



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

GISELE DE FÁTIMA PINHEIRO RANGEL

**EFEITO UROPROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DAS SEMENTES DE
NONI (*Morinda citrifolia* L.) NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
IFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS**

Fortaleza - CE

2023

GISELE DE FÁTIMA PINHEIRO RANGEL

**EFEITO UROPROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DAS SEMENTES DE
NONI (*Morinda citrifolia* L.) NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
IFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

Coorientadora: Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong

FORTALEZA - CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

R154e Rangel, Gisele de Fátima Pinheiro.
Efeito uroprotetor de uma proteína isolada das sementes de noni (*Morinda citrifolia* L.) na
cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos / Gisele de Fátima Pinheiro
Rangel. – 2023.
104 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

Coorientação: Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong.

1. Bexiga. 2. Cistite hemorrágica. 3. Ifosfamida. 4. *Morinda citrifolia*. 5. McLTP1. I. Título.

CDD

GISELE DE FÁTIMA PINHEIRO RANGEL

EFEITO UROPROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DAS SEMENTES DE
NONI (*Morinda citrifolia* L.) NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
IFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

Coorientadora: Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Flávio da Silveira Bitencourt
Instituto do Câncer do Ceará - ICC

Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Profa. Dr^a. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará – UFC
(Orientadora)

A Deus que me capacitou e abençoou
em cada etapa desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me capacitar e permitir vencer todas as etapas de realização desse trabalho, minha inesgotável fonte de esperança.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e FUNCAP pelo financiamento científico deste projeto.

À minha orientadora Profa. Dra. Nylane Alencar, que ao longo desses anos tornou-se uma grande amiga. Por toda confiança no meu trabalho, por sua orientação em cada etapa dessa jornada e persistência para que fosse realizado da melhor forma possível. Por todos os ensinamentos que vão além da bancada, vão para a vida toda.

À minha coorientadora Profa. Dra. Deysi Wong, que me acolheu no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), dando todo o suporte científico para que meus experimentos fossem realizados. Por todas as discussões de resultados e conhecimento compartilhado.

À minha amiga, Aurilene Cajado, que me auxiliou na realização de experimentos importantíssimos para construção da tese. Por nossa parceria ao longo dos anos de doutorado, aperseios, choros e risos. A caminhada ao seu lado ficou muito mais leve. Gratidão pela sua contribuição imensurável nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Hermógenes David, coordenador do Laboratório de Química Medicinal/NPDM, e seu grupo de pesquisa, especialmente Andréa Costa e Adrienne Maia, pela colaboração científica e por nos fornecer a proteína purificada, utilizada nesse trabalho, por serem sempre tão solícitos e prestativos.

As Profas. Dras. Delane Gondim, Renata Leitão e Deysi Wong, pelas grandes contribuições durante a qualificação deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Roberto César Pereira Lima Junior, Hermógenes David de Oliveira, Jand Venes Rolim Medeiros e Flávio da Silveira Bitencourt, por gentilmente aceitarem o convite para participar da banca desta tese de Doutorado e pelas valiosas contribuições.

À Profa. Renata Leitão e ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI) pela avaliação histológica neste trabalho, atenção e colaboração científica. Aos técnicos, Júnior e Flávia, por toda prestatividade e apoio técnico.

À Dra. Anamaria Falcão, por gentilmente nos orientar durante a realização do experimento de imunofluorescência.

À Dra. Rosemayre Souza, responsável técnica em microscopia confocal da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, por nos auxiliar durante a captura de fotos de forma tão paciente e criteriosa.

Às minhas amigas e pós-graduandas do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica (LFB): Bianca Kurita, Fernanda Soares, Kayanne Ferreira, Marília Oliveira, Liviane Rabelo e Raquel Rossis, por nossa amizade, apoio, leveza e amor depositado durante todos esses anos de luta juntas.

Aos técnicos do laboratório Patrícia Sousa e Dr. Manuel Monteiro, por toda a ajuda, amizade e apoio técnico necessário para a realização dos experimentos.

Às minhas amigas Doutoradas do LFB na qual fui bolsista de iniciação científica no início da jornada no laboratório: Rachel Pinheiro, Tamiris Goebel, Larisse Marques, Luana David, Patrícia Luz, por toda a amizade, ensinamentos, carinho, respeito, por acreditarem no meu potencial e serem minha inspiração.

Aos estudantes de iniciação científica do laboratório: Berlânia Viana, Williany Batista, Ianah Marcilon e Marcelo Fernandes, pelo auxílio em todos os momentos que necessitei.

A minha mãe, Sidenia Pinheiro, por seu apoio incondicional, por nunca poupar esforços para me proporcionar a melhor formação pessoal e profissional. Esse trabalho só foi possível por você.

Ao meu pai, Francisco Rangel, por me incentivar na realização de um sonho que também era seu.

Aos meus irmãos, Paulo César e Ana Vivian, que são minha fonte de amor, carinho e superação de vida.

Ao meu esposo Kirally Coelho, que sempre me apoiou desde quando comecei no laboratório, por seu amor, incentivo e compreensão em todos dias de luta.

Ao meu filho de quatro patas, Juba, que nesses últimos anos foi meu companheiro, não me deixando passar um dia sem seu amor inesgotável.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFC, que nos ensinam, inspiram e nos fazem acreditar que fazer pesquisa é incrível, possível e gratificante.

Aos funcionários do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), especialmente Marta, Jussara e Anderson, por todo auxílio ao acesso no biotério.

A todos os funcionários do NPDM/UFC, que nos ajudam dia a dia no uso desse ambiente tão próspero.

Às secretarias do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Laura e Milena por todo auxílio e paciência na parte burocrática deste trabalho.

RESUMO

A cistite hemorrágica é um efeito colateral da quimioterapia induzida pelo antineoplásico do grupo das oxazafosforinas (ifosfamida e ciclofosfamida), decorrente da formação do metabólito urotóxico acroleína. Assim, a busca por proteínas vegetais pode ser uma alternativa terapêutica. *Morinda citrifolia* Linn., popularmente conhecida como noni, é uma espécie da família Rubiaceae, dessa espécie utiliza-se desde a raiz aos frutos para finalidades terapêuticas. A partir das sementes, uma proteína termoestável denominada McLTP₁ (9,4 kDa) foi purificada, dentre os seus efeitos terapêuticos apresentou atividade anti-inflamatória, gastroprotetora, antibacteriana e antinociceptiva. Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito uroprotetor de McLTP₁ na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos, investigando os mecanismos de ação envolvidos. A cistite hemorrágica foi induzida por meio da administração intraperitoneal (i.p) de ifosfamida (IFO) em dose única de 400 mg/kg, conforme protocolo padronizado, em camundongos da linhagem Balb/c machos. O grupo experimental tratado com o fármaco uroprotetor, Mesna (80 mg/kg; i.p), recebeu um pré-tratamento 30 minutos antes, 4 e 8 horas após IFO. Realizou-se um pré-tratamento três dias antes da indução da cistite com McLTP₁ administrada nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg (i.p), e dois tratamentos 4 e 8 horas após administração da IFO. Seguidas 12 horas da indução da cistite hemorrágica, os animais foram eutanasiados por uma alta dosagem anestésica. Posteriormente, as bexigas foram removidas, pesadas, analisadas macroscopicamente (edema e hemorragia), em seguida foram mantidas em formol tamponado a 10% para análises histológicas, imuno-histoquímica (COX-2 e TNF- α), imunofluorescência (NF-kB e F4-80) ou armazenadas a - 80°C para dosagem de MPO, hemoglobina, citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-4, IL-33), enzimas (iNOS e COX-2) e marcadores de estresse oxidativo (MDA, NO, GSH, SOD e CAT). Os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/NPDM) através do protocolo número nº 23170920-0. O tratamento com McLTP₁ reduziu significativamente o peso úmido vesical nas três respectivas doses supracitadas, contudo, foi observada a redução dos parâmetros de toxicidade (escores macroscópicos de edema e hemorragia) apenas na menor dose (10 mg/kg), como também a atividade da MPO nas doses de 10 e 20 mg/kg ($p < 0,05$). Diante desses resultados, a menor dose foi escolhida para os experimentos subsequentes. McLTP₁ (10 mg/kg) foi capaz de reduzir a permeabilidade vascular e hemoglobina na bexiga ($p < 0,05$). Além disso, apresentou efeito protetor ao atenuar os escores inflamatórios e preservar a estrutura do urotélio. A atividade anti-inflamatória foi demonstrada através da diminuição significativa das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e aumento de IL-10; redução da expressão de COX-2, NF-kB e F4/80, e expressão gênica de IL-33, IL-4 e iNOS. McLTP₁ também apresentou atividade antioxidante, sendo capaz de reduzir MDA e NO e aumentar os níveis de GSH, SOD e CAT. A partir dos dados apresentados, podemos inferir que McLTP₁ é um uroprotetor na prevenção da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos através da redução de parâmetros inflamatórios e atividade antioxidante.

Palavras-chave: bexiga; cistite hemorrágica; ifosfamida; *Morinda citrifolia*; McLTP₁.

ABSTRACT

UROPROTECTIVE EFFECT OF A PROTEIN ISOLATED FROM NONI SEEDS (*Morinda citrifolia* L.) ON IFOSFAMIDE-INDUCED HEMORRHAGIC CYSTITIS IN MICE

Hemorrhagic cystitis is a side effect of chemotherapy induced by an antineoplastic agent from the oxazaphosphorine group (ifosfamide and cyclophosphamide), resulting from the formation of the urotoxic metabolite acrolein. Thus, the search for vegetable proteins can be a therapeutic alternative. *Morinda citrifolia* Linn., popularly known as noni, is a species of the Rubiaceae family, this species is used from the root to the fruit for therapeutic purposes. From the seeds, a thermostable protein called McLTP₁ (9.4 kDa) was purified, among its therapeutic effects, it showed anti-inflammatory, gastroprotective, antibacterial and antinociceptive activity. Thus, the aim of this study was to evaluate the uroprotective effect of McLTP₁ on hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide in mice, investigating the mechanisms of action involved. Hemorrhagic cystitis was induced by intraperitoneal (i.p) administration of ifosfamide (IFO) in a single dose of 400 mg/kg, according to a standardized protocol, in male Balb/c mice. The experimental group treated with the uroprotective drug, Mesna (80 mg/kg; i.p), received a pretreatment 30 minutes before, 4 and 8 hours after IFO. A pre-treatment was carried out three days before the induction of cystitis with McLTP₁ administered at doses of 10, 20 and 40 mg/kg (i.p), and two treatments 4 and 8 hours after IFO administration. After 12 hours of hemorrhagic cystitis induction, the animals were euthanized by a high anesthetic dose. Subsequently, the bladders were removed, weighed, analyzed macroscopically (edema and hemorrhage), then kept in 10% buffered formalin for histological, immunohistochemical (COX-2 and TNF- α), immunofluorescence (NF- κ B and F4-80) or stored at -80°C for measurement of MPO, hemoglobin, cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-4, IL-33), enzymes (iNOS and COX-2) and oxidative stress markers (MDA, NO, GSH, SOD and CAT). The adopted experimental procedures were approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA/NPDM) through protocol number 23170920-0. Treatment with McLTP₁ significantly reduced bladder wet weight at the three respective doses mentioned above, however, a reduction in toxicity parameters (macroscopic scores of edema and hemorrhage) was observed only at the lowest dose (10 mg/kg), as well as the activity of MPO at doses of 10 and 20 mg/kg ($p < 0.05$). Given these results, the lowest dose was chosen for subsequent experiments. McLTP₁ (10 mg/kg) was able to reduce vascular permeability and hemoglobin in the bladder ($p < 0.05$). In addition, it had a protective effect by attenuating inflammatory scores and preserving the structure of the urothelium. The anti-inflammatory activity was demonstrated through the significant decrease of the cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 and increase of IL-10; reduced expression of COX-2, NF- κ B and F4/80, and gene expression of IL-33, IL-4 and iNOS. McLTP₁ also showed antioxidant activity, being able to reduce MDA and NO and increase levels of GSH, SOD and CAT. From the presented data, we can infer that McLTP₁ is a uroprotector in the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in mice by reducing inflammatory parameters and antioxidant activity.

Keywords: bladder; hemorrhagic cystitis; ifosfamide; *Morinda citrifolia*; McLTP₁.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fórmulas estruturais das oxazafosforinas	17
Figura 2 -	Vias de metabolismo da ifosfamida	19
Figura 3 -	Representação das camadas de tecido que compõem a bexiga	21
Figura 4 -	Vias propostas para a patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	26
Figura 5 -	<i>Morinda citrifolia</i> L. (Rubiaceae) “Noni”	32
Figura 6 -	Protocolo experimental no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	44
Figura 7 -	Efeito de diferentes doses de $McLTP_1$ no aumento do peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos	55
Figura 8 -	Efeito de diferentes doses de $McLTP_1$ sobre os escores de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos	56
Figura 9 -	Efeito do tratamento de diferentes doses na $McLTP_1$ na atividade de mieloperoxidase na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	58
Figura 10 -	Efeito do tratamento com $McLTP_1$ na permeabilidade vascular aplicada ao modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	59
Figura 11 -	Efeito do tratamento com $McLTP_1$ na hemoglobina aplicada ao modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	60
Figura 12 -	Fotomicrografias representativas do efeito de $McLTP_1$ nas alterações histológicas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	62
Figura 13 -	Efeito do tratamento com $McLTP_1$ nas alterações histológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	63
Figura 14 -	Fotomicrografias representativas do efeito de $McLTP_1$ nas alterações histológicas de hemorragia em camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	64
Figura 15 -	Efeito do tratamento com $McLTP_1$ na espessura do urotélio na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	65

Figura 16a -	Fotomicrografias das imunofluorescências para F4/80 em bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	67
Figura 16b -	Quantificação da área fluorescente da expressão de F4/80 em bexiga de camundongos submetidos à cistite hemorrágica por ifosfamida	68
Figura 17a -	Fotomicrografias de imunofluorescências para NFkB em bexiga camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	69
Figura 17b -	Efeito do tratamento com McLTP ₁ na imunomarcação para NFkB na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	70
Figura 18a -	Fotomicrografias das imunomarcações para COX-2 em bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	71
Figura 18b -	Efeito do tratamento com McLTP ₁ na imunomarcação para COX-2 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	72
Figura 19a -	Fotomicrografias das imunomarcações para TNF- α em bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	73
Figura 19b -	Efeito do tratamento com McLTP ₁ na imunomarcação para TNF- α na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	74
Figura 20 -	Efeito do tratamento com McLTP ₁ nos níveis teciduais de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	76
Figura 21 -	Efeito do tratamento com McLTP ₁ expressão gênica de IL-4, COX-2, iNOS e IL-33 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	78
Figura 22 -	Efeito do tratamento com McLTP ₁ nos níveis teciduais de MDA, NO, SOD, CAT, GSH na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	80
Figura 23 -	Modelo hipotético com os principais achados associado à uroproteção de McLTP ₁ na fisiopatogênese da cistite hemorrágica	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

BSA - Albumina sérica bovina

CAT - Catalase

CH - Cistite hemorrágica

COX-2 - Cicloxigenase 2

G-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina

GSH - Glutathiona reduzida

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HE - Hematoxilina-eosina

HSPs - Proteínas de choque térmico

IFO - Ifosfamida

IL-1 - Interleucina 1

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-4 - Interleucina 4

IL-1R - Receptor de interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

IL-33 - Interleucina 33

iNOS - Óxido nítrico sintase

L-NAME - Argininametil-ester

LTPs - Proteínas transferidoras de lipídeos

MDA - Malondialdeído

MPO - Mieloperoxidase

NBT - Nitroblue

NFkB - Fator nuclear kappa B

PARP - Poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase

PBS - Tampão fosfato-salino

RAW 264.7 - Linhagem de macrófagos murinos

RNS – Espécies reativas de nitrogênio

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SOD - Superóxido dismutase

TNFR1 - Receptor de TNF

TNF- α - Fatores de Necrose Tumoral Alfa

TNJ – Tahitian Noni Juice

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Oxazafosforinas: ifosfamida.....	17
1.2 Cistite hemorrágica: fisiopatologia.....	20
1.3 Cistite hemorrágica: manejo e uroproterores	27
1.4 Proteínas aplicadas a farmacologia.....	29
1.5 <i>Morinda citrifolia</i> L.....	31
1.5.1 Proteína transferidora de lipídeos da <i>Morinda citrifolia</i> L. (McLTP ₁)	35
2. Justificativa.....	38
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Isolamento e purificação de McLTP ₁	42
4.2 Animais experimentais.....	42
4.3 Protocolo experimental	43
4.3.1 Indução da Cistite Hemorrágica	43
4.3.2 Grupos experimentais	43
4.4 Avaliação da indução de cistite hemorrágica por ifosfamida	44
4.4.1 Peso úmido vesical	44
4.4.2 Análise Macroscópica	44
4.4.3 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO).....	45
4.4.4 Avaliação da Permeabilidade Vascular pelo Método do Azul de Evans	46
4.4.5 Quantificação da hemoglobina vesical pelo método da cianometahemoglobina	46
4.5 Análise Histopatológica.....	46
4.5.1 Avaliação da hemorragia por Tricrômio de Mallory	47
4.5.2 Mensuração da espessura do urotélio	47
4.6 Avaliação da expressão de F4/80 e NFkB por imunofluorescência.....	49
4.7 Avaliação da expressão de COX-2 e TNF- α por imunohistoquímica.....	49
4.8 Detecção das citocinas inflamatórias	50
4.9 Avaliação da expressão gênica de mediadores inflamatórios (COX-2, Inos, IL-4; IL-33) por rtPCR	50
4.10 Avaliação do estresse oxidativo	51

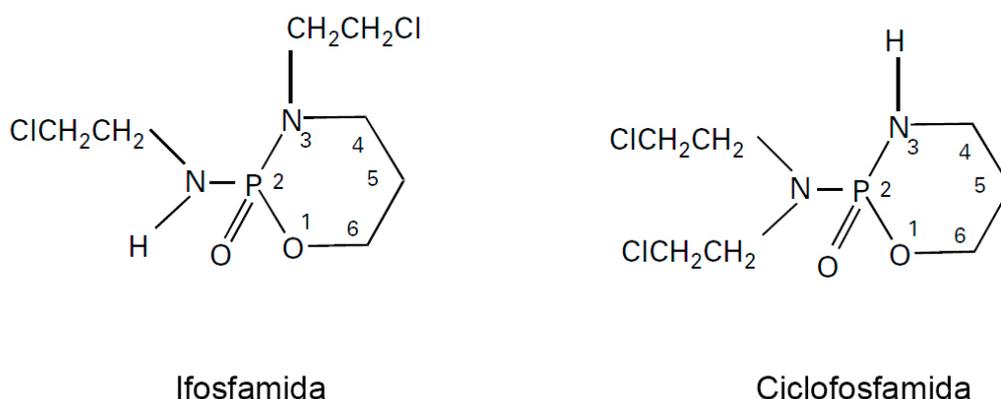
4.10.1	Determinação da concentração de Malonaldeído (MDA)	51
4.10.2	Determinação dos níveis de nitrito (NO).....	52
4.10.3	Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH).....	52
4.10.4	Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT)	53
4.10.5	Determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase	53
4.11	Análise estatística.....	54
5.	RESULTADOS.....	55
5.1	Avaliação do efeito de McLTP ₁ sobre parâmetros de indução da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	55
5.2	Efeito de McLTP ₁ sobre permeabilidade vascular na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	59
5.3	Efeito de McLTP ₁ sobre dosagem de hemoglobina em bexigas no modelo cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	60
5.4	Efeito de McLTP ₁ sobre as alterações histopatológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	61
5.5	Efeito de McLTP ₁ na imunofluorescência de F4/80 e NF-kB na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	66
5.6	Efeito de McLTP ₁ na imunomarcção de COX-2 e TNF- α na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	70
5.7	Efeito de McLTP ₁ sobre citocinas inflamatórias na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.....	70
5.8	Efeito de McLTP ₁ na expressão gênica de IL-4, IL-33, COX-2 e iNOS na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	77
5.9	Efeito de McLTP ₁ sobre estresse oxidativo na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	79
6.	DISCUSSÃO	81
7.	CONCLUSÃO	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Oxazafosforinas: ifosfamida

As oxazafosforinas são antineoplásicos alquilantes da classe das mostardas nitrogenadas altamente reativas que agem modificando diretamente grupos nucleofílicos específicos de moléculas de DNA. Ciclofosfamida e ifosfamida fazem parte desse grupo de quimioterápicos (Figura 1) (DECHANT et al., 1991).

Figura 1 - Fórmulas estruturais das oxazafosforinas.



Fonte: adaptado de Furlanut; Franceschi (2003).

Os quimioterápicos ciclofosfamida e ifosfamida têm eficácia terapêutica em diversos tumores malignos, abrangendo o câncer de pulmão pequenas células e não pequenas células, osteossarcoma, sarcoma de tecidos moles, sarcoma de Ewing, câncer de testículo, bexiga, câncer do colo do útero (recorrente ou metastático), câncer de mama avançado, linfoma não-Hodgkin e linfoma de Hodgkin (GANGIREDDY; NOOKALA, 2022; GUPTA et al., 2011).

A ifosfamida foi desenvolvida no início da década de 1970, com um espectro de atividade mais amplo do que a ciclofosfamida que já estava em uso desde final da década de 1960, esse antineoplásico é um análogo da oxazafosforinas com átomo de

fósforo assimétrico. Atualmente administrado como uma pró-droga sintetizada a partir da modificação química da ciclofosfamida, constituindo uma estrutura com maior solubilidade em água, com baixa mielotoxicidade (possibilitando uso em maiores doses) e atividade antineoplásica mais eficaz (BROCK, 1996). Por ser uma pró-droga sua atividade farmacológica está associada aos metabólitos sintetizados durante as biotransformações metabólicas hepáticas, pelos citocromos CYP3A4, CYP2B6 e CYP2C9 (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006).

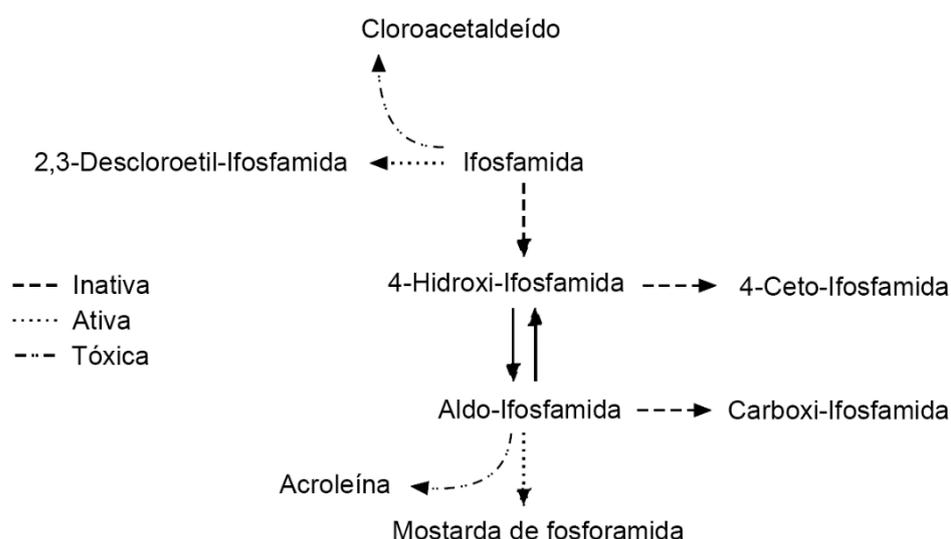
Em seguida, ifosfamida é convertida em cloroacetaldeído ou hidroxilada em C-4 de seu anel oxinitrofosfórico, formando os metabólitos 4-hidroxi-ifosfamida e isoaldofosfamida. Esse último, por meio de sua decomposição, dá origem à acroleína e seus metabólitos formam mostarda fosforamida como agente alquilante citotóxico. A acroleína é um subproduto tóxico causador de dano urotelial, edema subepitelial, infiltração de neutrófilos, morte celular, neovascularização, hemorragia e ulceração (LAWSON et al., 2008) (Figura 2). Esses metabólitos ativos se ligam ao DNA e inibem sua síntese, de forma que, causam danos celulares formando ligações cruzadas entre fitas ou intracadeias, levando à apoptose da célula danificada. Em segundo lugar, os metabólitos ativos também suprarregulam as espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em danos irreparáveis no DNA e proteínas (SANNU et al., 2017).

A ifosfamida é metabolizada principalmente no fígado, embora existam diferenças na via preferencial do metabolismo, dependendo da via de administração oral *versus* endovenosa. O volume de distribuição chega a 0,5 - 0,81 L/kg. A excreção ocorre pela urina de forma inalterada por uma baixa fração da dose administrada (valor médio de cerca de 20%) e a preferência pelo enantiômero (R) foi relatada. A eliminação via renal geralmente não excede 15 ml/min, enquanto a depuração corporal total é maior em aproximadamente cinco vezes. Além disso, a excreção urinária da ifosfamida em pacientes tratados é predominantemente representada por metabólitos inativos estáveis e por urotóxicos, como a acroleína. No entanto, a via de administração pode influenciar a via metabólica, uma vez que a administração oral produz concentrações urinárias mais altas de cloroetilifosfamida, carboxiifosfamida e mostarda de isofosforamida do que a endovenosa. A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) da ifosfamida é variável entre 4 a 7 horas, dependendo da duração do tratamento, idade, composição do tecido (teor de gordura dos tecidos), co-medicação, função hepática e renal (FURLANUT; FRANCESCHI, 2003).

As reações adversas de oxazafosforinas são inúmeras e principalmente relacionadas à dose, acometendo sistema hematológico (leucopenia, anemia, trombocitopenia), sistema nervoso central (encefalopatia), cardíaco (arritmia), dermatológico (alopecia), respiratório (fibrose pulmonar, pneumonia, dispneia), gastrointestinal (vômitos, anorexia e desconforto abdominal), endócrino (amenorreia), metabólico (acidose metabólica) e doenças neurológicas (ototoxicidade e neuropatia periférica). Além disso, acomete o sistema geniturinário, correlacionado à hiperatividade da bexiga, frequência urinária, incontinência, disúria, hematúria, urgência, noctúria. Além disso, a ifosfamida causa necrose tubular renal, associado a síndrome de Fanconi, raquitismo renal, insuficiência renal aguda e hematúria (DOBREK; BARANOWSKA; THOR, 2013).

