



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

FRANCISCO CLEBER SILVA FERREIRA

**PROPRIEDADES UROPROTETORAS DOS COMPOSTOS [6]-, [8]- E [10]-
GINGEROL ISOLADOS DO *Zingiber officinale* NA CISTITE HEMORRÁGICA
INDUZIDA POR IFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA – CE
2017

FRANCISCO CLEBER SILVA FERREIRA

**PROPRIEDADES UROPROTETORAS DOS COMPOSTOS [6]-, [8]- E [10]-
GINGEROL ISOLADOS DO *Zingiber officinale* NA CISTITE HEMORRÁGICA
INDUZIDA POR IFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS**

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

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

**FORTALEZA – CE
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)

F441p Ferreira, Francisco Cleber Silva.

Propriedades uroprotetoras dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol isolados do *Zingiber officinale* na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos / Francisco Cleber Silva Ferreira. – 2017. 88 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de PósGraduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

1. Cistite. 2. Ifosfamida. 3. Gingerol. 4. Estresse Oxidativo. I. Título.

CDD 615.1

FRANCISCO CLEBER SILVA FERREIRA

**PROPRIEDADES UROPROTETORAS DOS COMPOSTOS [6]-, [8]- E [10]-
GINGEROL ISOLADOS DO *Zingiber officinale* NA CISTITE HEMORRÁGICA
INDUZIDA POR IFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS**

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

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

Aprovada em: 13 /12 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Regilane Matos da Silva Prado
Centro Universitário Católica de Quixadá (Unicatólica)

Dr. Francisco Advane de Paulo Rodrigues
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família, em especial aos meus pais,
Francisco Ferreira e Raimunda Ferreira,
por todos os esforços realizados que culmina
com mais essa conquista em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todo Seu cuidado e proteção, por Sua presença constante em minha vida, por me proporcionar diversas graças, mesmo diante de toda minha iniquidade.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá**, por ter me acolhido e aceito como orientando, por toda sua disponibilidade, atenção, compreensão, incentivo, orientação e paciência durante todo esse percurso de mestrado. Muito obrigado!

Aos membros da banca de qualificação, **Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar**, **Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte** e a **Profa. Dra. Karoline Sabóia Aragão**, por todas considerações, correções e sugestões de melhoria do trabalho.

Aos membros da banca de defesa, **Profa. Dra. Regilane Matos da Silva Prado** e **Dr. Francisco Advane de Paulo Rodrigues**, pela disponibilidade de tempo, por terem aceitado o convite e pela contribuição na etapa final desse trabalho.

A **Profa. Dra. Karina Moreira de Alencar Cunha**, da graduação, monitoria e para vida, por acreditar no meu potencial e por ter sido a ponte que me levou até a concretização desse mestrado. MUITÍSSIMO obrigado!

Ao **Prof. Dr. Jame's Almada da Silva**, pela colaboração com pesquisa, por ter nos cedidos gentilmente os compostos gingeróis.

Ao **Prof. Dr. Mario Rogério Lima Mota**, pela realização dos cortes e análise histopatológica.

Ao **Francisco Advane** e **Dainesy Martins** pelo companheirismo, disponibilidade nos experimentos realizados e por todo apoio dado na construção desse trabalho.

A **Herlice Veras** e **Samilly Ribeiro**, pela amizade construída, pelos momentos de descontração, risadas e ajuda na realização dos qPCRs.

Aos amigos de pós-graduação do LTM e LDI: **Ana Karolina dos Santos**, **Alejandra Velasco**, **Mariana Bona**, **Jessica Dayana**, **João Vitor Almeida**, **Rafaela Gomes**, **Júlio Werner**, **Marília Maia**, **Mara Prata**, **Rafaela Pankov** e **Klingem Leite**, por todos os momentos compartilhados, risadas e apoio.

Aos colegas de pós-graduação em Farmacologia (**turma 2015.2**), pelos momentos de convivência e cooperação.

Ao meu amigo **Wanderlei Lima**, pela amizade construída desde a graduação, mestrado e que permanece até hoje, obrigado pelo apoio e momentos compartilhados.

Aos **alunos de iniciação científica**, Thiago Miranda, Pedro Mateus e em especial a **Késia Helena**, pela sua disponibilidade na realização dos experimentos.

Aos **meus amigos de longa data**, por serem meu apoio nos momentos adversos, por cada palavra de motivação e por estarem presente em minha vida.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para realização desse trabalho, a todos muito obrigado!

A CAPES pelo o apoio financeiro.

RESUMO

A cistite hemorrágica (CH) é um evento inflamatório associado ao uso das oxazafosforinas, caracterizada pela presença de macro e micro hematúria, disúria, edema, dor supra-púbica e aumento da frequência urinária. Isto se deve à formação de acroleína, um metabólito tóxico comum à ifosfamida (IFO). Os gingeróis, substâncias bioativas provenientes do gengibre (*Zingiber officinale*), com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, poderiam exercer um efeito protetor, diminuindo a resposta pró-inflamatória. O presente trabalho avaliou o potencial efeito antioxidante e anti-inflamatória dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol isolados do *Zingiber officinale* (gengibre) na CH induzida por IFO. Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens *Swiss* e C57BL/6, pesando 20-25g. Primeiramente realizou-se um protocolo de padronização da linhagem de camundongos a serem utilizados no modelo de CH por IFO. O camundongo da linhagem *Swiss* foi a melhor escolha para a realização do modelo experimental. Foi realizado um protocolo piloto para determinar a dose de tratamento a ser utilizada nos demais protocolos experimentais, utilizou-se o composto [6]-gingerol nas doses 6,25, 12,5 e 25mg/Kg, sendo a dose de 25mg/Kg a escolhida como dose padrão para os demais compostos gingeróis. Os camundongos fêmeas *Swiss* foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n=6-7 por grupo): controle, IFO, Mesna (controle de uroproteção de CH utilizado na clínica) e os grupos de tratamento com [6]-, [8]- e [10]-gingerol (IFO+6G; IFO+8G; IFO+10G), que foram tratados por gavagem na dose 25mg/Kg, administrado uma hora antes da indução de CH e 4hs e 8hs após a indução. Após 12h da indução de CH por IFO foi realizado o sacrifício dos animais, seguido de excisão das bexigas e avaliação macroscópica de edema, hemorragia e análise histopatológica segundo os critérios de Gray, avaliação do peso úmido vesical (PUV), atividade da mieloperoxidase (MPO), perfil oxidativo (malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH)) e transcrição gênica de mediadores pró-inflamatórios (TNF α , IL-1 β , IL-6, e COX-2) através da reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR). Os compostos gingeróis foram capazes de diminuir o PUV, os escores de edema de forma significativa e apresentou uma melhora no escore de hemorragia. Além disso, reduziram de forma significativa a atividade de MPO, MDA e aumentaram as concentrações de GSH. Observou-se melhoras nos parâmetros histológicos para os compostos [8]- e [10]-gingerol, semelhante ao grupo Mesna. O [10]-gingerol foi o composto que apresentou a melhor redução na expressão de mRNA dos marcadores analisados, reduzindo de forma significativa a expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 e apresentou uma redução na expressão de COX-2. O composto [8]-gingerol diminuiu significativamente a expressão de COX-2, TNF- α e IL-6 e o [6]-gingerol reduziu a expressão de COX-2 estatisticamente. A partir dos dados apresentados, os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol demonstraram uma diminuição dos efeitos adversos da IFO na bexiga por sua ação anti-inflamatória e antioxidante (diminuição do edema, da atividade de MPO, no estresse oxidativo e redução da expressão gênica de marcadores pró-inflamatório), exercendo assim um efeito uroprotetor contra a CH induzida por IFO em camundongos.

Palavras-chave: Cistite, Ifosfamida, Gingerol, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

UROPROTECTIVE PROPERTIES OF COMPOUNDS [6] -, [8] - E [10] -GINGEROL ISOLATED FROM *Zingiber officinale* IN HEMORRHAGIC CYSTITIS INDUCED BY IFOSFAMIDE IN MICE

Hemorrhagic cystitis (HC) is an inflammatory event associated with the use of oxazaphosphorins, characterized by the presence of macro and microhematuria, dysuria, edema, suprapubic pain and increased urinary frequency. This is due to the formation of acrolein, a toxic metabolite common to ifosfamide (IFO). Gingerols, bioactive substances from ginger (*Zingiber officinale*), with antioxidant and anti-inflammatory properties, could exert a protective effect, reducing the pro-inflammatory response. The present work evaluated the potential antioxidant and anti-inflammatory effects of [6] -, [8] - and [10] -gingerol compounds isolated from *Zingiber officinale* (ginger) in HC induced by IFO. Female Swiss and C57BL / 6 mice, weighing 20-25g. First, a protocol for the standardization of the lineage of mice to be used in the HC model by IFO was performed. The Swiss strain was the best choice for the experimental model. A pilot protocol was used to determine the dose of treatment to be used in the other experimental protocols, the compound [6] -gingerol was used in doses of 6.25, 12.5 and 25mg / kg, with a dose of 25mg / kg which was chosen as the standard dose for the other gingerols compounds. The Swiss females were divided into the following experimental groups (n = 6-7 per group) were used: control, IFO, Mesna (clinic used drug for uroprotection against HC) and treatment groups with [6] - , [8] - and [10] -gingerol (IFO + 6G, IFO + 8G, IFO + 10G), which were treated by gavage at 25mg / kg dose, chosen from a pilot protocol, and given one hour before induction of HC and 4hs and 8hs after induction. After 12 h of induction of HC by IFO, the animals were euthanized for bladder excision and macroscopic evaluation of edema and hemorrhage and histopathological analysis according to Gray criteria, evaluation of bladder wet weight (BWW), myeloperoxidase activity (MPO), and pro-inflammatory profile (TNF α , IL-1 β , IL-6, and COX-2) by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Gingerols were able to significantly decrease BWW, edema scores and to improve bleeding scores. In addition, the activities of MPO and MDA were reduced while GSH levels increased significantly. We also found an improvement in the histological parameters especially for the compounds [8] - and [10] -gingerol, similar to the group treated with Mesna. [10] -gingerol was the compound that showed the best reduction in the mRNA expression of the analyzed markers, significantly reduced the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 and also reduced mRNA COX-2 expression. The compound [8]-gingerol significantly decreased ($P < 0.05$) the expression of COX-2, TNF- α and IL-6 and [6]-gingerol reduced COX-2 expression statistically. From the data presented, compounds [6]-, [8]- and [10]-gingerol demonstrated a decrease in the adverse effects of IFO in the bladder due to their anti-inflammatory and antioxidant action (decreased edema in MPO activity, improvement in oxidative stress and reduction of the gene expression of pro-inflammatory markers). Thus, they exerted a uroprotective effect against HC induced by IFO in female mice.

Keywords: Cystitis, Ifosfamide, Gingerol, Oxidative Stress.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Cistite Hemorrágica: fisiopatologia e aspectos gerais.	15
1.2	Oxazafosforinas: ifosfamida e ciclofosfamida	15
1.3	Tratamento preventivo utilizado na Cistite Hemorrágica por oxazafosforinas	18
1.4	Estresse oxidativo na Cistite Hemorrágica	21
1.5	Fisiopatologia e mediadores inflamatórios na Cistite Hemorrágica	22
1.6	<i>Zingiber officinale</i> (Gengibre), Gingeróis e suas características	26
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Animais e comitê de ética	31
4.2	Compostos e substâncias utilizadas	31
4.2.1	<i>Preparação dos compostos [6]-, [8]-, e [10]-gingerol</i>	31
4.3	Modelo de indução de cistite hemorrágica por ifosfamida	31
4.4	Grupos experimentais	32
4.4.1	<i>Protocolo de padronização do modelo de CH por IFO entre as linhagens de camundongos fêmeas Swiss e C57BL/6</i>	32
4.4.2	<i>Protocolo piloto</i>	32
4.4.3	<i>Protocolo experimental tratamento</i>	33
4.5	Parâmetros avaliados na cistite hemorrágica	37
4.5.1	<i>Avaliação do Peso Úmido Vesical</i>	37
4.5.2	<i>Análise macroscópica</i>	37
4.5.3	<i>Análise histopatológica</i>	37
4.6	Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	38
4.7	Análise do dano oxidativo	39
4.7.1	<i>Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)</i>	39
4.8	Avaliação da atividade antioxidante	39

4.8.1	<i>Avaliação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH)</i>	39
4.9	Avaliação dos marcadores inflamatório por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	40
4.9.1	<i>Extração do RNA total</i>	40
4.9.2	<i>Síntese de cDNA</i>	40
4.9.3	<i>PCR quantitativo em tempo real (qPCR)</i>	40
4.10	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Padronização do modelo experimental de cistite hemorrágica por ifosfamida nas linhagens de camundongos fêmeas <i>Swiss</i> e <i>C57BL/6</i>	43
5.1.1	Avaliação do peso úmido vesical (PUV) e dos escores macroscópico de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida entre as linhagens de camundongos fêmeas <i>C57BL/6</i> e <i>Swiss</i>	43
5.2	Determinação da dose versus efeito do tratamento com o composto [6]-gingerol na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	46
5.3	Avaliação do peso úmido vesical (PUV) e dos escores macroscópicos de edema e hemorragia após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol sem indução de cistite hemorrágica por ifosfamida	50
5.4	Avaliação do peso úmido vesical (PUV) e dos escores macroscópico de edema e hemorragia após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida	53
5.5	Análise histopatológica de bexigas após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida	56
5.6	Avaliação da atividade de mioeloxidase (MPO) após tratamento com os compostos [6]-, [8]- ou [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida	58
5.7	Determinação do malondialdeído (MDA) após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida	59

5.8	Avaliação da atividade da glutathiona reduzida (GSH) após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida	60
5.9	Avaliação da transcrição gênica da COX-2 após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida	61
5.10	Avaliação da transcrição gênica da TNFα após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida	61
5.11	Avaliação da transcrição gênica da IL-1β após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida	64
5.12	Avaliação da transcrição gênica da IL-6 após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida	64
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura química das oxazafosforinas	16
Figura 2-	Mecanismo de alquilação da guanina do DNA	17
Figura 3-	Estrutura do MESNA	19
Figura 4-	Representação esquemática da inativação da Acroleína pelo Mesna.	20
Figura 5-	Esquema da patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas	25
Figura 6-	Rizoma do gengibre	26
Figura 7-	Estrutura química do [6]-, [8]- e [10]-gingerol	27
Figura 8-	Desenho experimental, grupo controle	35
Figura 9-	Desenho experimental, grupo cistite (IFO 400mg/Kg)	35
Figura 10-	Desenho experimental, grupo Mesna (80mg/Kg i.p.)	36
Figura 11-	Desenho experimental, grupo Cistite com tratamento com os compostos gingeróis (IFO+6G; IFO+8G e IFO+10G), grupo Gingeróis Controle	36
Figura 12-	Avaliação do peso úmido vesical (PUV) entre as linhagens de camundongos fêmeas <i>Swiss</i> e <i>C57BL/6</i> na cistite hemorrágica por ifosfamida	44
Figura 13-	Avaliação dos escores macroscópicos de edema e hemorragia entre as linhagens de camundongos fêmeas <i>Swiss</i> e <i>C57BL/6</i> na cistite hemorrágica por ifosfamida	45
Figura 14-	Efeito do tratamento de diferentes doses do composto [6]-gingerol no peso úmido vesical (PUV) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	47
Figura 15-	Efeito do tratamento de diferentes doses do composto [6]-gingerol na avaliação dos escores macroscópicos de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	48
Figura 16-	Efeito do tratamento de diferentes doses do composto [6]-gingerol na atividade de mioeloperoxidase (MPO) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	49
Figura 17-	Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol no peso úmido vesical (PUV) sem indução de cistite hemorrágica induzida	

	por ifosfamida	51
Figura 18-	Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na avaliação dos escores macroscópicos de edema e hemorragia sem indução de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	52
Figura 19-	Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol no peso úmido vesical (PUV) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	54
Figura 20-	Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na avaliação dos escores macroscópicos de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	55
Figura 21-	Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol nas alterações histológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	57
Figura 22-	Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na atividade de mieloperoxidase (MPO) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	58
Figura 23-	Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na dosagem de malondialdeído (MDA) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	59
Figura 24-	Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na dosagem de glutathiona reduzida (GSH) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	60
Figura 25-	Efeito do tratamento com compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na transcrição gênica de COX2 na cistite hemorrágica por ifosfamida	62
Figura 26-	Efeito do tratamento com compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na transcrição gênica de TNF α na cistite hemorrágica por ifosfamida	63
Figura 27-	Efeito do tratamento com compostos [6], [8] e [10]-gingerol na transcrição gênica de IL-1 β na cistite hemorrágica por ifosfamida	65
Figura 28-	Efeito do tratamento com compostos [6], [8] e [10]-gingerol na transcrição gênica de IL-6 na cistite hemorrágica por ifosfamida	66
Figura 29-	Modelo hipotético com os principais achados associados à uroproteção dos compostos gingeróis na fisiopatogênese da cistite hemorrágica	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escores macroscópicos de Edema e Hemorragia de acordo com Gray et al. (1986)	37
Tabela 2	Sequências de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados	41
Tabela 3	Análise microscópicas dos grupos experimentais segundo critério de Gray et al. (1986)	56
Tabela 4	Resumos dos resultados encontrados na pesquisa	74

ABREVIATURAS

ASCO - Sociedade Americana de Oncologia Clínica

CAT - Catalase

CH - Cistite hemorrágica

CLP - *Cecal ligation puncture*

COX-2 - Ciclooxigenase-2

DSS - Dextrana sulfato de sódio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FDA - *Food and Drug Administration*

GSH - Glutathiona reduzida

HPRT-1 - Hipoxantina fosforibosiltransferase 1

IFO - Ifosfamida

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

IL-1 β - Interleucina-1beta

IL-6 - Interleucina-6

LPS - Lipopolissacarídeos

LRA - Lesão renal aguda

MDA - Malondialdeído

MESNA - 2-mercaptoeano-sulfonato de sódio

MPO - Mieloperoxidase

NF κ B - Fator nuclear Kappa B

NIH - *National Cancer Institute*

NO - Óxido nítrico

PAF - Fator de ativação plaquetária

PUV - Peso úmido vesical

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

SOD - Superóxido dismutase

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

6-G - [6]-gingerol

8-G - [8]-gingerol

10-G - [10]-gingerol

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cistite Hemorrágica: fisiopatologia e aspectos gerais

A cistite hemorrágica (CH) é um processo inflamatório, caracterizado por alteração da mucosa da bexiga, com presença de hematúria, dor na região púbica, disúria, aumento na urgência e frequência urinária, incontinência e noctúria (MANIKANDAN, KUMAR, DORAIRAJAN, 2010; MARTINS et al., 2012; SILVA-JUNIOR et al., 2013; DORNELLES et al., 2014).

A CH pode se tornar uma condição crônica e recorrente, passando a ser um desafio na prática clínica, por apresentar alta morbidade, afetando seriamente a qualidade de vida dos pacientes em tratamento quimioterápico, prolongamento nas internações hospitalares e gerando altos custos. Em casos mais graves pode ser necessário a cistectomia e, eventualmente, casos de óbito também são registrados (PAYNE et al., 2013; DORNELLES et al., 2014).

A cistite em pacientes com câncer pode ser dividida em 3 tipos de categorias: a cistite resultado do câncer de bexiga primário ou de canceres adjacentes; a cistite infecciosa em consequência de imunossupressão e, por fim, a cistite induzida diretamente pelo tratamento antineoplásico ou radioterapia (MOY, 2016).

A ocorrência da CH não está relacionada com a ação citotóxica da droga antineoplásica utilizada na quimioterapia do câncer, mas pelo seu efeito inflamatório de intensidade variada no percurso da eliminação renal de metabólitos tóxicos das oxazafosforinas, como a acroleína. Essa substância está envolvida na ativação de vias de processo inflamatório importantes, envolvendo diversos mediadores, que intensificam o seu efeito citotóxico e, como consequência, o dano urotelial (KORKMAZ, TOPAL, OTER, 2007; RIBEIRO et al., 2012).

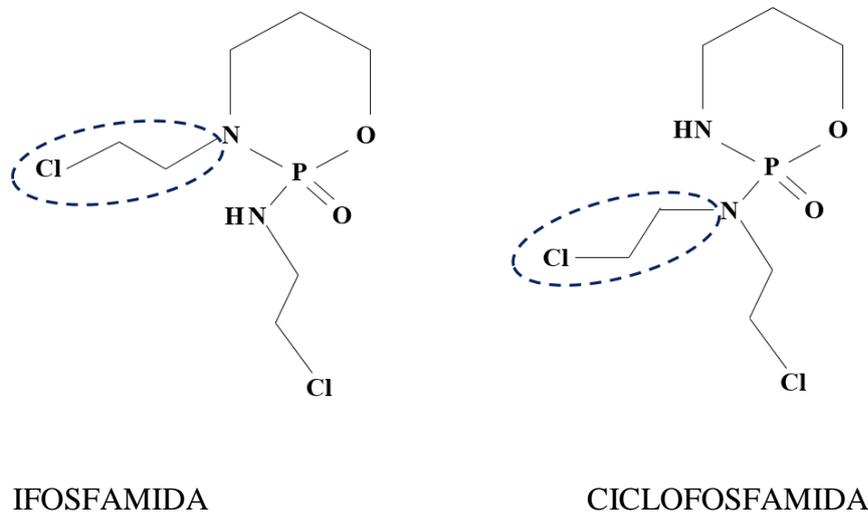
1.2 Oxazafosforinas: ifosfamida e ciclofosfamida

As oxazafosforinas têm como representantes a ciclofosfamida e ifosfamida, sendo o último um análogo da ciclofosfamida que foi introduzido na clínica no início da década de 1970. São agentes antineoplásicos alquilantes pertencentes à classe das mostardas nitrogenadas altamente reativas, que exercem seus efeitos quimioterapêuticos atacando grupos nucleofílicos específicos de moléculas de DNA em células alvo de câncer (WANG; WANG, 2012). Estes agentes são pró-drogas que necessitam do metabolismo hepático, ou seja, requerem ativação do

citocromo hepático P450, produzindo mostardas de azoto para exercerem seus efeitos citotóxicos (ALI et al., 2014).

Quimicamente estes compostos são isômeros de fórmula $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$, que diferem entre si apenas pela posição de um grupamento cloroetila. A ciclofosfamida possui os dois grupos cloroetila no átomo de nitrogênio exocíclico, enquanto um dos dois grupos cloroetila da ifosfamida encontra-se no nitrogênio da ifosfamida cíclica do anel oxazafosforina (**FIGURA 1**) (GOODMAN; GILMAR, 2013).

Figura 1. Estrutura química das oxazafosforinas



Fonte: Adaptado de Matz; Hsieh, (2017).

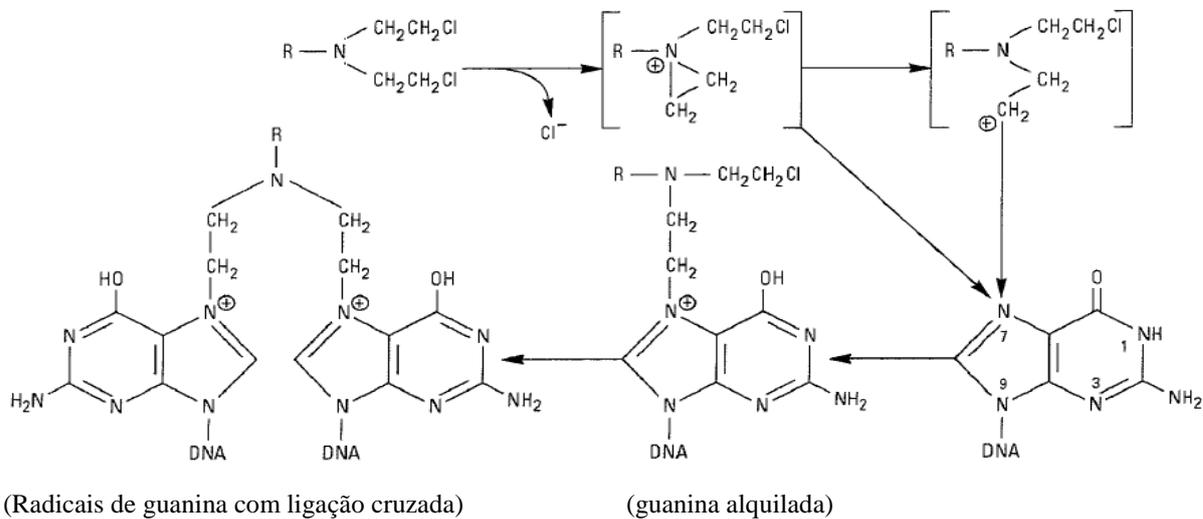
Biologicamente os agentes alquilantes representam uma classe de moléculas citotóxicas, que possuem em comum a habilidade de tornarem-se compostos eletrofílicos fortes, que formam ligações covalentes com os grupos do DNA e, assim, impedindo a sua replicação (GERMANAS; PANDYA, 2002; GOODMAN; GILMAR, 2005). 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).

O mecanismo de ação desses fármacos envolve a ciclização intramolecular, formando um íon etilenoimônio altamente reativo, que pode diretamente ou pela formação de íon carbônio,

transferir um grupo alquila para um constituinte celular (CHU; SARTORELLI, 2014) (**FIGURA 2**).

A alquilação do DNA no interior do núcleo provavelmente representa a principal interação que leva à morte celular. Dependendo do agente específico, a alquilação pode ocorrer nos átomos de nitrogênio ou de oxigênio da base, 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 (BARBIE; FRANK, 2009).

Figura 2. Mecanismo de alquilação da guanina do DNA.



Fonte: Chu; Sartorelli, (2014).

