



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

KÁLYAN NOGUEIRA SOUSA

**EFEITO PROTETOR DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*
Lamarck NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA EM
CAMUNDONGOS**

FORTALEZA - CEARÁ

2017

KÁLYAN NOGUEIRA SOUSA

EFEITO PROTETOR DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* Lamarck 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: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S697e Sousa, Kályan Nogueira.
EFEITO PROTETOR DA LECTINA DE SEMENTES DE Moringa oleifera Lamarck NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS / Kályan Nogueira Sousa. – 2017.
92 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar.
1. Cistite hemorrágica. 2. Moringa oleifera. 3. Proteína ligante à quitina. I. Título.

CDD 615.1

KÁLYAN NOGUEIRA SOUSA

EFEITO PROTETOR DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* Lamarck 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 Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 18/12/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ingrid Samantha Tavares de Figueiredo Braz
Centro Universitário Estácio do Ceará (ESTÁCIO-FIC)

Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus.

À minha mãe, Leide, principal responsável por mais esta conquista, que nunca mediu esforços para me proporcionar uma educação com qualidade. Sem o seu incentivo, amor e compreensão eu não teria chegado até aqui.

À minha irmã, Ana Clara, por todo carinho e amizade à mim dedicados.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por nunca me abandonar nos momentos de aflição e angústia, por ter me proporcionado saúde, otimismo e perseverança para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar, por seu exemplo não apenas como professora, mas como amiga; pelo apoio, confiança, ensinamentos e por estar sempre presente em nosso dia-a-dia com palavras de sabedoria e bondade.

Às queridas companheiras de laboratório Luana David, Gisele Pinheiro e Marília Nunes, por toda amizade, incentivo, ajuda, conselhos e por estarem sempre dispostas a ajudar.

À todos que fazem parte da “família” LFB, Patrícia Sâmara, Manuel Monteiro, Patrícia Bastos, Tamiris Goebel, Larisse Marques e Daniele Teixeira, por toda a ajuda e por tornarem a convivência do laboratório tão leve e agradável.

Aos estudantes de iniciação científica, Yuri, Fernanda, Anna Thawany e Monalisa por todo o auxílio durante os experimentos e dedicação.

Aos professores e colegas do LAFICA, por toda parceria e ajuda imprescindível.

Ao Laboratório de Toxinas Vegetais, sob a coordenação da Profa. Dra. Ilka Maria, em especial ao Tiago, pela colaboração no isolamento, purificação, liofilização e fornecimento da *Mo*-CBP₄.

À Profa. Dra. Renata Leitão, por toda a disponibilidade, ensinamentos, colaboração nas análises histopatológicas e imunohistoquímicas deste trabalho e por ter aceitado participar da banca de defesa.

À Profa. Dra. Gerly Anne pela autorização para que eu pudesse, com o auxílio do Júnior, confeccionar as lâminas para a análise histopatológica e imunohistoquímica.

Às Profas. Dras. Danielle Macêdo Gaspar, Mariana Lima Vale e Karoline Sabóia Aragão por terem aceitado participar da banca de qualificação, pelas correções e sugestões para a melhoria deste trabalho.

À Profa. Dra. Ingrid Samantha Tavares por ter aceitado participar da banca de defesa e pelas excelentes colaborações.

À toda a minha família que me incentivou de forma direta ou indireta, em especial à Lyara Freitas, pelo grande auxílio para que eu pudesse iniciar o mestrado.

Ao veterinário do NPDM, Wesley Lyeverton, por toda a atenção e responsabilidade.

À CAPES, CNPq e FUNCAP, pelo apoio financeiro.

À todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho e não foram aqui citados.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”

(Platão)

RESUMO

EFEITO PROTETOR DA LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* Lamarck NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS

A cistite hemorrágica é um efeito colateral de agentes antineoplásicos pertencentes ao grupo das oxazafosforinas (ifosfamida e ciclofosfamida) e isso ocorre devido à formação do metabólito urotóxico acroleína. *Moringa oleifera* Lamarck é uma planta pertencente à família Moringaceae encontrada principalmente no Nordeste do Brasil. A lectina isolada de suas sementes denominada de *Mo*-CBP₄ (*Mo*: *Moringa oleifera* e CBP: “chitin-binding protein”) possui potentes atividades anti-inflamatória e antinociceptiva, portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de *Mo*-CBP₄ na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. A cistite hemorrágica foi induzida em camundongos swiss fêmeas (n=6) pela administração de ifosfamida (400 mg/kg i.p.) e como grupo controle negativo os animais foram tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.). Nos outros grupos experimentais os animais foram tratados com mesna (80 mg/kg i.p.) e *Mo*-CBP₄ (10, 20 e 40 mg/kg e.v.) 30 min antes, 4h e 8h após a injeção de ifosfamida. Após 12 horas de administração de ifosfamida, os animais foram eutanasiados e coletadas as bexigas para avaliar o edema, hemorragia, atividade de mieloperoxidase (MPO), contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos e linfócitos), parâmetros histopatológicos, dosagem de citocinas (IL-1 β , IL-8 e TNF- α), imunomarcção de COX-2 e quantificação de glutathiona (GSH). A análise estatística foi realizada utilizando os testes ANOVA/Bonferroni ou Kruskal Wallis/Dunn; Os valores de P<0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Inicialmente, *Mo*-CBP₄ nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg promoveu a redução do peso úmido vesical em 24,29%, 50,80%, 61,18% respectivamente. Apresentou um efeito protetor na análise em escores macroscópica e histopatológica, onde *Mo*-CBP₄ nas doses de 20 e 40 mg/kg foi capaz de prevenir a formação de edema, porém apenas a dose de 40mg/kg foi eficaz em prevenir a hemorragia e a lectina na dose de 10 mg/kg não teve nenhum efeito sobre a formação de ambos os parâmetros. *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg) preveniu o aumento da permeabilidade vascular (60%) e promoveu a redução da atividade de MPO (85%). Na contagem diferencial tecidual de leucócitos também promoveu redução do número de linfócitos (75%) e neutrófilos (77%) e foi capaz de prevenir a liberação de citocinas inflamatórias IL-1 β (26,69%), IL-8 (53,16%) e TNF- α (19,75%). Além disso, promoveu redução da imunomarcção de COX-2 e manteve a concentração de GSH (80,55%) semelhante a dos animais normais. Assim, o conjunto de resultados demonstrou que *Mo*-CBP₄ tem ação anti-inflamatória na cistite hemorrágica experimental induzida pela ifosfamida atuando na

prevenção da formação de edema, diminuição da migração leucocitária, redução das concentrações de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-8 e TNF- α), redução da imunomarcação de COX-2 e inibindo a redução da concentração de GSH.

Palavras chave: Cistite hemorrágica, *Moringa oleifera*, proteína ligante à quitina.

ABSTRACT

PROTECTIVE EFFECT OF LINGING OF *Moringa oleifera* Lamarck IN HEMORRHAGIC CYSTITIS INDUCED BY IFOSFAMIDE IN MICE

A hemorrhagic cystitis is a side effect of antineoplastic agents belonging to the oxazaphosphorines group (ifosfamide and cyclophosphamide) and this occurs due to the formation of the urotoxic metabolite acrolein. *Moringa oleifera* Lamarck is a plant belonging to the family Moringaceae found mainly in the Northeast of Brazil. An isolated molecule of its *Mo*-CBP₄ (*Mo*: *Moringa oleifera* and CBP: "chitin-binding protein") seeds has potent anti-inflammatory and antinociceptive activities, therefore the present study had as objective to evaluate the effect of *Mo*-CBP₄ in hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide. Hemorrhagic cystitis was induced in female swiss mice (n=6) by administration of ifosfamide (400 mg/kg i.p.) and as negative control group the animals were treated with sterile saline solution (NaCl 0.9%, i.p.). In the other experimental groups of animals treated with Mesna (80 mg/kg i.p.) and *Mo*-CBP₄ (10, 20 and 40 mg/kg e.v.) 30 min before, 4 h and 8 h after an ifosfamide injection. After 12 hours of ifosfamide administration, the animals were euthanized and collected as bladders to evaluate edema, hemorrhage, myeloperoxidase activity (MPO), differential leukocyte count (neutrophils and lymphocytes), histopathology, cytokine (IL-1 β , IL-8 and TNF- α), COX-2 immunoblotting and quantitation of glutathione (GSH). Statistical analysis was performed using the ANOVA/Bonferroni or Kruskal Wallis/Dunn tests; Values of P < 0.05 were considered statistically significant. Initially, *Mo*-CBP₄ at doses of 10, 20 and 40 mg/kg promoted a reduction in bladder weight in 24.29%, 50.80%, 61.18% respectively. It had a protective effect in macroscopic and histopathological analysis, where *Mo*-CBP₄ at doses of 20 and 40 mg/kg for preventing edema formation, but only a dose of 40 mg/kg was effective in preventing bleeding and lectin at the dose of 10 mg/kg had no effect on the formation of both parameters. *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg) prevented vascular permeability (60%) and reduced the MPO activity (85%). In the differential leukocyte count also promoted a reduction in the number of lymphocytes (75%) and neutrophils (77%) and was able to prevent the release of inflammatory cytokines IL-1 β (26.69%), IL-8 (53.16%) and TNF- α (19.75%). In addition, it promoted reduction of COX-2 immunostaining and maintained the GSH concentration (80.55%) similar to that of normal animals. Thus, the set of results demonstrated that *Mo*-CBP₄ has anti-inflammatory action in the experimental hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide acting on the prevention of edema formation, decreasing leukocyte migration, reducing of inflammatory cytokines concentrations (IL-1 β , IL-8 and TNF- α), reduction of COX-2 immunolabeling and

inhibiting reduction of concentration from GSH.

Keywords: Hemorrhagic cystitis, *Moringa oleifera*, chitin binding protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ativação e metabolismo da ciclofosfamida e da ifosfamida.....	23
Figura 2	Cascata de eventos sequenciais na cistite hemorrágica.....	26
Figura 3	Caminhos propostos para a patogênese da cistite hemorrágica.....	29
Figura 4	Representação esquemática da inativação de metabólitos de ifosfamida por mesna na bexiga urinária.....	31
Figura 5	A) Estrutura molecular do Mesna (2-mercaptoetanossulfonato de sódio) B) DiMESNA (ditioldietasulfonato de sódio).....	32
Figura 6	Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.....	33
Figura 7	<i>Moringa oleifera</i> Lamarck. (A) Árvore de <i>Moringa oleifera</i> ; (B) Frutos imaturos; (C) Frutos maduros; (D) Sementes aladas.....	36
Figura 8	Esquema de purificação de <i>Mo</i> -CBP ₄ a partir da farinha delipidada das sementes de <i>Moringa oleifera</i>	48
Figura 9	Protocolo experimental.....	50
Figura 10	Fotografias das bexigas dos grupos experimentais na análise macroscópica	58
Figura 11	Fotomicrografias de bexigas. Análise histopatológica representativa das paredes da bexiga coradas por HE (40x).....	60
Figura 12	Fotomicrografias de bexigas. Análise imunohistoquímica representativa das bexigas com imunomarcção para COX-2 (400x).....	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ e Mesna no peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	56
Gráficos 2 A e B	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ e Mesna sobre os aspectos macroscópicos de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	57
Gráfico 3	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ e Mesna no aumento da permeabilidade vascular na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	59
Gráfico 4	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ e Mesna na redução da imunomarcção de COX-2 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	62
Gráfico 5	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ e Mesna sobre a migração de neutrófilos na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	63
Gráficos 6 A, B e C	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ e Mesna no infiltrado inflamatório de leucócitos, linfócitos e neutrófilos na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida....	65
Gráficos 7 A, B e C	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ e Mesna na redução da liberação de IL-1 β , IL-8 e TNF- α na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	67
Gráfico 8	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ e Mesna no aumento da concentração de glutathiona na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ e Mesna sobre os aspectos macroscópicos de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	57
Tabela 2	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ e Mesna na análise histopatológica na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Grau centígrado
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX-2	Cicloxigenase 2
DiMESNA	Ditioetano-sulfonato de sódio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dra	Doutora
DTNB	Ácido 5,5 ditiobis(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	Erro padrão da média
fMLP	Peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
Funcap	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
g	Grama
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
h	Hora
HE	Hematoxilina-eosina
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IFO	Ifosfamida

IL-10	Interleucina-10
IL-1R	Receptor de interleucina 1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
INCA	Instituto Nacional de Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRAK4	<i>Interleukin-1 receptor-activated protein kinase</i>
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LFB	Laboratório de Farmacologia Bioquímica
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Metro
M	Molar
MDA	Malondialdeído
MESNA	2-mercaptoetanossulfonato de sódio
mg	Miligrama
Min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mo-CBP	<i>M. oleifera – chitin-binding protein</i>
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADPH	Nitrato redutase
NaEDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio
NaPO ₄	Fosfato de sódio
NF- κ B	Fator nuclear κ B
nm	Nanômetro

NO	Óxido nítrico
NO ²	Nitrito
NO ³⁻	Nitrato
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
O ₂ ⁻	Superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPD	O-fenilenodiamina
PARP	Poli adenosina difosfato ribose polimerase
PBS	Tampão fosfato salina
PGE2	Prostaglandina E2
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico
Profa	Professora
rhIL-11	Interleucina 11 humana recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
Th2	T <i>helper</i> 2
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-R1	Recetor de fator de necrose tumoral- α do tipo 1
TNF-R2	Receptor de fator de necrose tumoral- α do tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UFC	Universidade Federal do Ceará
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Câncer.....	20
1.2	Oxazafosforinas.....	21
1.3	Cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.....	24
1.3.1	Patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas.....	24
1.3.2	Uroproteção na cistite hemorrágica.....	30
1.4	Lectinas e atividades biológicas: inflamação.....	32
1.5	<i>Moringa oleifera</i> Lamarck.....	35
1.6	Lectina isolada das sementes de <i>Moringa oleifera</i> Lamarck: <i>Mo-CBP₄</i>	39
2	JUSTIFICATIVA	42
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo geral.....	44
3.2	Objetivos específicos.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	Fármacos, corantes, reagentes e anticorpos.....	45
4.2	Equipamentos e materiais.....	46
4.3	Animais.....	46
4.4	Isolamento e purificação da lectina de <i>Moringa oleifera</i> Lamarck (<i>Mo-CBP₄</i>)..	47
4.5	Protocolo experimental.....	48
4.5.1	Indução da Cistite Hemorrágica.....	48
4.5.2	Avaliação do efeito da <i>Mo-CBP₄</i> na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	49
4.5.3	Grupos experimentais.....	49
4.6	Parâmetros avaliados na Cistite Hemorrágica.....	50
4.6.1	Avaliação do Peso Úmido Vesical.....	50
4.6.2	Análise Macroscópica.....	50
4.6.3	Quantificação da Permeabilidade Vascular pelo Método do Azul de Evans.....	51
4.6.4	Análise Histopatológica.....	51
4.6.5	Imunohistoquímica.....	52
4.6.6	Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO).....	53
4.6.7	Contagem Diferencial Leucocitária.....	54

4.6.8	Dosagem de Citocinas.....	54
4.6.9	Quantificação de Glutathiona.....	54
4.7	Análise Estatística.....	55
5	RESULTADOS	56
5.1	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ no peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	56
5.2	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ na análise macroscópica para edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	56
5.3	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ no aumento da permeabilidade vascular vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	58
5.4	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ em parâmetros histopatológicos na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	59
5.5	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ na imunomarcção de COX-2 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	61
5.6	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ na atividade de mieloperoxidase na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	63
5.7	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ na redução do infiltrado linfocitário e neutrofílico na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	64
5.8	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ nas concentrações de IL-1 β , IL-8 e TNF- α na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	66
5.9	Efeito de <i>Mo</i> -CBP ₄ na concentração de glutathiona na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	68
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO	79
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma patologia caracterizada por uma multiplicação exacerbada de células cancerosas. A célula se torna cancerosa quando a célula normal sofre mutação genética e passa a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes denominados de protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando se tornam ativos, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização das células normais. Essas células malignas podem se espalhar rapidamente por diversos órgãos desencadeando um processo chamado de metástase (INCA, 2017).

Essa patologia representa um grave problema de saúde pública, principalmente entre os países em desenvolvimento, pois representa a causa de morte que gera um maior impacto econômico, especialmente para o Sistema Único de Saúde (SUS), sendo a segunda maior causa de mortes em todo o mundo (KNUST *et al.*, 2017).

Estima-se que para o ano 2030, a ocorrência de 27 milhões de casos e 12,6 milhões de mortes pela doença (WHO, 2014). Segundo a OMS, em 2015 essa patologia ocasionou 8,8 milhões de mortes e os tipos de câncer que mais causam óbito são: pulmão (1,69 milhão de mortes), fígado (788.000 mortes), colorretal (774.000 mortes), gástrico (754.000 mortes) e mama (571.000 mortes). Esse alto índice de mortalidade tem maior destaque para os países africanos e isso está diretamente relacionado à sua baixa disponibilidade de centros para tratamento, cirurgia e quimioterapia. Apenas dois terços dos países em todo o mundo têm esses serviços geralmente disponíveis, com destaque para os países desenvolvidos (OMS, 2017).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (2016), a estimativa para o Brasil no biênio 2016-2017 aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer. Com exceção do câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos dessa patologia. O perfil epidemiológico observado destaca os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres como os mais frequentes. Os tipos mais frequentes em homens são próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) estarão entre os principais.

A alta incidência dos diferentes tipos de câncer está relacionada, principalmente,

aos fatores de risco relacionados, tais como: consumo de tabaco, excesso de peso ou obesidade, má alimentação, sedentarismo, consumo de bebidas alcoólicas, infecções causadas por papilomavírus humano, infecções causadas pelo vírus da hepatite, radiações ionizantes ou ultravioletas e poluição do ar. O tabagismo é o fator de risco que ocasiona cerca de 22% das mortes mundialmente. Portanto, cerca de 30 a 50% dos cânceres podem ser evitados e se detectado precocemente as chances de cura são bastante elevadas (OMS, 2017).

A terapia clínica para tratamento do câncer é realizada com diferentes classes de drogas antineoplásicas que atuam de forma inespecífica lesando células neoplásicas e normais, ocasionando os efeitos colaterais desses fármacos. Já é bem relatado na literatura a alta prevalência de efeitos colaterais associados a quimioterapia do câncer, com destaque para náuseas, alopecia, vômitos, mielossupressão, mucosite intestinal e oral, cistite hemorrágica, dentre outros (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999).

Efeitos colaterais como mucosite intestinal e oral bem como a cistite hemorrágica comprometem de forma considerável a qualidade de vida dos pacientes, visto que acarretam, principalmente, a dor por consequência do processo inflamatório e, apesar da busca incessante por novas moléculas que possam vir a serem utilizadas como fármacos, ainda não há nenhum tratamento medicamentoso específico curativo, há somente tratamentos paliativos e profiláticos que objetivam minimizar o desconforto dos pacientes.

1.2 Oxazafosforinas

As oxazafosforinas, ciclofosfamida e ifosfamida, são agentes alquilantes que estão entre as drogas citotóxicas mais utilizadas, sendo ativas contra muitos tipos de doenças neoplásicas e benignas (HUNTER; HARRISON, 1982). A ciclofosfamida começou a ser introduzida à quimioterapia clínica do câncer em meados da década de 1940 e a ifosfamida foi desenvolvida em meados dos anos 60 e introduzida na prática clínica no início da década de 1970. Esses fármacos são usados como um único agente para o tratamento de doenças auto-imunes e neoplasias, mas mais frequentemente vêm sendo utilizados em combinação com outros agentes antineoplásicos para o tratamento de um amplo espectro de tumores sólidos e neoplasias malignas hematológicas. Essa associação com outros agentes quimioterápicos tem como objetivo obter um efeito antineoplásico aditivo (ZHANG *et al.*, 2006).

As oxazafosforinas por serem pró-fármacos necessitam passar pelo metabolismo

hepático para formar sua forma ativa. A ciclofosfamida ao ser metabolizada pelas enzimas do citocromo P450 é convertida em 4-hidroxíciclofosfamida e seu tautômero a aldoifosfamida, a qual é responsável pela formação de mostarda de fosforamida e acroleína. A mostarda é o metabólito responsável pela ação alquilante do fármaco, onde promove alquilação do DNA para formar ligações cruzadas DNA-DNA, inibição da síntese de DNA e apoptose celular, e a acroleína pelo dano urotelial. A via de formação de 4-hidroxíciclofosfamida também pode originar outros metabólitos, tais como 4-oxociclofosfamida, iminociclofosfamida e carboxifosfamida (LI *et al.*, 2010).

A ifosfamida apresenta uma transformação metabólica bastante semelhante com a ciclofosfamida, mas necessita de doses superiores por sofrer maior inativação metabólica. Durante o metabolismo, um grupamento cloroetil é deslocado para o anel nitrogenado e isto conduz a diferenças físico-químicas, como maior solubilidade em água. Uma via metabólica principal para esse fármaco é a desalquilação de cadeia lateral para produzir 2- e 3-decloroetilifosfamida juntamente com 2-cloroacetaldeído e 2-cloroetilamina. Sabe-se que 2-cloroacetaldeído pode levar à formação de S-carboximetilcisteína através da conjugação com cisteína ou glutatona e é transformado em ácido tiodiglicólico. S-carboximetilcisteína pode ser responsável por encefalopatia e ácido tiodiglicólico por disfunção mitocondrial, que também pode contribuir para os efeitos colaterais associados ao tratamento com ifosfamida. A ifosfamida também promove maior formação de cloroacetaldeído, metabólito que pode ocasionar nefrotoxicidade e neurotoxicidade (LI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2006).

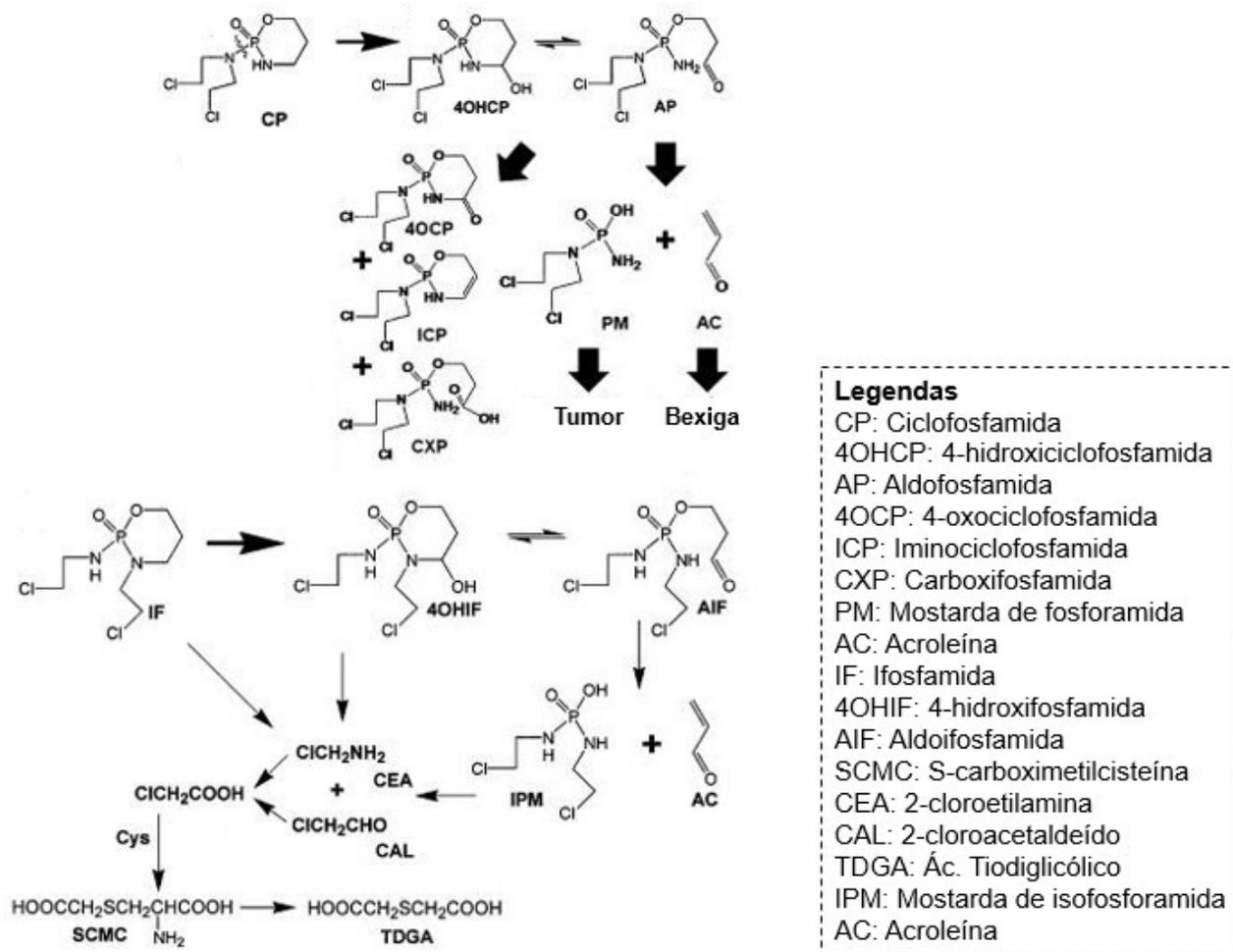


Figura 1. Ativação e metabolismo da ciclofosfamida e da ifosfamida (Adaptado de LI *et al.*, 2010).

