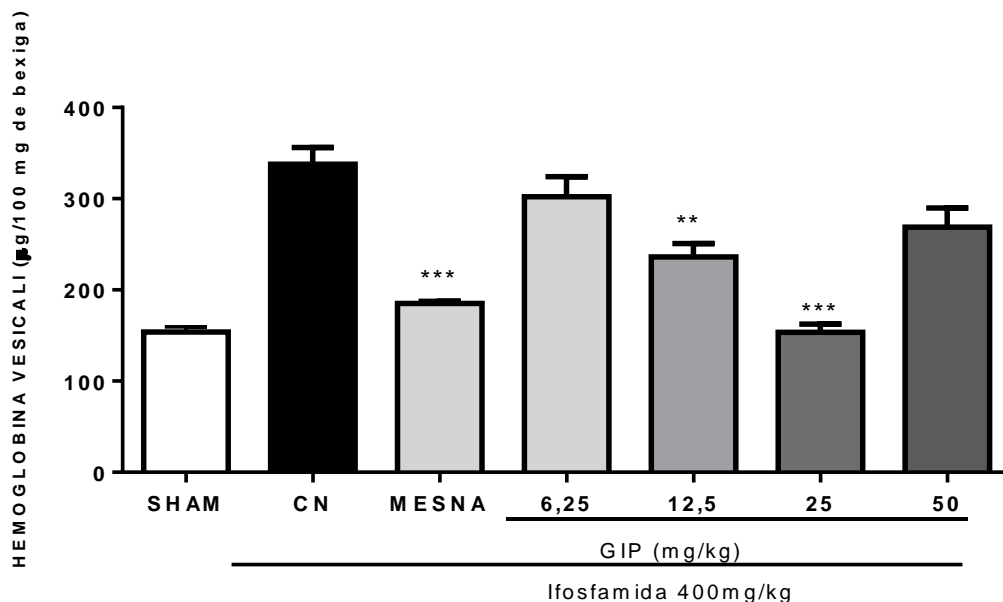
Legenda: Seção A: Grupo SHAM, os animais foram tratados apenas com veículo; Seção B: Grupo Controle Negativo: os animais receberam pré tratamento com o veículo e receberam indução da cistite; Seção C: Grupo MESNA: os animais receberam pré e pós tratamento com MESNA e receberam indução da cistite; Seção D,E,F e

G: Grupos teste que receberam as respectivas doses de GIP 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/kg como pré tratamento e receberam indução da cistite com dose única da Ifosfamida 400 mg/kg; Seção H : grupo de animais que receberam MESNA 80 mg/kg e GIP 25 mg/kg como pré tratamento . Os tecidos foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). (↓) Hemorragia; (↓) Polimorfos nucleados.

4.4 Efeito do GIP na redução dos 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 que as doses de GIP (12,5 e 25 mg/kg) mostraram diferenças significativas em relação ao controle negativo, com redução de 30,1% e 54,55%, respectivamente. Entretanto, o grupo MESNA, MESNA +25 mg/kg e o grupo GIP 25mg/kg não apresentam diferenças estatísticas em relação ao SHAM na redução de hemoglobina vesical , considerando $p < 0,05$.

Figura 12: Efeitos do GIP nos níveis de hemoglobina vesical dos animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

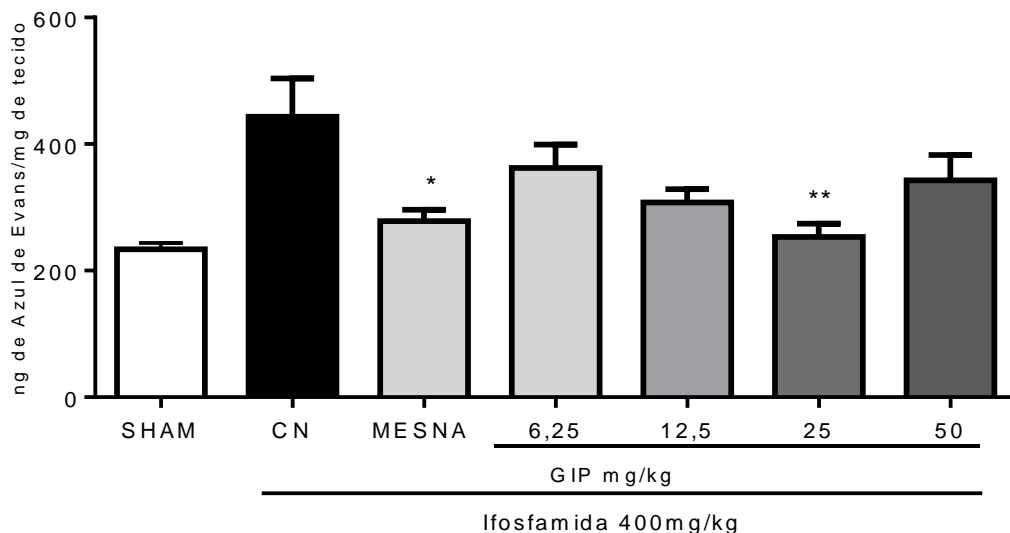


Legenda: Os dados estão expressos em µg de hemoglobina por 100 mg de tecido no formato de Média ± E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Teste de Bonferroni para um $*p < 0,05$. $** p < 0,001$, $***p < 0,001$.

