



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FRANCISCO WANDERLEI LIMA SILVA

**CURCUMINA PROTEGE DA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
IFOSFAMIDA MEDIANTE INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE E-SELECTINA E DA
MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS**

FORTALEZA

2017

FRANCISCO WANDERLEI LIMA SILVA

CURCUMINA PROTEGE DA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
IFOSFAMIDA MEDIANTE INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE E-SELECTINA E DA
MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S58c Silva, Francisco Wanderlei Lima.
Curcumina protege da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida mediante inibição da expressão de E-selectina e da migração de neutrófilos / Francisco Wanderlei Lima Silva. – 2017.
58 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

1. Cistite hemorrágica.. 2. Ifosfamida.. 3. Curcumina.. I. Título.

CDD 615.1

FRANCISCO WANDERLEI LIMA SILVA

CURCUMINA PROTEGE DA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
IFOSFAMIDA MEDIANTE INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE E-SELECTINA E DA
MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovado em 26 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Marcos Venício Alves Lima
Instituto do Câncer do Ceará - ICC

Prof. Dra. Regilane Matos da Silva Prado
Centro Universitário Católica de Quixadá - UNICATÓLICA

*Aos meus pais, Ivan e Eneida, pela incansável luta para educar seus filhos.
Aos meus irmãos, companheiros e fieis torcedores do meu sucesso.
A minha namorada Angélica pelo companheirismo e compreensão.
A minha amada tia Elisabete que tanto torceu por mim.
Ao meu Avô, grande incentivador de meus estudos.
A todos aqueles que torcem por mim.*

Com grandes poderes vêm grandes responsabilidades.
(Stan Lee, 1922).

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por permitir que eu chegasse até esse momento que me exigiu muitas abdições, mas que consegui enfrentar com coragem e perseverança.

Aos meus pais e irmãos pela torcida e apoio incondicional principalmente nos momentos mais decisivos de minha vida.

A minha namorada Angélica Quirino por ser companheira e compreensiva com minhas ausências.

As amigas Andreza e Luciana, pelas palavras de incentivo e torcida para que esse dia chegasse.

Ao Prof. Roberto Cesar, pelo grande homem que é sempre dedicado ao laboratório LAFICA e a seus orientandos. Por ter me recebido no laboratório mesmo eu não tendo experiência com pesquisa científica, por ser sempre compreensivo e estar à disposição para resolver minhas dúvidas, por acreditar no meu potencial, por ser um cientista de excelência.

A professora Karina Moreira por me mostrar que eu poderia chegar até aqui, por me fazer acreditar que se pode ir um pouco mais longe quando se tem um objetivo.

À Deysi Wong pela doçura de seus atos, por ser positiva, quanto mais pensávamos que não iria dar certo chegava ela com seu sorriso nos fazendo lembrar que no final tudo dá certo.

A professora Mariana Vale por me atender prontamente quando solicitei e por contribuir com minha pesquisa na hora mais importante.

Aos colegas de laboratório Anielle Torres, Camila Fernandes, Lucas Nicolau, Lucas Carvalho e Renata Brito por toda ajuda. Em especial à Camila Meirelles e Lívia nobre pela amizade que levarei pelo resto de minha vida, por serem pessoas de coração bom, por fazerem por mim coisas que nenhuma outra pessoa faria, pelas risadas na hora do café, por serem companheiras no almoço semanal principalmente nas terças feiras, por serem verdadeiras.

A Venúcia Magalhães e Amilcar Dornellas pelas noites mal dormidas em que passamos fazendo experimentos, pela disposição e por ser tão compreensivos.

A Adenilde Amorim pelo auxílio diário durante o tempo em que esteve contribuindo com o LAFICA, pelos conselhos de mãe que nos dava, pelo exemplo de mulher batalhadora que é.

Ao grande amigo Cleber Ferreira, companheiro desde a graduação, sempre muito focado e dando aquela força nas horas de aflição.

Aos meus grandes amigos e irmão de coração Roberto, Plínio, Fádua Raquel e Marta Neiva (Martinha) obrigado pela amizade sincera, pelas mensagens de incentivo, pela confiança.

Aos alunos de iniciação científica Lis Nobrega e Mariana Lima pelo auxílio nos experimentos e pela amizade formada.

Ao CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Introdução: A cistite hemorrágica (CH) é um processo inflamatório da bexiga urinária, caracterizado por alterações na mucosa, hematúria, disúria, aumento da frequência e urgência urinária, além de dor pélvica intensa. Dentre as causas mais frequentes da CH está a quimioterapia baseada em oxazafosforinas, tais como a ciclofosfamida e seu análogo sintético, a ifosfamida (IFO). Apesar dos avanços no tratamento, em situações como no pré-condicionamento para transplante de medula óssea, a CH continua sendo um grave problema clínico. A curcumina é o componente da *Curcuma longa L.*, possuindo numerosas atividades biológicas e potenciais benefícios para a saúde, sendo de interesse como agente anti-inflamatório e anticancerígeno. O presente trabalho buscou avaliar o efeito da curcumina sobre parâmetros inflamatórios envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando 20-25g. Inicialmente os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n = 6): CONTROLE, IFO e os grupos Curcumina que receberam 10, 30 e 100mg/kg por gavagem, administrado uma hora antes e seis horas depois da indução da CH com ifosfamida (400mg/kg, i.p.). Após selecionar a dose de 30mg/Kg de curcumina como a mais promissora, nos testes posteriores, os animais foram divididos apenas em 4 grupos (n=6): CONTROLE, IFO, CUR (Curcumina 30mg/kg, oral uma hora antes e seis horas após a indução da CH com ifosfamida (400 mg/Kg) i.p.) e curcumina (Curcumina 30 mg/Kg, oral, uma hora antes e seis horas depois da injeção de salina 0,9% i.p.). Em seguida, doze horas após a indução da CH foi realizada a eutanásia com excisão das bexigas para avaliação macroscópica de edema, hemorragia e análise histopatológica segundo os critérios de Gray, peso úmido vesical (PUV), permeabilidade vascular, atividade de mieloperoxidase (MPO), dosagens de citocinas (IL-1 e KC) e imunomarcagem de E-selectina. Para análise estatística foram utilizados os testes One-way ANOVA/Kruskal Wallis e Bonferroni ou Newman-Keuls ou Dunn com $p < 0,05$ aceito como nível de significância. **Resultados:** A Curcumina nas doses de 10, 30 e 100 mg/Kg atenuou escores de edema e hemorragia ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo IFO. Na avaliação do peso úmido vesical, a curcumina, na dose de 30 mg/Kg, apresentou o melhor efeito protetor versus o grupo IFO ($p < 0,05$). Na análise histopatológica observou-se que a IFO promoveu edema, hemorragia, e dano urotelial, sendo esse dano significativamente prevenido pela curcumina na dose de 30 mg/Kg, visto que, a mesma manteve as bexigas com preservação do urotélio e camada muscular, bem como ausência de edema e hemorragia. Adicionalmente, a curcumina atenuou a migração de neutrófilos. Entretanto, na avaliação dos níveis de KC (quimiocina análoga da IL-8 humana) e interleucina-1 β (IL-1 β) nas bexigas, notou-se que a curcumina na dose de 30 mg/Kg não reverteu o aumento destas citocinas gerado pela IFO. Por outro lado, houve significativa redução da imunomarcagem de E-selectina no grupo injetado com curcumina na mesma dose. **Conclusão:** A curcumina possui atividade anti-inflamatória na CH por inibir a migração de neutrófilos possivelmente mediante a redução da expressão de moléculas de rolamento E-selectina.

Palavras-chave: Cistite hemorrágica, ifosfamida, curcumina.

ABSTRACT

CURCUMIN PREVENTS THE DEVELOPMENT OF IFOSFAMIDE-INDUCED HEMORRHAGIC CYSTITIS BY INHIBITION OF E-SELECTIN EXPRESSION AND NEUTROPHIL MIGRATION

Introduction: Hemorrhagic cystitis (HC) is an inflammatory process of the urinary bladder, characterized by mucosal injury, hematuria, dysuria, increased urinary frequency and urgency, as well as severe pelvic pain. Oxazaphosphorine-based chemotherapy, including cyclophosphamide and ifosfamide (IFO), is one main cause of HC. Despite advances in HC management, administration of higher doses of these drugs, such as in preconditioning for bone marrow transplantation, HC remains a serious clinical problem. Curcumin is the component of *Curcuma longa* rhizomes, which has biological interest for its anti-inflammatory and anticancer properties. In the present research, the protective effect of curcumin was evaluated on hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide. **Methods:** Swiss male mice (20-25 g) were treated by oral administration with vehicle (0.9% saline, tween 80 and 70% alcohol) or curcumin (10, 30 and 100 mg/kg) 1h before and 6h after induction of HC with IFO (400 mg / kg, ip). Following 12h of HC induction, the mice were euthanized for bladder excision. Macroscopic damage, vascular permeability, myeloperoxidase, histopathological injury, cytokine levels, and E-selectin immunostaining were measured. ANOVA/Bonferroni or Kruskal-Wallis/Dunn's test were used for statistical analysis. $p < 0.05$ was accepted as significant. **Results:** Curcumin attenuated edema and hemorrhage scores at doses of 10, 30 and 100 mg/kg ($p < 0.05$) when compared to the IFO group. Curcumin at the dose of 30 mg/kg also reduced bladder wet weight ($p < 0.05$ vs IFO). The histopathological analysis showed that the IFO promoted edema, hemorrhage, and urothelial damage, and this injury was significantly prevented by curcumin, as detected by preserved urothelial and muscle layer, as well as absence of edema and hemorrhage. In addition, curcumin attenuated neutrophil accumulation into the bladder. Conversely, IFO-related increased levels of KC (keratinocyte chemokine, a murine analogue of the human chemokine IL-8) and interleukin-1 (IL-1) in the bladders were not prevented by curcumin (30mg/kg). On the other hand, there was a significant reduction in the immunoexpression of E-selectin in curcumin-administered group. **Conclusion:** Curcumin has anti-inflammatory activity in HC due to the inhibition of neutrophil migration probably by reduction of E-selectin expression.

Keywords: Hemorrhagic cystitis, ifosfamide, curcumin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Mecanismo de alquilação da guanina do DNA	10
Figura 2	– Estrutura química das oxazafosforinas	10
Figura 3	– Estrutura química da mesna	11
Figura 4	– Vias da patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas	15
Figura 5	– Turmérico	16
Figura 6	– Fórmula molecular da curcumina	17
Figura 7	– Vias metabólicas da curcumina: reações de fase 1 e 2	18
Figura 8	– Efeito de diferentes doses de curcumina no Peso Úmido Vesical (PUV) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (IFO)	32
Figura 9	– Efeito de diferentes doses de curcumina no escore de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (IFO)	33
Figura 10	– Efeito de diferentes doses de curcumina na permeabilidade vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (IFO)	34
Figura 11	– Fotomicrografias representativas do efeito da curcumina 30mg/Kg na bexiga de camundongos com CH induzida por ifosfamida 400 mg/Kg	36
Figura 12	– Efeito de diferentes doses de curcumina sobre recrutamento de neutrófilos na cistite induzida por ifosfamida	37
Figura 13	– Efeito da curcumina no nível de KC na bexiga de camundongos tratados com ifosfamida a 400 mg/Kg	38
Figura 14	– Efeito da curcumina 30mg/Kg na concentração de IL-1 β em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida (400 mg/Kg)	39
Figura 15	– Fotomicrografias representativas da imunomarcção para E-selectina em bexigas de camundongos.	40
Figura 16	– Efeito da administração oral de Curcumina na expressão endotelial de E-selectina em bexiga de camundongos.	41
Figura 17	– Proposta de mecanismo de ação da curcumina na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	–	Análise de variância
ATP	–	Trifosfato de adenosina
BDMC	–	Bisdesmetoxicurcumina
CH	–	Cistite hemorrágica
COX-2	–	Cicloxygenase 2
CEUA	–	Comitê de Ética no Uso de Animais
CUR	–	Curcumina
CYP	–	Ciclofosfamida
DMC	–	Desmetoxicurcumina
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	–	Ensaio imuno-enzimático
EUA	–	Estados Unidos da América
GMP-c	–	Monofosfato cíclico de guanosina
HE	–	Hematoxilina-eosina
ICAM-1	–	Molécula de adesão intercelular
IFO	–	Ifosfamida
IL	–	Interleucina
INCA	–	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	–	Óxido nítrico sintase induzível
KC	–	Quimiocina derivada de queratinócito
LAFICA	–	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LOX	–	Lipoxigenase
MESNA	–	2-mercaptoetanosulfonato de sódio
MPO	–	Mieloperoxidase
MYD88	–	Proteína adaptadora fator de diferenciação mieloide 88
NF-κB	–	Fator de transcrição nuclear
NO	–	Óxido nítrico
PAF	–	Fator de ativação plaquetária

- PTX3 – Pentotraxina 3
- RNA – Ácido ribonucleico
- TCPH – Transplante de células progenitoras hematopoéticas
- TLR-4 – Receptor do tipo Toll
- TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
- WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
g	Gramas
kg	Quilogramas
M	Molar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
μL	Microlitros
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Câncer	8
1.2	Quimioterápicos: as oxazafosforinas como agentes alquilantes	8
1.3	Cistite hemorrágica	12
1.3.1	<i>Citocinas e mediadores inflamatórios na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida: contribuições do LAFICA</i>	13
1.4	Curcumina	16
1.4.1	<i>Metabolismo da curcumina</i>	17
1.4.2	<i>Absorção da curcumina</i>	20
1.3.4	<i>Ação biológica da curcumina</i>	21
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVO	23
3.1	Geral	23
3.2	Específico	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Animais	24
4.2	Drogas	24
4.3	Preparação da solução de curcumina	24
4.4	Modelo de indução de cistite hemorrágica por ifosfamida	24
4.5	Grupos experimentais	25
4.5.1	<i>Experimento 1</i>	25
4.5.2	<i>Experimento 2</i>	25
4.6	Avaliação dos parâmetros gerais de indução de cistite hemorrágica por ifosfamida	26
4.6.1	<i>Avaliação do Peso Úmido Vesical</i>	26
4.6.2	<i>Análise Macroscópica (EDEMA / HEMORRAGIA)</i>	26
4.6.3	<i>Análise Microscópica (histopatológico)</i>	27
4.6.4	<i>Avaliação da permeabilidade vesical</i>	27
4.7	Avaliação de parâmetros inflamatórios	28
4.7.1	<i>Determinação da infiltração de neutrófilo através da atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO)</i>	28

4.7.2	<i>Detecção das citocinas KC, e IL-1β por ELISA</i>	29
4.7.3	<i>Expressão por imunohistoquímica de E-selectina na bexiga</i>	29
4.8	Análise estatística	30
5	RESULTADOS	31
5.1	Avaliação de diferentes doses de curcumina sobre os parâmetros de indução da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	30
5.1.1	<i>Avaliação de diferentes doses de curcumina na permeabilidade vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida</i>	34
5.1.2	<i>Efeito da curcumina sobre as alterações histopatológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (IFO)</i>	35
5.1.3	<i>Avaliação da curcumina sobre o infiltrado neutrofílico na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida</i>	36
5.2	Determinação de KC e IL-1 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	39
5.3	Imunohistoquímica para E-selectina na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida após tratamento com curcumina	37
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é um termo genérico para descrever um grupo de doenças proliferativas celulares que podem afetar qualquer parte do corpo. Outros termos utilizados são tumores malignos e neoplasias. Uma característica do câncer é a geração de células com potencial replicativo a partir de mutações, que posteriormente podem invadir tecidos adjacentes e se espalhar para outros órgãos, este último chamado de metástase, sendo este, um dos principais mecanismos responsáveis pelo óbito de pacientes. O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo e foi responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015. Globalmente, quase 1 em cada 6 mortes é associada ao câncer (WHO, 2017).

A quimioterapia antineoplásica compõe uma das formas de tratamento do câncer. Entretanto, os fármacos desse grupo afetam tanto as células normais como as neoplásicas. Os efeitos terapêuticos e tóxicos dos quimioterápicos dependem do tempo de exposição e da concentração plasmática da droga. A toxicidade é variável para os diversos tecidos e depende da droga utilizada e incluem mielossupressão, alopecia e alterações gastrintestinais, como náuseas, vômitos e diarreia (INCA, 2017).