A ciclofosfamida e a ifosfamida são oxazafosforinas aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso contra diversas doenças malignas e benignas. São prescritas para cânceres pediátricos, incluindo leucemia linfoblástica aguda, neuroblastoma e retinoblastoma. Já a síndrome nefrótica infantil (nefropatia por lesão mínima) é tratada com ciclofosfamida. Em adultos, a ciclofosfamida é aprovada para uso em leucemia mieloide aguda, câncer de mama, leucemia linfocítica crônica, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiplo, micose fungoide, linfoma não-Hodgkin e adenocarcinoma ovariano. A ciclofosfamida também tem um papel de imunossupressor no transplante de células-tronco hematopoiéticas (FDA, 2017; NIH, 2017).

A ifosfamida é indicada pelo FDA para uso contra tumores de células germinativas testiculares (FDA, 2017). Possui eficácia terapêutica em cânceres de pulmão de pequenas e

não pequenas células, câncer de bexiga, linfoma não-Hodgkin e câncer de mama avançado (SIU; MOORE, 1998). Está entre os agentes de alquilação de DNA mais utilizado na quimioterapia, por exibir uma maior taxa de resposta terapêutica, com menos mielossupressão, em comparação com a ciclofosfamida. É utilizado como único agente, mas com mais frequência em combinação com outros agentes antineoplásicos no tratamento de tumores sólidos e neoplasias hematológicas (WANG; WANG, 2012; ALI et al., 2014).

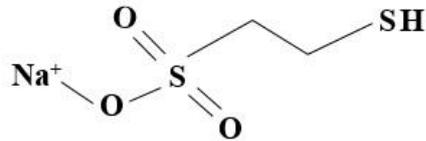
Como demonstrado acima, o uso desses fármacos é amplo e abrange um grande número de pacientes. Com base nas estimativas da Sociedade Americana do Câncer sobre a incidência de câncer, a incidência de neoplasias com indicação da FDA de ciclofosfamida é mais de 400 mil novos pacientes por ano (MATZ; HSIEH, 2017).

Em situações de resistência de tumores em pacientes em tratamento com ciclofosofamida, a ifosfamida é utilizada com sucesso em regimes combinados de quimioterapia. Além disso, não apresenta uma acentuada resistência tumoral, possui um amplo espectro de ação antineoplásica e provoca uma baixa mielossupressão quando comparado a outros agentes (MACEDO, 2010).

A utilização desses antineoplásicos podem provocar um grave dano no sistema urinário, especificamente na bexiga, região mais afetada, devido ao efeito tóxico provocado pelo contato direto do metabólito acroleína, que é liberado na urina, podendo ocasionar a cistite hemorrágica, principal efeito adverso dose-limitante e que continua sendo um importante problema clínico responsável pela suspensão da quimioterapia (ALMEIDA et al., 2005; KORKMAZ, TOPAL, OTER, 2007; RIBEIRO et al., 2012; MATZ; HSIEH, 2017).

1.3 Tratamento preventivo utilizado na Cistite Hemorrágica por oxazafosforinas

Diversas medidas preventivas e profiláticas têm sido utilizadas e estudadas no tratamento da CH induzida pelos agentes do grupo oxazafosforinas. Como exemplo podemos citar: a co-administração do Mesna (2-mercaptoeano-sulfonato de sódio) (**FIGURA 3**) nos regimes de quimioterapia, o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais, corticoides, inibidores do oxido nítrico sintase (MORAES et al., 2013), o uso oral de disulfiram, N-acetil-cisteína e oxigênio hiperbárico, irrigação vesical com solução salina, formalina, fenol, nitrato de prata e prostaglandinas (CLOW et al., 2006), hidratação do paciente, a fim de manter o fluxo urinário, além da irrigação da bexiga, prevenindo a obstrução do trato urinário (CHEUK et al., 2007; PAYNE et al., 2013).

Figura 3. Estrutura do MESNA

Fonte: Adaptado de Matz; Hsieh, (2017).

A incidência de complicações de CH com uso das oxazafosforinas tem diminuído após a utilização de medidas profiláticas, como o Mesna. O seu uso é restritamente profilático, não possuindo efeitos na CH já estabelecida. O Mesna é um composto de tiol que funciona como um desintoxicante regional de metabólitos urotóxicos, como a acroleína, 4-hidroxi-ifosfamida e cloroacetaldeído. Depois de entrar na circulação o Mesna é oxidado pelos constituintes inibidores do ácido etilenodiaminotetracético para o Dimesna, que é então excretado pelos rins. Entre 30 e 50% de Dimesna filtrada no glomérulo é reduzida de volta ao Mesna no epitélio tubular renal pela glutatona redutase. Os grupos sulfidríla livres resultantes de Mesna podem se combinar diretamente com a ligação dupla de acroleína ou com outros metabólitos tóxicos de oxazafosforina na bexiga para formar compostos estáveis e não tóxicos, levando a excreção efetiva (SIU; MOORE, 1998; MARTINS et al., 2012; MACEDO et al., 2012; MATZ; HSIEH, 2017). A **Figura 4** representa esquematicamente a inativação de metabólitos tóxicos da ifosfamida (acroleína) pelo Mesna.

A Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) estabeleceu as diretrizes de prática clínica para o uso de Mesna. Essas diretrizes sugerem que para uma dose padrão de ifosfamida (<2,5g/m²/dia), a administração de Mesna deve ser igual a 60% da dose diária total de ifosfamida, administrada em 3 bolus, por via endovenosa, 15 minutos antes, 4 e 8 horas após a administração de cada dose (HENSLEY et al., 2008).

Antes da utilização dessa medida, a incidência de hematúria chegava a atingir 68% dos pacientes submetidos ao tratamento com oxazafosforinas, com mortalidade estimada em 4% dos casos mais graves (SANTOS-JUNIOR et al., 2010). Essa incidência de hematúria é estimada em 5% dos casos em função da utilização desses uroprotetores (LIMA et al., 2007). Desta forma, na ausência de uroproteção adequada, a CH se torna dose-limitante, com uma incidência em torno de 20-40% (MACEDO et al., 2012).

1.4 Estresse oxidativo na Cistite Hemorrágica

O estresse oxidativo é decorrente da existência do desequilíbrio entre formação dos radicais livres e da capacidade da defesa antioxidante de eliminá-las (BARBOSA et al., 2008). O mesmo está associado com um aumento de produção de espécies reativas, dentre elas as espécies reativas de oxigênio (ERO), em particular no ânion superóxido (O_2^-), que é normalmente convertida para H_2O_2 pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). H_2O_2 , por sua vez, é metabolizado em H_2O e O_2 através das enzimas antioxidantes: glutaciona peroxidase e catalase (CAT) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O aumento excessivo desses radicais livres é responsável por efeitos prejudiciais na peroxidação lipídica de membrana, agressões nas proteínas dos tecidos e membranas, enzimas, carboidratos e DNA, estando relacionados a diversas patologias, envolvidos nos processos inflamatórios, cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BARBOSA et al., 2010).

Os danos oxidativos causados pelos radicais livres têm sido implicados na patogênese da cistite hemorrágica. Tem sido proposto que o dano urotelial ocorre devido a redução da glutaciona endógena, ocasionando a formação de radicais livres, como ânion superóxido e o radical hidroxilo, que desencadeiam a peroxidação lipídica e outros danos celulares. Tais evidências apontam que a participação das EROs e o estresse oxidativo representam um papel importante no dano uroepitelial ocasionado pela acroleína e que o sequestro de radicais livres pode amenizar o dano na bexiga causado pela acroleína em experimentação animal (KORKMKAZ et al., 2007; ALI et al., 2014).

As células são naturalmente equipadas por um sistema de defesa antioxidante, capaz de evitar a citotoxicidade das EROs através de mecanismos que envolvem a ação de enzimas e compostos com potencial de sequestrar radicais livres. Entre as enzimas envolvidas nesta ação estão a superóxido dismutase (SOD) e a glutaciona peroxidase (FESHARAKI et al., 2006).

Estudos têm demonstrado a utilização de agentes antioxidantes na inibição dos efeitos da CH experimental. Vieira e colaboradores (2004) demonstraram que um flavonoide natural, a ternatina, preveniu a CH induzida por ifosfamida e ciclofosfamida em camundongos. O β -caroteno (SADIR et al., 2007) e a melatonina (SENER et al., 2004) são exemplos de substâncias antioxidantes capazes de prevenir o dano urotelial das oxazafosforinas.

Substâncias como a glutaciona e amifostina (um agente citoprotetor utilizado para proteger as células saudáveis dos efeitos citotóxicos da quimioterapia do câncer) exercem

proteção do uroepitélio em modelo de CH induzida por ifosfamida ou seu metabólico urotóxico, a acroleína (BATISTA et al., 2007).

As EROs potencializam a resposta inflamatória por meio da indução dos fatores de transcrição, como Fator nuclear Kappa B (NFκB), um complexo proteico associado a fatores de transcrição de diversos eventos inflamatórios. Na presença das EROS ou citocinas (TNF-α e IL-1), o NFκB é liberado e translocado para o núcleo, onde exercerá a ativação de genes pró-inflamatórios, e potencializará o efeito da acroleína na lesão na bexiga causado pelas oxazafosforinas (LIU, 2005; KORKMAZ, TOPAL, OTER, 2007).

Durante o processo inflamatório o radical O_2^- é formado pelas células fagocitárias ou linfócitos e fibroblastos, por ação da NADPH oxidase, que catalisa a redução por um elétron do O_2 com gasto de uma molécula de NADPH, com o objetivo de destruir os agentes invasores, apresentando assim a importância do radical O_2^- na defesa celular diante das infecções por bactérias, fungos e vírus (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

1.5 Fisiopatologia e mediadores inflamatórios na Cistite Hemorrágica

Diversos estudos desenvolvidos por grupos de pesquisas do Estado de Ceará foram realizados com intuito de compreender a fisiopatologia e os mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da CH induzida pelas oxazafosforinas. Experimentalmente, sabe-se que diversas substâncias contribuem para a gênese e o dano urotelial na CH, assim como outros agem como agentes protetores, atenuando o processo inflamatório (LIMA, 1994; GOMES et al., 1995; SOUZA et al., 1997; ASSREUY et al., 1999; RIBEIRO et al., 2002; VIEIRA et al., 2003, MOTA et al., 2007; MACEDO et al., 2008b; MACEDO et al., 2012).

A inflamação da bexiga urinária induzida pelas oxazafosforinas é inicialmente caracterizada pelo o acúmulo da acroleína no epitélio causando o dano urotelial, levando a formação de edema, ulceração, neovascularização, hemorragia, necrose e expressão de mediadores e enzimas inflamatórias (MACEDO et al., 2008a).

Existem algumas propostas de mecanismo de ação responsável por provocar o dano urotelial: aumento da produção das EROs no epitélio da bexiga, que induz a expressão de alguns fatores de transcrição celular, como o NFκB e AP-1, ativando citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina-1β (IL-1β) (KORKMAZ, TOPAL, OTER, 2007).

Estudos realizados por Lima (1994), demonstrou o envolvimento das prostaglandinas, leucotrienos e do fator de ativação plaquetária (PAF) no modelo de CH por ciclofosfamida em

ratos. Posteriormente, Gomes e colaboradores (1995) demonstraram que citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α desempenhavam um papel importante na CH induzida por ciclofosfamida, uma vez que a prévia neutralização do TNF- α ou da IL-1 β endógena pelo soro anti-TNF- α ou anti-IL-1 inibiu significativamente os eventos inflamatórios da CH.

Souza-Filho (1997) ao estudar a relação do óxido nítrico (NO) na cistite induzida por ciclofosfamida, descobriu que o surgimento dos eventos inflamatórios estaria relacionado com a presença do NO, pois a ciclofosfamida induziria a ativação da óxido nítrico sintase (iNOS), que conduziria ao dano inflamatório na bexiga dos ratos. Outra relação interessante foi que toda esta cascata de eventos seria dependente da ação do PAF. Este último é um potente mediador inflamatório fosfolipídico, que aumenta a adesão celular e ativa as células endoteliais por efeito direto ou através da formação de EROs ou metabólitos do ácido araquidônico. A sua ativação parece levar aos efeitos inflamatório do TNF- α e IL-1 β .

Portanto, os resultados descritos acima sugeriram que o NO endógeno estaria envolvido no dano urotelial e nos eventos inflamatórios que levam a CH após a administração de uma oxazafosforinas, como a ifosfamida, pois a indução da iNOS na bexiga inflamada requereria a ação do TNF- α e IL-1 β (RIBEIRO et al., 2002).

A migração dos neutrófilos no desenvolvimento da CH também foi descrita nos estudos realizados por Assreuy e colaboradores (1999). Na ocasião foi demonstrado que lectinas de plantas com afinidade específica por resíduos de glicose-manose exerciam atividade anti-inflamatória na CH induzida por ciclofosfamida, uma vez que foram capazes de diminuir de forma significativa o dano urotelial através do provável bloqueio competitivo da ligação com as selectinas e, conseqüentemente, inibição da migração de leucócitos para o sítio inflamatório.

Em 2003, Vieira e colaboradores, ao estudar o efeito do uso de glicocorticoide associado nas duas últimas doses de Mesna, comprovou que a dexametasona foi capaz de diminuir o edema vesical e as alterações macro e microscópicas provocadas pela cistite. Esse efeito poderia ser explicado por dois motivos: 1) os glicocorticoides são potentes inibidores da síntese de citocinas tais como TNF- α e IL-1 β , PAF e iNOS, que são responsabilizados como mediadores primordiais para o surgimento dos efeitos inflamatórios da cistite hemorrágica; 2) a dexametasona é um potente inibidor da migração de neutrófilos.

Macedo e colaboradores (2008b) estudaram o papel da ciclooxigenase-2 (COX-2) e das prostaglandinas no quadro de CH. Nesse estudo, o uso de um inibidor da enzima COX-2 (etoricoxib) foi capaz de inibir a CH induzida pela ifosfamida. Além disso, a utilização de um inibidor da síntese de TNF- α (talidomida), e um inibidor da síntese de TNF- α e IL-1 β

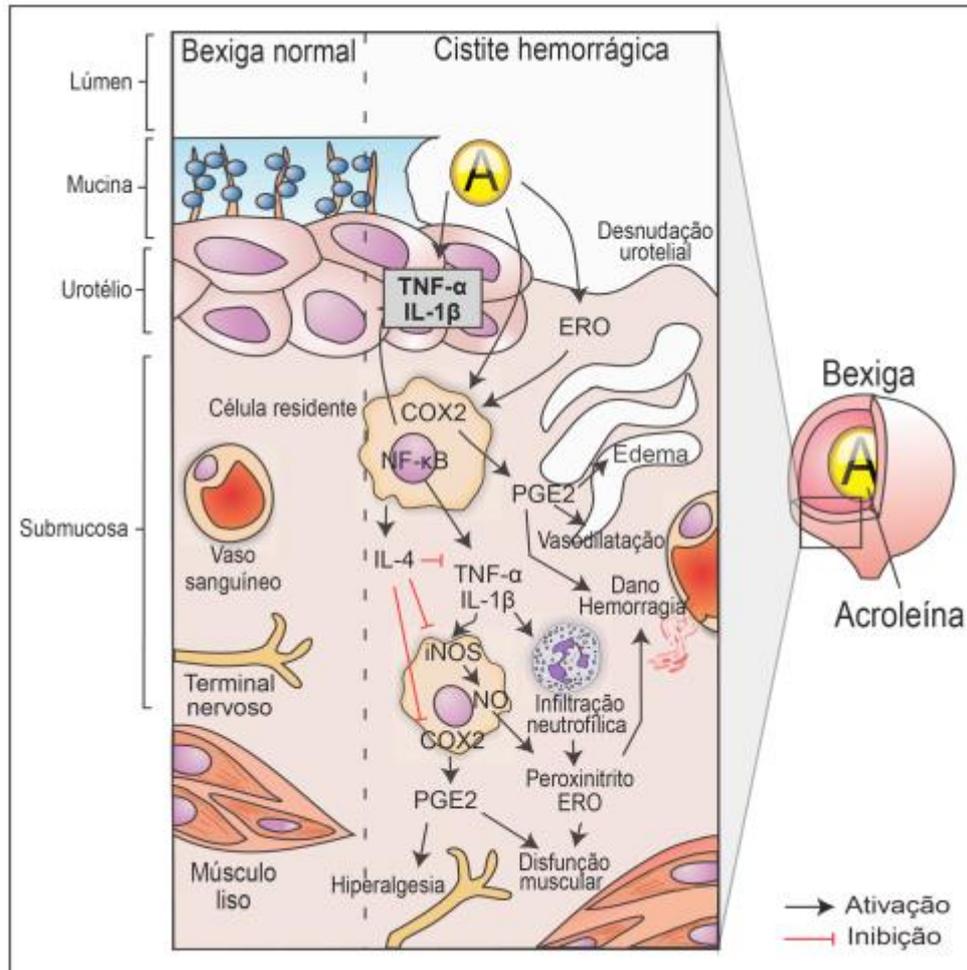
(pentoxifilina) diminuíram a expressão de COX-2, bem como as alterações macroscópicas e microscópicas da CH induzida por ifosfamida.

Ainda em 2007, Mota e colaboradores, mostraram o efeito protetor da interleucina -11 (IL-11) ao reduzir o aumento do peso úmido vesical causado por ifosfamida assim como diminuição nos achados macro e microscópicos de hemorragia e edema. Foi demonstrado que interleucina-4 (IL-4) exógena preveniu parcialmente os eventos inflamatórios da CH induzida por ifosfamida, e que a IL-4 endógena produzida após a administração de ifosfamida é parte importante do processo de modulação do fenômeno inflamatório exercendo sua atividade anti-inflamatória através da inibição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β e enzimas pró-inflamatórias como iNOS e COX-2 (MACEDO et al., 2012).

Na busca por entender e de criar um esquema mais simplificado e de fácil entendimento do que se descobriu nos últimos anos sobre a patogênese da CH induzida pelas oxazafosforinas, Ribeiro e colaboradores (2012) propuseram um esquema das vias que levam ao dano ao epitélio da bexiga, o que pode ser visto na **Figura 5**. E como base nessas informações da fisiopatologia da CH, foi proposto um modelo de quatro estágios para descrever as fases envolvidas na CH.

O primeiro estágio da fisiopatologia da CH corresponderia a fase inicial do dano urotelial, que ocorre após o acúmulo de acroleína na bexiga. Em seguida seria a fase inflamatória, com elevada regulação do NF κ B e a presença de citocinas inflamatórias liberadas pelas células residentes (macrófagos). A resposta seria intensificada pelo aumento de citocinas, EROs e a expressão de enzimas inflamatórias (iNOS e COX2). No terceiro estágio (fase sintomática), ocorreria a desnudação urotelial e a formação de úlceras, consequentemente a dor visceral e disfunção vesical. O quarto e último estágio (fase de cicatrização), representado pelo reparo tecidual, com provável sinalização dos fibroblastos e a liberação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de queratinócitos (RIBEIRO et al., 2012).

Figura 5. Esquema da patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.



Fonte: Adaptado Ribeiro et al. (2012); Leite (2015).

1.6 *Zingiber officinale* (Gengibre), Gingeróis e suas características

O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma das principais espécies pertencente à família Zingiberaceae. É uma planta herbácea perene com haste frondosa e com rizoma ramificados e aromáticos (**FIGURA 6**), originária da Ásia, cultivada nas regiões tropicais e semitropicais. A família do gengibre é composta por 53 gêneros e mais de 1200 espécies (CAPÓ et al., 2007; PÉREZ et al., 2010; KUMAR et al., 2013).

Figura 6. Rizoma do gengibre



Fonte: Silva Neto (2012); Rodrigues (2013).

O gengibre é considerado um importante recurso natural, que fornece muitos produtos úteis para alimentos, especiarias, medicamentos, corantes e perfumes, sendo uma das especiarias mais utilizadas em inúmeros alimentos da culinária oriental, europeia e americana, devido ao seu aroma doce e sabor pungente (ANDREO; JORGE, 2007; LEMOS JUNIOR; LEMOS, 2010; BARRETO; TOSCANO; FORTES, 2011; KUMAR et al., 2013).

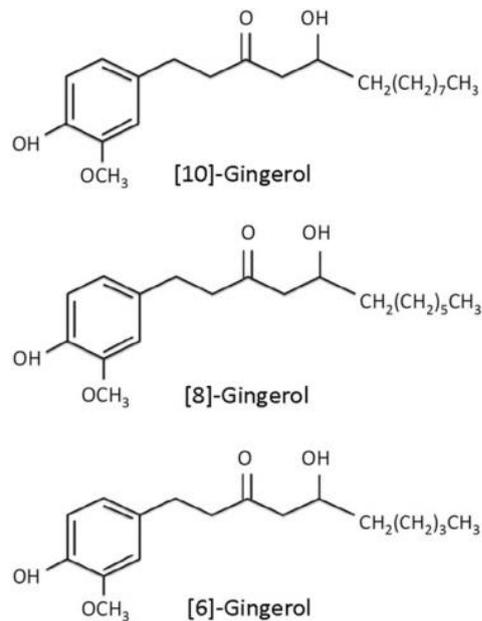
A sua ampla utilização é reportada ao longo da história por apresentar benefícios para a saúde humana, devido ao seu valor medicinal, e sendo utilizado na medicina oriental e tradicional. A literatura científica relata diversas propriedades farmacológicas para o extrato do gengibre, incluindo: anti-inflamatória, antioxidante, anti-carcinogênica, efeito nos distúrbios gastrointestinais (dores de estômago, espasmo abdominal, náuseas, vômitos e colite ulcerativa), efeito cardio e hepatoprotetor (AJAYI; ADEDARA; FAROMBI, 2015; HALAWANY et al., 2017).

As propriedades medicinais oriundas do gengibre são explicadas pela presença de diversos componentes químicos, como: gingeróis, shogaois, paradois e zingerones, que são os princípios ativos responsáveis pela atividade biológica e farmacológica. Os gingeróis e os shogaois são responsáveis pela característica pungente do gengibre, principalmente o [6]-

gingerol, um dos homólogos dos gingeróis que apresentam maior pungência (AJAYI; ADEDARA; FAROMBI, 2015).

Os compostos gingeróis compartilham entre si uma porção cetona aromática, mas se diferem pelo número de carbonos na sua cadeia lateral: 10, 12, 14 átomos de carbonos, dando origem ao [6]-, [8]- e [10]-gingerol, sendo o [6]-gingerol a forma mais abundante no gengibre, seguindo pelo [10]-gingerol e [8]-gingerol. A **Figura 7** apresenta a estrutura química destes principais homólogos de gingerol, que após a desidratação formam os shogaóis correspondentes (BERNARD; MCCONNERY; HOSKIN, 2017).

Figura 7. Estrutura química do [6]-, [8]- e [10]-gingerol.



Fonte: Bernard; Mcconnery; Hoskin (2017).

Diversos estudos vêm demonstrando os efeitos farmacológicos provenientes do gengibre e de seus componentes. Estudos realizados por Ahmed e colaboradores (2000), em modelo de estresse oxidativo por pesticida (malation) em ratos, verificou-se que a utilização de gengibre na dieta desses animais atenuava esse efeito oxidativo, diminuindo a peroxidação lipídica e aumentando as concentrações enzimáticas da SOD e da glutathione peroxidase, resultados semelhantes encontrados com o ácido ascórbico.

Rodrigues e colaboradores (2014) ao avaliarem o efeito da fração de gingeróis em um modelo de nefrotoxicidade por gentamicina em ratos, demonstrou um efeito nefroprotetor, com melhora nos parâmetros da função renal, redução no dano oxidativo, diminuição na

peroxidação lipídica e aumento na atividade das enzimas SOD e glutathiona reduzida (GSH) e reduções significativas na transcrição de mRNA para TNF- α , IL-2 e IFN- γ .

Estudos realizados com [6]-gingerol no modelo de colite ulcerativa por dextrana sulfato de sódio (DSS) em ratos, demonstrou que o [6]-gingerol foi capaz de prevenir o dano oxidativo e inflamatório, reduzindo as concentrações de malondialdeído e aumentando a atividade das enzimas antioxidantes, suprimindo as concentrações IL-1 β e TNF- α e a atividade da mieloperoxidase (MPO) (AJAYI; ADEDARA; FAROMBI, 2015). Zhang e colaboradores (2017) ao analisarem os efeitos dos [6]-, [8]- e [10]-gingerol no mesmo modelo de colite confirmou os mesmos achados.

O [6]-gingerol foi capaz de reduzir a expressão de iNOs em cultura de macrófagos estimuladas por lipopolissacarídeos (LPS). A expressão de iNOS está diretamente relacionada com a participação das EROs na via de sinalização para expressão de iNOS induzida por LPS, demonstrando assim que o [6]-gingerol atuou como um composto antioxidante (LEE et al., 2009).

Os compostos fenólicos [8]- e [10]-gingerol detêm ação antioxidante semelhante ao [6]-gingerol, pois tal atividade está relacionada com a presença dos grupos fenólicos, sendo o gengibre rico em tais compostos. Os três compostos inibiram o dano oxidativo por redução na produção de EROs diminuindo os níveis do ânion superóxido, do radical hidroxila e reduzindo a produção de nitrito (ALI et al., 2008; DUGASANI et al., 2010).

Pesquisas estão sendo realizadas para demonstrar a atividade imunossupressora dos compostos gingeróis. Resultados encontrados por Lu e colaboradores (2011) sugerem que o [8]-gingerol foi capaz de suprimir a resposta imunológica humoral e celular em camundongos e que o mecanismo pode estar relacionado com a inibição direta de linfócitos T e B sensibilizados.