4.5 O GIP reduz o extravasamento vascular em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

A **Figura 13** demonstra que o GIP, na dose de 25 mg/kg foi capaz de reduzir o extravasamento vesical do azul de Evans em 42,94%, em relação ao controle negativo, a mesma dose quando associada ao MESNA reduziu 43,97%; ambas não exibiram diferenças significativas em relação ao SHAM. O MESNA sozinho reduziu 36,28% em relação ao CN, considerando $p < 0,05$.

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

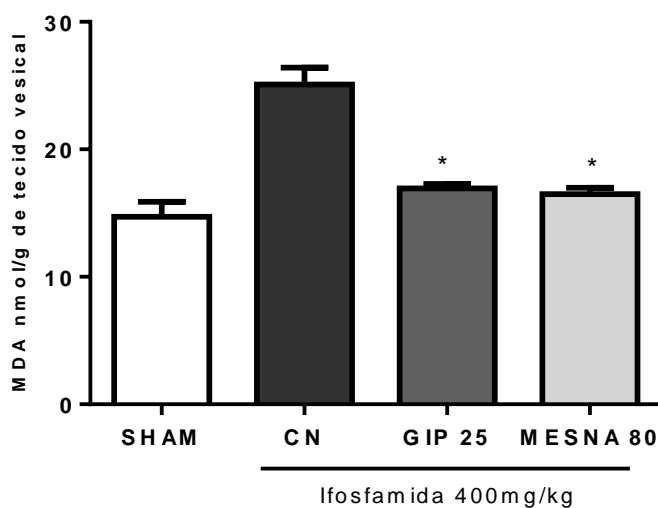


Legenda: Os dados estão expressos em ng de AE por mg de bexiga no formato de Média \pm E.P.M., (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Teste de Bonferroni para um $*p < 0,05$. ** $p < 0,001$.

4.6 O GIP reduz os níveis de malondialdeído (MDA) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

Na **Figura 14**, observa-se que o GIP na dose de 25 mg/kg e MESNA (80 mg/kg) reduziram significativamente os níveis de MDA (32,53% e 34,29%, respectivamente) quando comparado com o grupo lesivo ifosfamida ($P < 0,05$).

Figura 14: Efeito do GIP sobre os níveis de MDA no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

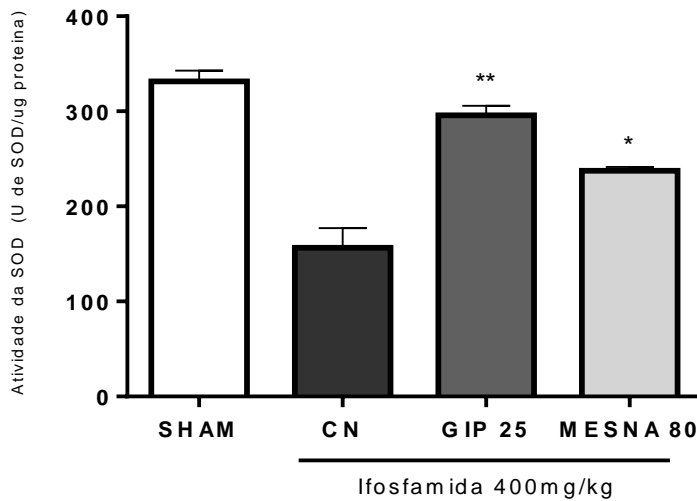


Legenda: Os dados estão expressos em nmol de MDA por g de tecido no formato de Média \pm E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Teste de Bonferroni para um $*p < 0,05$.

4.7 O GIP mantém os níveis homeostáticos da superóxido dismutase (SOD) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A **Figura 15** demonstra que o tratamento com ifosfamida reduziu os níveis vesicais de SOD a (47,26 %) quando comparados ao SHAM (normalizado como 100%). Entretanto, o pré-tratamento com GIP na dose de 25 mg/kg foi capaz de manter os níveis de SOD a 89,27%. De modo semelhante, os animais pre-tratados com MESNA mantiveram os níveis enzimáticos de SOD (71,62 %).