Em comparação com a ciclofosfamida, a ifosfamida é mais eficaz em uma diversidade de neoplasias malignas e apresenta atividade contra uma variedade de tumores, incluindo carcinoma de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de bexiga, câncer do colo do útero, osteosarcoma, neuroblastoma, mieloma múltiplo e linfomas (ARLAND *et al.*, 2001; BERRAK *et al.*, 2005; BIAGI *et al.*, 2005; BUDA *et al.*, 2003; DONFRANCESCO *et al.*, 2004; GONZALEZ-MARTIN *et al.*, 2002; HUSSAIN; JAMES, 2003; KIM *et al.*, 2004; KOSMAS *et al.*, 2003; MASTERS *et al.*, 1998).

Assim como outras classes de antineoplásicos, as oxazafosforinas desencadeiam uma série de efeitos colaterais e isso se dá devido a ação não-específica dos agentes quimioterápicos, lesando células malignas e normais (MURAD; KATZ, 1996).

Inicialmente, a ifosfamida começou a ser administrada em pequenas doses diárias mostrando boa tolerância. Em seguida, doses únicas elevadas foram utilizadas mostrando

uma maior eficácia, mas gerando urotoxicidade grave. A urotoxicidade representa o principal efeito colateral ocasionado pelas oxazafosforinas, bem como nefrotoxicidade e neurotoxicidade. À fim de reduzir a urotoxicidade, inicialmente era necessário o fracionamento da dose de ifosfamida durante 5 dias. Apesar de desencadear esses efeitos colaterais, a ifosfamida é um fármaco relativamente bem tolerado, mas também pode originar, ocasionalmente, complicações potencialmente fatais como: arritmias, insuficiência cardíaca e encefalopatia grave, que ocorrem quando é administrada em altas doses (COHEN *et al.*, 1975; ZHANG *et al.*, 2006).

1.3 Cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas

A cistite hemorrágica (CH) é um processo inflamatório não-infeccioso caracterizado principalmente por hemorragia difusa e edema na bexiga urinária. É ocasionada de forma dose-dependente, mais frequente com o uso da ifosfamida, através da inativação da ifosfamida por N-descloroetilação gerando a acroleína que entra em contato com o urotélio causando ulceração (BRYANT *et al.*, 1980). Alguns autores sugerem que a excreção urinária da mostarda de fosforamida, mostarda de isofosforamida e metabólitos como o cloroacetaldeído também podem estar envolvidos na urotoxicidade (COLVIN, 1982; NORPOTH, 1976; WAGNER *et al.*, 1980).

Em um estudo com pacientes pediátricos e adultos jovens com tumores sólidos em tratamento com ifosfamida, a cistite hemorrágica foi prevalente em 9 dentre 70 pacientes em 14 de 425 ciclos de quimioterapia, além disso foi demonstrando que o risco de CH é dependente da dose de ifosfamida (SAITO *et al.*, 2016).

O diagnóstico de CH é realizado através de sintomas como: hematúria, disúria, urgência e aumento da frequência urinária e é confirmado através da cistosopia (DEVRIES; FREIHA, 1990). Essa patologia pode ser classificada em três estágios: leve, moderada e severa. O tratamento dessa inflamação em estágio leve pode ser realizado em regime ambulatorial com hidratação e é um processo de natureza transitória. A moderada pode requerer a extração do coágulo via cistosopia, irrigação contínua da bexiga e instilação de agentes na bexiga. A severa pode requerer transfusões e até mesmo cistectomia (MATZ; HSIEH, 2017).

1.3.1 Patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas

A patogênese da cistite hemorrágica pode ser classificada em 4 fases: iniciação, sinalização ou inflamatória, ulcerativa ou sintomática e fase de resolução, como

demonstra a figura 2 (RIBEIRO *et al.*, 2012). A fase de iniciação ocorre após o acúmulo de acroleína na bexiga, causando o dano urotelial. A acroleína é encontrada em fumaça de cigarros e industrialmente é utilizada como herbicida. É um aldeído altamente reativo α,β -insaturado que reage com nucleófilos de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e depleta as reservas de agentes nucleófilos como a glutatona (KEHRER; BISWAL, 2000).

Além dos efeitos diretos sobre as macromoléculas celulares, a acroleína ativa espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) que induzem a ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B que é encontrado no citoplasma ligado à proteína inibitória I- κ B. A ser exposta à ROS, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), I- κ B é degradada e libera NF- κ B para o núcleo celular e lá promove a ativação de genes relacionados a inflamação. A fase inflamatória da CH ocorre devido a essa ativação de NF- κ B e liberação de citocinas pró inflamatórias pelas células epiteliais e conjuntivas residentes como os macrófagos. Além disso, também ocorre a ativação das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase 2 (COX-2) e há o recrutamento de leucócitos que são contribuintes importantes para a resposta inflamatória (LAWRENCE, 2009; LIU, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2012).

A ativação de iNOS ocasiona a formação de óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO⁻). Quando o peroxinitrito é formado, ele pode desencadear danos à proteínas, DNA e lipídios, onde o acúmulo de danos no DNA resulta na depleção de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD⁺) e adenosina trifosfato (ATP) acarretando morte celular (LAWRENCE, 2009; LIU, 2005).

A fase sintomática da CH é caracterizada por formação de úlceras, ocasionando dor visceral e disfunção da bexiga. A fase de resolução envolve o reparo tecidual com possível sinalização dos fibroblastos e a liberação local de fatores de crescimento de queratinócitos promovendo assim a cura (MACEDO *et al.*, 2012; ULICH *et al.*, 1997).

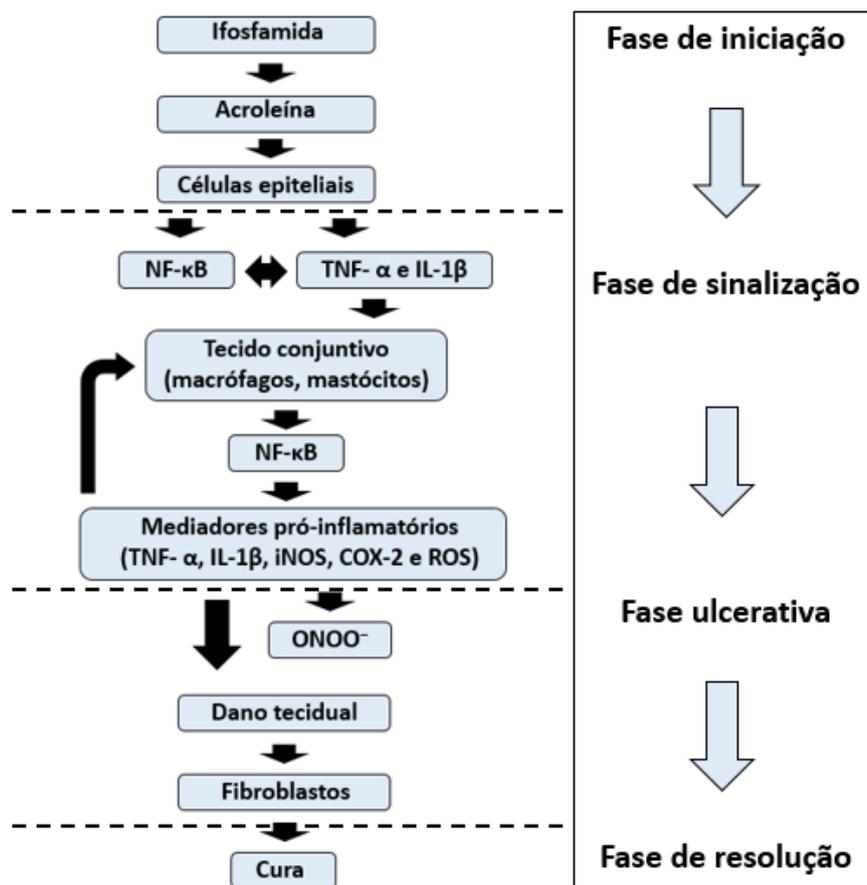


Figura 2. Cascata de eventos sequenciais na cistite hemorrágica (Adaptado de RIBEIRO *et al.*, 2012).

A ifosfamida induz à cistite hemorrágica através da formação de vários mediadores inflamatórios como: TNF- α , IL-1 β , COX-2, NO e ONOO⁻. O TNF- α é uma citocina pró inflamatória que pode interagir com dois receptores distintos: TNF-R1 ou TNF-R2. O TNF-R1 é expresso na maioria dos tecidos e ambos podem ser expressos nas células do sistema imunológico. A interação de TNF- α com TNF-R1 provoca a ativação da cascata de caspase que leva à apoptose e à ativação de NF- κ B (LOGAN *et al.*, 2007). Gomes *et al.* (1995) demonstraram o papel fundamental dessa citocina na cistite hemorrágica ao realizarem o pré-tratamento de animais com soro anti-TNF- α e observaram redução do peso úmido vesical e redução da permeabilidade vascular. A análise histopatológica das bexigas dos grupos pré-tratados com anti-TNF- α e anti-IL-1 β demonstrou uma redução significativa de erosão da mucosa, hemorragia, edema, migração de leucócitos, deposição de fibrina e ulcerações.

A interleucina-1 β é outra citocina pró inflamatória que também pode interagir com dois receptores distintos: IL-1R tipo I e IL-1R tipo II. A sinalização de IL-1 β ocorre com

sua ligação a IL-1R tipo I, ocasionando a fosforilação de proteínas acopladas ao receptor MyD88 e IRAK4 e então ocorre uma sequência de fosforilação de proteínas que promovem a ativação de NF- κ B (DINARELLO, 2011). Leite *et al.* (2015) avaliaram o papel do anakinra, um bloqueador de receptor de IL-1, e do infliximabe, um inibidor de TNF- α , na cistite hemorrágica e apesar de ambas as citocinas terem participação fundamental na patogênese da doença, apenas o anakinra mostrou-se capaz de controlar a hemorragia e atenuar os parâmetros inflamatórios e funcionais, incluindo hiperalgesia abdominal e disfunção da bexiga. O Infliximabe promoveu redução de edema e hiperalgesia, mas não foi capaz de inibir a inflamação da bexiga. Dietrich *et al.* (2015) demonstraram que a fração purificada de glicosídeos de ácido quinovic, obtida de *Uncaria tomentosa*, ocasionou redução de: concentrações de IL-1 β , infiltrado neutrofílico, edema, hemorragia, peso úmido vesical e promoveu a estabilização da dor visceral. Além disso, impediu o aumento da expressão dos purinorreceptores P2X7 induzido pela ciclofosfamida, a ativação desses receptores está envolvida na infiltração de neutrófilos e na maturação e liberação da IL-1 β .

A enzima cicloxigenase-2 é uma enzima que atua na cascata do ácido araquidônico e é a isoforma de cicloxigenase mais expressa durante o processo inflamatório. Pode ter sua expressão aumentada por IL-1, TNF- α e LPS. COX-2 é responsável pela formação de prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano), onde o aumento da formação de prostaglandinas (PGs) irá promover a sensibilização nos receptores de dor ocasionando a hiperalgesia (DRAY; URBAN, 1996; DUBOIS *et al.*, 1998).

Macedo *et al.* (2007, 2010) demonstraram que o aumento na expressão de COX-2, que tem pico de expressão 24h após a administração de ifosfamida, na cistite hemorrágica acarretou mudanças na responsividade do músculo liso urinário e em animais tratados com etoricoxib, um inibidor de COX-2, houve uma redução significativa de PGE2. Etoricoxib, em um modelo de cistite hemorrágica por administração intravesical de acroleína, promoveu redução do peso úmido vesical após 12h de administração de acroleína (MACEDO *et al.*, 2008).

No processo inflamatório, o óxido nítrico é um mediador resultante da ativação da iNOS que possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO que quando interage com ROS promove ação citotóxica indireta. Quando NO combina-se com o ânion superóxido (O $_2^-$) resulta na formação de peroxinitrito (ONOO $^-$). O ONOO $^-$

pode na presença de íon hidrogênio (H^+), originar o hidroxil ($HO\cdot$), um radical altamente reativo e tóxico, desencadeando um aumento na ação tóxica do NO e do O_2^- , que pode acarretar em morte celular (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Souza-Filho *et al.* (1997) demonstraram que há um pico de expressão de iNOS 6h após a administração de ciclofosfamida em animais que manteve-se elevada durante 48 horas e óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) que diminuiu ao longo de um período de tempo semelhante. A administração de um antagonista do fator ativador das plaquetas diminuiu o extravasamento da proteína plasmática induzida por ciclofosfamida, bem como o aumento da atividade iNOS, mas não teve efeito sobre a queda na atividade de cNOS. Estes resultados sugerem que o NO endógeno derivado de iNOS participa no dano urotelial, e o fator ativador de plaquetas também parece estar envolvido na patogênese desta condição, atuando através do aumento do peso úmido vesical e aumento da atividade de iNOS. Gomes *et al.* (1995) demonstraram que a indução da iNOS no urotélio é dependente da produção de IL-1 β e TNF- α , porque os anticorpos contra estas citocinas reduziram a expressão de iNOS.

O peroxinitrito, também envolvido na patogênese da cistite hemorrágica, é formado a partir da reação de NO com radicais livres de superóxido (O_2^-) durante o estresse oxidativo. Um dos mecanismos de lesão celular é um aumento dependente de peroxinitrito na quebra da cadeia do DNA, que desencadeia a ativação da PARP, uma enzima de reparo do DNA. Danos no DNA causam a ativação dessa enzima, resultando em depleção de dinucleótido de nicotinamida adenina oxidada e trifosfato de adenosina e, conseqüentemente, morte celular necrótica (KORKMAZ *et al.*, 2005; ZINGARELLI *et al.*, 1996). Batista *et al.* (2007) demonstraram que a glutatona, potente antioxidante que atua contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, inibiu de forma dose dependente o aumento no peso úmido vesical, edema, hemorragia e achados histopatológicos caracterizados por dano urotelial intenso, edema, infiltração de leucócitos, hemorragia e deposição de fibrina induzidos pela ifosfamida. Além disso, quando administrada sistemicamente ou intravesicamente também promoveu uroproteção no modelo de cistite hemorrágica por administração intravesical de acroleína.

Alguns estudos já relataram a presença de outros mediadores envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica. Nishii *et al.* (2006) observaram o envolvimento de IL-6 após a administração de ciclofosfamida em ratos, a expressão do gene IL-6 atingiu o pico às 6h e diminuiu com o tempo, sugerindo que a fonte primária dessa citocina pode

ser fibroblastos na bexiga.

Em acréscimo ao envolvimento de citocinas nessa patogênese, já foi demonstrado a ação de citocinas anti-inflamatórias na cistite hemorrágica. Macedo *et al.* (2012) demonstraram que IL-4, modula, pelo menos parcialmente, negativamente o processo inflamatório na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos e atua através da inibição da liberação de TNF- α e IL-1 β bem como da redução da expressão de iNOs e COX-2 com conseqüente redução na formação de NO e prostaglandinas, como demonstra a figura 3.

Mota *et al.* (2007) constataram que o pré tratamento de animais com a interleucina 11 humana recombinante (rhIL-11) foi capaz de prevenir a formação de edema, de maneira dose-dependente, por redução do peso úmido vesical e da permeabilidade vascular na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos, demonstrando o papel protetor dessa citocina.

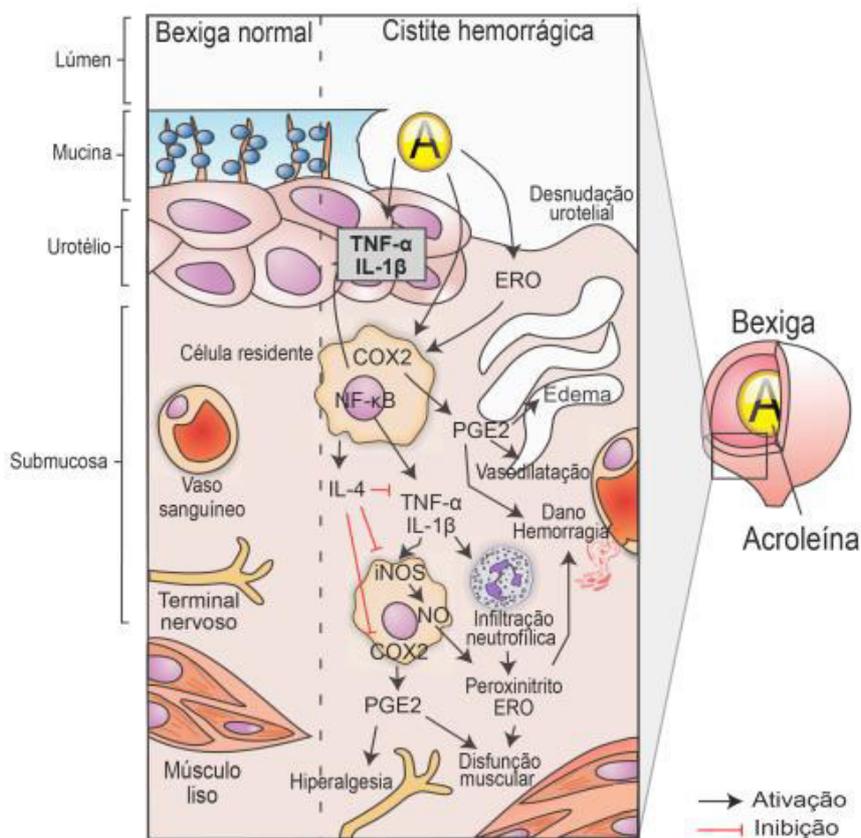


Figura 3. Caminhos propostos para a patogênese da cistite hemorrágica (Fonte: Adaptado de RIBEIRO *et al.*, 2012).

1.3.2 Uroproteção na cistite hemorrágica

Com o objetivo de minimizar a ocorrência da cistite hemorrágica, há algumas formas de uroproteção já estabelecidas, como a utilização do mesna, hidratação intravenosa, uso de diuréticos, alcalinização urinária, irrigação da bexiga com N-acetil-L-cisteína, catéteres permanentes e instilação intravenosa de alumínio sulfato de amônio ou alumínio sulfato de potássio. Alguns autores determinam que a hiperhidratação é uma medida profilática segura e barata, a qual objetiva diminuir o tempo de contato da acroleína com as paredes da bexiga minimizando a toxicidade. No entanto, a hiperhidratação pode não ser possível em pacientes com disfunção renal, pulmonar ou hepática devido aos riscos de sobrecarga de fluidos (BENJAMIN *et al.*, 1993; SCHEEF *et al.*, 1979; SCHEULEN *et al.*, 1983; SHEPHERD *et al.*, 1991; WESTERMAN; BOORJIAN; LINDER, 2016).

Apesar da descoberta de variadas medidas de uroproteção, o agente mais utilizado na clínica com maior efeito uroprotetor permanece sendo o mesna, que é um tiol que age nos metabólitos tóxicos formados pela ifosfamida, como a acroleína, 4-hidroxi-ifosfamida e o cloroacetaldeído. Ao entrar na circulação, mesna é oxidado por constituintes inibidores de ácido etilenodiaminotetracético para ditioldietasulfonato de sódio (DiMESNA), que é então excretado pelos rins (GOREN, 1992). O DiMESNA, através da glutathione redutase, pode originar o mesna novamente no epitélio tubular renal e são os seus grupos sulfidrilo livres resultantes que podem combinar-se com uma ligação dupla de acroleína ou com outros metabólitos tóxicos na bexiga para formar compostos não tóxicos, como demonstra a figura 4 (STOFER-VOGEL *et al.*, 1993).

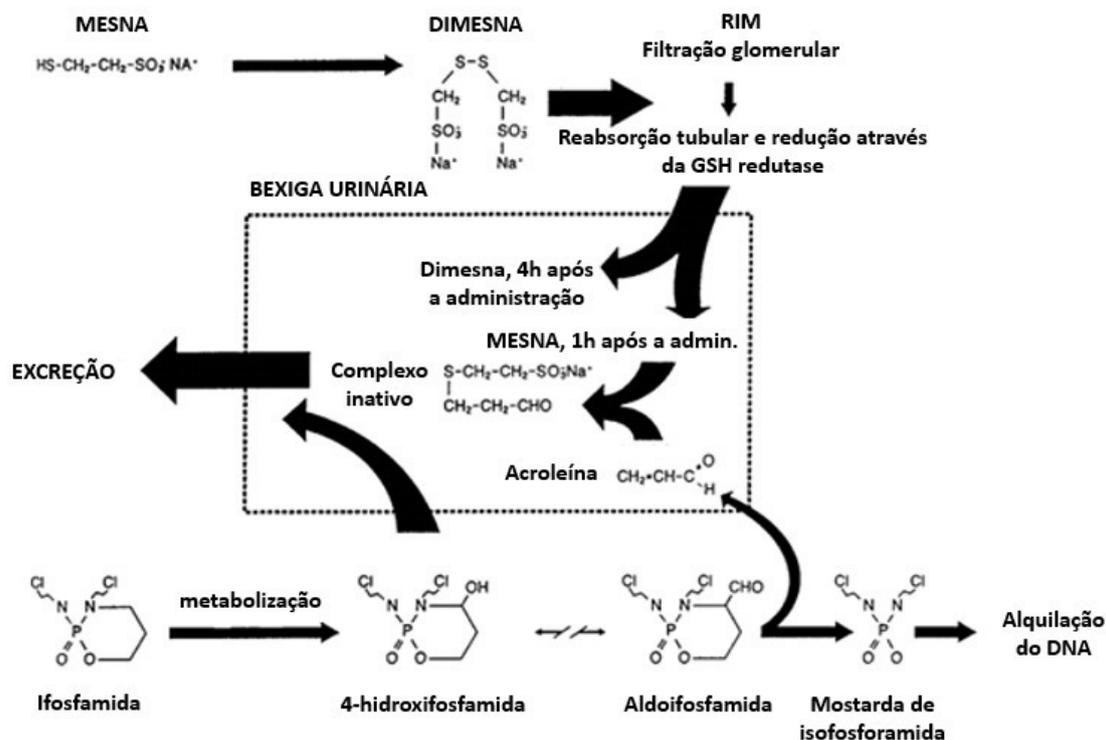


Figura 4. Representação esquemática da inativação de metabólitos de ifosfamida por mesna na bexiga urinária (Fonte: DORR, 1991)

Por ser uma molécula polar, a mesna é incapaz de atravessar membranas e adentrarem células, devido a essa propriedade a co-administração de mesna não interfere no efeito antineoplásico da ifosfamida. A mesna é um fármaco bem tolerado onde relatos de efeitos adversos são incomuns. O uso por via intravenosa tem demonstrado um efeito urotetor superior que a profilaxia com hidratação e alcalinização da urina. O esquema posológico que está padronizado envolve a administração desse fármaco em uma dose igual a 60% da dose de ifosfamida, administrada em três doses divididas, em simultâneo ou a 15 min antes e às 4 h e 8 h após a ifosfamida, onde esse fracionamento é realizado devido à sua curta meia-vida plasmática de aproximadamente 1,5h (BRYANT *et al.*, 1980; SIU; MOORE, 1998).