1.2 Quimioterápicos: as oxazafosforinas como agentes alquilantes.

Os compostos utilizados na quimioterapia de doenças neoplásicas exibem acentuada variação em sua estrutura e em mecanismos de ação, incluindo agentes alquilantes, análogos antimetabólicos do ácido fólico, das pirimidinas e das purinas, produtos naturais, hormônios, antagonistas hormonais e uma variedade de agentes dirigidos para alvos moleculares específicos (CHABNER, 2012).

Os agentes alquilantes agem modificando diretamente a estrutura do DNA e seu uso clínico foi favorecido por observações em marinheiros inadvertidamente expostos às mostardas nitrogenadas durante a Segunda Guerra Mundial. Foi constatado que esses homens apresentaram uma drástica supressão das células hematopoiéticas, sugerindo que os agentes alquilantes poderiam ter utilidade terapêutica em neoplasias malignas derivadas do sangue, como as leucemias. Pouco depois, foi sugerido que os agentes alquilantes também poderiam ser úteis no tratamento de tumores epiteliais, tumores mesenquimatosos, carcinomas e

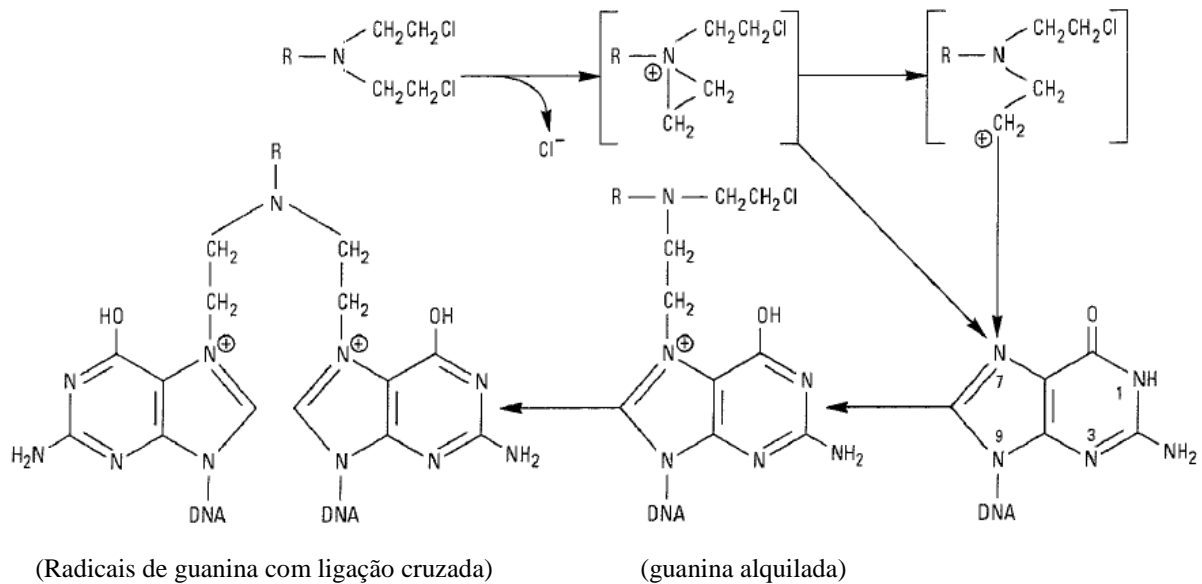
sarcomas; com efeito, hoje esses agentes são comumente utilizados no tratamento de todas essas doenças (BARBIE; FRANK 2009).

Biologicamente os agentes alquilantes representam uma classe de moléculas citotóxicas, que possuem, em comum, a habilidade de tornarem-se compostos eletrofílicos fortes, que formam ligações covalentes com os grupos do DNA e, assim, impedindo a sua replicação (GERMANAS; PANDYA, 2002). A etapa principal da ação dos agentes alquilantes é a formação de um íon carbônio – um átomo de carbono com apenas seis elétrons em sua camada externa. Estes íons são altamente reativos e reagem instantaneamente com um doador de elétrons, como os grupos amina, hidroxila ou sulfidroxila. A maioria dos agentes alquilantes anticâncer citotóxicos são bifuncionais, ou seja, possuem dois grupos alquilantes (RANG et al., 2012).

A alquilação do DNA no interior do núcleo provavelmente representa a principal interação que leva à morte celular (**FIGURA 1**). Dependendo do agente específico, a alquilação pode ocorrer nos átomos de nitrogênio ou de oxigênio da base nitrogenada, na estrutura de fosfato ou em uma proteína associada ao DNA. Os átomos N-7 e O-6 das bases de guanina mostram-se particularmente suscetíveis à alquilação (CHU, SARTOLLI 2014; BARBIE; FRANK 2009).

As oxazafosforinas são um grupo de fármacos citotóxicos alquilantes em que seus principais representantes é a ciclofosfamida e a ifosfamida. Ambas são pró-drogas cujo metabolismo hepático produz substâncias eletrofílicas capazes de se ligar aos grupos nitrogenados dos ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA), bem como a alguns elementos proteicos, corrompendo a sua estrutura (CHABNER, LONGO, 2005). Quimicamente estes compostos são isômeros de fórmula ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$), que diferem entre si apenas pela posição de um grupamento cloroetil, como pode ser visto na Figura 2 (MOURÃO, 2012).

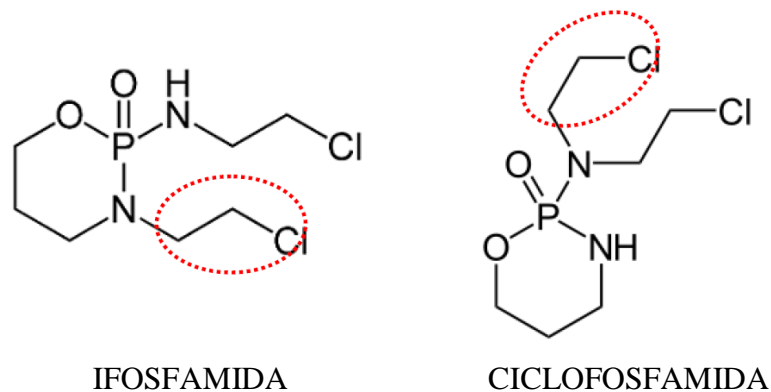
Figura 1 - Mecanismo de alquilação da guanina do DNA.



Fonte: Katzung, Marters, Trevo (2014).

A toxicidade dos agentes alquilantes depende da dose e pode ser grave, por via de regra elas acontecem devido à lesão do DNA das células normais. Essa toxicidade manifesta-se tipicamente nos tecidos de rápida proliferação, como medula óssea, o epitélio do trato gastrointestinal e do trato geniturinário e nos folículos pilosos. Por outro lado, pode resultar da ação de produtos do metabolismo da molécula original do fármaco, como, por exemplo, a acroleína (um subproduto metabólico hepático da ciclofosfamida ou de seu análogo, a ifosfamida) podendo produzir a cistite hemorrágica, devido a seu acúmulo e concentração na bexiga (BARBIE; FRANK 2009).

Figura 2 - Estrutura química das oxazafosforinas



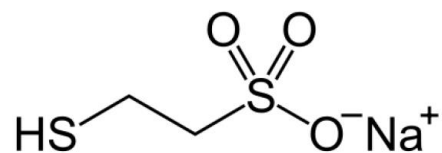
Fonte: Mourão, (2012).

A cistite hemorrágica causada pela ifosfamida apresenta-se de forma difusa e com edema por toda parede da bexiga, podendo ocasionar anemia devido à hematúria, infecções recorrentes do trato urinário, hidronefrose, insuficiência renal, constrição da bexiga e morte (SENCER et al., 1993). Os métodos para o tratamento da cistite induzida pelas oxazafosforinas incluem hiper-hidratação, constante irrigação da bexiga, esvaziamento frequente, drenagem com cateter e cateterização uretral, sendo todas medidas profiláticas com o intuito de diminuir o tempo de contato da acroleína com as paredes da bexiga, diminuindo assim a urotoxicidade (RIBEIRO et al., 2012).

Uma medida que visa neutralizar o efeito tóxico da acroleína é a administração sistêmica de MESNA (2-mercaptoetanosulfonato de sódio) que resulta em detoxicação do sistema urinário. O mesna se liga à acroleína e esta interação resulta em um composto inativo, não anulando a atividade antitumoral do fármaco. Portanto, o mesna está indicado para prevenir a ocorrência de cistite hemorrágica, embora não seja efetivo quando a lesão já estiver estabelecida (RIBEIRO et al., 2012).

O mesna (**FIGURA 3**) é um composto tiol que, logo após sua administração endovenosa, sofre oxidação rápida no plasma a dimesna. Apenas pequena proporção do composto ativo permanece no plasma. Mesna e dimesna são hidrofílicos, ficando no compartimento intravascular e sendo rapidamente depurados pelos rins. Os grupos sulfidril (tiol) livres do mesna combinam-se com a acroleína e a outros metabólitos urotóxicos, formando compostos não tóxicos estáveis (ROSA, 2004).

Figura 3 - Estrutura química do mesna.



Fonte: Mourão, (2012).

O mesna tem um papel fundamental na diminuição da gravidade e incidência da cistite hemorrágica, uma vez que possibilita a utilização de doses maiores das oxazafosforinas e, conseqüentemente, o aumento da eficácia dos tratamentos antineoplásicos (KOC et al, 2000; ELZIMAITY et al, 2004; HADJIBABEI et al, 2008).

Entretanto, em um estudo clínico controlado randomizado de pacientes em tratamento quimioterápico à base de ifosfamida, demonstrou-se que mesmo com profilaxia clássica com três doses de mesna, 66,7% dos pacientes apresentaram lesões cistoscópicas e 100% de dano urotelial, como edema, exocitose e hemorragia (LIMA et al., 2007).

1.3 Cistite hemorrágica

A cistite é um processo inflamatório da bexiga, caracterizado por alterações na mucosa, e que pode apresentar como sinais característicos a hematúria (presença de sangue na urina), disúria (dor ao urinar), aumento da frequência e urgência urinária, além de dor pélvica intensa (SAKTHIVEL et al., 2008). Essa patologia pode ser causada por infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias, por radiação, medicamentos, agentes químicos (ifosfamida e ciclofosfamida) ou ainda, pode ter origem idiopática (NEHEMAN et al., 2005; SAINI et al., 2008; GROVER et al., 2011; VYKHOVANETS et al., 2012).

Já a Cistite Hemorrágica (CH) é uma forma mais severa desta patologia que pode trazer importantes complicações pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas com uma incidência variando de 7 a 70% entre estes pacientes. Uma CH leve pode causar disúria e hemorragia microscópica e muitas vezes está associada aos efeitos tóxicos do condicionamento realizado no pré-transplante. Isto também pode ocorrer durante ou imediatamente após o condicionamento (LEUNG et al., 2002).

Dentre as causas mais frequentes de CH crônicas recorrentes estão à quimioterapia com as oxazafosforinas, tais como a ciclofosfamida (CYP) e seu análogo sintético, a ifosfamida (IFO), e as radioterapias pélvicas (MOY, 2012). Muitos casos de CH leves são resolvidos espontaneamente sem complicações; porém casos de CH moderada à severa podem resultar em significativa morbidade ou até mesmo mortalidade (CHEUK et al., 2007; MANIKANDAN; KUMAR; DORAJAN, 2010).

E ao contrário do que acontece como efeito colateral associado ao uso de agentes antineoplásicos como mucosite oral e intestinal ou a mielossupressão, a CH não deriva da ação citotóxica da droga usada no tratamento anticâncer, trata-se de um processo inflamatório de intensidade variável causada pela eliminação renal de metabólitos tóxicos da ciclofosfamida e da ifosfamida, do qual se destaca a acroleína como principal responsável pelo dano urotelial (PHILLIPS et al., 1961; FORNI; KOSS; GELLER, 1993).

1.3.1 Citocinas e mediadores inflamatórios na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida: contribuições do LAFICA

O dano epitelial na bexiga causado pela acroleína já foi relatado que pode ocorrer em cerca de 20 a 40% dos pacientes que estão em tratamento contra o câncer, e é dose dependente. No entanto a incidência de cistite hemorrágica pode acometer até 5% dos pacientes mesmo com a administração da mesna (BALIS; HOLCENBERG; POPLACK, 1997). Já Korkmaz; Topal; Obter (2007) e Ribeiro et al (2012) baseado nessas observações levantaram a hipótese de que o dano urotelial não seria causado somente pela ação citotóxica da acroleína, sugerindo que essa substância deveria ativar vias importantes do processo inflamatório, envolvendo vários mediadores que potencializam os efeitos citotóxicos e subsequente dano urotelial.

Desde o início da década de 90 o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) vem se dedicando aos estudos da fisiopatologia e dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica experimental induzida por ifosfamida, e o que se sabe até hoje é que vários mediadores contribuem para a gênese e o consequente dano urotelial da cistite hemorrágica, assim como outros atuam como agentes protetores, atenuando o processo inflamatório.

Em 1995, Gomes et al. sugeriu em seu estudo que o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a citocina pró-inflamatória interleucina 1 β (IL-1) são mediadores cruciais envolvidos em eventos inflamatórios gerados na cistite hemorrágica, visto que ao pré-tratarem camundongos Swiss com soro anti-TNF- α e anti-IL-1, os parâmetros de peso úmido e permeabilidade vascular reduziram significativamente quando comparados com os grupos tratados apenas com ciclofosfamida. Já em Souza-filho et al. (1997) avaliou a relação do óxido nítrico na cistite induzida por ciclofosfamida, indicando que os eventos inflamatórios também estão relacionados à presença do NO.

A migração dos neutrófilos no desenvolvimento da CH também foi descrita nos estudos de Assreuy et al. (1999) dando continuidade às pesquisas do LAFICA. Naquela ocasião foi demonstrado que lectinas de plantas com afinidade específica por resíduos de glicose-manose exercem atividade anti-inflamatória na CH induzida por ciclofosfamida, uma vez que são capazes de diminuir de forma significativa o dano urotelial através do provável bloqueio competitivo da ligação com as selectinas e consequente inibição da migração de leucócitos para o sítio inflamatório.

Vieira et al (2003) ao estudar o efeito de glicocorticoide adicionado às duas últimas doses de mesna, comprovou que a dexametasona é capaz de diminuir o edema vesical e as alterações macro e microscópicas provocadas pela cistite. Esse efeito poderia ser explicado por dois motivos: 1) pelo fato dos glicocorticoides serem potentes inibidores da síntese de citocinas tais como TNF- α , IL-1 β e iNOS, os mesmos que anos atrás já haviam sido associados à patogênese da cistite hemorrágica; 2) Como a dexametasona também é um potente inibidor da migração de neutrófilos, seria provável que essa ação também poderia contribuir para a prevenção da cistite.

Adicionalmente, Gifoni (2008) demonstrou a relação da pentraxina 3 (PTX3) na CH induzida por ifosfamida e que sua produção é consequente ao estímulo de TNF- α e, em menor escala, ao estímulo por IL-1 β , visto que talidomida e amifostina são capazes de reduzir a imunoexpressão de PTX3. Além disso, a PTX3 parece potencializar a expressão de iNOS.