Bernard e colaboradores (2015) ao avaliarem a proliferação de linfócitos T em camundongos e comparando os efeitos entre os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol, demonstraram que o [10]-gingerol e [8]-gingerol foram inibidores mais potentes de linfócitos T do que o [6]-gingerol, sugerindo que esses compostos podem ser benéficos em condições inflamatórias crônicas associadas à ativação excessiva ou inadequada de linfócitos T.

Diante do exposto e sabendo do potencial terapêutico proveniente dos compostos gingeróis e da inexistência de estudos que relatem sua ação uroprotetora, nos propomos a investigar os possíveis efeitos antioxidante e anti-inflamatório dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na CH causada pelo tratamento quimioterápico por ifosfamida.

2 JUSTIFICATIVA

A cistite hemorrágica (CH) é o principal efeito adverso associado ao uso das oxazafosforinas (ifosfamida e ciclofosfamida). A terapêutica usual utiliza agentes uroprotetores como o Mesna para diminuir os índices de CH, no intuito de utilizar doses maiores de oxazafosforinas nos tratamentos de neoplasias e assim aumentar a eficácia na resposta clínica. Entretanto, mesmo com o uso dos uroprotetores a ocorrência de CH ainda é observada em percentual relativamente significativo entre os pacientes (LIMA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2012). Diante deste fato, surge a base para pesquisa e teste de novos compostos que possam promover efeitos que amenizem ou evitem o quadro de CH pós-tratamento com oxazafosforinas.

Estudos anteriores demonstraram que a fração enriquecida com gingeróis apresentou atividades antioxidante e anti-inflamatório na função renal diante a nefrotoxicidade por aminoglicosídeo (RODRIGUES et al., 2014). Além disso, um estudo realizado com os compostos [6]-, [8]- e [10]- gingerol apontou a redução na indução da colite ulcerativa através das atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (AJAYI; ADEDARA; FAROMBI, 2015; ZHANG et al., 2017). Contudo, os efeitos biológicos e comparativos dos compostos isolados [6]-, [8]- e [10]- gingerol sobre os mesmos marcadores no modelo de CH por ifosfamida são inexistentes na literatura, o que torna relevante a pesquisa desses parâmetros.

No intuito de descobrir alternativas que venham favorecer, ou até mesmo reverter os efeitos causados dos processos oxidantes e inflamatórios no tecido injuriado na CH induzida por oxazafosforinas, os gingeróis, compostos ativos isolados do gengibre, poderiam ser uma alternativa farmacológica promissora. Portanto, o presente trabalho se propõe investigar e demonstrar os possíveis efeitos uroprotetores dos [6]-, [8]- e [10]-gingerol no percurso dos danos inflamatórios e oxidativos observados na cistite hemorrágica por ifosfamida em camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antioxidante e anti-inflamatória dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol isolados do *Zingiber officinale* (gengibre) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar a linhagem de camundongos fêmeas a ser utilizado no modelo de cistite hemorrágica por ifosfamida.
- Analisar os efeitos do [6]-, [8]- e [10]-gingerol sobre o peso úmido vesical (PUV) e sobre os parâmetros macroscópicos de edema e hemorragia na cistite hemorrágica por ifosfamida;
- Investigar a atividade de mieloperoxidase (MPO) na cistite hemorrágica por ifosfamida em camundongos tratados ou não com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol;
- Avaliar as possíveis alterações histológicas na presença ou ausência de tratamento oral com [6]-, [8]- e [10]-gingerol frente à cistite hemorrágica por ifosfamida;
- Verificar o perfil oxidativo através das medidas de concentração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) na cistite hemorrágica em camundongos tratados ou não com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol;
- Investigar o possível efeito anti-inflamatório dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol sobre os marcadores de lesão inflamatória (COX-2, TNF α , IL-1 β e IL-6) produzidos na cistite hemorrágica;
- Comparar os efeitos dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na proteção do tecido lesionado com a cistite hemorrágica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e comitê de ética

Foram utilizados camundongos fêmeas *Swiss* e C57BL/6, pesando entre 20 e 25 gramas. Os animais foram colocados em caixas, em um ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$; ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão. Os animais foram fornecidos pelo biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC.

Todos os protocolos desenvolvidos foram conduzidos de acordo com os padrões de uso de animais experimentais, estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará sob o número de **protocolo 34/2016**.

4.2 Compostos e substâncias utilizadas

Os compostos [6]-, [8]-, e [10]-gingerol foram obtidos por meio de técnica de isolamento padronizado no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFCar) conforme descrito por Silva et al., (2012), e cedidos pelo Prof. Dr. Jame's Almada da Silva. Os demais produtos químicos e outras substâncias aqui mencionadas foram adquiridas da Sigma-Aldrich® USA ou Vetec® Brasil.

4.2.1 *Preparação dos compostos [6]-, [8]-, e [10]- gingerol*

Os compostos [6]-, [8]-, e [10]- gingerol foram dissolvidas no Tween-80 2% em solução salina 0,9%, aplicada na dose 25 mg/Kg, por via oral, que foi definida a partir do experimento piloto (item 4.4.1) (RODRIGUES et al., 2014).

4.3 Modelo de indução de cistite hemorrágica por ifosfamida

Para indução da cistite hemorrágica, os animais receberam uma dose única por administração intraperitoneal (i.p.) de ifosfamida (IFO) (400mg/Kg) e o grupo controle recebeu volume equivalente de solução salina 0,9% i.p. (RIBEIRO et al., 2002; BATISTA et al., 2007).

4.4 Grupos experimentais

Inicialmente foram realizados **três blocos experimentais**: primeiramente foi realizado um **protocolo de padronização da linhagem de camundongos** a serem utilizados na pesquisa. Nesse bloco foi utilizado as linhagens de camundongos fêmeas *Swiss* e C57BL/6. No segundo bloco experimental foi realizado um **protocolo piloto** para determinar a melhor dose a ser utilizada nos protocolos experimentais que se seguem. Para isso foi utilizado o composto [6]-gingerol nas doses 6,25, 12,5 e 25mg/Kg em grupos distintos (RODRIGUES et al., 2014). O terceiro bloco experimental foi o **protocolo experimental tratamento**, onde foi avaliado o efeito protetor dos gingeróis ([6]-gingerol, [8]-gingerol e [10]-gingerol) na dose determinada pelo **experimento piloto** perante a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

4.4.1 Protocolo de padronização do modelo de CH por IFO entre as linhagens de camundongos fêmeas *Swiss* e C57BL/6

- **Grupo Controle**
 - Os animais (*Swiss* ou C57BL/6) (n= 6-7) receberam administração de salina 0,9% i.p. conforme descrito no item 4.3, em grupos distintos.
- **Grupo Cistite - IFO**
 - Os animais (*Swiss* ou C57BL/6) (n= 6-7) foram submetidos à indução de CH por IFO conforme descrito no item 4.3, em grupos distintos.

Percorridos o período experimental de 12 horas da indução da cistite, os animais foram anestesiados com quetamina 90mg/Kg e xilazina 7,5 mg/Kg i.p. e eutanasiados por exsanguinação. Em seguida suas bexigas foram rapidamente removidas e submetidas às análises do peso úmido vesical e aos critérios macroscópicos de edema e hemorragia, de acordo como descrito por Gray e colaboradores (1986).

4.4.2 Protocolo Piloto

- **Grupo Controle**
 - Os animais (n= 6-7) receberam administração de salina 0,9% i.p. conforme descrito no item 4.3. Uma hora antes deste procedimento, 4hs e 8hs após

receberam administração de Tween-80 2% por gavagem (0,1ml/10g peso do animal).

- **Grupo Cistite - IFO**

- Os animais (n= 6-7) foram submetidos à indução de CH por IFO conforme descrito no item 4.3. Uma hora antes deste procedimento, 4hs e 8hs após receberam administração de Tween-80 2% por gavagem (0,1ml/10g peso do animal).

- **Grupo Cistite com Tratamento (IFO+6G)**

- Os animais (n= 6-7) foram submetidos à indução de CH por IFO conforme descrito no item 4.3. Uma hora antes desse procedimento, 4hs e 8hs após receberam seus respectivos tratamentos com [6]-gingerol por gavagem (0,1ml/10g peso do animal) nas doses 6,25, 12,5 e 25 mg/Kg em **3 grupos** distintos.

Percorridos o período experimental de 12 horas da indução da cistite, os animais foram anestesiados com quetamina 90mg/Kg e xilazina 7,5 mg/Kg i.p. e eutanasiados por exsanguinação. Em seguida suas bexigas foram rapidamente removidas e submetidas às análises do peso úmido vesical e aos critérios macroscópicos de edema e hemorragia, de acordo como descrito por Gray e colaboradores (1986), para, a seguir, serem rapidamente congeladas a -80°C para posterior avaliação na determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO), conforme protocolo experimental descritos a seguir.

4.4.2 Protocolo experimental tratamento

Os animais (camundongos *Swiss*) foram divididos em **9** grupos de 6-7 animais cada, distribuídos de forma aleatória. Em todos os grupos, os animais foram mantidos agrupados em caixas, alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

- **Grupo Controle**

- Os animais (n= 6-7) receberam administração de salina 0,9% i.p. conforme descrito no item 4.3. Uma hora antes desse procedimento, 4hs e 8hs após

receberam administração de Tween-80 2% por gavagem (0,1ml/10g peso do animal) (**FIGURA 8**).

- **Grupo Cistite – (IFO)**

- Os animais (n= 6-7) foram submetidos à indução de CH por IFO conforme descrito no item 4.3. Uma hora antes desse procedimento, 4hs e 8hs após receberam administração de Tween-80 2% por gavagem (0,1ml/10g peso do animal) (**FIGURA 9**).

- **Grupo Mesna (MESNA)**

- Os animais (n= 6-7) foram submetidos à indução de CH por IFO conforme descrito no item 4.3. E cinco minutos antes desse procedimento, 4hs e 8hs após foram tratados com Mesna 80mg/Kg i.p. (**FIGURA 10**).

- **Grupo Cistite com Tratamento (IFO+6G; IFO+8G; IFO+10G)**

- Os animais (n= 6-7) foram submetidos à indução de CH por IFO conforme descrito no item 4.3. Uma hora antes desse procedimento, 4hs e 8hs após receberam seus respectivos tratamentos com os Gingeróis por gavagem (0,1ml/10g peso do animal), em **3 grupos** distintos na dose de 25mg/Kg definida a partir do protocolo piloto (**FIGURA 11**).

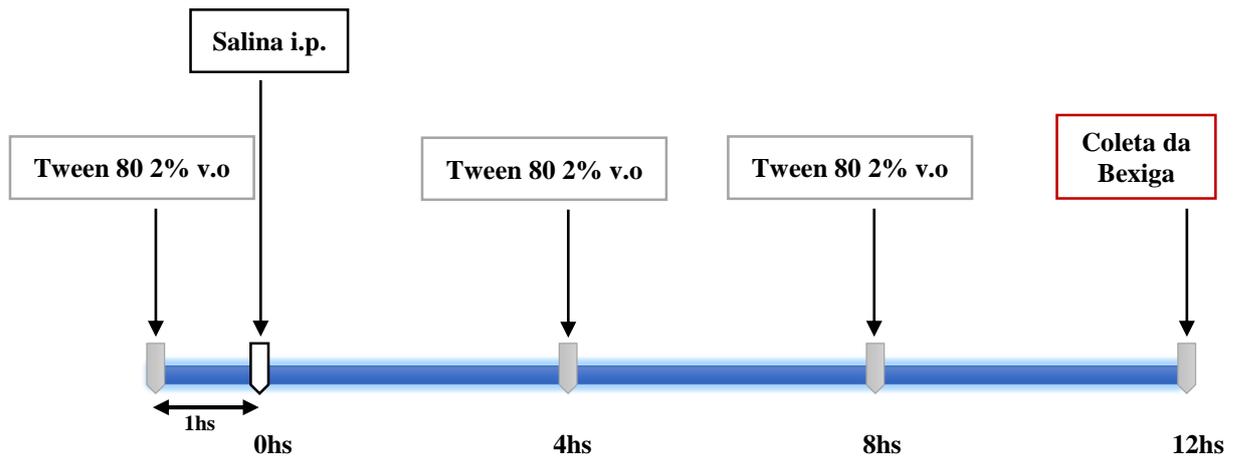
- **Grupo Gingerol Controle**

- Os animais (n= 6-7) receberam administração de salina 0,9% i.p. conforme descrito no item 4.3. Uma hora antes desse procedimento, 4hs e 8hs após receberam seus respectivos tratamentos com os Gingeróis por gavagem (0,1ml/10g peso do animal) em **3 grupos** distintos na dose de 25mg/Kg definida a partir do protocolo piloto (**FIGURA 11**).

Percorrido o período experimental de 12 horas da indução da cistite, os animais foram anestesiados com quetamina 90mg/Kg e xilazina 7,5 mg/Kg i.p. e conduzidos para laparotomia e dissecação da bexiga, que foi rapidamente removida e submetida à avaliação do peso úmido vesical e aos critérios macroscópicos de edema e hemorragia de acordo como descrito por Gray et al. (1986) e, para análise histológica, os tecidos foram armazenados em

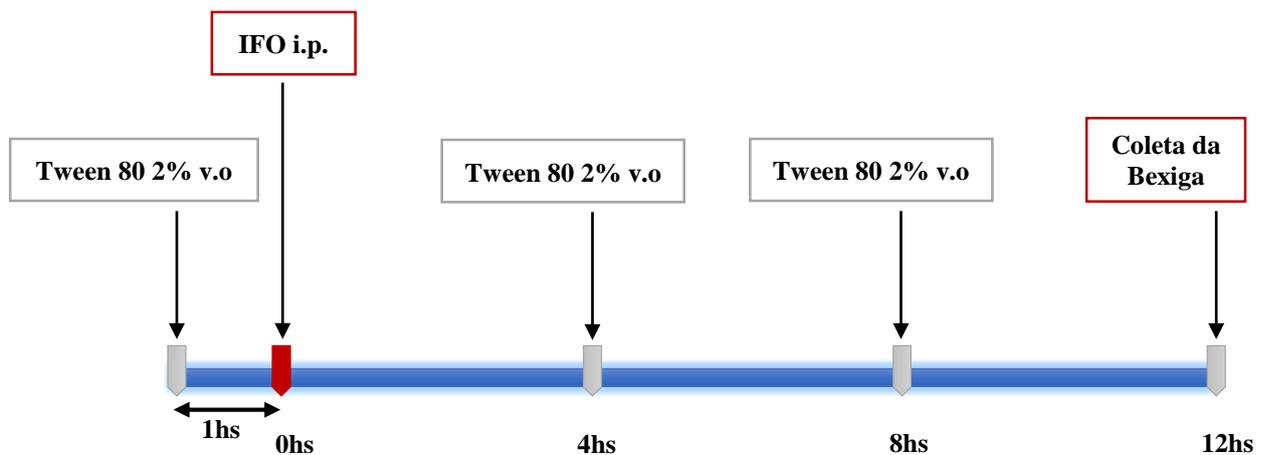
formol 10% tamponado. Em outros momentos os tecidos foram retirados e armazenados a -80°C e posteriormente utilizados para as análises da atividade de MPO, do dano oxidativo e para os ensaios de biologia molecular para marcadores inflamatórios.

Figura 8. Desenho experimental, grupo controle



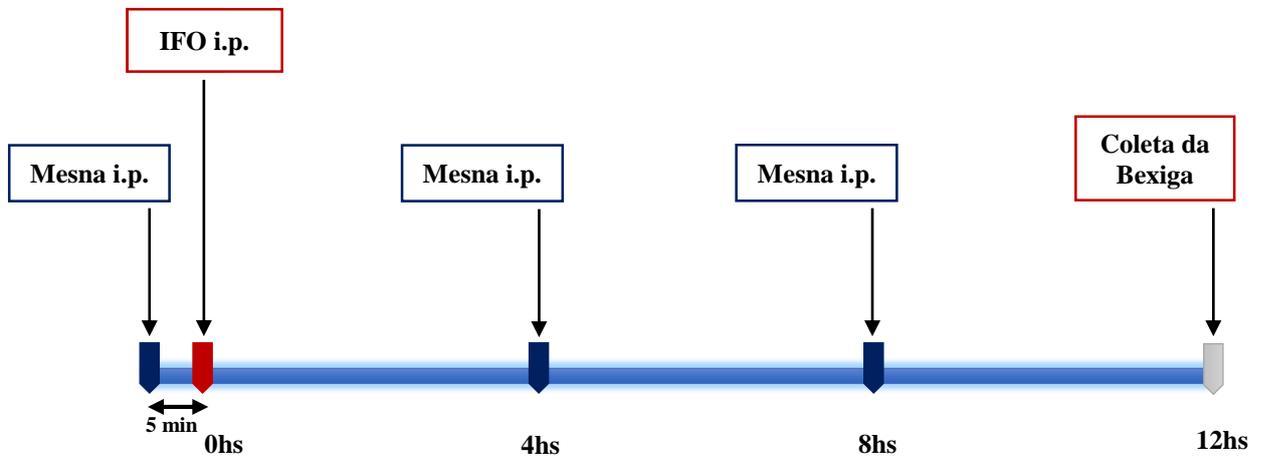
Fonte: Autor

Figura 9. Desenho experimental, grupo cistite (IFO 400mg/Kg)



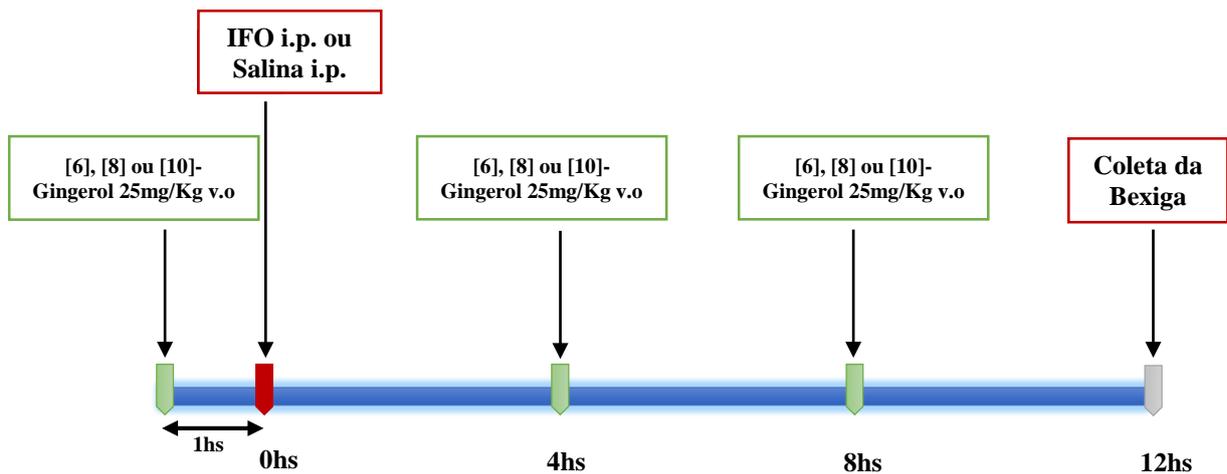
Fonte: Autor

Figura 10. Desenho experimental, grupo Mesna (80mg/Kg i.p.)



Fonte: Autor

Figura 11. Desenho experimental, grupo Cistite com tratamento com os compostos gingeróis (IFO+6G; IFO+8G e IFO+10G), grupo Gingeróis Controle



Fonte: Autor

4.5 Parâmetros avaliados na cistite hemorrágica

4.5.1 Avaliação do Peso Úmido Vesical (PUV)

Após dissecadas e esvaziadas de seu conteúdo urinário, as bexigas foram pesadas e o PUV foi expresso em mg/20 gramas 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.

4.5.2 Análise macroscópica

As bexigas foram dessecadas e esvaziadas de seu conteúdo urinário e posteriormente examinadas quanto ao edema e hemorragia de acordo com os critérios de Gray et al. (1986) descritos na **Tabela 1** a seguir:

Tabela 1. Escores macroscópicos de Edema e Hemorragia de acordo com Gray et al. (1986)

PARÂMETROS			
EDEMA		HEMORRAGIA	
Severo (3+)	Edema interno e externo	(3+)	Coágulo intra-vesical
Moderado (2+)	Edema interno (mucosa)	(2+)	Hematomas na mucosa
Leve (1+)	Intermediário	(1+)	Telangiectasia (dilatação dos vasos da bexiga)
Normal (0)	Nenhum	(0)	Normal

4.5.3 Análise histopatológica

Para realização do estudo histopatológico, as amostras de bexigas, após dissecadas e esvaziadas de seu conteúdo urinário, pesadas e analisadas macroscopicamente, foram fixadas em uma solução de formol 10% tamponado por 18-20 horas. Percorrido esse período, foram transferidas para uma solução de álcool 70%, onde permaneceu até a realização dos procedimentos histológicos.

Depois da devida fixação do tecido, o material foi processado para realização do exame histológico em processador automático de tecidos (histotécnico). Em seguida foram desidratados em concentrações crescentes de 70 a 100% de etanol. Após o processamento foi realizado a inclusão do material em parafina, utilizando-se o banho histológico. Os blocos de parafina foram cortados em 5µm de espessura com auxílio de um micrótomo de impacto e colocado em lâmina histológica para coloração pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e analisados à microscopia óptica. As alterações histológicas foram realizadas pelo Profº. Dr. Mario Rogério Lima Mota de acordo com critérios pré-estabelecidos por Gray et al. (1986):

- **(0) Histologia Normal:** caracterizada por epitélio urotelial normal, ausência de infiltrado inflamatório e ausência de úlceras;
- **(1+) Alterações Discretas:** caracterizadas por redução no número de células epiteliais uroteliais em decorrência de descamação, diminuição das dobras habituais da mucosa em virtude do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras;
- **(2+) Alterações Intensas:** caracterizadas por exulceração da mucosa, múltiplas úlceras, edema acentuado, infiltrado inflamatório, depósito de fibrina e hemorragia.
- **(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 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO foi avaliada como um marcador bioquímico da infiltração neutrofílica. Ela é uma enzima presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e outras células da origem mielóide. Amostras de bexigas foram homogeneizadas com brometo de hexadecitrimetilamônio a 0,5% (HTAB; pH 6,0) em tampão de fosfato de potássio para preparar um homogenato a 10%. O homogeneizado foi centrifugado a 5000 rpm por 7 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a análise. A atividade da MPO foi aferida utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1% como substrato para essa enzima. Durante o ensaio, a medida que o H₂O₂ fora degradado, ocorreu a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidina em um composto de cor marrom (BRADLEY et al., 1982). Os resultados foram expressos em unidades de MPO por miligramas (UMPO/mg de tecido).

4.7 Análise do dano oxidativo

4.7.1 Determinação da concentração de Malondialdeído (MDA)

Para confirmar o dano oxidativo direto no tecido, o grau de lipoperoxidação foi mesurado por meio da determinação dos níveis de MDA, através das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Ohkawa et al. (1979). Foi realizado homogenato do tecido a 10% (100mg/1mL) em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15 M. Em seguida retirou-se 250 µL do homogenato e adicionou-se 1,5 mL de ácido fosfórico 1% + 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6% e levado ao banho fervente (95-100 °C) por 45 minutos. A mistura foi resfriada em banho de gelo e em seguida adicionou-se 2 mL de n-butanol. O tubo foi agitado no vórtex por 1 min. e centrifugado a 1200rpm/15min. Após a centrifugação retirou-se a fase orgânica para realização da leitura em espectrofotômetro (535 nm). Os resultados de MDA foram expressos em nmol/mg de tecido.

4.8 Avaliação da atividade antioxidante

4.8.1 Avaliação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH)

O princípio do teste consiste na utilização do DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)), usado para analisar a atividade da glutathiona reduzida (GSH) em amostra de tecidos. O DTNB reage com GSH formando o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico (TNB), de cor amarela, que pode ser detectado por espectrofotometria (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

Para avaliação das alterações no conteúdo tecidual de glutathiona reduzida foi feito homogenato a 10% em solução gelada de EDTA 0,02 M. Utilizou-se 40 µL de cada amostra (homogenato a 10% em tampão fosfato) e adicionou-se 160 µL de água destilada e 40 µL de TCA (ácido tricloro acético) 50%. O material foi centrifugado a 3000 g por 15 min e retirado 200 µL do sobrenadante, ao qual adicionou-se 400 µL de tampão TRIS 0,4M (pH=8,9) e 10 µL de DTNB 0,01M. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de GSH padrão (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µg). Todo o ensaio foi avaliado na absorvância de 412 nm e os resultados foram expressos em µg/mg de tecido.

4.9 Avaliação dos marcadores inflamatório por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

4.9.1 Extração do RNA total

As amostras foram congeladas a -80°C até o momento da extração. Realizou-se um homogenato, onde cada tecido foi posto em contato com uma esfera de metal e congelada em -80 por 3 minutos. A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo do *PureLink[®] RNA Mini Kit (Life Technologies)*. Após a finalização do processo de extração, $1\mu\text{L}$ de RNA total de cada amostra foi dosado pelo Nanodrop[®] (*Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos*) com a finalidade de verificar qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar (cDNA).

4.9.2 Síntese de cDNA

O RNA total isolado armazenado a -80°C seguiu para a síntese de cDNA através do *iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad[®], Califórnia, EUA)*, de acordo com instruções do fabricante. O protocolo da reação incluiu $1,0\mu\text{L}$ da enzima transcriptase reversa, $4\mu\text{L}$ do tampão *5x iScript Reaction Mix* (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), $200\text{ ng}/\mu\text{L}$ de RNA extraído das amostras e completou-se o volume total até $20\mu\text{L}$ com água livre de nuclease. O protocolo padrão no termociclador iCycler[®] (*Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos*) foi 25°C por 5 min, 42°C por 30 min e 85°C por 5 min. O cDNA sintetizado foi armazenado em freezer -20°C até a amplificação pela Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR).