As contraindicações conhecidas para o uso de ifosfamida são poucas. As contraindicações absolutas são hipersensibilidade conhecida ao fármaco ou seus componentes e obstrução do fluxo urinário. Enquanto que as relativas incluem mielossupressão e insuficiência hepática grave ou renal (KERBUSCH et al., 2001).

Figura 2 - Vias de metabolismo da ifosfamida.



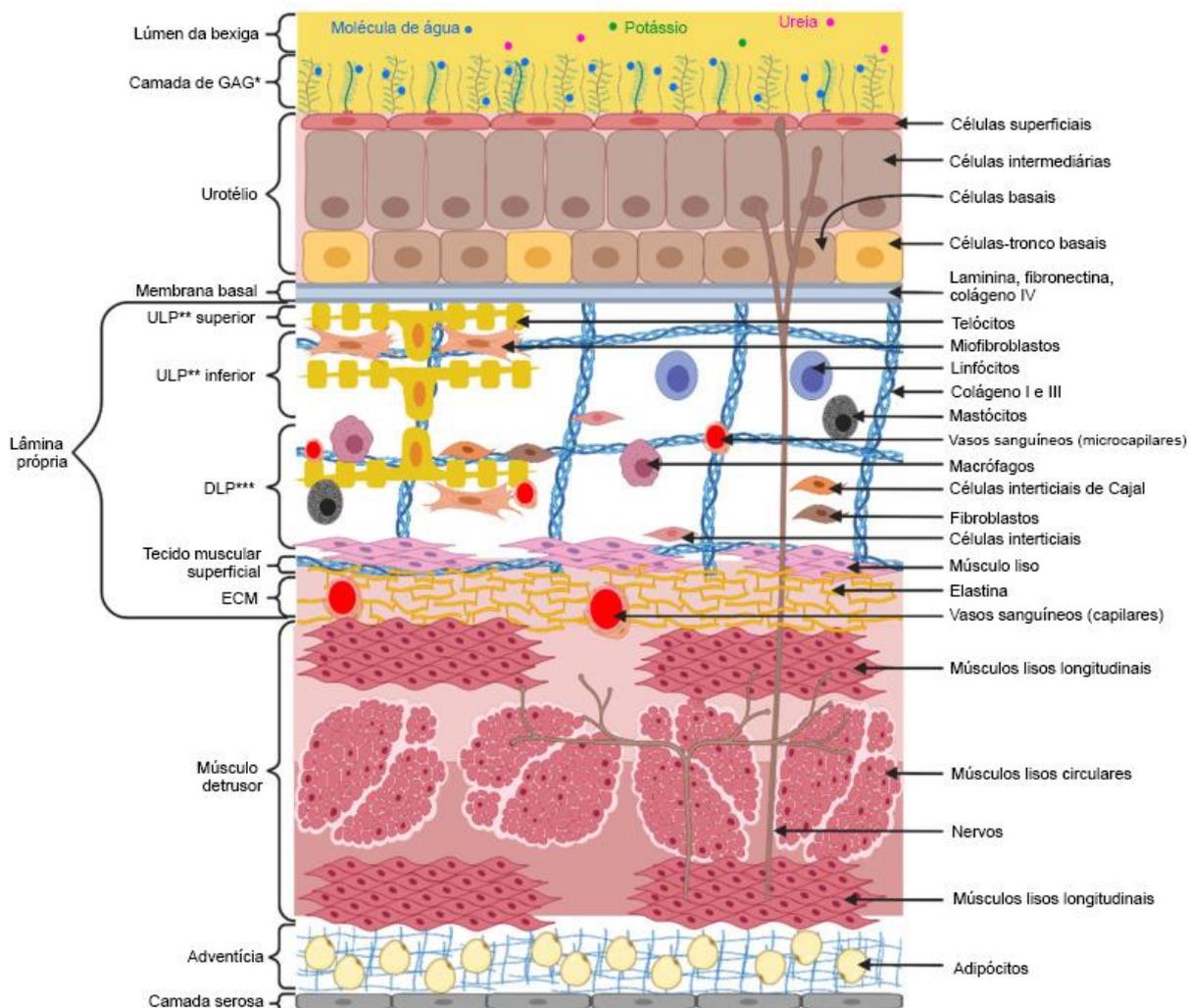
Fonte: adaptado de Furlanut; Franceschi (2003).

1.2 Cistite hemorrágica: fisiopatologia

O termo cistite é empregado para definir inflamação geral da bexiga. A inflamação pode ser crônica ou aguda, com gravidade variando de leve desconforto na região supra púbica a hemorragia significativa, podendo ser fatal. Sua etiologia é diversificada e por vezes desconhecida (THOMPSON et al., 2013).

A compreensão da cistite é dependente do conhecimento das relações estrutura-função na bexiga urinária e sua interação com outros sistemas orgânicos. A parede da bexiga urinária é composta por três camadas: (1) mucosa, (2) muscular própria e (3) adventícia ou serosa. A mucosa é constituída do urotélio, classificado histologicamente como o epitélio de transição que recobre a bexiga; e abaixo do mesmo, encontra-se a lâmina basal, que separa o urotélio do tecido conjuntivo subjacente, seguida da lâmina própria, constituída por uma matriz extracelular contendo numerosos tipos de células, dentre esses: fibroblastos, miofibroblastos/células intersticiais, células imunes e neurônios aferentes e eferentes. Além disso, a lâmina própria contém vasos sanguíneos e linfáticos, fibras elásticas e fascículos de músculo liso. A camada muscular está disposta abaixo da lâmina própria e é composta pelo músculo detrusor, sendo organizada em três camadas de fibras musculares lisas que se fixam em diferentes direções. O urotélio recobre não apenas a superfície interna da bexiga urinária, mas também a pelve renal, ureteres e uretra proximal (Figura 3) (LEE; ROMIH; ZUPANČIČ, 2014).

Figura 3 - Representação das camadas de tecido que compõem a bexiga.



O urotélio é a camada que reveste o lúmen da bexiga e forma a barreira urina-corpo. A lâmina própria é uma camada de tecido conjuntivo que contém nervos e vasos. A lâmina própria e a camada muscular que fornece suporte estrutural à bexiga e facilita suas funções fisiológicas de enchimento e esvaziamento. A serosa é a camada mais externa. Dentro do urotélio ainda existem três subdivisões de camadas. A primeira formando uma barreira de permeabilidade com alta resistência a íons e moléculas, além de patógenos presentes na urina que podem se acomodar durante longos períodos de armazenamento nos ciclos da micção. A segunda é constituída de células superficiais diferenciadas denominadas de células “umbrela” (guarda-chuva), encarregadas de manter a barreira sangue-urina que advém das junções apertadas e a terceira é a membrana plasmática apical constituída de placas uroteliais. GAG: glicosaminoglicanos; ULP: lâmina própria superior; DLP: lâmina própria profunda; ECM: matriz extracelular. Fonte: adaptado de (BROSSARD et al., 2022).

As células citadas anteriormente passam por diferentes deformações durante o enchimento e esvaziamento da bexiga (estiramento), compressão súbita durante a micção e alterações na superfície apical durante exocitose e endocitose. Além disso, o urotélio sofre interferência de uma rede sensorial da bexiga, composta por fibras nervosas sensoriais, miofibroblastos e células musculares lisas, responsáveis pela liberação de neurotransmissores e mediadores de forma que os nervos simpáticos e parassimpáticos orquestram a funcionalidade da bexiga durante seu enchimento e micção (DALY et al., 2011).

A permeabilidade do epitélio e funcionalidade sensorial sofrem alterações durante o curso de doenças que afetam a bexiga. Um exemplo é a hiperatividade do músculo detrusor, uma vez que o acometimento da barreira de permeabilidade do urotélio pode levar a um aumento da sinalização responsável pela frequência urinária e dor na bexiga. De forma semelhante, na cistite ocorre aumento da permeabilidade do urotélio podendo estar associado à deficiência na diferenciação de células uroteliais (LEWIS, 2000).

A cistite hemorrágica (CH), especificamente, é uma condição inflamatória da bexiga que resulta em sangramento da mucosa associada a hematúria manifestando-se como sinal clínico primário. A ciclofosfamida e a ifosfamida são geralmente associadas a cistite hemorrágica de início precoce. A fisiopatologia da CH tem envolvimento do estresse oxidativo, inflamação e liberação de óxido nítrico (HALDAR; DRU; BHOWMICK, 2014). A patogênese da cistite induzida por ciclofosfamida/ifosfamida é iniciada pela acroleína, metabólito ativo, que após sua biotransformação, induz o aumento do estresse oxidativo, que danifica diretamente as membranas biológicas e prejudica os processos energéticos mitocondriais, bem como a função do retículo endoplasmático (KATERJI; FILIPPOVA; DUERKSEN-HUGHES, 2019).

Estudos pioneiros do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) investigaram o envolvimento de diversos mediadores inflamatórios na fisiopatologia da cistite hemorrágica induzida por quimioterapia, dentre esses, prostaglandinas, leucotrienos e fator de ativação plaquetária (LIMA, 1994). Em seguida, foi demonstrada a correlação da ação de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , uma vez que a neutralização de ambas com soro anti-TNF- α ou anti-IL-1 inibiu significativamente o processo inflamatório (GOMES et al., 1995).

O envolvimento do óxido nítrico foi investigado por Souza-Filho e colaboradores em 1997, que observaram que a inibição da enzima óxido nítrico sintase foi capaz de reduzir a hemorragia e danos no urotélio, bem como, promoveu um aumento da expressão de iNOS nas células da lâmina própria. Outro dado revelado no presente estudo é que o fator ativador de plaquetas também parece estar envolvido na patogênese dessa condição, possivelmente pela indução da expressão da iNOS (SOUZA-FILHO et al., 1997). Em seguida foi demonstrado que a ação da citocina pró-inflamatória TNF- α também é fundamental para o aumento da expressão da iNOS na cistite (RIBEIRO et al., 2002).

Com a finalidade de investigar o efeito da acroleína na bexiga no modelo de cistite hemorrágica, Batista e colaboradores demonstraram que a administração intravesical de acroleína aumentou o peso úmido vesical e a permeabilidade vascular, comprovado pela redução macroscópica de edema e hemorragia (BATISTA et al., 2006).

Posteriormente, Macedo e colaboradores investigaram o envolvimento da ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandinas, através da inibição com etoricoxib, onde esse último foi capaz de inibir parcialmente a cistite hemorrágica em ambos modelos de cistite hemorrágica induzida por acroleína e ifosfamida. Posteriormente, os autores observaram que a inibição da síntese de TNF- α por talidomida e de TNF- α e IL-1 β por pentoxifilina contribuíram para a redução da expressão de COX-2, dos escores de edema e hemorragia no modelo de indução por ifosfamida (MACEDO et al., 2008a, 2008b).

Em seguida, observou-se que uma pentraxina de cadeia longa, pentraxina 3 (PTX3), está envolvida no presente modelo, e sua ativação é estimulada por TNF- α , uma vez que talidomida e amifostina são capazes de reduzir a imunoexpressão de PTX3. Além disso, esse último parece estimular a expressão de iNOS (GIFONI, 2008).

Proteínas reguladoras também estão envolvidas na patogênese da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas, como por exemplo, o fator nuclear κ B (NF- κ B). Esse fator de transcrição normalmente fica no citoplasma como uma ligação com a proteína inibidora (inibidor- κ B; I- κ B). Vários agentes, incluindo espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , degradam I- κ B que permitem que NF- κ B entre no núcleo e estimule a transcrição gênica de fatores relacionados ao estresse. No curso da cistite hemorrágica, a acroleína, juntamente

com espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas pró-inflamatórias mencionadas acima, ativam vias dependentes de NF- κ B, resultando na exacerbação e intensificação dos efeitos nocivos da acroleína na bexiga (DOBREK; BARANOWSKA; THOR, 2013).

Ribeiro e colaboradores subdividiram a patogênese da cistite hemorrágica por ifosfamida em etapas: Primeira etapa, fase de iniciação: ocorre após a agregação de acroleína na bexiga, provocando danos uroteliais. Segunda etapa, fase inflamatória: destaca-se pela supra regulação dos fatores de transcrição, NF- κ B e liberação de citocinas inflamatórias pelas células residentes epiteliais e conjuntivas, como os macrófagos. O estresse oxidativo é desencadeado pela ativação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além do envolvimento das enzimas inflamatórias, iNOS e COX-2. Terceira etapa, fase sintomática: resulta no desnudamento urotelial e na formação de úlceras, causando hiperalgesia e disfunção vesical. Quarta etapa, fase de cicatrização: implica no reparo dos tecidos, com a participação dos fibroblastos e fatores de crescimento (fator de crescimento de queratinócitos) (RIBEIRO et al., 2012) (Figura 4).

O envolvimento de IL-4 foi investigado por Macedo e colaboradores (2012), visto que essa citocina tem efeitos inibitórios na expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias. No modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, a administração de IL-4 exógena apresentou atividade anti-inflamatória através da inibição de TNF- α , IL-1 β , iNOS e COX-2. Entretanto, a administração sistêmica de IL-4 resulta em efeitos adversos, logo, o interesse é de encontrar substâncias capazes de modular esse alvo terapêutico (MAJHAIL et al., 2004).

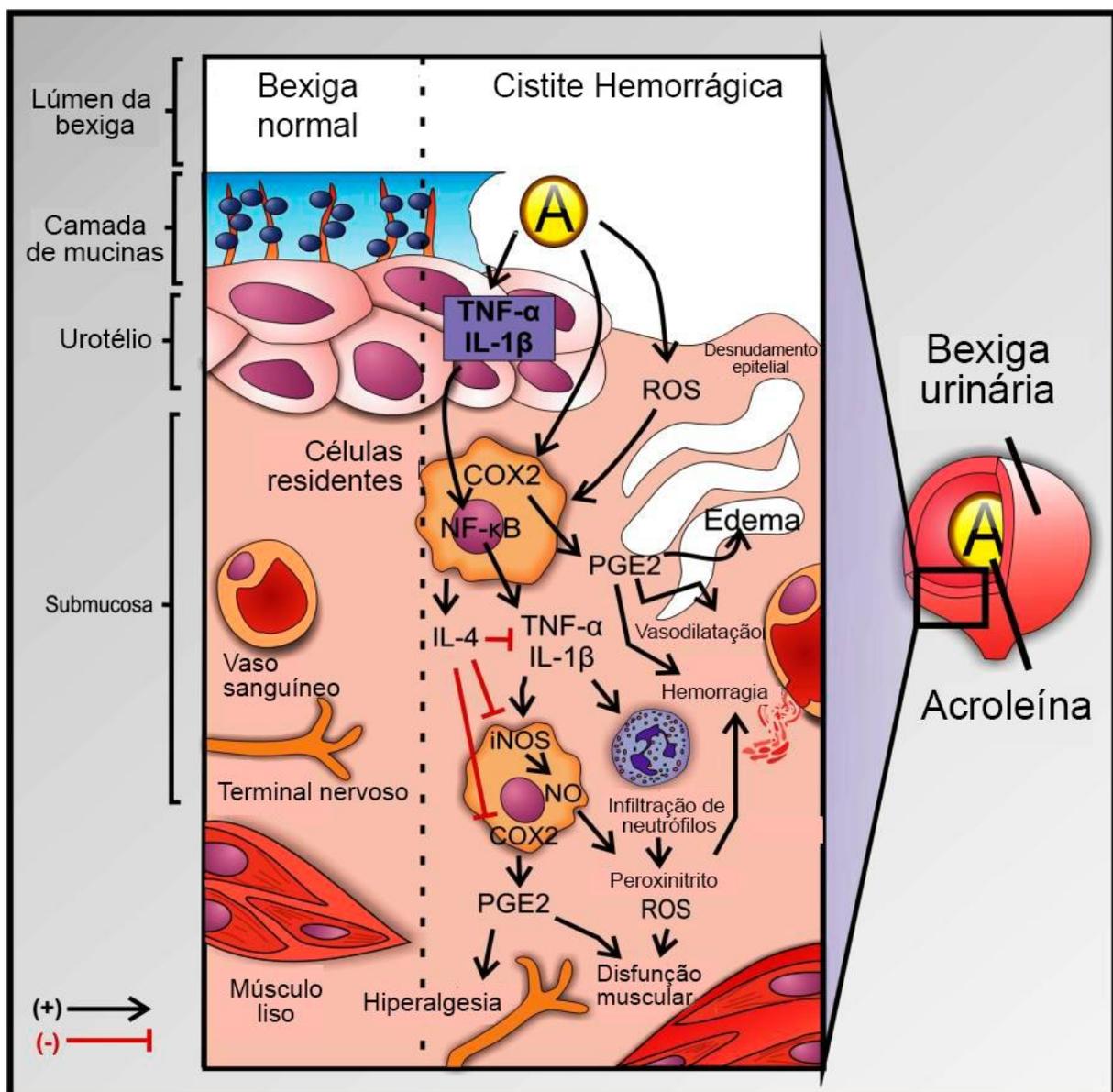
Leite e colaboradores avaliaram o efeito protetor do antagonista do receptor da IL-1 (Anakinra) e do anticorpo anti-TNF α (infiximabe) na cistite hemorrágica. Foi observado nesse estudo que anakinra foi capaz de atenuar a hemorragia, o edema, o infiltrado neutrofílico, a hipernocicepção visceral e a disfunção vesical, além de reduzir a inflamação e o infiltrado vesical de neutrófilos e macrófagos em animais IL-1R $^{-/-}$ quando comparado a animais selvagens. No entanto, animais caspase-1 $^{-/-}$, não houve mudança no padrão inflamatório, demonstrando que IL-1 β produzida pela caspase-1 parece ter menor importância na via de ativação da CH. A administração de infiximabe inibiu o edema vesical e a hipernocicepção visceral, sem interferir na hemorragia, disfunção vesical e infiltração de neutrófilos e macrófagos, como também foi capaz de

reduzir o edema em animais TNFR1^{-/-}, contudo, não alterou os parâmetros inflamatórios, e verificou-se uma piora da CH em animais TNFR1/R2^{-/-} (LEITE et al., 2015).

Dobrek e colaboradores (2012) destacaram que o ponto chave no desenvolvimento da cistite hemorrágica é a síntese de peroxinitrito que é formado a partir de ROS e NO. O peroxinitrito atrai macromoléculas celulares (proteínas, lipídios, DNA), exacerbando os danos na bexiga, resultando em danos à integridade das células e tecidos, manifestando-se na forma como anormalidades histológicas e morfológicas, como edema, hemorragia e ulcerações (DOBREK; BARANOWSKA; THOR, 2013).

Posteriormente, Dornelas-Filho e colaboradores (2018) investigaram o envolvimento direto dos neutrófilos na patogênese da cistite hemorrágica por ifosfamida através da administração do fucoidan, um inibidor de P- e L-selectinas e também através da depleção de neutrófilos com anticorpo anti-Ly6G. O estudo demonstrou que fucoidan (100 mg/kg) foi capaz de reduzir danos macro e microscópicos, peso úmido da bexiga e atividade da MPO. A depleção de neutrófilos preveniu a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida por meio da redução de parâmetros inflamatórios e lesão histológica da bexiga. Em contraste, o G-CSF, fator estimulador de colônia de granulócitos, agravou a CH induzida por IFO, que foi significativamente atenuada pelo tratamento com fucoidan, evidenciando a importância dos neutrófilos na patogênese da CH.

Figura 4 - Vias propostas para a patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Fonte: adaptada de Ribeiro et al., 2012.

1.3 Cistite hemorrágica: manejo e uroproterores

O manejo clínico da cistite hemorrágica por ifosfamida pode levar a necessidade de extração de coágulos por cistoscopia, irrigação vesical contínua e até administração de fármacos intravesicais (MATZ; HSIEH, 2017). Em casos graves pode levar a necessidade de transfusão sanguínea e até cistectomia. Uma vez instalada, os tratamentos disponíveis são: instilação de sulfato de alumínio e potássio (corrosivos químicos), cauterização e terapia por oxigênio hiperbárico. Contudo, essas opções de tratamento não são completamente eficazes (HALDAR; DRU; BHOWMICK, 2014).

O agente protetor com maior efetividade e usado na clínica é o 2-mercaptoetanossulfonato (Mesna). Mesna é um medicamento desenvolvido em 1983, e o seu mecanismo de ação baseia-se na sua ligação a molécula de acroleína no nível do urotélio, levando um produto não tóxico para excreção na urina. Após injeção endovenosa, o mesmo circula em sua forma dimérica, dimesna, a qual é pouco absorvida, novamente reduzido a mesna pelo metabolismo renal, e excretado na urina. Conseqüentemente, torna-se capaz de prevenir a cistite hemorrágica sem interferir na atividade antitumoral das oxazafosforinas (ELIAS et al., 1990). Mesna deve ser administrada antes, durante e após a ifosfamida juntamente com hidratação agressiva (pelo menos 2 litros por via oral ou endovenosa) para prevenir urotoxicidade. Todavia, mesmo seguindo a profilaxia clássica com três doses de mesna, 66,7% dos pacientes apresentam lesões cistoscópicas graves e 100% são acometidos por danos uroteliais, tais como edema, exocitose e hemorragia (LIMA et al., 2007).

Outra estratégia para manejo da cistite hemorrágica é o uso clínico da hiper-hidratação, um agente efetivo e de baixo custo que se mostrou tão eficaz quanto mesna e a irrigação vesical. Porém, torna-se um método inviável para pacientes com disfunção renal, hepática ou pulmonar devido os riscos de sobrecarga de fluidos (MANK et al., 2003). Logo, há necessidade de agentes uroprotetores alternativos.

Vieira e colaboradores (2003) investigaram o efeito de um glicocorticoide associado as duas últimas doses de mesna, e observaram que a dexametasona reduziu o edema vesical e as alterações macro e microscópicas provocadas pela cistite. Esse efeito é relacionado à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) e iNOS, como também redução na migração de neutrófilos.

Mourão e colaboradores observaram que amifostina foi capaz de prevenir as alterações urodinâmicas, avaliadas por metodologia de cistometrograma contínuo, bem como restabeleceu a capacidade do tecido vesical em responder a estímulos contráteis em camundongos. O efeito protetor da amifostina se dá por meio da inibição da geração de NO e da abertura de canais de potássio dependentes de ATP sem, contudo, ocorrer via geração de GMPc (MOURÃO, 2012).

O uso de tratamento adjuvante através da glutathione associado a mesna foi investigado por Ali e colaboradores, onde foi possível observar que o agente antioxidante pode ser tão útil quanto mesna (ALI et al., 2014). Outra alternativa foi o uso de cetamina e mesna combinados, sendo esses capazes de reduzir o edema e alterações histológicas. De forma surpreendente, a cetamina sozinha preveniu alterações histológicas associadas à cistite hemorrágica (OZGUVEN et al., 2014).

O metabólito ativo, acroleína, depleta as reservas de agentes nucleotídicos (glutathione) e reage com ácidos nucleicos e proteínas, bem como possui potencial citotóxico direto contanto que em maiores concentrações. Batista e colaboradores associaram o tratamento de dois antioxidantes, glutathione e amifostina, e foi demonstrado que o pré-tratamento com esses compostos preveniram a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida de maneira dose-dependente. Além disso, a cistite hemorrágica induzida por acroleína também foi prevenida pelo pré-tratamento sistêmico (i.p.) ou local (i.v.e.) com glutathione ou amifostina, sendo o melhor efeito protetor observado no tratamento com amifostina (2 mg/kg intravesical) (BATISTA et al., 2007).

A busca por novos fármacos tem sido crescente, dentre esses, fármacos antioxidantes e anti-inflamatórios oriundos de produtos naturais, como por exemplo, cúrcuma, gengibre, *Moringa oleífera*, dissulfeto de dialil, *Uncaria tomentosa*, α -*felandreno*, entre outros, demonstraram potencial efeito protetor no modelo de cistite hemorrágica por ifosfamida (ARAFA, 2009; DIETRICH et al., 2015; FERREIRA, 2017; GONÇALVES et al., 2020; KIM et al., 2015; SOUSA, 2017).

Apesar da existência de um tratamento com uso de mesna e hiper-hidratação, ainda se buscam alternativas de agentes uroprotetores, uma vez que esses fármacos não são isentos de efeitos colaterais e uma porcentagem de pacientes não se beneficiam. A busca pela elucidação do mecanismo patogênico da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida ainda persiste. Diante disso, novos estudos são necessários para o desenvolvimento de novos agentes profiláticos.

1.4 Proteínas aplicadas à Farmacologia

Os produtos farmacêuticos com origem proteica são uma das classes de moléculas de medicamentos que mais crescem, incluindo mais de 250 proteínas usadas clinicamente para várias indicações. Dentre as vantagens de uso estão a alta seletividade e interações altamente específicas com seu alvo com base em um mecanismo de ação bem definido (CRAIK et al., 2013). Ao longo dos anos, as proteínas são usadas em uma diversidade de aplicações na saúde, como por exemplo, em reagentes para diagnóstico, vacinas e medicamentos (FISCHER et al., 2004). Terapias mais robustas como as baseadas em citocinas (interferon beta) para Esclerose Múltipla; medicamentos à base de anticorpos monoclonais, como adalimumabe (Humira), proteínas Fc-Fusion e Etanercept (Enbrel) para artrite reumatoide. Eloctate (Fc-FVIII) e inibidores de checkpoint imunológico, como pembrolizumabe (Keytruda) e atezolizumabe (Tecentriq), entre outros produtos de anticorpos foram desenvolvidos (DINGMAN; BALU-IYER, 2019).