Figura 15: Efeito do GIP sobre os níveis de superóxido dismutase (SOD) no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

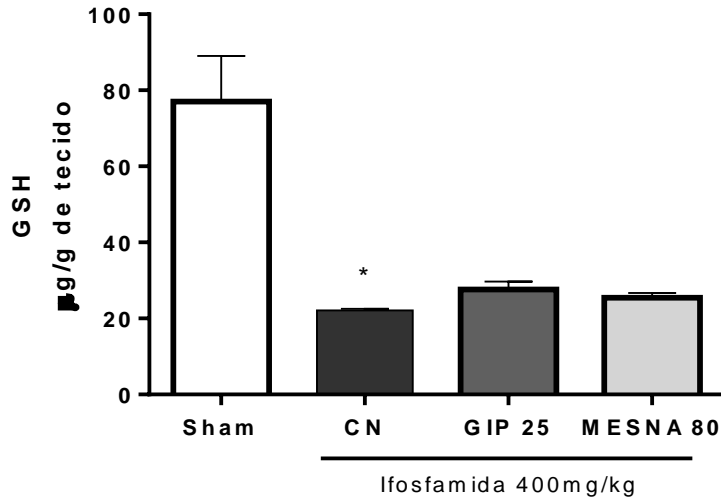


Legenda: Os dados estão expressos em U de SOD por μg de proteína no formato de Média \pm E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina - CN)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Teste de Bonferroni para um * $p < 0,05$. ** $p < 0,001$ versus CN.

4.8 O GIP não mantém os níveis homeostáticos da glutathiona reduzida (GSH) no tecido vesical de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A **Figura 16** demonstra que o tratamento com ifosfamida reduziu os níveis vesicais de GSH (28,71%) quando comparados ao SHAM. Entretanto, o pré-tratamento com GIP na dose de 25 mg/kg não foi capaz de manter os níveis de GSH similares ao do grupo SHAM, redução à 35,87%, Da mesma forma o MESNA não apresentou efeito significativo, também, em relação a os níveis de GSH.

Figura 16: Efeito do GIP sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

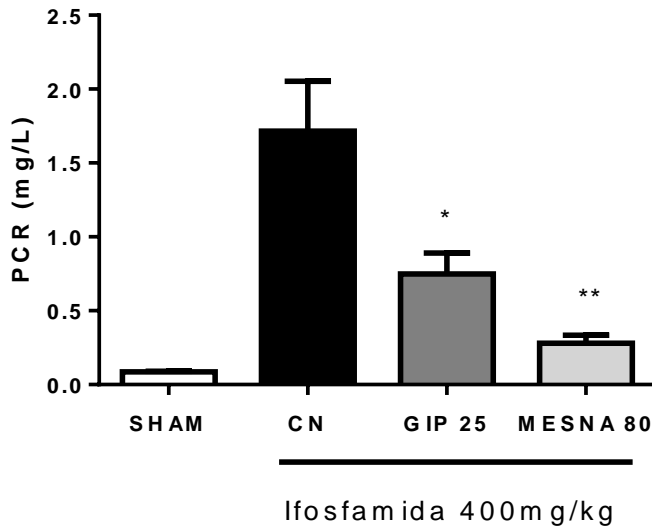


Legenda: Os dados estão expressos em µg de GSH por g de tecido no formato de Média ± E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (Tween/Salina)* por Análise de variância (ANOVA), oneway seguido do Teste de Bonferroni para um *p<0,05. ** p<0,001.

4.9 O GIP reduz os níveis de proteína C-reativa em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

A **Figura 17** apresenta os resultados da avaliação dos níveis de proteína C-reativa. Os dados demonstram que a dose de 25 mg/kg de GIP, foi capaz de reduzir significativamente os valores de PCR em relação ao CN, (diferença média de 56,41%), já o MESNA diminui em 83,68%, considerando p<0,05.

Figura 17 - Efeito do GIP na determinação quantitativa ultrasensível de proteína C-reativa (PCR) em amostras de soro por imunoturbidimetria.

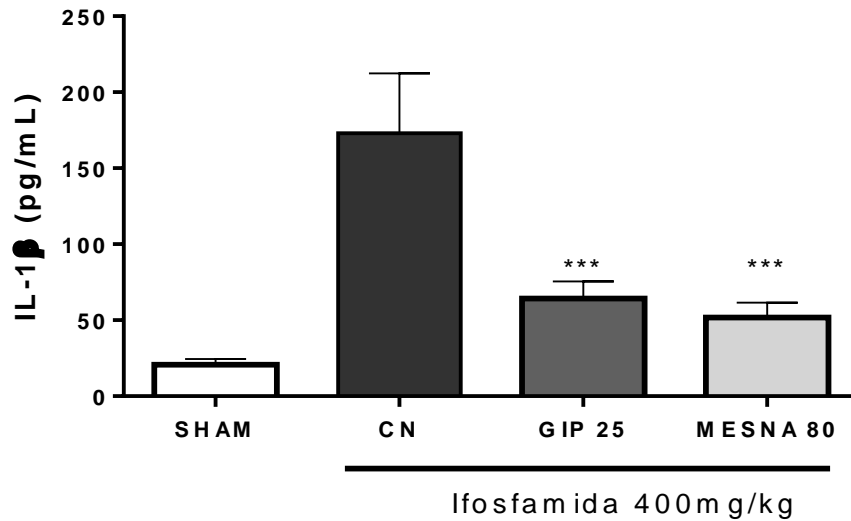


Legenda: Os dados estão expressos em mg de PCR por litro de soro no formato de Média \pm E.P.M, (n=5). Os dados foram comparados com o controle negativo (*Tween/Salina*)* por Análise de variância (ANOVA), *oneway* seguido do *Bonferroni's Multiple Comparison Test* para um *p<0,05. ** p<0,001.