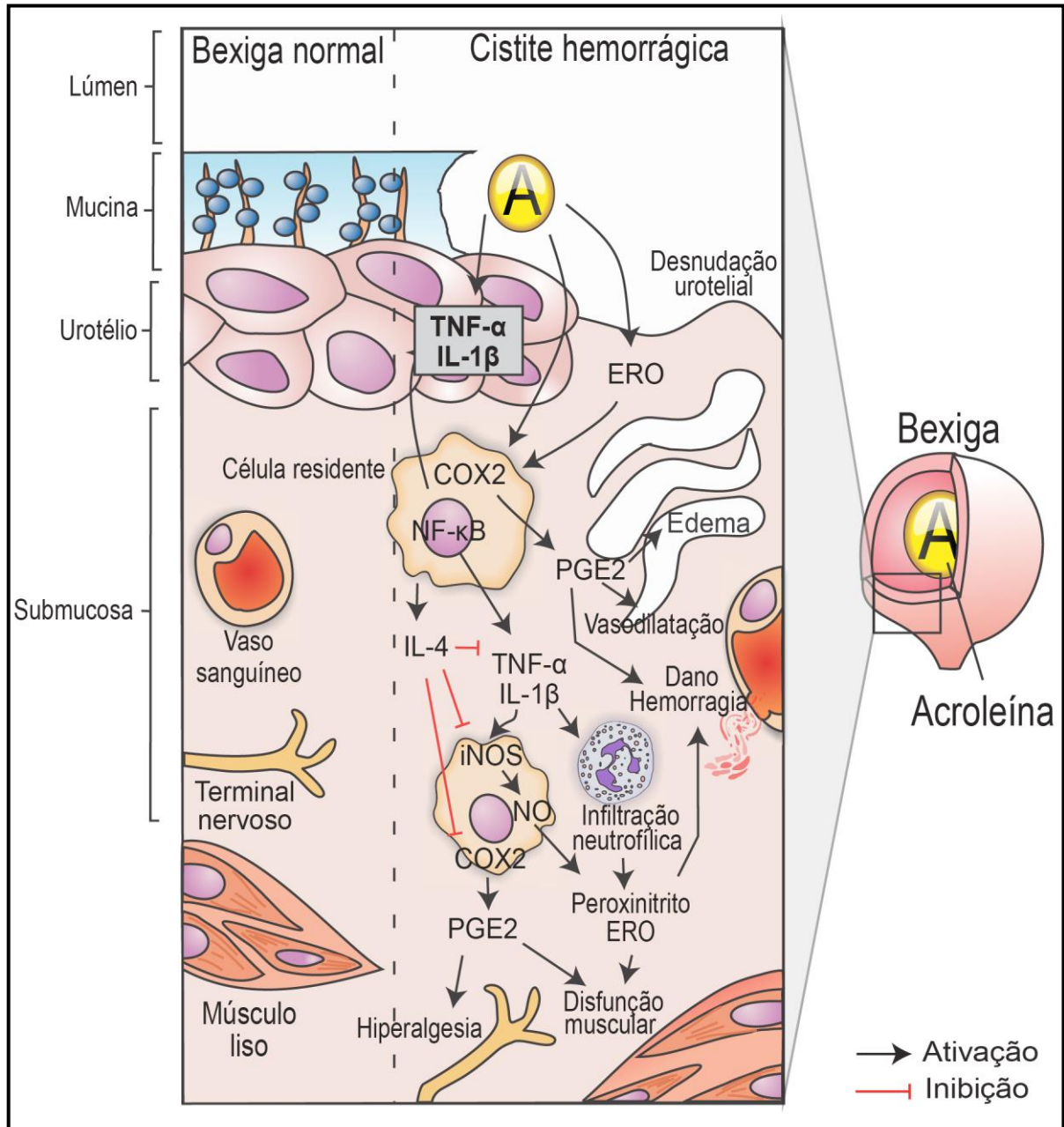
Posteriormente, Macedo et al. (2011) sugeriu o papel de cicloxigenase-2 na lesão vesical associada à ifosfamida, uma vez que a inibição dessa enzima com indometacina ou com etoricoxibe levou à atenuação dos danos histopatológicos e das alterações funcionais.

Mourão (2012), como uma das últimas contribuições do LAFICA nessa linha de pesquisa, demonstrou que a amifostina possui ação protetora no controle da disfunção vesical causada pela ifosfamida, através de bloqueio na formação de NO e da abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP.

Na busca por entender e se criar um esquema mais simplificado e de fácil leitura sobre os achados experimentais acerca da patogênese da CH induzida pelas oxazafosforinas, Ribeiro e colaboradores (2012) propuseram um esquema das vias que levam dano ao epitélio da bexiga, como pode ser visto na Figura 4.

Como citado anteriormente, apesar dos avanços no conhecimento da patogênese da cistite, o manejo clínico desta toxicidade ainda é limitado em situações em que altas taxas de dose quimioterápica são empregadas. Isso abre espaço para pesquisas de drogas com potencial uroprotetor. Nesse sentido, produtos naturais com reconhecida atividade anti-inflamatória, como a curcumina, apresentam-se como potenciais agentes terapêuticos.

Figura 4 - Vias da patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.



Fonte: Leite, 2014. Fase de iniciação: acúmulo de acroleína, levando a danos uroteliais. Fase inflamatória: *up-regulation* dos fatores de transcrição (NF-kappaB), liberação de citocinas inflamatórias por células residentes, como macrófagos. Resposta amplificada por citocinas, espécies reativas de oxigênio, expressão de óxido nítrico sintase induzida. Fase sintomática: perda de urotélio e formação de úlceras, presença de dor e disfunção vesical. Fase de cicatrização: reparo dos tecidos com possível sinalização por fibroblastos e liberação de fatores de crescimento como o fator de crescimento de queratinócitos.

1.4 Curcumina

A *Curcuma longa* L. é um arbusto perene endêmico da Índia e sua parte vegetal com maior utilização é o rizoma, que pode ser consumido fresco ou seco. Para fins de conservação, esse rizoma é desidratado e moído, gerando um pó de coloração dourada denominado turmérico (**FIGURA 5**). A utilização do turmérico remete às primeiras descrições de *C. longa* L., e historicamente tem aplicação na culinária, medicina e religião (SANTIAGO et al., 2015).

Figura 5 – Turmérico



Pó do rizoma

Fonte: Mendonça, 2012.

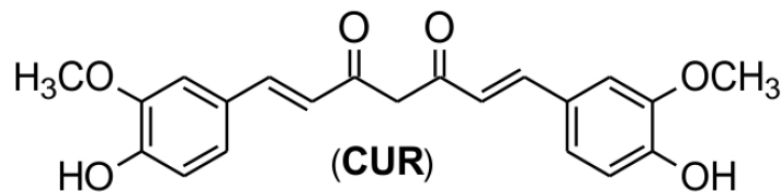
Esta planta também pode receber a denominação de açafão, açafão-da-índia, açafão-da-terra, açafroa, açafroeira, açafroeiro-da-índia, batata-amarela, gengibre-amarelo, gengibre-dourada e mangarataia (LORENZI; MATOS, 2002). Pertencente à família Zingiberaceae é uma planta de pequeno porte que mede aproximadamente 1m e amplamente cultivada nos países asiáticos. Tem sido utilizado há anos como alimento na forma de especiarias, devido ao seu forte sabor e a sua coloração amarela marcante (VILELA; ARTUR, 2008).

A composição química do turmérico é bastante variada, tendo como principais classes de compostos os terpenos voláteis, presentes no óleo essencial de diferentes partes do vegetal, além dos curcuminóides, componentes majoritários da fração não volátil. Estes ocorrem em maior proporção nos rizomas da planta, com destaque para curcumina (**FIGURA 6**), desmetoxicurcumina (DMC) e bisdesmetoxicurcumina (BDMC), além de curcuminóides minoritários (SANTIAGO et al., 2015).

Entre os curcuminóides a curcumina é o componente majoritário dos rizomas de *C. longa L.*, sendo responsável por cerca de 2% do peso seco dos rizomas. A curcumina pode ser obtida comercialmente como uma mistura dos três componentes em uma proporção que gira em torno de 77% de curcumina (CUR), 17% de desmetoxicurcumina (DMC) e 3% de bisdesmetoxicurcumina (BDMC) (GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008). Devido às suas numerosas atividades biológicas e potenciais benefícios para a saúde, os curcuminóides são de interesse atual, principalmente como agente anti-inflamatório e anticancerígeno (METZLER, 2013).

Vários outros efeitos biológicos e aplicações terapêuticas têm sido explorado nos curcuminóides, entre eles efeitos antiprotozoários, antimicrobianos, antivirais e aplicação em doenças cardiovasculares, diabetes e em doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla, Parkinson e Alzheimer (AGGAARWAL; HARIKUMAR, 2009; GUPTA et al, 2012).

Figura 6 - Fórmula molecular da curcumina



Fonte: Santiago et al., 2015.

1.4.1 Metabolismo da curcumina

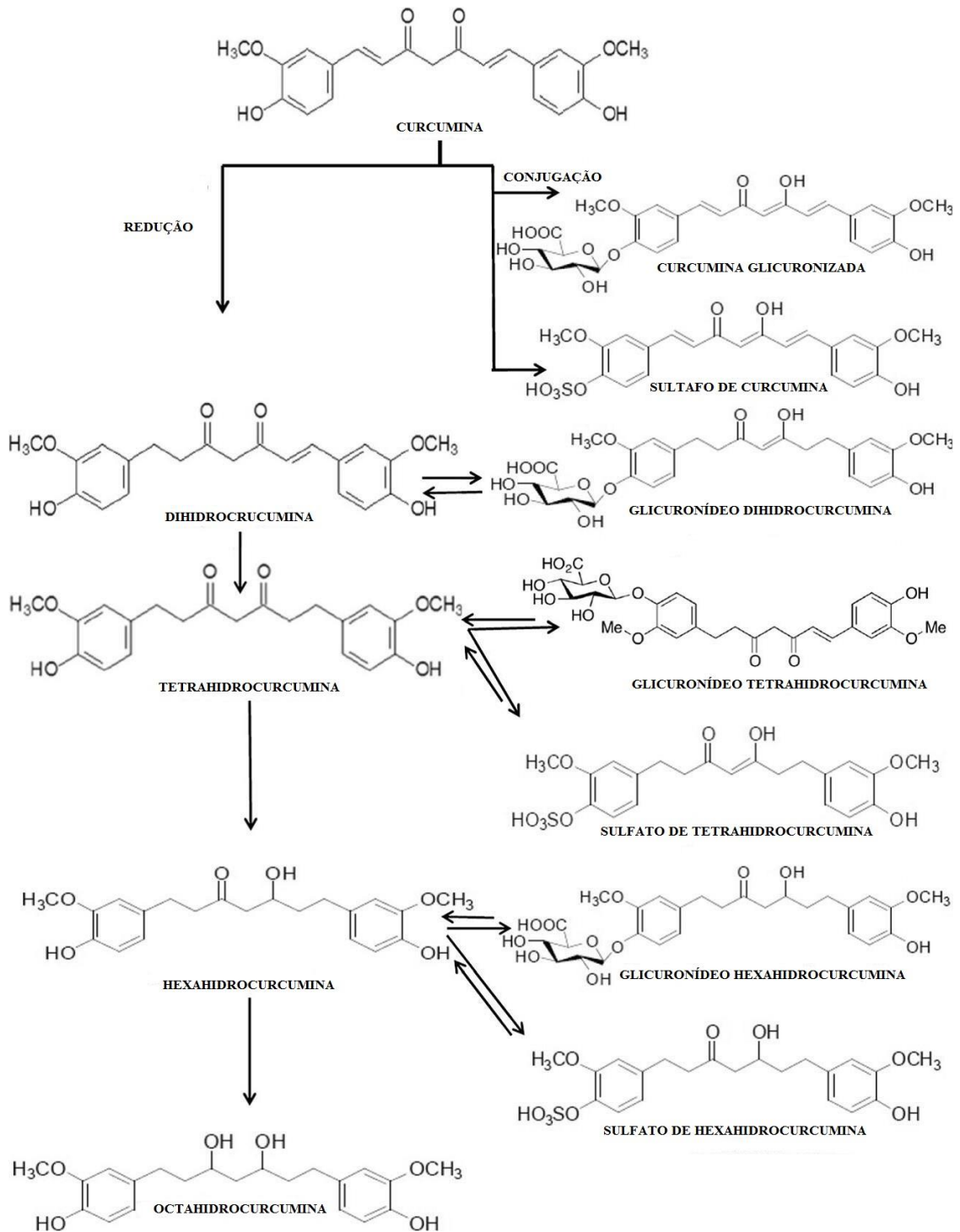
Os primeiros estudos do metabolismo da curcumina remontam de 1978 quando Holder, Plummer e Ryan lançaram os resultados de uma pesquisa em que se avaliaram as alterações moleculares da curcumina em organismos de ratos após a administração oral e intraperitoneal. No mesmo estudo, realizou-se a marcação da curcumina com trítio e deutério e, em seguida, foram quantificados os metabólitos através de espectrometria de massa. Os metabólitos detectados eram em sua maioria produtos da glicuronização.

Hoje é aceito que a curcumina sofre um extenso metabolismo de primeira passagem seguido de biotransformação de fase 1 e fase 2 no fígado e no intestino, tendo como metabólitos finais o tetra, hexa e octahidrocurcumina na fase 1 (redução) (MAHRAN et al.,

2016). Já na fase 2 a curcumina é conjugada com glicuronídeos, glutathione e sulfatos no intestino e no citosol de células hepáticas (IRESON et al., 2002) (**FIGURA 7**).

O tipo de metabolismo envolvido está diretamente ligado à via de administração da curcumina. Administração oral leva à formação direta de metabólitos de fase 2 (conjugação) ao passo que administrações intraperitoneais ou intravenosas geram preferencialmente metabólitos de redução ou fase 1 (ASAI, MIYAZAWA, 2000; ANAND et al., 2007).

Figura 7 - Vias metabólicas da curcumina: reações de fase 1 e 2.



Fonte: Adaptado de Mahran et al., 2016. No metabolismo de fase 1 a curcumina é reduzida no fígado e no epitélio intestinal para tetra, hexa e octahydrocurcumina. Na fase 2 a curcumina é conjugada com glucuronídeos e glutatonas ou sulfatadas no citossol intestinal e hepático.

1.4.2 Absorção da curcumina

A curcumina é muito pouco solúvel em meio aquoso, sendo assim, torna-se necessário a utilização de adjuvantes para aumentar sua solubilidade, como solventes apróticos (DMSO) ou surfactantes, entre outros (COLETTI, 2013).

Surfactantes são compostos orgânicos formados por dois grupos estruturais diferentes, um solúvel em água (grupo polar ou hidrofílico) e o outro insolúvel em água (grupo apolar ou hidrofóbico) (CROSS, 1997). Quando dissolvidas em água, as moléculas do surfactante se auto-associam em agregados micelares, com suas caudas hidrofóbicas protegidas da água no interior dos agregados, e a sua cabeça hidrofílica expostas a água na superfície desses agregados. Esta auto associação é impulsionada principalmente pelas interações hidrofóbicas, embora interações de Van Der Waals, pontes de hidrogênio, também desempenhem um papel importante na micelização (ISRAELACHVILI, 1991). De acordo com suas características peculiares, os surfactantes ou tensoativos atuam como detergentes, agentes emulsificantes, dispersantes ou solubilizantes (ROSSI et al., 2006).

O monooleato de sorbitan etoxilado 80, também conhecido como polissorbato 80 ou tween 80, é um surfactante não-iônico que já foi usado como agente dispersante por vários pesquisadores. A adição de moléculas de surfactantes, como o tween 80, forma micelas e pode fornecer a influência necessária para estabilizar moléculas de curcumina em água (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2012).

A curcumina possui grande potencial farmacológico, porém alguns fatores limitam suas aplicações terapêuticas, principalmente por suas características físico-químicas, incluindo baixa solubilidade aquosa em condições de pH ácido e fisiológico, hidrólise rápida em pH alcalino e instabilidade em presença de luz (SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005).

Estrategicamente, a indústria farmacêutica vem utilizando técnicas que possa melhorar a farmacocinética da curcumina, uma destas é tentar complexar a curcumina com um fosfolípídeo bastante lipofílico chamado fosfatidilcolina. A curcumina, comercialmente complexada com fosfatidilcolina vendida com o nome de Meriva[®], é facilmente incorporado as membranas celulares lipofílicas, tornando-se significativamente mais biodisponível do que a curcumina não ligada (MARCZYLO et al., 2007; JULIE, JURENKA, 2009).

Outra estratégia comumente feita na clínica para aumentar a biodisponibilidade da curcumina é a utilização de adjuvantes que bloqueiam sua biotransformação, como é o caso da piperina, um alcalóide extraído das sementes de *Piper nigrum L.* e *Piper longum L.*, que

inibe os processos de glucuronidação hepática e intestinal, e aumenta o efluxo de drogas (GUPTA et al., 2012; ZHOU et al., 2012).

1.4.3 Ação biológica da curcumina

Têm sido atribuídos à curcumina diversos efeitos biológicos. Existem estudos demonstrando sua atividade antioxidante, antimicrobiana, anticarcinogênica e anti-inflamatória. Além disso, foi demonstrado em modelos animais e humanos que a curcumina pode ser extremamente segura, mesmo quando usada em doses muito altas (ANAND, *et al* 2008).