As plantas demonstraram ser fonte de compostos biologicamente ativos, englobando metabólitos secundários, proteínas e peptídeos. Metabólitos secundários como vincristina e paclitaxel isolados de *Catharanthus roseus* e *Taxus brevifolia Nutt*, respectivamente, têm sido usados clinicamente para linfoma, leucemia linfoblástica aguda, nefroblastoma, câncer de mama, pulmão e ovário. Contudo, medicamentos à base de metabólitos secundários estão associados a toxicidade, má absorção, baixa biodisponibilidade sistêmica e desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas. Estas limitações estimularam a comunidade científica a explorar outras moléculas biologicamente ativas, como proteínas e peptídeos (PAN; CHAI; KINGHORN, 2012; SECA; PINTO, 2018).

As vantagens da drogas proteicas sobre as extraídas de metabólitos secundários são: especificidade de proteínas com pouca interferência em outros processos biológicos e, com isso, redução da toxicidade; funções complexas que não podem ser desempenhadas por outros compostos; mínima resposta imune do hospedeiro; alta capacidade de tolerância a modificações estruturais para maior eficiência terapêutica; presença de múltiplos grupos funcionais que permitem cargas em diferentes valores de pH, permitindo atingir diferentes tecidos do corpo com faixas de pH variadas (WANI et al., 2020).

Um importante grupo de proteínas envolvidas na ativação da resposta imune contra tumores são denominadas, proteínas de choque térmico (HSPs). A alta expressão de HSPs é relatada em câncer de esôfago, gástrico, pulmonar, mama, pulmonar, próstata e colorretal. A detecção dos níveis dessas proteínas e seus anticorpos específicos no soro de indivíduos com neoplasia podem desempenhar um papel importante no diagnóstico, uma vez que o perfil de expressão está relacionado a proliferação, invasão, metástase e morte de células cancerosas. Esses recursos são explorados como biomarcadores e vacinas baseadas em HSP destinadas a induzir respostas citotóxicas contra células tumorais (SAINI; SHARMA, 2018).

Enzimas proteolíticas derivadas de plantas tem sido alvo de investimentos na indústria farmacêutica no tratamento de diversas doenças, tendo destaque as enzimas colagenolíticas. Os produtos à base de colágeno são utilizados no tratamento de feridas crônicas, úlceras venosas e diabéticas, queimaduras, cirurgia plástica, ginecologia, urologia, proctologia, otorrinolaringologia, oftalmologia, odontologia, cirurgia óssea, cartilaginosa e cardiovascular, como também em cosmetologia (LEADER; BACA; GOLAN, 2008).

As vantagens do uso de proteínas vêm fomentando o ganho de estratégias para o desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas. São necessários métodos que simplifiquem o processo de purificação, a fim de tornar viável a produção em quantidades industriais rentáveis que viabilizem o uso comercial. Diante disso, tecnologias estão sendo aplicadas, dentre essas destacam-se os sistemas de produção para proteínas terapêuticas como lipossomas, microesferas e nanopartículas. O DNA recombinante é mais uma opção que permite a produção e comercialização de proteínas terapêuticas recombinantes, com menor custo de produção e maior lucro no setor farmacêutico, viabilizando a produção de biofármacos. Atualmente, novos estudos têm sido realizados para otimizar o processo de produção e consolidar novas formas de síntese enzimática (GOSWAMI et al., 2018).

1.5 *Morinda citrifolia* L.

Morinda citrifolia Linn., popularmente conhecida como noni, é uma espécie de Rubiaceae, distribuída de forma abundante em regiões tropicais, nativa do sudeste da Ásia, cultivada na Índia, América Central e do Sul e principalmente na Polinésia, onde utiliza-se desde a raiz aos frutos para finalidades nutricionais e terapêuticas (DENG et al., 2007). No Brasil, é cultivada nos estados do Acre, São Paulo, Minas Gerais, Pará, Sergipe, Ceará e Mato Grosso (SILVA, 2012).

O noni é uma árvore pequena, medindo cerca de 3 a 6 metros de altura, podendo atingir até 10 metros. As folhas são de coloração verde brilhante, com formato ovalado medindo 15-30 cm de largura por 20-40 cm de comprimento (POTTERAT; HAMBURGER, 2007). As flores são pequenas, tubulares e agrupadas em estrutura globosa no pedúnculo, onde originam frutos ovoides carnosos, de cor verde a translúcida quando maduros, de forte cheiro e sabor desagradável devido à liberação de ácido butírico, ao final da maturação. As sementes são pequenas e triangulares (4 milímetros de comprimento) com coloração marrom avermelhada, sendo abundantes no fruto, aproximadamente 100 – 150 sementes (CHAN-BLANCO et al., 2006; YASHASWINI et al., 2014).

Figura 5 - *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae) “Noni”.



Fonte: Barbosa, 2022.

Diferentes partes do noni têm sido empregadas na medicina popular para diversas finalidades terapêuticas, como hipoglicemiante, hipotensor, antialérgico, anti-inflamatório, analgésica, antifúngica, antimicrobiana, tratamento de úlcera gástrica, aterosclerose, atividade cicatrizante, artrite e até anticancerígeno (LOHANI et al., 2019; TORRES et al., 2017).

O suco do noni é mais uma forma de consumo da população, sendo inclusive comercializado por empresas asiáticas, como *Tahitian Noni Juice* (TNJ). Na ação antioxidante do TNJ *in vitro*, foi evidenciado que o suco do fruto foi capaz de remover radicais superóxido com maior eficiência do que a vitamina C. Quando testado *in vivo* foi capaz reduzir significativamente os níveis de superóxido e de peroxidação lipídica, em modelo de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono em ratos (WANG; SU, 2001).

A atividade hipoglicêmica foi evidenciada em diferentes componentes da *Morinda citrifolia* L., como o efeito do extrato aquoso dos frutos parece estar relacionado a lipogênese e captação de glicose em células adipócitos 3T3-L1 (INADA et al., 2020). Sua atividade também foi relacionada a inibição da Proteína Tirosina Fosfatase 1B (PTP1B), mimetizando a ação da insulina (NGUYEN et al., 2013). Constituintes químicos de raízes de *Morinda citrifolia* exibiram efeitos hipoglicemiantes no modelo animal de diabetes induzida por estreptozotocina (KAMIYA et al., 2008). Até mesmo o suco do fruto fermentado foi capaz de produzir atividade hipoglicêmica e hepatoprotetora em ratos diabéticos (NAYAK et al., 2011).

O efeito hipotensor do extrato etanólico de folhas e frutos de *Morinda citrifolia* L. foi demonstrado em ratos após hipertensão induzida por dexametasona (WIGATI et al., 2017). Como também, cardioproteção induzida por dieta rica em gordura e colesterol através do suco de noni em hamsters (LIN et al., 2012).

A atividade anti-inflamatória foi evidenciada em diferentes modelos experimentais. O suco comercial de noni apresentou atividades antioxidantes e anti-inflamatórias no modelo de edema de pata induzido por carragenina (YILMAZER et al., 2016). Bem como, um polissacarídeo isolado de *Morinda citrifolia* L. foi capaz de inibir a migração de leucócitos para o local da inflamação, reduziu a hiperalgisia inflamatória e em modelo de colite ulcerativa também apresentou ação anti-inflamatória em camundongos (BATISTA et al., 2020; SOUSA et al., 2018).

Evidências científicas sugerem que o consumo diário de frutos e folhas do noni são capazes de prevenir sintomas alérgicos, esse dado foi constatado através do extrato etanólico a 50% de frutos e folhas de *Morinda citrifolia* L. na reação cutânea trifásica induzida por dinitrofluorobenzeno e dermatite de contato induzida por cloreto de picril em camundongos (MURATA et al., 2014).

O suco do noni mostrou-se eficiente no controle da artrite reumatoide e gotosa em camundongos (KUSTIARINI et al., 2019; LI et al., 2021). Além disso, folhas de *Morinda citrifolia* ricas em escopoletina (cumarina) e epicatequina (flavonóides) foram capazes de suprimir a progressão da osteoartrite contra a degradação e inflamação da cartilagem articular, através da redução da liberação de glicosaminoglicano e óxido nítrico da cartilagem (WAN OSMAN et al., 2019).

O efeito do extrato aquoso do fruto de *Morinda citrifolia* e seu biomarcador escopoletina foi investigado no modelo de esofagite de refluxo e úlcera gástrica em ratos, onde foi demonstrado que o noni pode ser benéfico como um potencial agente preventivo e terapêutico para doenças inflamatórias gastroesofágicas, principalmente por meio de suas atividades antissecretoras e pró-cinéticas, incluindo uma atividade inibitória sobre serotonina, radicais livres e citocinas pró-inflamatórias (MAHATTANADUL et al., 2011).

A atividade antibacteriana de sementes de *Morinda citrifolia* contra *Staphylococcus spp* resistente à meticilina foi comprovada através da obtenção de um extrato metanólico que foram avaliados como antibacterianos no modelo de bioautografia e técnicas de microdiluição em caldo, validando seu uso na medicina tradicional (CRUZ-SÁNCHEZ et al., 2019).

A atividade cicatrizante foi investigada através da fabricação de um *scaffold* nanofibroso à base de *Morinda citrifolia* L. eletrofiado testado *in vitro* e *in silico*, onde foi demonstrado como um potencial cicatrizante através do aumento da proliferação e adesão de queratinócitos. A hipótese é de que por serem hidrofílicos por natureza, visando proteínas de feridas, aumentando a proliferação e adesão de queratinócitos e combatendo patógenos, os *scaffolds* nanofibrosos dotados de extrato de *Morinda citrifolia* mostraram-se um material terapêutico eficaz para aplicações de curativos cutâneos (EKAMBARAM et al., 2021).

Atividade anticancerígena de *Morinda citrifolia* foi investigada recentemente em modelos *in vitro*, no qual o óleo essencial do noni carregado de nanopartículas de quitosana foi capaz de combater células de câncer de pulmão humano A549. Uma antraquinona foi extraída das hastes de *Morinda citrifolia*, denominado Nordamnacanthal, também apresentou efeito citotóxico em linhagens celulares de câncer de mama, MDA-MB231 e MCF-7 *in vitro* e cessou a progressão tumoral de células 4T1 *in vivo* (ABU et al., 2018).

1.5.1 Proteína transferidora de lipídeos da *Morinda citrifolia* L. (McLTP₁)

As proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) são abundantes no reino vegetal e recebem essa denominação devido a sua capacidade de se ligar e transportar moléculas hidrofóbicas, como os lipídeos entre as membranas (CARVALHO; GOMES, 2007). As LTPs são moléculas pequenas e seu ponto isoelétrico é geralmente básico (8-10), sendo diferenciadas por sua massa molecular, tendo a LTP do tipo 1 com massa de 9 kDa (com cerca de 90 aminoácidos) e LTP do tipo 2 com massa de 7 kDa (com 90 aminoácidos). A estabilidade estrutural dessas proteínas deve-se a quantidade de resíduos de aminoácidos (90 - 95), dentre esses 8 são cisteínas, formando quatro pontes dissulfeto, formando assim uma estrutura terciária do peptídeo. Além disso, são moléculas estáveis ao calor e à proteólise (KADER, 1996).

Investindo no potencial do noni, Campos e colaboradores isolaram de forma inédita uma proteína transferidora de lipídeos de *Morinda citrifolia* L. denominada McLTP₁. A massa molecular da proteína é de 9.4 kDa e sua sequência N-terminal (AVPCGQVSSALSPCMSYLTGGGDDPEARCCAGV) evidenciou um elevado grau de identidade com proteínas transferidoras de lipídeos vegetais já mencionados na literatura. Além disso também se mostrou resistente a altas temperaturas, digestão com pepsina, tripsina e quimotripsina (CAMPOS et al., 2016).

As primeiras atividades biológicas de McLTP₁ demonstraram seu efeito analgésico e anti-inflamatório. A administração por via intraperitoneal nas doses de 1, 2, 4, 8 mg/kg e via oral na maior dose (8 mg/kg) inibiu as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Tendo essa atividade mantida após 30 minutos de incubação da proteína a 80°C, evidenciando sua termoestabilidade. Um pré-tratamento com McLTP₁ (8 mg/kg, i.p. e v.o.) também reduziu as fases neurogênica e inflamatória da nocicepção no teste da formalina. O uso de um antagonista de receptores opioides, naloxona (2 mg/kg, i.p.), reverteu o efeito antinociceptivo do McLTP₁, sugerindo que a analgesia induzida por essa proteína ocorre com envolvimento da via opioide (CAMPOS et al., 2016).

A estabilidade da proteína foi avaliada por Costa (2016), mostrando que McLTP₁ permaneceu estável por até 6 meses a - 4, 4 e 25°C, com proteção a incidência luminosa em prateleira. Sua estabilidade foi comprovada por sua aparência, suspendibilidade, estrutura secundária e atividade antinociceptiva, apresentando

efeito biológico antinociceptivo estatisticamente igual ao observado com a proteína não-armazenada. Entretanto, a exposição a luz alterou a cor, suspendibilidade e efeito farmacológico (COSTA, 2016).

Os ensaios de toxicidade foram realizados nas doses de 8 e 80 mg/kg e doses diárias de McLTP₁ de 8 mg/kg durante 28 dias. Em ambos, não foram constatadas alterações comportamentais, na mortalidade, no consumo de ração, ganho de peso, parâmetros bioquímicos e hematológicos, havendo também preservação histológica dos órgãos vitais (COSTA, 2016). No contexto *in vitro*, foi avaliada a atividade citotóxica, onde não foi demonstrado alteração de viabilidade celular na linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2/C3a), leucemia humana (HL-60), células tumorais de cólon humano (HCT-116) e glioblastoma humano (SF-295). Em relação ao potencial alergênico, McLTP₁ induziu a produção de IgG e IgG₁ em camundongos imunizados pela via oral, semelhante a dados encontrados de outras LTPs (COSTA, 2016; LUTIF, 2015).

Em seguida, Campos e colaboradores (2017) investigaram os mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória de McLTP₁ relatadas anteriormente. McLTP₁ (8mg/kg, i.p. ou v.o.) inibiu significativamente a migração celular em modelos experimentais de peritonite induzida por carragenina e a formação de edema de pata induzido por carragenina e dextrana em camundongos. Além disso, a proteína reduziu os níveis de citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, associado ao aumento da citocina anti-inflamatória IL-10.

O tratamento com McLTP₁ (v.o e i.p) no modelo de pancreatite induzida por ceruleína reduziu marcadores bioquímicos de lesão pancreática e pulmonar (amilase, lipase, mieloperoxidase) como também escores histopatológicos estando relacionado seu efeito a modulação de citocinas (CAMPOS et al., 2017).

Souza e colaboradores (2018) investigaram na atividade antibacteriana *in vitro* e no modelo *in vivo* de sepse induzida por ligadura de ceco em camundongos. McLTP₁ (12,5-800 μ g/mL) reduziu a formação e o crescimento de biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, além disso mostrou uma interação sinérgica com a oxacilina em outras culturas bacterianas. Entretanto, McLTP₁ não inibiu significativamente o crescimento de bactérias Gram-negativas. No modelo experimental de sepse, McLTP₁ na dose de 8 mg/kg (i.p. ou v.o.) foi capaz de inibir

em 100% a mortalidade dos animais e também melhorou significativamente a perda de massa corporal, leucocitose, febre e dano histológicos nos órgãos. Todos esses efeitos parecem estar relacionados a redução de citocinas inflamatórias séricas induzidas pelo quadro de sepse (SOUZA et al., 2018).

Marinho e colaboradores (2020) investigaram os efeitos protetores McLTP₁ em modelo de nefrotoxicidade induzida por gentamicina em ratos e em uma linhagem de células epiteliais tubulares proximais de macaco Rhesus (LLC-MK2). O tratamento com 6,25–25 µg/mL da proteína protegeu as células contra a citotoxicidade induzida por 2 mM de gentamicina. No modelo *in vivo* o tratamento de 8 mg/kg, administrado por via oral diariamente, durante 7 dias, 2 h após indução da lesão atenuou o aumento dos níveis de creatinina, ureia e ácido úrico. Além disso, aumentou os níveis de glutatona, um importante marcador antioxidante, incluindo uma redução na atividade da mieloperoxidase e na modulação de citocinas ao reduzir IL-6 e aumentar IL-10. Os dados foram corroborados com análise histológica mostrando lesões histológicas atenuadas pelo tratamento proteico (MARINHO et al., 2020).

Os efeitos gastroprotetor de McLTP₁ foram descritos por Nogueira e colaboradores (2022). A proteína na dose de 8 mg/kg reduziu as lesões gástricas induzidas por etanol após 1 hora. Em seguida, com a finalidade de avaliar o envolvimento do óxido nítrico no efeito protetor de McLTP₁, foi administrado N^w-nitro-argininametil-ester (L-NAME) (20 mg/kg, i.p.) antes do tratamento padrão com proteína, de forma que L-NAME reduziu parcialmente o efeito gastroprotetor, sugerindo que seu efeito pode estar relacionado com a ativação da via do óxido nítrico. Somado a isso, McLTP₁ também diminuiu a secreção gástrica em modelo de ligadura pilórica e reduziu significativamente os níveis de marcadores de estresse oxidativo, ao reduzir o malonaldeído (MDA) e de aumentar significativamente a glutatona reduzida (GSH) (NOGUEIRA et al., 2022).

Recentemente, Do Carmo e colaboradores (2022) avaliaram a atividade de McLTP₁ no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos. A proteína foi capaz de reduzir a mortalidade, diarreia, bem como preveniu significativamente o dano histológico e levou a uma redução na contratilidade excessiva do duodeno. Além disso, McLTP₁ diminuiu os níveis de MPO, IL-1β, IL-6 e KC, e a expressão de COX-2, NF-κB e iNOS, importantes parâmetros inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da doença.

Diante desse embasamento teórico que mostra o potencial terapêutico de McLTP₁ ao modular citocinas inflamatórias em diferentes modelos, surgiu o interesse de investigar o efeito uroprotetor dessa proteína na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

2. Justificativa

O aumento mundial da expectativa de vida está intimamente relacionado ao aumento nas taxas de morbidade e mortalidade por câncer. O tratamento do câncer por cirurgia, radioterapia e quimioterapia é de alto custo e tornou-se um encargo financeiro substancial para os sistemas de saúde em todo o mundo. No entanto, aproximadamente metade de todos os casos de câncer são evitáveis com medidas de baixo custo. Uma vez que esse risco pode ser controlado por meio de mudanças no estilo de vida, como evitar o tabagismo, dieta rica em calorias e gorduras, obesidade, inatividade física e outros fatores de risco para o câncer (BRAY et al., 2018).

O quadro clínico do paciente oncológico sob consequência dos efeitos adversos da quimioterapia se agrava em decorrência ao comprometimento da adesão medicamentosa, levando à manutenção da longitudinalidade do cuidado, portanto, a adesão ao tratamento em pacientes com câncer está associada a melhores resultados de saúde e diminuição dos custos de saúde (KUMAR; GUDHOOR; GANACHARI, 2020).

A má adesão tem sido correlacionada a internações sucessivas, aumento da necessidade de intervenções médicas, morbidade e mortalidade. Além disso, a não adesão resulta em aumento dos custos de saúde. Na América do Norte as estimativas chegam a aproximadamente US\$ 100 bilhões sendo gastos anualmente e US\$ 2.000 gastos por paciente/ano em visitas adicionais ao médico (MEDEIROS et al., 2019).

A cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas continua a ser uma complicação ameaçadora na vida de pacientes que utilizam essa classe de antineoplásicos. Esse efeito adverso é uma importante complicação clínica dose-limitante em pacientes em tratamento com ifosfamida. A incidência global relatada da cistite hemorrágica entre pacientes tratados com dosagem fracionada de ifosfamida

sem proteção urotelial varia de 18 a 40 por cento (LINDER, CHAO, GOUNDER, 2021). Já a cistite hemorrágica refratária é uma doença com diagnóstico de exclusão que pode ocorrer em 5-10% dos pacientes submetidos a radioterapia pélvica, assumindo uma incidência relevante. Manifesta-se entre 6 meses e 20 anos após o tratamento, sendo uma complicação crônica da radioterapia (J et al., 2018). Nesse contexto, é primordial a prevenção desse efeito adverso na prática clínica.

Estudos demonstram que as espécies reativas de oxigênio (ROS) e mediadores inflamatórios estão envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Diante disso, antioxidantes e agentes anti-inflamatórios ainda têm atraído grande interesse como alternativas terapêuticas para tratar esse efeito adverso e possibilitar a tolerabilidade do tratamento (RIBEIRO et al., 2012).

O mesna, apesar de ser o agente uroprotetor mais usado na clínica, não impede completamente o dano causado à bexiga, pois sua atividade é estritamente profilática, não sendo capaz de tratar a cistite hemorrágica residual assintomática. Além disso, seu uso pode resultar em hipersensibilidade sistêmica e reações adversas, incluindo arritmias (REDDY; WINSTON, 2022). Quando são administradas doses mais altas de ifosfamida, entre 2 e 4 g/m² durante 3 a 5 dias produziram hematúria em 31% a 100% dos pacientes, contudo, quando mesna foi administrada em associação com estas doses de ifosfamida, a incidência de hematúria foi menor de 7% (FUKUOKA et al., 1991; SCHEEF et al., 1979). Desse modo, a investigação de alternativas terapêuticas que possam ter eficácia quando administradas isoladamente ou concomitante ao uso do mesna pode trazer benefícios significativos para a prevenção e tratamento dos efeitos colaterais destes antineoplásicos.

O recente interesse nessas abordagens, as moléculas provenientes de plantas continuam sendo uma poderosa fonte de novos compostos biologicamente ativos. Dentre essas moléculas, as proteínas e peptídeos têm se destacado, em função de sua seletividade e atividade farmacológica em doses relativamente baixas, quando comparadas aos fármacos convencionais ou derivados de moléculas pequenas, produzindo, assim, menos efeitos adversos (ZHANG et al., 2021).

Assim, não há dúvidas que a toxicidade, eventualmente, direcionada para um órgão específico, ocasiona uma grande limitação do tratamento quimioterápico acarretando um prejuízo substancial para o paciente, sendo fundamental a busca de

alternativas preventivas e terapêuticas que promovam melhoria significativa da qualidade de vida dos indivíduos acometidos, impedindo a redução das doses dos quimioterápicos, ou até mesmo a interrupção temporária ou definitiva do tratamento. Sabendo do potencial anti-inflamatório de McLTP_1 em outros modelos animais, é relevante investigar o efeito terapêutico da proteína no modelo cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito uroprotetor de uma proteína isolada da semente de *Morinda citrifolia* L. (McLTP₁) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos, investigando os mecanismos de ação envolvidos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a melhor dose de McLTP₁ para redução da toxicidade no modelo de cistite hemorrágica por ifosfamida através da avaliação do peso úmido vesical (PUV), escores macroscópicos de edema, hemorragia e infiltrado neutrofílico;
- Analisar o efeito de McLTP₁ sobre a permeabilidade vascular e quantidade de hemoglobina no tecido vesical no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida;
- Analisar o efeito protetor de McLTP₁ nas alterações histopatológicas induzidas pelo quimioterápico ifosfamida;
- Investigar a atividade anti-inflamatória de McLTP₁ via níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-4, IL-33) e expressão de F4/80, NF-kB, COX-2 e iNOS;
- Investigar a atividade moduladora do estresse oxidativo de McLTP₁ através da dosagem de MDA, GSH, Nitrito, SOD e CAT;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento e purificação de McLTP₁

A proteína utilizada nesse trabalho foi purificada a partir da semente da planta *Morinda citrifolia* L., sendo denominada McLTP₁. A purificação foi realizada no Laboratório de Química Medicinal no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão do Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira, conforme descrito anteriormente por (CAMPOS et al., 2016) com as modificações adotadas por (SOUZA, 2016). Sua pureza foi confirmada pelo SDS-PAGE. A amostra de proteína liofilizada foi armazenada a -20°C para posterior utilização nos ensaios biológicos. A determinação de proteínas solúveis foi efetuada conforme metodologia proposta por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.2 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem Balb/c (8 semanas de idade) provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC para execução dos protocolos experimentais (n = 6-8/grupo). Os animais foram mantidos em ciclo de 12h claro/escuro, temperatura (23 ± 2 °C) e umidade ($55 \pm 10\%$) controlados, com fornecimento *ad libitum* de ração e água. Os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará com o número de protocolo 23170920-0 (anexo).

4.3 Protocolo experimental

4.3.1 Indução da Cistite Hemorrágica

A indução da cistite hemorrágica foi feita por meio da administração intraperitoneal (i.p) de ifosfamida (IFO) em dose única de 400 mg/kg, conforme protocolo padronizado por MACEDO et al., (2012). Após 12 horas, os animais foram eutanasiados por dose elevada de anestésico com cloridrato de xilazina (30 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (300 mg/kg, i.p.). Em seguida, as bexigas foram removidas, pesadas e mantidas em formol tamponado a 10% ou armazenadas a - 80 °C para análises subsequentes.