4.9.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A transcrição relativa dos genes COX-2, TNF α , IL-1 β e IL-6 foi realizada através do equipamento CFX96 Touch[®] (*Bio-Rad[®], Califórnia, EUA*). Como mostra a **Tabela 2**, a sequência dos iniciadores de DNA (primers) dos genes investigados foi obtida no sítio eletrônico do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, no qual o gene de referência utilizado foi o Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT-1).

Tabela 2. Sequências de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados

Gene	Sequência dos iniciadores	N° NBCI	Condições de anelamento
<i>COX2</i>	S- GGGTGTCCCTTCACTTCTTTCA AS- TGGGAGGCACTTGCATTGA	NC_010339.1	
<i>TNFα</i>	S- CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA AS- TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	NC_000083.6	
<i>IL-1β</i>	S- CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG AS- GATCCACACTCTCCAGCTGCA	NC_000068.7	20'' - 61°C
<i>IL-6</i>	S- GAGGATACCACTCCCAACAGACC AS- AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	NC_000071.6	
<i>HPRT-1</i>	S- GGCCAGACTTTGTTGGATTT AS- CAGATTCAACTTGCGCTCAT	NC_000086.7	20'' - 60°C

Fonte: Autor.

Nota: S – iniciador senso (5'-3') e AS – iniciador anti-senso (3'-5'). Gene de referência: HPRT-1.

Para a reação foram utilizados 10 μ L de Syber Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems®, Inglaterra), 2,0 μ L de cada iniciador (0,2 μ M) e 1,0 μ L de cDNA das amostras, completando com água livre de nuclease até um volume final de 20 μ L. As condições de anelamento para cada gene investigado estão descritos na **Tabela 2**. Todos os ciclos começaram com a etapa de desnaturação (20 segundos a 95°C) e finalizaram com etapa de extensão (45 segundos por 1 minuto a 72°C). Os dados foram obtidos com o *software* do sistema CFX96 (BioRad®, Califórnia, EUA) e foram baseados nos valores do ciclo de limiar, em que a fluorescência observada é de 10 vezes maior do que a fluorescência basal para cada ensaio de qPCR. Todas as amplificações foram avaliadas quanto à curva de fusão, realizada para assegurar a especificidade da amplificação e detectar a não formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq ou Ct) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft®, Estados Unidos) e os níveis relativos de mRNA foram calculados de acordo com a metodologia $2^{-\Delta\Delta CT}$, qual como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

4.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPadPrism[®], versão 5.0. Realizou-se o teste de comparações múltiplas por meio de análise de variância (ANOVA) seguido do teste Bonferroni's (dados paramétricos) ou aplicação do teste *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste Dunn's (dados não paramétricos). E os dados de qPCR foram analisados pelo teste de *Mann-Whitney*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (E.P.M) ou valor mediano, máximo e mínimo. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

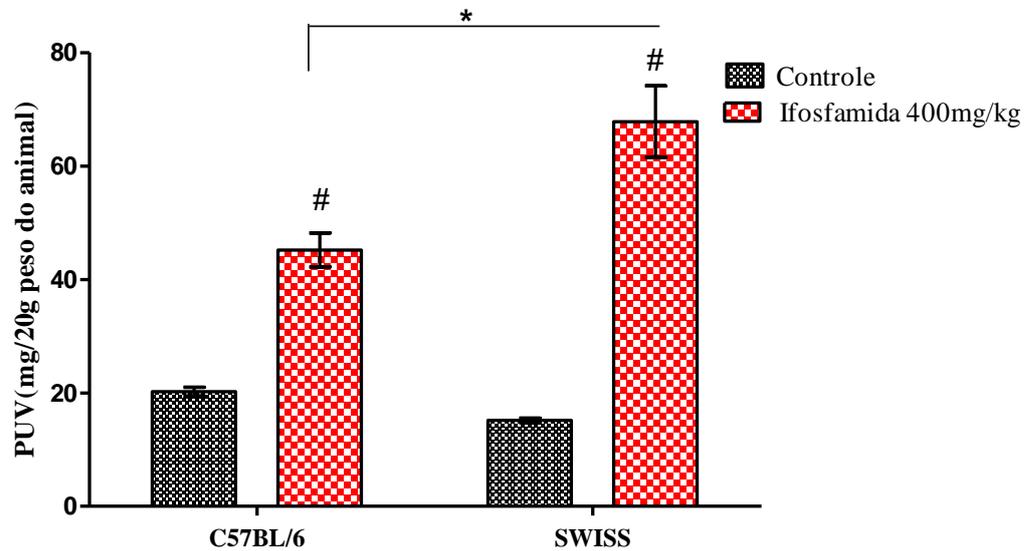
5.1 Padronização do modelo experimental de cistite hemorrágica por ifosfamida nas linhagens de camundongos fêmeas *Swiss* e *C57BL/6*

Primeiramente tentou-se padronizar o modelo experimental de cistite hemorrágica (CH) por ifosfamida (IFO) na dose 400mg/Kg foi padronizado nas linhagens de camundongos fêmeas *Swiss* e *C57BL/6*. Os resultados a seguir apresentam os dados encontrados no protocolo de padronização do modelo de CH por IFO entre as linhagens de camundongos fêmeas (item 4.4.1).

5.1.1 Avaliação do peso úmido vesical (PUV) e dos escores macroscópico de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida entre as linhagens de camundongos fêmeas *Swiss* e *C57BL/6*

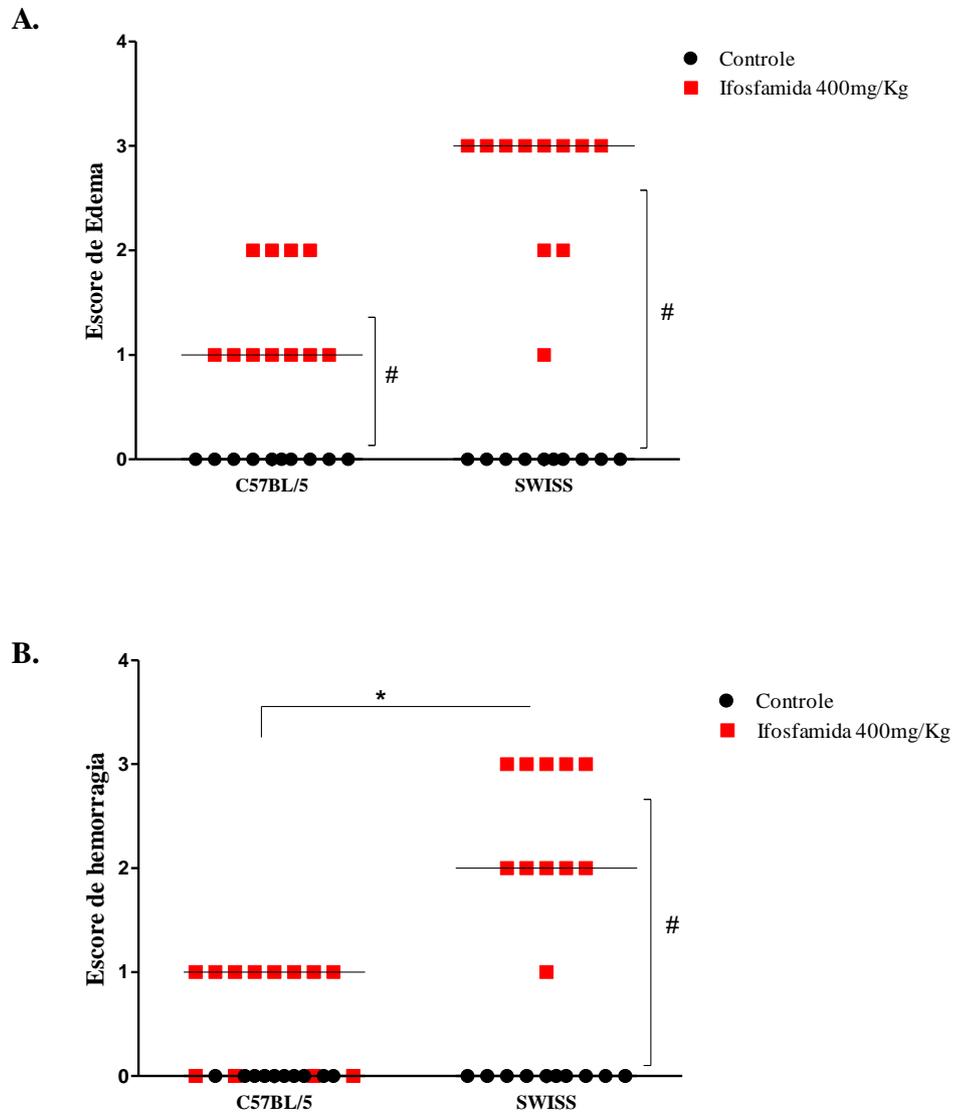
A administração intraperitoneal de ifosfamida (400mg/Kg, i.p.) aumentou o PUV em ambas linhagens: ($67,83 \pm 6,305$ mg/20g de peso animal) para *Swiss* e ($45,20 \pm 2,983$ mg/20g de peso animal) para *C57BL/6*, quando comparados aos seus respectivos grupos controles ($15,17 \pm 0,3926$ mg/20g de peso animal) e ($20,23 \pm 0,7723$ mg/20g de peso animal), apresentando assim um aumento de 447,1% e 223,4% para as espécies *Swiss* e *C57BL/6*, respectivamente. Podemos observar que o aumento acentuado foi demonstrado na linhagem *Swiss* quando comparado com a linhagem *C57BL/6*, conforme mostrado na **Figura 12**. A CH foi caracterizada macroscopicamente pela presença marcante de edema com escore 3 (1-3) e por hemorragia difusa com hematomas na mucosa e coágulos intravesicais com escore 2 (1-3) na linhagem *Swiss*. Já para linhagem *C57BL/6* foram observados escore 1 (1-2) para edema e escore 1 (0-1) para hemorragia, constatando assim, que os escores macroscópicos de edema e hemorragia foram mais intensos na linhagem *Swiss*, como apresentado na **Figura 13**. Os grupos controle de ambas as linhagens apresentaram escore 0 (0-0) para edema e hemorragia. De acordo com os resultados apresentados de PUV e os escores macroscópicos de edema e hemorragia, concluímos que os camundongos da linhagem *Swiss* seriam uma melhor escolha para a realização do modelo experimental em questão.

Figura 12. Avaliação do peso úmido vesical (PUV) entre as linhagens de camundongos fêmeas *Swiss* e *C57BL/6* na cistite hemorrágica por ifosfamida



Os valores representam o aumento do peso úmido vesical (PUV) entre as linhagens *C57BL/6* e *Swiss* fêmeas após a indução da cistite hemorrágica por IFO. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=6-7). #p < 0,05 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), * P < 0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por Bonferroni's.

Figura 13. Avaliação dos escores macroscópicos de edema e hemorragia entre as linhagens de camundongos fêmeas *Swiss* e *C57BL/6* na cistite hemorrágica por ifosfamida



Os valores representam a mediana (mín-máx) dos escores macroscópicos de edema e hemorragia entre as cepas *C57BL/6* e *Swiss* fêmeas após a indução da cistite hemorrágica por IFO (n= 10-11). A) Escore de edema, B) Escore de hemorragia. # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), * $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste de Kruskal Wallis seguido por pós-teste de Dunn.

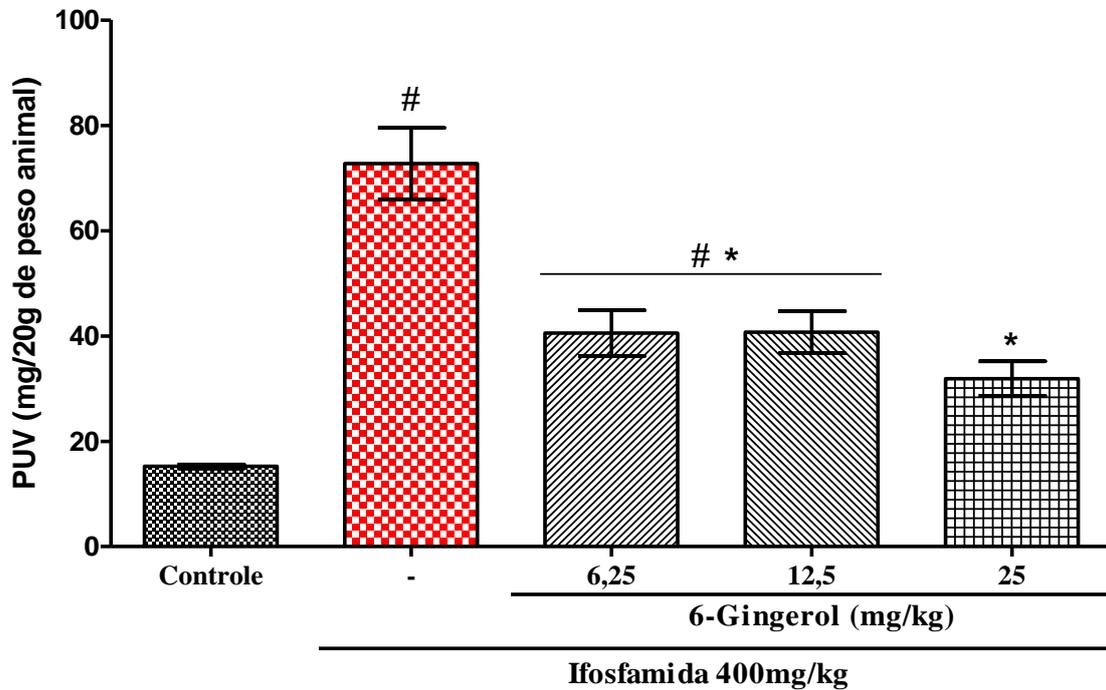
5.2 Determinação da dose versus o efeito do tratamento com o composto [6]-gingerol na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

No protocolo piloto determinou-se qual dose a ser utilizada nos demais protocolos experimentais. Para isso os animais receberam indução de cistite hemorrágica por IFO (400mg/Kg i.p.). O composto [6]-gingerol foi administrado nas doses 6,25, 12,5 e 25mg/Kg por via oral (v.o.) em grupos distintos (RODRIGUES et al., 2013), conforme o esquema terapêutico descrito anteriormente. Os animais foram pesados, e as bexigas foram avaliadas quanto ao peso úmido vesical, escores macroscópicos de edema e hemorragia, segundo os critérios de Gray et al. (1986), e analisado a atividade de MPO.

A **Figura 14** demonstra os efeitos das diferentes doses de tratamentos com [6]-gingerol por via oral no aumento do PUV na CH induzida por IFO (400mg/Kg). A IFO ($72,71 \pm 6,829$ mg/20g de peso animal) induziu significativamente ($P < 0,05$) o aumento do PUV dos animais em comparação ao grupo controle ($15,22 \pm 0,3762$ mg/20g de peso animal). O tratamento com [6]-gingerol diminuiu o aumento nas três doses testadas: ($40,54 \pm 4,321$ mg/20g de peso animal), ($40,70 \pm 3,997$ mg/20g de peso animal), ($31,89 \pm 3,280$ mg/20g de peso animal), respectivamente para as doses 6,25, 12,5 e 25mg/Kg, com uma maior redução para a dose 25mg/Kg.

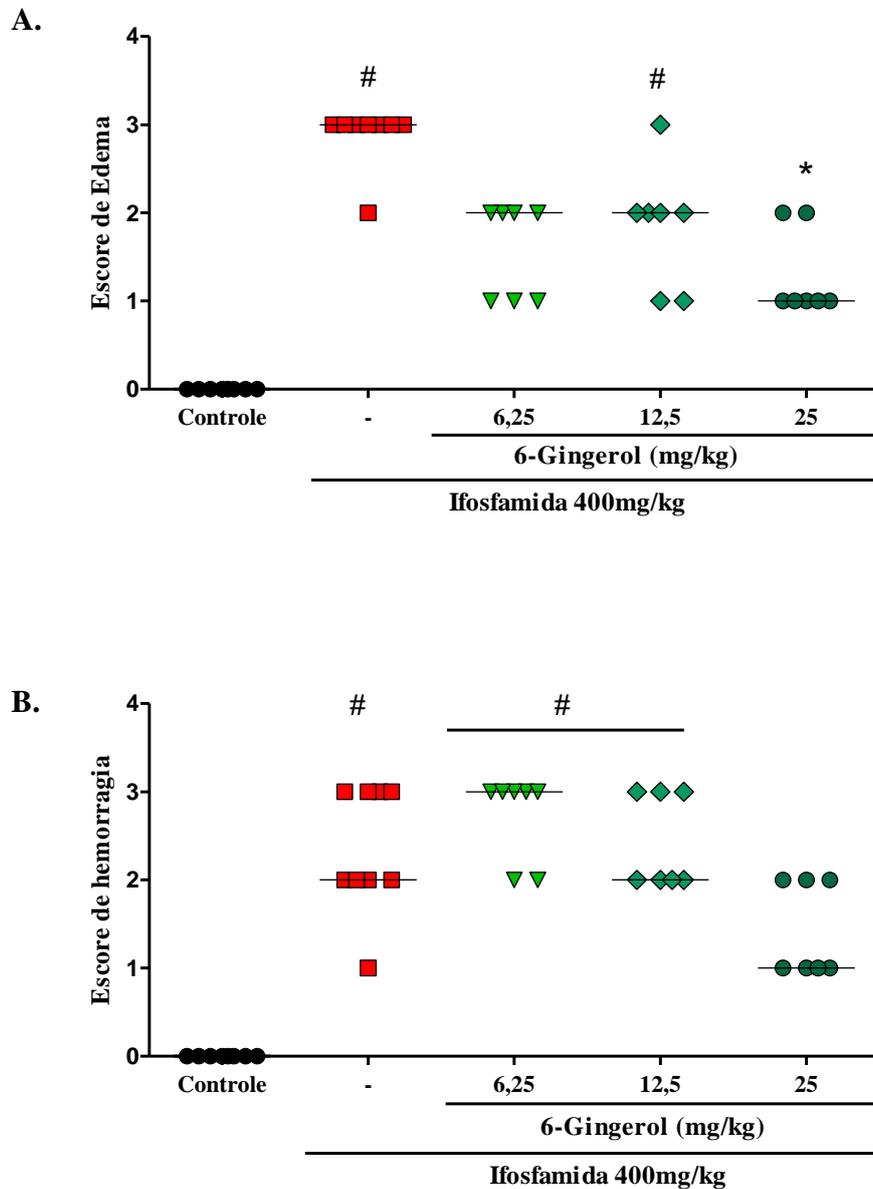
Ao avaliar os escores macroscópicos de edema e hemorragia, observamos que a IFO aumentou significativamente ($P < 0,05$) tais parâmetros, escore 3(2-3) para edema e escore 2,5(2-3) para hemorragia, caracterizado por hemorragia difusa com hematomas na mucosa e coágulos intravesicais, quando comparado ao grupo Controle, escore 0 (0-0). O tratamento com o [6]-gingerol na dose 25mg/Kg reduziu significativamente ($P < 0,05$) o escore de edema 1 (1-2) e reduziu o escore hemorragia de 1(1-2) conforme descrito na **Figura 15**. Por outro lado, as doses de 6,25 e 12,5mg/Kg não causaram redução significativa.

Figura 14. Efeito do tratamento de diferentes doses do composto [6]-gingerol no peso úmido vesical (PUV) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida



Os valores representam o aumento do peso úmido vesical (PUV) em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratado com [6]-gingerol v.o. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=6-7). #P< 0,05 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), * P<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

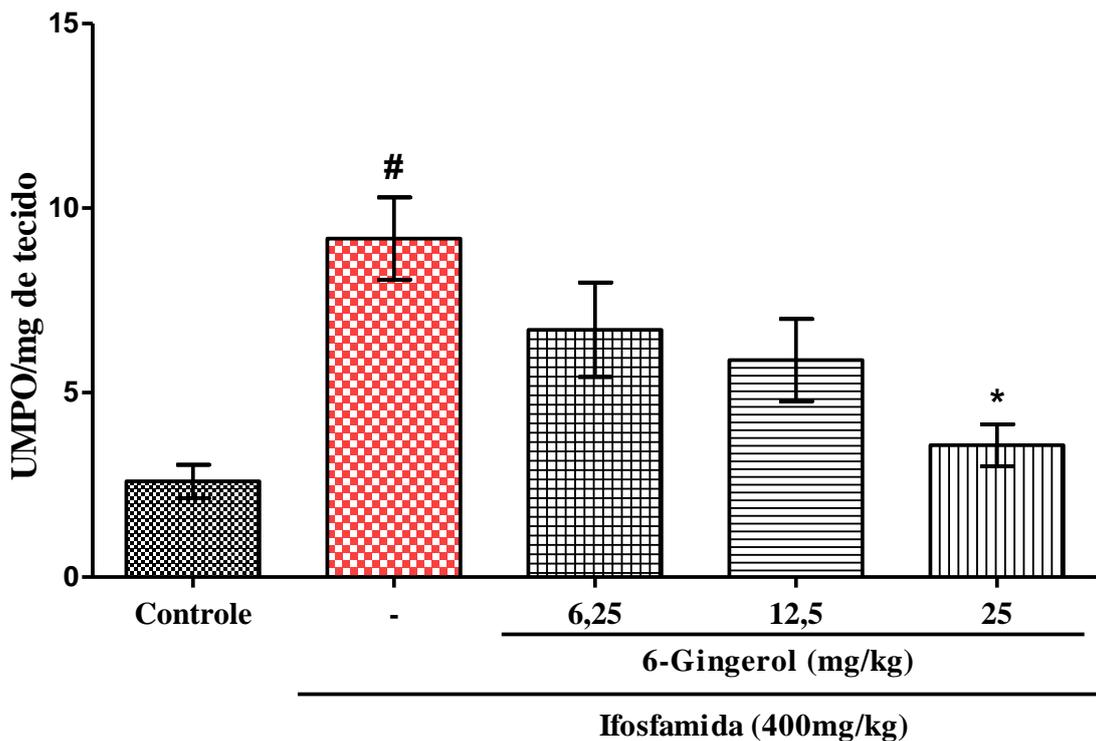
Figura 15. Efeito do tratamento de diferentes doses do composto [6]-gingerol na avaliação dos escores macroscópicos de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida



Os valores representam a mediana (mín-máx) dos escores macroscópicos de edema e hemorragia em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratado com [6]-gingerol v.o. (n=7-8). A) Escore de edema, B) Escore de hemorragia. # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), * $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste de Kruskal Wallis seguido por pós-teste de Dunn.

Na **Figura 16** avaliamos os efeitos das diferentes doses de tratamentos com [6]-gingerol por via oral perante a atividade de MPO na CH induzida por IFO (400mg/Kg). Pode-se observar que a IFO ($9,175 \pm 1,115$ UMPO/mg de tecido) induziu um aumento significativo ($P < 0,05$) na atividade de MPO quando comparado ao grupo controle ($2,597 \pm 0,4522$ UMPO/mg de tecido). O tratamento com [6]-gingerol na dose 25mg/Kg ($3,573 \pm 0,5661$ UMPO/mg de tecido) reverteu este aumento significativamente ($P < 0,05$). Porém, não foram observados uma redução significativa nas doses 6,25mg/Kg ($6,706 \pm 1,278$ UMPO/mg de tecido) e 12,5mg/Kg ($5,881 \pm 1,114$ UMPO/mg de tecido).

Figura 16. Efeito do tratamento de diferentes doses do composto [6]-gingerol na atividade de mieloperoxidase (MPO) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida



Os valores representam a atividade de mieloperoxidase (MPO) em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratado com [6]-gingerol v.o. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM ($n=6-7$). # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), * $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste 1way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

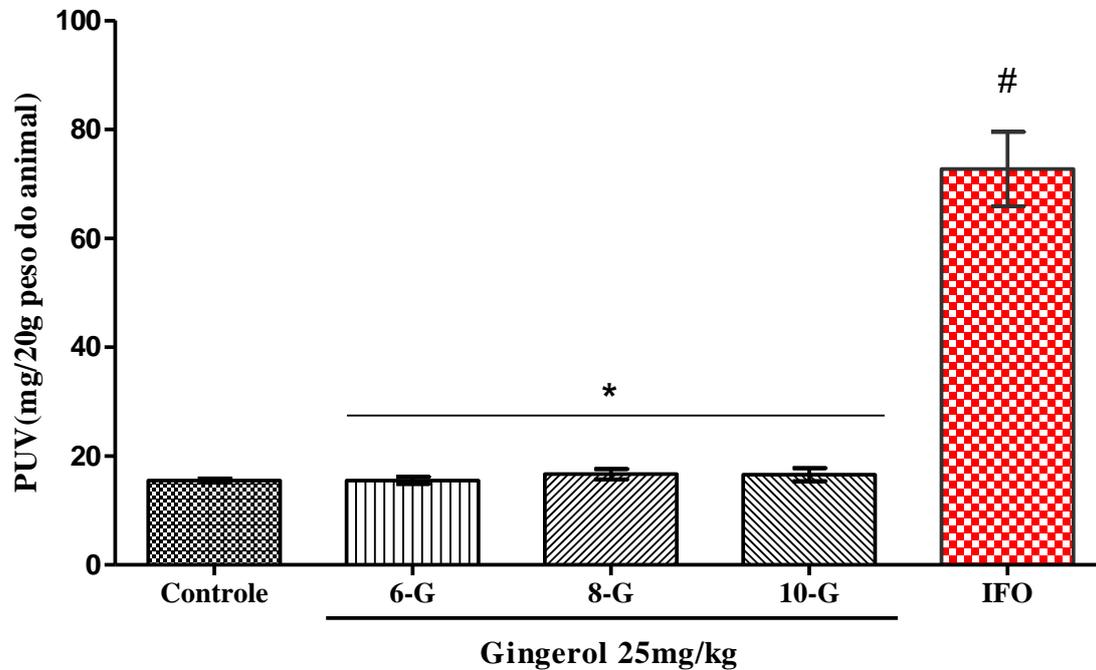
Nos resultados apresentados no protocolo piloto, a dose 25mg/Kg foi escolhida para ser utilizada como padrão para os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol nos protocolos experimentais que se seguem.