No entanto, esse protocolo padrão utilizado com três administrações de mesna não impede completamente o dano causado à bexiga pois é um fármaco restritamente profilático. Lima *et al.* (2007) demonstraram que a cistoscopia da bexiga de pacientes tratados com mesna apresentou discretas alterações macroscópicas como: edema leve, hemorragia com hematomas mucosos e telangiectasia em uma porcentagem significativa de pacientes. Em relação a avaliação microscópica, houveram alterações histopatológicas como: edema, erosão, exocitose, hialinização e esclerose significativas nas bexigas, no

entanto, não foram detectadas alterações nos parâmetros de urinálise como: glóbulos vermelhos, hematúria, leucócitos ou proteínas em pacientes tratados com ifosfamida e mesna em comparação com as bexigas antes da administração da ifosfamida.

Alguns fármacos já foram testados para a uroproteção, a glutathiona em associação com o mesna demonstrou um potencial de prevenção semelhante a ele quando utilizado isoladamente. Já a cetamina quando em associação com o mesna demonstrou uma redução no peso úmido da bexiga e quando utilizada isoladamente foi capaz de evitar alterações microscópicas associadas à cistite hemorrágica (ALI *et al.*, 2014; OZGUVEN *et al.*, 2014).

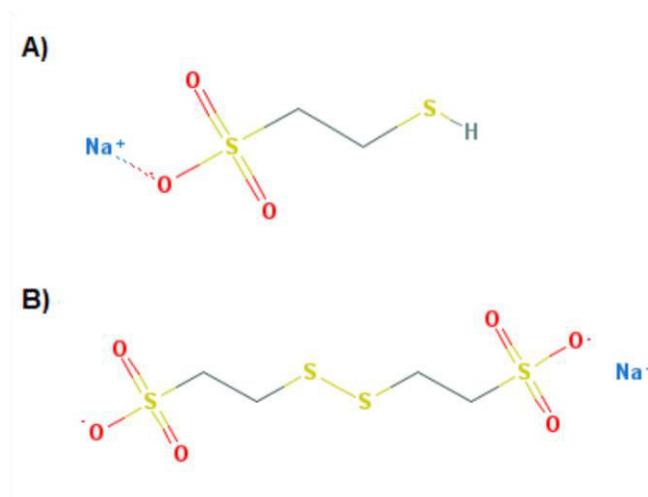


Figura 5. A) Estrutura molecular do Mesna (2-mercaptoetanossulfonato de sódio). B) DiMESNA (ditioldietasulfonato de sódio) (Fonte: *National Center for Biotechnology Information*).

Jiang *et al.* (2015) sugeriram que o mesna, quando administrado em infusão contínua, foi mais eficaz na prevenção da cistite hemorrágica, pois permitiu uma administração de dose de até 8 g/min numa infusão contínua de 24h. Além de ser um método seguro para preveni-la em pacientes que se submeteram a transplante de células-tronco hematopoiéticas, isso melhora a qualidade de vida dos mesmos, sendo vantajosa a aplicação em grande escala (BRYANT *et al.*, 1980; COHEN *et al.*, 1975). No entanto, essa forma de administração não apresenta uma boa comodidade posológica ao paciente, sendo assim necessárias novas buscas por alternativas terapêuticas isoladas ou mesmo associadas com as já existentes para profilaxia e/ou tratamento da cistite hemorrágica.

1.4 Lectinas e atividades biológicas: inflamação

As lectinas são proteínas/glicoproteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico que liga-se de forma específica e reversível a um mono-

ou oligossacarídeo específico por ligações que podem ser através de pontes de hidrogênio ou forças de Van Der Waals (PROCÓPIO *et al.*, 2016; SHARON; LIS, 2004; VAN PARIJS *et al.*, 1991). Podem estar presentes em diversas partes da planta: folhas, raízes, caule, flores e nas sementes são encontradas em maiores quantidades (VAN DAMME; PEUMANS, 1990).

Essas proteínas podem ser classificadas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas, conforme mostra a figura 6. Merolectinas são constituídas exclusivamente de um único sítio de ligação a carboidratos e devido à sua natureza monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou células aglutinantes (VAN PARIJS *et al.*, 1991). Hololectinas também são constituídas de sítios de ligação a carboidratos, mas contém dois ou mais desses domínios que são idênticos ou muito homólogos, são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas são proteínas de fusão possuindo um domínio de ligação a carboidratos e atuam independentemente desse domínio de ligação, também comportam-se como merolectinas ou hololectinas e as superlectinas consistem em moléculas com dois ou mais domínios de ligação a carboidratos distintos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME *et al.*, 1998).

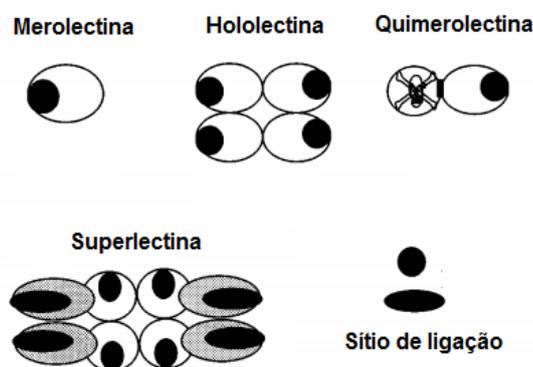


Figura 6. Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Fonte: VAN DAMME *et al.*, 1998).

As lectinas têm demonstrado diversas aplicações que vão desde medicina à agricultura. Já foram comprovadas as suas potentes ações antifúngicas, antitumorais, antivirais e contra pragas de insetos. Podem ser obtidas através de diversas fontes, tais como animais, cogumelos e plantas, sendo as de plantas as mais estudadas devido à sua importância econômica e nutricional e são encontradas em abundância em sementes de leguminosas ou de plantas superiores (LAM; NG, 2011). As lectinas de plantas superiores

têm sido as mais estudadas, tanto pela importância econômica de suas espécies como pela facilidade de isolamento (LIS; SHARON, 1998).

Considerando-se o processo inflamatório como uma resposta de defesa do sistema imune, porém com potencial lesivo aos tecidos, sendo em várias doenças causa de mortalidade, o estudo dos mecanismos e dos mediadores envolvidos no processo inflamatório e de novos fármacos para controlá-lo torna-se de extrema importância.

Nos últimos anos, têm sido feitos estudos no sentido de investigar o envolvimento dos carboidratos na resposta inflamatória. Alencar *et al.* (2004) já mostraram que as lectinas podem exibir atividades pró ou anti-inflamatórias, dependendo da via pela qual são administradas. Várias lectinas da subtribo Diocleinae já demonstraram experimentalmente atividade anti-inflamatória, como a lectina de *Canavalia boliviana* que foi capaz de inibir a migração de neutrófilos e o edema de pata, ambos induzidos por carragenina (BEZERRA *et al.*, 2014) bem como as lectinas de *Acacia farnesiana*, *Dioclea violacea*, *Cratylia floribunda*, *Dioclea guianensis*, *Dioclea virgatta* que também reduziram a migração de neutrófilos nesse modelo (ABRANTES *et al.*, 2013). *Dioclea Violacea*, *Cratylia floribunda*, *Dioclea guianensis* também reduziram a migração de neutrófilos induzida por fMLP e carragenina de forma dose dependente e o edema de pata induzido por carragenina (ASSREUY *et al.*, 1997). Lectinas de *Canavalia grandiflora* mostraram um efeito redutor na migração de neutrófilos induzida por carragenina, no rolamento de leucócitos e na liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (NUNES *et al.*, 2009).

As lectinas de Diocleinae também podem exercer ações pró-inflamatórias. Alencar *et al.* (2013) demonstraram que lectina de *Dioclea violacea* induziu edema de pata e aumento da permeabilidade vascular dependente de dose bem como infiltração de neutrófilos quando administrada por via subcutânea. É importante ressaltar que os efeitos anti-inflamatórios ou pró-inflamatórios dessa lectina demonstrados em modelos de inflamação aguda podem ser inibidos pela sua associação com resíduos de manose, já que possui uma especificidade de ligação para glicose-manose. Assim, pode-se sugerir que os resíduos de manose são importantes para que a reversão do efeito da lectina ocorra (ASSREUY *et al.*, 1997).

Assreuy *et al.* (1999) mostraram o potencial anti-inflamatório dose-dependente de lectinas de *D. violacea* e *D. guianensis* na cistite hemorrágica. Essas lectinas foram capazes de reduzir: o peso úmido vesical, o aumento da permeabilidade vascular e o infiltrado leucocitário. Mostrando o potencial promissor da utilização de lectinas como

agentes uroprotetores para profilaxia e/ou tratamento da cistite hemorrágica.

1.5 *Moringa oleifera* Lamarck

Moringa oleifera Lamarck é uma árvore de tamanho médio que pertence a família monogénica Moringaceae. A família é caracterizada pela placentação parietal, fruto com 3 valvas, folhas pinadas, baga alongada e sementes aladas (RAMACHANDRAN *et al.*, 1980). *M. oleifera* cresce em qualquer país tropical e subtropical com características ambientais de clima seco ou úmido tropical ou subtropical, e temperatura entre 18 e 28 °C, geralmente cresce até 10 a 12 m de altura. É amplamente cultivada no Sudeste Asiático, Índias Ocidentais, África e em algumas áreas da América do Sul, como o Nordeste do Brasil (JAHN *et al.*, 1986; NOUMAN *et al.*, 2014; PALADA, 1996).

M. oleifera apresenta a seguinte classificação taxonômica (SACHAN; JAIN; SINGH, 2011):

Reino: Plantae

Sub-reino: Tracheobionta

Super-divisão: Spermatophyta

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Eudicotiledônea

Ordem: Brassicales

Família: Moringaceae

Gênero: *Moringa*

Espécie: *Moringa oleifera* Lamarck

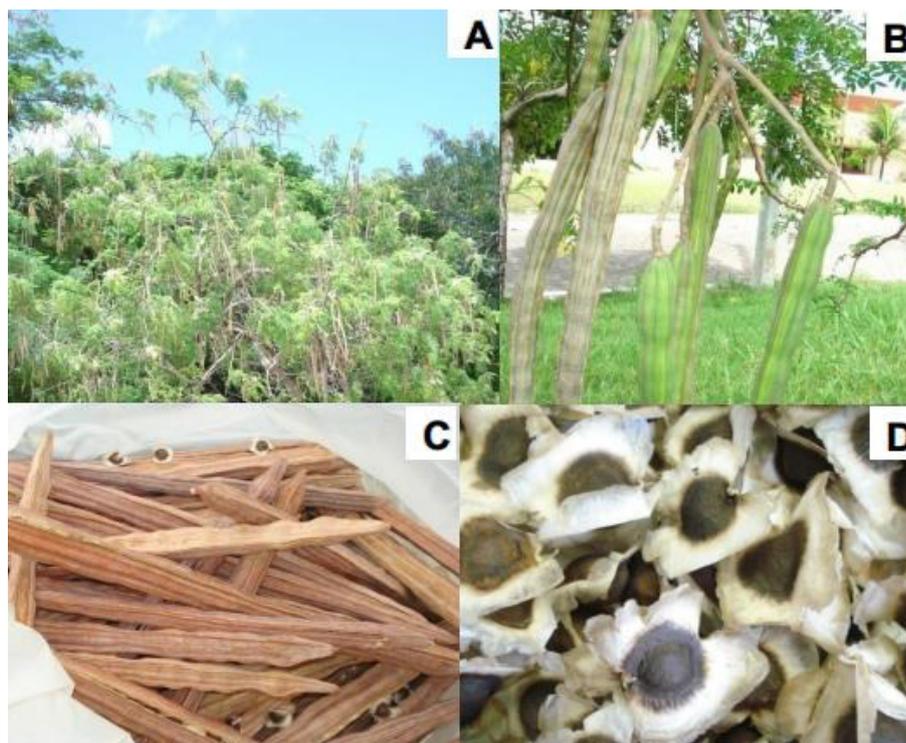


Figura 7. *Moringa oleifera* Lamarck. (A) Árvore de *Moringa oleifera*; (B) Frutos imaturos; (C) Frutos maduros; (D) Sementes aladas (Fonte: Pereira, 2010).

M. oleifera foi inicialmente utilizada no tratamento de água, enquanto só mais tarde foram descobertas suas diversas propriedades nutricionais e medicinais, onde quase todas as partes desta planta: raiz, casca, goma, folha, fruto (vagens), flores, sementes e óleo de sementes já são utilizadas no tratamento das doenças inflamatórias, infecciosas, cardiovasculares, gastro-intestinais, hematológicas e hepatorreais. A planta exibe essas atividades por possuir mais de 46 antioxidantes (ácido ascórbico, caretenóides, flavonóides e compostos fenólicos) e 36 compostos anti-inflamatórios (isotiocianato e derivados fenólicos) (ANWAR *et al.*, 2007).

Experimentalmente, o extrato de *M. oleifera* demonstrou atividade antibiótica contra uma variedade de microorganismos e isso ocorre devido à presença da substância pterigospermina. Pterigospermina é um composto que é facilmente dissociado em 2 moléculas de isotiocianato de benzilo que origina os compostos 4-(α -L-ramnopiranosiloxi) de glucosinolato de benzil e seu isotiocianato correspondente, e estudos demonstram que 4-(α -L-ramnopiranosiloxi) de isotiocianato de benzilo e outros isotiocianatos têm atividade contra a bactéria *Helicobacter pylori* (OLSON; FAHEY, 2011).

Mehta *et al.* (2003) demonstraram que o fruto verde dessa planta ocasionou redução do colesterol no sangue e triglicerídeos em animais tratados através da redução

da lipoproteína de baixa densidade e o aumento da lipoproteína de alta densidade em animais com concentrações elevadas de colesterol total. Ndong *et al.* (2007) demonstraram também que o tratamento com as folhas de moringa tem ação de melhorar a intolerância a glicose em animais com diabetes *mellitus* tipo II quando comparados aos não tratados. Essa regulação da glicose pode ocorrer devido ao seu elevado teor de substâncias polifenólicas, tais como quercetina e kempferolo.

Os extratos hidroetanólicos de folhas e flores de *M. oleifera* tiveram ação contra a hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno em ratos. As enzimas marcadoras de dano hepático foram significativamente reduzidas quando os animais foram tratados com os extratos. Além disso, não foram observadas alterações significativas nos marcadores clínicos da função renal (SHARIFUDIN *et al.*, 2013). Corroborando com esses achados, Fakurazi *et al.* (2008) demonstraram que a atividade hepatoprotetora do extrato de *M. oleifera* foi capaz de promover a redução da concentração de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) em grupos pré-tratados com o extrato, foi observado que a concentração de glutatona é restaurada em animais tratados com *M. oleifera* em comparação com os grupos tratados com acetaminofeno. Sugerindo que o extrato de moringa pode prevenir lesões hepáticas através da prevenção do declínio da concentração de glutatona.

O extrato da semente de moringa foi capaz de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS) gerados em camundongos com dietas ricas em gordura e protegendo os danos nucleares devido à radicais hidroxila e isso ocorre devido à riqueza em polifenóis (DAS *et al.*, 2015).

Além disso, diversos estudos realizados abordam a potente atividade anti-inflamatória de diversas partes desta planta. Tan *et al.* (2015) demonstraram que o extrato da flor reduziu significativamente a liberação de NO e diminuiu a expressão de mediadores inflamatórios como: NF-kB, iNOS, COX-2, PGE2, IL-6, IL-1 β e TNF- α , enquanto aumentou a expressão de IL-10 e I κ B- α , em macrófagos estimulados com LPS. Corroborando com esses resultados, Lee *et al.* (2013) demonstraram que o extrato da fruta também reduz as concentrações de mediadores pró-inflamatórios incluindo o NO, IL-1 β , TNF- α e IL-6 através da inibição da ativação de NF-kB em células RAW264.7

O extrato de folhas de *M. oleifera* inibiu significativamente a produção de NO e outros marcadores inflamatórios como: PGE2, TNF- α , IL-6 e IL-1 β ; e induziu a produção de IL-10 de uma forma dependente da dose. Além disso, suprimiu efetivamente a expressão de marcadores inflamatórios como: iNOs, COX-2 e NFkB-p65 em macrófagos

RAW264.7 induzidos por LPS de uma forma dependente da dose (FARD *et al.*, 2015).

Os extratos metanólicos e etanólicos das folhas também foram capazes de estimular a resposta imune celular e humoral em animais tratados com ciclofosfamida, promovendo um aumento significativo de glóbulos brancos, neutrófilos e imunoglobulinas. Além disso, o extrato metanólico, de maneira dose dependente, teve ação de reduzir o edema de pata induzido por carragenina e histamina, as contorções abdominais induzidas por ácido acético e apresentou elevado efeito analgésico e antioxidante. Em todos esses parâmetros, *M. oleifera* apresentou melhores resultados que o fármaco de referência indometacina, principalmente na analgesia (ADEDIPO; FALAYI; OYAGBEMI, 2015; GUPTA *et al.*, 2010; SUDHA *et al.*, 2010).

O extrato hidroalcólico das folhas além do efeito anti-inflamatório, demonstrou um bom efeito antioxidante em aliviar a urotoxicidade ocasionada pela cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em ratos, pois ocasionou a normalização das concentrações de malonaldeído (MDA) e glutathione (GSH), provavelmente por efeitos antioxidantes diretos, eliminação de radicais livres ou através de proteção contra a peroxidação lipídica e ROS (TAHA; AMIN; SULTAN, 2015). MDA é um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, formado durante o processo oxidativo (DRAPER; HADELY, 1990) e GSH é o tiol celular mais prevalente e o peptídeo de baixo peso molecular mais abundante presente nas células atuando como um antioxidante (DENEKE; FANBURG, 1989). Além do efeito antioxidante na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida, ratos tratados com o extrato hidroalcólico das folhas apresentaram inibição do aumento do peso úmido vesical e mantiveram histologicamente uma arquitetura da bexiga bem preservada, sem evidência de ulceração, edema e distribuição normal de fibras de colágeno (TAHA; AMIN; SULTAN 2015). Alguns autores sugerem que a ação anti-inflamatória das folhas é devido a presença de flavonóides e ácidos fenólicos (LEONE *et al.*, 2015).

O extrato bruto de metanol da raiz inibiu o edema de pata induzido por carragenina de uma forma dependente da dose, e na inflamação aguda o extrato é muito mais potente para a inibição do acúmulo celular e exsudação de fluidos. No entanto, o extrato quando utilizado na inflamação crônica é bem menos eficaz (EZEAMUZLE *et al.*, 1996).

Minaiyan *et al.* (2014) demonstraram que o extrato hidroalcoólico de sementes de *M. oleifera* foi eficaz em reduzir a gravidade da lesão, a área da úlcera, a hemorragia, intensidade da inflamação, a extensão da inflamação, o dano da cripta e o índice de colite total e MPO em animais com colite induzida por ácido acético e isso se deve aos

componentes biofenóis e flavonóides presentes. O extrato aquoso e as lectinas isoladas das sementes: cMoL (“coagulant *M. oleifera* lectin”) e WSMoL (“water-soluble *M. oleifera* lectin”) foram capazes de reduzir a produção de NO *in vivo* em ratos e *in vitro* em macrófagos estimulados com LPS. O extrato aquoso promoveu também uma redução na migração dos leucócitos, além de reduzir as concentrações de TNF- α , IL-1 β , MPO e a infiltração de polimorfonucleares de forma dose dependente em um modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos (ARAÚJO *et al.*, 2013). Todos esses achados descritos revelam um potente efeito anti-inflamatório dos extratos de *M. oleifera*.

1.6 Lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* Lamarck: Mo-CBP₄

Pereira *et al.* (2011) isolaram uma proteína ligante à quitina a partir de sementes de *M. oleifera*, denominada de Mo-CBP₄ (Mo: *Moringa oleifera* e CBP: “chitin-binding protein”), o número 4 representa a ordem na qual essa proteína foi eluída com um tampão de equilíbrio acrescido de 60% de NaCl 1M e foi escolhida dentre as outras lectinas eluídas por apresentar maior pico protéico. Essa proteína é uma glicoproteína de massa molecular aparente de 9,8 kDa em condições redutoras, atividade floculante e ponto isoelétrico de 10,55, que não aglutina eritrócitos humanos ou de coelho indicando que tem apenas um único local de ligação a carboidratos sendo classificada como merolectina. A estrutura indica que essa proteína é rica em resíduos de glutamina e aminoácidos básicos, tratando-se de uma proteína alfa-beta, com alta estabilidade frente a variações de temperatura e pH (PEREIRA, 2014).

Mo-CBP₄ mostrou-se ser uma lectina com potente atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Os testes farmacológicos mostraram que essa proteína reduziu a ocorrência de contorções abdominais induzidas por ácido acético de uma maneira dose-dependente e com potência semelhante à da indometacina. Quando administrada por via oral mostrou efeito significativo em reduzir a migração de neutrófilos induzida por zymosan e carragenina e quando administrada por via endovenosa reduziu a migração de neutrófilos induzida também por carragenina, no entanto, Mo-CBP₄ quando ligada ao carboidrato N-acetil-D-glucosamina teve seu efeito anti-inflamatório inibido, pois não foi capaz de causar redução significativa na migração de neutrófilos induzida por zymosan. Além disso, promoveu diminuição das concentrações de IL-1 β e aumento de IL-10 no soro de animais em modelo de peritonite induzida por zymosan, inibição do aumento da permeabilidade vascular e redução de contorções abdominais quando administrada por via oral (PEREIRA, 2014).

A atividade analgésica dessa proteína está relacionada com redução do processo inflamatório. *Mo*-CBP₄ foi capaz de diminuir o tempo de lambadura da pata na fase inflamatória da dor de uma forma dose-dependente quando administrada por via endovenosa. Porém, na fase neurogênica da dor, a lectina só apresentou atividade antinociceptiva na maior dose administrada. Essa proteína quando administrada por via oral apresentou atividade antinociceptiva, diminuindo a intensidade de hipernocicepção causada após 1, 3 e 5 horas da administração de carragenina, respectivamente (PEREIRA, 2014).

Para investigar a toxicidade, Pereira (2014) fez dois tratamentos distintos por via oral: *Mo*-CBP₄ administrada na dose única de 2000 mg/kg e administrada diariamente por 28 dias em três doses diferentes (10, 40 e 100 mg/kg). Assim, a lectina em estudo não afetou o comportamento e a massa corpórea de camundongos quando administrada por via oral, em uma dose elevada (2000 mg/kg). Também não desencadeou efeitos adversos quando administrada diariamente, por 28 dias, em doses de até 10 vezes a terapêutica. Além de estudos *in vivo*, avaliações *in vitro* utilizando diversas metodologias e linhagens de células saudáveis ou cancerígenas mostraram que *Mo*-CBP₄ não apresentou efeitos cito- e genotóxicos. Portanto, *Mo*-CBP₄ demonstrou ser uma proteína considerada segura quando administrada em diferentes doses o que garante vantagem em relação aos anti-inflamatórios não esteroidais (PEREIRA *et al.*, 2011).

Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que *Mo*-CBP₄ protegeu contra a pancreatite aguda edematosa induzida por ceruleína em camundongos. *Mo*-CBP₄ administrada por via oral nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg reduziu o edema pancreático de forma dose-dependente, a amilase, lipase, AST, ALT, atividade de MPO no pâncreas, no pulmão e no fígado. A lectina administrada na dose de 40 mg/kg por via oral diminuiu as concentrações pancreáticas das citocinas TNF- α , IL1- β e IL-6 e também plasmáticas de TNF- α , IL1- β , reduziu significativamente MDA no plasma e na análise histológica foi capaz de atenuar significativamente o infiltrado inflamatório, a necrose no pâncreas e também de reduzir o dano pulmonar e hepático. Em células acinares estimuladas com colecistocinina 8, reduziu as concentrações de cálcio citosólico e preveniu a necrose dessas células induzida por ácido taurolitocólico. Atenuou a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos estimulados com fMLP e PMA, respectivamente. Além disso, foi capaz de reduzir a imunomarcagem de COX-2, TNF- α , iNOS e NF κ B no pâncreas (LUZ, 2017).