Essa ampla variedade de efeitos deve-se ao seu grande número de alvos moleculares que podem ser divididos em duas categorias: aqueles que a curcumina liga-se diretamente, modulando sua atividade, e outra categoria que envolve modulação indireta ou secundária. Dentre os alvos diretos da curcumina encontram-se enzimas como a cicloxigenase-2 (COX-2) e a lipooxigenase (LOX) (GAFNER et al., 2004; HONG et al., 2004). Os alvos indiretos podem ser regulados positiva ou negativamente dependendo do alvo e da célula. Esse tipo de ação ocorre, por exemplo, através de sua ação sobre fatores de transcrição, como o NF- κ B (SOUZA, 2012).

Essa inibição da via do NF- κ B acontece, simultaneamente, em diversos pontos da via de ativação. Inicialmente, os estímulos extracelulares que ativam a cascata de formação do NF- κ B dependem da presença de espécies reativas de oxigênio, que são decorrentes de lesões, processos inflamatórios e estresse oxidativo. A presença das hidroxilas fenólicas e da subunidade 1,3-dicetênica da curcumina consegue capturar os radicais dessas espécies reativas, minimizando a ativação da via (SANTIAGO, 2015).

Portanto, devido aos efeitos supracitados sobre os mediadores que participam da patogênese da cistite hemorrágica e dos estudos com a curcumina comprovando seu papel modulador em processos inflamatórios, a curcumina foi utilizada neste trabalho como potencial agente protetor na cistite hemorrágica experimental.

2 JUSTIFICATIVA

A cistite hemorrágica induzida por quimioterápicos é uma complicação clínica comum do tratamento oncológico. Compreender os mecanismos que geram a resposta inflamatória e sua consequente fisiopatologia abre um vasto campo de estudo na identificação de alvos farmacológicos e na criação de estratégias terapêuticas. Já estão bem elucidados os papéis de alguns mediadores proinflamatórios na gênese da CH, tais como a IL-1 β , TNF- α , COX-2 e NO. Apesar de ser bem responsiva ao uso profilático do mesna, a CH ainda apresenta relativamente refratária quando tratada com doses altas de oxazafosforinas no pré-condicionamento para o transplante de medula óssea.

A curcumina, um produto natural isolado de *Curcuma longa L.*, tem sido estudada quanto ao potencial antiinflamatório e antitumoral, modulando diversos mediadores reconhecidamente envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica. Esta já vem sendo estudada em modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em ratos (ARAFA 2009) e com isso já foi possível mostrar o seu papel na modulação de TNF- α e NO por exemplo. No entanto, a caracterização de sua ação em modelo de CH induzido por ifosfamida em camundongos ainda não tem dados descritos na literatura. Baseado nesses aspectos, o presente trabalho buscou investigar o potencial efeito anti-inflamatório da curcumina sobre a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e os mecanismos envolvidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito da curcumina nos parâmetros inflamatórios envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos.

3.2 Específicos

- (a) Investigar o efeito de curcumina oral sobre os parâmetros macroscópicos e microscópicos de lesão e sobre a migração de neutrófilos na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida;
- (b) Avaliar o efeito da curcumina oral sobre a permeabilidade vesical;
- (c) Examinar o efeito da curcumina sobre as dosagens dos marcadores pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e KC;
- (d) Determinar o efeito da curcumina na expressão da molécula de rolamento E-selectina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, com peso entre 20-25 g provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais receberam água e ração comercial balanceada à vontade e foram mantidos em gaiolas com temperatura (22 ± 1 °C), umidade (65-70%) e ciclo de luz (12h claro/ 12h escuro).

Os modelos experimentais utilizados neste trabalho foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, que aprovou os protocolos sob o número 119/16.

4.2 Drogas

Ifosfamida 0,5 g (Haloxone[®] Baxter); Azul de Evans (Sigma Chemical Co.); Tribromoetanol (Sigma Chemical Co.) ; Formamida (Sigma Chemical Co.); Curcumina (Pharmanostra), anticorpo anti-E-selectina (Santa Cruz Biotechnology).

4.3 Preparação da solução de curcumina

A curcumina foi dissolvida em Tween-80 (2% na solução final), álcool 70 (2% na solução final) e NaCl 0,9% para a administração das doses de 10, 30 ou 100 mg/Kg, por via oral, com posterior escolha da dose com melhor resposta inibidora para parâmetros de inflamação dando continuidade aos experimentos seguintes.

4.4 Modelo de indução de cistite hemorrágica por ifosfamida

Para indução da cistite hemorrágica, os animais receberam dose única intraperitoneal (i.p.) de ifosfamida (IFO) (400 mg/Kg). Após 12 horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, através de uma incisão abdominal mediana, realizou-se cuidadosamente a coleta da bexiga, desprezando-se o

conteúdo urinário, em seguida foram pesadas, analisadas macroscopicamente e submetidas às análises descritas a seguir.

4.5 Grupos experimentais

4.5.1 Experimento 1

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n = 6). Distribuídos nos seguintes grupos para decisão da melhor dose a ser utilizada nos experimentos posteriores:

- 1) Grupo CONTROLE: administração do veículo (salina 0,9% + tween 80 + álcool 70%, oral) uma hora antes e seis horas depois da injeção de salina 0,9% i.p.
- 2) Grupo IFO: veículo uma hora antes e seis horas após a indução da CH com ifosfamida (400 mg/Kg) i.p.
- 3) Grupo CUR: Curcumina (10, 30, 100mg/ Kg, oral) uma hora antes e seis horas após a indução da CH com ifosfamida (400 mg/Kg) i.p.

Os animais deste experimento foram submetidos as avaliações do peso úmido, escores macroscópicos de edema e hemorragia, permeabilidade vesical e infiltrado neutrofilico.

4.5.2 Experimento 2

Como anteriormente, os animais foram divididos aleatoriamente agora em apenas 4 grupos (n = 6) após a escolha da dose de 30mg/Kg para prosseguimento das análises. Distribuídos da forma a seguir:

- 1) Grupo CONTROLE: administração do veículo (salina 0,9% + tween 80 + álcool 70%, oral) uma hora antes e seis horas depois da injeção de salina 0,9% i.p.
- 2) Grupo IFO: veículo uma hora antes e seis horas após a indução da CH com ifosfamida (400 mg/Kg) i.p.
- 3) Grupo CUR: Curcumina (30mg/kg, oral) uma hora antes e seis horas após a indução da CH com ifosfamida (400 mg/Kg) i.p.

- 4) Grupo CURCUMINA: Curcumina (30 mg/Kg, oral) uma hora antes e seis horas depois da injeção de salina 0,9% i.p.

Os animais deste experimento foram submetidos as avaliações de histopatologia, dosagens de citocinas e expressão de moléculas de rolamento.

4.6 Avaliação dos parâmetros gerais de indução de cistite hemorrágica por ifosfamida

4.6.1 Avaliação do Peso Úmido Vesical

Depois de dissecadas e retirado o conteúdo urinário com auxílio de papel absorvente (hidrofílico), as bexigas foram pesadas, sendo o peso úmido vesical expresso em mg/20g de peso do animal. O edema vesical foi quantificado por aumento do peso úmido vesical, reportado como média \pm EPM/20 g de peso do animal.

4.6.2 Análise Macroscópica (EDEMA / HEMORRAGIA).

As bexigas foram examinadas macroscopicamente quanto ao edema e hemorragia de acordo com os critérios de Gray et al. (1986), detalhado a seguir:

Edema:

- a) Severo (3+): edema interno e externo;
- b) Moderado (2+): edema interno (mucosa);
- c) Leve (1+): intermediário;
- d) Normal (0): nenhum.

Hemorragia:

- a) (3+): coágulo intravesical;
- b) (2+): hematomas na mucosa;

- c) (1+): telangiectasia ou dilatação dos vasos da bexiga;
- d) (0): Normal

4.6.3 Análise Microscópica (histopatológico)

As bexigas foram fixadas em formol 10%, em seguida desidratadas em álcool 70%, imersas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados (5 µm), com auxílio do micrótomo, corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e analisado por microscopia óptica. As alterações microscópicas foram determinadas pelos critérios de Gray Modificado (MARTINS et al., 2012), que se seguem:

- a) (0): Histologia Normal: caracterizada pelo urotélio normal, bem como ausência de úlcera e infiltrado inflamatório.
- b) (1+): Alterações Discretas: caracterizada por número de células epiteliais diminuídas pela descamação, “apagamento” das dobras habituais da mucosa em decorrência do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras.
- c) (2+): Alterações Moderadas: caracterizada por múltiplas ulcerações da mucosa, edema moderado, infiltrado inflamatório, depósito de fibrina e focos hemorrágicos.
- d) (3+): Alterações Intensas: caracterizada por múltiplas ulcerações da mucosa, erosão na mucosa, edema intenso, infiltrado inflamatório intenso, depósito de fibrina intenso e diversos focos hemorrágicos com possível hemorragia transmural.

4.6.4 Avaliação da permeabilidade vesical

A permeabilidade vascular vesical foi avaliada pela técnica de extravasamento com solução de Azul de Evans. O Azul de Evans é um corante que se liga à albumina plasmática. Caso haja extravasamento de albumina para o tecido inflamado, devido aumento da permeabilidade e conseqüente edema encontraremos o corante no interstício.

Seguindo a mesma divisão dos grupos experimentais previamente apresentados, foi injetado, por via endovenosa, via plexo reto-orbital, 2,5% de solução de Azul de Evans (25

mg/Kg) 30 minutos antes do sacrifício dos animais. As bexigas foram retiradas, dissecadas e incubadas em tubos de ensaio contendo solução de formamida (1 mL/bexiga) à 62°C por 12 h para extração do corante presente no tecido. Posteriormente, o corante presente nos tubos de ensaio foi mensurado pela absorvância em 630 nm (ELISA). Ao mesmo tempo, foi determinada uma curva de absorvância. Os resultados foram expressos em microgramas de Azul de Evans por mg bexiga (média \pm EPM) (MACÊDO et al., 2011).

4.7 Avaliação de parâmetros inflamatórios

4.7.1 Determinação da infiltração de neutrófilos através da atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO).

A quantificação do acúmulo de neutrófilos na bexiga de animais após a indução da cistite por IFO foi determinada pelo ensaio da atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado. Os tecidos foram coletados, conforme protocolo e incubadas em 200 μ L de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,012 M; pH 4,7). Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida foi realizado um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 1000 μ L de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o “*pellet*” foi ressuspensão em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 50 μ L do sobrenadante das bexigas foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25 μ L de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 μ L de H₂O₂ (0,5 mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5 min a 37 °C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. Em seguida os neutrófilos foram quantificados a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1 x 10⁵ neutrófilos/ poço/ 50 μ L). Por fim, foi feita a absorvância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO et al., 2006).

4.7.2 Detecção das citocinas KC e IL-1 β por ELISA

Os níveis de KC e IL-1 β presentes nas amostras foram mensurados por ELISA, como descrito por Melo et al. (2008). Resumidamente, os anticorpos primários, anti-IL-1 e anti-KC foram incubados durante a noite a 4°C em microplacas de 96 poços. Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24 h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo secundário produzido em caprinos anti anticorpos primários, anti-IL-1 e anti-KC. Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1 h, as placas foram lavadas e 100 μ L do complexo estreptavidina-HRP diluída 1:200 foi adicionado em cada poço. Em seguida, foi acrescentado o substrato aos poços (1:1 mistura de H₂O₂ e tetrametilbenzidina; R&D systems, EUA) e após 20 min de incubação à temperatura ambiente em local protegido da luz, a reação enzimática foi parada utilizando H₂SO₄ à 2N. A reação colorimétrica foi mensurada pela absorbância medida a 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/mg de tecido para os ensaios *in vivo* (LIMA-JÚNIOR, et al., 2014).

4.7.3 Expressão por imuno-histoquímica de E-selectina na bexiga.

A partir de amostras de bexiga dos diferentes grupos de animais foi avaliada a expressão da molécula de adesão E-selectina através de técnica de imuno-histoquímica seguindo o método de estreptavidina-biotina-peroxidase descrito por Hsu e Raine (1981). As peças histopatológicas embebidas em parafina foram cortadas em 5 mm de espessura de tecido, montadas em lâminas para microscópio revestidas de poli-L-lisina e processadas em banhos de xileno, álcoois graduados, aquecidas em tampão de citrato, para recuperação de antígenos, e tratadas com 3 % (v/v) de peróxido de hidrogênio, para o bloqueio da peroxidase endógena (15 min). As lâminas foram incubadas a 4°C por 12 h com anticorpo primário anti-E-selectina, diluído de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, foram realizados os procedimentos de lavagem em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS), e as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário. Em seguida, o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (sc-2017, ABC Coloração Sistema de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) foi adicionado, junto com a 3,3'-diaminobenzidina (referência K3468, Dako líquido DAB + peróxido, CA, EUA) e as lâminas foram contrastadas

com hematoxilina de Harry. Após a desidratação dos tecidos em álcool foi realizada a montagem das lâminas. As amostras foram avaliadas por um patologista, que através de teste cego, classificou a imunomarcção nos tecidos em escores variado de 0-3, onde 0 seria equivalente a nenhuma marcação; 1 = imunomarcção fraca, 2 = imunomarcção moderada e 3 = imunomarcção intensa (LIMA-JÚNIOR et al., 2014).

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism[®], versão 5.0, foi realizada empregando o teste de análise de variância One-way (ANOVA) ou Kruskal Wallis conforme propriedade, respectivamente, para dados paramétricos e não-paramétricos, seguidos do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, Newman-Keuls ou Dunn, baseando-se na continuidade das variáveis em análise.

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M ou mediana, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação de diferentes doses de curcumina sobre os parâmetros de indução da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

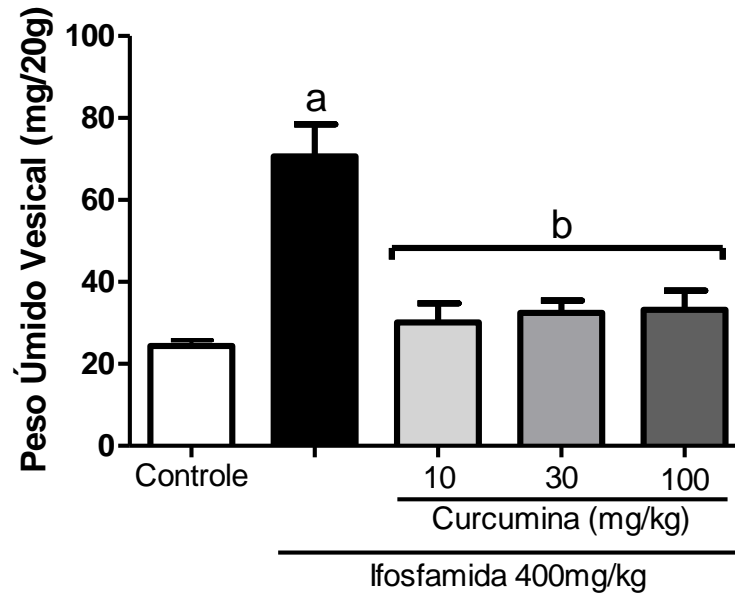
Para induzir os efeitos deletérios da acroleína na bexiga dos camundongos os animais foram tratados com ifosfamida na dose de 400 mg/Kg, via intraperitoneal, com o objetivo de induzir a cistite hemorrágica. Para o protocolo de tratamento preventivo a Curcumina foi administrada por via oral (gavagem), uma hora antes e seis horas depois da administração de ifosfamida.

O esquema de tratamento com duas administrações orais de curcumina baseou-se no fato de que o uso dessa substância é severamente limitado pela sua pouca estabilidade, baixa solubilidade, biodisponibilidade e metabolismo acelerado (RAVICHANDRAN, 2013).

Inicialmente, foi testado o efeito da Curcumina nas doses de 10, 30 e 100 mg/Kg, e os resultados mostram que todas as três doses tiveram respostas positivas e muito parecidas em reduzir o peso úmido vesical (PUV), este que é um dado que mede indiretamente o grau do edema presente no tecido.