5.0 O GIP é capaz de modular os níveis teciduais de citocinas inflamatórias.

A **Figura 18** demonstra que o tratamento com ifosfamida aumentou os níveis vesicais de IL-1 β (731,6%) quando comparados ao SHAM. Entretanto, o pré-tratamento com GIP (25 mg/kg) reduziu os níveis de IL-1 β em 62,87% em comparação com o CN (p<0,05). O resultado mostra ainda que o MESNA apresentou efeito significativo na redução da expressão desta citocina com redução de 70,04% em relação ao grupo CN.

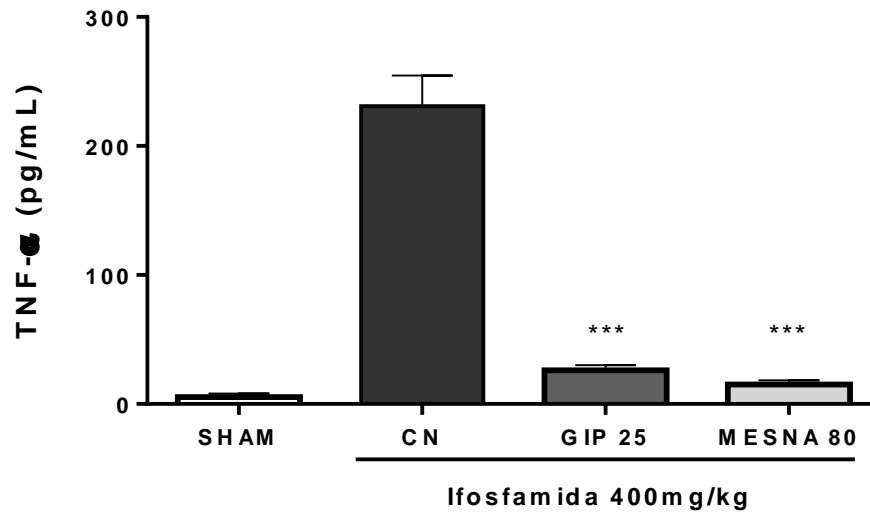
Figura 18: Efeito do GIP sobre os níveis da interleucina IL-1 β no tecido vesical de animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



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, ** p<0,001, ***p<0,001.

A **Figura 19** demonstra que o tratamento com ifosfamida aumentou os níveis vesicais de TNF- α quando comparados ao SHAM. Animais pré-tratados com o GIP na dose de 25 mg/kg mostram redução (88,72 % em relação ao CN) nos níveis de TNF- α . O grupo MESNA apresentou uma redução de 93,44% que é significativa quando em comparação com o CN (p<0,05).

Figura 19: Efeito do GIP 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, ** p<0,001, ***p<0,001.

DISCUSSÃO

6.0 DISCUSSÃO

A cistite hemorrágica (CH) é geralmente causada por quimioterapia intravenosa (ciclofosfamida, ifosfamida) utilizada no tratamento de câncer de mama e linfoma. Estes tratamentos farmacológicos resultam em um metabolito hepático, a acroleína, que é eliminado na urina. A acroleína produz ulcerações mucosas e expõe a musculatura da mucosa e vasos vesicais do córion (COLOMBEL, et al, 2019). A aparência macroscópica da CH é um urotélio com abrasão que expõe a derme subjacente e está associado a uma reação inflamatória intensa, deposição de fibrina, que pode secundariamente produzir hipertrofia do detrusor e evoluir para a esclerose e perda da função da bexiga (RIBEIRO et al., 2012). A exposição do córion leva à ruptura dos microvasos. Portanto, é principalmente uma síndrome inflamatória local, o que resulta em uma hemorragia devido à ruptura da microcirculação do córion, resistentes a qualquer tratamento, o que pode comprometer o prognóstico vital (KELES et al., 2014),

Diante disso, sabendo-se que a administração oral do galato de metila atenuou a artrite reumatoide, modulando a formação de edema, a migração de leucócitos e a produção de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE2) (BARBOSA, 2010), aventou-se a possibilidade do galato de isoprila (GIP) reduzir os efeitos urotóxicos da acroleína em modelo de cistite induzida por ifosfamida. Foi escolhida a via oral para administração do polifenol, conforme a biodisponibilidade oral já comprovada em literatura(Correia, et al 2015).