Além das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva, *Mo*-CBP₄ já demonstrou

atividade antidermatofítica em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Lopes (2016) demonstrou que *Mo*-CBP₄ na concentração de 250 µg/ml foi capaz de inibir em 35% o crescimento de cepas de *T. mentagrophytes* e foi capaz de inibir em 50% a germinação dos microconídios deste fungo. Foi constatada que a ação antifúngica da lectina independe do seu sítio de ligação a N-acetil-D-glucosamina. Em ensaios *in vivo* em camundongos, *Mo*-CBP₄ nas doses de 5 e 10 mg/g foi capaz de reduzir a gravidade das lesões e o tempo de infecção causados por *T. mentagrophytes*. Curiosamente, a lectina mostrou melhor ação na menor dose utilizada (5 mg/g) e pode ter exercido sua ação antifúngica por ter se ligado a quitina da parede celular ou interferindo na permeabilidade da membrana celular fúngica.

2. JUSTIFICATIVA

A cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas continua a ser um problema ameaçador da vida de pacientes que utilizam essa classe de antineoplásicos. Apesar da utilização frequente do mesna, um tio-composto utilizado na profilaxia, a cistite é um efeito colateral clinicamente significativo e ainda continua sendo tema de diversos ensaios experimentais.

Mesna, apesar de ser o agente uroprotetor mais usado na clínica, não impede completamente o dano causado à bexiga pois é um fármaco restritamente profilático. De acordo com Lima *et al.* (2007), uma porcentagem significativa de pacientes tratados com mesna apresentaram discretas alterações macroscópicas como: edema leve, hemorragia com hematomas mucosos e telangiectasia bem como alterações histopatológicas: edema, erosão, exocitose, hialinização e esclerose significativas nas bexigas.

Diante disso, a busca por alternativas terapêuticas que possam ter eficácia quando administradas isoladamente ou concomitante ao uso de mesna podem trazer contribuições significativas para a prevenção e tratamento dos efeitos colaterais destes quimioterápicos.

Atualmente, é grande o interesse da indústria farmacêutica pelo uso da biodiversidade como fonte de novos medicamentos. O uso de produtos naturais como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos oferece vantagens como: existência de uma grande variedade de estruturas químicas, economia, fonte de novas moléculas para alvos moleculares complexos, considerando-se ainda o fato de serem uma fonte biológica renovável, cuja obtenção racional não causará efeitos sobre o meio ambiente. Além disso, efeitos colaterais associados à terapia convencional, justificam o crescimento destas pesquisas e o aumento na venda desses produtos. Assim, a busca de alternativas terapêuticas em recursos naturais deve ser vista como uma importante estratégia científica.

É bem relatado na literatura que as lectinas vegetais podem apresentar atividade anti-inflamatória em diversos modelos de inflamação, inclusive no modelo de cistite hemorrágica como demonstrado por Assreuy *et al.* (1999), tornando relevante a investigação da atividade de *Mo*-CBP₄ neste estudo.

Mo-CBP₄ é uma lectina isolada das sementes da *Moringa oleifera* Lamarck que apresenta um bom rendimento protéico (6,33%) quando submetida ao processo de

purificação, apresentando uma vantagem em relação à outras lectinas vegetais. Experimentalmente, já demonstrou desempenhar potente atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos de inflamação aguda quando administrada por via oral, endovenosa e intraperitoneal (PEREIRA *et al.*, 2011; PEREIRA, 2014; LUZ, 2017). Diante disso, devido a sua potente ação anti-inflamatória e por apresentar estabilidade à variações de pH sendo resistente a ação de proteases do trato gastrointestinal e à altas temperaturas, além de ser uma lectina bastante segura quando administrada em altas doses não causando efeitos tóxicos ou adversos, garantindo vantagem em relação aos anti-inflamatórios não esteroidais, *Mo-CBP₄* neste estudo também pode vir a ser uma opção terapêutica futura para profilaxia da cistite hemorrágica.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da lectina isolada de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck (*Mo*-CBP₄) na prevenção da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da *Mo*-CBP₄ sobre a formação de edema e hemorragia no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória da *Mo*-CBP₄ na análise histopatológica;
- Investigar se a atividade anti-inflamatória da *Mo*-CBP₄ ocorre através da inibição da migração leucocitária, via modulação da liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-8, TNF- α), via redução da imunomarcção de COX-2 e através do aumento da atividade de GSH.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fármacos, corantes, reagentes e anticorpos

- Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético;
- Ácido tricloroacético;
- Anticorpo biotinilado secundário de cabra anti-IL-1 β (R&D Systems)
- Anticorpo biotinilado secundário de cabra anti-TNF- α (R&D Systems)
- Anticorpo primário policlonal anti-IL-1 β (R&D Systems);
- Anticorpo primário policlonal anti-IL-8 (Dako);
- Anticorpo primário policlonal anti-TNF- α (Abcam);
- Anticorpo primário policlonal de cabra Anti-COX-2 (Abcam);
- Azul de Evans (Sigma);
- Cloreto de sódio estéril 0,9% (Pharmace);
- Cloridrato de ketamina 10% (Dopalen®- Vetbrands);
- Cloridrato de xilazina 2% (Anasedan®- Vetbrands);
- Eosina (Merck);
- Formamida (Dinâmica);
- Formol tamponado a 10%;
- Glutationa (Sigma);
- Hematoxilina (Merck);
- Heparina sódica (Cristália);
- Ifosfamida (HoloXane®) (Baxter);
- Mesna (Mitexan®) (Baxter);
- NADPH (Sigma);
- Nitrato redutase (Sigma);
- Nitrito de sódio;
- O-dianisidine (Sigma);
- Tampão 1 (NaCl, EDTA dissódico e tampão fosfato de sódio);
- Tampão fosfato de sódio;
- Tampão HTAB (hexadeciltrimetilamônio);
- Tris-Ácido clorídrico;

4.2 Equipamentos e materiais

- Agitador para tubos de ensaio (Labnet);
- Balança analítica digital, modelo Ay220 (Shimadzu);
- Balança para pesagem de animais, modelo ID-1500 (FILIZOLA);
- Banho maria, modelo 100 (Fanem);
- Câmera fotográfica Nikon L20;
- Computador, modelo Flatron (LG);
- Estufa, modelo MA033 (Marconi);
- Freezer -80°C (Thermo Scientific);
- Homogeneizador (Ultra SIRRER);
- Lâmina lisa para microscopia 26x76 mm;
- Lamínula 24x32 mm;
- Leitor de Elisa, modelo Expert Plus (ASYS);
- Luva cirúrgica (IUVATEX);
- Micro centrífuga refrigerada, modelo NT 805 (Nova técnica);
- Micropipeta 1000 µl (Peguet);
- Micropipeta 20 µl (DIGIPET);
- Micropipeta multicanal (Eppendorf);
- Microscópio óptico (ZEISS);
- Pinças cirúrgicas;
- Placa estéril de 96 poços;
- Tesoura de ponta fina 11,5cm (QUINELATO ÍRICAL);
- Tubos de falcon de 15 ml.

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* albinos (*Mus musculus*) fêmeas, com massa corpórea entre 25 a 30 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e mantidos no Biotério setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Todos os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas, recebendo ração e água à vontade, sob condições adequadas de luz e temperatura, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. O protocolo experimental foi submetido à Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da

Universidade Federal do Ceará e foi aprovado sob protocolo nº 91/2015.

4.4 Isolamento e purificação da lectina de *Moringa oleífera* Lamarck (*Mo-CBP₄*)

O processo de purificação e liofilização foi realizado no Laboratório de Toxinas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC sob coordenação da Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos seguindo a metodologia descrita por Pereira *et al.* (2011) e Pereira (2014). Esta proteína purificada foi fornecida para o nosso laboratório na sua forma liofilizada.

Inicialmente a farinha das sementes de *Moringa oleífera* foi colocada em contato com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M, na proporção 1:10 (m/v) e deixada sob agitação moderada por 4 horas a 4 °C. Em seguida, a suspensão foi filtrada e centrifugada a 15.000 x g, 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi filtrado e denominado extrato total. Este extrato foi então submetido à diálise exaustiva contra água destilada, em membrana de porosidade de 12 kDa, 4 °C, sob agitação moderada. A suspensão obtida foi centrifugada novamente. O material proteico presente no sobrenadante (fração albumínica) foi liofilizado e ressuscitado em tampão de equilíbrio para a cromatografia de afinidade em matriz de quitina equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. As proteínas ligantes à quitina foram eluídas com ácido acético 0,05 M. As frações eluídas foram monitoradas por leitura de absorbância a 280 nm. O pico proveniente da eluição com ácido acético (P_{AC}) foi reunido e dialisado contra água destilada e liofilizado. O P_{AC} foi ressuscitado em 2 mL de tampão de equilíbrio e centrifugado a 8.000 x g, por 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi aplicado na coluna de matriz de CM-Sepharose™ *Fast Flow* (GE Helthcare), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. As proteínas foram eluídas em fluxo contínuo de 30 mL/h, em frações de 3 mL. A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorbância a 280 nm. Todas as proteínas eluídas receberam a denominação de *Mo-CBP*, acrescidas de um número na ordem em que foram eluídas. *Mo-CBP₄* foi o pico eluído com tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,6 M. O rendimento protéico de *Mo-CBP₄* foi de 6,33% à partir de 100% do extrato total (PEREIRA, 2014).

Mo-CBP₄ liofilizada foi armazenada a 4 °C em microtubos de polietileno e solubilizada em solução salina estéril (0,9%) imediatamente antes de iniciar os procedimentos experimentais.

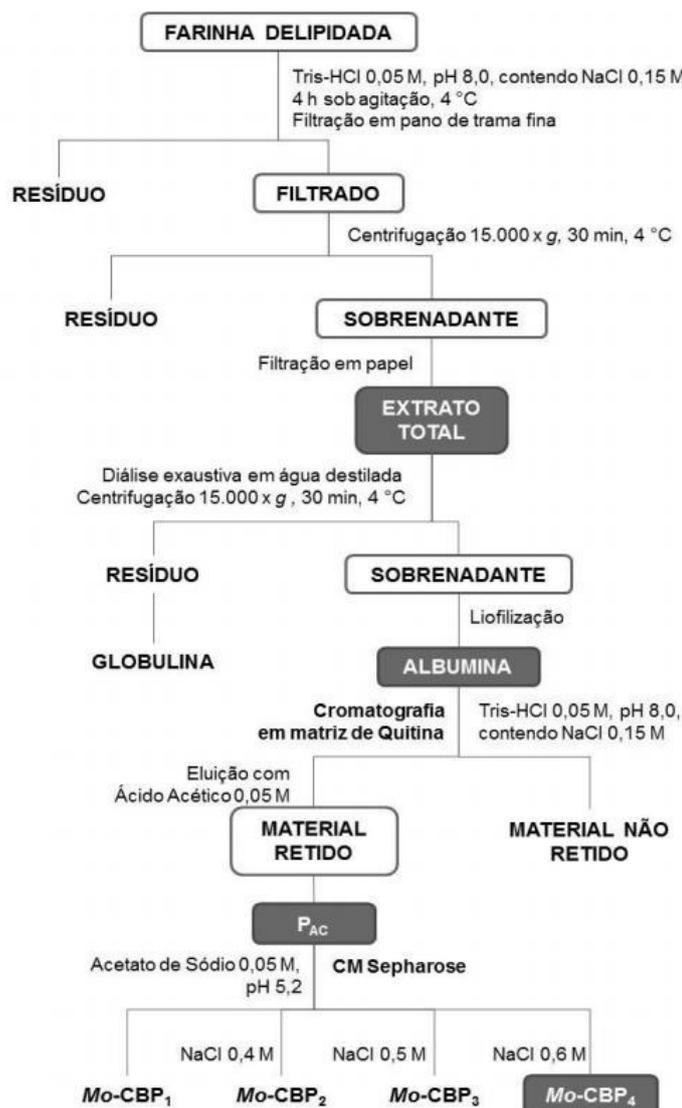


Figura 8. Esquema de purificação de *Mo-CBP₄* a partir da farinha delipidada das sementes de *Moringa oleifera* (Fonte: PEREIRA, 2014).

4.5 Protocolo experimental

4.5.1 Indução da Cistite Hemorrágica

Os camundongos Swiss fêmeas receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de Ifosfamida (400 mg/kg) para indução da cistite hemorrágica. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após 12h, de acordo com outros estudos (LEITE *et al.*, 2015; MACEDO *et al.*, 2012, MOURÃO, 2012). Em seguida, através de incisão abdominal as bexigas foram removidas, desprezando-se o conteúdo urinário através de uma leve pressão. As bexigas foram então pesadas e algumas imersas em formol a 10% para posterior confecção das lâminas para análise histopatológica.

4.5.2 Avaliação do efeito da *Mo*-CBP₄ na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

Para a investigação dos efeitos anti-inflamatórios da *Mo*-CBP₄, os camundongos receberam injeção endovenosa da lectina nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg. Essas doses foram escolhidas baseadas no estudo de Pereira (2014) tendo como objetivo a escolha da menor dose capaz de desencadear um efeito anti-inflamatório desejado.

4.5.3 Grupos experimentais

A. Grupo salina

Esse grupo foi constituído por 6 animais que receberam apenas solução fisiológica estéril 0,9% por via intraperitoneal.

B. Grupo Ifosfamida

Esse grupo foi constituído por 6 animais que receberam Ifosfamida (HoloXane®-Asta Médica, Brasil; 400 mg/kg) diluída em solução fisiológica estéril 0,9% por via intraperitoneal.

C. Grupo Ifosfamida + Mesna

Esse grupo foi constituído por 6 animais que receberam Mesna (Mitexan®; 80mg/kg) por via intraperitoneal como droga padrão comercializada diluída em solução fisiológica estéril 0,9% 30 min antes, 4 e 8h após a ifosfamida. A dose de mesna utilizada corresponde a 20% da dose de ifosfamida conforme ocorre na clínica e a via de administração de mesna foi escolhida baseada em estudos experimentais (BATISTA *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2003, 2004).

D. Grupo Ifosfamida + *Mo*-CBP₄

Esse grupo foi constituído por 18 animais que receberam *Mo*-CBP₄ por via endovenosa diluída em solução fisiológica estéril 0,9% 30 min antes, 4 e 8h após a ifosfamida nas seguintes doses:

- 10 mg/kg (6 animais);
- 20 mg/kg (6 animais);
- 40 mg/kg (6 animais).

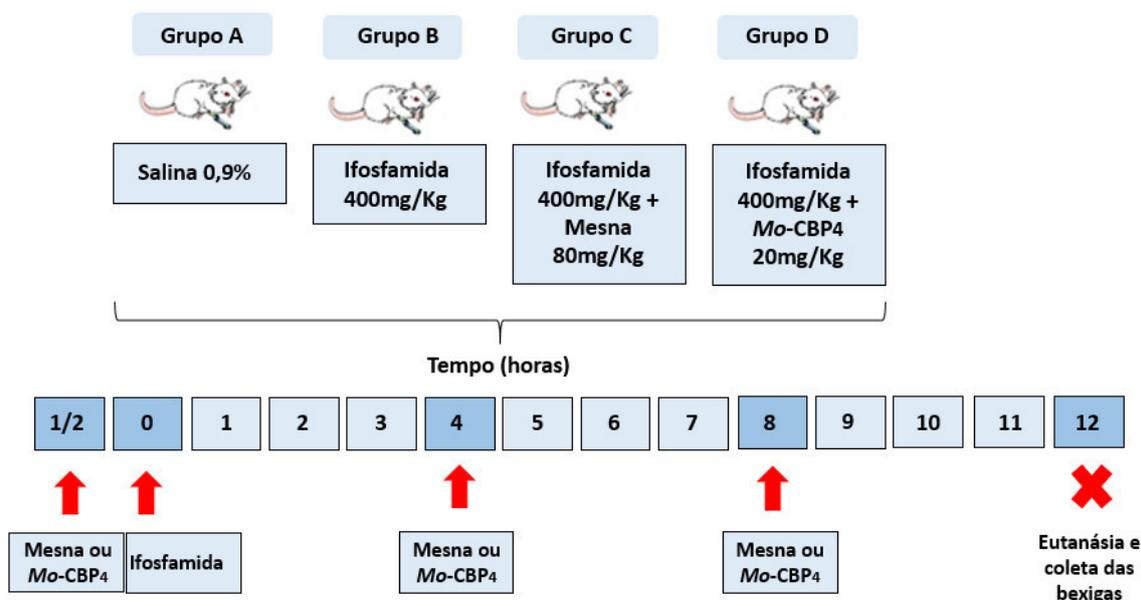


Figura 9. Protocolo experimental. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: salina 0,9% (grupo A); Ifosfamida 400 mg/kg (grupo B); Ifosfamida 400 mg/kg + mesna 80 mg/kg (grupo C) e ifosfamida 400 mg/Kg + Mo-CBP₄ 10; 20 e 40 mg/Kg (grupo D). Foi realizado um pré tratamento com mesna e Mo-CBP₄ meia hora antes e 4 e 8h após a administração de IFO; IFO e salina 0,9% foram administradas isoladamente como controles. Após 12h da administração de IFO e salina 0,9% foi realizada a eutanásia em todos os grupos experimentais. (Fonte: próprio autor).

4.6 Parâmetros avaliados na Cistite Hemorrágica

4.6.1 Avaliação do Peso Úmido Vesical

Após a remoção da bexiga e desprezo do conteúdo urinário, as bexigas foram pesadas, sendo o peso úmido vesical expresso em mg/20g de peso de animal. O edema vesical foi quantificado por aumento do peso úmido vesical, reportado como média \pm EPM/20g de peso de animal.

4.6.2 Análise Macroscópica

Após a avaliação do peso úmido vesical as bexigas foram removidas, cortadas e analisadas visualmente quanto ao edema e hemorragia de acordo com os Critérios de Gray *et al.* (1986):

Edema:

- Severo (3+): quando fluido é visto externa e internamente na parede da bexiga;
- Moderado (2+): quando o edema é confinado à mucosa interna;
- Intermediário (1+): aspecto entre normal e moderado;
- Ausente (0): aspecto normal.

Hemorragia:

- (3+): coágulos intra-vesicais;
- (2+): hematomas na mucosa;
- (1+): telangiectasia ou dilatação dos vasos vesicais;
- (0): normal.

4.6.3 Quantificação da Permeabilidade Vascular pelo Método do Azul de Evans

O aumento da permeabilidade vascular vesical foi avaliada por meio do extravasamento do corante Azul de Evans, que é um corante que se liga à albumina plasmática, e quando há o extravasamento de albumina e formação de edema, o corante estará presente. O corante foi injetado por via endovenosa no plexo retro orbital na dose de 25 mg/kg meia hora antes dos animais serem eutanasiados. As bexigas foram removidas, o conteúdo urinário foi desprezado e foram incubadas em eppendorfs contendo solução de formamida (1 ml/bexiga) a 56°C por 72h para a extração do corante. O corante extraído foi determinado pela medida na mudança da absorbância a 630 nm em leitor de ELISA. A permeabilidade vascular foi medida como parâmetro e expressa em µg de Azul de Evans/20g do peso da bexiga (média ± EPM).

4.6.4 Análise Histopatológica

Todo o processo de confecção das lâminas e análise histopatológica foi realizada em colaboração com o Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens do Departamento de Morfologia – UFC, sob coordenação da Profa. Dra. Gerly Anne Brito e sob orientação da Profa. Dra. Renata Leitão.

Após o desprezo do conteúdo urinário, as bexigas foram imersas em formol tamponado a 10% durante 24h, posteriormente foram imersas em álcool, desidratadas e incluídas em parafina. Foram cortadas longitudinalmente ao meio e divididas em lado direito e esquerdo. Os cortes foram obtidos na espessura de 5 µm e corados pelas técnicas da hematoxilina-eosina (HE). Posteriormente, foram analisadas no microscópio óptico. As alterações histológicas coradas pelo HE foram determinadas de acordo com os Critérios de Gray *et al.* (1986):

- Alterações intensas (2+) – Caracterizadas por exulceração da mucosa, várias úlceras, edema acentuado, infiltrado inflamatório, depósito de fibrina e hemorragia;
- Alterações discretas (1+) – Caracterizadas por redução do número de células epiteliais uroteliais devido à descamação, apagamento das dobras de mucosa habituais em virtude do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras;
- Histologia normal (0) – Caracterizada por epitélio urotelial normal, ausência de infiltrado inflamatório e de úlceras.

4.6.5 Imunohistoquímica

Todo o processo de confecção das lâminas e análise imunohistoquímica foi realizada em colaboração com o Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens do Departamento de Morfologia – UFC, sob coordenação da Profa. Dra. Gerly Anne Brito e sob orientação da Profa. Dra. Renata Leitão.

Para avaliar a marcação da enzima COX-2 na bexiga foi realizada a imunohistoquímica para esse imunomarcador. Inicialmente as bexigas foram removidas em inclusas em formol tamponado a 10% por 24h, posteriormente os tecidos foram inclusos em parafina e foram realizados cortes de 4 μ m para inserção na lâmina histológica. Em seguida as lâminas foram submetidas a desparafinização: inseridas em estufa a 60°C *overnight* e três banhos de xilol por 5 minutos cada. Então os cortes foram hidratados com dois banhos de etanol absoluto, um banho em etanol: a 90%, 80% e 70% por 3 minutos cada. Ao final dessa etapa os cortes foram submersos em água destilada por 10 minutos e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (pH 7) por 20 minutos em banho maria (95°C). Em seguida os tecidos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 minutos. Na etapa seguinte realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio à 3% por 30 minutos. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários para anti-COX2 (Abcam) por 1h em temperatura ambiente. Para confecção dos controles negativos os anticorpos primários foram omitidos. Após esse período, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e incubados com polímero por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS durante 3 minutos cada, secadas e foi aplicado o DAB (3,3 diaminobenzidina). DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em uma coloração marrom. Após esse tempo a reação foi parada

imediatamente e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e processadas para inserção da lamínula.

Para a análise qualitativa as bexigas foram fotografadas (aumento de 400x) e para quantificar as células imunomarcadas foi realizada a contagem total de células (aumento de 1000x) sem marcação e com marcação em 10 campos da lâmina em um total de 4 amostras por grupo, então foi realizada uma regra de três da seguinte forma:

$\frac{\text{N}^\circ \text{ total de células}}{\text{N}^\circ \text{ de células marcadas}} = \frac{100\%}{x}$
--

Os resultados foram expressos em Células COX-2⁺/%/grupo.

4.6.6 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usada como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos (SOUZA *et al.*, 2001).

As bexigas foram coletadas e incluídas em 200 µL de tampão (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,015 M, pH 4,7), posteriormente as amostras foram maceradas com a utilização de um Pollytron e centrifugadas a 3.000 rpm durante 15 min, a 4°C. Foi realizado um choque hipotônico no sedimento celular (pellet) com 1.000 µL de solução NaCl 0,2%. Após a nova centrifugação a 3.000 rpm durante 15 min à 4°C, o pellet foi ressuspenso em tampão NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4) com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e macerou-se novamente com o Pollytron. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado à 10.000 rpm durante 15 min à 4°C, e após centrifugação, 50 µL do sobrenadante obtido foi colocado em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço foram adicionados 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6mM) e 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM) e a placa foi incubada em estufa por 5 min à 37°C. Posteriormente, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M. A quantificação dos neutrófilos foi realizada à partir de uma curva padrão de neutrófilos (1x10⁵ neutrófilos/50 µL no primeiro poço). A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 450 nm e os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO *et al.*, 2006).

4.6.7 Contagem Diferencial Leucocitária

Para confirmar a redução da migração leucocitária e identificar quais os tipos de leucócitos predominantes, foi realizada uma contagem diferencial nas lâminas teciduais coradas com HE no microscópio óptico na objetiva de maior aumento (1000x). Foram contados 10 campos por lâmina em regiões com predominância de células leucocitárias e os resultados foram expressos através da média dos 10 campos por lâmina (média \pm EPM).

4.6.8 Dosagem de Citocinas

Foram realizadas as dosagens das citocinas IL-1 β , IL-8 e TNF- α no sobrenadante das bexigas e IL-1 β e TNF- α no soro (CUNHA *et al.*, 2000; SAFIEH-GARABEDIAN *et al.*, 1995). Inicialmente, as placas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos anti-TNF- α , anti-IL-1 β e anti-IL-8 murino. Após esse processo, os anticorpos foram removidos e as placas foram lavadas 3x com tampão PBS/Tween-20, então foi adicionado 290 μ L de BSA para realizar o bloqueio e a incubação por 1h a 4°C. Após o bloqueio, foi realizada a lavagem das placas e 100 μ L das amostras foram adicionadas. A curva padrão foi adicionada e incubada por 2h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti-TNF- α , anti-IL-1 β e anti-IL-8 diluídos (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após a incubação, as placas foram lavadas e 100 μ L do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. Após 20 min foi adicionado o-fenilenodiamina (OPD 100 μ L) e as placas foram incubadas no escuro a temperatura ambiente por 20 min. Para interromper a reação enzimática foi adicionado H₂SO₄ (1M 50 μ L) e a densidade óptica mensurada a 450 nm em leitor de ELISA. As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão obtida por diluição seriada. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante.