A Figura 8 mostra que ifosfamida (400mg/Kg, i.p.) foi capaz de induzir aumento do peso úmido vesical nos animais tratados somente com ifosfamida ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo CONTROLE que recebeu apenas o veículo, uma solução contendo o diluente da curcumina (álcool 70%; Tween 80; NaCl 0,9%). Já os grupos pré-tratados com Curcumina nas doses de 10, 30 e 100mg/Kg, via oral, uma hora antes do início da indução da cistite hemorrágica e seis horas depois, obtiveram diminuição dos parâmetros do peso úmido e escores de edema, diferindo significativamente ($p < 0,05$) do grupo tratado apenas com ifosfamida 400 mg/Kg. Na avaliação do escores de hemorragia apenas a dose de 10mg diferiu ($p < 0,05$) do grupo tratado apenas com ifosfamida 400 mg/kg (**FIGURA 9**)

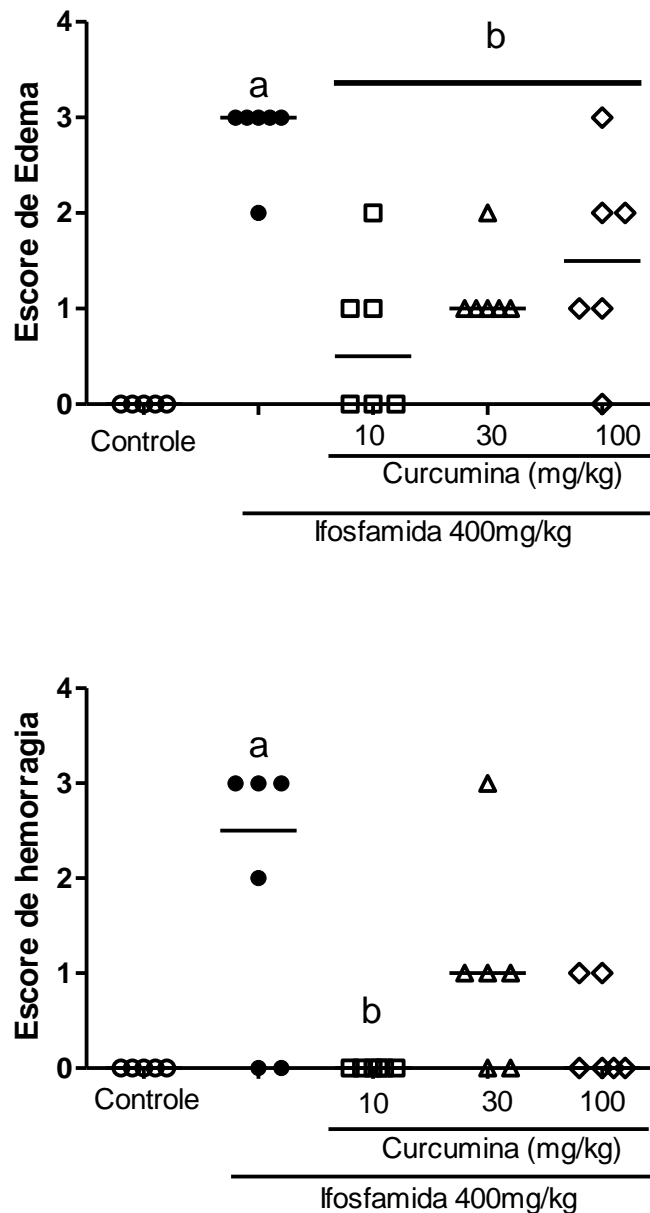
Figura 8 - Efeito de diferentes doses de curcumina no Peso Úmido Vesical (PUV) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (IFO).



Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. dos valores de peso úmido vesical após 12 horas de indução da cistite pela ifosfamida. Grupos: Controle (n = 6) (veículo, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p.); Ifosfamida (n = 6) (veículo, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.); Curcumina (n = 6) (Curcumina 10, 30 e 100mg/Kg, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.). ^ap<0,05 vs grupo Controle; ^bp<0,05 vs grupo Ifosfamida. A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA seguida de Bonferroni.

Os testes com as três doses de curcumina serviram ainda para avaliar se esta era capaz de influenciar nos escores de edema e hemorragia descritos por Grey (1986). Os resultados comprovam a eficácia da curcumina neste critério ao mostrar que as três doses também conseguiram reduzir estatisticamente os escores, não havendo praticamente nenhuma diferença de uso, entre elas (**FIGURA 9**).

Figura 9 - Efeito de diferentes doses de curcumina no escore de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (IFO).



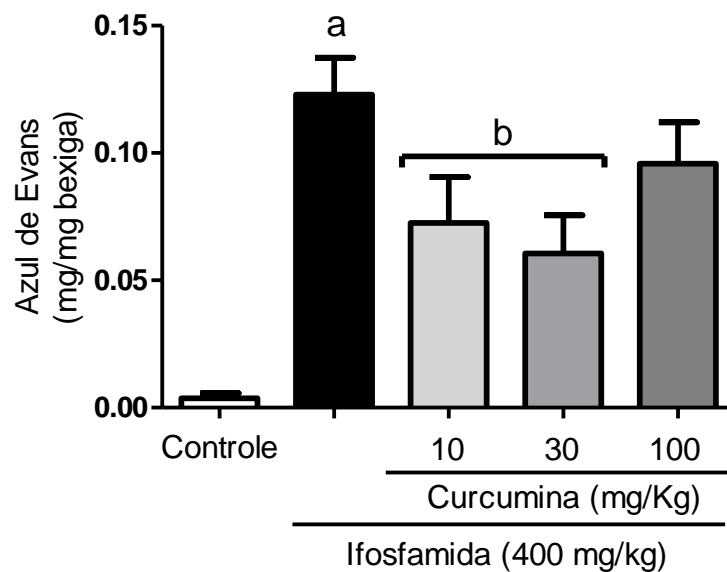
Os valores da figura representam a mediana dos valores dos escores de edema e hemorragia após 12 horas de indução da cistite hemorrágica pela ifosfamida. Grupos: Controle (n = 6) (veículo, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p.); Ifosfamida (n = 6) (veículo, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.); Curcumina (n = 6) (Curcumina 10, 30 e 100mg/Kg, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.). ^ap<0,05 vs grupo controle; ^bp<0,05 vs grupo tratado apenas com ifosfamida. A análise estatística foi realizada com o teste One-way ANOVA seguida de Bonferroni.

5.1.1 Avaliação de diferentes doses de curcumina na permeabilidade vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A permeabilidade vascular vesical foi avaliada pela técnica de extravasamento com solução de Azul de Evans 2,5%, corante que se liga à albumina plasmática. Havendo extravasamento de albumina para o tecido inflamado, devido ao aumento da permeabilidade, ocorre o surgimento de edema que tornará possível detectar o corante no interstício.

A **Figura 10** mostra que neste parâmetro a curcumina se mostrou eficaz somente nas doses de 10 e 30 mg/Kg ($p < 0,05$) quando comparada com o grupo ifosfamida. Já a dose de 100 mg/Kg não foi estatisticamente ($p > 0,05$) eficaz.

Figura 10 - Efeito de diferentes doses de curcumina na permeabilidade vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (IFO).

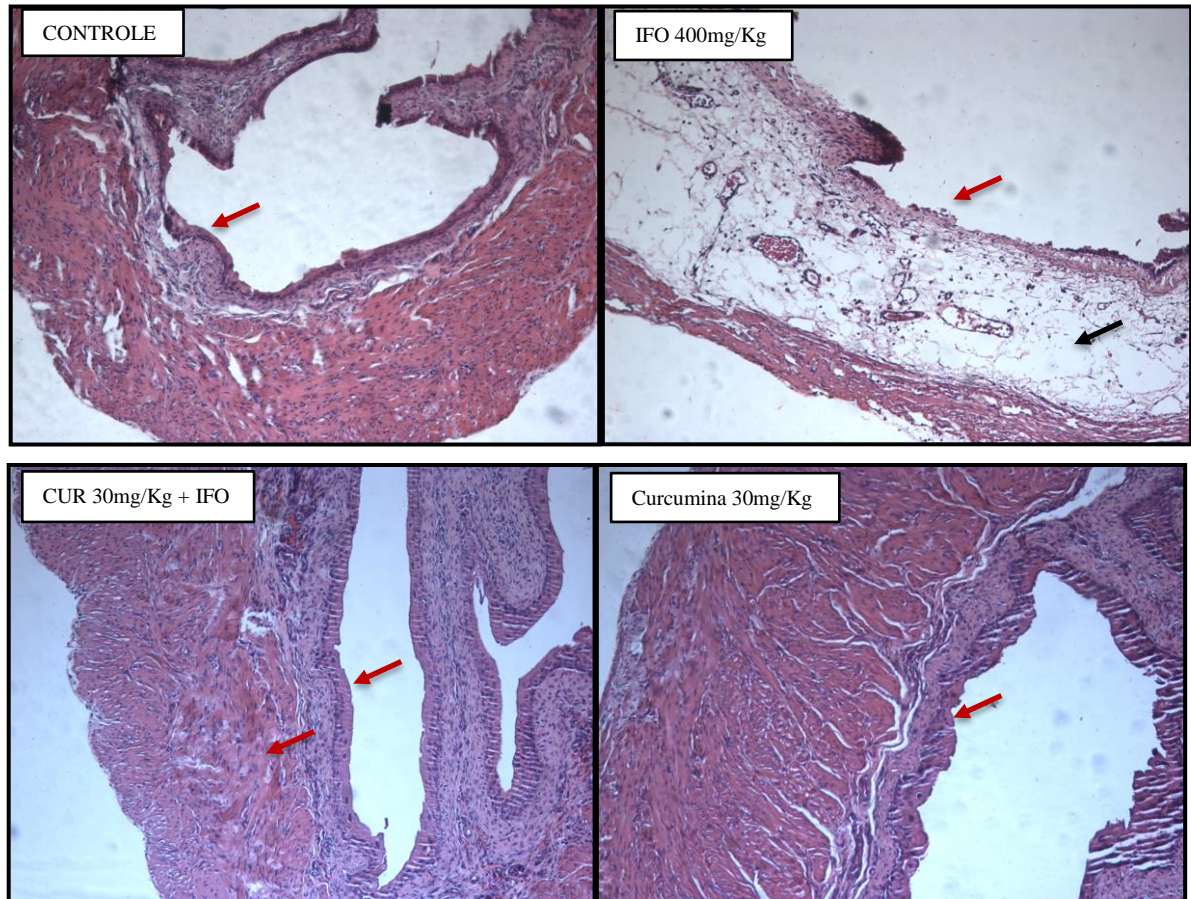


Efeito das diferentes doses de Curcumina, via oral, na permeabilidade vesical ao Azul de Evans na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Grupos: Grupos: Controle (n = 6) (veículo, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p.); Ifosfamida (n = 6) (veículo, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.); Curcumina (n = 6) (Curcumina 10, 30 e 100mg/Kg, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.). ^a $p < 0,05$ vs grupo controle; ^b $p < 0,05$ vs grupo ifosfamida. A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA seguida de Bonferroni.

5.1.2 Efeito da curcumina sobre as alterações histopatológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (IFO).

Após 12 horas da administração da IFO indução da cistite, observou-se nas amostras de bexiga marcantes traços que caracterizavam histologicamente a cistite hemorrágica no grupo IFO (400 mg/Kg i.p.), tais como: edema, pequenos focos de hemorragia e presença de infiltrado inflamatório, o que representou escores máximos 3 (3-3). Já os grupos Controle e CUR (Curcumina 30 mg/Kg), mostraram-se preservados em relação a alterações inflamatórias (urotélcio constituído; camada mucosa, submucosa e muscular intactas) recebendo escores 0 (0-0). No grupo pré-tratado com curcumina houve prevenção das alterações observadas no grupo IFO [$p < 0,05$, 0 (0-1)].

Figura 11 – Fotomicrografias representativas do efeito da curcumina 30mg/Kg na bexiga de camundongos com CH induzida por ifosfamida 400 mg/Kg.



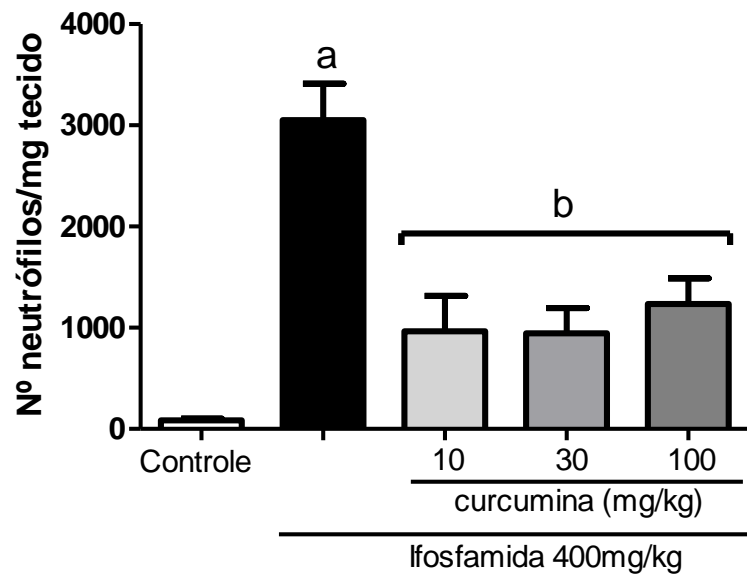
Fotos: Elaborada pelo autor. Análise histopatológica dos tecidos que formam a parte mais interna da bexiga em seções coradas por H&E, 40x. Efeito uroprotetor da curcumina. Bexiga normal, (Grupo CONTROLE) animal que recebeu dose oral de veículo uma hora antes e seis horas após a injeção de se salina 0,9%, i.p. a seta indica área urotelial preservada; Bexiga de animal tratado do grupo IFO (veículo, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.), observa-se intenso dano urotelial (seta vermelha) e edema (seta preta). Bexiga do grupo CUR 30mg/Kg + IFO: nota-se a preservação do urotélio com ausência de edema e camada muscular praticamente normal (setas vermelhas) se comparada aos grupos controles e curcumina. Bexiga do grupo Curcumina 30mg/Kg, oral, a seta indica a região urotelial preservada, curcumina reverteu o dano urotelial e reduziu edema. Aumento 40 x.

5.1.3 Avaliação da curcumina sobre o infiltrado neutrofílico na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

Os resultados demonstram que a curcumina, independentemente da dose, foi capaz de reduzir a quantidade de neutrófilos no tecido vesical, detectada pela dosagem da enzima Mieloperoxidase (MPO).

Como observado na **Figura 12**, a IFO aumentou os níveis de MPO se comparado com grupo excipiente ($p < 0,05$), o que foi prevenido no grupo curcumina em todas as doses testadas ($p < 0,05$ vs grupo IFO).

Figura 12 - Efeito de diferentes doses de curcumina sobre recrutamento de neutrófilos na cistite induzida por ifosfamida

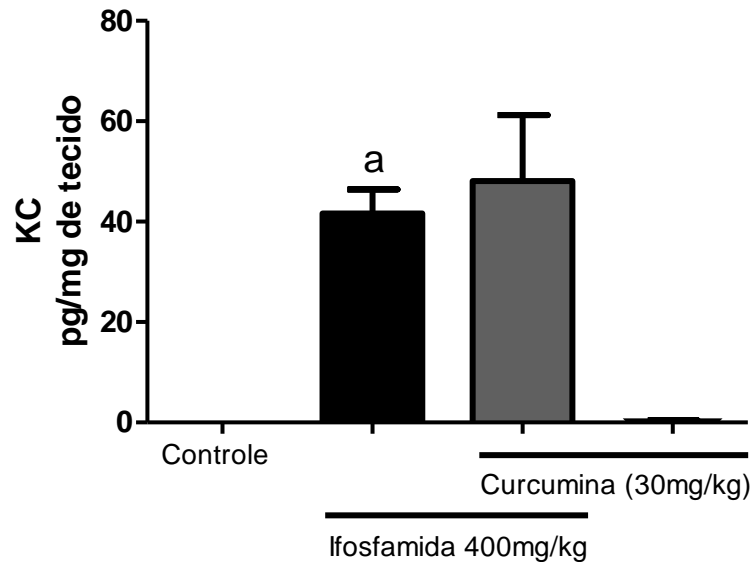


Os valores da figura representam a média \pm E.P.M. dos valores de MPO presente no tecido vesical após as 12 h de injeção de ifosfamida. Grupos: Controle (n = 6) (veículo, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p.); Ifosfamida (n = 6) (veículo, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.); Curcumina (n = 6) (Curcumina 10, 30 e 100mg/Kg, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.). ^a $p < 0,05$ vs grupo Controle; ^b $p < 0,05$ vs grupo Ifosfamida. A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA seguida de Bonferroni.