5.3 Avaliação do peso úmido vesical (PUV) e dos escores macroscópicos de edema e hemorragia após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol sem indução de cistite hemorrágica por ifosfamida

Para realização desse protocolo, os animais receberam administração de salina (NaCl 0,9%) i.p. sem indução de CH por IFO e foram tratados com os compostos [6]-, [8]- ou [10]-gingerol na dose 25mg/Kg (v.o.) em grupos distintos conforme o esquema terapêutico descrito no item 4.2.1 e comparados com os demais grupos (Controle e IFO). Podemos observar que a IFO ($72,71 \pm 6,829$ mg/20g de peso animal) induziu um aumento de PUV dos animais comparado ao grupo controle ($15,49 \pm 0,4012$ mg/20g de peso animal) e o tratamento com [6]-, [8]- ou [10]-gingerol ($15,51 \pm 0,6485$ mg/20g de peso animal), ($16,68 \pm 0,9415$ mg/20g de peso animal), ($16,57 \pm 1,195$ mg/20g de peso animal), respectivamente, não alterou o PUV nos animais que não receberam indução por IFO (**FIGURA 17**), não apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle.

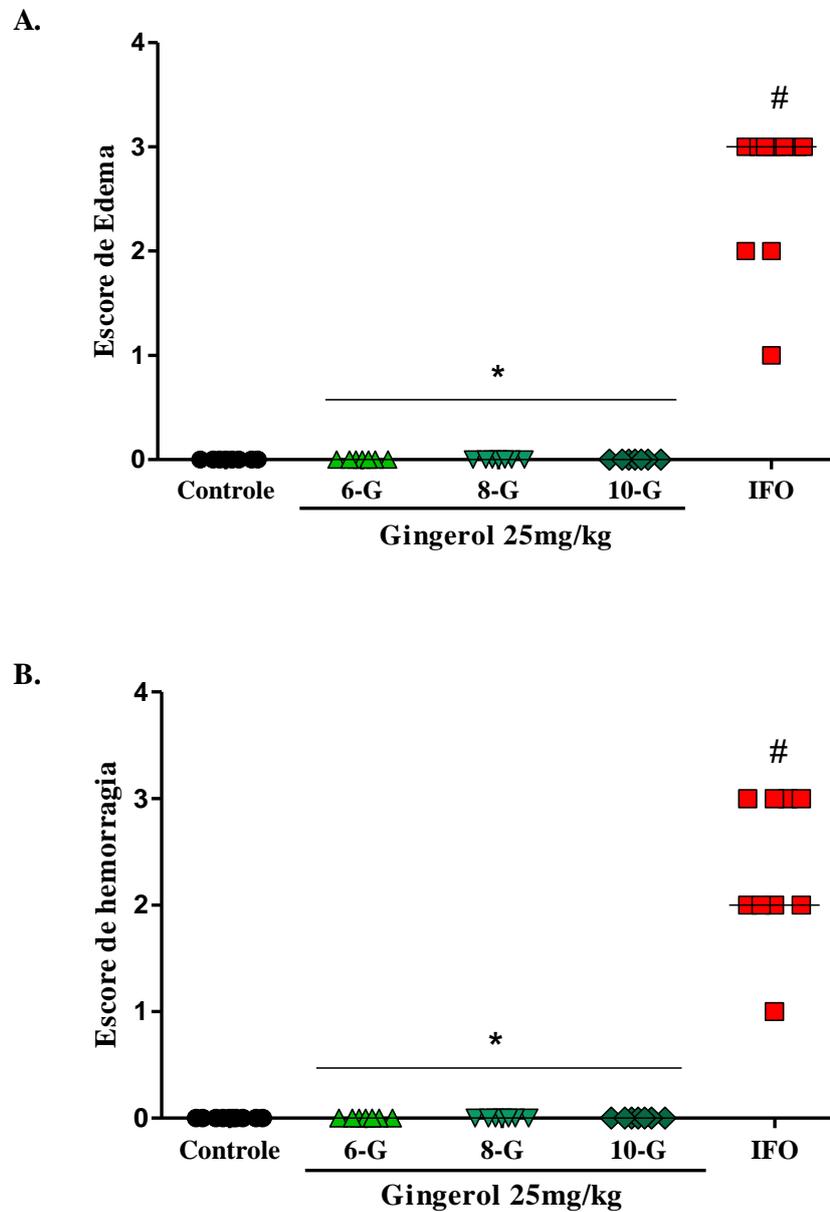
Podemos observar na **Figura 18** que os tratamentos com os compostos [6]-, [8]- ou [10]-gingerol também não alteraram os parâmetros macroscópicos de edema e hemorragia, ambos apresentaram escore 0 (0-0) nos animais sem indução de CH por IFO. Resultado diferente foi observado no grupo com indução por IFO, que apresentou escore 2,5(1-3) para edema e escore 2 (1-3) para hemorragia.

Figura 17. - Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol no peso úmido vesical (PUV) sem indução de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida



Os valores representam o aumento do peso úmido vesical (PUV) em animais tratados com [6]-, [8]- e [10]-gingerol 25mg/g (6-G, 8-G, 10-G) por via oral v.o., sem indução de cistite hemorrágica por IFO. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=6-7). #P < 0,05 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), * P<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

Figura 18. Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na avaliação dos escores macroscópicos de edema e hemorragia sem indução de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida



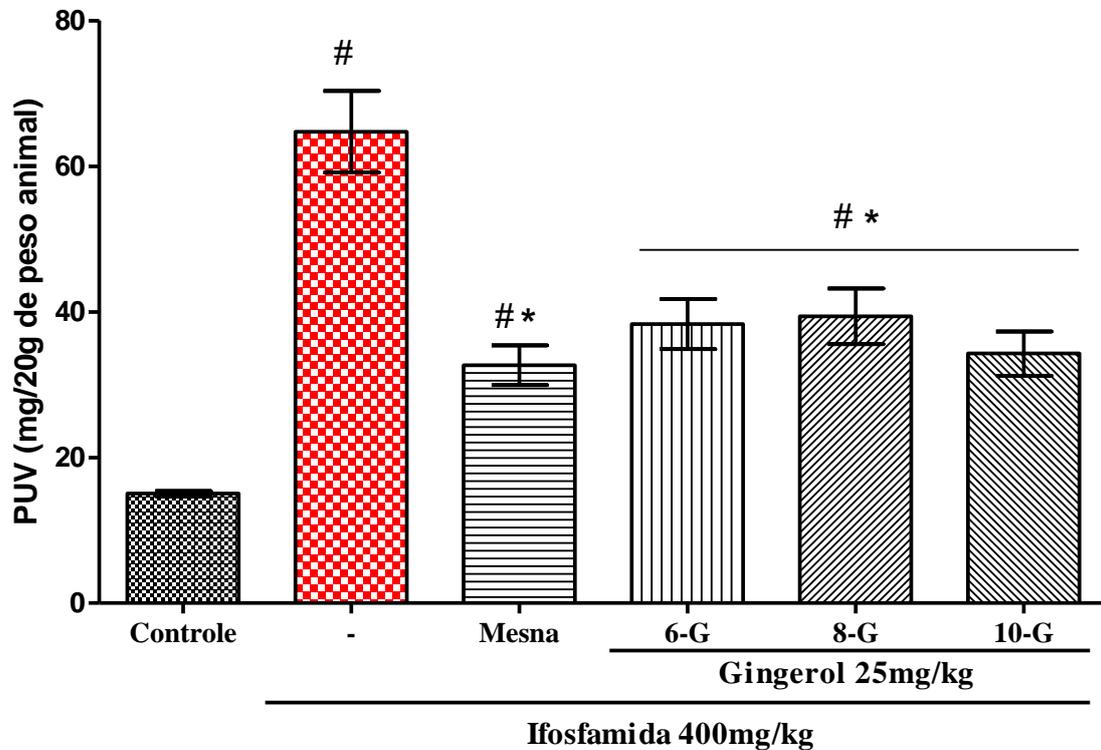
Os valores representam a mediana (mín-máx) dos escores macroscópicos de edema e hemorragia em animais tratados com com [6]-, [8]- e [10]-gingerol 25mg/g (6-G, 8-G, 10-G) por via oral v.o., sem indução de cistite hemorrágica por IFO 400mg/Kg. (n=6-7). A) Escore de edema, B) Escore de hemorragia. # P<0,05 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), *P <0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste de Kruskal Wallis seguido por pós-teste de Dunn.

5.4 Avaliação do peso úmido vesical (PUV) e dos escores macroscópico de edema e hemorragia após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida

Podemos observar que os tratamentos com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na dose 25mg/Kg (v.o.) foram capazes de reverter significativamente ($P < 0,05$) o aumento do PUV nos animais que foram submetidos a indução de CH por IFO e tratados com os gingeróis: IFO+6G ($38,32 \pm 3,450$ mg/20g de peso animal), IFO+8G ($39,39 \pm 3,817$ mg/20g de peso animal) e IFO+10G ($34,27 \pm 3,018$ mg/20g de peso animal) quando comparados ao grupo IFO ($64,72 \pm 5,613$ mg/20g de peso animal), e apresentando uma similaridade, sem diferença significativa quando comparados ao grupo Mesna ($32,68 \pm 2,706$ mg/20g de peso animal), conforme representado na **Figura 19**.

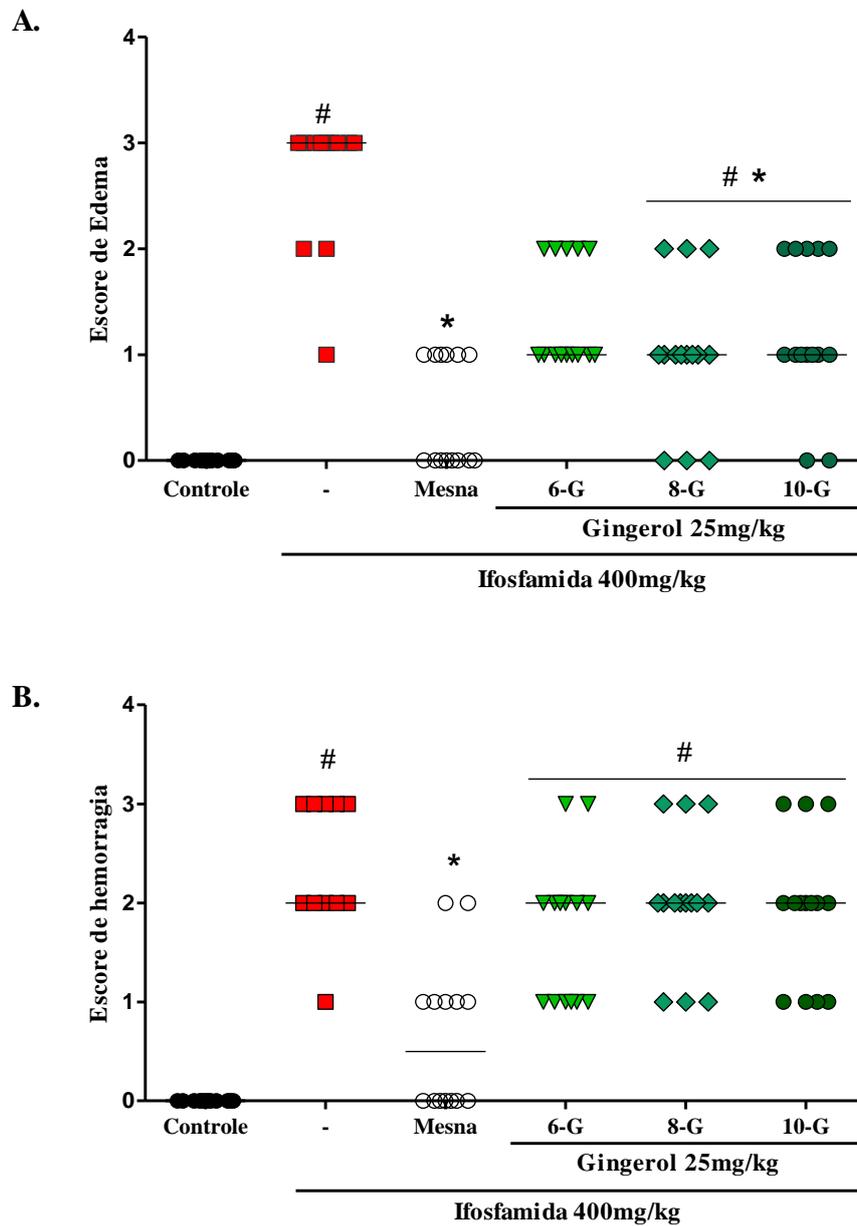
Ao avaliarmos os escores macroscópicos de edema e hemorragia, a IFO foi capaz de aumentar significativamente ($P < 0,05$) tais parâmetros, escore 3(1-3) para edema e escore 2(1-3) para hemorragia quando comparado ao grupo controle, escore 0 (0-0). Os tratamentos com o [8]- e [10]-gingerol na dose 25mg/Kg reduziram significativamente ($P < 0,05$) o edema. O composto [6]-gingerol demonstrou uma redução nesse parâmetro de forma não significativa, quando comparado ao grupo IFO. Não foram observados redução significativa no parâmetro macroscópico de hemorragia em ambos os tratamentos (**FIGURA 20**).

Figura 19. Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol no peso úmido vesical (PUV) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida



Os valores representam o aumento do peso úmido vesical (PUV) em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratado com [6]-, [8]- e [10]-gingerol v.o. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM (n=6-7). #P< 0,05 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), * P<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

Figura 20. Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na avaliação dos escores macroscópicos de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida



Os valores representam a mediana (mín-máx) dos escores macroscópicos de edema e hemorragia em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratados com [6]-, [8]- e [10]-gingerol v.o (n=12-14). A) Escore de edema, B) Escore de hemorragia. # P<0,05 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), * P<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO, § P<0,05 em relação ao grupo Mesna. A análise foi realizada pelo teste de Kruskal Wallis seguido por pós-teste de Dunn.

5.5 Análise histopatológica de bexigas após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida

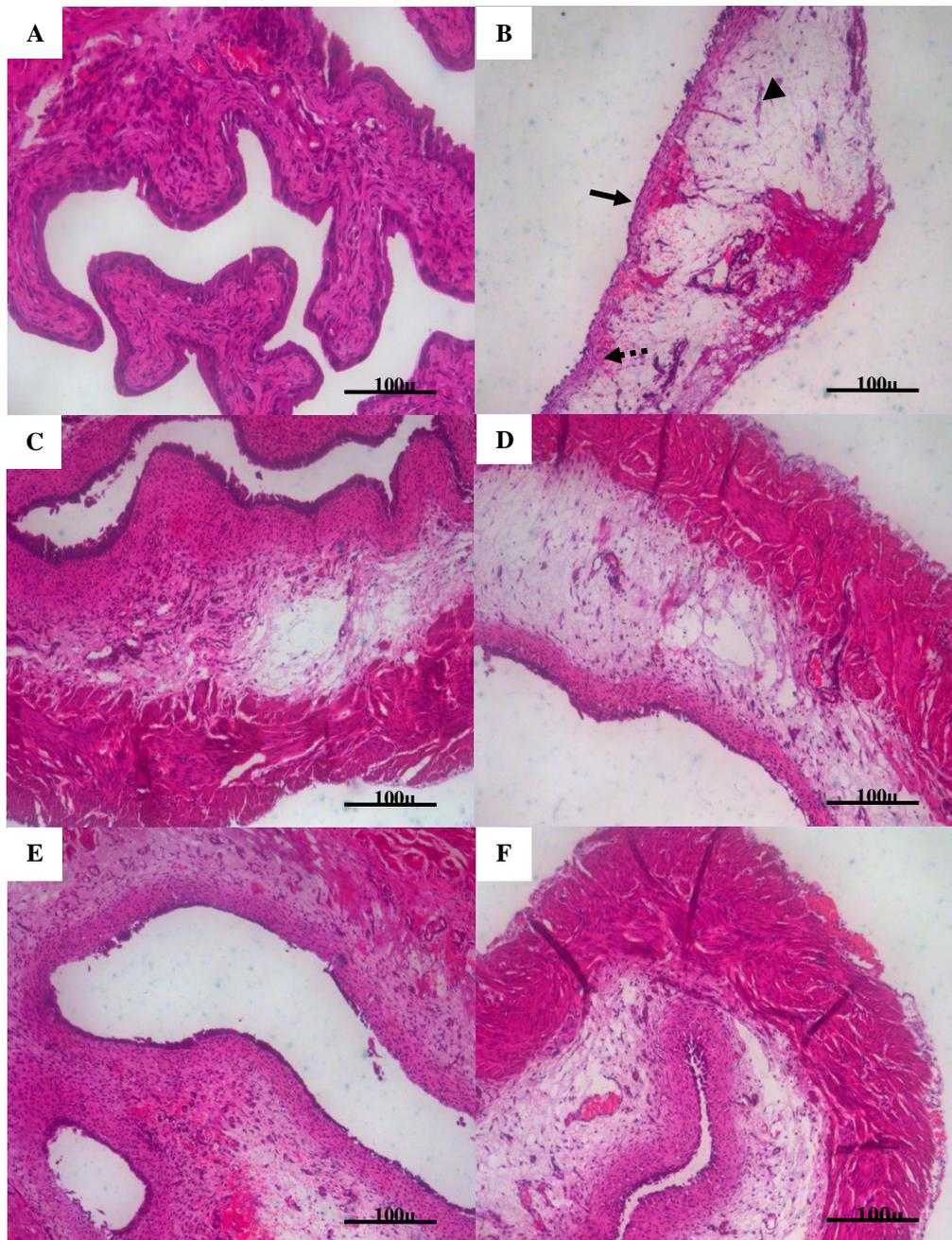
Ao realizar a análise histopatológica das bexigas, conforme os critérios microscópicos descritos por Gray e colaboradores (1986), evidenciou-se presença intensa de edema, erosão de mucosa com ulceração, deposição de fibrina, coágulos, hemorragia e infiltrado neutrofílico nos animais tratados com IFO, com escore 3 (3-3), como demonstrado na **Figura 21B**. Os animais tratados com os compostos gingeróis apresentaram uma diminuição nos parâmetros microscópicos, semelhante ao grupo Mesna (**FIGURA 21C**), conforme medianas apresentadas na **Tabela 3**, com redução na descamação do urotélio e edema, como demonstrado na **Figura 21**. O grupo tratado com o [6]-gingerol não apresentou redução nos parâmetros analisados (**FIGURA 21D**).

Tabela 3. Análise microscópicas dos grupos experimentais segundo critério de Gray et al. (1986)

<i>GRUPO</i>	ESCORES MICROSCÓPICOS
<i>Controle</i>	0(0-1)
<i>IFO</i>	3(3-3) #
<i>Mesna</i>	2(1-2)
<i>IFO+6G</i>	3(3-3)
<i>IFO+8G</i>	2(2-3)
<i>IFO+10G</i>	2(2-3)

Os valores representam a mediana (mín-máx) dos escores macroscópicos de edema e hemorragia nos tecidos de animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratados com [6]-, [8]- e [10]-gingerol v.o (n=7).

Figura 21. Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol nas alterações histológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida



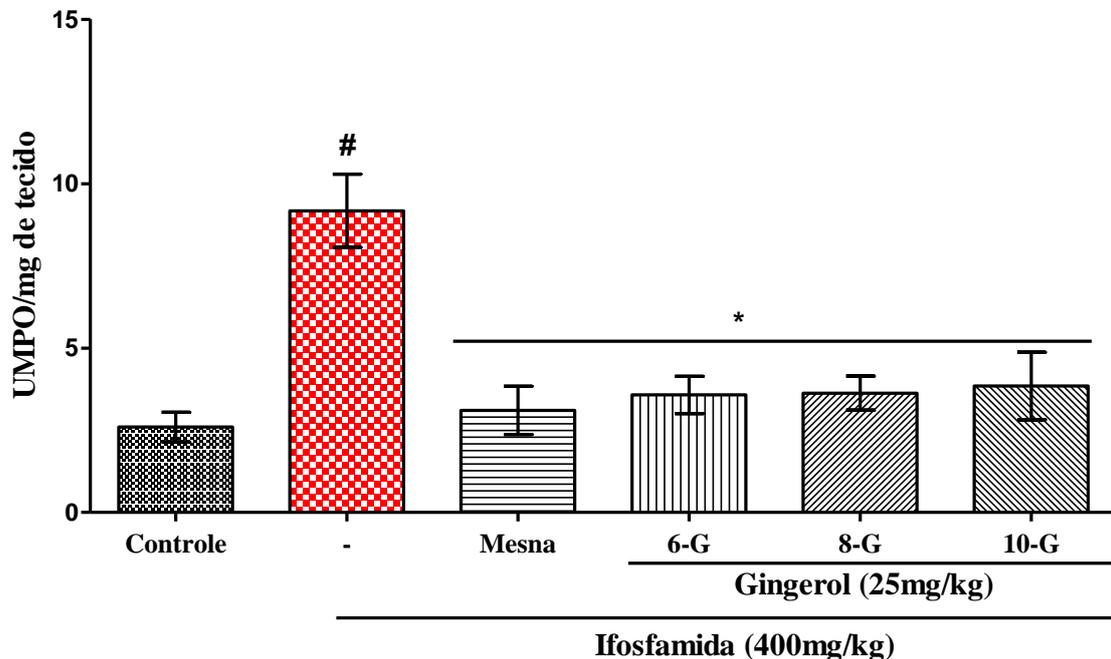
Nota: A (Grupo Controle), B (Grupo IFO), C (Grupo Mesna), D (Grupo IFO+6G), E (Grupo IFO+8G), F (Grupo IFO+10G). → Erosão de mucosa com ulceração, ►Edema, - - ► Hemorragia.

Fotomicrografia de bexigas processados pela técnica de coloração de hematoxilina-eosina (HE) dos grupos experimentais. As figuras expressam a morfologia dos tecidos representativos dos seguintes grupos: **A (Controle:** Salina i.p. / Tween80 2% v.o.), **B (IFO:** Ifosfamida 400mg/Kg i.p. / Tween80 2% v.o.), **C (IFO+Mesna:** Ifosfamida 400mg/Kg i.p. / Mesna 80mg/Kg i.p.), **D (IFO+6G:** Ifosfamida 400mg/Kg i.p. / [6]-gingerol 25mg/Kg v.o.), **E (IFO+8G:** Ifosfamida 400mg/Kg i.p. / [8]-gingerol 25mg/Kg v.o.), **F (IFO+10G:** Ifosfamida 400mg/Kg i.p. / [10]-gingerol 25mg/Kg v.o.). A análise foi realizada pelo teste de Kruskal Wallis seguido por pós-teste de Dunn).

5.6 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) após tratamento com os compostos [6]-, [8]- ou [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida

A administração de IFO 400mg/Kg induziu um aumento significativo ($P > 0,05$) na atividade de MPO ($9,175 \pm 1,115$ UMPO/mg de tecido) quando comparados ao grupo controle ($2,597 \pm 0,4522$ UMPO/mg de tecido). O tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol reduziram significativamente ($P < 0,05$) a atividade de MPO quando comparados ao grupo IFO: IFO+6G ($3,573 \pm 0,5661$ UMPO/mg de tecido), IFO+8G ($3,628 \pm 0,5166$ UMPO/mg de tecido) e IFO+10G ($3,848 \pm 1,028$ UMPO/mg de tecido). Podemos observar que não houve diferença significativa quando comparamos os grupos tratados com os compostos gingeróis e o grupo Mesna ($3,106 \pm 0,7337$ UMPO/mg de tecido) (**FIGURA 22**).

Figura 22. Efeito do tratamento com os compostos [6], [8] e [10]-gingerol na atividade de mieloperoxidase (MPO) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida



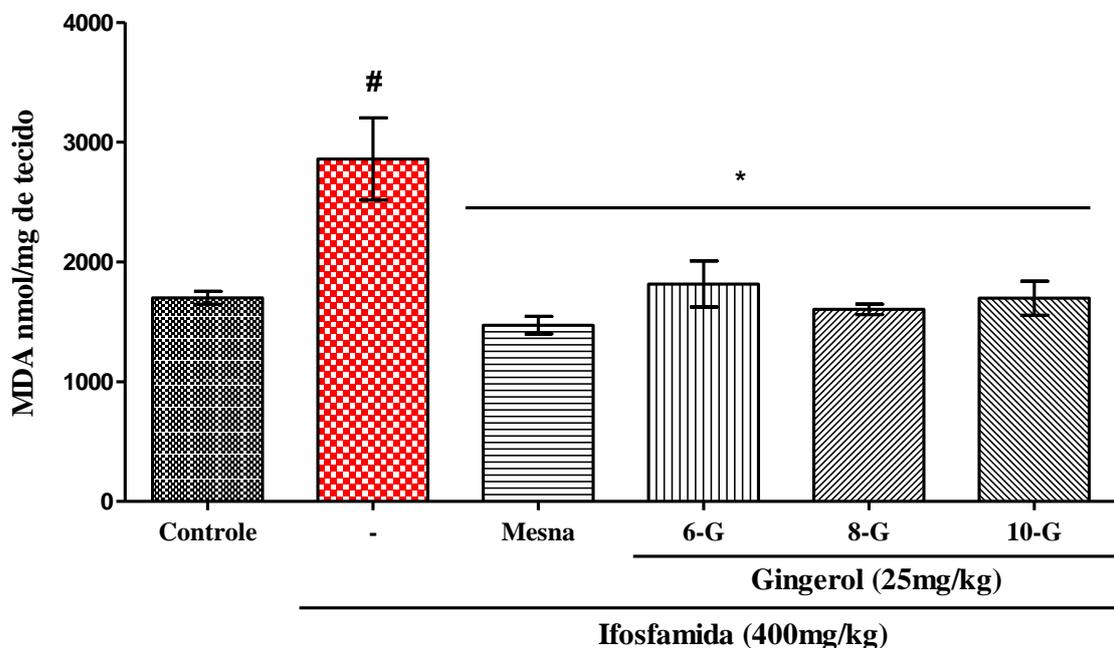
Os valores representam a atividade de mieloperoxidase (MPO) em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratado com [6]-, [8]- e [10]-gingerol v.o. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM ($n=6-7$). # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), * $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

5.7 Determinação do malondialdeído (MDA) após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida

Conforme demonstrado na **Figura 23** o grupo IFO ($2860 \pm 342,3$ nmol/mg de tecido) induziu um aumento significativo ($P < 0,05$) nos valores de MDA quando comparados ao grupo Controle ($1700 \pm 54,41$ nmol/mg de tecido). Os tratamentos com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol foram capazes de reduzir significativamente as concentrações de MDA nas bexigas analisadas, IFO+6G ($1816 \pm 193,3$ nmol/mg de tecido), IFO+8G ($1604 \pm 44,00$ nmol/mg de tecido) e IFO+10G ($1697 \pm 143,2$ nmol/mg de tecido), respectivamente, quando comparados ao grupo IFO.