4.6.9 Quantificação de Glutathiona Reduzida

A glutathiona desempenha um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (JOSEPH; MANNERVIK; MONTELLANO, 1997). O método baseia-se no desenvolvimento de cor amarela ao se adicionar ácido 5,5 ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), conhecido como reagente de Ellman, a compostos de sulfidril. DTNB e GSH reagem formando o ácido

2-nitro-5-tiobenzóico e glutathiona oxidada (GSSG). As amostras são desproteinizadas com ácido tricloroacético (TCA) (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

As amostras foram processadas à 10% com EDTA 0,02M, posteriormente 40µL de homogenato foram colocados em eppendorf juntamente com 60µL de ácido tricloroacético (TCA) à 10%. O material foi centrifugado a 5000rpm durante 15min à 4°C. Posteriormente foi realizada a montagem da curva padrão na placa onde inicialmente foi adicionado 60µL de EDTA 0,02M do poço 2A ao poço 12A, após isso foi adicionado 60µL de GSH 100µg/mL nos poços 1A e 2A para então prosseguir com a diluição até o poço 11A e descartar 60µL desse poço, pois o 12A é o branco e contém somente EDTA 0,02M. 60µL das amostras foram adicionadas por poço na placa. Imediatamente antes da leitura, foi misturado 25mL do tampão Tris EDTA + 0,65ml (650µL) do DTNB 0,01M e foi adicionado 102µL da solução em cada poço. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA à 412 nm e os resultados foram expressos como mg GSH/g tecido.

4.7 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas através de Análise de Variância (ANOVA) seguido do pós teste de Bonferroni. Para a análise histopatológica e macroscópica os dados foram apresentados em medianas e determinados através do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns. Os testes foram realizados através do *software* GraphPad Prism® versão 5.0. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito de *Mo*-CBP₄ no peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A administração intraperitoneal de ifosfamida (400 mg/kg) ocasionou um aumento significativo (67,06%) do peso úmido vesical 12h após a sua administração quando comparado ao grupo tratado apenas com salina 0,9% ($p < 0,05$). Este aumento foi atenuado pelos tratamentos com Mesna (80 mg/kg) em 46% e pelos tratamentos com *Mo*-CBP₄ nas doses de 10; 20 e 40 mg/kg que preveniram o aumento do peso úmido vesical em 24,29%, 50,80%, 61,18% respectivamente, quando comparados ao grupo tratado apenas com ifosfamida ($p < 0,05$), conforme mostra o gráfico 1.

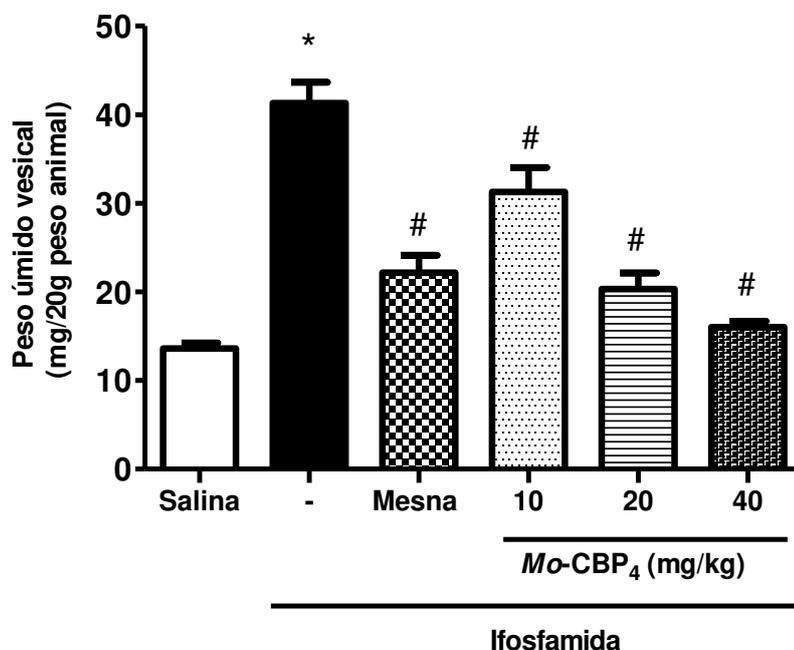


Gráfico 1. Efeito de *Mo*-CBP₄ e Mesna no peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. A Ifosfamida (400 mg/kg i.p.) induziu a um aumento no peso úmido vesical 12h após a sua administração que foi atenuado pelos tratamentos com Mesna (80 mg/kg i.p.) e *Mo*-CBP₄. Os resultados foram apresentados pelas médias \pm EPM ($n=6$). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

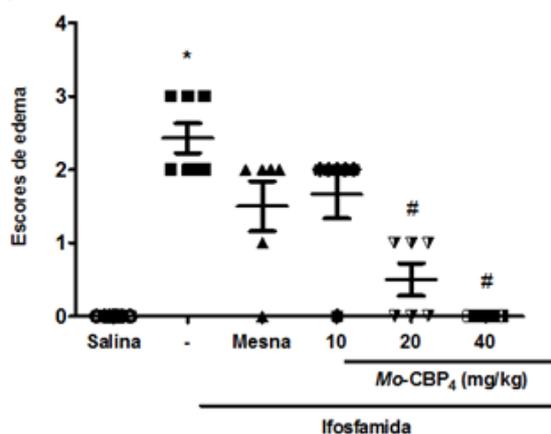
5.2 Efeito de *Mo*-CBP₄ na análise macroscópica para edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A cistite hemorrágica observada 12h após a administração de ifosfamida (400 mg/kg) foi macroscopicamente caracterizada pela presença de edema moderado à intenso, recebendo, de acordo com os critérios Gray *et al.* (1986), escores 3 (2-3) e por marcante

hemorragia com coágulos intra-vesicais e hematomas na mucosa recebendo escores 2,5 (2-3) e sendo significativamente diferente do grupo controle tratado com salina 0,9% que recebeu escores 0 (0-0) para ambos os parâmetros, conforme visto nas figuras 10 e 11 e tabela 1. O tratamento com mesna não foi eficaz em prevenir a formação de edema, recebendo escores 1 (0-2) e nem de hemorragia 1,5 (0-3). Os tratamentos com *Mo*-CBP₄ nas doses de 20 e 40 mg/kg foram capazes de prevenir a formação de edema recebendo escores de 1(0-1) e 0 (0-0), respectivamente, porém apenas a maior dose administrada foi eficaz em prevenir a hemorragia com escores 0 (0-1). A lectina na dose de 10 mg/kg não preveniu a formação de edema 2 (0-2) e hemorragia 1,5 (0-3), conforme mostram os gráficos 2 A e B e a tabela 1.

2)

A)



B)

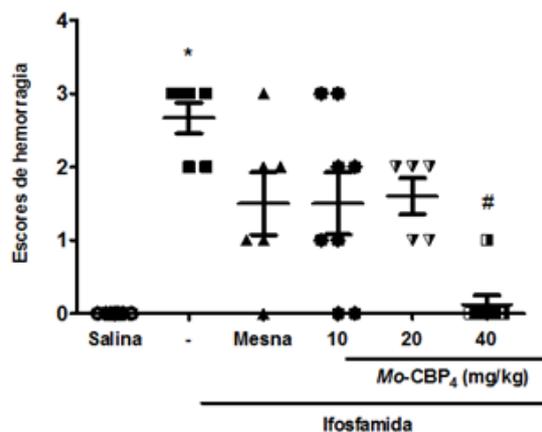


Gráfico 2 A e B. Efeito de *Mo*-CBP₄ e Mesna sobre os aspectos macroscópicos de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. A cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida (400 mg/kg i.p.) é caracterizada por presença de intenso edema e hemorragia. Os tratamentos com *Mo*-CBP₄ (20 e 40 mg/kg e.v.) foram eficazes em prevenir a formação de edema, mas apenas o tratamento com *Mo*-CBP₄ (40 mg/kg e.v.) foi eficaz em prevenir a hemorragia na análise macroscópica. Os resultados foram apresentados por medianas e valores mínimos e máximos (n=6). * p<0,05 em relação ao grupo salina e # p<0,05 em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns.

Grupos	Análise macroscópica (Edema)	Análise macroscópica (Hemorragia)
Salina 0,9%	0 (0-0)	0 (0-0)
Ifosfamida (400mg/kg)	3 (2-3)*	2,5 (2-3)*
Mesna (80mg/kg)	1 (0-2)	1,5 (0-3)
<i>Mo</i> -CBP ₄ (10mg/kg)	2 (0-2)	1,5 (0-3)
<i>Mo</i> -CBP ₄ (20mg/kg)	1(0-1)#	1 (0-1)
<i>Mo</i> -CBP ₄ (40mg/kg)	0 (0-0)#	0 (0-1)#

Tabela 1. Efeito de *Mo*-CBP₄ e Mesna sobre os aspectos macroscópicos de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Os resultados foram apresentados por medianas e valores mínimos e máximos (n=6). * p<0,05 em relação ao grupo salina e # p<0,05 em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns.

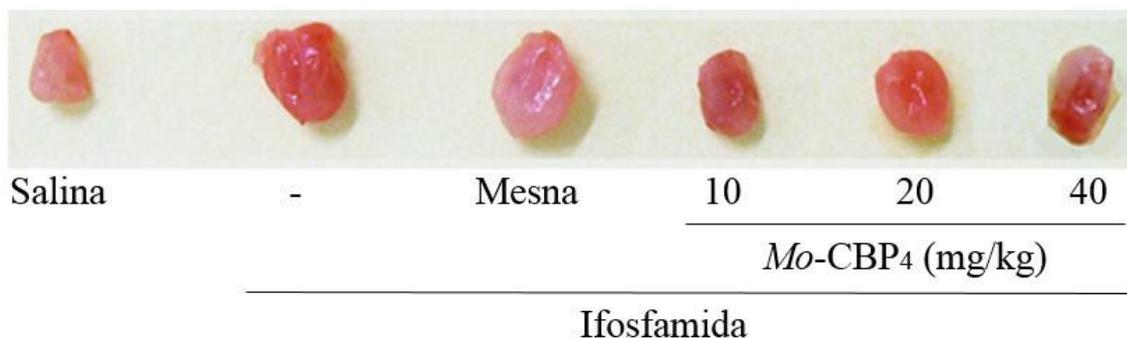


Figura 10. Fotografias das bexigas dos grupos experimentais na análise macroscópica. A ifosfamida induz a alterações macroscópicas na bexiga caracterizados por edema e hemorragia quando comparada ao grupo tratado com salina. Observa-se uma redução importante de edema nos grupos tratados com *Mo*-CBP₄ em diferentes doses quando comparados ao mesna e à IFO (Fonte: próprio autor).

5.3 Efeito de *Mo*-CBP₄ no aumento da permeabilidade vascular vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

O tratamento com ifosfamida (400 mg/kg) induziu a um aumento significativo da permeabilidade vascular (86,82%) medida através do extravasamento do Azul de Evans nas bexigas 72h após a administração do corante quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina 0,9%. O tratamento com mesna (80 mg/kg) não foi capaz de promover uma redução significativa, no entanto, o tratamento com *Mo*-CBP₄ na dose de 20 mg/kg, que foi escolhida para dar continuidade aos experimentos, preveniu em 60% o aumento da permeabilidade vascular vesical quando comparado ao grupo tratado apenas com ifosfamida (p<0,05), conforme mostra o gráfico 3.

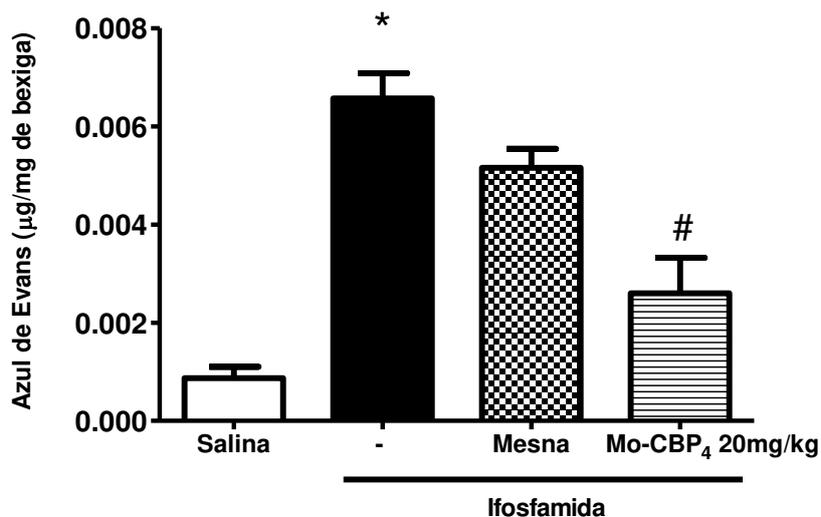


Gráfico 3. Efeito de *Mo*-CBP₄ e Mesna no aumento da permeabilidade vascular na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. A ifosfamida (400 mg/kg i.p.) induziu a um aumento na permeabilidade vascular 72h após a administração do corante Azul de Evans, que foi atenuada pelo tratamento com *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg e.v.), o tratamento com mesna (80 mg/kg i.p.) não apresentou uma redução significativa da permeabilidade vascular. Os resultados foram apresentados pelas médias ± EPM de azul de Evans (n=6). * p<0,05 em relação ao grupo salina e # p<0,05 em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.4 Efeito de *Mo*-CBP₄ em parâmetros histopatológicos na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

De acordo com os Critérios de Gray *et al.* (1986), após 12h da administração de ifosfamida (400 mg/kg) a bexiga é caracterizada por intenso edema, vasos congestionados, focos hemorrágicos, áreas com predominância de leucócitos, predominantemente neutrófilos e linfócitos, e perda de fibras colágenas, recebendo escores de 2 (2-2) como mostrado na figura 11 B, quando comparada à bexiga normal 0 (0-0) mostrada na figura 11 A. Nas bexigas tratadas com mesna (80 mg/kg) há ainda intenso edema e perda de fibras colágenas como mostrado em 11 C. Mas as alterações causadas por ifosfamida foram reduzidas pelo tratamento com *Mo*-CBP₄ (20mg/kg) e observa-se que praticamente não há foco hemorrágico, edema, presença de leucócitos e as fibras colágenas estão íntegras recebendo escores 1 (0-1), como mostrado na figura 11 D. Os escores com parâmetros de Gray são mostrado na tabela 2.

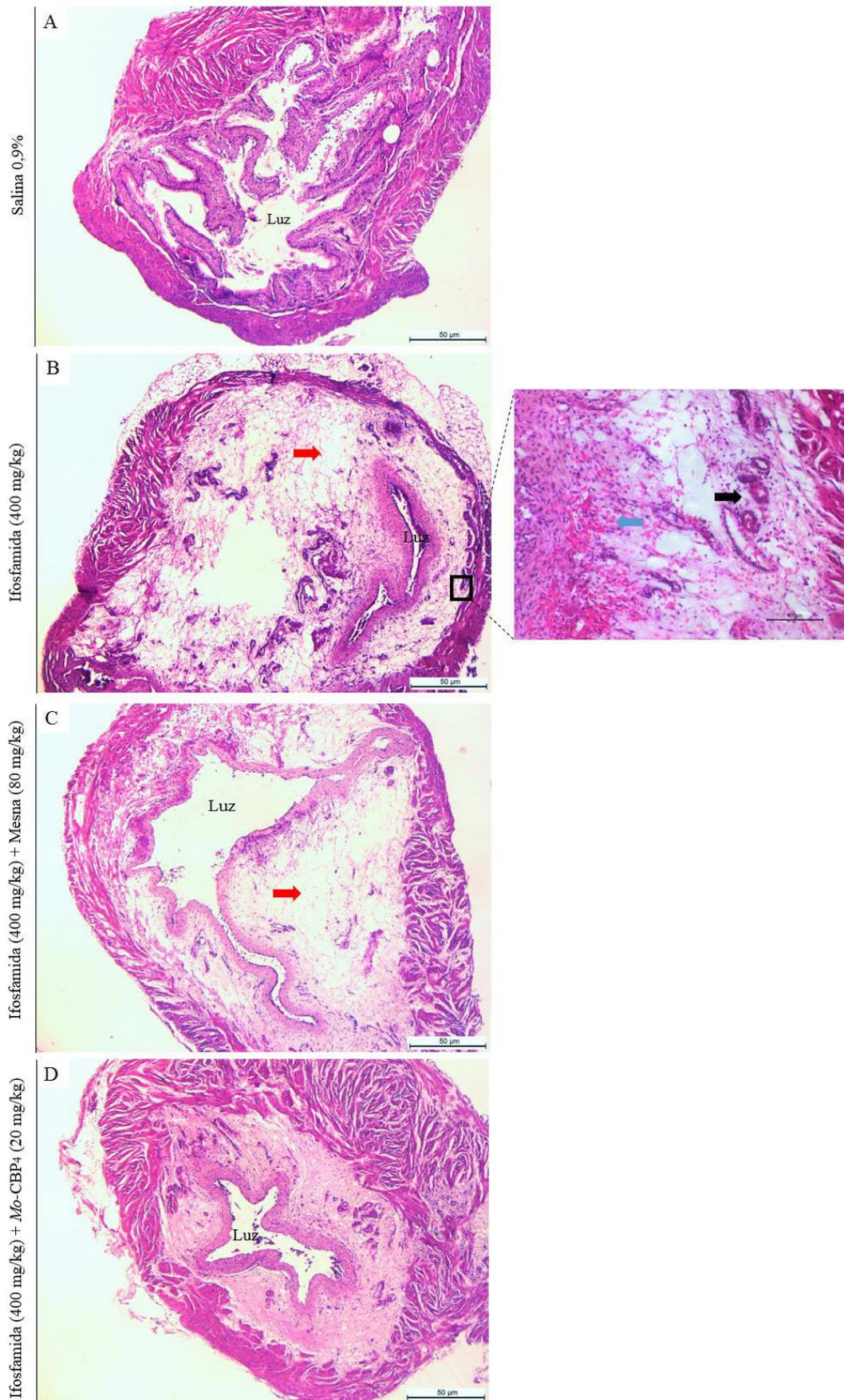


Figura 11. Fotomicrografias de bexigas. Análise histopatológica representativa das paredes da bexigas coradas por HE (Aumento de 40x). A. Bexiga normal; B. Bexigas com cistite hemorrágica em

animais tratados com Ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Observa-se intenso edema (setas vermelhas), vasos congestos e focos hemorrágicos. Observa-se no quadro em destaque em maior aumento (200x) vasos congestos (seta preta) e hemácias no tecido (seta azul). **C.** Bexigas tratadas com Mesna (80 mg/kg i.p.). Observa-se a presença de intenso edema (seta vermelha) e perda de fibras colágenas. **D.** Bexigas tratadas com *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg e.v.). Observa-se que praticamente não há foco hemorrágico, edema e presença de leucócitos, as fibras colágenas estão íntegras. (Fonte: próprio autor).

Grupos	Análise histopatológica
Salina 0,9%	0 (0-0)
Ifosfamida (400mg/kg)	2 (2-2)*
Mesna (80mg/kg)	1,5 (0-2)
<i>Mo</i> -CBP ₄ (20mg/kg)	1 (0-1)#

Tabela 2. Efeito de *Mo*-CBP₄ na análise histopatológica na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Os resultados foram apresentados por medianas e valores mínimos e máximos (n=6). * p<0,05 em relação ao grupo salina e # p<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com ifosfamida. Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns.

5.5 Efeito de *Mo*-CBP₄ na imunomarcação de COX-2 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

O tratamento com ifosfamida (400 mg/kg) induziu a uma imunomarcação média significativa de 33,72% de células marcadas quando contados 10 campos por amostra de bexiga em um total de 4 amostras por grupo, o mesmo foi realizado com os grupos tratados com mesna e *Mo*-CBP₄. Os grupos tratados com mesna (80 mg/kg) e com *Mo*-CBP₄ (20mg/kg) apresentaram 15,27% e 6,02% de células marcadas, respectivamente, em um total de 100% de células em 10 campos/amostra, conforme mostra o gráfico 4. A figura 12 mostra as fotomicrografias de bexigas imunomarcadas por COX-2 (400x).

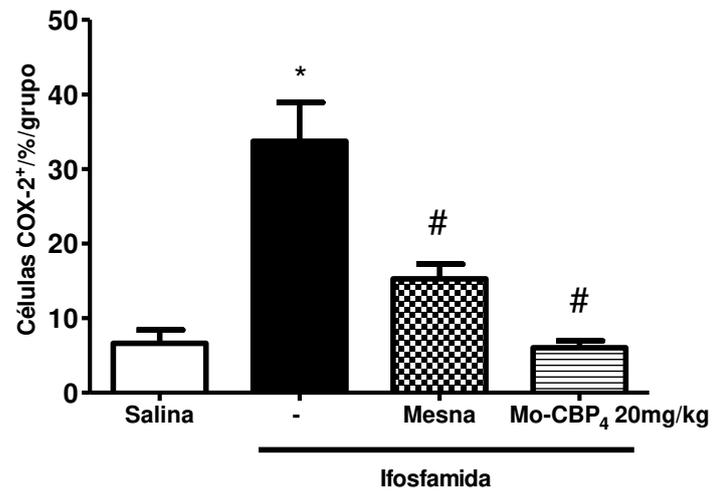
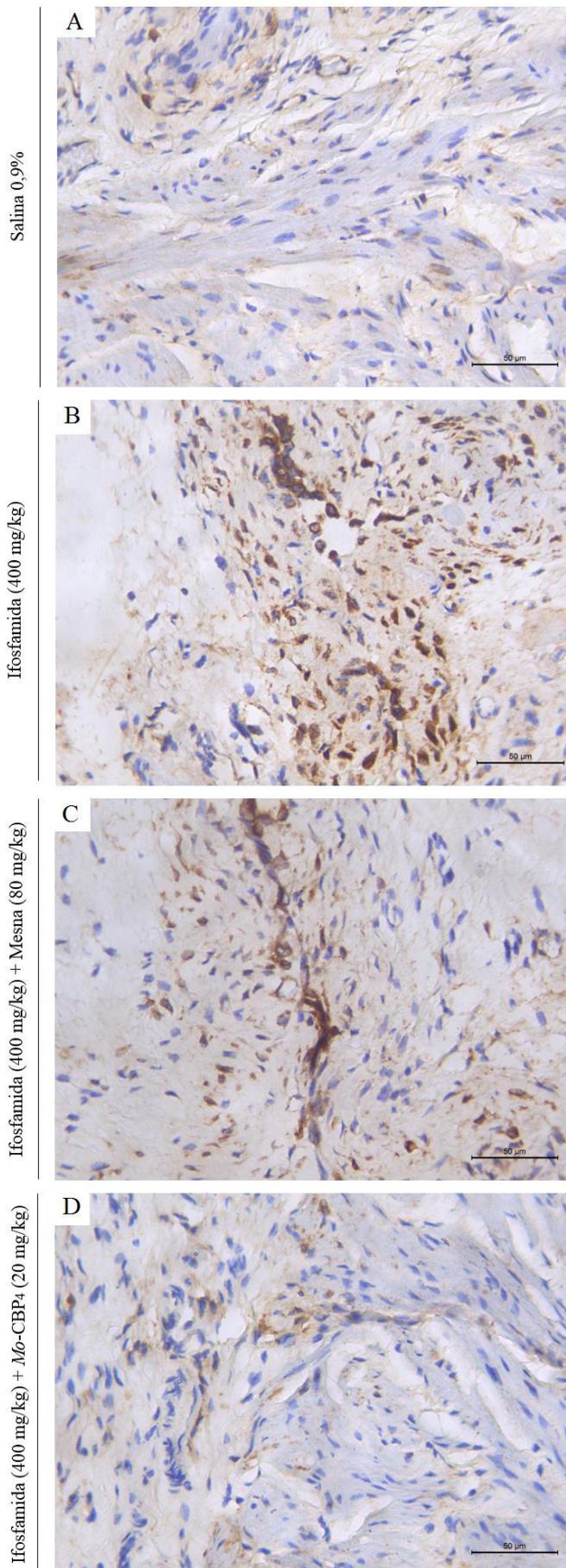


Figura 12. Fotomicrografias de bexigas. Análise imunohistoquímica representativa das bexigas com imunomarcção para COX-2 (400x). A. Bexiga normal; B. Bexigas com cistite hemorrágica em animais

tratados com Ifosfamida (400 mg/kg, i.p.). Observa-se intensa imunomarcação para COX-2; C. Bexigas tratadas com Mesna (80 mg/kg i.p.). Observa-se a presença de moderada imunomarcação para COX-2; D. Bexigas tratadas com *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg e.v.). Observa-se uma imunomarcação semelhante ao grupo tratado com salina. (Fonte: próprio autor). **Gráfico 4. Efeito de *Mo*-CBP₄ e mesna na redução da imunomarcação de COX-2 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.** A ifosfamida (400 mg/kg i.p.) induziu a um aumento significativo do percentual de células imunomarcadas com COX-2, que foi reduzido pelos tratamentos com *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg e.v.) e mesna (80 mg/kg i.p.). Os resultados foram apresentados pelas médias ± EPM (n=4). * p<0,05 em relação ao grupo salina e # p<0,05 em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.6 Efeito de *Mo*-CBP₄ na atividade de mieloperoxidase na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

O tratamento com ifosfamida (400 mg/kg) induziu a um aumento significativo (85%) da quantidade de leucócitos polimorfonucleares que foi quantificado indiretamente pela atividade de MPO, quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina 0,9% (p<0,0001). Este aumento foi atenuado pelos tratamentos com mesna (80 mg/kg) e *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg) que preveniram o aumento da atividade da enzima MPO em 94,7% e 85%, respectivamente, quando comparados ao grupo tratado apenas com ifosfamida (p<0,0001), conforme mostra o gráfico 5.