5.2 Determinação de KC e IL-1 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

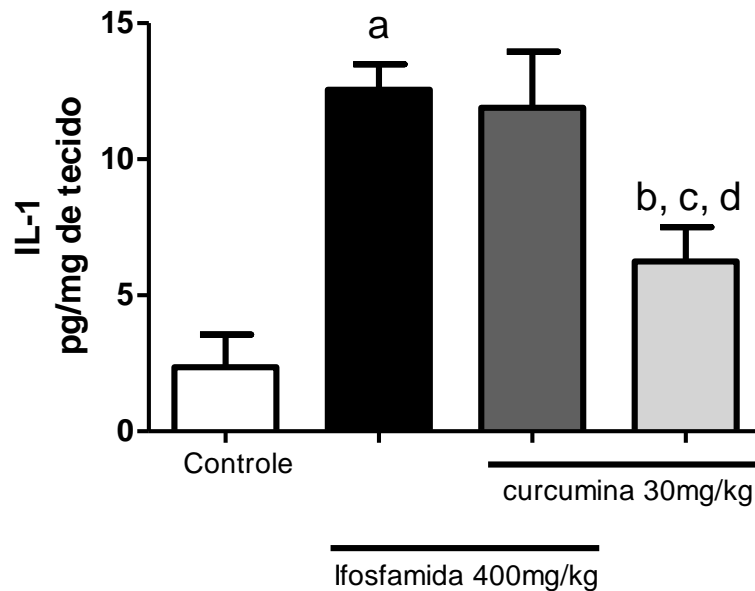
Verificou-se que a ifosfamida (400mg/Kg) aumentou significativamente o nível de KC (**Figura 13**) e de IL-1 (**Figura 14**) nas amostras de bexiga se comparados com o grupo excipiente e curcumina (30 mg/kg) administrada isoladamente ($p < 0,05$). Contudo, a curcumina falhou em prevenir o aumento dessas citocinas (**FIGURAS 13 E 14**).

Figura 13 - Efeito da curcumina no nível de KC na bexiga de camundongos tratados com ifosfamida a 400 mg/Kg.



Os Grupos: Controle (n = 6) (veículo, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p.); Ifosfamida (n = 6) (veículo, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.); CUR (n = 6) (Curcumina 30mg/Kg, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.) e grupo Curcumina 30mg/kg (Curcumina 30mgKg, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p). O pré-tratamento com Curcumina não reduziu o nível de KC com relação ao grupo tratado apenas com ifosfamida. ^ap<0,05 vs grupo Controle. O grupo CUR vs grupo Ifosfamida não apresentou p<0,05 assim como, o grupo Controle vs grupo Curcumina 30mg/Kg. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA seguida de pós teste com Newman Keuls.

Figura 14 - Efeito da curcumina 30mg/Kg na concentração de IL-1 β em bexigas de camundongos tratados com ifosfamida (400 mg/Kg)

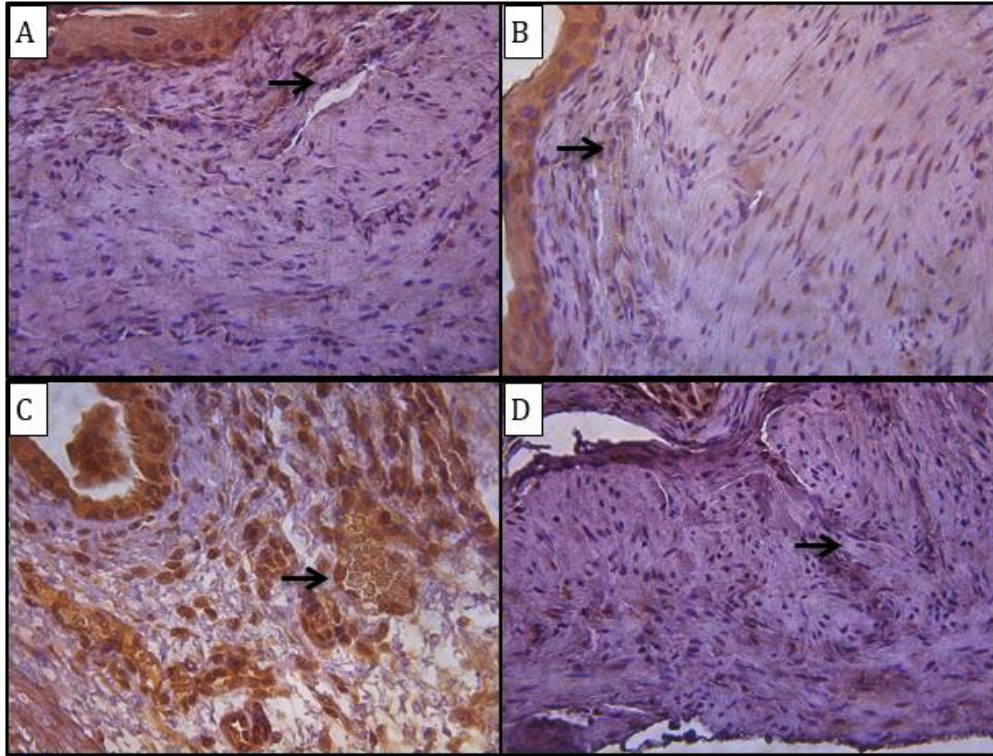


Os Grupos: Controle (n = 6) (veículo, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p.); Ifosfamida (n = 6) (veículo, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.); CUR (n = 6) (Curcumina 30mg/Kg, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.) e grupo Curcumina 30mg/kg (Curcumina 30mgKg, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p). O pré-tratamento com curcumina não reduziu o nível de IL-1 β com relação ao grupo tratado apenas com ifosfamida. ^ap<0,05 vs grupo Controle; ^bp<0,05 vs grupo IFO; ^cp<0,05 vs grupo Curcumina 30mg/Kg; ^dnão apresentou diferença (p<0,05) se comparado com o grupo Controle. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA seguida de pós teste com Newman Keuls.

5.3 Imunohistoquímica para E-selectina na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida após tratamento com curcumina

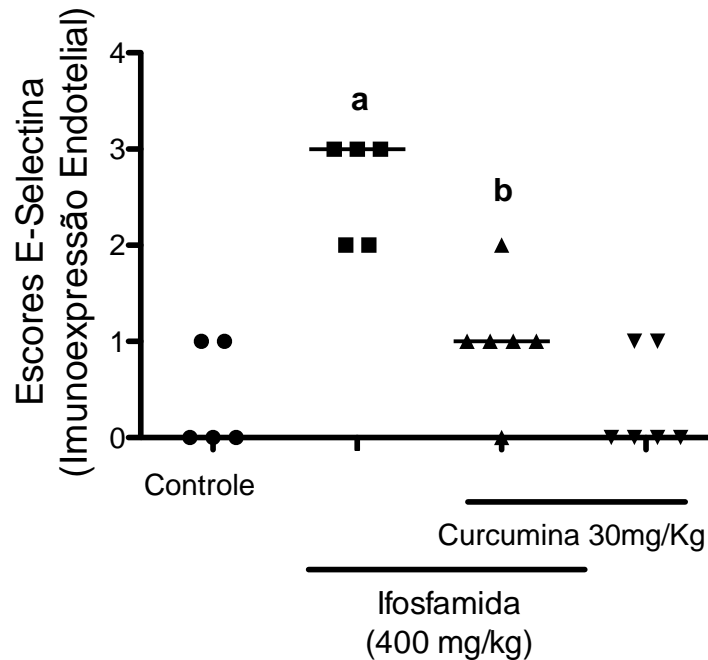
Após a realização de testes confirmatórios para a presença de E-selectina por imuno-histoquímica existiram evidências de aumento na expressão endotelial desta nas bexigas de animais tratados com ifosfamida (400 mg/kg, i.p., 3[2-3]) versus o grupo excipiente (0[0-1]), como mostrado na **Figura 15** e **16**. Estas alterações foram reduzidas (p<0,05) com o pré-tratamento com curcumina (1[0-2]) **Figuras 15** e **16**.

Figura 15. - Fotomicrografias representativas da imunomarcação para E-selectina em bexigas de camundongos.



Fotos: Elaborada pelo autor. **A** - Controle (n = 6) (veículo, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p.); **B** - Curcumina 30mg/kg (Curcumina 30mgKg, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p.); **C** - Ifosfamida (n = 6) (veículo, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.); **D** - CUR (n = 6) (Curcumina 30mg/Kg, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.). As setas pretas indicam a região endotelial vascular, curcumina reduziu a expressão de E-selectina. Aumento de 40x.

Figura 16. Efeito da administração oral de Curcumina na expressão endotelial de E-selectina em bexiga de camundongos.



Os dados da figura representam a mediana de valores dos escores após 12 horas de indução da cistite pela ifosfamida. Grupos: Controle (n = 6) (veículo, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p.); Ifosfamida (n = 6) (veículo, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.); CUR (n = 6) (Curcumina 30mg/Kg, via oral, uma hora antes e seis horas após a indução da C.H. com ifosfamida 400mg/Kg, i.p.) e grupo Curcumina 30mg/kg (Curcumina 30mgKg, por via oral, uma hora antes e seis horas após a injeção de salina 0,9% i.p). Ifosfamida levou ao aumento da expressão de E-selectina nos animais do grupo Ifosfamida (400mg/Kg), assim como causou redução na expressão de E-selectina no grupo CUR. ^ap<0,05 vs grupo Controle; ^bp<0,05 vs grupo Ifosfamida. A análise estatística foi realizada com Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

6 DISCUSSÃO

Em nosso estudo foi possível reproduzir a cistite hemorrágica quando administramos ifosfamida intraperitoneal na dose de 400 mg/Kg em camundongos Swiss. Através de estudos anteriores de nosso laboratório já se sabe que o pico de produção de mediadores pró-inflamatórios e da marcante presença de sinais clássicos da inflamação como edema e hemorragia ocorre em torno da décima segunda hora após a administração da ifosfamida (RIBEIRO et al., 2002).

A curcumina foi testada nesta pesquisa como substância com potencial para proteger a bexiga dos efeitos nocivos da ifosfamida. O tratamento foi realizado por administrações orais de curcumina 1 hora antes e 6 horas após a administração intraperitoneal da ifosfamida. Os protocolos de tratamento com duas doses orais foram pensados através da observação já descrita em artigos que comprovam a pouca solubilidade da curcumina em meio aquoso e da sua baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral (SHARMA, GESCHER, STEWARD, 2005; COLETTI, 2013).

Consta de 2009 o trabalho pioneiro que buscou elucidar o papel da curcumina na cistite hemorrágica induzida por antineoplásico, nele ARAFA documenta pela primeira vez que o tratamento prévio com curcumina i.p. por 10 dias antes da indução de CH com a ciclofosfamida, foi capaz de melhorar as alterações bioquímicas e histopatológicas causadas pelo fármaco, assim como a curcumina demonstrou eficácia uroprotetora, possivelmente através da modulação da liberação de citocinas inflamatórias, nomeadamente o TNF- α e óxido nítrico (ARAFA, 2009).

Já é bem descrito na literatura que o uso clínico da curcumina pode enfrentar forte limitação para uso oral devido aos problemas com a farmacocinética e farmacodinâmica da droga. Estudos com a nanotecnologia, por exemplo, refletem a necessidade da criação de estratégias viáveis que possibilite a utilização da curcumina em seres humanos sem a grande perda gerada pelo metabolismo. A nanotecnologia torna a curcumina completamente dispersível em meio aquoso, foi o que pode ser avaliado por Ravichandran (2013) quando administrou em ratos Wistar cápsulas orais de curcumina, comprovando o aumento significativo da concentração de curcumina em órgãos importantes dos animais como pulmão, coração, fígado e baço logo após trinta minutos de administração. Estes dados evidenciam a importância do manejo adequado de metodologias que favoreçam o uso correto para a determinação da dose, o tempo de administração e a toxicidade em pesquisas terapêuticas com a curcumina.

Para nossa avaliação, realizou-se um teste piloto que consistiu em uma curva dose-resposta, onde avaliamos o efeito da curcumina sobre o Peso Úmido Vesical (PUV), escores macroscópicos de Grey et al. (1986) para edema e hemorragia e dosagem de mieloperoxidase (MPO) com doses de 10, 30 e 100 mg/Kg v.o. Nossos resultados mostraram que nas de 10 e 30mg, a curcumina foi capaz de reduzir de forma significativa os parâmetros analisados nos animais pré-tratados se comparado com o grupo que recebeu apenas dose intraperitoneal de ifosfamida. De fato, pesquisas anteriores com outros modelos de inflamação já mostraram que a curcumina é capaz de atenuar sinais clássicos da inflamação como edema e hemorragia. Wang et al. (2015) ao estudar a hemorragia intracerebral em camundongos testou doses intraperitoneal de curcumina e comprovou seu efeito na redução da hemorragia e edema com consequente melhoria dos animais.

Em nosso estudo, o edema também foi avaliado através da técnica de extravasamento de Azul de Evans, onde, as doses de 10 e 30 mg/Kg mostraram redução estatisticamente considerável na quantidade de corante presente no tecido, comprovando, indiretamente, a capacidade que a curcumina teve de prevenir o aumento da permeabilidade vascular e consequente saída de fluidos juntamente com proteínas do sangue para os tecidos. Essa técnica foi recentemente utilizada por Li et al. (2016) em um estudo sobre a retinopatia diabética induzida por estreptozotocina em camundongos, e ao usar também a curcumina oral por um período de 12 semana, comprovou a ação desta em reverter o edema nos vasos da retina dos animais diabéticos mostrando o seu potencial efeito anti-inflamatório.

Lima et al. (2007) relatou em sua pesquisa que edema e hemorragia são condições que costumam acometer os pacientes em quimioterapia mesmo sendo aqueles submetidos ao tratamento com três doses de mesna. Em seus achados, 66,7% dos voluntários em tratamento da cistite hemorrágica submetidos a profilaxia com mesna ainda foram capazes de desenvolver a cistite. Este fato comprova o quanto é necessário encontrar outras formas de tratamento que possam ser associados ao uso de mesna e tragam, portanto, melhor tolerabilidade dos pacientes ao tratamento quimioterápico.

Nossos achados comprovam o efeito uroprotetor da curcumina, quando administrada oralmente, nos parâmetros macroscópicos de lesão vesical. A partir da análise dos testes iniciais, foi possível perceber que as doses de 10 e 30 mg/Kg foram capazes de induzir as melhores respostas frente a ação da ifosfamida nos parâmetros de dano tecidual.

Mostramos ainda, na análise histopatológica, a atividade protetora da curcumina, evidenciando que na dose de 30 mg/Kg, foi possível garantir a preservação do urotélio, a ausência de edema intramural, além da manutenção estrutural normal da camada muscular e

menor acúmulo de células inflamatórias nas amostras de bexiga dos animais submetidos ao pré-tratamento com curcumina antes da indução de cistite com a ifosfamida.

Nossos resultados condizem com uma atividade anti-inflamatória da curcumina na fase aguda do processo inflamatório. Esta fase apresenta-se de início rápido e caracteriza-se pela exsudação de líquido e proteínas plasmáticas decorrentes das alterações no calibre vascular que proporciona um distanciamento nas células endoteliais adjacentes, além do acúmulo de leucócitos, predominantemente neutrófilos, no local da lesão (ABBAS; ASTER; KUMAR 2013).

Considerando-se os achados histopatológicos, buscamos também, mostrar o efeito protetor da curcumina sobre a migração dos polimorfonucleares através da dosagem de mieloperoxidase (MPO), esta que é uma enzima armazenada em grânulos azurófilos de neutrófilos e macrófagos e liberada para o fluido extracelular no contexto do processo inflamatório, refletindo assim o grau de dano que o tecido possa estar sofrendo (LORIA, 2008).

Nossos achados foram satisfatórios ao identificar que neste parâmetro os animais pré-tratados com curcumina nas três doses (10, 30 e 100 mg/Kg v.o.) mostraram redução do recrutamento de neutrófilos no tecido das bexigas. Neste contexto, já existem estudos que buscam justificar o poder anti-inflamatório da curcumina relacionado a inibição do recrutamento de células de defesa, a citar o estudo de Fan e colaboradores (2015), que ao induzir isquemia intestinal em ratos Wistar avaliou o efeito da curcumina neste modelo e evidenciou o papel desta com a capacidade de inibir os níveis tanto de MPO quanto a produção de IL-6 e a expressão da molécula de adesão ICAM-1 provavelmente pela inibição da via do NF- κ B, o fator de transcrição nuclear que está envolvido na síntese destas duas moléculas.