O grupo Mesna foi capaz de reduzir ($P < 0,05$) o MDA ($1472 \pm 73,38$ nmol/mg de tecido) quando comparado ao grupo IFO. Os grupos tratados com os compostos gingeróis não apresentaram diferença significativa com o grupo tratado com Mesna.

Figura 23. Efeito do tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na dosagem de malondialdeído (MDA) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

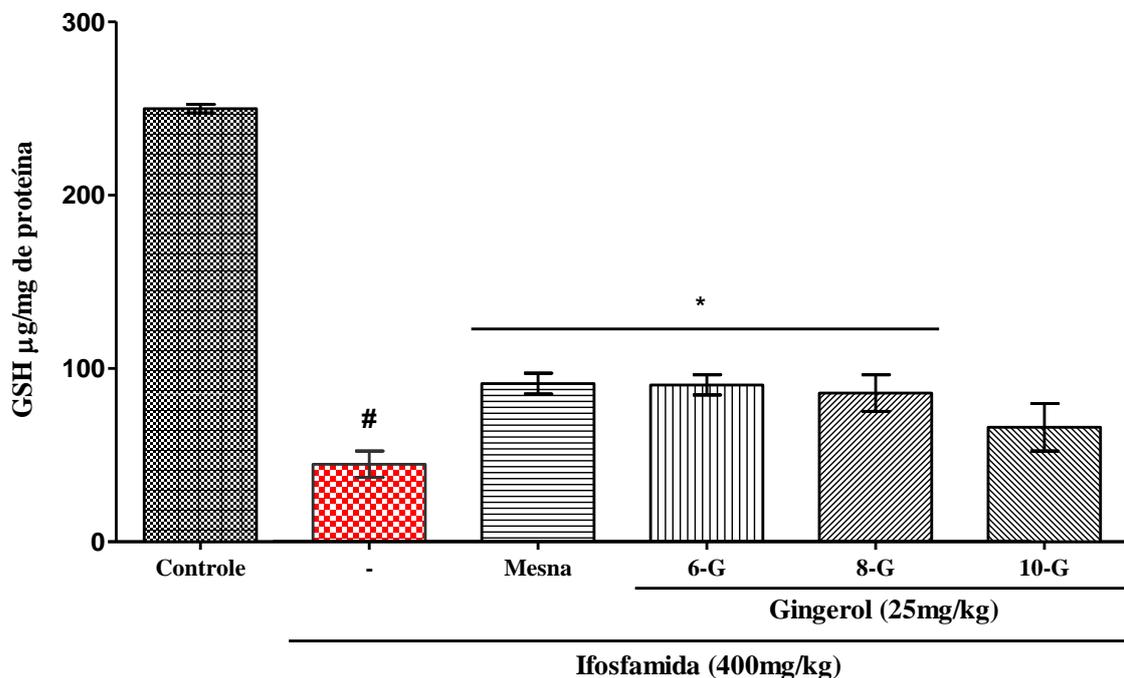


Os valores representam as dosagens de MDA em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratado com [6]-, [8]- e [10]-gingerol v.o. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM ($n=6-7$). # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), * $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

5.8 Avaliação da atividade da glutatona reduzida (GSH) após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida

De acordo com a **Figura 24** os animais do grupo IFO ($47,83 \pm 7,243$ mg/g de tecido) apresentaram redução significativa na atividade da GSH quando comparado ao grupo Controle ($249,9 \pm 2,490$ mg/g de tecido). Os tratamentos com [6]- e [8]-gingerol foram eficientes em aumentar significativamente ($P < 0,05$) a atividade da GSH: IFO+6G ($90,50 \pm 5,772$ mg/g de tecido), IFO+8G ($85,79 \pm 10,54$ mg/g de tecido). Já o [10]-gingerol apresentou um aumento na atividade da GSH de forma não significativa. O grupo Mesna foi capaz de aumentar a atividade da GSH ($91,26 \pm 6,007$ mg/g de tecido) de forma significativa ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo IFO e não apresentou diferença significativa com os grupos tratamentos com os compostos gingeróis.

Figura 24. Efeito do tratamento com os compostos [6], [8] e [10]-gingerol na dosagem de glutatona reduzida (GSH) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida



Os valores representam as dosagens de GSH em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratado com [6]-, [8]- e [10]-gingerol v.o. Os resultados foram reportados pelas médias \pm EPM ($n=6-7$). # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.), * $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste 1 way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni's.

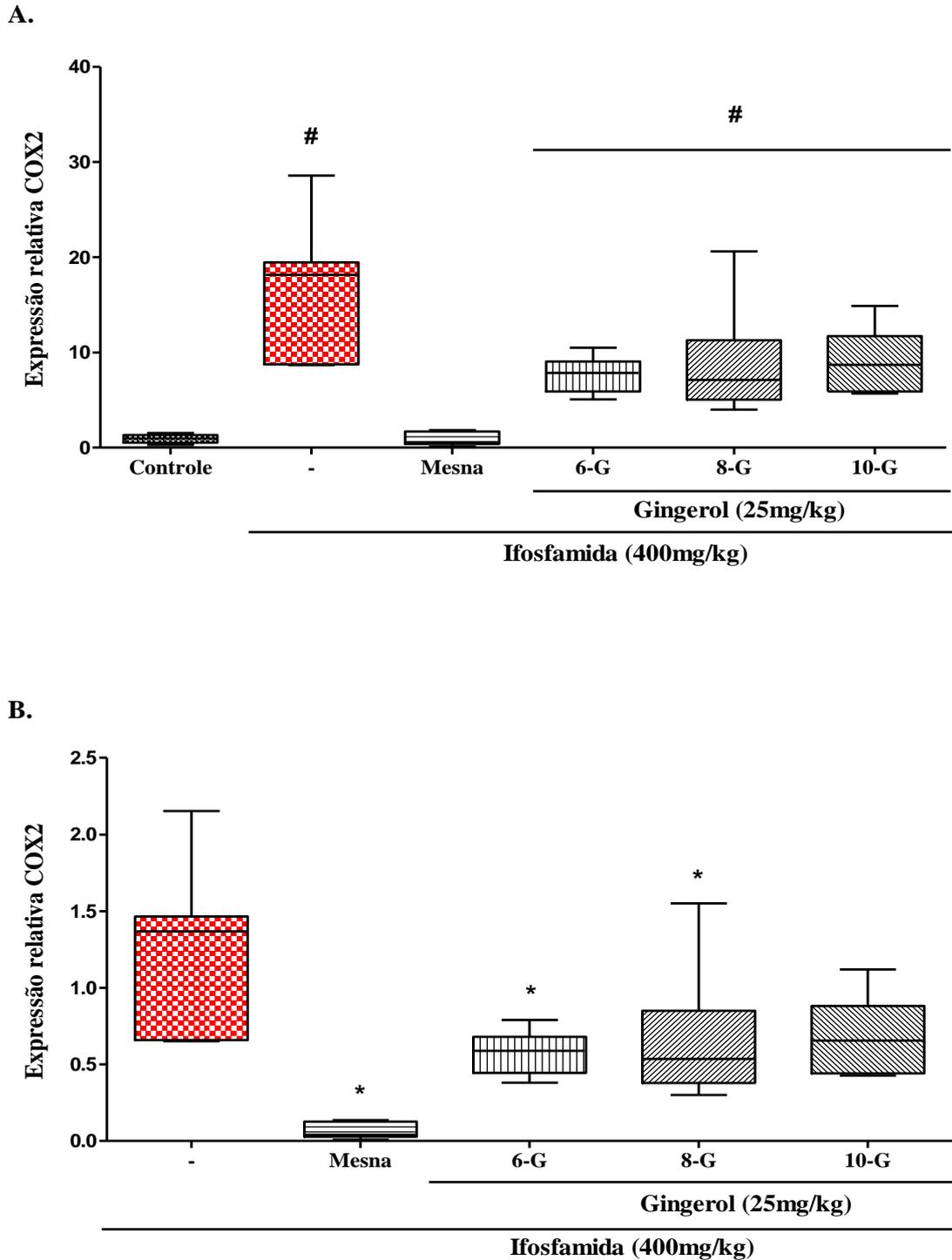
5.9 Avaliação da transcrição gênica da COX-2 após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida

A **Figura 25** representa a expressão relativa para COX-2. Podemos observar que os animais tratados com IFO ($18,16 \pm 2,82$) tiveram um aumento significativo ($P=0,0006$) na transcrição gênica de COX-2 em relação ao grupo controle ($0,95 \pm 0,17$), indicando assim a participação dessa enzima na patogênese da CH (**FIGURA 25A**). Os tratamentos com os compostos [6]- e [8]-gingerol apresentaram respectivamente diferença estatística ($P=0,008$), ($P=0,035$) na expressão gênica de COX-2: IFO+6G ($0,59 \pm 0,06$), IFO+8G ($0,53 \pm 0,19$), comparados ao grupo IFO ($1,37 \pm 0,21$). O tratamento com [10]-gingerol ($0,66 \pm 0,11$) apresentou uma redução na expressão gênica de COX-2, mas de forma não significativa (**FIGURA 25B**). O grupo Mesna obteve uma expressão semelhante ao grupo controle (**FIGURA 25A**).

5.10 Avaliação da transcrição gênica da TNF α após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida

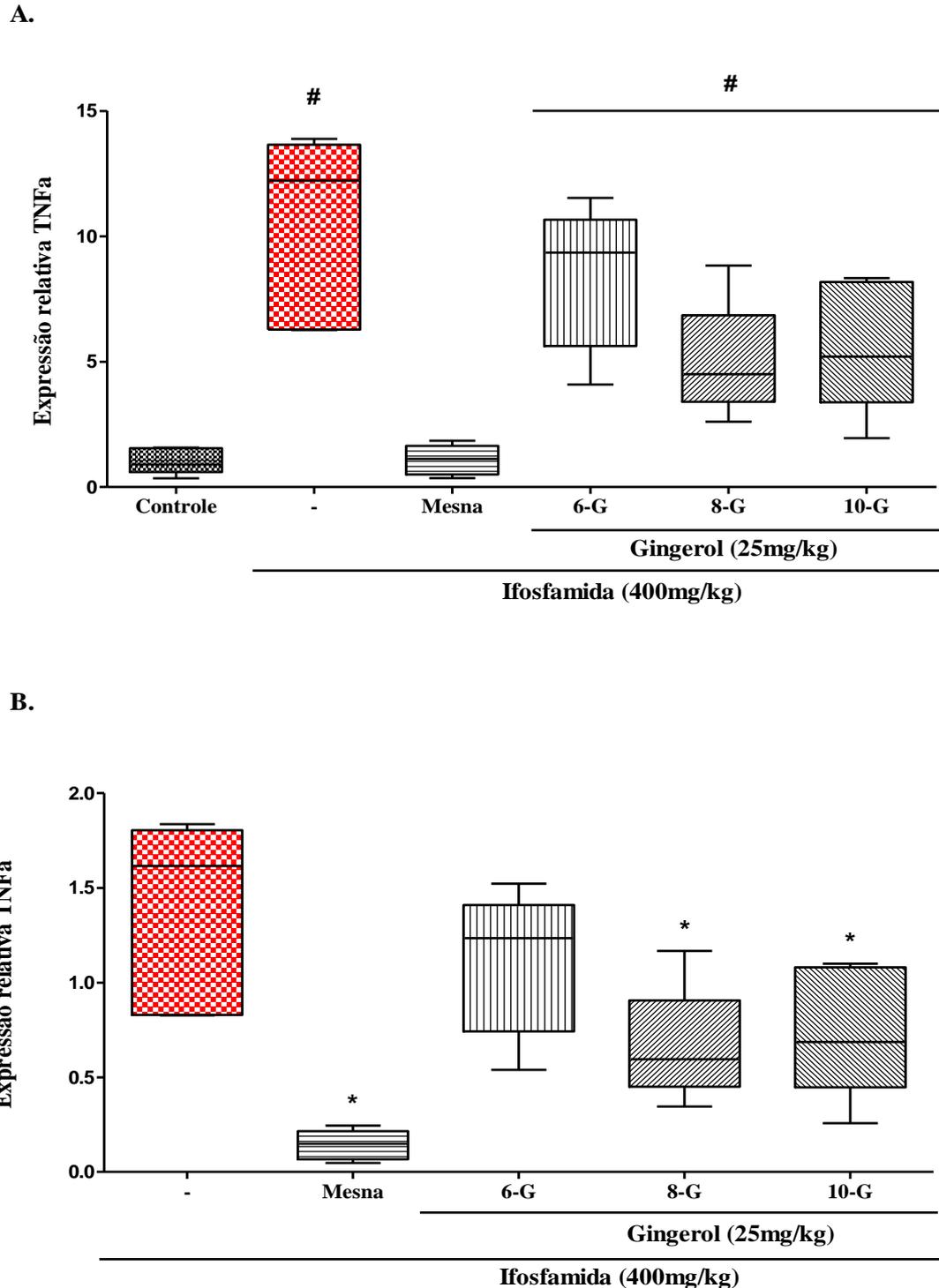
Conforme representado na **Figura 26A**, o grupo IFO ($12,23 \pm 1,44$) aumentou a expressão gênica de TNF α em relação ao grupo controle ($0,90 \pm 0,20$), ($P=0,002$). Os grupos IFO+8G ($0,60 \pm 0,10$) e IFO+10G ($0,69 \pm 0,13$) demonstraram, respectivamente, uma redução significativa ($P=0,02$), ($P=0,035$) na expressão relativa de TNF α em comparação ao grupo IFO ($1,62 \pm 0,19$). O tratamento com o [6]-gingerol ($1,62 \pm 0,19$) não apresentou diferença estatística em relação ao grupo IFO (**FIGURA 26B**). Assim como demonstrado anteriormente, o grupo Mesna apresentou expressão relativa semelhante ao grupo controle (**FIGURA 26A**).

Figura 25. Efeito do tratamento com compostos os [6]-, [8]- e [10]-gingerol na transcrição gênica de COX-2 na cistite hemorrágica por ifosfamida



Os valores representam a transcrição gênica de COX-2 em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratado com [6]-, [8]- e [10]-gingerol v.o. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx) (n=6-7). A) Expressão gênica de COX-2 em relação ao controle. B) Expressão gênica de COX-2 em relação a IFO. #P<0,05 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.). * P<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Figura 26. Efeito do tratamento com compostos os [6]-, [8]- e [10]-gingerol na transcrição gênica de TNF α na cistite hemorrágica por ifosfamida



Os valores representam a transcrição gênica de TNF α em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratado com [6]-, [8]- e [10]-gingerol v.o. Os resultados foram reportados pelas medianas (mín-máx) (n=6-7). A) Expressão gênica de TNF α em relação ao controle. B) Expressão gênica de TNF α em relação a IFO. #P< 0,05 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.). * P<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

5.11 Avaliação da transcrição gênica da IL-1 β após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida

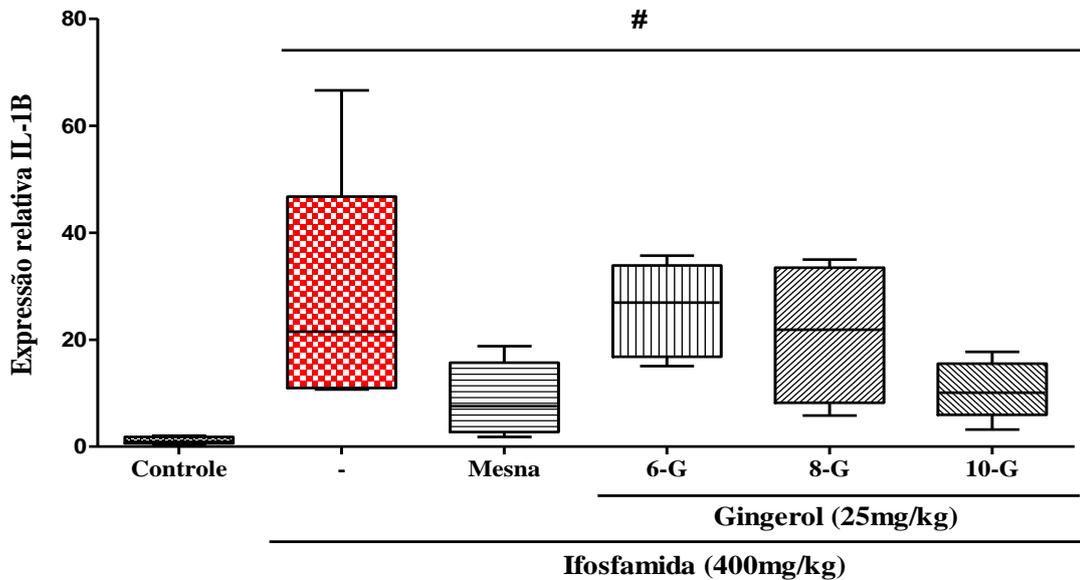
Podemos observar na **Figura 27A** que os animais tratados com IFO ($21,52 \pm 8,77$) apresentaram aumento significativo ($P=0,001$) na expressão gênica da IL-1 β quando comparados ao grupo controle ($0,91 \pm 0,24$). No grupo IFO+10G ($0,54 \pm 0,09$), animais que foram tratados com o composto [10]-gingerol, apresentou diferença estatística ($P=0,02$) com o grupo IFO ($1,14 \pm 0,46$). Não foram observadas alterações estatística entre o grupo IFO com os grupos IFO+6G ($1,43 \pm 0,18$) e IFO+8G ($1,16 \pm 0,23$) (**FIGURA 27B**). A expressão dos níveis de RNAm de IL-1 β no grupo Mesna ($7,59 \pm 2,32$) apresentou diferença significativa ($P=0,002$) com grupo controle ($0,91 \pm 0,24$) (**FIGURA 27A**).

5.12 Avaliação da transcrição gênica da IL-6 após tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol na cistite hemorrágica por ifosfamida

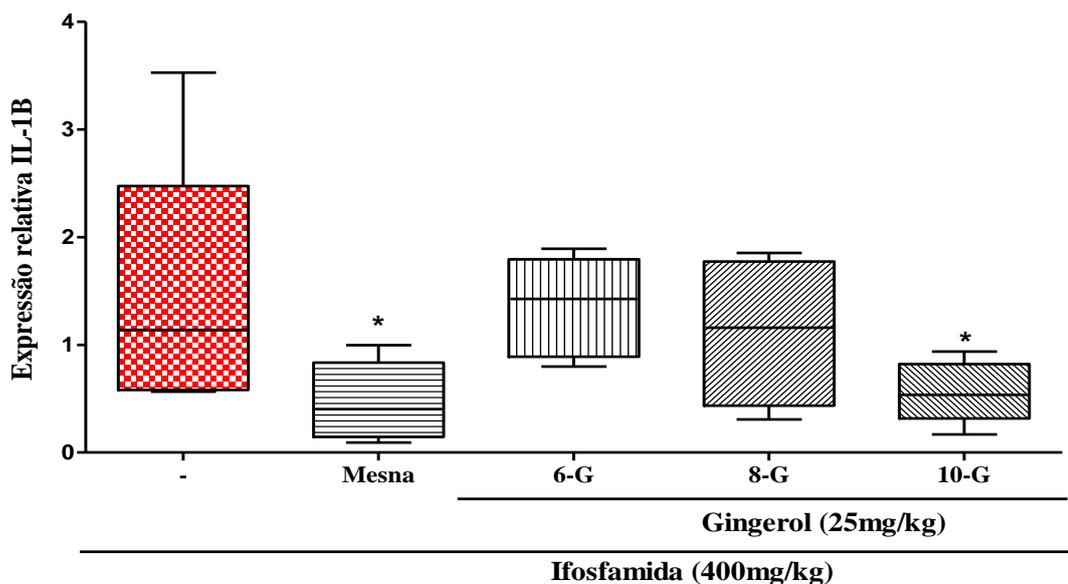
Por meio da **Figura 28A** podemos observar que os animais que foram induzidos à CH no grupo IFO ($249,6 \pm 20,32$) apresentaram um aumento significativo ($P=0,001$) na expressão de RNAm para IL-6 comparado ao grupo controle ($0,86 \pm 0,23$). Os tratamentos com os compostos [8]- e [10]-gingerol: IFO+8G ($0,23 \pm 0,026$) e IFO+10G ($0,51 \pm 0,08$) reduziram significativamente a expressão gênica para IL-6 ao serem comparados com grupo IFO ($1,04 \pm 0,085$), ($P=0,0003$) e ($P=0,001$) respectivamente. O tratamento com o [6]-gingerol ($0,84 \pm 0,10$) não apresentou diferença estatística (**FIGURA 28B**). O grupo Mesna ($38,12 \pm 12,46$) apresentou expressão gênica de IL-6 como diferença significativa ($P=0,004$) em relação ao grupo controle ($0,86 \pm 0,23$) (**FIGURA 28A**).

Figura 27. Efeito do tratamento com compostos os [6]-, [8]- e [10]-gingerol na transcrição gênica de IL-1 β na cistite hemorrágica por ifosfamida.

A.

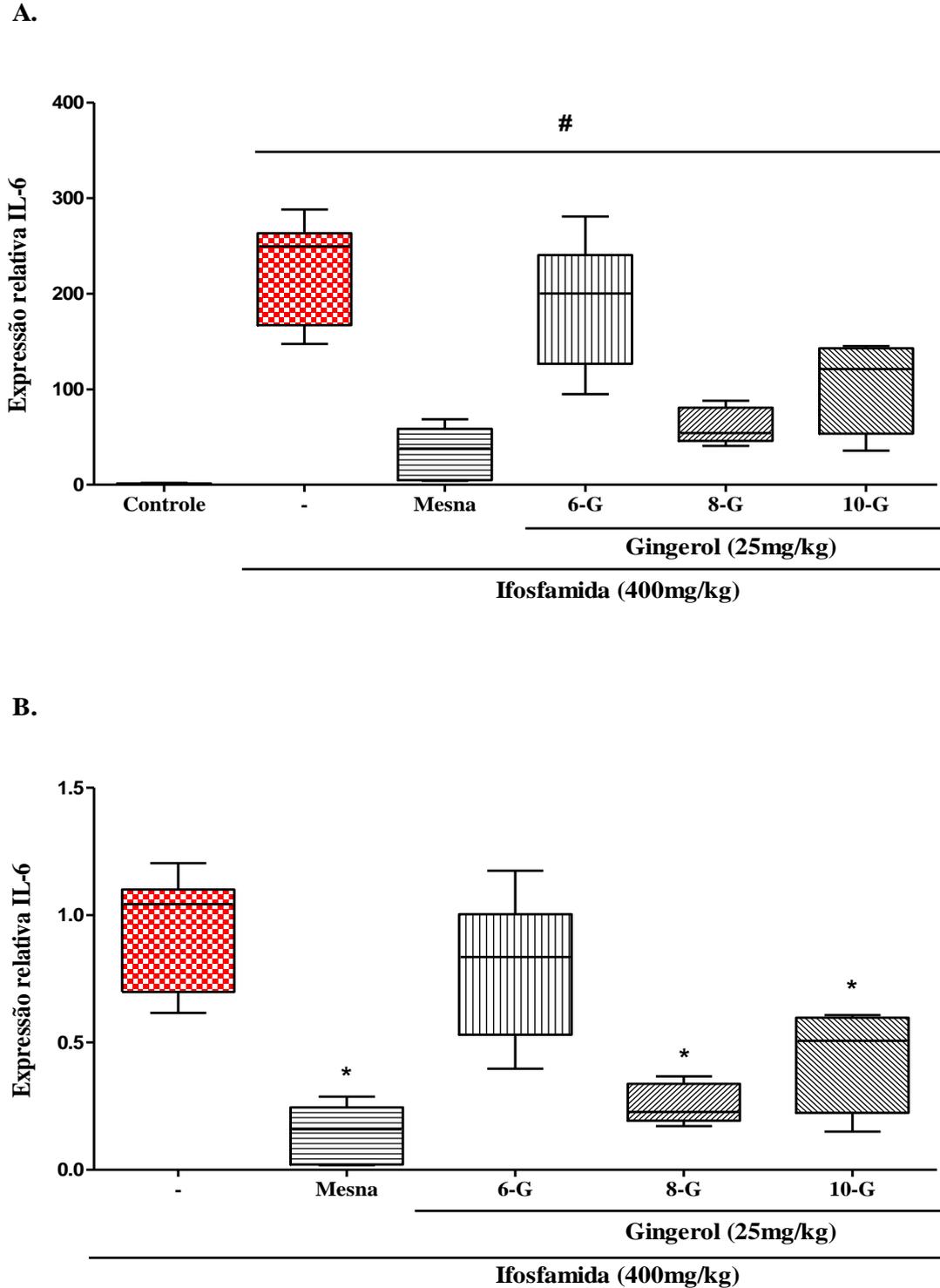


B.