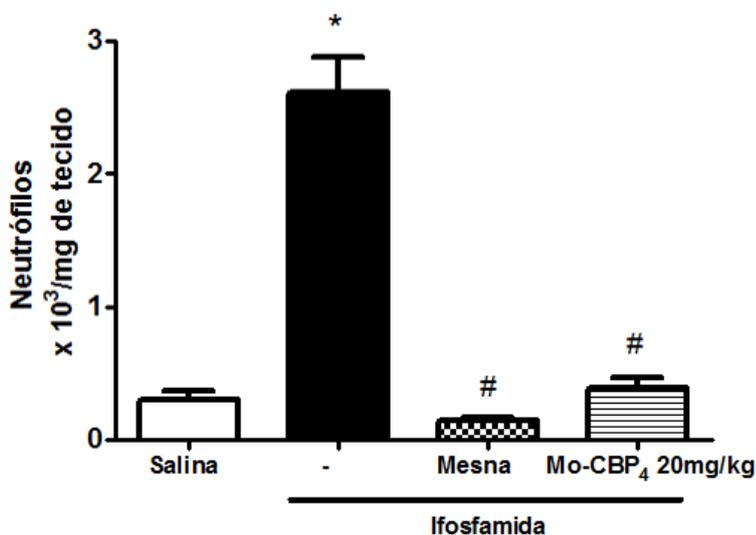
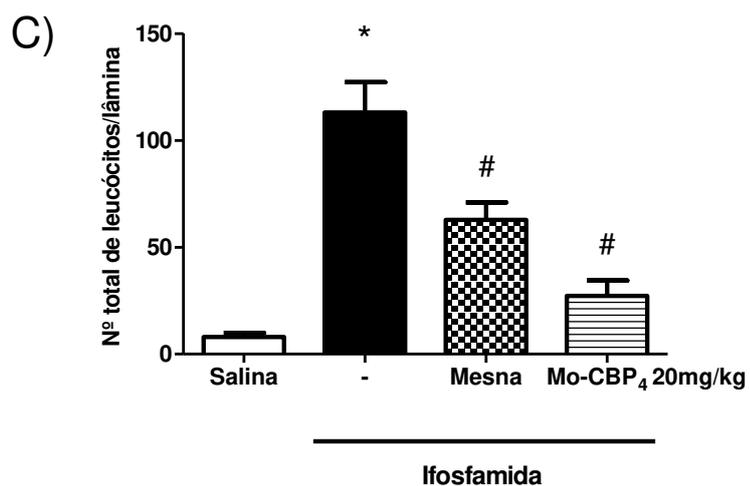
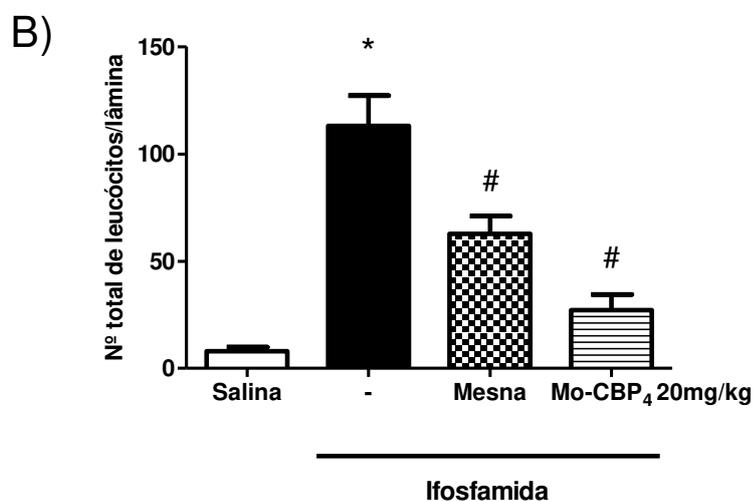
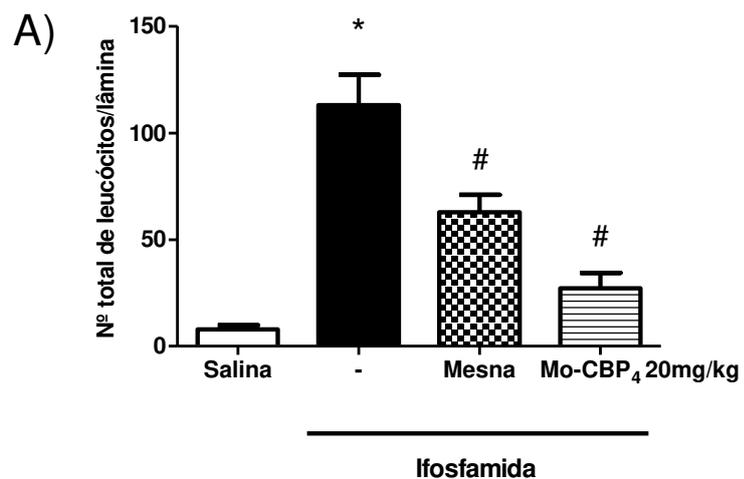


Gráfico 5. Efeito de *Mo*-CBP₄ e Mesna sobre a migração de neutrófilos na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. A Ifosfamida (400 mg/kg i.p.) induziu a um aumento significativo da quantidade de leucócitos polimorfonucleares, que foi atenuado pelos tratamentos com *Mo*-CBP₄ (20mg/kg e.v.) e Mesna (80mg/kg i.p.). Os resultados foram apresentados pelas médias ± EPM do número de neutrófilos/mg de tecido (n=6). * p<0,0001 em relação ao grupo salina e # p<0,0001 em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.7 Efeito de *Mo*-CBP₄ na redução do infiltrado linfocitário e neutrofílico na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

O tratamento com ifosfamida (400 mg/kg) induziu a um aumento significativo (93%) da quantidade leucócitos totais no tecido. Dentre os leucócitos, 54% eram neutrófilos e 46% linfócitos. Esse aumento foi considerado significativo quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina 0,9% ($p < 0,05$) e foi atenuado pelo tratamento com mesna (80 mg/kg) que foi capaz de reduzir o infiltrado linfocitário e neutrofílico em 42% e 54% respectivamente e *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg) que reduziu o infiltrado linfocitário e neutrofílico em 75% e 77% respectivamente, quando comparados ao grupo tratado apenas com ifosfamida ($p < 0,05$), conforme mostram os gráficos 6 A, B e C.

6)



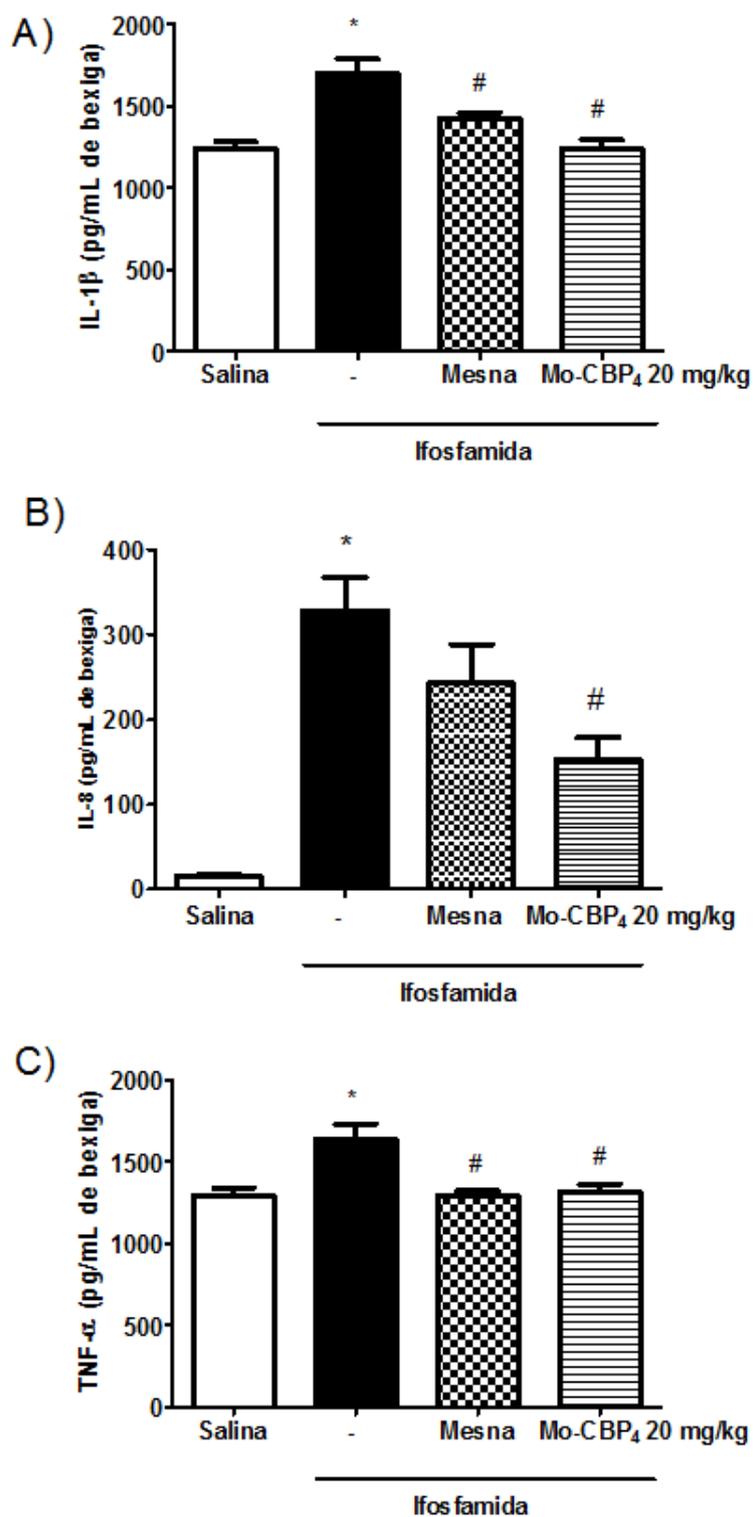
Gráficos 6 A, B e C. Efeito de *Mo*-CBP₄ e Mesna no infiltrado inflamatório de leucócitos, linfócitos e neutrófilos na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. A ifosfamida (400 mg/kg i.p.) induziu a um aumento significativo da quantidade de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos na contagem de 10 campos de tecido (aumento de 1000x), que foi atenuado pelos tratamentos com *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg e.v.) e Mesna (80 mg/kg i.p.). Os resultados foram apresentados pelas médias ± EPM do número de células/lâmina (n=6). * p<0,05 em relação ao grupo salina e # p<0,05 em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida.

ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.8 Efeito de *Mo*-CBP₄ nas concentrações de IL-1 β , IL-8, TNF- α na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

O tratamento com ifosfamida (400 mg/kg) induziu a um aumento significativo das concentrações de IL-1 β (27%), IL-8 (95%) e TNF- α (21%) no tecido quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina 0,9% ($p < 0,05$). O aumento das concentrações de IL-1 β , IL-8 e TNF- α no tecido foi atenuado pelos tratamentos com mesna (80 mg/kg) e *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg) que preveniram o aumento da liberação de IL-1 β em 16,24% e 26,69%, respectivamente, bem como TNF- α em 21,17% e 19,75% quando comparados ao grupo tratado apenas com ifosfamida ($p < 0,005$), porém em relação a IL-8 apenas o tratamento com *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg) preveniu o aumento da liberação em 53,16%, conforme mostram os gráficos 7 A, B e C.

7)



Gráficos 7 A, B, C. Efeito de *Mo*-CBP₄ e mesna na redução da liberação de IL-1 β , IL-8 e TNF- α na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. A ifosfamida (400 mg/kg i.p.) induziu a um aumento significativo das concentrações de IL-1 β , IL-8 e TNF- α na bexiga, que foi prevenido pelos tratamentos com *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg e.v.) e mesna (80 mg/kg i.p.). Os resultados foram apresentados pelas médias \pm EPM (n=6). * p<0,05 em relação ao grupo salina e # p<0,05 em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.9 Efeito de *Mo*-CBP₄ na concentração de glutatona na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

O tratamento com ifosfamida (400 mg/kg) induziu a uma redução significativa (78,97%) da concentração de glutatona quando comparada ao grupo que recebeu apenas salina 0,9% ($p < 0,05$) e foi recuperada pelo tratamento com *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg) que foi capaz de induzir um aumento da concentração de GSH em 80,55%, quando comparado ao grupo tratado apenas com ifosfamida ($p < 0,05$). No entanto, o tratamento com mesna (80 mg/kg) não foi capaz de promover um aumento significativo, conforme mostra o gráfico 8.

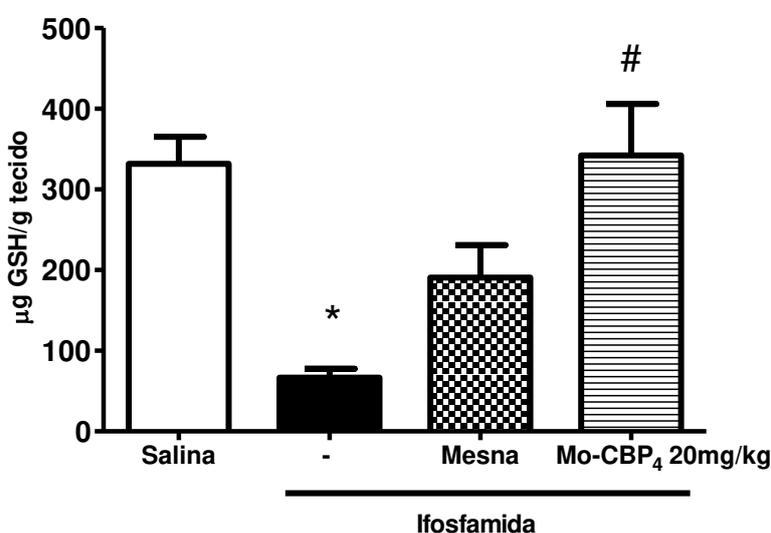


Gráfico 8. Efeito de *Mo*-CBP₄ e mesna no aumento da concentração de glutatona na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. A ifosfamida (400 mg/kg i.p.) induziu a uma redução significativa da concentração de glutatona na bexiga, que foi aumentada pelos tratamentos com *Mo*-CBP₄ (20 mg/kg e.v.) e mesna (80 mg/kg i.p.). Os resultados foram apresentados pelas médias \pm EPM ($n=6$). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

Neste modelo de cistite hemorrágica foi demonstrado que a lectina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck (*Mo-CBP₄*) exerceu efeito anti-inflamatório através da redução de: edema, migração de leucócitos, liberação de citocinas pró-inflamatórias, imunomarcção de COX-2 e aumento da concentração de glutathiona, apresentando efeito protetor na cistite hemorrágica.

A diminuição do rolamento e migração neutrofílica através do processo de quimiotaxia está diretamente relacionada à diminuição das concentrações de TNF- α e IL-1 β liberadas por macrófagos teciduais, ambas as citocinas apresentam vários papéis na resposta inflamatória, principalmente ativação dos leucócitos e ativação de outros mediadores inflamatórios (iNOS, COX-2 e ROS), onde COX-2 promove a formação de PGE₂. Todos esses mediadores desempenham um papel fundamental na patogênese da cistite hemorrágica (RIBEIRO *et al.*, 2012) e baseado no conhecimento acerca deles, inúmeras vias pró-inflamatórias iniciadas pela acroleína podem ser alvos terapêuticos de novos fármacos uroprotetores para reduzir esse processo inflamatório.

Os estudos com lectinas e, em especial com a *Mo-CBP₄*, veem demonstrando a ampla variedade de efeitos farmacológicos, onde as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva se destacam em modelos de inflamação (LUZ, 2017; PEREIRA *et al.*, 2011; PEREIRA, 2014)

Baseado nos dados obtidos por Pereira (2014), que utilizou três doses de *Mo-CBP₄* (0,1; 1 e 10 mg/kg) para tratamento por via endovenosa, no presente estudo para tratamentos pré e pós a administração de ifosfamida foram estabelecidas três doses atóxicas (10, 20 e 40 mg/kg), de acordo com estudos toxicológicos já realizados, que foram administradas também por essa via à fim de reduzir o processo inflamatório. Também foi utilizado um grupo tratado com mesna (80 mg/kg) por via intraperitoneal por ser a droga mais utilizada na clínica atualmente por pacientes em tratamento com oxazafosforinas (MATZ; HSIEH, 2017).

De acordo com Ribeiro *et al.* (2002) os principais mediadores relacionados à patogênese da doença (IL-1 β e TNF- α) começam a ser liberados ou expressos somente 12h após a administração de ifosfamida, portanto a escolha das doses das drogas, vias de administração, tempo de pré-tratamento e de eutanásia dos animais foram determinados de acordo com a padronização do modelo de cistite hemorrágica, que é bastante efetivo e aplicável, estabelecido pelo laboratório LAFICA que há anos vem estudando os mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese e os possíveis agentes uroprotetores

para essa patologia (BATISTA *et al.*, 2007; LEITE *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2007, 2008, 2010, 2011, 2012; MOURÃO, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2002).

Neste estudo, o modelo foi reproduzido apropriadamente e inicialmente foi realizada a mensuração do peso úmido vesical, que é um método bastante usado para quantificar a formação de edema. Posteriormente foi realizada a análise macroscópica de acordo com os Critérios de Gray (GRAY *et al.*, 1986), que apesar de terem sido descritos há alguns anos ainda são utilizados atualmente em boa parte dos estudos relacionados à cistite hemorrágica com o intuito de avaliar a presença de edema e hemorragia. O grupo tratado com ifosfamida apresentou evidências características de cistite hemorrágica pois na análise macroscópica as bexigas foram caracterizadas pela presença de edema moderado a severo, corroborando com a análise do peso úmido vesical, e hemorragia marcada com hematomas na mucosa e coágulos intravesicais, corroborando com Ali *et al.* (2014).

O processo inflamatório é caracterizado por sinais clássicos que são: edema, calor, rubor, dor e perda da função. Para que ocorra a formação de edema, inicialmente ocorre vasodilatação que funciona como aumento na pressão hidrostática, onde acarreta à saída do líquido do interior dos vasos para o interstício. Quando isto acontece há também uma diminuição da pressão osmótica, por conta desse desequilíbrio a reabsorção do líquido fica comprometida resultando em acúmulo de líquido no meio extravascular. A hemorragia é ocasionada por ruptura de um vaso sanguíneo e morfológicamente há formação de petéquias, púrpura, equimose e hematoma (ROBBINS *et al.*, 2010).

Mo-CBP₄ quando administrada nas doses de 20 e 40 mg/kg mostrou-se capaz de prevenir a formação de edema na análise macroscópica e em relação à análise macroscópica para avaliar a hemorragia, apenas a dose de 40 mg/kg da lectina foi capaz de reverter esse parâmetro, demonstrando com esses dados que o efeito de *Mo*-CBP₄ é dose-dependente.

Apesar da maior dose analisada ter demonstrado melhores resultados, foi escolhida a dose de 20 mg/kg para dar continuidade aos experimentos seguintes, visto que apesar da lectina apresentar bom rendimento protéico (6,33%) durante o processo de purificação, sabe-se que uma dose para ser ideal deve ser a mínima necessária para que se tenha o efeito terapêutico desejado.

Mo-CBP₄ (20 mg/kg) mostrou-se bastante eficaz em prevenir a formação de edema causado pela ifosfamida que foi confirmado pela redução da permeabilidade

vascular. Esse modelo de avaliação do aumento da permeabilidade vascular consiste na administração do corante azul de Evans por via endovenosa, este corante liga-se a albumina plasmática, conseqüentemente se houver formação de edema na bexiga urinária o corante estará presente. Os dados obtidos corroboraram com Pereira *et al.* (2011) e LUZ (2017) que observaram que esse efeito antiedematogênico de *Mo-CBP₄* nos modelos de permeabilidade vascular induzida por ácido acético e pancreatite aguda induzida por ceruleína foi dose-dependente. As lectinas de *Dioclea violacea* e *D. guianensis* também promoveram a redução de ambos os parâmetros na cistite hemorrágica (ASSREUY *et al.*, 1999), bem como a lectina das sementes de *Lonchocarpus araripensis* e *Acacia farnesiana* que ocasionaram a mesma ação farmacológica em reduzir a permeabilidade vascular e prevenir a formação de edema de pata provocados por carragenina (ABRANTES *et al.*, 2013; PIRES *et al.*, 2016). As lectinas de *Bauhinia bauhinioides* (BBL) e de *Clitoria fairchildiana* também preveniram a formação de edema de pata ocasionado por carragenina (GIRÃO *et al.*, 2015; LEITE *et al.*, 2012).

A prevenção da formação do edema através da inibição do aumento do peso úmido vesical e da permeabilidade vascular pode ter sido desencadeada devido à diminuição da liberação de TNF- α . De acordo com Gomes *et al.* (1995) que realizaram um pré-tratamento de animais com soro anti-TNF- α foi observada uma redução de ambos os parâmetros e segundo Leite *et al.* (2015) quando os animais foram tratados com inibidor de TNF- α (infiximabe) também houve redução do edema, ambos na cistite hemorrágica.

A análise histopatológica das bexigas tratadas com ifosfamida mostrou um tecido com cistite hemorrágica que é caracterizado por intenso edema, congestão vascular, hemorragia, degradação de fibras colágenas e áreas com predominância de neutrófilos e linfócitos. A intensidade dessas alterações está semelhantes ao observado em outros estudos (ASSREUY *et al.*, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2002). Porém, também há evidências histológicas de erosão extensa na mucosa com ulceração (ALI *et al.*, 2014; MACEDO *et al.*, 2012) o que não foi constatado neste estudo.

Mo-CBP₄ apresentou efeitos semelhantes a lectina de *D. violacea*, pois promoveu a preservação de uma grande área de urotélio com integridade de fibras colágenas, mas ainda com a presença de hemorragia (ASSREUY *et al.*, 1999). A análise histopatológica para edema das bexigas tratadas com a lectina na dose de 20 mg/kg corroborou com os dados macroscópicos.