No modelo empregado, a formação do edema pôde-se ser observada no 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 GIP mostraram ser capazes em prevenir o surgimento do edema. Ainda neste contexto da indução inflamatória, em contraste com os resultados observados nos parâmetros macroscópicos e microscópicos, GIP (12,5 e 25 mg/kg) reduziu significativamente o edema, porém a atividade sobre a hemorragia só se pronunciou de forma significativa na dose de 25 mg/kg. Estes mesmos resultados podem ser observados visualmente através das figuras macroscópicas que representam a mediana do seu grupo.

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, quanto maior o tamanho desses depósitos de hemoglobina na matriz extracelular do tecido vesical maior será à extensão do dano vesical ocasionado pelo metabólito da ifosfamida (COLOMBEL, et al,2019).

Na observação dos resultados, os dados da avaliação revelaram uma atividade protetora do GIP na hemorragia vesical, especificamente para a dose de 25 mg/kg . Observa-se, também, que não existe sinergismo entre GIP e MESNA (fármaco padrão), pois ambos os grupos não apresentaram diferenças significativas quando associados e em relação ao tratamento de forma isolada, sugerindo-se que o GIP atua de forma semelhante ao MESNA.

No presente trabalho o edema vesical, medido tanto pelo peso úmido quanto pelo extravasamento do azul de Evans, e a análise macroscópica, foram reduzidos nos animais pré-tratados com GIP (25mg/kg), em relação aos animais tratados apenas com ifosfamida. De fato, o GIP parece inibir a permeabilidade vascular, por reduzir TNF- α , que potencializa sinalização inflamatória das células epiteliais e do tecido conjuntivo com os macrófagos teciduais, promovendo um aumento local de neutrófilos (RIBEIRO et al., 2012). A julgar pela cascata de mediadores envolvidas na cistite é razoável propor que a diminuição da permeabilidade vascular pelo GIP ocorre por inibição de TNF- α e IL-1 β (CORREIA, et al 2015). Assim, os resultados da avaliação da extensão da cistite hemorrágica com o azul de Evans demonstram que o GIP 25 mg/kg foi capaz de diminuir o extravasamento vascular de proteínas e de reduzir o dano causado pela IFOS em 42,94%. Desse modo, ratifica que o derivado do ácido gálico possui potencial protetor da progressão da cistite hemorrágica induzida pelo antineoplásico ifosfamida. Este achado é compatível com o padrão de atividade anti-inflamatória encontrada na literatura por compostos fenólicos com estrutura química relacionada ao ácido gálico (FARHOOSH, R; NYSTROM, L. 2018).

Desse modo, a investigação do papel de dano tecidual decorrente do processo inflamatório pela lesão induzida IFO foi realizada através dos níveis de MDA para quantificar indiretamente a peroxidação lipídica no tecido vesical e o efeito do GIP na atenuação do estresse oxidativo celular, mostrando que o pré-tratamento com o fármaco diminuiu significativamente os níveis teciduais de MDA no tecido vesical, frente ao modelo experimental de cistite hemorrágica. Estes dados corroboram com achados na literatura, pois WIANG et al., (2005) demonstraram que o galato de metila, assim como alguns metabolitos do ácido gálico possuem elevada atividade antioxidante, avaliada através da presença de

substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de forma análoga, sugere-se que esse achado estende-se ao GIP.

A relação entre o estresse oxidativo e nitrosativo é tênue, pois tem-se um complexo sistema de defesa endógeno para proteger os tecidos da lesão celular induzida por EROs e ERN's (VASCONCELOS et al., 2011). Esse sistema antioxidante pode ser dividido em enzimático, onde se destacam enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione 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 ($O_2\cdot^-$) é capaz de diminuir o substrato para a formação de peroxinitrito ($ONO_2\cdot^-$), porém, a atividade da SOD é reduzida quando há elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio, especialmente ($O_2\cdot^-$) (VASCONCELOS et al., 2011). Com base nestas observações, que qualificam a atividade da SOD como marcador de estresse oxidativo, este estudo delineou sua atividade, onde o GIP foi capaz de manter os níveis da SOD em comparação com o controle negativo, mostrando que este fármaco é capaz de prevenir o consumo da atividade da enzima SOD pela formação de espécies reativas de oxigênio. Estes dados confirmam os achados apresentados por Wiang et al. (2005), o qual mostrou que os derivados do ácido gálico diminuem o desgaste da atividade da SOD em modelos de desgaste endotelial pelo processo oxidativo.

As defesas antioxidantes também possuem mecanismos não enzimáticos, dessa forma, a glutathione (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 ativo 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 dosou os níveis teciduais de GSH e os achados apontaram que tanto o MESNA quanto o GIP foram capazes de manter os mesmos níveis teciduais de GSH, entretanto, o tratamento com o GIP não preveniu a perda de GSH em condições de indução da cistite. Desse modo, o MESNA, apesar de sua atividade antioxidante graças ao seu grupo sulfidrílico, não apresentou atividade nesta avaliação e atuou de forma semelhante ao GIP (CHABNER; LONGO, 2015; TELES et al., 2017).