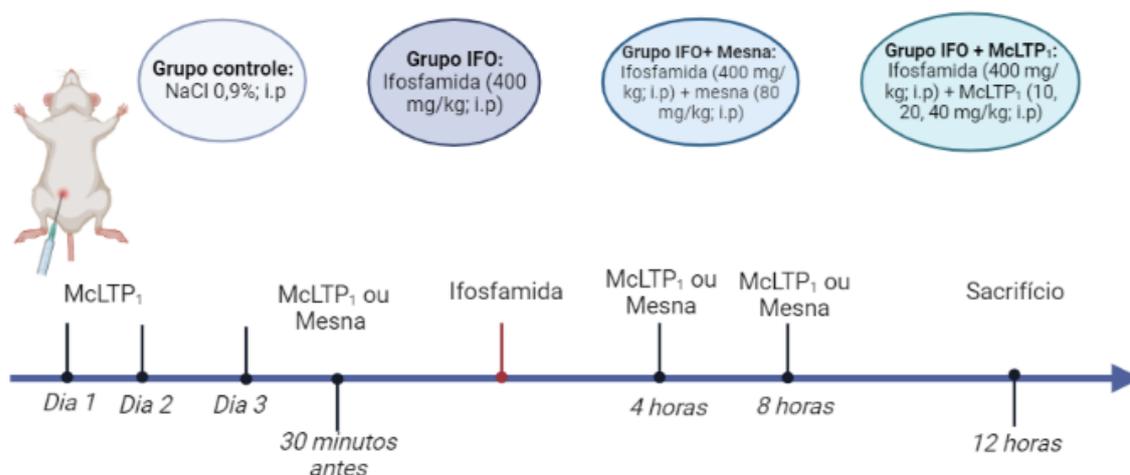
4.3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos (n = 6-8/grupo). Distribuídos da seguinte forma (Figura 6):

- Grupo controle: administração do veículo (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal;
- Grupo IFO: dose única de ifosfamida (Eurofarma; Brasil, 400 mg/kg) diluída em NaCl 0,9% por via intraperitoneal;
- Grupo IFO + MESNA: administração de Mesna (Mitexan®; 80 mg/kg) por via intraperitoneal como droga uroprotetora comercializada diluída em NaCl 0,9% 30 min antes, 4 e 8h após a ifosfamida.
- Grupo IFO + McLTP₁ 10 (mg/kg; i.p): os animais foram pré-tratados com McLTP₁ (10 mg/ kg; i.p) uma vez ao dia durante 3 dias consecutivos, seguido de ifosfamida (400 mg/kg; i.p) 30 minutos após a administração de McLTP₁ no terceiro dia. A seguir, 4 e 8 h após o quimioterápico.
- Grupo IFO + McLTP₁ 20 (mg/kg; i.p): os animais foram pré-tratados com McLTP₁ (20 mg/ kg; i.p) uma vez ao dia durante 3 dias consecutivos, seguido de ifosfamida (400 mg/kg; i.p) 30 minutos após a administração de McLTP₁ no terceiro dia. A seguir, 4 e 8 h após o quimioterápico.
- Grupo IFO + McLTP₁ 40 (mg/kg; i.p): os animais foram pré-tratados com McLTP₁ (40 mg/ kg; i.p) uma vez ao dia durante 3 dias consecutivos, seguido de ifosfamida (400 mg/kg; i.p) 30 minutos após a administração de McLTP₁ no terceiro dia. A seguir, 4 e 8 h após o quimioterápico.

As doses das drogas e o protocolo foram selecionados baseado em estudos anteriores (BARUT et al., 2019; BATISTA et al., 2007; CAMPOS et al., 2017; VIEIRA et al., 2003, 2004).

Figura 6 - Protocolo experimental no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Fonte: elaborado pela autora no software BioRender®.

4.4 Avaliação da indução de cistite hemorrágica por ifosfamida

4.4.1 Peso úmido vesical

As bexigas foram dissecadas, retirado conteúdo urinário com papel hidrofílico e pesadas. A partir disso, o peso úmido vesical foi quantificado em mg/20g de massa corporal, um parâmetro que representa o edema vesical.

4.4.2 Análise Macroscópica

Após a avaliação do peso úmido vesical as bexigas foram analisadas visualmente quanto ao edema e hemorragia de acordo com os Critérios de GRAY et al., (1986) (tabela 1). Os resultados foram expressos em mediana.

Tabela 1 – Escores de Gray para edema e hemorragia

ESCORES			
	EDEMA		HEMORRAGIA
Intenso (3+)	quando fluido é visto externa e internamente na parede da bexiga	3+	coágulos intra-vesicais
Moderado (2+)	quando o edema é confinado à mucosa interna	2+	hematomas na mucosa
Intermediário (1+)	aspecto entre normal e moderado	1+	telangiectasia ou dilatação dos vasos vesicais
Ausente (0)	aspecto normal	0	Normal

Elaborada pela autora.

4.4.3 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase, enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos é empregada como um marcador quantitativo do acúmulo dessa célula no sítio inflamatório (BRADLEY et al., 1982). As bexigas coletadas foram incubadas em 200 µL de tampão (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,015 M; pH 4,7). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um triturador (Pollytron®) e centrifugadas a 3.000 rpm durante 15 min, a 4°C. O pellet foi ressuspensão em tampão NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4) com brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), em seguida, o material foi macerado. O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min, 4°C. Posteriormente, 50 µL do sobrenadante foram aplicados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço foram adicionados 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM) e a placa foi incubada em estufa por 5 min a 37 °C. A seguir, a reação foi interrompida por ácido sulfúrico 4M. A quantificação dos neutrófilos foi realizada a partir de uma curva padrão de neutrófilos (com 1x10⁵ neutrófilos/50 µL no primeiro poço). A leitura das absorbâncias foi através de um espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, e os resultados foram expressos como U/mg de tecido (ALVES-FILHO et al., 2006).

4.4.4 Avaliação da Permeabilidade Vascular pelo Método do Azul de Evans

O aumento da permeabilidade vascular vesical foi avaliado por meio do extravasamento do corante Azul de Evans, que se liga à albumina plasmática, e quando há o extravasamento de albumina formando o edema estará presente. O corante foi injetado por via endovenosa no plexo retro orbital na dose de 25 mg/kg, 30 minutos antes dos animais serem eutanasiados. As bexigas foram removidas, o conteúdo urinário foi desprezado e foram incubadas em solução de formamida (1 ml/bexiga) a 56°C *overnight*. O corante extraído foi determinado pela medida na mudança da absorvância a 630 nm em leitor de placa. A permeabilidade vascular foi expressa em µg de Azul de Evans/mL (MOTA et al., 2007).

4.4.5 Quantificação da hemoglobina vesical pelo método da cianometahemoglobina

A dosagem de hemoglobina foi realizada através da adaptação da técnica descrita por Harold e Drabkin (1935). As bexigas foram homogeneizadas em reagente de Drabkin (100 mg de tecido da bexiga por mL de reagente) e após 1 h de incubação, as bexigas foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min. Os sobrenadantes foram extraídos e centrifugados novamente a 10.000 x g por 10 min. A absorvância do sobrenadante foi quantificada utilizando um leitor de placas no comprimento de onda de 450 nm e a concentração de hemoglobina foi calculada através da curva analítica previamente construída utilizando padrão de hemoglobina (Labtest, Brasil) e os resultados foram expressos em µg de hemoglobina/mg de tecido (DRABKIN; AUSTIN, 1935).

4.5 Análise Histopatológica

As bexigas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10% por 24h, em seguida desidratadas em álcool 70% e incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em 5 µm e corados com hematoxilina-eosina (HE). A avaliação histológica foi realizada de forma cega pela Prof^a. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão de acordo com critérios de Gray Modificado (MARTINS et al., 2012) que se seguem na tabela 2:

Tabela 2 – Escores histológicos de Gray

Escore	Descrição
Alterações intensas (3 +)	Caracterizada por múltiplas ulcerações da mucosa, erosão na mucosa, edema intenso, infiltrado inflamatório intenso, depósito de fibrina intenso e diversos focos hemorrágicos com possível hemorragia transmural.
Alterações moderadas (2+)	Caracterizada por múltiplas ulcerações da mucosa, edema moderado, infiltrado inflamatório, depósito de fibrina e focos hemorrágicos.
Alterações discretas (1+)	Caracterizada por número de células epiteliais diminuídas pela descamação, “apagamento” das dobras habituais da mucosa em decorrência do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras.
Histologia normal (0)	Caracterizada pelo urotélio normal, bem como ausência de úlcera e infiltrado inflamatório.

Fonte: elaborada pela autora.

4.5.1 Avaliação da hemorragia por Tricrômio de Mallory

A hemorragia vesical foi avaliada nos diferentes grupos experimentais a partir de lâminas de tecidos coradas com coloração especial de Mallory, corante utilizado comumente na identificação de fibras colágenas, que são evidenciadas em azul nessa coloração. As lâminas foram utilizadas no presente estudo para a avaliação dos vasos sanguíneos, considerando que as hemácias e as células endoteliais são fortemente marcadas em vermelho, o que facilita a identificação dos vasos sanguíneos e colágeno (NARIMIYA et al., 2017).

4.5.2 Mensuração da espessura do urotélio

A mensuração da espessura do urotélio foi realizada por meio do *software* ImageJ versão 1.36b, sendo medidas cinco imagens seriadas da lâmina corada com HE de cada animal em cada grupo usando baixa ampliação ($\times 100$), as fotos foram obtidas no Microscópio Nikon com objetiva 100x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 100x. O valor mensurado foi apresentado em milímetros (WRÓBEL et al., 2017).

4.6 Avaliação da expressão de F4/80 e NF- κ B por imunofluorescência

Os blocos de parafina contendo bexiga foram cortados, na espessura de 4 μ m, em micrótomo. Para a realização da imunofluorescência, os cortes dos tecidos extraídos foram desparafinizados em estufa a 60 °C por 60 minutos. Em seguida, foi realizada a hidratação com dois banhos de xilol por 2 minutos, dois banhos de álcool absoluto 10 minutos e três banhos de álcool (90%, 70%, 50%) por 5 minutos, seguido de uma lavagem em água corrente por 10 minutos e três banhos de PBS por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0), à temperatura de 95°C, por 18 minutos, seguida de resfriamento, à temperatura ambiente, durante 20 minutos e três banhos de PBS por 5 minutos. Depois, foram feitas a permeabilização da membrana nuclear, por 10 minutos, utilizando triton X-100 0,2% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), e o bloqueio de ligações inespecíficas, utilizando glicina 0,3 M (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) em albumina sérica bovina (BSA) 5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), durante 30 minutos. Os tecidos foram incubados com os anticorpos primários feitos em coelho anti NF- κ B p65, anticorpo de marcação nuclear (Abcan) (diluição: 1:100) ou anti-F4/80 (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) (diluição de 1: 200) overnight, na temperatura de 2 – 8 °C. Posteriormente, após três banhos de PBS por 5 min, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário feito em Alexa Fluor™ 568 donkey anti-rabbit (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), na diluição de 1: 200, durante 1 hora e 30 minutos. Com a finalidade de marcar os núcleos celulares, as seções dos tecidos foram incubadas, durante 30 minutos, com DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) (4 μ L em 200 mL de PBS). Para montagem das lâminas, foi utilizado o meio Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para a aquisição das fotomicrografias, foi utilizado um microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com “master gain” e “digital offset” padronizados para posterior análise. As fotomicrografias foram analisadas através de um “software” de imagem (Fiji Image J, National Institutes of Health, Washington, DC, EUA). Para realizar a quantificação da área fluorescente nas fotomicrografias, foi necessário fazer a diferenciação dos pixels fluorescentes pela maior saturação de cor relacionada à fluorescência (vermelha). Previamente, com o propósito de definir os pixels

selecionados e não selecionados, os limites inferior e superior foram padronizados pelo limiar de cores. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem, que foi calculada comparando a fluorescência positiva de F4/80 ou NF-KB (100%).

4.7 Avaliação da expressão de TNF- α e COX-2 por imunohistoquímica

Amostras de bexiga foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24h e processados para inclusão em parafina. Após a inclusão, os segmentos foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 4 μ m que foram inseridos em lâminas histológicas silanizadas. Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cortes foram submetidas à desparafinização: inseridas em estufa a 60°C por 1 hora, seguido de dois banhos em xilol por 5 min. cada. Em seguida, foram hidratados com dois banhos de etanol absoluto, um banho em etanol a 90%, e um banho em etanol a 70%, por 3 min cada. Ao final desta etapa, os cortes foram submersos a um banho de água destilada por 10 min. e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (DAKO, pH 6,0) por 25 min em banho maria na temperatura de 95°C. Em seguida, os tecidos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 min. Na etapa seguinte, realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% (DAKO) por 30 min. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários anti-COX-2 (Invitrogen) (diluição 1:200) ou anti-TNF- α (Abcan) (diluição 1:300) overnight. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com polímero HRP (DAKO) por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS durante 3 min cada, secadas e aplicado o DAB (DAKO), 3,3-diaminobenzidina, uma gota de DAB para um mL de diluente). DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Dessa forma, observou-se as lâminas até aparecer uma coloração marrom, após este evento a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Enfim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e processadas para inserir a lamínula. Imagens dos tecidos foram capturadas por meio de câmera digitalizada acoplada ao microscópio (Nikon Elipse E200), sendo capturados 10 campos por corte histológico no aumento de 200x ou 400x para obter a área total do tecido e a área imunomarcada. A quantificação foi realizada através da

quantificação de pixels pela maior saturação de cor relacionada à imunomarcação com DAB, através do *software* ImageJ.

4.8 Detecção das citocinas inflamatórias

A concentração de citocinas presentes nas bexigas foi quantificada através do ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com método descrito por (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995). Os tecidos foram homogeneizados a 10% de PBS (pH 7,4) (mg de tecido/ μ L) e centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos para utilização do sobrenadante. As placas de 96 poços com superfície de alta ligação foram incubadas *overnight* com anticorpos murinos de captura para TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 (kits da R&D systems). Após bloqueio de sítios de ligação inespecíficas com BSA (1%), 100 μ L de amostra foram incubadas por 2h a 4°C, bem como, a curva padrão seriada também adicionada nesta etapa. Após cada etapa de incubação as placas foram lavadas com tampão PBS/TWEEN-20, e em seguida foi adicionado anticorpo de detecção por 2h. Posteriormente, as placas foram lavadas e 100 μ L do complexo HRP-streptavidina diluído (1:40) foi adicionado. Decorridos 20 minutos, 100 μ L do substrato de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a temperatura ambiente por 20 min. A reação enzimática foi interrompida com 50 μ L de H₂SO₄ (2N) e então a leitura das absorbâncias foi mensurada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 450 nm. As concentrações de citocinas foram calculadas a partir de uma curva padrão. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mg de tecido.

4.9 Avaliação da expressão gênica de mediadores inflamatórios (COX-2, Inos, IL-4; IL-33) por rtPCR

Amostras de bexiga foram homogeneizadas em 1 mL de Trizol usando esferas de aço (4.5 mm) que foram agitadas no TissueLyser LT (Qiagen) por 2 minutos a 50 pulsos/segundo e depois colocadas no gelo por 2 minutos. Para homogeneização completa, as amostras necessitaram de 2 ciclos de agitação. A extração do RNA seguiu o método Trizol de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, as amostras foram quantificadas em uma Placa de Microvolume Take3™, utilizando-

se um Epoch™ Microplate Spectrofotometer (BioTek), amostras com fator de pureza onde a absorbância A260/280 variou de 1,5 a 2,0 foram consideradas adequadas para o estudo. A transcrição do RNA em DNA complementar foi realizada usando o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit in Veriti 96 Thermocycler ambos da Applied Biosystems. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

Finalmente, o qRT-PCR foi realizado usando o PowerUp SyBr Green Master Mix no QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Scientific). A amplificação foi realizada utilizando o modo de ciclagem rápida seguindo as especificações do fabricante. Um micrograma de cDNA foi usado para analisar a expressão dos genes IL-4 (5'-CGCCATGCACGGAGATG-3' e reverso 5'-CGAGCTCACTCTCTGTGGTGT-3'), COX-2 (5'-GTGGAAAACCTCGTCCAG-3' e reverso 5'-GCTCGGCTTCCAGTAFFGA-3'), iNOS (5'-GGCAGCCTGTGAGACCTTG-3' e reverso 5'-GCATTGGAAGTGAAGCGTTC-3') e IL-33 (5'-TGCATGAGACTCCGTTCTGG-3' e reverso 5'-CCCGTGGATAGGCAGAGAAG-3'). As amostras foram normalizadas usando o gene β -actina (5'-AGAGGGAAATCGTGCGTCAC-3' direto e 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3' reverso). A expressão gênica relativa foi determinada usando o método 2- $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittgen, 2001).

4.10 Avaliação do estresse oxidativo

4.10.1 Determinação da concentração de Malonaldeído (MDA)

A determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico foi realizada através da quantificação do malonaldeído, um produto da decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, formado durante o processo oxidativo, conforme método descrito por (DRAPER; HADLEY, 1990). As bexigas foram homogeneizadas com tampão fosfato 0,05 M a 10% (mg de tecido/ μ L), 250 μ L do homogenato foram incubados em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Em seguida, a fim de interromper o processo de peroxidação, foi adicionado 400 μ L de ácido perclórico 35% às amostras e então centrifugadas em 14.000 rpm, 15 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi coletado e adicionou-se 200 μ L de ácido tiobarbitúrico 0,8% e novamente submetido a banho-maria por 30 minutos a 95°C. Após resfriamento, as

amostras foram plaqueadas e uma curva-padrão com tetrametoxi-propano (TMP) foi utilizada para calibração do método. As absorbâncias foram mensuradas no comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/mg de tecido.

4.10.2 Determinação dos níveis de nitrito (NO)

O método fundamenta-se na reação do NO_2^- com uma amina primária aromática em meio ácido para formar um sal de diazônio, que conseqüentemente reage com um composto aromático formando um azo-composto, sendo denominado reação de Griess (GREEN et al., 1982). Esse método é uma forma indireta de quantificação do óxido nítrico, uma vez que o íon NO_3^- (nitrato) é determinado como íon NO_2^- (nitrito) após redução pela enzima nitrato redutase. As bexigas foram homogeneizadas com cloreto de potássio (KCl 0,15 M) a 10% ($\mu\text{L}/\text{mg}$ de tecido), centrifugadas a 5.000 rpm por 30 minutos. Em seguida, 80 μL do sobrenadante foi incubado com a solução reagente (40 μL da enzima nitrato redutase, substrato NADPH, KH_2PO_4 em água destilada) *overnight* em estufa a 37 °C, a fim de que todo nitrato presente no sobrenadante fosse convertido em nitrito. A curva-padrão também foi plaqueada a partir de uma solução nitrato de sódio (NaNO_2 200 μM). Por fim, 80 μL da solução de Griess (1% de sufamilamida em 1% H_3PO_4 / 0,1% de NEED/água destilada/1:1:1:1) foram adicionadas em cada poço. As absorbâncias foram lidas em 540 nm e os resultados foram expressos em μM de NO_2^- (CHEN et al., 2000).

4.10.3 Determinação da concentração de glutatona reduzida (GSH)

A determinação da glutatona reduzida, antioxidante hidrossolúvel componente endógeno do pool dos grupos sulfidrílicos não-proteicos (NPSH), foi analisado de acordo com o método de (SEDLAK; LINDSAY, 1968) que fundamenta-se na reação do DTNB (ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico) com compostos de sulfidril. As bexigas foram homogeneizadas a 10% com tampão EDTA 0,02 M. Em seguida, adicionou-se 60 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10% a 40 μL de amostra e então foi centrifugado em 5000 rpm, 15 min, 4°C. O sobrenadante foi plaqueado, bem como a curva-padrão com glutatona reduzida. Por fim, foi adicionado 102 μL da solução de leitura (Tris-

EDTA, DTNB 0,01 M) e a absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em μg de NP-SH/mg de tecido.

4.10.4 Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT)

A catalase é um antioxidante capaz de transformar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio, o ensaio determina a velocidade de consumo do H_2O_2 pela enzima presente na amostra, conforme descrito por (MAEHLY; CHANCE, 1954). As bexigas foram homogeneizadas a 10% em tampão fosfato 150 mM e em seguida centrifugadas a 10.000 rpm, 5 minutos, 4 °C. E então, 20 μL do sobrenadante foram adicionados a 980 μL do meio de reação (H_2O_2 0,1%, Tris-HCl-EDTA 5 mM pH 8,0 e água Milli-Q). As absorbâncias foram medidas após 1 e 6 minutos da adição do meio de reação em comprimento de onda 230 nm. Os resultados foram expressos como unidades de catalase (U) /mg de proteína.

4.10.5 Determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutação do ânion superóxido para peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um radical menos nocivo, que em seguida é degradado pela catalase. A SOD é capaz de inibir a redução do azul de nitro-tetrazolio (NBT) a formazam pelo ânion superóxido (O_2^-), nessa metodologia a riboflavina reduzida fotoquimicamente libera o O_2^- . As bexigas foram homogeneizadas a 10% em tampão fosfato 50 mM (pH 7,8) e em seguida centrifugadas a 12.000 rpm, 20 min, 4°C. Do sobrenadante obtido, 50 μL foram adicionados a 1 mL do meio de reação (tampão fosfato 50 mM, EDTA 0,1 mM, metionina 19,5 mM), 300 μL de riboflavina 5 μM e 150 μL de NBT 750 μM , protegidos da luz. O material foi exposto à luz fluorescente (15 W) por 15 minutos e então plaqueadas para leitura da absorbância no comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos em unidades da enzima (U)/mg de proteína (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

4.11 Análise estatística

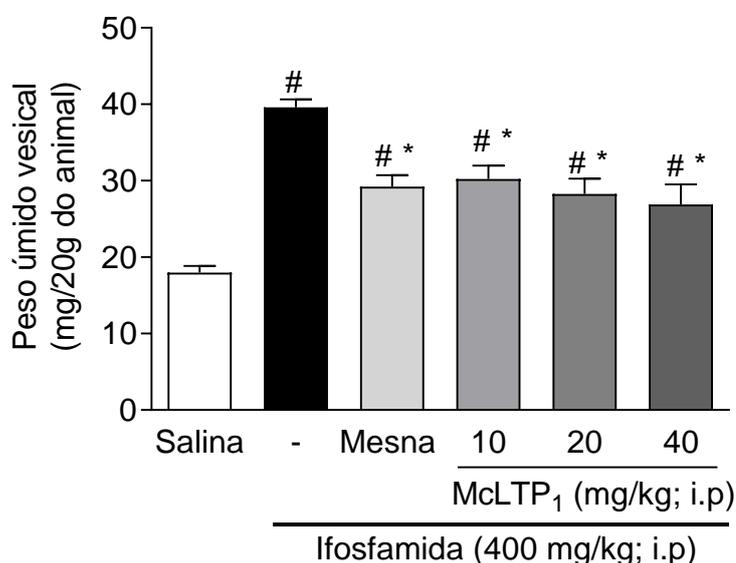
A análise estatística foi realizada com o software GraphPadPrism®, versão 8.0. Realizou-se o teste de comparações múltiplas por meio de análise de variância (ANOVA) seguido do teste Bonferroni (dados paramétricos) ou aplicação do teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunn's (dados não paramétricos). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão média (E.P.M), para dados paramétricos ou valor mediano, máximo e mínimo, para dados não paramétricos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito de McLTP_1 sobre a indução da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

A indução da cistite hemorrágica foi através da administração de ifosfamida na dose de 400 mg/kg via intraperitoneal. McLTP_1 foi administrada nas doses de 10, 20 ou 40 mg/kg (i.p) conforme esquema terapêutico descrito anteriormente. A figura 7 mostra que ifosfamida induziu o aumento do peso úmido vesical em 116%, quando comparado ao controle tratado apenas com o veículo salina. Enquanto que o tratamento com McLTP_1 foi capaz de reduzir esse parâmetro nas três respectivas doses supracitadas 23, 28 e 30% respectivamente, tal como o grupo mesna com redução de 25%.

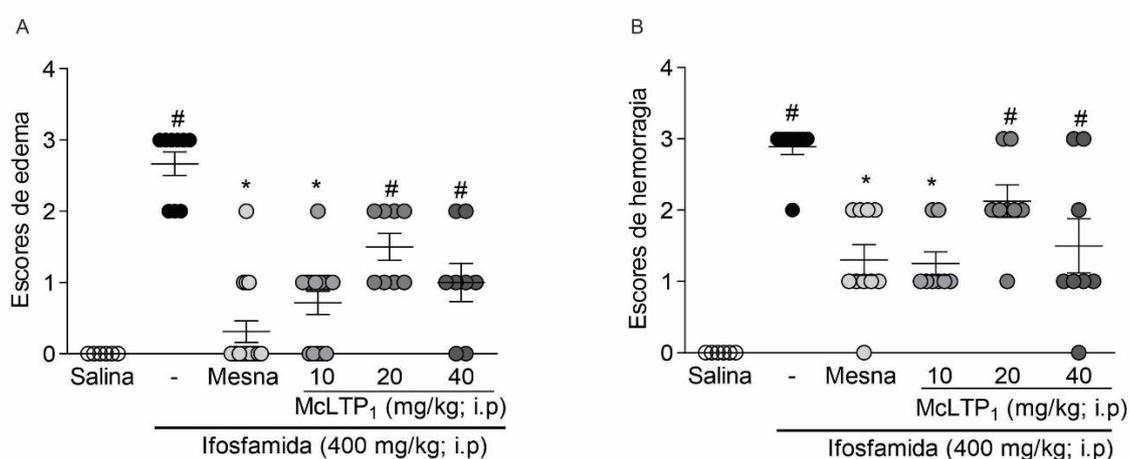
Figura 7- Efeito de diferentes doses de McLTP_1 no aumento do peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Os valores representam o aumento do peso úmido vesical (PUV) em camundongos após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratado com McLTP_1 ou mesna. Os resultados são apresentados pelas médias \pm EPM ($n = 6-8/\text{grupo}$). # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e * $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

A avaliação macroscópica dos escores de edema e hemorragia demonstram que a ifosfamida aumentou tais parâmetros significativamente [E: 3 (2-3); H: 3 (2-3)], quando comparado ao controle salina [E: 0 (0-0); H: 0 (0-0)]. Já o tratamento com McLTP_1 na dose de 10 mg/kg preveniu significativamente edema e hemorragia [E: 1 (0-2); H: 1 (1-2)], semelhante significativamente ao fármaco uroprotetor mesna [E: 0 (0-2); H: 1 (0-2)]. Entretanto, nas doses de 20 [E: 1,5 (1-2); H: 2 (1-3)] e 40mg/Kg [E: 1 (0-2); H: 1 (0-3)] não houve redução significativa (Figura 8 A e B; Tabela 3).

Figura 8 - Efeito de diferentes doses de McLTP_1 sobre os escores de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Os valores representam a mediana (mín-máx) dos escores macroscópicos de edema e hemorragia em animais após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratados com McLTP_1 ou mesna. Apenas o tratamento com McLTP_1 na dose de (10 mg/kg i.p.) foi capaz de reduzir os escores de edema e hemorragia. Os resultados são apresentados por medianas e valores mínimos e máximos (n=8/grupo). # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e * $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's.