A migração leucocitária para o tecido é um evento importante da resposta inflamatória e o número de polimorfonucleares está elevado em processos inflamatórios

agudos, sendo a primeira linha de defesa contra patógenos (ASSREUY *et al.*, 1999). O processo de deslocamento dos neutrófilos ao local da lesão é chamado de extravasamento, que se divide em 3 etapas: 1- Marginação, rolamento e adesão dos leucócitos para o endotélio; 2 - Transmigração através do endotélio (diapedese) e 3 - Migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático (ROBBINS *et al.*, 2010). A liberação de mediadores inflamatórios como histamina, PGE2 e prostaciclina irá ocasionar vasodilatação e marginação dos neutrófilos para a periferia do vaso, após esse processo se inicia o rolamento. O processo de rolamento por toda a periferia vascular é mediado por selectinas que, através de seu domínio lectínico, vão interagir com carboidratos específicos presentes da membrana dos neutrófilos (ALVES-FILHO *et al.*, 2010). As selectinas são glicoproteínas existentes em 3 tipos: endotelial, plaquetária e leucocitária. A selectina plaquetária (P-selectina) é encontrada não somente nas plaquetas mas também em corpos Weibel-Palade nas células endoteliais. O TNF e a IL-1 induzem uma maior expressão de E-selectina, molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), essas células endoteliais ativadas aumentam a adesão dos leucócitos (ROBBINS *et al.*, 2010). As selectinas participam do processo de adesão juntamente à imunoglobulinas e integrinas, mas as selectinas são as principais envolvidas nesse processo (PANÉS *et al.*, 1999). Após essa forte adesão ocorre a migração do neutrófilo que atravessa para o tecido por quimiotaxia, sendo guiado por quimiocinas, leucotrieno B4, componentes bacterianos exógenos, fragmentos do complemento, dentre outros (JANETOPOULOS; FIRTEL, 2008; ROBBINS *et al.*, 2010).

Diante disso, para avaliar a presença de leucócitos polimorfonucleares, foi realizada a dosagem de mieloperoxidase, que tem sido usada como índice quantitativo para avaliar a inflamação aguda em vários tecidos (SOUZA *et al.*, 2001). Nas bexigas tratadas com ifosfamida houve um aumento de MPO, sugerindo ter ocorrido infiltração de neutrófilos. No presente estudo, *Mo*-CBP₄ promoveu a diminuição da migração de neutrófilos induzida por ifosfamida, corroborando com os resultados obtidos com a mesma lectina nos modelos de migração de neutrófilos induzida por ácido acético e pancreatite aguda induzida por ceruleína (LUZ, 2017; PEREIRA *et al.*, 2011), aumentando as evidências de que *Mo*-CBP₄ possui efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos. Além disso, demonstrou ter ação semelhante às lectinas de *Dioclea violacea*, *D. guianensis*, *D. virgata*, *Cratylia floribunda*, *Canavalia boliviana* e lectina das sementes de *Lonchocarpus araripensis* (LAL) que inibiram a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina ou fMLP, bem como a lectina das sementes

de *Bauhinia bauhinioides*, *Parkia biglobosa*, *Clitoria fairchildiana*, *Canavalia grandiflora*, *Acacia farnesiana* e o extrato aquoso de sementes de *Moringa oleifera* que ambos tiveram o mesmo efeito sobre a migração leucocitária induzida apenas por carragenina (ABRANTES *et al.*, 2013; ALENCAR *et al.*, 1999; ARAÚJO *et al.*, 2013; BEZERRA *et al.*, 2014; GIRÃO *et al.*, 2015; LEITE *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2013).

Para confirmar o resultado obtido da dosagem da atividade de MPO foi realizada a contagem celular diferencial no tecido e de acordo com os resultados obtidos os neutrófilos e, curiosamente, os linfócitos são as principais células envolvidas no efeito anti-inflamatório da lectina. Esses achados corroboram com Macedo *et al.* (2012), no entanto, a presença de mononucleados praticamente não é descrita em outros estudos relacionados a cistite hemorrágica.

LUZ (2017) mostrou que na análise histopatológica *Mo*-CBP₄ foi capaz de atenuar significativamente o infiltrado inflamatório no pâncreas de animais com pancreatite aguda induzida por ceruleína. Pires *et al.* (2016) constataram que a lectina das sementes de *Lonchocarpus araripensis* foi capaz de promover a redução da concentração de neutrófilos mas não teve efeito sobre a concentração de mononucleares em modelo de peritonite induzida por fMLP e carragenina, a lectina promoveu essa ação por inibição do rolamento e adesão leucocitária.

A diminuição da migração de leucócitos neste estudo, especialmente polimorfonucleares, pode estar relacionada com a competição entre *Mo*-CBP₄ e selectinas por ligação a carboidrato comum presente em membranas de leucócitos e/ou células endoteliais, pois a inflamação é mediada por lectinas de membrana (selectinas, integrinas, imunoglobulinas) que devido a mecanismos de interação entre essas moléculas de adesão, leucócitos e células endoteliais promovem o processo de rolamento e migração (ASSREUY *et al.*, 1999; BARI *et al.*, 2016).

De acordo com Pereira (2010), quando *Mo*-CBP₄ foi incubada com seu carboidrato específico (N-acetil-D-glucosamina) houve inibição das contorções abdominais induzida por ácido acético, mostrando que a atividade antinociceptiva da proteína parece independe do sítio de ligação à carboidrato, mas a atividade anti-inflamatória parece depender dessa ligação, pois Pereira (2014) constatou que *Mo*-CBP₄ teve seu efeito inibido de reduzir a migração de neutrófilos após a incubação com N-acetil-D-glucosamina.

Vários estudos já demonstraram que o domínio lectínico está diretamente

relacionado à atividade pró ou anti-inflamatória das lectinas (ALENCAR *et al.*, 2013; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2015). Pires *et al.* (2016) mostraram que lectina de sementes isolada de *Lonchocarpus araripensis*, que é específica por N-acetil-D-glucosamina, teve seu efeito anti-inflamatório revertido quando incubada a esse carboidrato e foi capaz de bloquear completamente o seu efeito inibitório na migração de leucócitos, corroborando com Alencar *et al.* (1999; 2005) que demonstraram que lectinas de *Lonchocarpus sericeus* e *Dioclea virgata* inibiram a migração de neutrófilos e o edema de pata induzidos por carragenina. As atividades inibitórias dessas lectinas foram revertidas quando incubadas com seus açúcares específicos (α -metil mannoside e N-acetil-D-glucosamina). Devido a semelhança dessas lectinas em serem específicas ao mesmo carboidrato e por Pereira (2014) ter mostrado que *Mo*-CBP₄ teve seu efeito de redução da migração de neutrófilos inibido após a incubação, esses dados nos levam a sugerir que o domínio lectínico deve estar envolvido na atividade anti-inflamatória da lectina também neste modelo.

De forma pioneira neste estudo foi demonstrado que *Mo*-CBP₄ promoveu diminuição da liberação de IL-8 e esse é outro mecanismo sugestivo para a diminuição da migração de leucócitos. A interleucina 8 (IL-8/CXCL8), gerada por macrófagos e células endoteliais, está envolvida predominantemente nas respostas inflamatórias agudas e pertence a família das quimiocinas. As quimiocinas são definidas como citocinas quimiotáticas que controlam a migração de leucócitos, atuando como coordenadoras de tráfego celular durante reações imunológicas e inflamatórias. Essa citocina é classificada em CXCL8 pois contém duas cisteínas separadas por um resíduo (RANG *et al.*, 2016). A IL-8 induz à reorganização do citoesqueleto, alterações nas concentrações de cálcio intracelular, ativação de integrinas e exocitose de proteínas granulares (PACCAUD; SCHIFFERLI; BAGGIOLINI, 1990).

É pouco relatada na literatura a atividade das lectinas em relação a IL-8, mas os resultados obtidos neste estudo corroboram com os estudos envolvendo a lectina de sementes *Lonchocarpus sericeus*. Essa lectina reduziu a concentração de IL-8 no exsudato peritoneal de camundongos estimulados com carragenina de forma dose-dependente, no entanto apenas a maior dose administrada (10 mg/kg) promoveu esse efeito na pata de camundongos também estimulada com carragenina (MOTA, 2008; NAPIMOGA *et al.*, 2007).

Outro mecanismo sugestivo para essa diminuição da migração de leucócitos é a diminuição das concentrações de TNF- α e IL-1 β , pois o primeiro atua como um agente

quimiotático potente, enquanto que o segundo estimula a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (NILSSON, FOWLER, JACOBSSON, 2006; YU *et al.*, 2007). Ribeiro *et al.* (2002) demonstraram que os soros anti-TNF- α e anti-IL-1 β inibiram a capacidade das respectivas citocinas para induzir migração de neutrófilos.

A lectina em estudo promoveu a redução das concentrações teciduais de TNF- α e IL-1 β mas não teve efeito sobre o aumento da liberação de IL-10 (dados não apresentados), corroborando com LUZ (2017). No entanto em outros estudos, *Mo*-CBP₄ foi capaz de reduzir a concentração de IL-1 β e aumentar a de IL-10 no soro (PEREIRA, 2014) e reduzir as concentrações de TNF- α e IL-1 β plasmáticas (LUZ, 2017). Por conta disso foi investigada a ação da lectina no soro dos animais neste modelo de cistite hemorrágica e, confirmando o descrito na literatura sobre a patogênese da doença ser restrita à bexiga, não houve diferença estatística entre os grupos tratados com salina, ifosfamida, mesna e *Mo*-CBP₄ (dados não apresentados).

Já foi demonstrado que o extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* e cMoL (“coagulant *M. oleifera* lectin”) reduziram as concentrações de TNF- α e IL-1 β tanto *in vitro* como *in vivo*, bem como as lectinas de *Bauhinia bauhinioides* (BBL), *Lonchocarpus sericeus* e *Canavalia grandiflora* que reduziram apenas *in vivo* (ARAÚJO *et al.*, 2013; GIRÃO *et al.*, 2015; NAPIMOGA *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2009). O bloqueio do receptor de IL-1 β pode estar relacionado à diminuição do processo hemorrágico, visto que ao ser utilizado um bloqueador de receptor de IL-1 (anakinra) houve um maior controle desse parâmetro na cistite hemorrágica (LEITE *et al.*, 2015).

A redução da expressão de COX-2 por *Mo*-CBP₄ pode estar diretamente relacionada à diminuição das concentrações de TNF- α e IL-1 β liberadas por macrófagos, pois a COX-2 é induzida principalmente nas células inflamatórias quando ativadas por ambas as citocinas (RANG *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2012). Ribeiro *et al.* (2002) demonstraram que ao ser utilizado um inibidor de síntese TNF- α (talidomida) e um inibidor de síntese IL-1 β (pentoxifilina) esses agentes preveniram a formação de edema vesical e alterações histopatológicas quando em comparação ao grupo tratado apenas com ifosfamida.

A COX-2 é uma enzima que atua na cascata do ácido araquidônico e é a isoforma de cicloxigenase mais expressa durante o processo inflamatório. Essa enzima é a principal responsável pela formação de prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano) na inflamação, onde o aumento da formação de prostaglandinas (PGs) irá promover a sensibilização nos receptores de dor ocasionando a hiperalgesia (DRAY; URBAN, 1996;

DUBOIS *et al.*, 1998). Porém existem algumas exceções, pois COX-2 é expressa constitutivamente no rim, gerando prostaciclina que atua na homeostase renal e no sistema nervoso central, onde sua função não está bem elucidada (RANG *et al.*, 2016).

Macedo *et al.* (2007, 2011) demonstraram que a ifosfamida promoveu alterações nas funções motoras do trato urinário inferior dos animais, comprometendo o processo de esvaziamento da bexiga urinária em ratos anestesiados e alterando o comportamento contrátil. Essas alterações podem ter sido desencadeadas pela expressão de COX-2 na bexiga urinária, que tem pico de expressão 24h após a administração de ifosfamida, com consequente aumento das concentrações plasmáticas de PGE2. Além disso, em animais tratados com etoricoxib, um inibidor de COX-2, houve uma redução significativa de PGE2. Etoricoxib, em um modelo de cistite hemorrágica por administração intravesical de acroleína, promoveu redução do peso úmido vesical após 12h da administração de acroleína, pois entre 3 e 6h não há expressão suficiente da enzima COX-2 para ocasionar a diminuição do peso úmido no animais tratados com a acroleína, comprovando que há a liberação de outros mediadores inflamatórios mais precocemente (MACEDO *et al.*, 2008).

Os dados obtidos neste trabalho corroboram com LUZ (2017) que também demonstrou que *Mo*-CBP₄ reduziu a imunomarcação de COX-2 na pancreatite aguda induzida por ceruleína. Além disso, em animais tratados com o extrato hidroetanólico das folhas e da flor de *Moringa oleifera* houve redução da marcação de COX-2 em macrófagos estimulados com LPS (FARD *et al.*, 2015; TAN *et al.*, 2015). Bem como o glicosídeo fenólico bioativo 4 - [(2'-O-acetil- α -L-rhamnosyloxy) benzil] isotiocianato (RBITC) obtido da *M. oleifera* que atenuou a expressão COX-2 de maneira dependente da concentração em células RAW 264.7 também estimuladas com LPS (PARK *et al.*, 2011).

Mo-CBP₄ também inibiu que houvesse redução da concentração de glutathiona. A glutathiona (GSH) é um tiol celular de baixo peso molecular prevalente em tecidos de animais, vegetais e microorganismos. Sua principal função é manter um adequado potencial de oxidação-redução nas células e atua, principalmente, na defesa celular contra radicais livres, peróxidos e xenobióticos atuando em conjunto com as enzimas glutathiona peroxidase e glutathiona-S-transferase (SIES, 1999). Para que a atividade protetora da glutathiona expressa pela redução de espécies oxidantes, e consequente oxidação da GSH à glutathiona dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico que é desencadeado devido a atividade de três grupos de enzimas:

glutathione oxidase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, onde as duas primeiras enzimas catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a glutathione reductase é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

Já foi demonstrado que a glutathione exerce um efeito protetor contra o processo inflamatório na cistite hemorrágica. Ali *et al.* (2014) mostraram que animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida apresentaram macroscopicamente edema moderado a severo e hemorragia marcada com hematomas da mucosa e coágulos intravesicais. Além disso, também tiveram alterações histológicas caracterizadas por erosão na mucosa com ulcerações múltiplas, infiltrado de células inflamatórias e deposição de fibrina, alterações essas que foram praticamente abolidas nos animais tratados com glutathione. Batista *et al.* (2007) corroborando com esses achados demonstraram que a glutathione exerce efeito protetor na cistite hemorrágica induzida tanto por ifosfamida quanto por administração intravesical de acroleína, ocasionando inibição do aumento do peso úmido vesical bem como proteção contra alterações histopatológicas e macroscópicas para edema e hemorragia.

Alguns estudos já demonstraram a importante atividade antioxidante das folhas de *M. oleifera*. O extrato hidroalcolico das folhas de *Moringa oleifera* ocasionou efeito antioxidante em modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em ratos, pois ocasionou a normalização das concentrações de malonaldeído e glutathione, provavelmente por efeitos antioxidantes diretos, eliminação de radicais livres ou através de proteção contra a peroxidação lipídica (TAHA; AMIN; SULTAN, 2015). Corroborando com esses dados, o extrato das folhas de *Moringa oleifera* também ocasionou uma elevação significativa da concentração de glutathione no fígado de animais pré tratados com esse extrato quando comparados aos animais tratados com acetaminofeno, que é um composto responsável por ocasionar toxicidade hepática quando administrado em superdosagem desencadeando o estresse oxidativo (FAKURAZI; HAIRUSZAH; NANTHINI, 2008). Em um estudo recente em ratos com hepatotoxicidade induzida por níquel, foi constatado que o níquel induziu a um aumento de malondialdeído no plasma e redução da concentração de glutathione reduzida. Foi demonstrado que os animais que receberam uma dieta à base de folhas de *M. oleifera* tiveram redução da concentração de MDA e aumento da concentração de GSH (ADEYEMI; AROGE; AKANJI, 2017).

Apesar de ser o uroprotetor mais utilizado na clínica, muitos pacientes em

tratamento com mesna ainda apresentam discretas alterações macroscópicas como: edema leve, hemorragia com hematomas mucosos e telangiectasia. Em relação a avaliação microscópica, alterações histopatológicas como: edema, erosão, exocitose, hialinização e esclerose são significativas nas bexigas (LIMA *et al.*, 2007) por ser um fármaco restritamente profilático. Portanto, é imprescindível a busca por novas alternativas terapêuticas que tenham ação protetiva na cistite hemorrágica, visto que um sinal característico do processo inflamatório é a hiperalgesia que pode acarretar desconforto aos pacientes.

Com base nestes resultados experimentais podemos sugerir que *Mo-CBP₄* desempenhou ação anti-inflamatória superior ao mesna em vários parâmetros e com uma dose 25% menor, ocasionando diminuição de: edema, migração de leucócitos, liberação de citocinas pró-inflamatórias, imunomarcção de COX-2 e ocasionando efeito antioxidante por aumento da concentração de GSH. Estudos ainda devem ser realizados à fim de esclarecer o mecanismo de ação nesse modelo para um possível uso de *Mo-CBP₄* como fármaco, mas muitas proteínas já vêm sendo utilizadas como agentes terapêuticos em condições específicas sendo chamadas de biofármacos e podem ocasionar menos efeitos colaterais pois são utilizadas em baixas concentrações. Sendo assim, *Mo-CBP₄* poderá ser um composto natural promissor para profilaxia da cistite hemorrágica atuando isoladamente ou em associação com mesna.

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo mostram o efeito anti-inflamatório da lectina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck (*Mo-CBP₄*) no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos, a qual atua na prevenção da formação de edema, diminuição da migração leucocitária, redução das concentrações de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-8 e TNF- α), redução da imunomarcagem de COX-2 e preservando a concentração de GSH. No entanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar e confirmar seu exato mecanismo de ação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES, V. E. F.; ROCHA, B. A. M.; NÓBREGA, R. B. et al. Molecular Modeling of Lectin-Like Protein from *Acacia farnesiana* Reveals a Possible Anti-Inflammatory Mechanism in Carrageenan-Induced Inflammation. **Biomed. Res. Int.**, 2013.
- ADEDAPO, A.A.; FALAYI, O.O.; OYAGBEMI, A.A. Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant, phytochemical and toxicological properties of the methanolic leaf extract of commercially processed *Moringa oleifera* in some laboratory animals. **J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.** v. 26, n.5, p. 491–499. 2015.
- ADEYEMI, O. S.; AROGE, C. S.; AKANJI, M. A. *Moringa oleifera*-based diet protects against nickel-induced hepatotoxicity in rats. **J. Biomed. Res.** v. 31, n. 4, p. 350–357, 2017.
- ALENCAR, N. M. N.; BITENCOURT, F. S.; FIGUEIREDO, I. S. T.; LUZ, P. B.; LIMA-JUNIOR, R. C. P.; ARAGÃO, K. S.; MAGALHÃES, P. J. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; FREITAS, A. P. F.; RAMOS, M. V. Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the Clinically Used Drug for Colon Cancer Therapy, Are Eliminated in Experimental Animals Treated with Latex Proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae). **Phytoterapy research.** v. 31, p. 312–320, 2016.
- ALENCAR, N. M. N.; CAVALCANTE, C. F.; VASCONCELOS, M. P.; LEITE, K. B.; ARAGÃO, K. S.; ASSREUY, A. M. S.; NOGUEIRA, N. A. P.; CAVADA, B.S. ; VALE, M. R. Anti-inflammatory and anti-microbial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n.7, p. 919-922, 2005.
- ALENCAR, N. M.; ASSREUY A. M.; CRIDDLE, D. N. et al. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein and Peptide Letters**, v. 11, p. 195-200, 2004.
- ALENCAR, N. M.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.; CAVADA, B.S.; FLORES, C. A. et al. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, v. 8, p. 107–113, 1999.
- ALENCAR, N.M.; MOTA, M.R.; RODRIGUES, N.V.; MARTINS, J.L.; DO NASCIMENTO, K. S.; ASSREUY, A.M.; CAVADA, B.S. Neutrophil-infiltrated paw edema induced by mannose-binding *Dioclea violacea* lectin. **Pharmacol Rep.** v. 65, n. 1, p. 220-5, 2013.
- ALI, S.; DANDA, S.; BASHA, S.A.; RASHEED, A.; AHMED, M.; AHMED. O. Comparison of uroprotective activity of reduced glutathione with mesna in ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in rats. **Indian J. Pharmacol.**, v. 46, p. 105, 2014.
- ALVES-FILHO, J.C.; DE FREITAS, A.; RUSSO, M.; CUNHA. F.Q.; Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit. Care Med.** v. 34, p. 461-470, 2006.

ALVES-FILHO, J.C.; SPILLER, F.; CUNHA, F.Q. Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock**, v.34, p. 15-21, 2010.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. Moringa oleifera: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. **Phytother. Res.**, v. 21, p. 17–25. 2007.

ARAÚJO, L.C.; AGUIAR, J.S.; NAPOLEÃO, T.H.; MOTA, F.V.; BARROS, A.L.; MOURA, M.C.; CORIOLANO, M.C.; COELHO, L.C.; SILVA, T.G.; PAIVA, P.M. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from Moringa oleifera seeds. **PLoS One**. v. 8, n. 12, 2013.

ARLAND M.; LEUNER S.; LANGE S, et al. Ifosfamide, epirubicin and granulocyte colony-stimulating factor: a regimen for successful mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with multiple myeloma. **Hematol. Oncol.**, v.19, p.59-66, 2001.

ASSREUY A. M. S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; SOUZA, M.L.P.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. et al.: Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm.**, v. 6, p. 201–210, 1997.

ASSREUY, A.M.S.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, E.E. F.; BRITO, G. A. C.; 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, p. 1988–1993, 1999.

BARI, A.U.; SANTIAGO, M.Q.; OSTERNE, V.J.S.; PINTO-JUNIOR, V.R.; PEREIRA, L.P. et al. Lectins from Parkia biglobosa and Parkia platycephala: A comparative study of structure and biological effects. **J. of Biological Macromolecules**. v. 92, p. 194-201, 2016.

BATISTA, C. K. L. P.; MOTA, J. M. S. C.; SOUZA, M. L. P.; LEITAO, B. T.; SOUZA, M. H. L. P.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q.; Ribeiro, R. A. Amifostine and glutathione prevent ifosfamide- and acrolein-induced hemorrhagic cystitis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 51, p. 71-77, 2007.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.** V. 271, p. 1424-37, 1996.

BENJAMIN R.S.; LEGHA S.S.; SHREYASKUMAR R.P. et al. Single-agent ifosfamide studies in sarcomas of soft tissue and bone: the M.D. Anderson experience. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 31, n. 2, p. 174–179, 1993.

BERGER, A.M.; KILROY, T.J. ORAL COMPLICATIONS. IN: DE VITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSEBERG, S.A. (Ed.). **Cancer: principles and practice of oncology**. v. 6, 2001.

BERRAK S. G.; PEARSON M.; BERBEROGLU S.; ILHAN IE.; JAFFE N. High-dose ifosfamide in relapsed pediatric osteosarcoma: therapeutic effects and renal toxicity. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 44, n. 3, p. 215-9, 2015.

BEZERRA, G.A.; VIERTLMAYR, R.; MOURA, T.R. Structural studies of an anti-inflammatory lectin from *Canavalia boliviana* seeds in complex with dimannosides. **PLoS One**. v. 9, n. 5, 2014.

BIAGI J. J.; HERBERT K. E.; SMITH C. et al. A phase II study of dexamethasone, ifosfamide, cisplatin and etoposide (DICE) as salvage chemotherapy for patients with relapsed and refractory lymphoma. **Leuk. Lymphoma**, v. 46, n. 2, p. 197-206, 2005.

BOKEMEYER, C.; HARTMANN, J.T. Oral and gastrointestinal toxicity. In: LIPP, H. P. Anticancer drug toxicity: prevention, management and clinical pharmacokinets. **New York: Marcel Dekker**. p. 235-61, 1999.

BRENO S. NUNES, B. S.; RENSONNET, N. S.; DANIELA DAL-SECCO, D. et al. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds present potential anti-inflammatory cytokines (interferon gamma) and anti-inflammatory cytokine (interleukin-10) gene polymorphisms in chronic hepatitis B infection: an Indian scenario. **J. Interferon Cytokine Res.**, v.34, p. 547-551, 2014.

BRYANT, B. M.; JARMAN, M.; FORD, H. T.; SMITH, I. Prevention of isophosphamide-induced urothelial toxicity with 2-mercaptoethane sulphonate sodium (mesnum) in patients with advanced carcinoma. **Lancet**, v. 2, p. 657-659, 1980.