Os valores representam a transcrição gênica de IL-1 β em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratado com [6]-, [8]- e [10]-gingerol v.o. Os resultados foram reportados pelas medianas (mín-máx) (n=6-7). A) Expressão gênica de IL-1 β em relação ao controle. B) Expressão gênica de IL-1 β em relação a IFO. #P< 0,05 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.). * P<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

Figura 28. Efeito do tratamento com compostos os [6]-, [8]- e [10]-gingerol na transcrição gênica de IL-6 na cistite hemorrágica por ifosfamida.



Os valores representam a transcrição gênica de IL-1 β em animais após a indução da cistite hemorrágica por IFO e tratado com [6]-, [8]- e [10]-gingerol v.o. Os resultados foram reportados pelas medianas (mín-máx) (n=6-7). A) Expressão gênica de IL-1 β em relação ao controle. B) Expressão gênica de IL-1 β em relação a IFO. #P< 0,05 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com Tween80 2% v.o.). * P<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com IFO. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a atividade antioxidante e anti-inflamatória dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol, isolados do extrato de *Z. Officinale* no percurso da cistite hemorrágica (CH) induzida por ifosfamida (IFO), em um modelo experimental com camundongos *Swiss* fêmeas. O uso desse gênero se justifica pelo fato de serem menos suscetíveis que os machos ao efeito tóxico agudo em um modelo de CH induzido por ciclofosfamida (ANTON, 2002).

Silva e colaboradores (2013) padronizaram o modelo de CH em camundongos *Swiss* fêmeas induzido por ciclofosfamida, e realizaram uma cinética de tempo de indução. Seus resultados sugeriram a utilização do tempo de 12h como melhor avaliação experimental, por apresentar uma maior disponibilidade de parâmetros aumentados para avaliação inflamatória.

A utilização do antineoplásico ifosfamida se deu devido a existência de evidências de que a ocorrência de CH é mais frequente em pacientes em uso de ifosfamida do que aquele que fizeram uso de ciclofosfamida (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006; ALI et al., 2014). Deste modo, diversos modelos experimentais foram desenvolvidos no intuito de simular as alterações morfológicas e funcionais causadas pelo uso das oxazafosforinas em humanos. Ribeiro e colaboradores (2002) desenvolveram um modelo CH experimental induzido por ifosfamida em camundongos. No referido estudo realizaram uma curva dose-resposta em diferentes tempos, onde foi demonstrado o maior pico de inflamação com a dose 400mg/Kg e 12h após administração de ifosfamida. Os animais foram avaliados pela presença de edema vesical e aspectos macroscópicos e microscópicos das bexigas segundo critérios de Gray e colaboradores (1986). Os achados microscópicos das bexigas foram semelhantes ao que são encontrados na patologia em humanos.

Devido aos efeitos antioxidante e anti-inflamatório dos compostos gingeróis descritos na literatura, o mesmo foi considerado um candidato adequado a ser testado no presente estudo, com intuito de investigar e demonstrar possíveis efeitos uroprotetores. Nossos resultados demonstraram o papel protetor dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol diante aos parâmetros avaliados desencadeados pela CH, tais como: melhora nos parâmetros macroscópicos de edema e hemorragia, peso úmido vesical (PUV), na atividade de MPO, redução da lipoperoxidação e do estresse oxidativo, assim como na redução da resposta inflamatória.

Em nosso estudo tentou-se mimetizar de forma inédita o modelo de CH em camundongos fêmeas C57BL/6. Observou-se uma menor intensidade nos parâmetros

macroscópicos de edema e hemorragia, assim como no PUV quando comparado aos camundongos *Swiss* fêmeas, apresentando diferença estatística entre as espécies. A resistência observada na indução de CH em camundongos C57BL/6 pode ser devida às diferenças farmacocinéticas na distribuição dos metabólitos na bexiga, pois níveis mais elevados de acroleína foram encontrados na urina de uma linhagem de camundongo sensível (DBA/2) do que em camundongos da linhagem C57BL/6. Além disso, fatores intrínsecos no interior da bexiga também poderiam estar envolvidos na resistência exibida após a injeção de ciclofosfamida (FRAISER; KEHRER, 1992; ANTON, 2002).

Ao analisar os efeitos dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol em animais sadios sem indução de CH por ifosfamida sob os parâmetros de edema, hemorragia e PUV, constatou-se que não houve nenhuma alteração nesses parâmetros. Estudos vêm demonstrando que os compostos derivados do extrato do *Z. officinale* apresentam poucos efeitos colaterais e tóxicos, reconhecido como seguro pelo FDA (KAFESHANI, 2015; IMANI et al., 2015). Tais resultados encontrados indicam que os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol não desencadearam qualquer alteração morfofuncional, apresentando resultados similares ao grupo controle indicando, assim, serem compostos possivelmente seguros.

No presente estudo observou-se uma inflamação vesical marcante após a administração de ifosfamida, caracterizada por aumento do peso úmido da bexiga, presença de congestão vascular, edema pronunciado, hemorragia grave, deposição de fibrina, infiltração de neutrófilos, desnudação epitelial e o envolvimento de diversos mediadores pró-inflamatórios, eventos já mencionados em outros estudos (RIBEIRO et al., 2002; ALI et al., 2014; DORNELLES et al., 2014; LEITE et al., 2015). Contudo, o tratamento oral com os compostos gingeróis atenuou significativamente esta inflamação na bexiga.

Com o estabelecimento da inflamação vesical, realizou-se a medida indireta da infiltração neutrofílica através da atividade de MPO nesses tecidos. Como demonstrado anteriormente (RIBEIRO et al., 2002; PEREIRA et al., 2013; LEITE et al., 2015), a administração de IFO aumentou significativamente a atividade de MPO na bexiga, o que está relacionado com o aumento da migração de neutrófilos (DORNELLES et al., 2014; DIETRICH et al., 2015). Nossos dados demonstram que a atividade de MPO foi significativamente inibida com o tratamento com os compostos gingeróis e pelo Mesna, ambos apresentando inibição semelhante.

Nossos achados estão de acordo com estudos anteriores, onde o tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol reduziram a atividade de MPO no cólon de ratos com colite ulcerativa induzida por dextrana sulfato de sódio (ZHANG et al., 2017). A fração de

Z. officinale enriquecida com [6]-gingerol também reduziu a atividade de MPO cerebral, ovariano e uterino no dano oxidativo e inflamatório induzido por pesticida organofosforado em ratos fêmeas (ABOLAJI et al., 2017).

A peroxidação lipídica tem sido implicada na patogênese da CH induzida por oxazafosforinas, e esse aumento é observado pelos níveis aumentado de MDA na bexiga e o mesmo se correlaciona com a diminuição nos níveis na defesa antioxidante (GSH, SOD, CAT) e com o aumento da atividade MPO, sinalizando assim o dano oxidativo e inflamatório (BHATIA et al., 2008; ARAFA et al., 2009; FARSHID; TAMADDONFARD; RANJBAR, 2013).

No presente trabalho os valores de MDA aumentaram de forma significativa nos animais do grupo IFO quando comparados aos do grupo controle. Esses dados corroboram com outros estudos citados anteriormente, no que se refere a patogênese da CH. O tratamento com os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol reduziram de forma significativa na peroxidação lipídica observada no grupo IFO, apresentando assim um efeito uroprotetor. Estudo realizado por Kuhad e colaboradores (2006), demonstraram o potencial renoprotetor do [6]-gingerol em reduzir os níveis de MDA na nefrotoxicidade induzida por cisplatina, assim como o estudo realizado por Rodrigues e colaboradores (2014), ao analisarem a fração de *Z. officinale* enriquecida com [6]-, [8]- e [10]-gingerol, que apresentou ação antioxidante ao reduzir os níveis de MDA frente a nefrotoxicidade aguda desencadeada por gentamicina.

Os valores de MDA encontrados em nosso estudo estão de acordo com Hosseinzadeh e colaboradores (2017), que demonstraram que o extrato de gengibre foi capaz de reduzir a produção intracelular de ROS e o nível de MDA sobre o estresse oxidativo induzido por IL-1 β em células de condrócitos humanos e reduziu o MDA cardíaco na cardiotoxicidade por doxorubicina, proteção esta atribuída à atividade de eliminação de radicais livres de *Z. officinale* (AJITH; HEMA; ASWATH, 2016). Os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol diminuíram a resposta antioxidante na colite ulcerativa por DSS, e foram capazes de reduzir os níveis de MDA de forma significativa (AJAYI; ADEDARA; FAROMBI, 2015; ZHANG et al., 2017).

O organismo humano conta com um sistema de defesa antioxidante, que consiste em enzimas como SOD, catalase e glutathione peroxidases e seus substratos antioxidantes, que combatem a propagação e os danos causados pelas EROs. Quando esta ação antioxidante não consegue removê-las, temos como consequência o aumento nos níveis de peroxidação lipídica (VASCONSELOS et al., 2007; BALMUS et al., 2016; ABOLAJI et al., 2017).

A GSH é um tri-peptídeo contendo cisteína com um grupo tiol reativo que desempenha um papel importante na manutenção do estado redox celular e protege as células contra os efeitos deletérios dos radicais livres e peróxidos gerados durante o estresse oxidativo. A sua quantificação é considerada um marcador significativo de estresse oxidativo (AJAYI; ADEDARA; FAROMBI, 2015; HEGAZY et al., 2016).

O nível reduzido de GSH no homogeneizado da bexiga após administração de IFO encontrado em nosso estudo, é um achado que está em conformidade com os resultados de outras pesquisas, que demonstraram a redução do nível de GSH em resposta as EROs induzido por oxazafosforina (IFO ou ciclofosfamida) (ARAFÁ et al., 2009; SAYED-AHMED; DARWEESH; FATANI, 2010; SINANOGLU et al., 2012). Assim, a atividade diminuída de GSH é um indicativo de dano oxidativo devido ao comprometimento do estado antioxidante, o que pode ser devido ao aumento da peroxidação lipídica observada nesses tecidos, sendo assim um possível mecanismo para o dano urotelial.

Nossos resultados confirmam o efeito protetor a partir de uma atividade antioxidante dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol, pois os mesmos foram capazes de reduzir os níveis de GSH nos animais com CH, de forma significativa para os compostos [6]- e [8]-gingerol. Diversos estudos têm demonstrado esta ação antioxidante atribuída aos compostos fenólicos do gengibre, principalmente o [6]-gingerol, atuando na atividade de GSH no modelo de nefrotoxicidade (KUHAD et al., 2006; HEGAZY et al., 2016), no modelo de colite ulcerativa (AJAYI; ADEDARA; FAROMBI, 2015) e no dano oxidativo e inflamatório induzido por pesticida organofosforado (ABOLAJI et al., 2017).

Estudos realizados por nosso grupo demonstraram que o extrato enriquecido por gingeróis foi capaz de reverter o dano oxidativo desencadeado pela nefrotoxicidade por gentamicina (RODRIGUES et al., 2014). Em adição, um estudo realizado em animais com lesão renal aguda por um modelo experimental de sepsis reforçam a atividade antioxidante dos compostos isolados do gengibre, pois os compostos [6]- e [10]-gingerol reduziram a peroxidação lipídica e aumentaram a atividade antioxidante (GSH e SOD) (RODRIGUES, 2017). O extrato de *Z. officinale* e o [6]-gingerol aumentou a função antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo e mantendo as atividades de GSH, SOD e Catalase na toxicidade hepatorenal por cloreto de mercúrio (JOSHI et al., 2017).

Nosso estudo utilizou o Mesna, um fármaco padrão utilizado na clínica como preventivo de CH induzido por oxazafosforinas, com a finalidade de comparar o seu efeito uroprotetor com os efeitos dos compostos gingeróis, conforme já utilizados em outros estudos (BATISTA et al., 2007; PEREIRA et al., 2013; ALI et al., 2014). Os nossos resultados

demonstram uma similaridade entre os efeitos dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol com o Mesna na avaliação do PUV, na atividade de MPO, nos níveis de MDA, GSH e nos parâmetros histopatológicos.

Mesna tem sido investigado no tratamento da CH induzida por ifosfamida e ciclofosfamida com resultados variáveis (PAYNE et al., 2013). Mota e colaboradores (2007) demonstraram a ocorrência de hematúria devido a CH observada em 33% dos pacientes tratados com Mesna. Mesmo com a utilização da profilaxia, não houve diferença no efeito protetor em pacientes tratados com Mesna e pacientes sem tratamento em um estudo de coorte (YILMAZ et al., 2015).

Nesse sentido surge a necessidade de novos agentes uroprotetores alternativos. Com esta perspectiva vários estudos têm demonstrado os efeitos protetores de algumas plantas medicinais ou compostos isolados contra a CH em modelos animais. Como a curcumina, ternatina, espirulina, oleuropeína, extratos de *Phyllanthus niruri*, *Ipomoea obscura*, *Chenopodium ambrosioides* e *Caesalpinia pyramidalis* têm mostrado efeitos benéficos na ação antioxidante e anti-inflamatória (VIEIRA et al., 2004; ARAFA et al., 2009; HAMSA; KUTTAN, 2011; SINANOGLU et al., 2012; MORAES et al., 2013; SILVA et al., 2015; SHERIF et al., 2016).

O processo inflamatório na patogênese da CH por ifosfamida é caracterizada pela presença de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β , via indução na produção de óxido nítrico pela iNOS, pois sua inibição reduz a síntese de ambas as citocinas (RIBEIRO et al., 2002; LEITE et al., 2015) e com a participação da COX-2. Em adição, Macedo e colaboradores (2008b) ainda demonstraram que TNF- α tem um papel importante na sua regulação da CH.

O envolvimento da interleucina-6 (IL-6) no percurso da CH tem sido observado em alguns estudos que demonstraram o aumento da sua expressão na bexiga ou no soro após a indução por ciclofosfamida (NISHII et al., 2006; DANTAS et al., 2010; GIRARD et al., 2011), mas até o momento não foram encontrados estudos que demonstrassem a expressão da IL-6 na CH por ifosfamida.

O aumento da transcrição gênica de TNF- α , IL-1 β e COX-2 foram observados nos animais induzidos à CH por ifosfamida no presente estudo, conforme já descrito em outros estudos (RIBEIRO et al., 2002; MACEDO et al., 2008b; LEITE et al., 2015). Dentre os compostos gingeróis analisados, o [10]-gingerol foi o composto que apresentou a melhor redução na transcrição gênica dos marcadores analisados, reduziu de forma significativa a expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 e apresentou uma redução de aproximadamente 43% na

média de expressão de COX-2. O composto [8]-gingerol diminuiu significativamente a expressão de COX-2, TNF- α e IL-6 e o [6]-gingerol reduziu a expressão de COX-2 estatisticamente.

Dados publicados por Rodrigues e colaboradores (2014) demonstraram que a fração de gengibre enriquecida com os compostos de gingeróis reduziram a expressão aumentada de TNF- α e IL-1 β em um modelo de nefrotoxicidade por aminoglicosídeo, melhorando a função renal. O composto [6]-gingerol atenuou a resposta pró-inflamatória, diminuindo a transcrição gênica TNF- α , IL-1 β e IL-6 no modelo de colite por DSS em células de adenocarcinoma de cólon humano e reduziu os níveis de TNF- α , IL-1 β em animais com colite por DSS (CHANG, KUO, 2015), resultado não encontrado em nosso estudo para o [6]-gingerol.

Nessa perspectiva, Zhang e colaboradores (2017) demonstraram que os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol reduziram os níveis de TNF- α e IL-1 β em soro de animais com colite ulcerativa por DSS. Estudo realizado por Rodrigues (2017) apresentou diminuição na transcrição gênica de TNF- α e IL-1 β nos animais tratados com os compostos [6]- e [10]-gingerol no modelo de sepsis, corroborando com nossos achados com o [8]- e [10]-gingerol, mas o [8]-gingerol só apresentou uma tendência na redução na expressão de IL-1 β .

Foi demonstrado por Macedo e colaboradores (2008b) a participação da COX-2 na patogênese na CH induzida por ifosfamida, e esse achado foi confirmado pela transcrição gênica aumentada de COX-2 nas bexigas dos animais tratados com ifosfamida em nosso estudo.

A COX-2 está geralmente ausente em condições basais, sendo estimulada por diversos citocinas, fatores de crescimento e mitógenos. É um potente mediador pró-inflamatório que promove a produção de citocinas pró-inflamatória, como IL-1 β e IL-6 (LI et al., 2013). Estudo com o extrato de gengibre ou frações contendo predominantemente gingeróis foram capazes de inibir a expressão de COX-2 (JOLAD et al., 2005).

O [6]-gingerol diminuiu a expressão de COX-2 em um estudo realizado na fibrose hepática experimental por tetracloreto de carbono (ALGANDABY et al., 2016), reduziu a transcrição gênica de COX-2 induzida por radiação ultravioleta B em células do queratinócito humano e pele de animal (KIM et al., 2007) e inibiu a expressão de COX-2 em pele de rato estimulada com um agente indutor de tumor (KIM et al., 2005).

A IL-6 é uma citocina relacionada com inúmeras atividades biológicas. Sua produção é estimulada por várias células, incluindo fibroblastos, células endoteliais, monócitos e macrófagos. Em comparação às demais citocinas, seu nível de expressão é mais elevado no fluido corporal e também consistentemente elevados em doenças inflamatórias, funcionando

como marcador inflamatório em resposta ao estresse, na síndrome metabólica e na resistência à insulina (NISHII et al., 2006; JUNQUEIRA; ROMÊO FILHO; JUNQUEIRA, 2009; GOMES; MACÊDO NETO; BISPO, 2009).

A IL-6 é relatada como um importante mediador nas reações inflamatórias agudas (EID et al., 2017), conforme encontrado em nosso estudo. Tzeng e colaboradores (2015) demonstraram que o [6]-gingerol reduziu a expressão gênica de IL-6 em animais na esteato-hepatite não alcoólica experimental. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo realizado por Chang e Kuo (2015) ao analisar o composto [6]-gingerol no modelo de colite por DSS em células de adenocarcinoma de cólon humano. O extrato de gengibre e seus constituintes melhoraram as respostas inflamatórias, diminuindo os níveis de nitrito, PGE₂, IL-6 e IL-8 em células de adenocarcinoma de cólon humano após a exposição a uma mistura de mediadores inflamatórios (IL-1 β , LPS, TNF- α e INF- γ) (KIM; KIM; KIM, 2017).

Estudos sobre os efeitos dos compostos [8]- e [10]-gingerol sobre a enzima COX-2 e IL-6 são escassos na literatura científica e a presente pesquisa é a primeira a relatar tais efeitos na expressão gênica de COX-2 e IL-6 na CH experimental induzida por IFO.

Alguns estudos têm demonstrado que a CH induzida por IFO desencadeia alterações histopatológicas na bexiga urinária tais como edema da submucosa, hemorragia, erosão e ulceração urotelial e essas alterações foram acompanhadas pelo aumento do PUV da bexiga (RIBEIRO et al., 2002; ALI et al., 2014; DORNELLES et al., 2014; LEITE et al., 2015). Esses achados estão em conformidade com os achados do nosso estudo. O tratamento com os compostos [8]- e [10]-gingerol exibiram uma tendência em reduzir essas alterações histopatológicas, reduzindo a mediana do escore total, assemelhando-se com o grupo Mesna. Não foram observadas uma diminuição nos parâmetros microscópicos para o composto [6]-gingerol.

No entanto, o presente estudo teve como limitações a necessidade de diversas repetições dos grupos experimentais para a obtenção de amostra para pesquisar o que se pretendia analisar, assim como a falta da avaliação da transcrição gênica de marcadores do estresse oxidativo (GSH, SOD, CAT) e quantificação proteica dos marcadores inflamatórios investigados nesta pesquisa, resultados estes que irão corroborar com dados encontrados no estudo e no entendimento das vias envolvidas na proteção dos compostos gingeróis testados. Além disso, o modelo de inflamação utilizado no estudo, por se tratar de um modelo agudo, o mesmo poderia requerer a utilização de uma dose maior, outra via de administração ou um maior período de tratamento, como é observado em diversos estudos com extrato do gengibre

ou com os compostos gingeróis isolados (RODRIGUES et al., 2014; AJAYI; ADEDARA; FAROMBI, 2015; ABOLAJI et al., 2017).

Tabela 4. Resumos dos resultados encontrados na pesquisa

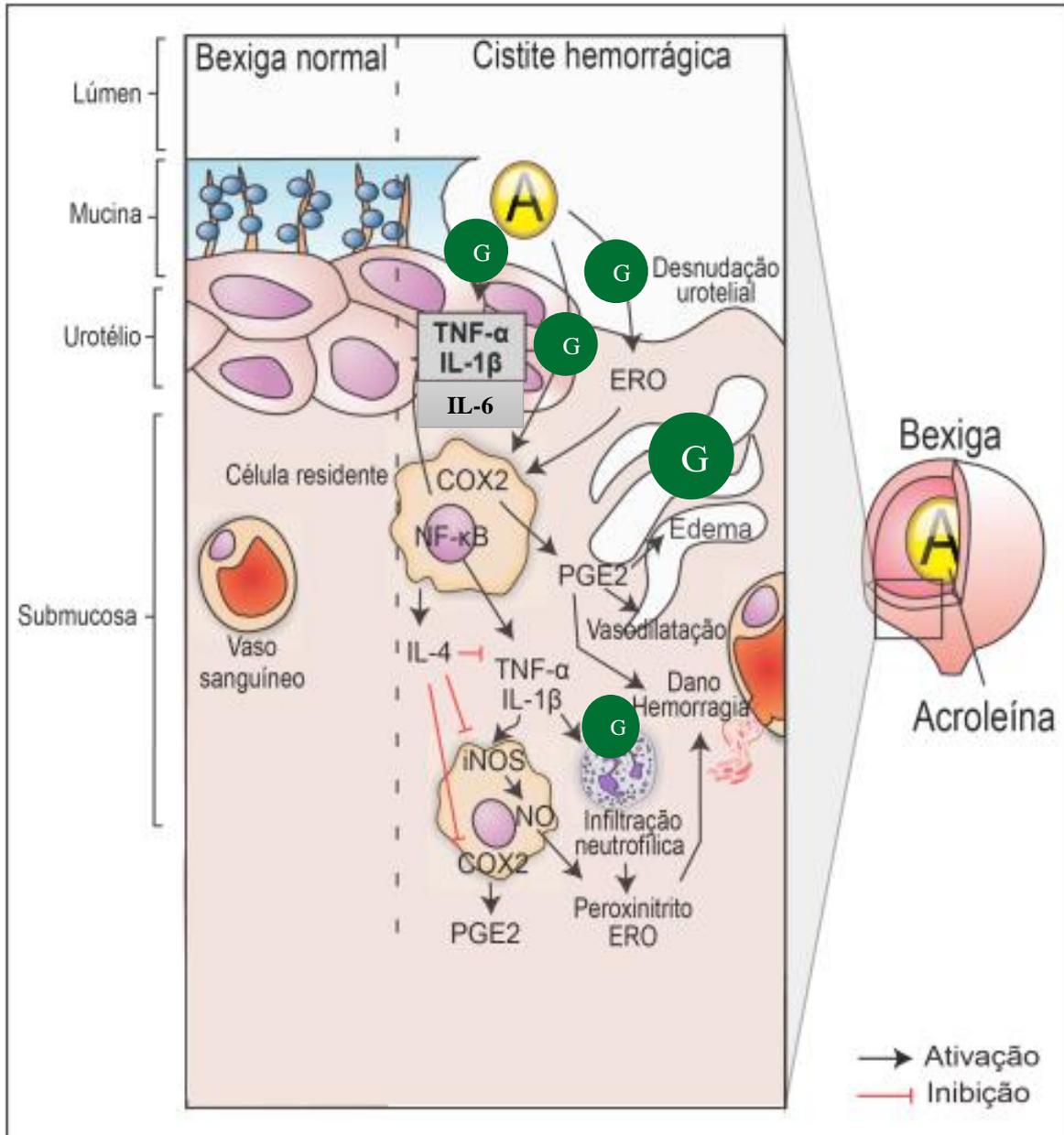
GRUPO	RESULTADO ENCONTRADO
<i>Cistite (IFO)</i>	↑ PUV, Edema e Hemorragia MPO, Dano oxidativo COX2, TNF α , IL1 β , IL6
<i>Mesna</i>	↓ PUV, Edema e Hemorragia MPO, Dano oxidativo COX2, TNF α , IL1 β , IL6
<i>[6]-gingerol</i>	↓ PUV, Edema MPO, Dano oxidativo COX2
<i>[8]-gingerol</i>	↓ PUV, Edema MPO, Dano oxidativo COX2, TNF α , IL6
<i>[10]-gingerol</i>	↓ PUV, Edema MPO, Dano oxidativo TNF α , IL1 β , IL6

Fonte: Autor.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se com os resultados encontrados na pesquisa que os compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol atenuaram as alterações ocasionadas na CH induzida por IFO, reduzindo o edema, PUV, atividade de MPO e o estresse oxidativo com ação semelhante ao Mesna. Tais compostos apresentaram um efeito na resposta pró-inflamatória desencadeado na patogênese da CH, demonstrando assim uma eficácia uroprotetora. Isto permite sugerir que os compostos gingeróis podem ser utilizados na prevenção da CH, embora estudos futuros sejam necessários para viabilização de sua utilização.