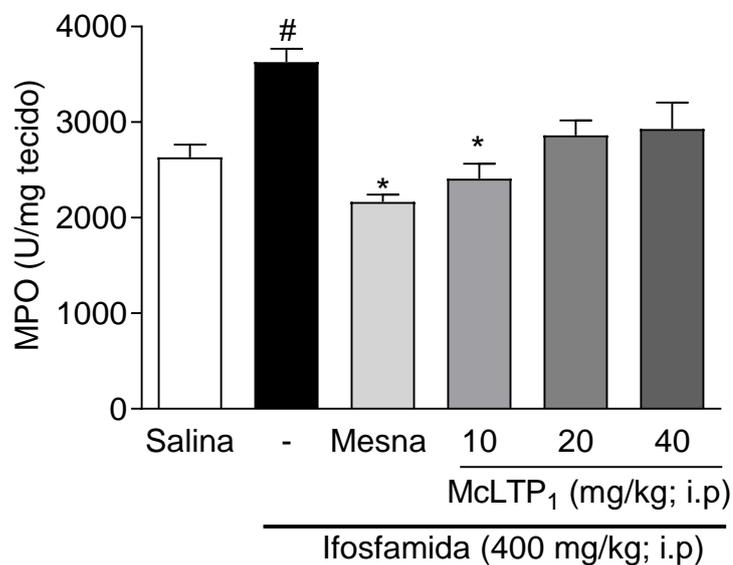
Tabela 3 - Efeito de diferentes doses de McLTP_1 sobre os escores de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

Grupos experimentais	Escore de edema	Escore de hemorragia
Salina	0 (0-0)	0 (0-0)
Ifosfamida	3 (2-3) #	3 (2-3) #
IFO + Mesna	1 (0-2) *	1 (0-2) *
IFO + McLTP_1 10 mg/kg	1 (1-2) *	1 (1-0) *
IFO + McLTP_1 20 mg/kg	1 (1-2) #	2 (1-3) #
IFO + McLTP_1 40 mg/kg	1 (0-2) #	1 (0-3) #

Os resultados são apresentados por medianas e valores mínimos e máximos (n=8/grupo). # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e * $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's.

A atividade da mieloperoxidase, enzima presente nos neutrófilos foi aumentada no grupo tratado apenas com ifosfamida em 37%, quando comparado ao grupo salina. Enquanto que McLTP_1 nas doses de 10 mg/kg foi capaz de reduzir esse parâmetro inflamatório em 33%, equivalente ao tratamento com mesna que reduziu em 40%. Porém, as doses de 20 e 40 mg/kg não promoveram redução significativa, tendo redução da MPO em 21 e 19%, respectivamente (Figura 9).

Figura 9 - Efeito do tratamento de diferentes doses na McLTP_1 na atividade de mieloperoxidase (MPO) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



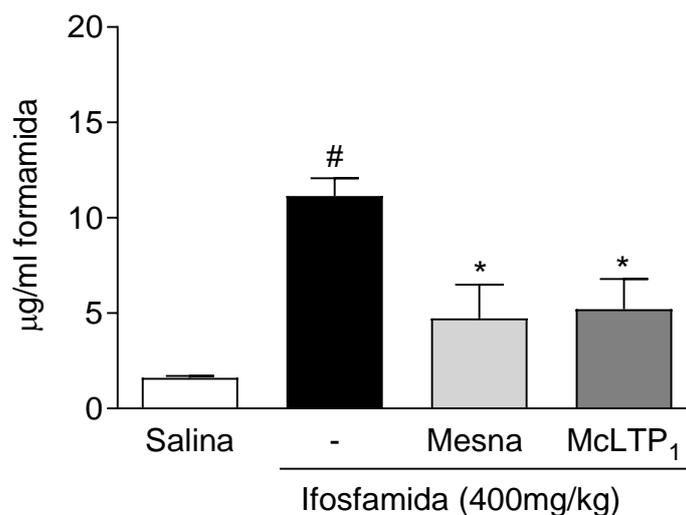
Os valores representam a atividade de mieloperoxidase (MPO) em animais após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratado com McLTP_1 ou mesna. Os resultados são apresentados pelas médias \pm EPM (n=6/grupo). # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e * $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Os resultados acima evidenciam que a dose testada com melhor efeito terapêutico de McLTP_1 é a de 10 mg/kg, sendo assim elegível para realização dos experimentos a seguir.

5.2 Efeito de McLTP_1 sobre permeabilidade vascular na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

O tratamento com ifosfamida induziu um aumento significativo da permeabilidade vascular em 587%, medida através do extravasamento do Azul de Evans nas bexigas 24h após a administração do corante quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina. O tratamento com McLTP_1 na dose de 10 mg/kg foi capaz de promover uma redução significativa de 53% desse parâmetro, bem como tratamento com mesna com redução de 57%, conforme mostra a figura 10.

Figura 10 - Efeito do tratamento com McLTP_1 na permeabilidade vascular aplicada ao modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

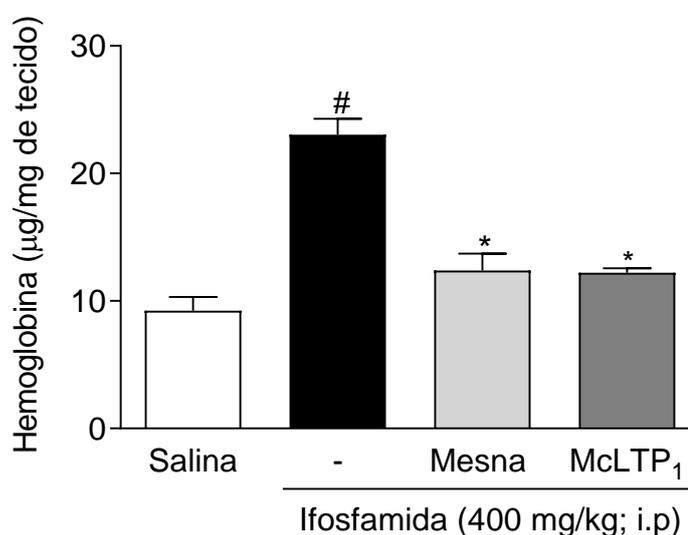


Os valores representam o extravasamento de Azul de Evans em bexigas de camundongos após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratado com McLTP_1 ou mesna. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. (n=8/grupo). # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e * $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

5.3 Efeito de McLTP_1 sobre dosagem de hemoglobina em bexigas no modelo cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

Ao contrário do grupo salina, a parede da bexiga em animais tratados com ifosfamida mostrou aumento significativo da hemorragia em 150%, conforme indicado na Fig. 11. O tratamento com McLTP_1 reduziu a quantidade de hemoglobina em 47%, semelhante ao tratamento com mesna que reduziu em mesmo valor.

Figura 11 - Efeito do tratamento com McLTP_1 na hemoglobina aplicada ao modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

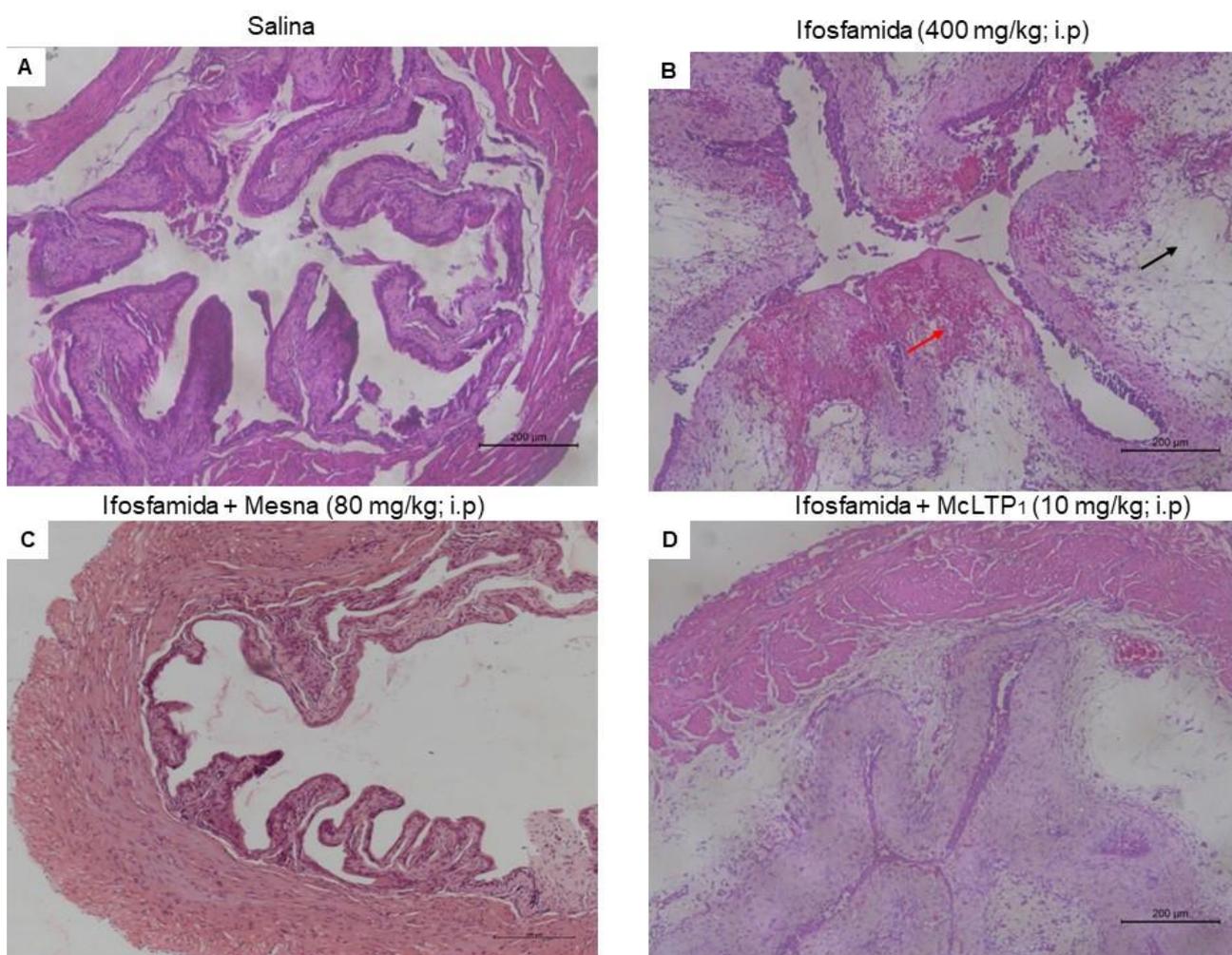


Os valores representam a hemorragia que foi avaliada indiretamente pelos níveis de hemoglobina tecidual após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratado com McLTP_1 ou mesna. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. ($n=8$ /grupo). # $p<0,05$ em relação ao grupo salina e * $p<0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

5.4 Efeito de McLTP₁ sobre as alterações histológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

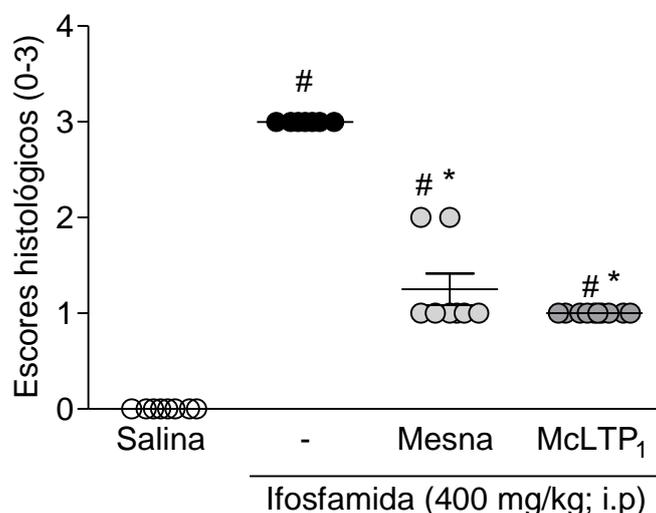
Ao avaliar as bexigas microscopicamente de acordo com os critérios de Martins (2012) observou-se acentuado edema, hemorragia, congestão vascular e ulceração, recebendo escores de 3 (3-3) nos animais tratados com ifosfamida (12 B), quando comparada à bexiga do grupo controle 0 (0-0) (12 A). Já nos animais tratados com McLTP₁ (12 D), observou-se redução dos escores 1(1-1), apresentando apenas edema, semelhante ao grupo mesna 1 (1-2) (12 C) (Figura 13, Tabela 4).

Figura 12 - Fotomicrografias representativas do efeito de $McLTP_1$ nas alterações histológicas de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



As bexigas foram processadas pela técnica de coloração de hematoxilina-eosina (HE) nos grupos experimentais. As figuras expressam a morfologia dos tecidos representativos dos seguintes grupos: Controle: Salina i.p.); Ifosfamida 400mg/Kg i.p.); Ifosfamida + Mesna (80 mg/kg; i.p); Ifosfamida + $McLTP_1$ (10mg/kg; i.p). Seta preta: edema. Seta vermelha: focos hemorrágicos. Escala: 200 µm.

Figura 13 - Efeito do tratamento com McLTP_1 nas alterações histológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Os valores representam a mediana (mín-máx) dos escores macroscópicos de edema e hemorragia em animais após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratados com McLTP_1 ou mesna. Os resultados são apresentados por medianas e valores mínimos e máximos ($n=8/\text{grupo}$). # $p<0,05$ em relação ao grupo salina e * $p<0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's.

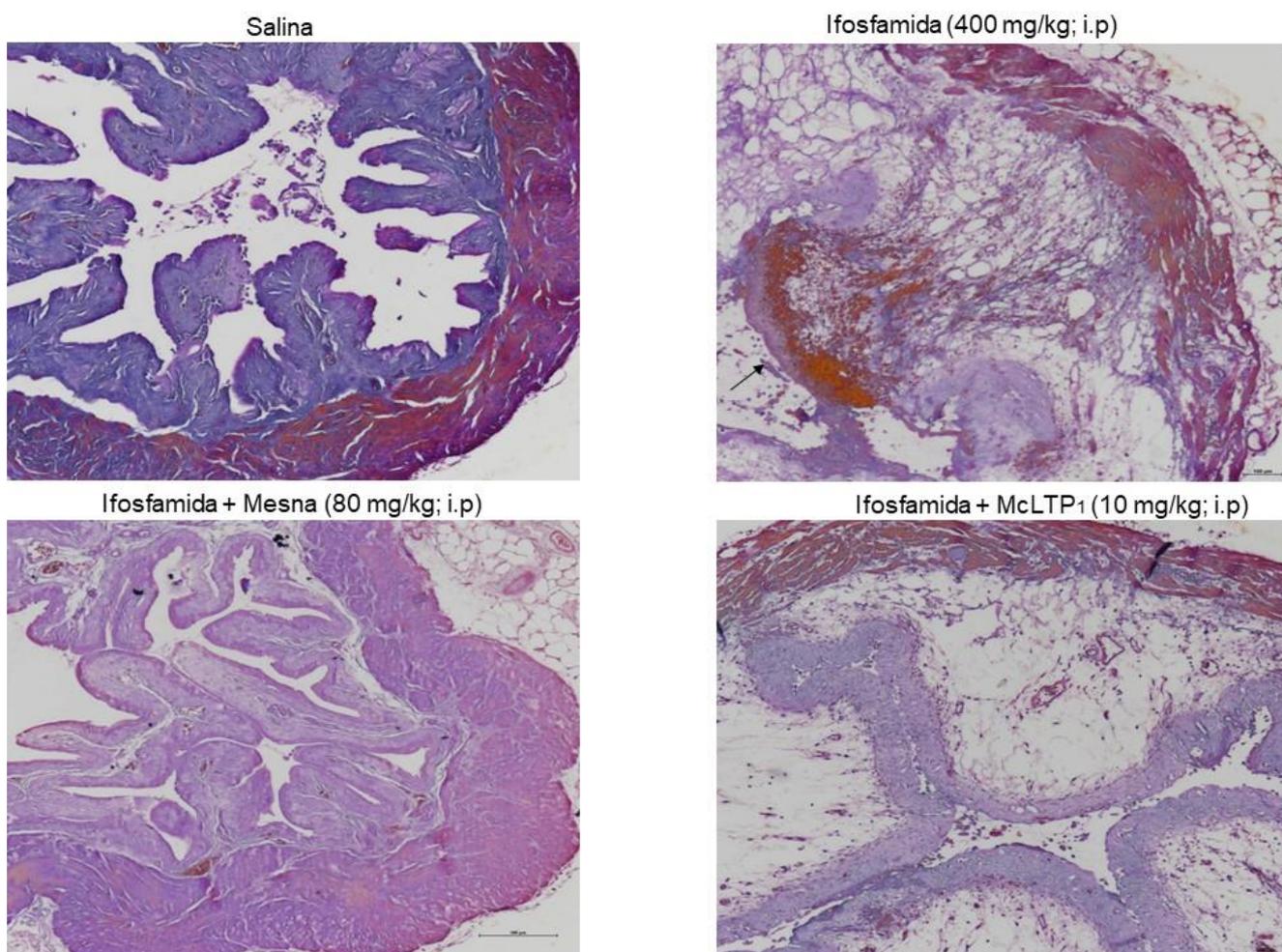
Tabela 4 - Efeito do tratamento com McLTP_1 nas alterações histológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

Grupos experimentais	Escores histológicos
Salina	0 (0-0)
Ifosfamida	3 (3-3) #
IFO + Mesna	1 (1-1) #*
IFO + McLTP_1	1 (1-2) #*

Os resultados são apresentados por medianas e valores mínimos e máximos ($n=8/\text{grupo}$). # $p<0,05$ em relação ao grupo salina e * $p<0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's.

A presença de hemorragia foi investigada com a coloração especial, onde observa-se uma intensa marcação em focos hemorrágicos de bexigas do grupo ifosfamida, comparado a uma redução acentuada após tratamento com McLTP₁ e mesna (Fig. 14).

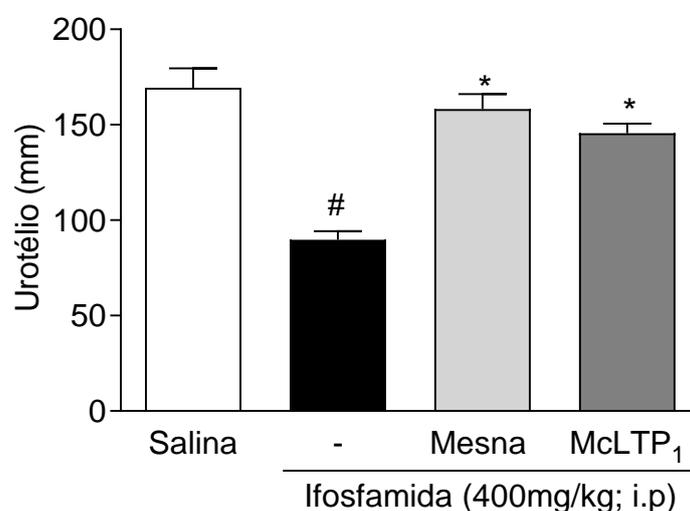
Figura 14 - Fotomicrografias representativas do efeito de McLTP₁ nas alterações histológicas de hemorragia em camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



As bexigas foram processadas pela técnica de coloração de Mallory nos grupos experimentais. As figuras expressam a morfologia dos tecidos representativos dos seguintes grupos: Controle: Salina i.p.; Ifosfamida 400mg/Kg i.p.; Ifosfamida + McLTP₁ (10mg/kg; i.p); Ifosfamida + Mesna (80 mg/kg; i.p). Seta preta: foco hemorrágico. Escala: 200 μ m.

O tratamento com ifosfamida também induz a redução da espessura do urotélio ($89,73 \pm 4,44$ mm), quando comparado ao grupo controle ($169,4 \pm 10,17$ mm). McLTP_1 e Mesna foram capazes de preservar esse epitélio que recobre grande parte do trato urinário ($145,6 \pm 4,96$ mm; $158,3 \pm 7,84$ mm), respectivamente (Fig. 15).

Figura 15 - Efeito do tratamento com McLTP_1 na espessura do urotélio na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



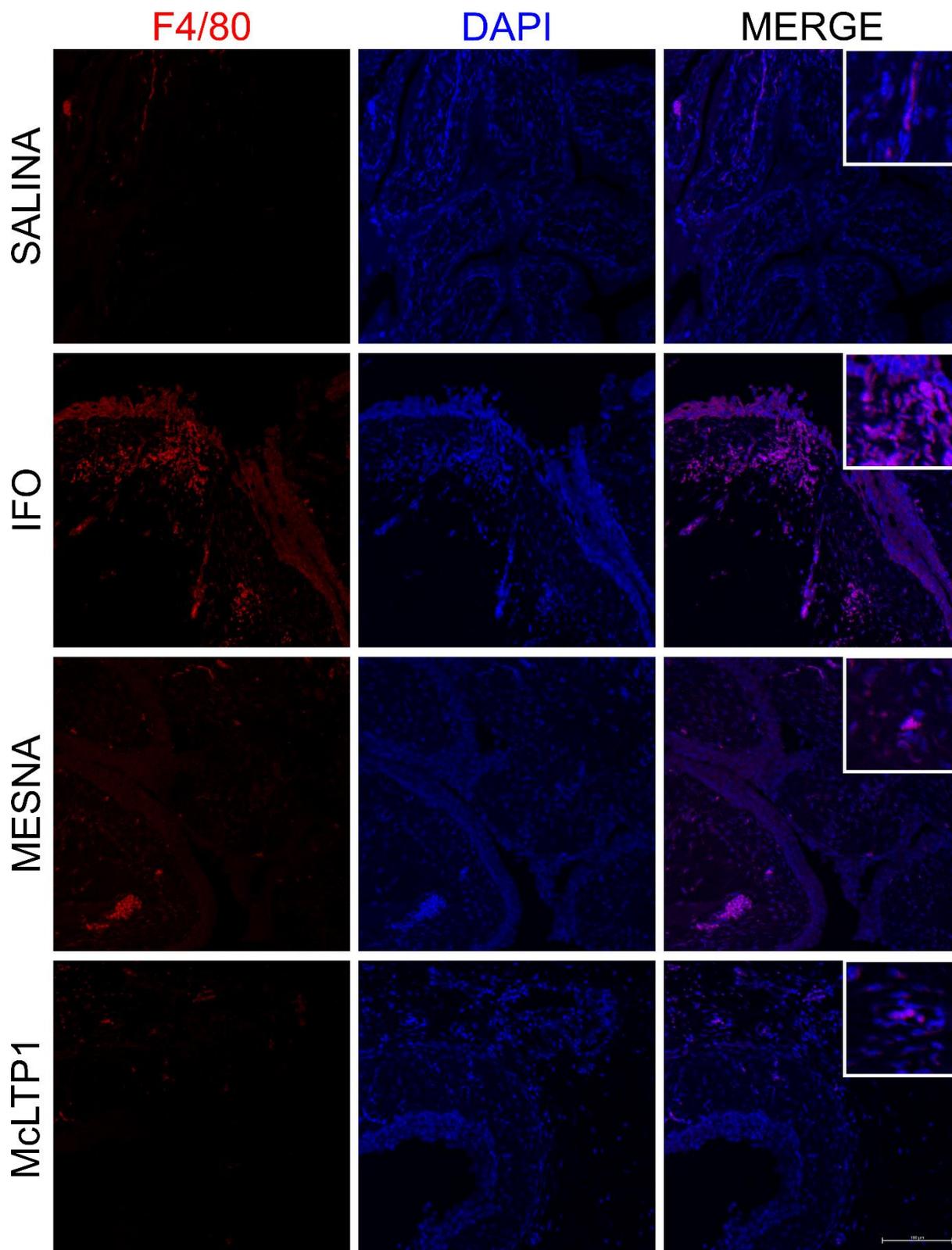
Os valores representam a medida do urotélio avaliada em lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina em animais após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratados com McLTP_1 ou mesna. Os resultados (mm) são expressos pela média \pm E.P.M. ($n=8/\text{grupo}$). # $p<0,05$ em relação ao grupo salina e * $p<0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

5.5 Efeito de McLTP₁ na imunofluorescência de F4/80 e NF-kB na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

A ifosfamida aumentou significativamente a expressão de F4/80 ($43,95 \pm 6,53$ %) na bexiga quando comparado ao grupo controle ($2,13 \pm 0,33$ %) (Figura 16a e 16b). McLTP₁ e Mesna foram capazes de reduzir a marcação de F4/80 quando comparados ao grupo ifosfamida ($5,46 \pm 0,55$ %; $4,17 \pm 0,55$ %), respectivamente.

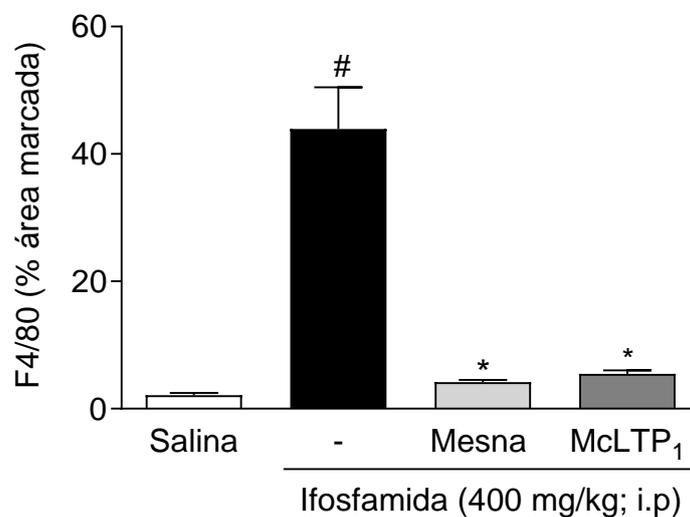
Na imunofluorescência para NF-kB, a ifosfamida aumentou significativamente expressão desse fator de transcrição ($12,14 \pm 1,28$ %), comparando ao grupo que recebeu apenas solução salina (grupo controle) ($1,53 \pm 0,13$ %). McLTP₁ e o tratamento com Mesna foram capazes de reduzir a marcação de NF-kB quando comparados ao grupo ifosfamida ($3,22 \pm 0,30$ %; $2,18 \pm 0,17$ %) (Figura 17a e 17b).