BUDA A.; DELL'ANNA T.; SIGNORELLI M.; MANGIONI C. Role of ifosfamide in cervical cancer: an overview. **Oncology**, v. 65, n. 2, p. 63-6, 2003.

COHEN, M. H.; CREAVEN, P. J.; TEJADA, F.; HANSEN, H. H.; MUGGIA, F., MITTELMAN, A.; SELAWRY, O. S. Phase I clinical trial of ifosfamide. **Cancer Chemother.**, v. 59, p. 751-755, 1975.

COLVIN, M. The comparative pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. **Semin. Oncol.** v. 9, n. 1, p. 2-7, 1982.

CUNHA, J.M.; CUNHA, F.Q; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Cytokine mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **Br. J. Pharmacol.**, v.130, p.1418-1424, 2000.

DAS, N.; GANGULI, D.; DEY, S. *Moringa oleifera* Lam. seed extract prevents fat diet induced oxidative stress in mice and protects liver cell-nuclei from hydroxyl radical mediated damage. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 53, n. 12, p. 794-802, 2015.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**. v. 257 n. 4, p.163-173, 1989.

DEVRIES, C.R.; FREIHA, F.S. Hemorrhagic cystitis: a review. **J. Urol.**, v. 143, n.1, p. 1-9, 1990.

DIETRICH, F.; PIETROBON MARTINS, J.; KAISER, S. et al. The Quinovic Acid Glycosides Purified Fraction from *Uncaria tomentosa* Protects against Hemorrhagic Cystitis Induced by Cyclophosphamide in Mice. **PLoS One.**, v. 10, n. 7, 2015.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720-32, 2011.

DONFRANCESCO A.; JENKNER A.; CASTELLANO A. et al. Ifosfamide/carboplatin/etoposide (ICE) as front-line, topotecan/cyclophosphamide as second-line and oral temozolomide as third-line treatment for advanced neuroblastoma over one year of age. **Acta Paediatr.**, v. 93, p. 6-1, 2004.

DORR R.T. Chemoprotectants for cancer chemotherapy. **Semin. Oncol.** v. 18, n. 2, p. 48-58, 1991.

DRAPER, H. H.; HADELY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation, **Meth. Enzymol.** v. 186, p. 421-431, 1990.

DRAY, A., URBAN, L. New pharmacological strategies for pain relief. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 36, p. 253-280, 1996.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B. A.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. September 1998 **The FASEB Journal**, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, 1998.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Nitric oxide revision. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.39, n.4, 2003.

EZEAMUZLE, I.C.; AMBADEDEROMO, A.W.; SHODE, F.O.; EKWEBELEM, S.C. Anti-inflammatory effects of *Moringa oleifera* root extract. **Int. J. Pharm.**, v. 34, p. 207-212, 1996.

FAKURAZI S., HAIRUSZAH I., NANTHINI U. *Moringa oleifera* Lam prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 2611-2615, 2008.

FARD, M.T.; ARULSELVAN, P.; KARTHIVASHAN, G.; ADAM, S.K.; FAKURAZI, S. Bioactive Extract from *Moringa oleifera* Inhibits the Pro-inflammatory Mediators in Lipopolysaccharide Stimulated Macrophages. **Pharmacogn. Mag.** v. 11, n. 4, 2015.

GIRÃO, D. K. F. B.; CAVADA, B.S.; PIRES, A.F.; MARTINS, T.V.; FRANCO, A. X.; MORAIS, C. M.; NASCIMENTO, K.S. et al. The galactose-binding lectin isolated from *Bauhinia bauhinioides* Mart seeds inhibits neutrophil rolling and adhesion via primary cytokines. v. 28, p. 285-292, 2015.

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.1103-8, 1995.

GONZALEZ-MARTIN, A.; CRESPO, C.; GARCIA-LOPEZ, J.L. et al. Ifosfamide and vinorelbine in advanced platinum-resistant ovarian cancer: excessive toxicity with a potentially active regimen. **Gynecol. Oncol.**, v. 84, p. 368-73, 2002.

GOREN M.P. Oral mesna: a review. **Semin. Oncol.**, v. 6, n. 12, p. 65–72, 1992.

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.

GUPTA, A.; GAUTAM, M.K.; SINGH, R.K.; KUMAR, M.V.; RAO, C.H.V.; GOEL, R.K.; ANUPURBA, S. Immunomodulatory effect of *Moringa oleifera* Lam. extract on cyclophosphamide induced toxicity in mice. **Indian J. Exp. Biol.** v. 48, p. 1157–1160. 2010.

HERNANDEZ-PIMENTEL, F. A propósito del cáncer. **Rev. costarric. salud pública**, San José, v. 19, n. 2, p. 67-69, 2010.

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

HUNTER, H.L.; HARRISON, E.F. The anticancer spectrum of ifosfamide. **Semin. Oncol.** v. 4, n. 1, p. 96-100, 1982.

HUSSAIN, S. A.; JAMES, N. D. The systemic treatment of advanced and metastatic bladder cancer. **Lancet Oncol.**, v. 4, p. 489-97, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Rio de Janeiro, 2016.
Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>. Acesso em: 2 fev. 2017.

JAHN, S.A.A.; MUSNARD, H.A.; BURGSTALLER, H. The tree that purifies water: cultivating multipurpose Moringaceae in Sudan. **Unasylva**, v. 38, p. 23-28. 1986.

JANETPOULOS, C.; FIRTEL, R.A. Directional sensing during chemotaxis. **FEBS Letters**, v. 582, n.14, p. 2075-2085, 2008.

JIANG, Q.; HUANG, H.; LIU, Q. et al. Continuous IV infusion of MESNA can prevent hemorrhagic cystitis in HSCT and retain MESNA concentration in urine. **Bone Marrow Transplant.** v. 50, n. 11, p. 1490-2. 2015.

JOSEPH, P. D.; MANNERVIK, B.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.; Molecular Toxicology. Oxford University Press: New York, p.152-186, 1997.

KEHRER, J. P.; BISWAL, S.S. The molecular effects of acrolein. **Toxicol. Sci.**, v.57, p. 6-15, 2000.

KIM, D. W.; JO, Y. H.; KIM, J. H. et al. Neoadjuvant etoposide, ifosfamide, and cisplatin for the treatment of olfactory neuroblastoma. **Cancer**, v. 101, p. 2257-60, 2004.

KNUST, R. E.; PORTELA, M. C.; PEREIRA, C. C. A.; FORTES, G. B. Estimativa dos custos da assistência do câncer de pulmão avançado em hospital público de referência. **Rev. Saúde Pública**, v. 51, 2017.

KOSMAS, C.; TSAVARIS, N.; MALAMOS, N. et al. Phase I-II study of docetaxel and ifosfamide combination in patients with anthracycline pretreated advanced breast cancer. **Br. J. Cancer**, v. 88, p. 1168-74, 2003.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, p. 45–55, 2011.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 1, n. 6, 2009.

LEE, H.J.; JEONG, Y.J.; LEE, T.S.; PARK, Y.Y.; CHAE, W.G.; CHUNG, I.K.; CHANG, H.W.; KIM, C.H.; CHOI, Y.H.; KIM, W.J.; MOON, S.K.; CHANG, Y.C. Moringa fruit inhibits LPS-induced NO/iNOS expression through suppressing the NF- κ B activation in RAW264.7 cells. **Am J. Chin. Med.** v. 41, n. 5, 2013.

LEITE, C.A.V.G.; ALENCAR, V.T.L.; MELO, D.L.R. *et al.* Target inhibition of IL-1 receptor prevents ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **J. Urol.**, v. 194, p. 1777–178, 2015.

LEITE, J. F. M.; ASSREUY, A. M. S.; MOTA, M. R. L.; BRINGEL, P. H. S. F.; LACERDA, R. R. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. **Molecules**. v. 17, 3277-3290, 2012.

LEONE, A.; SPADA, A.; BATTEZZATI, A.; SCHIRALDI, A.; ARISTIL, J.; BERTOLI, S. Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Leaves: An Overview. **Int. J. Mol. Sci.** v. 16, n. 6, 2015.

LI, F.; PATTERSON, A.D.; HÖFER, C.C.; KRAUSZ, K.W.; GONZALEZ, F.J.; IDLE, J.R. Comparative metabolism of cyclophosphamide and ifosfamide in the mouse using UPLC-ESI-QTOFMS-based metabolomics. **Biochem Pharmacol.** v. 80, n. 7, p. 1063-74, 2010.

LIMA, M. V.; FERREIRA, F. V.; MACÊDO, F. Y.; BRITO, G. A. C.; Ribeiro, R. A. Histological changes in bladders of patients submitted to ifosfamide chemotherapy even with mesna prophylaxis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, p. 643-650, 2007.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LIU Z. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. **Cell Res.**, v. 15, p. 24-7, 2005.

LOPES, Tiago Deiveson Pereira Lopes. **Potencial antidermatofítico de Mo-CBP4, uma proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera***. 2016. 106f.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2016.

LUZ, Patricia Bastos. **Efeito protetor da lectina de sementes de Moringa oleifera na pancreatite aguda induzida por ceruleína em camundongos: via modulação da inflamação e estresse oxidativo.** 2017. 133f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2017.

MACEDO, F. Y. B.; MOURAO, L. T. C.; JUCA, D. M.; PALHETA JUNIOR, R.; LIMA JUNIOR, R. C. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; SANTOS, A. A.; SOUZA, M. H. L. P.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Cyclooxygenase-2 contributes to functional changes seen on experimental hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide in rat urinary bladder. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 67, p. 935-43, 2011.

MACEDO, F.Y. B.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA, P. R. C. et al. Cyclooxygenase-2 expression on ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, v. 134, p. 19-27, 2007.

MACEDO, F.Y. B.; BALTAZAR, F.; MOURAO, L. C.; ALMEIDA, P. R. C.; MOTA, J. M. S. C.; SCHMITT, F.; RIBEIRO, R. A. Induction of COX-2 expression by acrolein in the rat model of hemorrhagic cystitis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 59, p. 425-430, 2008.

MACEDO, F.Y.; MOURAO, L. T.; FREITAS, H.C.; LIMA-JUNIOR, R.C.; WONG, D.V.; ORIA, R.B.; VALE, M.L.; BRITO, G.A.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Interleukin-4 modulates the inflammatory response in ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 297-307, 2012.

MASTERS, G.A.; HOFFMAN P.C.; DRINKARD L.C.; SAMUELS B.L.; GOLOMB, H.M.; VOKES, E.E. A review of ifosfamide and vinorelbine in advanced non-small cell carcinoma of the lung. **Semin. Oncol.**, v. 25, p. 8-14, 1998.

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.

MEHTA, L. K.; BALARAMAN, R; AMIN, A. H.; BAFNA, P.A.; GULATI, O. D. Effects of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 86, p. 191–195, 2003.

MINAIYAN, M.; ASGHARI, G.; TAHERI, D.; SAEIDI, M.; NASR-ESFAHANI, S. Anti-inflammatory effect of *Moringa oleifera* Lam. seeds on acetic acid-induced acute colitis in rats. **Avicenna J Phytomed.** v. 4, n. 2, p. 127–136, 2014.

MOTA, J. M. S. C.; BRITO, G. A. C.; LOIOLA, R. T.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Interleukin-11 attenuates ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **International Braz J. Urol.**, v. 33, p. 704-710, 2007.

MOTA, Mário Rogério Lima. **Estudo da atividade antiinflamatória e antinociceptiva da lectina isolada de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) Kunth.** 2008. 152f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2008.

MOURÃO, Livia Talita Cajaseiras. **Envolvimento de óxido nítrico e de canais de potássio dependentes de ATP no efeito protetor da amifostina sobre as alterações motoras funcionais e inflamatórias da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.** 2012. 116f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2012.

MURAD, A.M.; KATZ, A.; *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento.* Guanabara. Rio de Janeiro, 1996.

NAPIMOGA, M.H.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.; MOTA, M.L.; BITENCOURT, F.S.; ALVES-FILHO, J.C.; GRESPAN, R.; GONCALVES, R.B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; DE FREITAS, A.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **Int. Immunopharmacol.** v.7, n. 6, p. 824–35. 2007.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=23662354. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23662354> acesso em: mar. 20, 2017.

NDONG, M.; UEHARA, M.; KATSUMATA, S.; SUZUKI, K. Effects of oral administration of *Moringa oleifera* Lam on glucose tolerance in Goto–Kakizaki and Wistar rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 40, p. 229–233, 2007.

NILSSON, O.; FOWLER, C.J.; JACOBSSON, S.O. The cannabinoid agonist WIN 55,212-2 inhibits TNF- α -induced neutrophil transmigration across ECV304 cells. **Eur. J. Pharmacol.** V. 547, p. 165–173, 2006.

NISHII, H.; NOMURA, M.; FUJIMOTO, N.; MATSUMOTO, T. Upregulation of interleukin-6 gene expression in cyclophosphamide-induced cystitis in mice: An in situ hybridization histochemical study. **Int. J. Urol.**, v. 13, p. 1339-43, 2006.

NORPOTH, K. Studies of the metabolism of isophosphamide (NSC-109724) in man. **Cancer Treat.** v. 60, n. 4, p. 437-43, 1976.

NOUMAN W., BASRA S.M.A., SIDDIQUI M.T., YASMEEN A., GULL T., ALCAYDE M.A.C. Potential of *Moringa oleifera* L. as livestock fodder crop: A review. **Turk. J. Agric.**, v. 38, p. 1–14, 2014.

NUNES, B.S.; RENSONNET, N.S.; DAL-SECCO, D. et al. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 379, n. 6, p. 609-16. 2009.

OLSON, M. E.; FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. **Rev. Mex. Biodiv.**, v. 82, n. 4, p. 1071-1082, 2011.

Organização Mundial da Saúde. Cancer. 2017 [acesso em 21 de abril 2017]. Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

OZGUVEN, A.A.; YILMAZ, O.; TANELI, F.; ULMAN, C.; VATANSEVER S.; ONAG A. Protective effect of ketamine against hemorrhagic cystitis in rats receiving ifosfamide. **Indian J. Pharmacol.** v. 46, n. 2, p. 147-51, 2014.

PACCAUD, J.P.; SCHIFFERLI, J.A.; BAGGIOLINI, M. NAP-1/IL-8 induces up-regulation of CR1 receptors in human neutrophil leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 166, n. 1, p. 187-92, 1990.

PALADA, M.C. Moringa (*Moringa oleifera* Lam.): A versatile tree crop with horticultural potential in the subtropical United States. **HortScience.** v. 31, p. 794–797, 1996.

PALMA, T. F. *et al* . Novo modelo experimental de indução de cistite intersticial por estresse oxidativo utilizando instilação intravesical de gel doador de óxido nítrico. **Einstein**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 329-335, 2010.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D. N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 537-550, 1999.

PARK, E. J.; CHEENPRACHA, S.; CHANG, L. C.; KONDRATYUK, T. P.; PEZZUTO, J. M. Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression and inducible nitric oxide synthase by 4-[(2'-*O*-acetyl- α -l rhamnosyloxy)benzyl]isothiocyanate from *Moringa oleifera*. **Nutr. Cancer.** v. 63, n. 6, p. 971–982, 2011.

PEREIRA, M.L.; OLIVEIRA, H.D.; OLIVEIRA, J.T.A.; GIFONI, J.M.; ROCHA, R. O.; SOUSA, D.O.B.; VASCONCELOS, I.M. Purification of a Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds with Potential to Relieve Pain and Inflammation. **Protein & Peptide Letters**, v.18, p. 1078-1085, 2011.

PEREIRA, Mirella Leite. **Aspectos estruturais, farmacológicos e toxicológicos de Mo-CBP₄, uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* Lamarck com atividades anti-inflamatória e antinociceptiva via oral.** 2014. 212f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2014.

PEREIRA, Mirella Leite. **Identificação de uma proteína ligante à quitina em sementes de *Moringa oleifera* Lamarck com atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.** 2010. 151f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2010.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.** v. 109, n. 2, p. 347-52, 1995.

PINTO-JUNIOR, V. R.; CORREIA, J. L. A.; PEREIRA, R. I.; PEREIRA-JUNIOR, F.

N. ; SANTIAGO, M. Q. ; OSTERNE, V. J. S. ; MADEIRA, J. C.; CAJAZEIRAS, J. B.; NAGANO, C. S. ; DELATORRE, P.; ASSREUY, A. M. S.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, p. 134-141, 2016.

PIRES, A. F.; RODRIGUES, N. V. F.C.; SOARES, P.M.G.; RIBEIRO, R.A.; ARAGÃO, K.S.; MARINHO, M.M.; SILVA, M.T.L.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M.S. A novel N-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice. **Inflammation Research**. v. 65, p. 43–52, 2016.

PROCÓPIO, T. F.; MOURA, M. C.; ALBUQUERQUE, L. P.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D.L.; COELHO, L.C.B.B.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential E. Collins (Ed.), *Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities*. **Nova Science Publishers Inc.**, p. 69-90, 2016.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. DRUMSTICK. (*Moringa Oleifera*): A Multipurpose Indian Vegetable. **Economic Botany**. v. 34, n. 3, p. 276-83, 1980.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. *Farmacologia*. Cap 26: Fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 317-333. 2016.

RIBEIRO, R. A.; FREITAS, H. C.; CAMPOS, M. C.; SANTOS, C. C.; FIGUEIREDO, F. C.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, Q. Tumor necrosis factor-and interleukin-1 mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **The journal of urology**, v. 167, P. 2229 –2234, 2002.

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.

ROBBINS, S. S.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. *Patologia: bases patológicas das doenças*. Rio de Janeiro, Elsevier, 8ª ed. 2010. SACHAN, D.; JAIN, S. K.; SINGH, N. In-vitro & in-vivo efficacy of *Moringa oleifera* plant constituents in urolithiasis as antilithiatic drug. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, p.1638-1644, 2011.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J. & WOOLF, C.J. Interleukin-1 beta contributes to the inflammation-induced increase in nerve-growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 1265 ± 1275, 1995.

SAITO, Y.; KUMAMOTO, T.; MAKINO, Y.; TAMAI, I.; OGAWA, C.; TERAOKA, H. A retrospective study of treatment and prophylaxis of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in pediatric and adolescent and young adult (AYA) patients with solid tumors. **Japanese Journal of Clinical Oncology**. v. 46, n. 9, p. 856–861, 2016.

SCHEEF W.; KLEIN HO.; BROCK N.; BURKERT H.; GÜNTHER U.; HOEFER-JANKER H.; MITRENGA D.; SCHNITKER J.; VOIGTMANN R.; Controlled clinical studies with an antidote against the urotoxicity of oxazaphosphorines: preliminary results. **Cancer Treat. Rep.**, v. 63, n. 3, p. 501, 1979.

SCHEULEN, M.E.; NIEDERLE, N.; BREMER, K. et al. Efficacy of ifosfamide in refractory malignant diseases and uroprotection by mesna: results of a clinical phase II-study with 151 patients. **Cancer Treat. Rev.**, v. 10, p. 93–101, 1983.

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

SHARIFUDIN, S.A.; FAKURAZI, S.; HIDAYAT, M.T.; HAIRUSZAH I.; MOKLAS M.A.; ARULSELVAN P. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* extracts against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Pharm. Biol.** v. 51, p. 279–288, 2013.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. v. 14, p. 53-62, 2004.

SHEPHERD, J. D.; PRINGLE, L.E.; BARNETT, M. J.; KLINGEMANN, H. G.; REECE, D. E.; PHILLIPS, G. L. Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide- induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. **J. Clin. Oncol.**, v. 9, p. 2016–2020, 1991.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 27, p. 916-920, 1999.

SILVA, H.C.; BARI, A.U.; ROCHA, B.A.M.; NASCIMENTO, K.S.; PONTE, E. L.; PIRES, A. F. et al., Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties. **J. Mol. Recognit.**, v. 26: 470–478, 2013.

SIU, L. L.; MOORE, M. J. Use of mesna to prevent ifosfamide-induced urotoxicity. **Support Care Cancer.**, v. 6, n. 2, p. 144-54. 1998.

SOUZA, D. G.; CASSALI, G. D.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.**, v. 134, n.5, p. 985-994, 2001.

SOUZA-FIHO, M. V.; LIMA, M.V.; POMPEU, M.M.; BALLEJO, G.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R. A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am J. Pathol.**, v. 150, p. 247-56, 1997.

SRIVASTAVA, M.; RANJAN, A.; CHOUDHARY, J.K.; TRIPATHI, M.K.; VERMA, S.; DIXIT, V. K.; NATH, G.; JAIN, A.K. Role of proinflammatory Role of proinflammatory cytokines (interferon gamma) and anti-inflammatory cytokine (interleukin-10) gene polymorphisms in chronic hepatitis B infection: an Indian scenario. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 34, n. 7, p. 547-51, 2014.

STOFER-VOGEL B.; CERNY T.; BORNER M. et al. Oral bioavailability of mesna tablets. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 32, p. 78–81, 1993.

SUDHA, P.; ASDAQ, S.M.; DHAMINGI, S.S.; CHANDRAKALA, G.K. Immunomodulatory activity of methanolic leaf extract of *Moringa oleifera* in animals. **Indian J. Physiol. Pharmacol.** v. 54, p. 133–140. 2010.

TAHA, N. R.; AMIN, H.A.; SULTAN, A. A. The protective effect of *Moringa oleifera* leaves against cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity in rats. **Tissue and Cell**, v. 47, p. 94–104, 2015.

TAN, W.S.; ARULSELVAN, P.; KARTHIVASHAN, G.; FAKURAZI, S. Moringa oleifera Flower Extract Suppresses the Activation of Inflammatory Mediators in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages via NF- κ B Pathway. **Mediators Inflamm.** 2015.

ULICH, T.R.; WHITCOMB, L.; TANG, W.; O'CONNOR TRESSEL, P.; TARPLEY, J.; YI, E. S.; LACEY, D. Keratinocyte growth factor ameliorates cyclophosphamide-induced ulcerative hemorrhagic cystitis. **Cancer Res.**, v. 57, p. 472-5, 1997.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological role. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 575-692, 1998.

VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J. Developmental changes and tissue distribution of lectin in *Galanthus nivalis* L. and *Narcissus* cv. Carlton. **Planta**, v. 182, n. 4, p. 605-9, 1990.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W.J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258-64, 1991.

VIEIRA, M. M. ; BRITO, G. A. C.; BELARMINO FILHO, J. N.; MACEDO, F. Y. B.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Use of Dexamethasone with Mesna for Prevention of Ifosfamide-induced Hemorrhagic Cystitis. **International Journal of Urology**, Japão, v. 10, n.11, p. 595-602, 2003.

VIEIRA, M. M.; MACÊDO, F. Y. B.; B FILHO, J. N.; COSTA, A. C. L. V.; CUNHA, A. N.; SILVEIRA, E. R.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Ternatin, a Flavonoid, Prevents Cyclophosphamide and Ifosfamide-Induced Hemorrhagic Cystitis in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, n.2, p. 135-141, 2004.

WAGNER, T.; HEYDRICH, D.; VOELCKER, G.; HOHORST, H. J. Über Blutspiegel und Urin-Ausscheidung von aktiviertem Cyclophosphamid und seinen Deaktivierungsprodukten beim Menschen. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 96, p 79–92, 1980.

WALTHER, M.M. Cystitis. In: DE VITA, V.T; HELLMAN; ROSENBERG, S.A (Eds). **Cancer. Principles and practice of oncology**. p. 2358-2362, 1993.

WESTERMAN, M. E.; BOORJIAN, S.A.; LINDER, B. J. Safety and efficacy of intravesical alum for intractable hemorrhagic cystitis: a contemporary evaluation. **Int. Braz J. Urol.** v. 42, n. 6, p. 1144–1149, 2016.

World Health Organization. Global Health Observatory (GHO): the data repository. Geneva: WHO; 2014.

YU, Y.M.; WANG, Z.H.; LIU, C.H.; CHEN, C.S. Ellagic acid inhibits IL-1b-induced cell adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells. **Br. J. Nutr.** v. 97, p. 692–698, 2007.

ZHANG, J.; TIAN, Q.; ZHOU, S. Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. **Curr. Drug Ther.**, v. 1, n. 1, p.55-84, 2006.

ZINGARELLI, B.; O'CONNOR, M.; WONG, H.; SALZMAN, A. L.; SZABO, C. Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. **J. Immunol.** v. 156, n. 1, p. 350-8, 1996.