A IL-6 é produzida no local da inflamação e desempenha um papel fundamental na resposta da fase aguda, ela portanto também regula o tráfico de neutrófilos durante a resposta inflamatória orquestrando a produção de quimiocinas e a apoptose de leucócitos. Esta citocina ainda determina a transição da inflamação aguda para a crônica, alterando a natureza do infiltrado leucocitário de neutrófilos polimorfonucleares para monócitos/macrófagos (GABAY, 2006; FEILDING, et al, 2008). A molécula de adesão intercelular ICAM-1 é uma componente que permite a ligação de leucócitos ao endotélio e pode permitir sua subsequente transmigração para o tecido periférico gerando, por exemplo, aumento da permeabilidade vascular (FRANK, LISANTI, 2008).

Já Lubbad e colaboradores em 2009 usaram a curcumina em modelo de colite, evidenciando também um efeito protetor na inflamação via inibição do NF- κ B, além da capacidade de inibir a expressão de receptores TLR-4 e da molécula adaptadora de sinalização MyD88. O NF- κ B tem forte papel na inflamação e na imunidade inata, pois este fator de transcrição induz a expressão de citocinas que regulam a resposta imunitária, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, bem como as moléculas de adesão, que levam ao recrutamento de leucócitos para os locais da inflamação (HOESEL, SCHMID, 2013).

Sabe-se que na patogênese da cistite hemorrágica induzida pelas oxazafosforinas as citocinas IL-1 β e o fator de necrose tumoral (TNF- α) têm participação fundamental. Uma das pesquisas pioneiras é remetida a Gomes et al. (1995), que comprovou o efeito protetor do soro anti-TNF- α e anti-IL-1 β contra o estabelecimento da cistite hemorrágica em camundongos injetados com ciclofosfamida. Em seus achados o pré-tratamento dos animais como os soros anti-TNF- α e anti-IL-1 β promoveu bloqueio significativo do peso úmido vesical e ainda reduziu parâmetros de edema, hemorragia, migração de neutrófilos e erosão da mucosa.

Posteriormente em 2002, Ribeiro e colaboradores reafirmaram o papel de TNF- α e IL-1 β na C.H. agora induzida por ifosfamida, uma vez que a talidomida (inibidor seletivo da síntese de TNF- α) e a pentoxifilina (inibidor de TNF- α e IL-1 β) controlaram o edema e alterações macro e microscópicas indicativas de dano. Mais recentemente foi demonstrada a importância de TNF- α e IL-1 β na gênese da C.H. induzida por ifosfamida no estudo de Leite (2014), desta vez mostrando o efeito protetor do anakinra, um antagonista de receptor de IL-1 β , e infliximabe, um anticorpo anti-TNF- α .

Já o uso da curcumina modulando IL-1 β vem sendo relatado há um certo tempo. Consta de 2001 a pesquisa de Lim e colaboradores que mostrou a ação inibitória da curcumina (v.o.) nos níveis de IL-1 β e no dano oxidativo em modelo de inflamação. Posteriormente os mesmos dados foram reafirmados por Begum et al (2008) ao comprovar a ação anti-inflamatório da curcumina (v.o. e i.p.) em modelo de doença de Alzheimer. Souza (2012) trabalhando com isquemia cerebral mostrou que a curcumina (v.o.) protegeu os animais de danos cognitivos por vezes associados ao aumento de IL-1 β em regiões hipocâmpais de ratos, evidenciando assim, mais uma vez o papel importante deste composto na inflamação.

Considerando os achados anteriormente citados, optou-se por dosar a concentração tecidual de IL-1 β de forma a verificar se o efeito protetor da curcumina seria proveniente à modulação desse mediador. Em nosso estudo, observou-se que os níveis de IL-

1 β permaneceram elevados equiparando-se ao nível produzido no grupo Ifosfamida, o que corrobora em parte com achados anteriores de nosso laboratório (GOMES et al. 1995; RIBEIRO et al. 2012), reafirmando a participação de IL-1 β na patogênese da C.H., porém, evidenciando que curcumina possivelmente age por mecanismos independentes da produção desta citocina para atenuar o processo inflamatório.

Dado que camundongos injetados com curcumina apresentaram menor atividade de mieloperoxidase durante a C.H. e uma vez que a migração de leucócitos é dependente da liberação local de quimiocinas (KOLACZKOWSKAS, KUBES, 2013), testou-se, no presente estudo, o efeito da curcumina sobre a produção de KC, um análogo de IL-8 em camundongos, que tem papel quimiotático importante sobre neutrófilos. A resposta dos neutrófilos à IL-8 é caracterizada por migração das células, liberação de enzimas granulares e outras alterações intra e extracelulares (BAGGIOLINI, DEWALD, MOSER, 1994; BAGGIOLINI, HOLCENBERG, POPLACK, 1997; BORISH, STEINKE, 2003). Pouco se sabe sobre o papel da IL-8 na patogênese da C.H., estudos em nosso laboratório mostraram uma atividade pró-inflamatória de IL-8, fato comprovado após administração de soro anti-IL-8 que preveniu o edema em camundongos que haviam recebido ciclofosfamida por via intraperitoneal (RIBEIRO et al, 2012).

Nossos resultados para as dosagens de IL-8 nas amostras de bexiga também não mostraram diferenças estatísticas quando comparado os grupos tratados apenas com ifosfamida e os animais que receberam tratamento com curcumina. Leite (2014) relatou que a fase inflamatória da gênese da C.H. é caracterizada por um *up-regulation* dos fatores de transcrição, tais como o fator nuclear-*kappa* B e, conseqüentemente, pela produção e liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias diversas, gerando assim, mais de uma via passível de ser controlada por algum agente anti-inflamatório como a curcumina.

Diversos mecanismos posteriores à ação celular da IL-1 β e de KC podem ser modulados pela curcumina, justificando, portanto, seu efeito anti-inflamatório. Dentre estes tem-se a modulação da expressão de moléculas de rolamento e adesão celular, cuja expressão é dependente de citocinas e quimiocinas (MCEVER, 2015). O TNF- α juntamente com IL-1 tem capacidade de estimular a síntese e expressão de moléculas de rolamento, as chamadas E-selectinas, na superfície celular do endotélio vascular, que podem ser expressas dentro de 1 a 2 horas (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2011).

No presente estudo, observou-se que a injeção de ifosfamida aumentou a imunoexpressão da E-selectina, o que foi significativamente inibido pela curcumina. A literatura relata o potencial modulador da curcumina sobre as vias de ativação das moléculas

de rolamento e adesão. Kumar e colaboradores (1998) propuseram que a curcumina seria capaz de inibir a expressão de moléculas de adesão tais como ICAM-I e VCAM-I via inibição de proteínas quinases, ativadas por TNF- α . Em modelo de inflamação induzido por TNF- α descrito por Gupta e Ghosh (1999) a curcumina além de inibir a expressão ICAM-I e VCAM-I também atenuou a expressão de E-selectina, segundo os autores a curcumina possivelmente age interferindo em estágios iniciais dos eventos de sinalização bloqueando a ativação de NF- κ B pela inibição de proteínas quinases importantes como a I κ B.

Em nosso estudo não foi possível avaliarmos a ação da curcumina sobre a produção de TNF- α , uma citocina que faz parte da patogênese da C.H. (GOMES et al., 1995; RIBEIRO et al., 2012) e que já foi evidenciado ter sua produção reduzida em tratamentos com curcumina (CHAN, 1995; ZHANG, MO, LIU, 2010; NISHIDA et al., 2010; AGGARVAL, GUPTA, SUNG, 2013), inclusive na CH induzida por ciclofosfamida (ARAFÁ, 2009).

Sabe-se que o estágio de firme adesão de células de defesa ao endotélio vascular é mediado pela ligação de moléculas da família das integrinas, especialmente a proteína LFA-1, presentes nos neutrófilos e que se ligam as moléculas ICAM-1 ou ICAM-2 presentes em células vasculares (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2011; MAYADAS; MANTOVANI et al., 2011). Nesse contexto, as E-selectinas expressas por células endoteliais medeiam um tipo de ligação fraca com os neutrófilos, permitindo o rolamento inicial (MCEVER, 2015). Contudo, desencadeiam o primeiro passo essencial para a adesão firme de neutrófilos ao endotélio e posterior transmigração para o tecido.

Mediante os achados aqui apresentados é possível inferir que a curcumina protegeu os animais da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida através da inibição da migração de neutrófilos, mediante em parte, à redução da expressão de moléculas de rolamento E-selectina, o mecanismo proposta da curcumina na CH induzida por ifosfamida pode ser visto na **Figura 17**. A curcumina além de melhorar a função endotelial ao atenuar a migração de leucócitos reduziu a permeabilidade vascular com posterior melhora do edema. No entanto, são necessárias maiores investigações para determinação dos mecanismos envolvidos na diminuição da expressão das moléculas de rolamento, assim como a caracterização do papel de TNF- α e o fator de transcrição nuclear NF- κ B neste protocolo de tratamento. É possível que o efeito anti-inflamatório da curcumina seja pela modulação de mecanismos de sinalização celulares importantes para a expressão de moléculas de rolamento, como fatores de transcrição (CHASE, MAGNANI, SIMON, 2012).

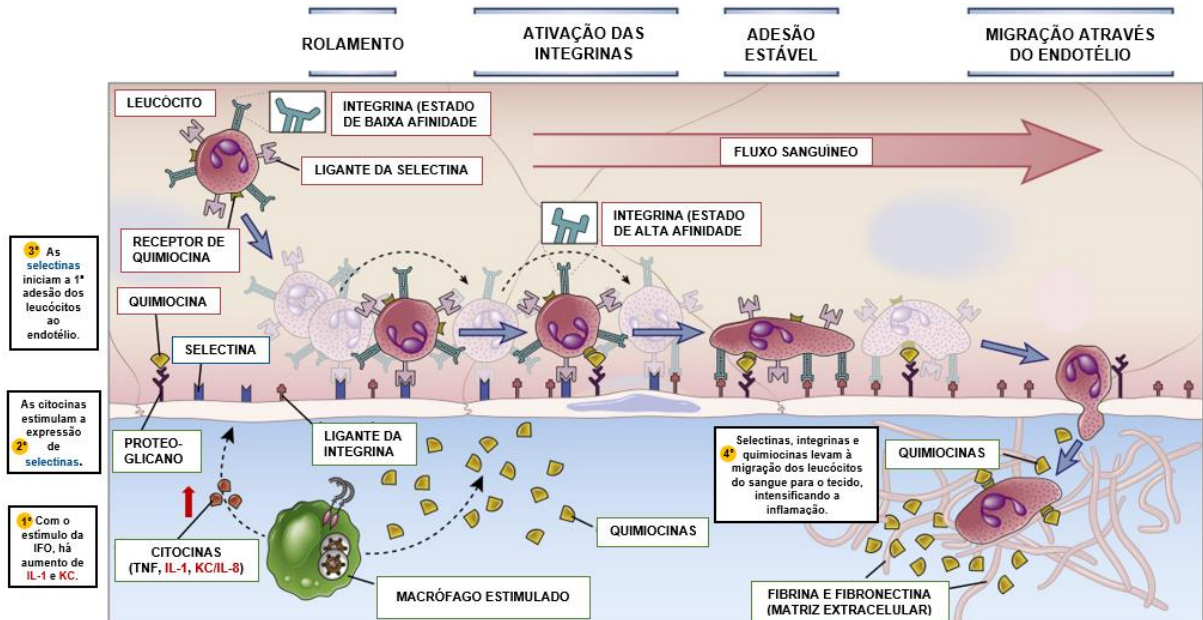
Existem ainda, autores que relacionam a ação protetora da curcumina com o controle do estresse oxidativo (ARAFÁ, 2009; DAI, 2016; WANG et al., 2017), e há muito já

é conhecido que na C.H. a acroleína aumenta as espécies reativas de oxigênio (ROS) no urotélio catalisando a reação da glutatona ao glutationilpropionaldeído (GTPD), e que este ativa a via apoptótica NF-kB interagindo com várias enzimas para formar radicais superóxidos que levam ao dano celular (GOMES et al., 1995). Não podemos excluir a possibilidade da curcumina estar interagindo em pontos diversos da cascata inflamatória da CH, nossos achados são inéditos neste modelo de inflamação e abre perspectivas para investigações futuras.

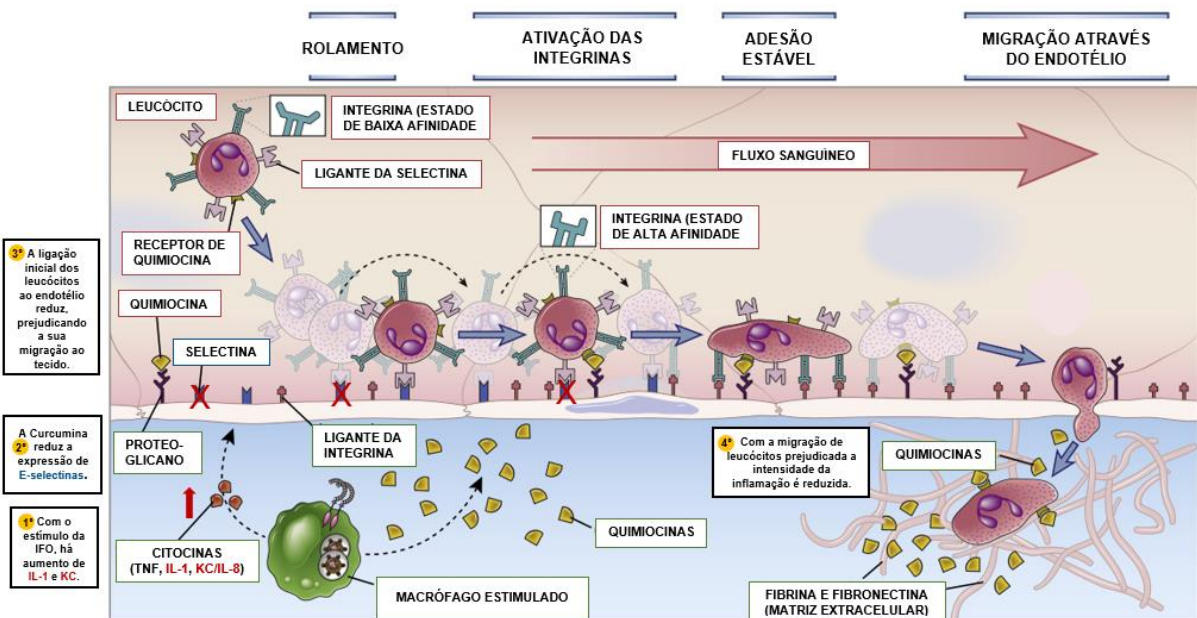
A curcumina, sendo um produto natural de baixo custo e toxicidade pouco apreciável, encoraja pesquisas para seu uso em protocolos de tratamento de doenças inflamatórias crônicas ou agudas, principalmente como terapia preventiva. A possibilidade do uso oral da curcumina como complemento a terapia medicamentosa de pacientes com toxicidades decorrentes do tratamento do câncer poderia torna-se uma estratégia viável.

Figura 17. – Proposta de mecanismo de ação da curcumina na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

A.



B.



Fonte: Adaptado de ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2011. A – Papel da ifosfamida no processo inflamatório da cistite hemorrágica. B – Proposta de mecanismo de ação da curcumina na atenuação do processo inflamatório da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (400mg/Kg).