Figura 29. Modelo hipotético com os principais achados associado à uroproteção dos compostos gingeróis na fisiopatogênese da cistite hemorrágica



Fonte: Adaptado Ribeiro et al. (2012); Leite (2015).

Nota: A figura reporta as principais alterações desencadeadas pelo cistite hemorrágica e os efeitos encontrados pelos os compostos gingeróis diante da sua fisiopatogênese.

REFERENCIAS

- ABOLAJI, A.O.; OJO, M.; AFOLABI, T.T.; AROWOOGUN, M.D.; NAWAWOLOR, D.; FAROMBI, E.O. Protective properties of 6-gingerol-rich fraction from *Zingiber officinale* (Ginger) on chlorpyrifos-induced oxidative damage and inflammation in the brain, ovary and uterus of rats. **Chemico-Biological Interactions**, n. 270, p. 15-23, 2017.
- AHMED, R.S.; SETH, V.; PASHA, S.T.; BANARJEE, D. B. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) on oxidative stress induced by malathion in rats. **Food Chem. Toxicol.** v. 38, p. 443-450, 2000.
- AJAYI, B. O.; ADEDARA, I. A.; FAROMBI, E. O. Pharmacological Activity of 6-Gingerol in Dextran Sulphate Sodium-induced Ulcerative Colitis in BALB/c Mice. **Phytother Res.** v. 29, n. 4, p. 566-7, 2015.
- AJITH, T.A.; HEMA, U.; ASWATHI, S. Zingiber officinale Roscoe ameliorates anticancer antibiotic doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rat. **J Exp Ther Oncol.**, v. 11, n. 3, p.171-175, 2016.
- ALGANDABY, M.M.; EL-HALAWANY, A.M.; ABDALLAH, H.M.; ALAHDAL, A.M.; NAGY, A.A.; ASHOUR, O.M.; ABDEL-NAIM, A.B. Gingerol protects against experimental liver fibrosis in rats via suppression of pro-inflammatory and profibrogenic mediators. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 389, n.4, p. 419-428, 2016.
- ALI, B.H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M.O.; NEMMAR, A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe); A review of recent research. **Food and Chemical toxicology**, v. 46, p. 409-20, 2008.
- ALI, S.A.; DANDA, S.K.; BASHA, S.A.A.B; RASHEED, A.; AHMED, O.; AHMED, M.M. Comparison of uroprotective activity of reduced glutathione with Mesna in Ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in rats. **Indian J Pharmacol.**, v. 46, n. 1, p. 105–108, 2014.
- ALMEIDA V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B; CARLOS ALBERTO MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 152-157, 2007.
- ANTON, E. Delayed toxicity of cyclophosphamide on the bladder of DBA/2 and C57BL/6 female mouse. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 89, p. 47-53, 2002.
- ARAFA, H.M.M. Uroprotective Effects of Curcumin in Cyclophosphamide-Induced Haemorrhagic Cystitis Paradigm. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, p. 393–399, 2009.

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.

BALMUS, I.M.; CIOBICA, A.; TRIFAN, A.; STANCIU, C. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical aspects and animal models. **Saudi J Gastroenterol.**, v. 22, n. 1, p. 3-17, 2016.

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.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: assessment of biomarkers. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARRETO, A.M.; TOSCANO, B.A.F.; FORTES, R.C. Efeitos do gengibre (*Zingiber officinale*) em pacientes oncológicos tratados com quimioterapia. **Com. Ciências Saúde**, v. 22, n. 3, p. 257-270, 2011.

BATISTA, C. K.; MOTA, J. M. S. C.; SOUZA, M. L. P.; LEITÃO, B. T. A.; SOUZA, M. H. L. P.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Amifostine and glutathione prevent ifosfamide and acrolein-induced hemorrhagic cystitis. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 59, n. 1, p. 71-7, 2007.

BERNARD, M.; FURLONG, S.J.; COOMBS, M.R.P.; HOSKIN, D.W. Differential Inhibition of T Lymphocyte Proliferation and Cytokine Synthesis by [6]-Gingerol, [8]-Gingerol, and [10]-Gingerol. **Phytother. Res.**, v. 29, p. 1707–1713, 2015.

BERNARD, M.M.; MCCONNERY, J.R.; HOSKIN, D.W. [10]-Gingerol, a major phenolic constituent of ginger root, induces cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 102, p. 370–376, 2017.

BHATIA, K.; AHMAD, F.; RASHID, H.; RAISUDDIN, S. Protective effect of S-allylcysteine against cyclophosphamide-induced bladder hemorrhagic cystitis in mice. **Food and Chemical Toxicology**, n. 46, p. 3368–3374, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, P.P. et al. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618–622, 1982.

CAPÓ, J.T.; FIGUEREDO, Y.N.; FERNÁNDEZ, S.A.; DOMÍNGUEZ, C.C. Actividad antiinflamatoria de compuestos liposolubles de *Zingiber officinale* Roscoe frente a diferentes agentes flogísticos. **Rev Cubana Plant Med.**, v. 12, n. 2, 2007.

CHANG, K.; KUO, C. 6-Gingerol modulates proinflammatory responses in dextran sodium sulfate (DSS)-treated Caco-2 cells and experimental colitis in mice through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation. **Food Funct.**, 2015, n. 6, p. 3334–3341, 2015.

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, n. 1, p. 73-81, 2007.

CHOW, Y.; YANG, S.; HUANG, C.; TZEN, C.; HUANG, P.; SU, Y.; PAULUS S. WANG, P.S. Epinephrine promotes hemostasis in rats with cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Urology**, v. 67, p. 636–641, 2006.

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.

DANTAS, A.C.; BATISTA-JÚNIOR, F.F.; MACEDO, L.F.; MENDES, M.N.; AZEVEDO, I.M.; MEDEIROS, A.C. Protective effect of simvastatin in the cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Acta Cir Bras.**, v. 25, n. 1, p. 43-46, 2010.

DIETRICH, F.; MARTINS, J.P.; KAISER, S.; SILVA, R.B.M.; ROCKENBACH, L.; EDELWEISS, M.I.A.; ORTEGA, G.G.; MORRONE, F.B.; CAMPOS, M.M.; BATTASTINI, A.M.O. The Quinovic Acid Glycosides Purified Fraction from *Uncaria tomentosa* Protects against Hemorrhagic Cystitis Induced by Cyclophosphamide in Mice. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. 1-15, 2015.

DORNELLES, F.N.; ANDRADE, E.L.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Role of CXCR2 and TRPV1 in functional, inflammatory and behavioural changes in the rat model of cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 452–467, 2014.

DUGASANI, S.; PICHIKAC, M. R.; NADARAJAHC, V. D.; BALIJEPALLIC, M. K.; TANDRAA, S.; KORLAKUNTA, J. N. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. **Journal of ethnopharmacology**. v. 127, n. 2, p. 515-520, 2010.

EID, B.G.; MOSLI, H.; HASAN, A.; EL-BASSOSSY, H.M. Ginger Ingredients Alleviate Diabetic Prostatic Complications: Effect on Oxidative Stress and Fibrosis. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2017, 2017.

FARSHID, A. A.; TAMADDONFARD, E.; RANJBAR, S. Oral administration of vitamin C and histidine attenuate cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Indian J. Pharmacol.**, v. 45, p.126-129, 2013.

FDA Food and Drug Administration. **Cyclophosphamide for injection**. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/012141s090,012142s112lbl.pdf. Acesso em: 12 de setembro de 2017.

FDA Food and Drug Administration. **IFEX**. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/019763s016lbl.pdf. Acesso em: 12 de setembro de 2017.

FESHARAKI, M.; NASIMI, A.; MOKHTARI, S.; MOKHTARI, R.; MORADIAN, R.; AMIRPOOR, N. Reactive oxygen metabolites and anti-oxidative defenses in aspirin-induced gastric damage in rats: Gastroprotection by Vitamin E. **Pathophysiology**, v. 13, p. 237-243, 2006.

FRAISER, L.; KEHRER, J.P. Murine strain differences in metabolism and bladder toxicity of cyclophosphamide. **Toxicol.**, v. 75, p. 257-272, 1992

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

GIRARD, B.M.; CHEPPUDIRA, B.P.; MALLEY, S.E.; SCHUTZ, K.C.; MAY, V.; VIZZARD, M.A. Increased expression of interleukin-6 family members and receptors in urinary bladder with cyclophosphamide-induced bladder inflammation in female rats. **Frontiers in Neuroscience**, v.5, 2011.

GOODMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

GOMES, M.A.M.; MACÊDO NETO, N.C.; BISPO, I.G.A. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. **Rev SOCERJ.**, v. 22, n. 6, p. 398-403, 2009.

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. Res.**, v. 28, p. 1103-1108, 1995.

GRAY, K.J.; ENGELMANN, U.H.; JOHNSON, E.H.; FISHMAN, I.J. Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (cytoxan) therapy. **J. Urol.**, v. 136, N. 6, p. 497-500, 1986.

HALAWANY, A.M.; SAYED, N.S.; ABDALLAH1, H.M.; DINE, R.S. Protective effects of gingerol on streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: emphasis on inhibition of β -amyloid, COX-2, alpha-, beta - secretases and A β 1a. **Sci Rep.**, v. 7, n. 1, 2017.

HAMSA, T.P., KUTTAN, G. Protective role of *Ipomoea obscura* (L.) on cyclophosphamide-induced uro- and nephrotoxicities by modulating antioxidant status and pro-inflammatory cytokine levels. **Inflammopharmacology**, n. 19, p. 155–167, 2011.

HEGAZY, A.M.S.; MOSAED, M.M.; ELSHAFFEY, S.H.; BAYOMY, N.A. 6-gingerol ameliorates gentamicin induced renal cortex oxidative stress and apoptosis in adult male albino rats. **Tissue and Cell**, n. 48, p. 208–216, 2016.

HENSLEY, M.L.; HAGERTY, K.L.; KEWALRAMANI, T.; GREEN, D.M.; MEROPOL, N.J.; WASSERMAN, T.H.; COHEN, G.I.; EMAMI, B.; GRADISHAR, W.J.; MITCHELL,

- R.B.; THIGPEN, J.T.; TROTTI, A.; VON HOFF, D.; SCHUCHTER, L.M American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. **J Clin Oncol.**, v. 27, n. 1, p. 127-145, 2008.
- HOSSEINZADEH, A.; BAHRAMPOUR, J.K.; FATEMI, M.J.; KAMARUL, T.; BAGHERI, A.; TEKIYEHMAROOF, N.; SHARIFI, A.M. Protective Effect of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Extract against Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptosis Induced by Interleukin-1 β in Cultured Chondrocytes. **Cells Tissues Organs.**, 2017.
- IMANI, H.; TABIBI, H.2.; NAJAFI, I.; ATABAK, S.; HEDAYATI, M.; RAHMANI, L. Effects of ginger on serum glucose, advanced glycation end products, and inflammation in peritoneal dialysis patients. **Nutrition**, v.3, p.703-707, 2015.
- JOLAD, S.D.; LANTZ, R.C.; CHEN, G.J.; BATES, R.B.; TIMMERMANN, B.N. Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-stimulated PGE2 production. **Phytochemistry.**, v. 66, n. 13, p. 1614-1635, 2005.
- JOSHI, D.; SRIVASTAV, S.K.; SATEESH BELEMKAR, S.; DIXIT, V.A. *Zingiber officinale* and 6-gingerol alleviate liver and kidney dysfunctions and oxidative stress induced by mercuric chloride in male rats: A protective approach. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. 91, p. 645–655, 2017.
- JUNQUEIRA, A.S.M.; ROMÊO FILHO, L.J.M.; JUNQUEIRA, C.L.C.. Avaliação do grau de inflamação Vascular em Pacientes com Síndrome metabólica. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, n. 3 p. 360-366, 2009.
- KAFESHANI, M. Ginger, micro-inflammation and kidney disease. **Journal of Renal Endocrinology**, v. 4, p.1-2, 2015.
- KIM, J.K.; KIM, Y.; NA, K.M.; SURH, Y.J.; KIM, T.Y. [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression in vitro and in vivo. **Free Radic Res.**, v. 41, n. 5, p. 603-614, 2007.
- KIM, S.O; KUNDU, J.K.; SHIN, Y.K.; PARK, J.H.; CHO, M.H.; KIM, T.Y.; SURH, Y.J. [6]-Gingerol inhibits COX-2 expression by blocking the activation of p38 MAP kinase and NF-kappaB in phorbol ester-stimulated mouse skin. **Oncogene**, v. 7, v. 24, n. 15, p. 2558-2567, 2005.
- KIM, Y.; KIM, D.M.; KIM, J.Y. Ginger Extract Suppresses Inflammatory Response and Maintains Barrier Function in Human Colonic Epithelial Caco-2 Cells Exposed to Inflammatory Mediators. **J Food Sci.**, v. 82, n. 5, p. 1264-1270, 2017.
- KORKMAZ, TOPAL, OTER, A.; TOPAL, T.; OTER, 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**, v. 23, n. 5, p. 303-12, 2007.
- KUHAD, A.; TIRKEY, N.; PILKHWAL, S.; CHOPRA, K. 6-Gingerol prevents cisplatin-induced acute renal failure in rats. **BioFactors**, v. 26, n. 3, p. 189-200, 2006.

KUMAR, K.M.; ASISH, G.R.; SABU, M.; BALACHANDRAN, I. Significance of gingers (Zingiberaceae) in Indian System of Medicine - Ayurveda: An overview. **Anc Sci Life**, v. 32, n. 4, p. 253-261, 2013.

LEE, T.Y.; LEE, K.C.; CHEN, S.Y.; CHANGA, H. 6-gingerol inhibits ROS and iNOS through the mouse macrophages. **Biochemica and biophysical research communication**. v. 382, p. 134-139, 2009.

LEITE, C.V.G.; ALENCAR, V.T.L.; MELO, D.R.; MOTA, J.M.S.C.; MELO, P.H.; MOURÃO, L.T.C.; WONG, D. V. T.; MAGALHÃES, P. J. C.; SANTOS, A.A.; BRITO, G. A. C.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Target Inhibition of IL-1 Receptor Prevents Ifosfamide Induced Hemorrhagic Cystitis in Mice. **The Journal of Urology**, v. 194, p. 1777-1786, 2015

LEMOS JÚNIOR, H.P.; LEMO, A.L.A. Gengibre. **Diagn Tratamento**, v. 15, n. 4, p. 174-178, 2010.

LIMA, M. V. A. **Estudos dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da Cistite Hemorrágica induzida por Ciclofosfamida**. 1994. Dissertação de mestrado. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1994.

LIMA, M.V.; FERREIRA, F.V.; MACEDO, F.Y.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A. Histological changes in bladders of patients submitted to ifosfamide chemotherapy even with mesna prophylaxis. **Cancer Chemother Pharmacol**. n. 59, v. 5, p. 643-650, 2007.

LIU Z. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. **Cell Res.**, v. 15, p. 24-27. 2005.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))}. **Method. Methods.**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LU, J.; GUAN, S.; SHEN, X.; QIAN, W.; HUANG, G.; DENG, X.; XIE, G. Immunosuppressive activity of 8-gingerol on immune responses in mice. **Molecules**, v.16, n. 3, p. 2636-2645, 2011.

MACEDO, F. Y. B. Efeito protetor da interleucina- 4 (IL- 4) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos. 2010. Dissertação de Mestrado. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2010.

MACEDO, F. Y.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA, P.R.; TÁVORA, F.; FERREIRA, F.V.; SCHMITT, F.C.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A. Cyclooxygenase-2 expression on ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **J Cancer Res Clin Oncol**, n. 134, v. 1, p. 19-27, 2008b.

MACEDO, F.Y.; BALTAZAR, F.; MOURAO, L.C.; ALMEIDA, P.R.; MOTA, J.M.; SCHMITT, F.C.; RONALDO, R.A. Induction of COX-2 expression by acrolein in the rat model of hemorrhagic cystitis. **Exp Toxicol Pathol.**, v. 59, n. 6, p. 425-430, 2008a.

MACEDO, F.Y.B.; MOURÃO, L.T.C.; FREITAS, H.C.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; WONG, D.V.T.; ORIÁ, R.B. VALE, M.L.; BRITO, G.A.C.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.

Interleukin-4 Modulates the Inflammatory Response in Ifosfamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. **Inflammation**, v. 35, n. 1, 2012.

MANIKANDAN, R., KUMAR, S. & DORAIRAJAN, L. N. 2010. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. **Indian J. Urol**, n. 26, p. 159-66, 2010.

MARTINS; J.P.; RBM SILVA, R.B.M.; COUTINHO-SILVA,R.; TAKIYA, C.M.; BATTASTINI, A.M.O.; FB MORRONE, F.B.; CAMPO, M.M. The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, p. 183–196, 2012.

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

MORAES, J.P.; PEREIRA, D. S.; MATOS, A.S.; SANTANA, D.G.; SANTOS, C.A.; ESTEVAM, C.S.; FAKHOURI, R.; LUCCA JUNIOR, W.; CAMARGO, E.A. The Ethanol Extract of the Inner Bark of *Caesalpinia pyramidalis* (Tul.) Reduces Urinary Bladder Damage during Cyclophosphamide-Induced Cystitis in Rats. **The Scientific World Journal**, 2013.

MOTA, J.M.; BRITO, G.A.; LOIOLA, R.T.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Interleukin-11 Attenuates Ifosfamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. **International Braz J Urol.**, v. 33, n. 5, p. 704-710, 2007.

MOY, B. **Cystitis in patients with câncer**. UpToDate, 2016. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/cystitis-in-patients-with-cancer#H15>. Acesso em: 20 de agosto de 2016.

NIH National Cancer Institute. **Cyclophosphamide**. Disponível em: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/cyclophosphamide>. Acesso em: 12 de setembro de 2017.

NISHII, H.; NOMURA, M.; FUJIMOTO, N.; MATSUMOTO, T. Up-regulation of interleukin-6 gene expression in cyclophosphamide-induced cystitis in mice: An in situ hybridization histochemical study. **International Journal of Urology**, v. 13, p. 1339–1343, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thyobarbituric Acid Reaction. **Anal Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PAYNE, H.; ADAMSON, A.; BAHL, A.; BORWELL, J.; DODDS, D.; HEATH, C.; HUDDART, R.; MCMENEMIN, R.; PATEL, P.; PETERS, J.; THOMPSON, A. Chemical- and radiation-induced haemorrhagic cystitis: current treatments and challenges. **BJU Int.**, v. 112, p. 885–897, 2013.

PEREIRA, D.S.; MORAIS, J.P.; SANTANA, D.G.; SANTOS, C.A.; THOMAZZI, S.M.; SANTOS, C.E.; ANTONIOLLI, A.R.; BEZERRA, D.P.; CAMARGO, E.A. Effects of the ethanol extract of the inner bark of *Syderoxylum obtusifolium* in the cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **J. Med. Plants Res.**, v.7, n. 20, p. 1411-1417, 2013.

PÉREZ, L.O.D.; BERTHA, B.; FERRERI, S.; ABRAHAMI, C.M.; SUÁREZI, V.M.; SEGURAI, M.S.; DÍAZI, R.M.L.D.; LINARES, J.C.M. Efecto in vitro de una solución de *Zingiber officinale* Rosc. (jengibre) sobre la respuesta de linfocitos humanos de donantes sanos y enfermos con inmunodeficiencia celular. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 26, n. 1, p. 216-222. 2010

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

RIBEIRO, R. A.; LIMA-JUNIOR, R. C.; LEITE, C. A.; MOTA, J. M.; MACEDO, F. Y.; LIMA, M. V.; BRITO, G. A. Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches and new insights. **J. Exp. Integr.Med.**, v. 2, n. 2, p. 95-112, 2012.

RIBEIRO, R.A.; FREITAS, H.C.; CAMPOS, M. C.; SANTOS, C.C.; FIGUEIREDO, F.C.; BRITO, G.A.C; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **J Urol**, n. 150, p. 2229–2234, 2002.

RODRIGUES, F.A.; PRATA, M.M.; OLIVEIRA, I.C.; ALVES, N.T.; FREITAS, R.E.; MONTEIRO, H.S.; SILVA, J.A.; VIEIRA, P.C.; VIANA, D.A.; LIBÓRIO, A.B.; HAVT, A. Gingerol fraction from *Zingiber officinale* protects against gentamicin-induced nephrotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, p.1872-1878, 2014.

RODRIGUES, F.A.P. **[6]-gingerol e [10]-gingerol modulam as alterações renais promovidas por modelo polimicrobiano de septicemia em ratos**. 2017. Tese de doutorado. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2017.

RODRIGUES, F.A.P. **Efeitos da fração contendo [6]-, [8]- e [10]-gingerol isolados do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) na nefrotoxicidade induzida por gentamicina em ratos**. 2013. Dissertação de Mestrado. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2013

SADIR, S.; DEVECI, S.; KORKMAZ, TOPAL, OTER, A.; OBTER, S. Alpha-tocopherol, beta-carotene and melatonin administration protects cyclophosphamide-induced oxidative damage to bladder tissue in rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 25, n. 5, p. 521-6, 2007.

SANTOS-JÚNIOR, A.A.; LEAL, P.C.; EDELWEISS, M.I.A.; LOPES, T.G.; CALIXTO, J.B.; MORRONE, F.B.; CAMPOS, M.M. Effects of the compounds MV8608 and MV8612 obtained from *Mandevilla velutina* in the model of hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide in rats. **Naunyn –Schmiedeberg’s Arch Pharmacol.**, v. 382, p. 399-407, 2010.

SAYED-AHMED, M.M.; DARWEESH, A.Q.; FATANI, A.J. Carnitine deficiency and oxidative stress provoke cardiotoxicity in an ifosfamide-induced Fanconi Syndrome rat model. **Oxid Med Cell Longev**. v. 3, n. 4, p. 266–274, 2010.

SEDLAK, J.; LIDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SENER, G.; SEHIRLI, O.; YEGEN, B.C.; CETINEL, S.; GEDIK, N.; SAKARCAN, A. Melatonin attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats. **J Pineal Res**, v. 37, p. 17-25, 2004.

SHERIF, I.O.; NAKSHABANDI, Z.M.; MOHAMED, M.A.; SARHAN, O.M. Uroprotective effect of oleuropein in a rat model of hemorrhagic cystitis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, n.74, p. 12–17, 2016.

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

SILVA NETO, A. G. **Estudo dos efeitos vasculares e renais causados pelo 6- gingerol isolado do gengibre**. 2012. Dissertação de mestrado. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2012.

SILVA, D.L.F.; BRAGA FILHO, J.A.F.; SOUSA, A.K.S.; FORTES, T.; AMARAL, F.M.M.; SILVA, L.A.; GUERRA, R.N.M.; GONÇALVES FILHO, A.; PEREIRA, W.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Potencial anti-inflamatório das folhas de *chenopodium ambrosioides* L. No modelo de cistite hemorrágica em camundongos. **Rev. Ciênc. Saúde**, v.17, n.1, p. 25-32, 2015.

SILVA, J.A.; BECCENERI, A.B.; MUTTI, H. S.; MARTIN, A.C.M.; SILVA, M.F.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; COMINETTI, M,R. Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumorcell lines. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 15, p. 157-62, 2012.

SINANOGLU, O. YENER, A.N.; EKICI, S.; MIDI, A.; AKSUNGAR, F.B. The protective effects of spirulina in cyclophosphamide induced nephrotoxicity and urotoxicity in rats. **Urology**, v. 80, n. 2, 2012.

SIU, L.L.; MOORE, M.J. Use of mesna to prevent ifosfamide-induced urotoxicity. **Care Cancer**, v. 6, p. 144–154, 1998.

SOUZA-FILHO, M.V.P.; LIMA, M.V A.; POMPEU, M.M.L; BALLEJO, L.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, A.R. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am J Pathol**, v. 150, p. 247–256, 1997.

TAKAMOTO, S.; SAKURA, N.; NAMERE A. Monitoring of urinary acrolein concentration in patients receiving cyclophosphamide and ifosfamide. **J. Chromatogr.B Analyt.Technol. Biomed.Life Sci.**,v. 806, p. 59-63, 2004.

TZENG, T.; SHORONG-SHII LIOU; CHANG, C.J.; LIU, I. 6-Gingerol Protects against Nutritional Steatohepatitis by Regulating Key Genes Related to Inflammation and Lipid Metabolism. **Nutrients**, v. 7, p. 999-1020, 2015.

VASCONSELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.L.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VIEIRA, M. M.; BRITO, G. A.; BELARMINO-FILHO, J. N.; MCEDO, F. Y.; NERY, E. A.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Use of dexamethasone with mesna for the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Int. J. Urol.**, v. 10, p. 595–602, 2003.

VIEIRA, M.M.; MACÊDO, F.Y.; FILHO, J.N.; COSTA, A.C.; CUNHA, A.N.; SILVEIRA, E.R.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A. Ternatin, a flavonoid, prevents cyclophosphamide and ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Phytother. Res.**, v. 18, n. 2, p. 135–141, 2004.

WANG, D.; WANG, H. Oxazaphosphorine bioactivation and detoxification The role of xenobiotic receptors. **Acta Pharm Sin B.**, v. 2, n. 2, 2012.

YILMAZ, N.; EMMUNGIL, H.; GUCENMEZ, S et al. Incidence of cyclophosphamide-induced urotoxicity and protective effect of mesna in rheumatic diseases. **J Rheumatol**, v. 42, p. 1661-1666, 2015.

ZHANG, F.; MA, N.; GAO, Y.; SUN, L.; ZHANG, J. Therapeutic Effects of 6-Gingerol, 8-Gingerol, and 10-Gingerol on Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute Ulcerative Colitis in Rats. **Phytother. Res.**, .n. 31, p. 1427–1432, 2017.

ZHANG, J.; TIAN, Q.; ZHOU, S. Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. **Current Drug Therapy**, v. 1, n. 1, p. 55-84, 2006.