Figura 16a - Fotomicrografias das imunofluorescências para F4/80 em bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



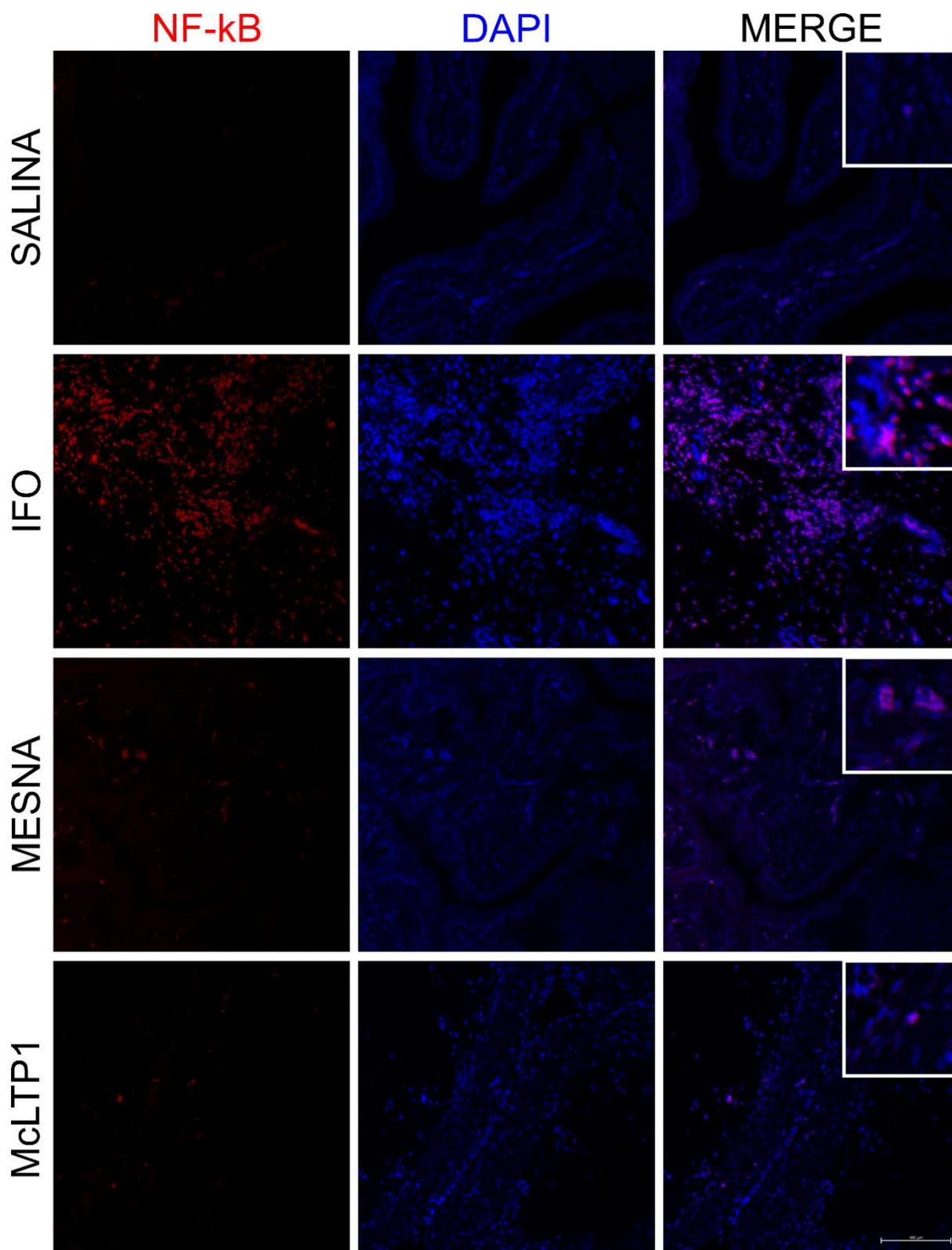
Fonte: dados da pesquisa. Vermelho: F4/80; azul: DAPI (marcador nuclear). Merge: contextualização espacial dos marcadores na imagem sobreposta. Aumento: 200 x. Escala: 100 μ m.

Figura 16b – Quantificação da área fluorescente da expressão de F4/80 em bexiga de camundongos submetidos à cistite hemorrágica por ifosfamida.



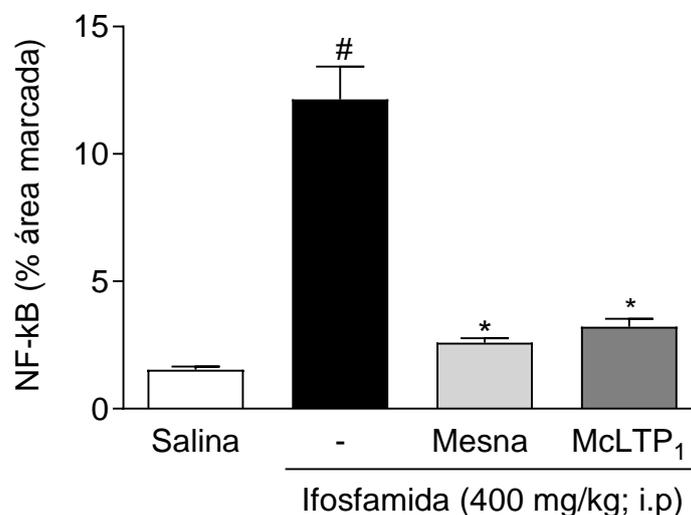
Os valores representam a porcentagem de área marcada de imunofluorescência para F4/80 após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratado com McLTP₁ ou mesna. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. (n=8/grupo). # p<0,05 em relação ao grupo salina e * p<0,05 em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

Figura 17a - Fotomicrografias das imunofluorescências para NF-kB em bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Fonte: dados da pesquisa. Vermelho: NF-kB; azul: DAPI (marcador nuclear). Merge: contextualização espacial dos marcadores na imagem sobreposta. Aumento: 200 x. Escala: 100 μ m.

Figura 17b - Efeito do tratamento com McLTP_1 na imunomarcação para NF-kB na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



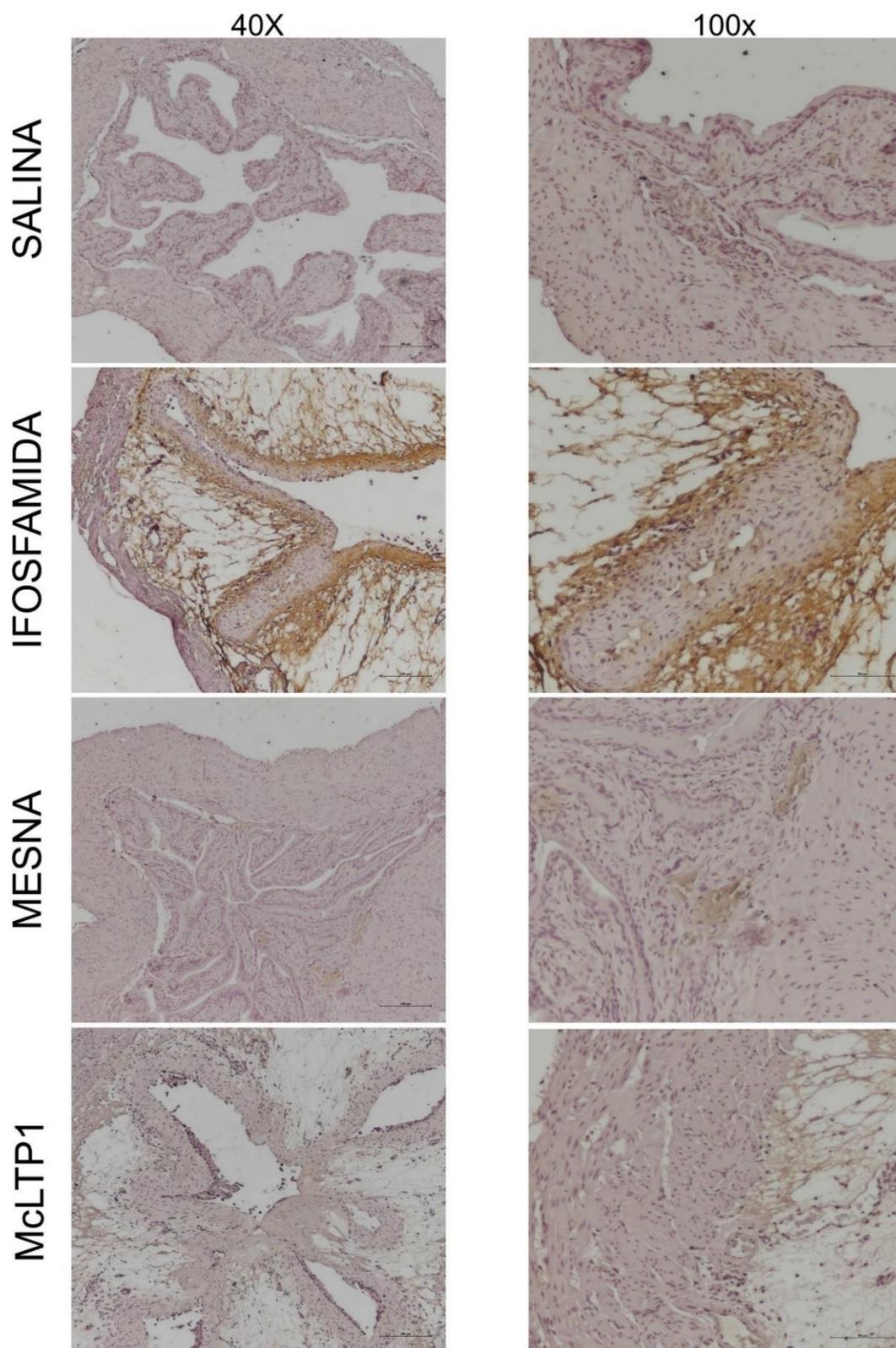
Os valores representam a porcentagem de área marcada de imunofluorescência para NFkB após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratado com McLTP_1 ou mesna. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. (n=8/grupo). # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e * $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

5.6 Efeito de McLTP_1 na imunomarcação de COX-2 e TNF- α na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

Através das figuras 18a e 19a evidencia-se que McLTP_1 foi capaz de diminuir a imunomarcação de COX-2 e TNF- α . Na figura 18b se observa o resultado do efeito de McLTP_1 na marcação de COX-2 por imunohistoquímica na bexiga de camundongos submetidos à cistite hemorrágica por ifosfamida ($13,22 \pm 1,65$), semelhante ao mesna ($14,90 \pm 2,59$). Sobre a porcentagem de área marcada, o tratamento com ifosfamida ($86,82 \pm 7,24$) aumentou significativamente quando comparado ao salina ($3,22 \pm 0,35$).

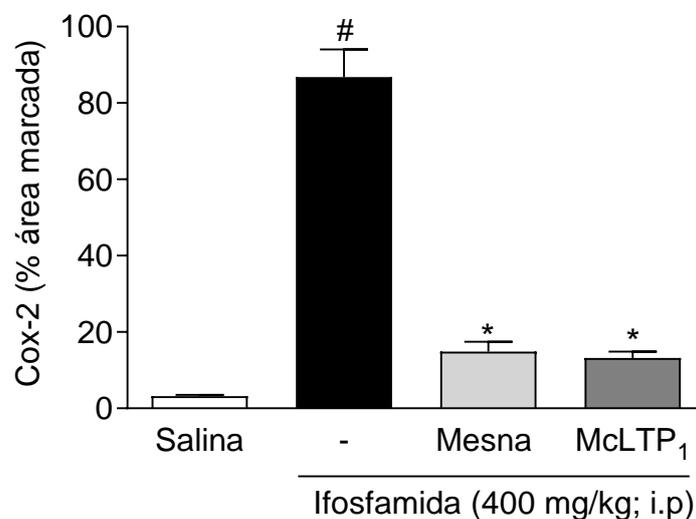
Na figura 19b observa-se intensa marcação de TNF- α no grupo ifosfamida ($67,34 \pm 3,45$) quando comparado ao controle negativo salina ($4,52 \pm 0,49$), enquanto que o tratamento com McLTP_1 reduz significativamente a imunomarcação ($22,92 \pm 3,16$), semelhante ao tratamento com mesna ($26,69 \pm 2,11$), ambos diferentes significativamente do grupo tratado apenas com ifosfamida.

Figura 18a – Fotomicrografias das imunomarcações para COX-2 na bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



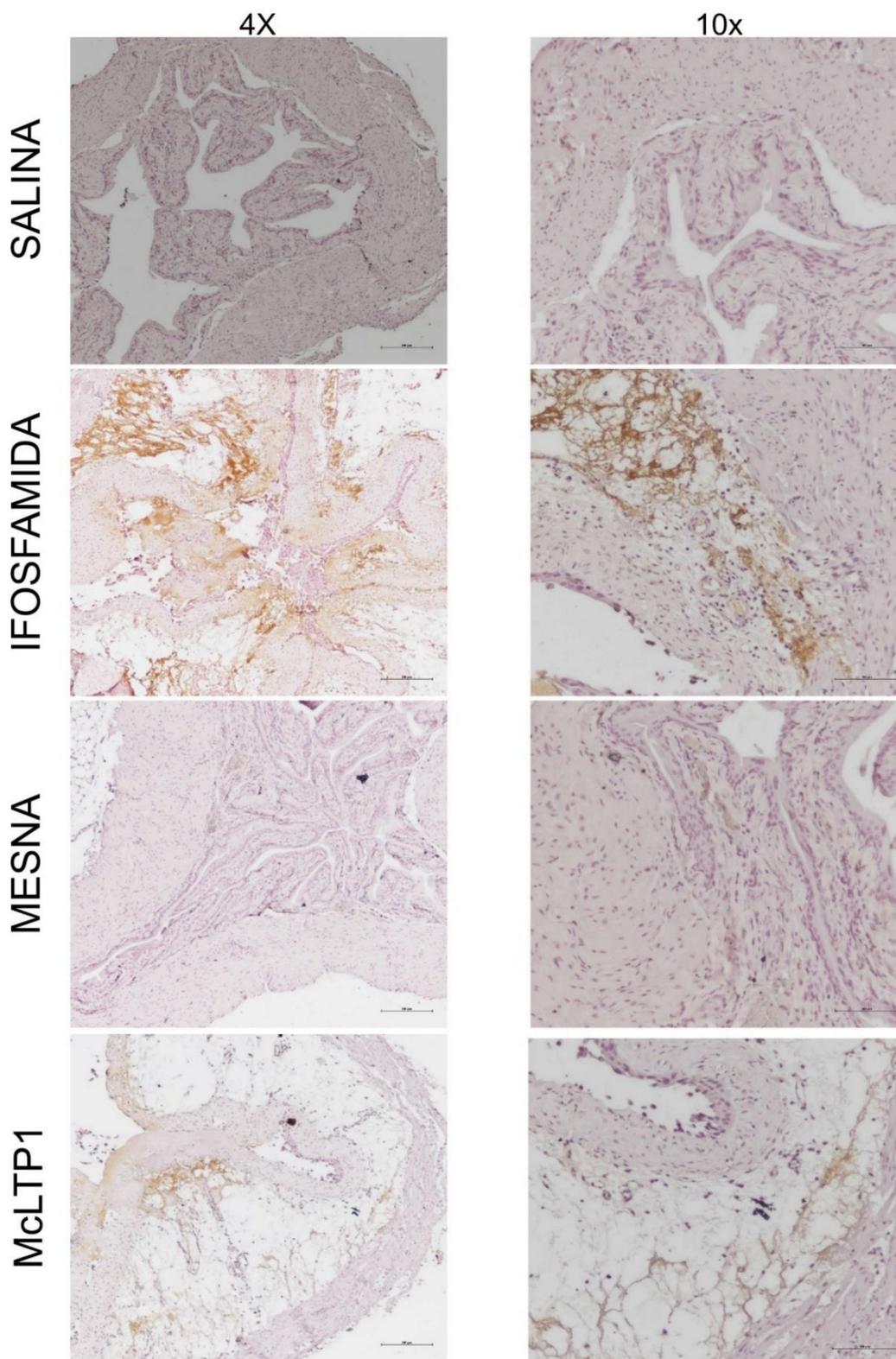
Os painéis representam imagens de imunohistoquímica para COX-2 em bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (100 μ m).

Figura 18b Efeito do tratamento com McLTP_1 na imunomarcção para COX-2 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



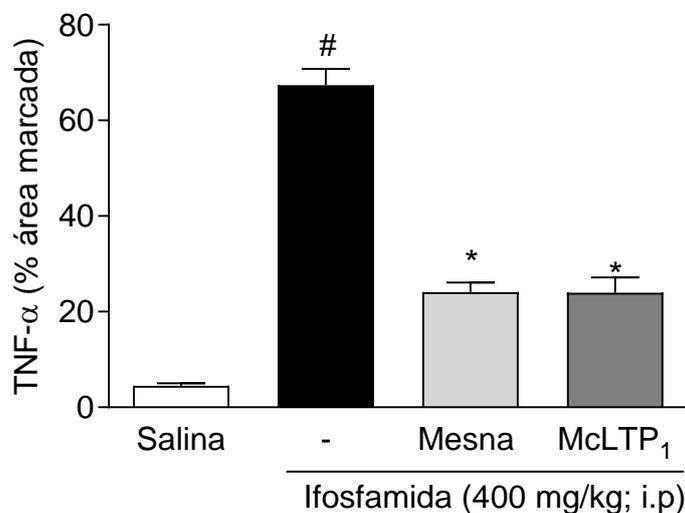
Os valores representam a porcentagem de área marcada de imunohistoquímica para COX-2 após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratado com McLTP_1 ou mesna. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. (n=8/grupo). # p < 0,05 em relação ao grupo salina e * p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

Figura 19a – Fotomicrografias das imunomarcações para TNF- α na bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Os painéis representam imagens de imunohistoquímica para TNF- α em bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (100 μ m).

Figura 19b - Efeito do tratamento com McLTP_1 na imunomarcação para $\text{TNF-}\alpha$ na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Os valores representam a porcentagem de área marcada de imunofluorescência para $\text{TNF-}\alpha$ após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratado com McLTP_1 ou mesna. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. (n=8/grupo). # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e * $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

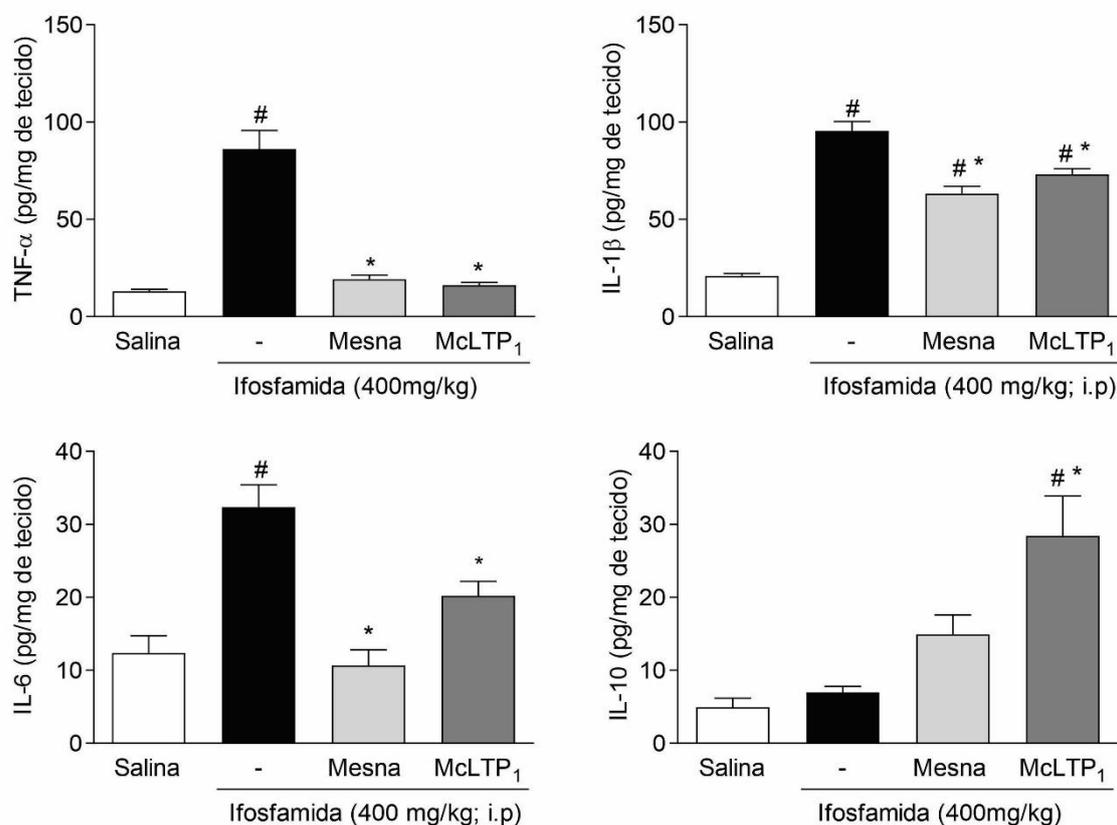
5.7 Efeito de McLTP_1 sobre citocinas inflamatórias na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

Amostras de bexigas dos animais após administração de ifosfamida ou salina foram utilizadas para determinação dos níveis de citocinas $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 . Os animais que receberam ifosfamida apresentaram aumento significativo na concentração das citocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF-}\alpha$: $86,13 \pm 9,51$; $\text{IL-1}\beta$: $95,48 \pm 4,77$; IL-6 : $32,37 \pm 3,03$ pg/mg de tecido), mas não alterou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 ($6,99 \pm 0,81$ pg/ mg de tecido) em relação ao grupo controle ($\text{TNF-}\alpha$: $13,0 \pm 1,07$; $\text{IL-1}\beta$: $20,96 \pm 1,41$; IL-6 : $12,39 \pm 2,37$; IL-10 : $4,94 \pm 1,22$ pg/ mg de tecido), que recebeu apenas solução salina.

Verificou-se que o tratamento com McLTP_1 foi capaz de prevenir de forma significativa a liberação das citocinas pró-inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 ($\text{TNF-}\alpha$: $16,25 \pm 1,32$; $\text{IL-1}\beta$: $73,20 \pm 2,86$; IL-6 : $20,23 \pm 1,96$ pg/mg de tecido) promovida pela ifosfamida. Bem como, promoveu aumento da liberação da citocina anti-inflamatória

IL-10 ($28,42 \pm 5,47$ pg/mg de tecido), semelhante ao tratamento com mesna, exceto na citocina anti-inflamatória IL-10, onde mesna não aumentou significativamente comparado ao grupo ifosfamida (TNF- α : $19,21 \pm 2,24$; IL-1 β : $63,20 \pm 3,84$; IL-6: $10,69 \pm 2,13$; IL-10: $14,92 \pm 2,67$ pg/mg de tecido) (Fig. 20).

Figura 20 - Efeito do tratamento com McLTP_1 nos níveis teciduais de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

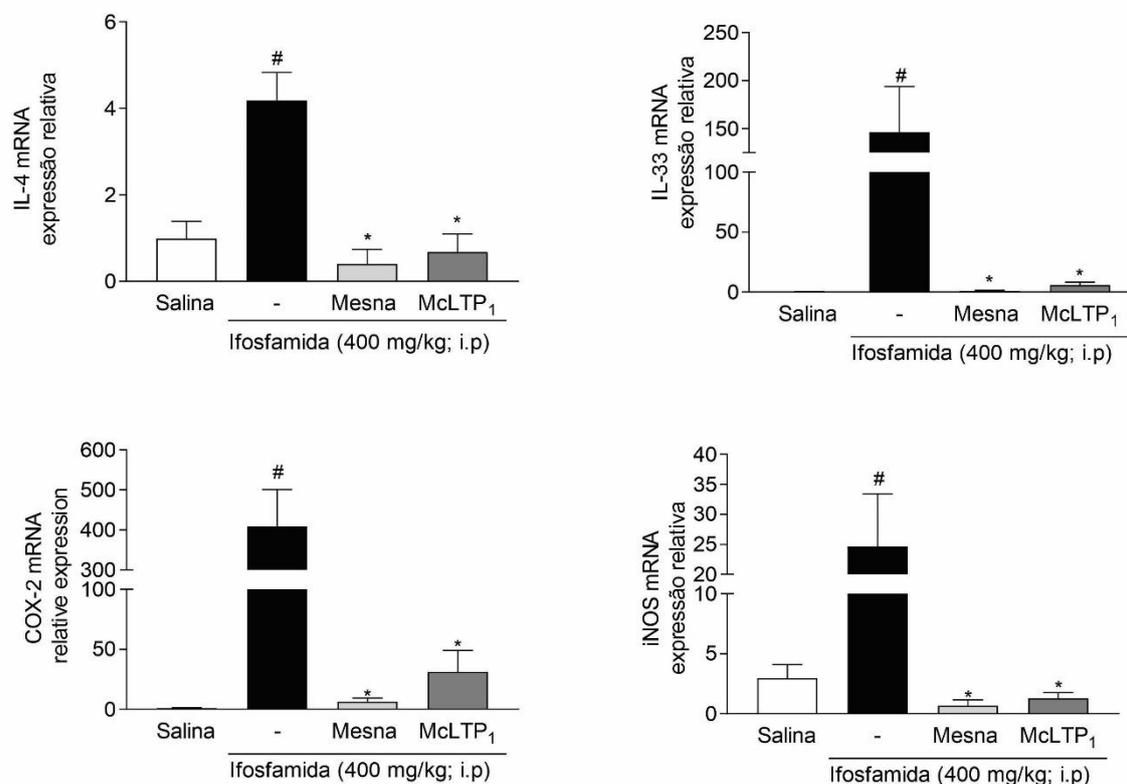


Os valores representam a concentração de citocinas $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratado com McLTP_1 ou mesna. Os resultados (picograma/mg de tecido) são expressos pela média \pm E.P.M. ($n=8$ /grupo). # $p<0,05$ em relação ao grupo salina e * $p<0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

5.8 Efeito de $McLTP_1$ na expressão gênica de *IL-4*, *IL-33*, *Cox-2* e *iNos* na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

Amostras de bexigas dos animais após administração de ifosfamida ou salina foram utilizadas para determinação da expressão gênica de importantes marcadores do processo inflamatório. O tratamento com ifosfamida aumentou a expressão gênica de *IL-4* (SAL: $0,98 \pm 0,40$ vs. IFO: $4,18 \pm 0,64$), *IL-33* (SAL: $0,36 \pm$ vs. $0,11$ vs. IFO: $146,2 \pm 47,46$), *COX-2* (SAL: $1,01 \pm 0,36$ vs. IFO: $408,9 \pm 91,84$) e *iNOS* (SAL: $2,97 \pm 1,12$ vs. IFO: $24,65 \pm 7,78$) quando comparado ao grupo salina ($P < 0,05$). Entretanto, o tratamento com $McLTP_1$ reduziu a expressão de *IL-4* (Mc: $0,67 \pm 0,42$ vs. Mesna: $0,40 \pm 0,33$), *IL-33* (Mc: $5,90 \pm 2,33$ vs. Mesna: $1,18 \pm 0,39$), *COX-2* (Mc: $31,33 \pm 17,86$ vs. Mesna: $6,39 \pm 2,99$) e *iNOS* (Mc: $1,29 \pm 0,48$ vs. Mesna: $0,67 \pm 0,49$), resultados semelhantes ao tratamento com a droga uroprotetora mesna ($P < 0,05$) (Figura 21).