Em relação à atividade anti-inflamatória, é sabido que a Proteína C reativa (PCR) é um marcador de fase aguda da inflamação, produzido no fígado em resposta ao TNF- α , refletindo a inflamação em nível sistêmico (RIBEIRO et al., 2012), desse modo o termo PCR ultrasensível é aplicado ao método desenvolvido que detecta concentrações séricas de PCR mais baixas que os métodos convencionais tradicionais (SOBRINHO, et al. 2015). Observa-se que o GIP (25 mg/kg) diminuiu em 56,41% os níveis de PCR. Essa informação sugere redução da inflamação sistêmica ocasionada diretamente pela acroleína, resultado observado, também, no grupo tratado com MESNA, indicando que o GIP por mitigar os níveis de TNF- α , reduza a produção da proteína C reativa (CORREIA, et al 2015) (SOBRINHO, et al. 2015).

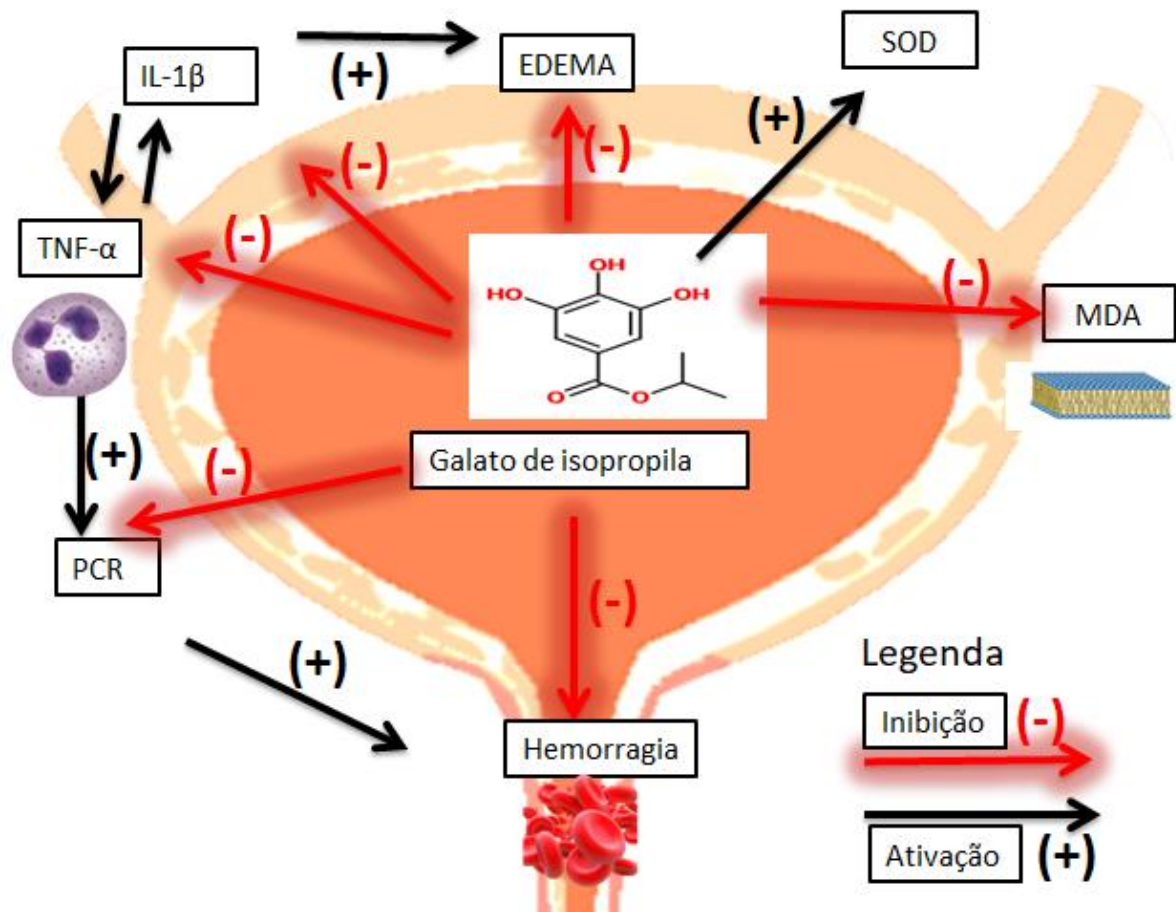
No processo de progressão do dano urotelial induzido pela ação tóxica da acroleína, tem-se uma sinalização inflamatória das células epiteliais e do tecido conjuntivo com os macrófagos teciduais, promovendo um aumento local de citocinas pró-inflamatórias, principalmente do fator de necrose tumoral alfa (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 β possui função similar à do TNF- α e induz a resposta

inflamatória sistêmica em resposta a um agravo inicial (STUMPF, 2014). Em relação à concentração destas citocinas na progressão do dano tecidual, este trabalho analisou os níveis teciduais de TNF- α e IL-1 β , mostrando que o derivado do ácido gálico foi capaz de diminuir de forma significativa as concentrações teciduais do TNF- α e IL-1 β , tendo desempenho semelhante ao MESNA em ambos os testes, e, por conseguinte capaz de minimizar os efeitos tóxicos da acroleína.