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados aqui apresentados, podemos concluir que:

- ✓ A curcumina nas doses analisadas reduz edema, hemorragia, permeabilidade vesical e migração de neutrófilos na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.
- ✓ A curcumina não modula a produção de citocinas pró-inflamatórias KC e IL-1 β no contexto da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.
- ✓ A curcumina protege da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida pela inibição da migração de neutrófilos, possivelmente mediante redução da expressão de moléculas de rolamento como a E-selectina.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; ASTER, J.C.; KUMAR, V. Robbins: **Patologia básica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 9. ed., cap. 2, p. 31, 2013.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, L. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: 7ed., Elsevier, 2011.
- AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 40-59, 2009.
- AGGARWAL, B.B.; GUPTA, S.C.; SUNG, B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. **British Journal of Pharmacology**. 1672–1692, 2013.
- ALVES-FILHO, J.C.; DE FREITAS, A.; RUSSO, M.; CUNHA, F.Q. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit. Care Med.** v. 34, p. 461–470, 2006.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B.; Mol. Pharmaceutics **2007**, 4, 807; Heger, M.; van Golen, R. F.; Broekgaarden, M.; Michel, M. C.; **Pharmacol. Rev.** **2014**, 66, 222.
- ARAFI, H.M.M. Uroprotective Effects of Curcumin in Cyclophosphamide-Induced Haemorrhagic Cystitis Paradigm. **Journal compilation Nordic Pharmacological Society**. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, v. 104, p. 393–399, 2009.
- ASAI, A.; MIYAZAWA, T.; **Life Sci.** p.67- 2785, 2000.
- ASSREUY, A.M.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, M.E.; BRITO, G.A.; CAVADA, B.S.;
- RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J. Urol.**, v. 161, n.6, p. 1988-1993, 1999.
- BAGGIOLINI M.; DEWALD B.; MOSER B. Human chemokines, an update. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p 675–705, 1997.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol**, v. 55, p 97–179. 1994.
- BALIS, F.M., J.S. HOLCENBERG, D.G. POPLACK, **Principles and Practice of Pediatric Oncology**, third ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, p. 227.
- BARBIE, D.A.; FRANK, D.A. Farmacologia do câncer: síntese, estabilidade, e manutenção do genoma. IN: GOLAN, DAVID, E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

BEGUM, A.N.; JONES, M.R.; LIM, G.P.; MORIHARA, T.; KIM, P.; HEATH, D.D.; CHERYL, L.; ROCK, C.L.; PRUITT, M.A.; YANG, F.; HUDSPETH, B.; HU, S.; FAULL, K.; TETER, B.; GREG, M.; COLE, G.M.; FRAUTSCHY, S.A. Curcumin Structure-Function, Bioavailability, and Efficacy in Models of Neuroinflammation and Alzheimer's Disease. **J Pharmacol Exp Ther.** p. 196–208, jul 2008.

BORISH, L.C.; STEINKE, J.W. Cytokines and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol.** p 460-75, fev 2003.

CHABNER, B.; LONGO, D. **Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice.** Lippincott Williams e Wilkins, 2005.

CHABNER, B.A. **Princípios gerais da quimioterapia do cancer.** IN: As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman. LAURENCE, L.; BRUNTO, A.C. Artmed 12 ed. Porto alegre. p.1667, cap. 60, 2012.

CHAN, M.M.Y. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. **Biochemical pharmacology**, v. 49, n. 11, p. 1551-1556, 1995.

CHASE SD, MAGNANI JL, SIMON SI. E-selectin ligands as mechanosensitive receptors on neutrophils in health and disease. **Ann Biomed Eng.** p. 849-59, abr 2012.

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

CHU, E.; SARTORELLI, A.C. **Quimioterapia do câncer.** In: KATSUNG, B.G.; MASTER, S.B.; TREVOR, A.J. Farmacologia básica e clínica. 12 ed. Porto Alegre, 2014.

COLETTI, T.M.S.F.A. **Efeito fotodinâmico da curcumina em micelas de cetrimide sobre cepas de candida susceptíveis e resistentes a fluconazole.** UNESP, 2013.

CROSS, J. E.; **Surfactant Science**, 8th ed., Marcel Dekker. New York, 1997.

DAI et al. Curcumin Attenuates Colistin-Induced Neurotoxicity in N2a Cells via Anti-Inflammatory Activity, Suppression of Oxidative Stress, and Apoptosis. **Mol Neurobiol.** dec 2016.

ELZIMAITY, M.; SALIBA, R.; CHAN, K.; SHAHJAHAN, M.; CARRASCO, A.; KHORSHID, O.; CALDERA, H.; COURIEL, D.; GIRALT, S.; KHOUR, I.; IPPOLITI, C.; CHAMPLIN, R.; LIMA, M. **Hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: donor type matters.** Blood, v. 13; n. 12, p.4674-4680, 2004.

FAN, Z.; JIHONG YAO; YANG LI; XIAOWEI HU; HUIZHU SHAO; XIAOFENG TIAN. Anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin on acute lung injury in a rodent model of intestinal ischemia reperfusion by inhibiting the pathway of NF-Kb. **Int J Clin Exp Pathol.** p. 3451-3459, 2015.

FIELDING, C.A.; MCLOUGHLIN, R.M.; MCLEOD, L.; COLMONT, C.S.; NAJDOVSKA, M.; GRAIL D.; ERNST, M.; JONES, S.A.; TOPLEY, N.; BRENDAN J.

N. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via stat3. **J Immunol** 2008.

FORNI AM, KOSS LG, GELLER W. Cytological study of the effect of cyclophosphamide mustard and other phosphoramidate. **J Med Chem.** 1993.

FRANK, P.G.; MICHAEL P. LISANTI. ICAM-1: Role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2008.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy** 2006.

GAFNER, S.; LEE, S. K.; CUENDET, M.; BARTHÉLÉMY, S.; VERGNES, L.; LABIDALLE, S.; MEHTA, R. G.; BOONE, C. W.; PEZZUTO, J. M. Biologic evaluation of curcumin and structural derivatives in cancer chemoprevention model systems. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2849-2859, 2004.

GERMANAS, J.; PANDYA, A.G. **Alkylating agents.** Dermatologic therapy. Copenhagen. V. 15, p. 317-324, 2002.

GIFONI, M.A.C. **Envolvimento da pentraxin 3 (PTX3) na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos.** Fortaleza, 2008.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B.; Curcumin as “*Curecumin*”: From kitchen to clinic. **Biochem. Pharm.** p.75-787, 2008.

GOMES, T.N.; SANTOS, C.C.; SOUZA-FILHO, M.V.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Participation of TNF-alpha and IL-1 in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Braz J Med Biol**, v. 28, n. 10, p. 1103-8, 1995.

GRAY, K.J.; ENGELMANN, U.H.; JOHNSON, E.H.; FISHMAN, I.J. Evaluation Of Misoprostol Cytoprotection Of The Bladder With Cyclophosphamide (Cytosan) Therapy. **J. Urol.**, v. 136, p. 6, p. 497-500, 1986.

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

GUPTA, B.; GHOSH, G. Curcuma longa inhibits TNF-a induced expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells. **International Journal of Immunopharmacology.** p. 745–757, 1999.

GUPTA, S. C. Discovery of Curcumin, a Component of the Golden Spice, and Its Miraculous Biological Activities. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 39, n. 3, p. 283–299, 2012.

HADJIBABAIE, M.; ALIMOGHADDAM, K.; SHMSHIRI, A.R.; IRAVANI, M.; BAHAR, B.; MOUSAVI, A.; JAHANI, M.; KHODABANDEH, A.; ANVARI, Y.; GHOLAMI, K.; GHAVAMZADEH, A. Continuous bladder irrigation prevents hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Urol. Oncol.**, v. 26, p. 43-46, 2008.

HOESEL, B.; SCHMID, J.A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Mol Cancer**. 2013.

HOLDER, G. M.; PLIMER, J. L.; RYAN, A.J. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. **Xenobiotica**. v. 8, p. 761-768, dec. 1978.

HONG, J.; BOSE, M.; J. U, J.; RYU, J. H.; CHEN, X.; SANG, S.; LEE, M. J.; YANG, C. S. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related b-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A (2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 1671-1679, 2004.

HSU, S.M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem. Cytochem.** v. 29, p. 1349–1353. 1981

INCA. Quimioterapia. Disponível em:<http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101. 2017> acesso em:04.06.17.

IRESON, C.R.; JONES, D.J.; ORR, S, et al. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2002; p. 105–11.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surface Forces**, 2nd ed.; Academic Press New York, 1991.

JULIE S. JURENKA, MT(ASCP). Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of *Curcuma longa*: A Review of Preclinical and Clinical Research. **Alternative Medicine Review**. v. 14, nov 2009.

KATSUNG, B.G.; MASTER, S.B.; TREVOR, A.J. **Farmacologia básica e clínica**. 12 ed. Porto Alegre, 2014.

KOC, S. HAGGLUND, H.; IRETON, R.C.; PEREZ-SIMON, J.A.; COLLINS, S. J.; APPELBAUM, F.R. Successful treatment of severe hemorrhagic cystitis with cystectomy following matched donor allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v. 26, p. 899-901, 2000.

KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**. p.159-75, 2013.

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

KUMAR, A.; DHAWAN, S.; HARDEGEN, N.J.; AGGARWAL, B.B. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 775–783, 1998.

- LEITE, C. A. V. G. **Bloqueio do receptor da interleucina-1 com anakinra inibe a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida** / Caio Abner Vitorino Gonçalves Leite. – 2014.
- LEUNG AY, SUEN CK, LIE AK, LIANG RH, YUEN KY, KWONG YL. Clinicopathological features risk factors of clinically overt haemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**. p. 509-513, 2002.
- LI, J.; WANG, P.; YING, J.; CHEN, Z.; YU, S. Curcumin attenuates retinal vascular leakage by inhibiting calcium/calmodulin-dependent protein kinase ii activity in streptozotocin-induced diabetes. **Cell Physiol Biochem**. v. 39:p. 1196-1208, 2016.
- LIM, G.P.; CHU, T.; YANG, F.; BEECH, W.; FRAUTSCHY, S.A.; COLE, G.M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. **J Neurosci**. v. 21:p. 8370–8377, 2001.
- LIMA, M.V.A.; FERREIRA, F.V.; MACEDO, F.Y.; BRITO, G.A.; RIBERIO, R.A. Histological changes in bladders submitted to ifosfamide chemotherapy even with mesna prophylaxis, **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 59., p. 643-650, 2007.
- LIMA-JÚNIOR, R.C.; FREITAS, H.C.; WONG, D.V.; WANDERLEY, C.W.; NUNES, L.G.; LEITE, L.L.; MIRANDA, S.P.; SOUZA, M.H.; BRITO, G.A.; MAGALHÃES, P.J.; TEIXEIRA, M.M.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Br J Pharmacol**. v.171, p. 2335-50, 2014.
- LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. A. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas**. Nova Odessa, Instituto Plantarum., 2002.
- LORIA, V., Ilaria Dato, Francesca Graziani, and Luigi M. Biasucci. Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes. **Mediators of Inflammation**. Article ID 135625, 4 pages. 2008.
- LUBBAD, A.; M. A. Oriowo; I. Khan. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. **Mol Cell Biochem**. v.127–135, 2009.
- MACEDO, F.Y.B.; MOURÃO, L.T.C.; PALHETA, J.R.; JUCÁ, D.M.; LIMA, J.R.; NETO, J.S.C. Cyclooxygenase-2 Contributes To Functional Changes Seen On Experimental Hemorrhagic Cystitis Induced By Ifosfamide In Rat Urinary Bladder. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 67, p. 935–43, 2011.
- MAHRAN, R.I.; MAGDA, M. H.; DUXIN, S.U.N.; DEAN E. B. Received. Bringing Curcumin to the Clinic in Cancer Prevention: a Review of Strategies to Enhance Bioavailability and Efficacy. **The AAPS Journal**, 2016.
- MANIKANDAN, R., KUMAR, S. & DORAIRAJAN, L. N. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. **Indian J Urol**, v. 26, p. 159-66, 2010.

MARCZYLO, T.H.; VERSCHOYLE, R.D.; COOKE, D.N. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 60, p. 171-177, 2007.

MARTINS, J.; SILVA, R.; COUTINHO-SILVA, R.; TAKIYA, C.; BATTASTINI, A. MORRONE, F.; CAMPOS, M. The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. **Br J Pharmacol**, v. 165, p. 183-96, 2012.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology.** v. 9, p. 181-218, 16 set. 2013.

MCEVER, R.P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. **Cardiovasc Res.** p. 331-9. 2015.

MENDONÇA, L. M. **Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimioterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores *in vitro* e *in vivo*, e identificação de alterações na expressão do gene *Tp53*.** Ribeirão Preto, 2012.

MELO, M.L.; BRITO, G.A.; SOARES, R.C.; CARVALHO, S.B.; SILVA, J.V.; SOARES, P.M.; VALE, M.L.; SOUZA, M.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 61(5), p.775-84. 2008.

METZLER, M.; PFEIFFER, E.; SCHULZ, S.I.; DEMPE, J.S. Curcumin Uptake and Metabolism. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, Inc. v. 39, n. 1, p. 14–20, January/February 2013.

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.** Fortaleza, 2012.

MOY, B. **Cystitis in patients with cancer.** In: UpToDate version 20.3 via <http://www.uptodate.com/contents/cystitis-in-patients-with-cancer> (Accessed 20 February 2012).

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

NISHIDA, M.Y.; NISHIUMI, S.; MIZUSHINA, Y.; FUJISHIMA, Y.; YAMAMOTO, K.; MASUDA, A.; MIZUNO, S.; FUJITA, T.; MORITA, Y.; KUTSUMI, H.; YOSHIDA, H.; AZUMA, T.; YOSHIDA, M. Monoacetylcurcumin strongly regulates inflammatory responses through inhibition of NF-κB activation. **International journal of molecular medicine.** v. 25, p. 761-767, 2010.

PHILLIPS F.S.; STERBERG S.S.; CRONIN, A.P. et al. Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. **Cancer Res.** v. 21, 1961.

RANGE, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAVICHANDRAN, R. Pharmacokinetic Study of Nanoparticulate Curcumin: Oral Formulation for Enhanced Bioavailability. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**. v. 4, p. 291-299, 20013.

RIBEIRO, R.A.; FREITAS, H.C.; CAMPOS, M.C. et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **J Urol**. v.150, p. 2229–34, 2002.

RIBEIRO, R.A.; JUNIOR, R.C.P.L.; LEITE, C.A.V.G.; MOTA, J.M.S.C.; MACEDO, F.Y.B.; LIMA, M.V.A.; BRITO, G.A.C. 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 citiprotetores. **Rev. Bras. Oncologia Clinica**, vol 1, p. 43-50, 2004.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A. D.; MACIEL, M. A. M. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural de Seropédica – Ciências Exatas e da Terra**, Seropédica, v. 25, n. 1-2, p. 59-71, 2006.

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

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

SANTIAGO, V.S.; SILVA, G.P.M.; RICARDO, D.D.; LIMA, M.E.F. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Quim. Nova**, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: the story so far. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1955-1968, 2005.

SOUZA, C.M. **efeito neuroprotetor da curcumina sobre o estresse oxidativo, inflamação, memória e dano neuronal de ratos submetidos à isquemia cerebral transitória**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2012.

SOUZA-Filho MVP, Lima MVA, Pompeu MML, et al. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am J Pathol**. v. 150: p. 247–56, 1997.

VIEIRA, M.M.; BRITO, G.A.C.; FILHO, J.N.B.; MACEDO, F.Y.B.; NERY, E.A.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Use of dexamethasone with mesna for the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Jour.of Uro**. p. 595-602. 2003.

VILELA, C.A.A.; ARTHUR, P.O. **Secagem do açafrão (cúrcuma longa L.) em diferentes cortes geográficos**. Ciência e tecnologia de alimentos, Campinas, v.28, p. 387-394, abril-junho, 2008.

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

WANG, B.F.; CUI, Z.W.; ZHONG, Z.H.; SUN, Y.H.; SUN, Q.F.; YANG, G.Y.; BIAN, L.B. Curcumin attenuates brain edema in mice with intracerebral hemorrhage through inhibition of AQP4 and AQP9 expression. **Acta Pharmacologica Sinica**. n. 36, p. 939–948, 2015.

WANG, X.N.; ZHANG, C.J.; DIAO, H.L.; ZHANG, Y. Protective Effects of Curcumin against Sodium Arsenite-induced Ovarian Oxidative Injury in a Mouse Model. **Chinese Medical Journal**. v. 130 , n. 9, mai 2017.

WEIN, A.J.; KAVOUSSI, L.R.; NOVICK, A.C.; PARTIN, A.W.; PETERS, C.A. **Campbell-Walsh Urology**. 10 Ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012.

WHO. Cancer. Disponível

em:<[http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/Janeiro 2017](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/Janeiro%202017)>. Acesso em:04.06.17.

YALLAPU, M.M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S.C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 17, n. 1/2, p. 71-80, 2012.

ZHANG, Q.Y, MO, Z.N; LIU, X.D. Reducing effect of curcumin on expressions of TNF-alpha, IL-6 and IL-8 in rats with chronic nonbacterial prostatitis]. **Zhonghua Nan Ke Xue**. v. 16: p. 84–88, 2010.

ZHOU, H. et al. **Targets of curcumin**. *Curr Drug Targets*, v. 12, n. 3, p. 332–347, 2012.