Figura 21 - Efeito do tratamento com McLTP_1 expressão gênica de IL-4, COX-2, iNOS e IL-33 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

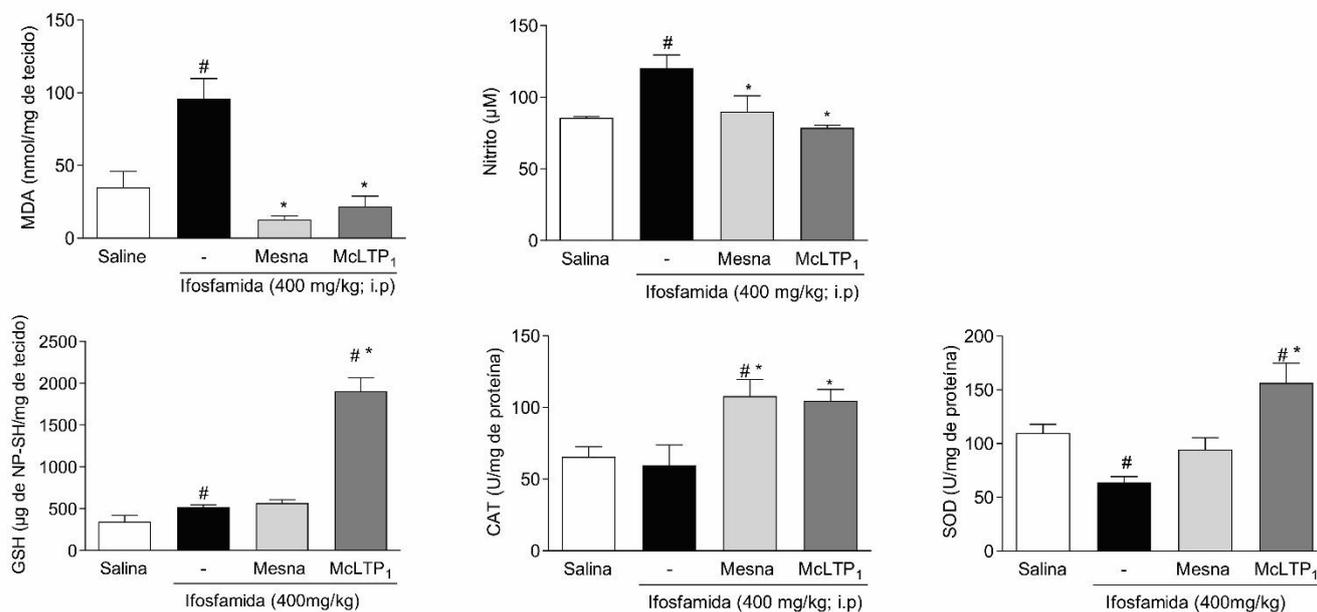


Os valores representam a expressão gênica de marcadores inflamatórios mensurados na bexiga de camundongos após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratado com McLTP_1 ou mesna. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. (n=8/grupo). # p<0,05 em relação ao grupo salina e * p<0,05 em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

5.9 Efeito de McLTP₁ sobre estresse oxidativo na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada através da determinação indireta de Nitrito (NO), do grau de peroxidação lipídica, através do marcador malonaldeído (MDA) e das enzimas antioxidantes glutathiona reduzida (GSH), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). O grupo salina teve os níveis de MDA, NO, GSH, SOD e CAT determinados na bexiga (MDA: $35,11 \pm 10,78$ nmol/mg de tecido; NO: $85,57 \pm 0,918$ μ M; GSH: $347 \pm 73,78$ μ g/mg de tecido; CAT: $65,59 \pm 6,92$ U/mg de proteína; SOD: $109,7 \pm 8,23$ U/mg de proteína). O estresse oxidativo aumentou significativamente no grupo ifosfamida, com altos níveis de peroxidação lipídica determinada pela quantificação de MDA ($95,96 \pm 13,90$ nmol/g de tecido) e NO ($120,5 \pm 9,02$ μ M) em comparação com o grupo controle. Levando também a depleção dos níveis de antioxidantes (GSH: $522,2 \pm 27,23$ μ g/mg de tecido; CAT: $59,85 \pm 13,93$ U/mg de proteína; SOD: $63,94 \pm 5,33$ U/mg de proteína). Contudo, o tratamento com McLTP₁ foi eficaz em aumentar significativamente a atividade antioxidante por meio de GSH, CAT e SOD no tecido (GSH: $1906 \pm 161,3$ μ g/mg de tecido; CAT: $104,8 \pm 7,79$ U/mg de proteína; SOD: $156,4 \pm 11,09$ U/mg de proteína), bem como a restauração da atividade para valores normais de NO ($78,74 \pm 1,74$ μ M) e da peroxidação lipídica (MDA: $21,79 \pm 7,12$ nmol/mg de tecido), semelhante ao tratamento com mesna. Entretanto, a atividade antioxidante de mesna só foi evidenciada na dosagem de catalase, enquanto que GSH e SOD não houve aumento significativo (GSH: $568,4 \pm 41,80$ μ g/mg de tecido; CAT: $108 \pm 11,45$ U/mg de proteína; SOD: $94,48 \pm 11,09$ U/mg de proteína; NO: $90,06 \pm 10,84$ μ M; MDA: $12,84 \pm 2,54$ nmol/g de tecido) (Fig. 22).

Figura 22 - Efeito do tratamento com McLTP_1 nos níveis teciduais de MDA, NO, SOD, CAT, GSH na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.



Os valores representam concentração de marcadores de estresse oxidativo MDA, Nitrito e antioxidante, GSH, SOD e CAT mensurados na bexiga de camundongos após a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida e tratado com McLTP_1 ou mesna. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. ($n=8$). # $p<0,05$ em relação ao grupo salina e * $p<0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas ifosfamida. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a proteína é um potencial uroprotetor ao tratamento quimioterápico com ifosfamida que evolui com cistite hemorrágica, tendo em vista seu potencial anti-inflamatório e antioxidante através da atenuação do edema e hemorragia, ao reduzir citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-33) e modular positivamente a citocina anti-inflamatória IL-10. Bem como atuou na inibição da expressão de importantes fatores de transcrição como NF-kB, enzima COX-2, iNOS e macrófago F4/80. Além disso, reduziu marcadores de estresse oxidativo, MDA e nitrito, e ainda foi capaz de aumentar a atividade antioxidante através da supra regulação das enzimas, SOD, catalase e GSH.

O modelo de cistite hemorrágica por oxazafosforinas foi padronizado por Lima e colaboradores (1994) através da administração ciclofosfamida em camundongos Swiss fêmeas. Os resultados sugeriram que após 12 horas da administração foi possível obter melhor atividade inflamatória. Posteriormente, a indução por ifosfamida passou a ser realizada, uma vez que foi evidenciado que a cistite hemorrágica é mais frequente em pacientes sob uso desse antineoplásico (RIBEIRO et al., 2012; ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006). Semelhante a ciclofosfamida, o maior pico inflamatório foi na dose 400 mg/kg e 12h após sua administração. Diante disso, escolhemos realizar os experimentos com a indução por ifosfamida.

Os estudos com McLTP₁ descritos na literatura já evidenciam sua atividade anti-inflamatória e antioxidante em diferentes modelos pré-clínicos de nocicepção, mucosite intestinal por irinotecano, atividade antimicrobiana e protetora sobre a sepse, nefroproteção e gastroprotetora. Diante disso, a proteína foi considerada um potencial uroprotetor a ser investigado (DO CARMO et al., 2022, 2022; MARINHO et al., 2020; NOGUEIRA et al., 2022; SOUZA et al., 2018).

Apesar das evidências promissoras com o uso do noni, vale destacar que há relatos de toxicidade relacionados ao seu indiscriminado. Shalan e colaboradores (2017) mostraram que o consumo crônico do fruto do noni em grande quantidade pode causar perda de peso, hepatotoxicidade e até mortalidade em camundongos. No entanto, a não recomendação ao uso do noni veio após relatos de hepatotoxicidade em humanos. Stadlbauer e colaboradores (2005) relataram dois casos em que

apresentam hepatotoxicidade relacionados ao consumo de suco do noni. Um deles após ter consumido 1,5 litros de suco nas três semanas anteriores a insuficiência hepática aguda. E a segunda paciente consumiu dois litros de suco resultando em aumento das transaminases, normalizando após suspensão do uso. Andrada e colaboradores (2007) descreveram um relato de caso em que a paciente apresentou dor abdominal, icterícia leve, náuseas e vômito, além de bilirrubina e transaminases elevadas, associadas ao consumo de um preparo de ervas com noni há duas semanas. Os testes de toxicidade descritos na literatura ainda são controversos, demonstrando a necessidade de investigações aprofundadas (LÓPEZ-CEPERO ANDRADA et al., 2007; MOHAMAD SHALAN; MUSTAPHA; MOHAMED, 2017; STADLBAUER et al., 2005).

Um estudo piloto foi realizado através administração de McLTP_1 nas doses de 10, 20 ou 40 mg/kg via intraperitoneal três dias antes, quatro e oito horas após a administração de ifosfamida com a finalidade de avaliar parâmetros macroscópicos, inflamatórios basilares e escolha da melhor dose. O uso profilático foi baseado em estudos recentes que evidenciaram que o pré-tratamento com produtos naturais e sintéticos de três a dez dias antes da indução do modelo de cistite hemorrágica por oxazafosforinas, apresentaram efeito uroprotetor (BARUT et al., 2019; SHERIF et al., 2016; WRÓBEL et al., 2017). Além disso, também foi aplicado um grupo tratado com mesna (80 mg/kg; i.p.) por ser a droga utilizada atualmente por pacientes em tratamento com oxazafosforinas (DECHANT et al., 1991).

A primeira medida avaliada foi do peso úmido vesical, método usado para quantificar a formação do edema, onde todas as doses aplicadas de McLTP_1 reduziram esse parâmetro. No entanto, os critérios macroscópicos de Gray evidenciaram que apenas a menor dose (10mg/kg) foi capaz de reduzir o edema e a hemorragia, quando comparado ao grupo tratado apenas com ifosfamida, que foram caracterizadas pela presença de edema moderado a severo, corroborando a análise do peso úmido vesical. Além disso, houve presença de hemorragia acompanhada de coágulos intravesicais e hematomas na mucosa após tratamento com ifosfamida.

A partir da instauração da inflamação na bexiga foi mensurada a atividade da enzima mieloperoxidase, presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, como forma indireta de determinar a infiltração neutrofílica (DORNELAS-FILHO et al., 2018). A ifosfamida aumentou os níveis de MPO no tecido, sendo reduzida significativamente

após o tratamento com McLTP₁ na dose de 10 mg/kg. Nossos achados estão de acordo com estudos anteriores, em que McLTP₁ (8mg/kg) reduziu a atividade de MPO no duodeno de camundongos submetidos a mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico irinotecano (DO CARMO et al., 2022).

Diante dos resultados descritos acima foi escolhida a menor dose de proteína (10 mg/kg) para dar continuidade aos experimentos seguintes. A formação de edema e hemorragia foram avaliados de forma quantitativa através da mensuração do aumento da permeabilidade vascular por Azul de Evans e dosagem de hemoglobina na bexiga. McLTP₁ reduziu a permeabilidade vascular e conseqüentemente liberação de fluidos ligados a proteínas (albumina) do sangue para os tecidos, bem como os níveis de hemoglobina na bexiga. Os dados obtidos corroboraram Souza (2017) que observaram esse efeito na permeabilidade vascular aplicado ao modelo de cistite hemorrágica por ifosfamida após tratamento com uma proteína isolada de *Moringa oleífera*, Mo-CBP₄ (SOUSA, 2017).

A formação do edema e hemorragia após tratamento com ifosfamida foram confirmados na análise histológica, onde o tratamento com o quimioterápico resultou em apagamento das dobras habituais da mucosa em decorrência do edema submucoso, hemorragia transmural, congestão vascular, infiltrado inflamatório e desnudação urotelial após 12 horas da sua administração, sendo essas alterações atenuadas após tratamento com McLTP₁. A proteína destacou-se pela preservação do urotélio e controle da hemorragia. O edema persistente, nesse caso, ocorre possivelmente pelas proteínas de junção que podem seguir alteradas pela acroleína, o que corrobora com os achados histológicos e redução parcial o peso úmido vesical. Diante disso, realizou-se a mensuração da espessura do urotélio a fim de confirmar a preservação do tecido vesical, onde McLTP₁ e mesna apresentaram medidas semelhantes aos animais saudáveis.

A cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas é caracterizada pelo extravasamento maciço de hemácias maduras e reticulócitos, marcada pela presença de hematúria. Este parâmetro foi abordado quantitativamente pela mensuração da hemoglobina tecidual, que é diretamente proporcional às rupturas vasculares no dano vesical causado pela ifosfamida (BHATIA et al., 2008). Além disso, os focos hemorrágicos podem ser evidenciados na coloração de Mallory, onde os mesmos apresentavam-se na cor vermelha, sendo essa reduzida significativamente após o

tratamento com a proteína. Os resultados obtidos neste estudo mostram que o McLTP_1 exerceu efeito protetor contra hemorragia vesical por prevenir a hemorragia. Essa proteção pode ser devido à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias na bexiga que reduzem a produção de peroxinitrito (OZGUVEN et al., 2014).

O efeito urotóxico da acroleína leva a progressão do dano urotelial estimulando a inflamação no tecido conjuntivo e células epiteliais, além da migração de macrófagos, liberando citocinas inflamatórias ao local da lesão. A proteína F4/80 tem sido amplamente utilizada como marcador de macrófagos, e estudos prévios evidenciaram o envolvimento desse importante marcador no modelo de cistite hemorrágica, onde a ciclofosfamida aumentou acentuadamente infiltração de macrófagos na bexiga urinária (MARTINS et al., 2012). No presente estudo, McLTP_1 foi capaz de reduzir a marcação para F4/80 no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

As vias STAT3 e NF- κ B, ambos os principais ativadores da cascata da inflamação e resposta imune através da tríade IL-1 β / TNF- α /IL-6, foram reguladas positivamente após o tratamento com ifosfamida (MBANEFO et al., 2018). O fator nuclear κ B (NF- κ B) é uma proteína que desempenha um papel crítico como mediador de apoptose e inflamação, após ativado, amplifica a liberação de fatores pró-inflamatórios como citocinas e enzimas (LIU et al., 2017). NF- κ B possui duas subunidades p50 e RelA/p65 que ficam no citoplasma ligadas a uma proteína inibidora, I κ B. Ao serem ativadas, as I κ Bs são fosforiladas, ubiquitinadas e por vezes degradadas. Com isso, NF- κ B é translocado para o núcleo, onde otimiza a transcrição de genes específicos que regulam as respostas inflamatórias (COURTOIS; GILMORE, 2006). O envolvimento dessa proteína na cistite hemorrágica foi demonstrado após indução do modelo com ciclofosfamida em ratos, participando como um importante mediador inflamatório (TRIPATHI; JENA, 2010). Nesse estudo, a ifosfamida aumentou a expressão de NF- κ B e McLTP_1 foi capaz de reduzir significativamente sua imunomarcação nuclear.

A translocação de NF κ B para o núcleo leva ao aumento da expressão de iNOS e COX-2 (DINARELLO, 2011). A COX-2 é uma importante enzima que orchestra a cascata do ácido araquidônico, provocando a formação de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano, sendo a isoforma mais expressa nos processos de

inflamação e hiperalgisia (DUBOIS et al., 1998). Além disso é um potente mediador pró-inflamatório que estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6 (LI et al., 2010). No modelo de cistite hemorrágica por ifosfamida foi evidenciado que após a inibição com etorocoxib, inibidor de COX-2, houve redução significativa da PGE₂, reduziu a expressão de COX-2 e de parâmetros macroscópicos e microscópicos. No modelo com administração intravesical de acroleína, obteve redução do peso úmido vesical somente após 12h, nos levando a acreditar que há envolvimento de outros mediadores inflamatórios que ativam a COX-2 (MACEDO et al., 2008a, 2011).

No presente estudo, o tratamento com McLTP₁ reduziu a expressão gênica e a imunomarcagem para COX-2. A redução da expressão dessa enzima pode estar 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.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), tem seu envolvimento investigado em muitos estudos ao longo do tempo. Essa citocina é comumente conhecida por regular funções como diferenciação, proliferação e apoptose celular, além de orquestrar a cascata de citocinas em doenças inflamatórias e participar da ativação da cascata das caspases o que leva a apoptose e ativação do NF- κ B (LOGAN et al., 2007; PARAMESWARAN; PATIAL, 2010).

Ribeiro e colaboradores (2002) mostraram que no modelo de cistite hemorrágica, o tratamento com talidomida, um ativador da degradação do mRNA de TNF- α , reduziu as alterações histológicas e do edema. Posteriormente, Leite e colaboradores (2015) realizaram um tratamento com um anticorpo anti-TNF- α (infliximabe), em animais *knockout* para TNFR1 (receptor de TNF), em ambos modelos experimentais foi evidenciado a inibição do edema vesical e hiperalgisia. No presente estudo mostramos que McLTP₁ reduziu a imunomarcagem para TNF- α .

A citocina pró-inflamatória, IL-1 β , também está envolvida na patogênese da cistite hemorrágica por oxazafosforinas, estando expressa nas células epiteliais e subepiteliais da bexiga (MACEDO et al., 2011). Em nosso estudo, McLTP₁ foi capaz de modular essa citocina crucial da cascata inflamatória. Corroborando esse dado, a

proteína foi capaz de reduzir TNF- α e IL-1 β no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos (CAMPOS et al., 2017).

A interleucina pró-inflamatória IL-6, componente da tríade de ativação de NF κ B, é estimulada por diversas células, dentre elas, células endoteliais, fibroblastos, monócitos e macrófagos. Na patogênese da cistite hemorrágica, IL-6 atingiu o pico de atividade 6 horas após a indução, sendo reduzida de forma tempo dependente, indicando que os fibroblastos são os responsáveis por sua liberação (NISHII et al., 2006). IL-6 também possui a capacidade de regular a ativação de iNOS na bexiga urinária sob condição inflamatória induzida por acroleína (WANG et al., 2013). Seu envolvimento no processo inflamatório está ligado à sinalização de proteína quinase ativada pelo mitógeno p38 e via c-jun ativada por NF- κ B (FIELDING et al., 2008; GABAY, 2006). McLTP₁ foi capaz de modular essa citocina no presente estudo.

A lesão da bexiga também pode ativar mastócitos adjacentes através da liberação da citocina pró-inflamatória IL-33, membro da família da IL-1, que atua como uma alarmina liberada por células endoteliais, epiteliais e musculatura lisa. A ativação dos mastócitos é um dos papéis primários da IL-33 e os induz a liberar mediadores pró-inflamatórios e propagar respostas inflamatórias (JANG; KIM, 2015; TSAI et al., 2017). A principal atividade funcional da IL-33 ocorre através da interação com o seu receptor específico ST2, que estimula a diferenciação das células auxiliares TCD4⁺ a um fenótipo CD4 + Th2. Porém, a IL-33 pode estimular a diferenciação CD4⁺ Th1 por um mecanismo dependente de IL-12 e ST2 (AFFERNI et al., 2018; GORBACHEVA; MITKIN, 2019).

O eixo de ativação de mastócitos e IL-33 foi o mecanismo central na inflamação e dor da bexiga induzida por LL-37 no modelo de cistite intersticial murina (JENSEN et al., 2018). Enquanto que, o envolvimento dessa citocina especificamente em modelo de cistite hemorrágica foi demonstrado de forma inédita em nosso estudo, onde ifosfamida aumentou sua expressão gênica e McLTP₁ foi capaz de modular a liberação de IL-33.

Uma citocina também capaz de modular o processo inflamatório é a IL-4, tendo demonstrado que 4 horas após indução da cistite por ciclofosfamida houve aumento significativo no mRNA, que persistiu 48 horas depois, semelhante ao encontrado após tratamento com ifosfamida (MALLEY; VIZZARD, 2002). Corroborando com os achados do presente estudo, onde ifosfamida aumentou a expressão gênica de IL-4,

sendo reduzida significativamente por McLTP_1 . Contudo, Macedo e colaboradores investigaram sua atividade após administração da citocina de forma exógena, onde esse tratamento foi capaz de atenuar a resposta inflamatória à ifosfamida, constatada pela diminuição de edema e hemorragia. Além disso, em camundongos *knockout* e após antissoro contra IL-4 em animais selvagens, houve potencialização do efeito inflamatório, demonstrado após aumento de $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β e expressão de iNOS e COX-2 (MACEDO et al., 2012).

A citocina anti-inflamatória IL-10 controla os processos inflamatórios ao suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, como também células apresentadoras de antígeno, neutrófilos, moléculas co-estimulatórias de monócitos/macrófagos e células T. Estudos *in vitro* demonstraram que IL-10 suprime citocinas pró-inflamatórias derivadas de macrófagos, tais como $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12. Clarke e colaboradores (1998) acreditam que IL-10 atenua a expressão do receptor de $\text{TNF-}\alpha$ e medeia os efeitos anti-inflamatórios por meio da inibição do fator de transcrição NF-kB (ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003; CLARKE et al., 1998). Associado à redução de citocinas pró-inflamatórias, McLTP_1 foi capaz de aumentar da síntese de IL-10, ratificando a contribuição desta proteína na modulação do processo inflamatório. Corroborando o nosso estudo, McLTP_1 aumentou IL-10 no modelo lesão gástrica induzida por etanol (NOGUEIRA et al., 2022).

Um importante mediador da cascata inflamatória e oxidante da cistite hemorrágica por ifosfamida é o óxido nítrico (NO), radical livre reativo que está envolvido na inflamação aguda e crônica, conhecido inicialmente pelo seu potencial vasodilatador. Sua síntese ocorre a partir da L-arginina com a formação de quantidades estequiométricas de L-citrulina, por três isoformas de NO sintase (NOS): NOS endotelial, NOS neuronal e iNOS (KORHONEN et al., 2005; MARTÍNEZ-RUIZ; CADENAS; LAMAS, 2011). A iNOS possui ação citotóxica e citostática atuando no combate a micro-organismos, parasitas e até células tumorais (BECKMAN; AMES, 1997; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Souza-Filho et al. (1997) demonstraram envolvimento da iNOS na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida. Gomes et al. (1995) mostraram que a indução da iNOS no urotélio é dependente da produção de IL-1 β e $\text{TNF-}\alpha$, uma vez que soro contra estas citocinas reduziram a expressão de iNOS (GOMES et al., 1995; SOUZA-FIHO et al., 1997).

A expressão de iNOS também é estimulada por NF- κ B levando ao aumento na formação de NO (SZABÓ; BILLIAR, 1999). Posteriormente, o envolvimento de COX-2 e a subsequente produção de prostaglandina foram intimamente relacionados com a geração de radicais NO (PANG; HOULT, 1997; POSADAS et al., 2000). Portanto, agentes que inibem NF- κ B, resultando em diminuição da expressão de iNOS e COX-2 e geração de NO, podem ter efeitos terapêuticos no presente modelo. Diante disso, demonstramos que McLTP₁ foi capaz de reduzir a expressão gênica de iNOS quando comparado ao grupo tratado apenas com ifosfamida. No modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano, McLTP₁ também foi capaz de reduzir a imunomarcagem para NF κ B, COX-2 e iNOS (DO CARMO et al., 2022).

Além da atividade inflamatória, o estresse oxidativo participa da patogênese da cistite hemorrágica. A peroxidação lipídica foi observada após administração de oxazafosforinas através do aumento do malonaldeído na bexiga, como também a *downregulation* de agentes antioxidantes (GSH, SOD e CAT), revelando o dano oxidativo. Nesse estudo o tratamento com McLTP₁ reduziu MDA de forma significativa, comparado aos animais tratados com ifosfamida, apenas.

A defesa antioxidante ocorre através das enzimas antioxidantes glutathione, catalase e SOD, com função sobretudo no combate a propagação dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (BALMUS et al., 2016).

Batista e colaboradores (2007) relataram que a glutathione, potente antioxidante que age contra espécies reativas de oxigênio, inibiu o aumento no peso úmido vesical, edema, hemorragia e escores histopatológicos caracterizados por edema, infiltração de leucócitos, hemorragia, dano urotelial intenso e deposição de fibrina induzidos pela ifosfamida de forma dose dependente. Além disso, quando administrada sistemicamente ou via intravesical também promoveu uroproteção no modelo de cistite hemorrágica por administração intravesical de acroleína (BATISTA et al., 2007).