Sobre os derivados do ácido gálico, o galato de metila foi capaz de reduzir artrite experimental induzida por zimosan além dos níveis de TNF- α e IL-1 β . O zimosan é reconhecido por ativar o receptor Toll-like 2 (TLR-2) e da dectina-1, resultando na ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), desencadeando a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias (CORREIA, et al 2015). Classicamente, a ativação de macrófagos induzida pela combinação de um ligante Toll com IFN- γ induz à produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 em grandes quantidades (FRASNELLI et al 2005). De forma análoga, Barbosa (2010) relata que o galato de isopropila apresentou atividade antioxidante superior ao galato de metila, pois a presença de uma cadeia carbônica alifática confere maior lipofilicidade à molécula podendo ter maior interação com as membranas biológicas. No presente trabalho foram observadas reduções de TNF- α , IL-1 β e redução nos danos da CH nos animais tratados com galato de isopropila, o que corrobora com os achados macroscópicos na dose de 25 mg/kg do GIP.

Diante dos fatos supracitados, o GIP pode atuar na redução dos sinais da CH, pois reduziu os níveis de TNF- α , IL-1 β , MDA e da proteína C reativa, além de elevar os níveis de SOD e diminuir o edema e hemorragia (**figura 20**). Estes dados confirmam que o GIP possui propriedades anti-inflamatórias e demonstram que esse polifenol representa uma promissora opção terapêutica no tratamento dessa condição patológica.

Figura 20: Resumo das atividades do GIP na prevenção da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Legenda: IL-1 β (Interleucina 1 beta); TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa); SOD (Superóxido desmutase) ; MDA (Malondialdeido) PCR (Proteína C reativa).

CONCLUSÃO

7.0 CONCLUSÃO

- ✓ Evidenciou-se o efeito protetor do GIP na prevenção do dano tecidual causado pela quimioterapia com ifosfamida, assim como a redução do dano histopatológico do GIP na dose de 25mg/kg.
- ✓ Observou-se que o GIP 25mg/kg reduziu os níveis de hemorragia e proteinúria e preveniu os danos vesicais.
- ✓ Demonstrou-se que o GIP 25mg/kg reduziu o extravasamento vascular.
- ✓ Observou-se a redução do nível de MDA após o pré-tratamento de GIP 25 mg/kg, na CH induzida por ifosfamida.
- ✓ Demonstrou-se a elevação do nível de SOD com pré-tratamento de GIP 25 mg/kg na CH induzida por ifosfamida.
- ✓ Demonstrou-se atividade do GIP sobre a proteína C reativa (PCR).
- ✓ O GIP mostrou redução potencial dos níveis teciduais de Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e interleucina-1 β na inflamação tecidual causado pela quimioterapia com ifosfamida.

REFERÊNCIAS

8.0 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.

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

ATIKINSON, K. Bladder irrigation does not prevent haemorrhagic cystitis in bone marrow transplant recipients. **Bone Marrow Transplant**, v 7 pp. 351-354, (1991).

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.

BARBOSA, V.F; Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos in vitro e ex vivo. 2010. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia), – UNESP/Campus Araraquara, SP.

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.

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.

CICOGNA, Elizelaine de Chico; NASCIMENTO, Lucila Castanheira; LIMA, Regina Aparecida Garcia de. 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, ; DAN L; **Manual de Oncologia de Harrison**. 2. ed. 2015.

COLOMBEL, M; WALLET, H.L. Cistitis hemorrágica: fisiopatología y conducta práctica **.EMC-UROLOGIA**. v 5, cap 1, p 1-10, 2019.

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.

CORREIA, L.B; PADUA, A.T; SEITO, L.N; COSTA, T.E.M.M; SILVA, M.A; CANDEIA, A.L.P; ROSAS, E.L; HENRIQUES, M.G. Anti-inflammatory effect of methyl gallate on experimental arthritis: inhibition of neutrophil recruitment, production of inflammatory mediators, and activation of macrophages. **Jornal of Natural Products**, p 1-13, 2015.

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**, vol 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 DTET al. Pediatric hemorrhagic cystitis. J Pediatr Urol. **J Pediatr Urol.**, Londres, p.254-264, 2009.

FARHOOSH, R; NYSTROM, L. Antioxidant potency of gallic acid, methyl gallate and their combinations in sunflower oil triacylglycerols at high temperature. **Food Chemistry** v 244, p 29-35 ,2018.

FRASNELLI, M. E. ; TARUSSIO, D. ;CHOBZ-PECLAT, V.; BUSO, N.; So, A. **Arthritis Res.**, 7 (2), R370–379 Ther 2005.