No presente estudo, observamos a redução significativa da glutathione em animais com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Enquanto que após o tratamento com McLTP₁ houve um aumento desse agente antioxidante. Corroborando esse estudo, a proteína apresentou atividade antioxidante no modelo de nefrotoxicidade induzida por gentamicina em ratos (MARINHO et al., 2020).

Nossos resultados confirmam o efeito protetor a partir de uma atividade antioxidante de McLTP₁, pois foi capaz de aumentar a atividade de SOD e catalase em camundongos com cistite hemorrágica. A função enzimática da SOD resulta na

redução de ROS e RNS. Dessa forma, o aumento da enzima possivelmente inibirá a formação das espécies reativas de oxigênio.

Evidências indicam que o desequilíbrio da homeostase redox é um gatilho para ativação de cascatas pró-inflamatórias. A liberação de espécies reativas de oxigênio mediada pelo estresse oxidativo e a consequente peroxidação lipídica exercida concomitantemente ao dano inflamatório na bexiga ativam a cascata inflamatória via NF- κ B e iNOS (FAMUREWA et al., 2021). O NF- κ B especificamente é sensível a ROS que sinaliza as citocinas inflamatórias e aumenta expressão de genes apoptóticos por meio de sua translocação para o núcleo (CHEN et al., 2019). Bem como, o aumento da atividade de iNOS leva à produção excessiva de NO na bexiga, conduzindo o mesmo a reagir com íons superóxido para produzir peroxinitrito, levando a uma produção sustentada de ROS (AKTAN, 2004).

De acordo com os resultados apresentados acima, McLTP₁ foi capaz de controlar o edema representado pela redução do peso úmido vesical e extravasamento do Azul de Evans; reduzir a hemorragia, pelo escore, absorção de hemoglobina e coloração de Mallory; como também atuou na redução de importantes marcadores inflamatórios e produziu atividade antioxidante. Reforçando o papel importante dessa proteína na atividade anti-inflamatória e na redução do estresse oxidativo causado pela ifosfamida. Sendo assim, McLTP₁ será capaz de tornar-se um biofármaco promissor para profilaxia da cistite hemorrágica de forma pioneira da classe das LTPs (Fig. 23).

7. CONCLUSÃO

A proteína isolada das sementes de *Morinda citrifolia* L., McLTP₁, demonstrou potencial uroprotetor no modelo de cistite hemorrágica por ifosfamida ao reduzir edema e hemorragia, preservar a morfologia do urotélio, modular a atividade inflamatória através da redução de citocinas, enzimas e fatores de transcrição envolvidos na fisiopatologia da cistite. Além disso, reduziu o estresse oxidativo e promoveu o aumento da atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ABU, N. et al. Subchronic toxicity, immunoregulation and anti-breast tumor effect of Nordamnacantal, an anthraquinone extracted from the stems of *Morinda citrifolia* L. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 31, 27 jan. 2018.
- AFFERNI, C. et al. The Pleiotropic Immunomodulatory Functions of IL-33 and Its Implications in Tumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.
- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, v. 75, n. 6, p. 639–653, 25 jun. 2004.
- ALI, S. A. et al. Comparison of uroprotective activity of reduced glutathione with Mesna in Ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 46, n. 1, p. 105–108, 2014.
- ALVES-FILHO, J. C. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 2, p. 461–470, fev. 2006.
- ARAFI, H. M. M. Uroprotective effects of curcumin in cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis paradigm. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, n. 5, p. 393–399, maio 2009.
- ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 241–269, jun. 2003.
- BALMUS, I. M. et al. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical aspects and animal models. **Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 22, n. 1, p. 3–17, fev. 2016.
- BARUT, E. N. et al. Uroprotective effect of ambroxol in cyclophosphamide-induced cystitis in mice. **International Urology and Nephrology**, v. 51, n. 5, p. 803–810, maio 2019.
- BATISTA, C. K. L. P. et al. A model of hemorrhagic cystitis induced with acrolein in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 39, n. 11, p. 1475–1481, nov. 2006.
- BATISTA, C. K. L. P. et al. Amifostine and glutathione prevent ifosfamide- and acrolein-induced hemorrhagic cystitis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 71–77, jan. 2007.
- BATISTA, J. A. et al. Polysaccharides derived from *Morinda citrifolia* Linn reduce inflammatory markers during experimental colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 248, p. 112303, 10 fev. 2020.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1 nov. 1971.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. Oxidative decay of DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 32, p. 19633–19636, 8 ago. 1997.

BHATIA, K. et al. Protective effect of S-allylcysteine against cyclophosphamide-induced bladder hemorrhagic cystitis in mice. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 11, p. 3368–3374, nov. 2008.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–209, mar. 1982.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BROCK, N. The history of the oxazaphosphorine cytostatics. **Cancer**, v. 78, n. 3, p. 542–547, 1 ago. 1996.

BROSSARD, C. et al. Molecular Mechanisms and Key Processes in Interstitial, Hemorrhagic and Radiation Cystitis. **Biology**, v. 11, n. 7, p. 972, 28 jun. 2022.

CAMPOS, D. C. O. et al. First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 71–79, maio 2016.

CAMPOS, D. C. O. et al. *Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1 exhibits anti-inflammatory activity by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1121–1129, out. 2017.

CARVALHO, A. DE O.; GOMES, V. M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—A concise review. **Peptides**, v. 28, n. 5, p. 1144–1153, 1 maio 2007.

CHAN-BLANCO, Y. et al. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, Biodiversity and nutrition: a common path. v. 19, n. 6, p. 645–654, 1 set. 2006.

CHEN, J. C. et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi**, v. 99, n. 3, p. 213–218, mar. 2000.

CHEN, M. et al. The involvement of DAMPs-mediated inflammation in cyclophosphamide-induced liver injury and the protection of liquiritigenin and liquiritin. **European Journal of Pharmacology**, v. 856, p. 172421, 5 ago. 2019.

CLARKE, C. J. et al. IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 5, p. 1719–1726, maio 1998.

COSTA, A. S. Avaliação da estabilidade e da toxicidade pré-clínica de uma proteína isolada de sementes de noni (*Morinda citrifolia* L.), como etapas preliminares para seu uso terapêutico em humanos. 2016.

COURTOIS, G.; GILMORE, T. D. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6831–6843, 30 out. 2006.

CRAIK, D. J. et al. The future of peptide-based drugs. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, n. 1, p. 136–147, jan. 2013.

CRUZ-SÁNCHEZ, N. G. D. L. et al. Antibacterial activity of *Morinda citrifolia* Linneo seeds against Methicillin-Resistant *Staphylococcus* spp. **Microbial Pathogenesis**, p. 347–353, 1 mar. 2019.

DALY, D. M. et al. The afferent system and its role in lower urinary tract dysfunction. **Current Opinion in Urology**, v. 21, n. 4, p. 268–274, jul. 2011.

DECHANT, K. L. et al. Ifosfamide/mesna. A review of its antineoplastic activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cancer. **Drugs**, v. 42, n. 3, p. 428–467, set. 1991.

DENG, S. et al. Noni as an anxiolytic and sedative: a mechanism involving its gamma-aminobutyric acid effects. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 14, n. 7–8, p. 517–522, ago. 2007.

DIETRICH, F. 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, p. e0131882, 2015.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720–3732, 7 abr. 2011.

DINGMAN, R.; BALU-IYER, S. V. Immunogenicity of Protein Pharmaceuticals. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 108, n. 5, p. 1637–1654, maio 2019.

DO CARMO, L. D. et al. Therapeutic effects of a lipid transfer protein isolated from *Morinda citrifolia* L. (noni) seeds on irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 1 jul. 2022.

DOBREK, Ł.; BARANOWSKA, A.; THOR, P. J. The influence of oxazaphosphorines alkylating agents on autonomic nervous system activity in rat experimental cystitis model. **Acta Polonae Pharmaceutica**, v. 70, n. 6, p. 1097–1105, dez. 2013.

DORNELAS-FILHO, A. F. et al. Neutrophils contribute to the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide. **International Immunopharmacology**, v. 62, p. 96–108, 1 set. 2018.

DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H. SPECTROPHOTOMETRIC STUDIES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 51–65, dez. 1935.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421–431, 1990.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343–350, 2003.

EKAMBARAM, R. et al. Design and fabrication of electrospun *Morinda citrifolia*-based nanofibrous scaffold as skin wound dressing material: in vitro and in silico analysis. **Biomedical Materials (Bristol, England)**, v. 16, n. 4, 13 abr. 2021.

ELIAS, A. D. et al. High-dose ifosfamide with mesna uroprotection: a phase I study. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 8, n. 1, p. 170–178, jan. 1990.

FAMUREWA, A. C. et al. Downregulation of redox imbalance and iNOS/NF- κ B/caspase-3 signalling with zinc supplementation prevents urotoxicity of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Life Sciences**, v. 266, p. 118913, 1 fev. 2021.

FERREIRA, F. C. S. Propriedades uroprotetoras dos compostos [6]-, [8]- e [10]-gingerol isolados do *Zingiber officinale* na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos. 13 dez. 2017.

FISCHER, R. et al. Plant-based production of biopharmaceuticals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 2, p. 152–158, 1 abr. 2004.

FUKUOKA, M. et al. Placebo-controlled double-blind comparative study on the preventive efficacy of mesna against ifosfamide-induced urinary disorders. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 117, n. 5, p. 473–478, 1991.

FURLANUT, M.; FRANCESCHI, L. Pharmacology of ifosfamide. **Oncology**, v. 65 Suppl 2, p. 2–6, 2003.

GANGIREDDY, M.; NOOKALA, V. Ifosfamide. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

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

GOMES, T. N. et al. Participation of TNF- α and IL-1 in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 28, n. 10, p. 1103–1108, out. 1995.

GONÇALVES, R. L. G. et al. Correction to: α -Phellandrene attenuates tissular damage, oxidative stress, and TNF- α levels on acute model ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 12, p. 2553–2554, dez. 2020.

GORBACHEVA, A. M.; MITKIN, N. A. [Interleukin-33: Friend or Enemy in the Fight against Tumors?]. **Molekuliarnaia Biologiia**, v. 53, n. 5, p. 774–789, 2019.

GOSWAMI, D. et al. MS-based conformation analysis of recombinant proteins in design, optimization and development of biopharmaceuticals. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 144, p. 134–151, 15 jul. 2018.

GRAY, K. J. et al. Evaluation of Misoprostol Cytoprotection of the Bladder with Cyclophosphamide (Cytoxan) Therapy. **The Journal of Urology**, v. 136, n. 2, p. 497–500, 1 ago. 1986.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, out. 1982.

GUPTA, K. et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, n. 5, p. e103-120, 1 mar. 2011.

HALDAR, S.; DRU, C.; BHOWMICK, N. A. Mechanisms of hemorrhagic cystitis. **American Journal of Clinical and Experimental Urology**, v. 2, n. 3, p. 199–208, 2 out. 2014.

INADA, A. C. et al. Therapeutic Effects of Morinda citrifolia Linn. (Noni) Aqueous Fruit Extract on the Glucose and Lipid Metabolism in High-Fat/High-Fructose-Fed Swiss Mice. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. 3439, 10 nov. 2020.

J, C. et al. Scoping Review and Meta-analysis of Hyperbaric Oxygen Therapy for Radiation-Induced Hemorrhagic Cystitis. **Current urology reports**, v. 19, n. 6, 13 abr. 2018.

JANG, T. Y.; KIM, Y. H. Interleukin-33 and Mast Cells Bridge Innate and Adaptive Immunity: From the Allergologist's Perspective. **International Neurourology Journal**, v. 19, n. 3, p. 142–150, set. 2015.

JENSEN, M. M. et al. IL-33 Mast Cell Axis is Central in LL-37 Induced Bladder Inflammation and Pain in a Murine Interstitial Cystitis Model. **Cytokine**, v. 110, p. 420–427, out. 2018.

KADER, J.-C. Lipid-Transfer Proteins in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 627–654, 1996.

KAMIYA, K. et al. Chemical constituents of Morinda citrifolia roots exhibit hypoglycemic effects in streptozotocin-induced diabetic mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 5, p. 935–938, maio 2008.

KATERJI, M.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1279250, 2019.

KERBUSCH, T. et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ifosfamide and its metabolites. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 1, p. 41–62, jan. 2001.

KIM, S. H. et al. Diallyl Disulfide Prevents Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis in Rats through the Inhibition of Oxidative Damage, MAPKs, and NF- κ B Pathways. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 23, n. 2, p. 180–188, mar. 2015.

KORHONEN, R. et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current Drug Targets. Inflammation and Allergy**, v. 4, n. 4, p. 471–479, ago. 2005.

KUMAR, J.; GUDHOOR, M.; GANACHARI, M. S. Parallel Assessment of Chemotherapy Adherence and Supportive Therapy Adherence on Occurrence and Minimization of Adverse Drug Reactions Among Cancer Patients: A Clinical-Based Observational Study. **The Journal of Pharmacy Technology : jPT : Official Publication of the Association of Pharmacy Technicians**, v. 36, n. 2, p. 72–77, abr. 2020.

KUSTIARINI, D. A. et al. Effects of Morinda citrifolia on Rheumatoid Arthritis in SKG Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 496–500, 2019.

LAWSON, M. et al. Urological implications of cyclophosphamide and ifosfamide. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v. 42, n. 4, p. 309–317, 2008.

LEADER, B.; BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 21–39, jan. 2008.

LEE, G.; ROMIH, R.; ZUPANČIČ, D. Cystitis: From Urothelial Cell Biology to Clinical Applications. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 473536, 2014.

LEITE, C. A. V. G. et al. Target Inhibition of IL-1 Receptor Prevents Ifosfamide Induced Hemorrhagic Cystitis in Mice. **The Journal of Urology**, v. 194, n. 6, p. 1777–1786, dez. 2015.

LEWIS, S. A. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 278, n. 6, p. F867-874, jun. 2000.

LI, F. et al. Comparative metabolism of cyclophosphamide and ifosfamide in the mouse using UPLC-ESI-QTOFMS-based metabolomics. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 7, p. 1063–1074, 1 out. 2010.

LI, X. et al. MicroRNAs Involved in the Therapeutic Functions of Noni (Morinda citrifolia L.) Fruit Juice in the Treatment of Acute Gouty Arthritis in Mice Induced with Monosodium Urate. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 7, p. 1638, 15 jul. 2021.

LIMA, M. V. A. et al. Histological changes in bladders of patients submitted to ifosfamide chemotherapy even with mesna prophylaxis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 643–650, 1 abr. 2007.

LIN, Y.-L. et al. Hypolipidemic and antioxidative effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on high-fat/cholesterol-dietary hamsters. **Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 67, n. 3, p. 294–302, set. 2012.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, p. 17023, 2017.

LOGAN, R. M. et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 5, p. 448–460, ago. 2007.

LOHANI, M. et al. Immunomodulatory actions of a Polynesian herb Noni (*Morinda citrifolia*) and its clinical applications. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 47, p. 102206, dez. 2019.

LÓPEZ-CEPERO ANDRADA, J. M. et al. Hepatotoxicidad grave asociada al consumo de Noni (*Morinda citrifolia*). **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 99, n. 3, p. 179–181, mar. 2007.

LUTIF, C. C. Caracterização bioquímica e avaliação das atividades citotóxica e alergênica de uma proteína transferidora de lipídeos isolada de sementes de *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). 2015.

MACEDO, F. Y. B. et al. Cyclooxygenase-2 expression on ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 134, n. 1, p. 19–27, jan. 2008a.

MACEDO, F. Y. B. et al. Induction of COX-2 expression by acrolein in the rat model of hemorrhagic cystitis. **Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie**, v. 59, n. 6, p. 425–430, abr. 2008b.

MACEDO, F. Y. B. et al. Cyclooxygenase-2 contributes to functional changes seen on experimental hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide in rat urinary bladder. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 935–943, abr. 2011.

MACEDO, F. Y. B. et al. Interleukin-4 modulates the inflammatory response in ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 297–307, fev. 2012.

MAEHLY, A. C.; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 1, p. 357–424, 1954.

MAHATTANADUL, S. et al. Effects of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 243–250, 24 mar. 2011.

MAJHAIL, N. S. et al. Phase I trial of continuous infusion recombinant human interleukin-4 in patients with cancer. **Investigational New Drugs**, v. 22, n. 4, p. 421–426, nov. 2004.

MALLEY, S. E.; VIZZARD, M. A. Changes in urinary bladder cytokine mRNA and protein after cyclophosphamide-induced cystitis. **Physiological Genomics**, v. 9, n. 1, p. 5–13, 2002.

MANK, A. et al. Monitoring Hyperhydration during High-Dose Chemotherapy: Body Weight or Fluid Balance? **Acta Haematologica**, v. 109, n. 4, p. 163–168, 2003.

MARINHO, A. D. et al. Protective Effects Of A Lipid Transfer Protein Isolated from *Morinda citrifolia* Seeds in Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 4, p. 568–576, 1 ago. 2020.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; CADENAS, S.; LAMAS, S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 1, p. 17–29, 1 jul. 2011.

MARTINS, J. et al. The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 1, p. 183–196, jan. 2012.

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

MEDEIROS, K. S. et al. Impact of mobile applications on adherence to cancer treatment: a systematic review and meta-analysis protocol. **BMJ Open**, v. 9, n. 11, p. e027246, 7 nov. 2019.

MOHAMAD SHALAN, N. A. A.; MUSTAPHA, N. M.; MOHAMED, S. Chronic toxicity evaluation of *Morinda citrifolia* fruit and leaf in mice. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 83, p. 46–53, fev. 2017.

MOTA, J. M. et al. Re: Interleukin-11 attenuates ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **International braz j urol**, v. 33, p. 852–853, dez. 2007.

MOURÃO, L. T. C. Envolvimento de óxido nítrico e de canais de potássio dependentes de ATP no efeito protetor da amifostina sobre as alterações motoras funcionais e inflamatórias da cistite hemorrágica induzida por Ifosfamida. 2012.

MURATA, K. et al. Anti-allergic activity of the *Morinda citrifolia* extract and its constituents. **Pharmacognosy Research**, v. 6, n. 3, p. 260–265, jul. 2014.

NARIMIYA, T. et al. Orthodontic tensile strain induces angiogenesis via type IV collagen degradation by matrix metalloproteinase-12. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, n. 5, p. 842–852, out. 2017.

NAYAK, B. S. et al. Hypoglycemic and Hepatoprotective Activity of Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) in Diabetic Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2011, p. 875293, 2011.

NGUYEN, P.-H. et al. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors from *Morinda citrifolia* (Noni) and their insulin mimetic activity. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 11, p. 2080–2087, 22 nov. 2013.

NISHII, H. et al. Up-regulation of interleukin-6 gene expression in cyclophosphamide-induced cystitis in mice: An in situ hybridization histochemical study. **International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association**, v. 13, n. 10, p. 1339–1343, out. 2006.

NOGUEIRA, F. et al. Peptide Isolated from Noni Seeds Confers Gastroprotective Effect by Improving Inflammation and Oxidative Stress in Mice. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 28, 22 jul. 2022.

OZGUVEN, A. A. et al. Protective effect of ketamine against hemorrhagic cystitis in rats receiving ifosfamide. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 147–151, abr. 2014.

PAN, L.; CHAI, H.-B.; KINGHORN, A. D. Discovery of new anticancer agents from higher plants. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 4, p. 142–156, 1 jan. 2012.

PANG, L.; HOULT, J. R. Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E2 and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 493–500, 21 fev. 1997.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 20, n. 2, p. 87–103, 2010.

POSADAS, I. et al. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 361, n. 1, p. 98–106, jan. 2000.

POTTERAT, O.; HAMBURGER, M. *Morinda citrifolia* (Noni) fruit--phytochemistry, pharmacology, safety. **Planta Medica**, v. 73, n. 3, p. 191–199, mar. 2007.

REDDY, V.; WINSTON, N. R. *Mesna*. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

RIBEIRO, R. et al. **Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches and new insights.** , 8 mar. 2012.

RIBEIRO, R. A. et al. Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β Mediate the Production of Nitric Oxide Involved in the Pathogenesis of Ifosfamide Induced Hemorrhagic Cystitis in Mice. **The Journal of Urology**, v. 167, n. 5, p. 2229–2234, 1 maio 2002.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. et al. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, n. 7, p. 1265–1275, ago. 1995.

SAINI, J.; SHARMA, P. K. Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer. **Current Drug Targets**, v. 19, n. 13, p. 1478–1490, 2018.

SANNU, A. et al. Ifosfamide-Induced Malignancy of Ureter and Bladder. **Cureus**, v. 9, n. 8, p. e1594, 22 ago. 2017.

SCHEEF, W. et al. Controlled clinical studies with an antidote against the urotoxicity of oxazaphosphorines: preliminary results. **Cancer Treatment Reports**, v. 63, n. 3, p. 501–505, mar. 1979.

SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. E263, 16 jan. 2018.

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, 1 jan. 1968.

SHERIF, I. O. et al. Uroprotective effect of oleuropein in a rat model of hemorrhagic cystitis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 74, p. 12–17, maio 2016.

SILVA, L. R. D. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FRUTO DE NONI (Morinda citrifolia L.). p. 4, [s.d.].

SOUSA, K. N. Efeito protetor da lectina de sementes de Moringa oleifera lamarck na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos. 18 dez. 2017.

SOUSA, S. G. et al. Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharide extracted from Morinda citrifolia Linn (Noni). **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 515–523, 1 out. 2018.

SOUZA, A. A. et al. Lipid transfer protein isolated from noni seeds displays antibacterial activity in vitro and improves survival in lethal sepsis induced by CLP in mice. **Biochimie**, v. 149, p. 9–17, jun. 2018.

SOUZA, A. Á. D. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ CENTRO DE CIÊNCIAS DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA. p. 119, 2016.

SOUZA-FIHO, M. V. et al. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **The American Journal of Pathology**, v. 150, n. 1, p. 247–256, jan. 1997.

STADLBAUER, V. et al. Hepatotoxicity of NONI juice: report of two cases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 30, p. 4758–4760, 14 ago. 2005.

SZABÓ, C.; BILLIAR, T. R. Novel roles of nitric oxide in hemorrhagic shock. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 12, n. 1, p. 1–9, jul. 1999.

- THOMPSON, A. et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of chemical- and radiation-induced cystitis. **Journal of Clinical Urology**, v. 7, p. 25–35, 13 dez. 2013.
- TORRES, M. A. O. et al. One Plant, Many Uses: A Review of the Pharmacological Applications of *Morinda citrifolia*. **Phytotherapy research: PTR**, v. 31, n. 7, p. 971–979, jul. 2017.
- TRIPATHI, D. N.; JENA, G. B. Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF-kappaB during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat. **Journal of Pineal Research**, v. 48, n. 4, p. 324–331, maio 2010.
- TSAI, W.-H. et al. L-Theanine inhibits proinflammatory PKC/ERK/ICAM-1/IL-33 signaling, apoptosis, and autophagy formation in substance P-induced hyperactive bladder in rats. **Neurourology and Urodynamics**, v. 36, n. 2, p. 297–307, 2017.
- VIEIRA, M. M. et al. Use of dexamethasone with mesna for the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association**, v. 10, n. 11, p. 595–602, nov. 2003.
- VIEIRA, M. M. et al. Ternatin, a flavonoid, prevents cyclophosphamide and ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Phytotherapy research: PTR**, v. 18, n. 2, p. 135–141, fev. 2004.
- WAN OSMAN, W. N. et al. Epicatechin and scopoletin rich *Morinda citrifolia* (Noni) leaf extract supplementation, mitigated Osteoarthritis via anti-inflammatory, anti-oxidative, and anti-protease pathways. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. e12755, mar. 2019.
- WANG, M. Y.; SU, C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 952, p. 161–168, dez. 2001.
- WANI, S. S. et al. Therapeutic Potential of Medicinal Plant Proteins: Present Status and Future Perspectives. **Current Protein & Peptide Science**, v. 21, n. 5, p. 443–487, 2020.
- WIGATI, D. et al. Hypotensive Activity of Ethanolic Extracts of *Morinda citrifolia* L. Leaves and Fruit in Dexamethasone-Induced Hypertensive Rat. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 22, n. 1, p. 107–113, jan. 2017.
- WRÓBEL, A. et al. Rho kinase inhibition ameliorates cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 6, p. 613–619, jun. 2017.
- YASHASWINI*, S. et al. Noni: A new medicinal plant for the tropics. **African Journal of Plant Science**, v. 8, n. 5, p. 243–247, 31 maio 2014.
- YILMAZER, N. et al. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of a Commercial Noni Juice revealed by Carrageenan-induced Paw Edema. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 3, p. 589–595, 1 set. 2016.

ZHANG, J. et al. Exploring and exploiting plant cyclic peptides for drug discovery and development. **Medicinal Research Reviews**, v. 41, n. 6, p. 3096–3117, nov. 2021.

ZHANG, J.; TIAN, Q.; ZHOU, S. Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. 2006.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE
MEDICAMENTOS - NPDM
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**EFEITO PROTETOR DA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE *Morinda Citrifolia* L (McLTP1) NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA EM CAMUNDONGO.**", registrada com o protocolo **23170920-0**, sob a responsabilidade de completo: **Nylane Maria Nunes de Alencar** e **Gisele de Fátima Pinheiro Rangel**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 29 / 10 / 2020.

We hereby certify that the project entitled "**PROTECTIVE EFFECT OF ISOLATED PROTEIN FROM *Morinda Citrifolia* L (McLTP1) SEEDS IN HEMORRHAGIC CYSTITIS INDUCED BY IFOSPHAMIDE IN MICE.**", identified by the protocol number **23170920-0**, and conducted by **Nylane Maria Nunes de Alencar** and **Gisele de Fátima Pinheiro Rangel** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 10 / 29 / 2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: NOVEMBRO/2020 Fim: FEVEREIRO/2023
Espécie	Camundongo isogênico
Linhagem	Balb/c
Nº de animais autorizados	424
Peso	25 - 38g
Idade	6 a 8 semanas
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 03 de novembro de 2020


Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - tel: 55 (85) 3366-8338
Horário de atendimento: Segunda a Sexta, das 09h às 12h e das 13h30 às 18h. Email: ceua-npdm@ufc.br