FREEDMAN, A.; EHERLICH, R.M.; LJUNG, B.M. Prevention of cyclophosphamide cystitis with 2-mercaptoethane sodium sulfonate: a histologic study. **J. Urol.**, 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.

GE I, RUDOLPH A, SHIVAPPA N et al. Dietary inflammation potential and postmenopausal breast cancer risk in a German casecontrol study. **The Breast**; 24(4): 491–496. 2015.

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 Find Exp Clin Pharmacol**, v.16, n.1 p.9-13 1994.

HAROLD, J.; DRABKIN, L. Spectrophotometric studies. **J. Biol. Chem.**, 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.

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.

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 J Cancer.**, v. 43, n. 1, 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. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 121, n. 1, p.128-131, 1995.

KELES I, BOZKURT MF, CEMEK M, et al. Prevention of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis by resveratrol: a comparative experimental study with mesna. **Int Urol Nephrol**, v. 46, p.2301-2310, 2014.

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.

KORKMAZ A, OTER S, DEVECI S, et al. Involvement of nitric oxide and hyperbaric oxygen in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. **J Urol**. v.170, n.6, p.2498-2502, 2003.

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.

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.

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.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 271–8, maio 1978.

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

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 sanitario**. 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, **Nat. Prod. Commun.** v.7, n.1, p.129–132, 2012.

NOGUEIRA, T. R.; CALDAS, D. R. C.; ARAÚJO, C. G. B. DE; SILVA, M. DA C. M. E; NOGUEIRA, N. DO N.; RODRIGUES, G. P. Potencial inflamatório da dieta e risco de câncer de mama. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 22, p. e571, 7 abr. 2019.

OLIVEIRA, C. M. B. DE; 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. **Am J Physiol Renal Physiol** 311: F85–F93, 2016.

PERAZELLA, M.A. Onco-nephrology: renal toxicities of chemotherapeutic agents. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 7, p1713–21, 2012.

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.

ROSA, D. D. Uso de Citoprotetores Use of Cytoprotectans. **ONCOLOGIA BASEADA EM PROVAS** /, v. 1, n. 1, p. 43–50, 2004.

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. **Jpn. J. Clin. Oncol.** 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, V. M. R; DONNICI,C.L. COMPOSTOS ORGANOFOSFORADOS PENTAVALENTES: HISTÓRICO, MÉTODOS SINTÉTICOS DE PREPARAÇÃO E APLICAÇÕES COMO INSETICIDAS E AGENTES ANTITUMORAIS. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 1, 159-170.2007.

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.

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, n2, p.1-9. 2018.

SILVA JUNIOR, R. N. C.; EDER, M. S.; M, A. K.; JOLEEN, L.; R, P. G.; FILHO, G.; F, F. R. Caracterização do modelo inflamatório de cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos Swiss. **Rev. cien. Int. 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*. **Rev. Ciênc. Saúde** v. 17, n. 1, p. 25–32, 2015.

SOARES S.E., Phenolic acids as antioxidants, **Nutr. Rev.** Campinas, 15(1):71 81, jan./abr. 2002.

SOBRINHO, C.A.A.A, et al. Proteína-C reativa, atividade física e aptidão cardiorrespiratória em adolescentes portugueses: estudo transversal. **Cad saud Pub**, v 31, n. 9, p 1907 – 1915, 2015.

TAKAMOTO, S.; SAKURA, N.; NAMERE, A. Monitoring of urinary acrolein concentration in patients receiving cyclophosphamide and ifosfamide. **Journal Chromatography B. analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.** 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.

TURKERI L,N; LUM L.G; UBERTI J.P ; ABELLA E.; MONIM F.; KARANES C, et al. Prevention of hemorrhagic cystitis following allogeneic bone marrow transplant preparative regimens with cyclophosphamide and busulfan: role of continuous bladder irrigation. **J Urol**, 153 (3Pt1), pp. 637-640. (1995).

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. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** 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

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

WANG, W.K; PARK, H.S; HAN, I ;MIHYUN, O; NAMKOONG, H; KIM, H.K; HWANHG, D.W;HUR, S.Y; KIM, T. E; PARK, Y.G; KIM, J.R; KIM, J.W. Methyl gallate and chemicals structurally related to methyl gallate protect human umbilical vein endothelial cells from oxidative stress. **EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE**, Vol. 37, No. 4, 343-352, August 2005.

WIRTH MD, SHIVAPPA N, STECK SE et al. The dietary inflammatory index is associated with colorectal cancer in the National Institutes of Health-American Association of Retired Persons Diet and Health Study. **British Journal of Nutrition**,; 113(11): 1819–1827.2015.

YASEEN, Z.; MICHOUDET, C.; BAVEREL, G.; DUBOURG, L. *In vivo* mesna and amifostine do not prevent chloroacetaldehyde nephrotoxicity *in vitro*. **Pediatr Nephrol**, 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.