



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

FABRÍCIO DE LAMARE RAMOS

**Alfa-bisabolol atenua a cistite hemorrágica induzida por
ifosfamida em camundongos**

Fortaleza, CE

2023

FABRÍCIO DE LAMARE RAMOS

**Alfa-bisabolol atenua a cistite hemorrágica induzida por
ifosfamida em camundongos**

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior

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)

- R143a Ramos, Fabrício de Lamare.
Alfa-bisabolol atenua a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos / Fabrício de Lamare Ramos. – 2023.
62 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.
1. Óleo essencial. 2. Quimioterapia. 3. Inflamação . I. Título.

CDD 615.1

FABRÍCIO DE LAMARE RAMOS

**Alfa-bisabolol atenua a cistite hemorrágica induzida por
ifosfamida em camundongos**

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Aprovado em 28 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Francisco de Assis Oliveira
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Fortaleza, CE

2023

Ao meu pai Fábio (*in memoriam*),
que me ensinou que as pessoas amam,
erram, acertam e aprendem
de maneira singular e no seu tempo.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Jorgelina Maria, que citando Milton Nascimento na canção Maria, Maria “é um dom, uma certa magia, uma força que nos alerta” obrigado por ter lutado quando foi preciso para chegarmos aqui.

Ao meu orientador Roberto César, meu exemplo na busca pela excelência na pesquisa, pela confiança, disponibilidade e paciência demonstrada nesse processo.

Ao professor Ronaldo Ribeiro (*in memoriam*), que foi o primeiro que me fez acreditar que era possível.

À professora Deysi Wong, por todo o apoio e palavras de sabedoria em momentos difíceis. À professora Renata Cordeiro, por ter compartilhado seu conhecimento, sua análise criteriosa e ter me levado para a pesquisa através de uma indicação sua, ainda em 2009, durante a graduação.

Aos meus amigos do LAFICA, em especial para as amigas Gisele Pinheiro, Celia Choquenaira, Jussara Rodrigues, Gysele de Iima e Lízias Quintela.

À minha Amiga Aurilene Cajado, que me ensinou muito além, me ensinou sobre a importância de transmitir o conhecimento sempre. Obrigado por todo o afeto nessa jornada.

Às minhas amigas Luane Macedo, Lorena Vieira e Paula Ventura, mulheres pesquisadoras brilhantes que tiveram contribuição com seu apoio e carinho.

Ao meu irmão Nicholas e amigos Rafael, Jardel e Érico, obrigado por todo suporte, auxílio e compreensão durante todo esse período.

Aos meus professores, colegas, alunos e pacientes que me ensinam todos os dias nessa caminhada.

“Loucura é continuar fazendo
sempre a mesma coisa e
esperar resultados diferentes”

(Autor desconhecido)

RESUMO

A cistite hemorrágica (CH) é uma patologia inflamatória da bexiga induzida pela acumulação vesical da acroleína, a qual é gerada a partir da biotransformação de oxazafosforinas, como a ifosfamida e ciclofosfamida. Caracteriza-se pela presença de hematúria, disúria, aumento da frequência e urgência urinária e dor pélvica. Estima-se que 18-40% dos pacientes tratados com ifosfamida apresentem cistite hemorrágica. O alfa-bisabolol (ABIS) é um terpeno da classe sesquiterpeno derivado da camomila (*Matricaria recutita*), uma das principais espécies de vegetais fonte de ABIS. Dentre os efeitos terapêuticos apresentados pelo ABIS pode-se salientar a ação anti-inflamatória. Avaliar a atividade farmacológica do ABIS e estudar seus efeitos anti-inflamatórios sobre a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida (IFO). A cistite foi induzida em camundongos Swiss, machos, com idade de 6 a 8 semanas, pesando entre 20-24g, de com dose única de ifosfamida (IFO). Os animais foram divididos em 5 grupos (n=6/grupo): controle (SF 0,9%, 10 ml/kg, i.p.), IFO (400 mg/kg, i.p.) e grupo de ABIS em três doses (5, 10 e 50 mg/kg, v.o.), sendo administrado uma hora antes da IFO. Após 12 horas da injeção de IFO, os animais foram eutanasiados com altas doses anestésicas. Em seguida, as bexigas foram removidas e pesadas para avaliar o peso úmido vesical (PUV), a análise macroscópica, a histopatológica seguindo critérios de Gray e a permeabilidade vesical, expressão do mRNA de *Il-1 β* , *Il-33* e *Cox-2* por qPCR e F4/80 por imunofluorescência. Para análise estatística foram utilizados os testes ANOVA/Bonferroni ou Kruskal Wallis/Dunn com significância estatística de $p < 0,05$ (parecer de aprovação pela CEUA-UFC nº 68310110222). A IFO aumentou o PUV ($20,45 \pm 1,84$ mg) em comparação com o controle negativo (salina: $8,29 \pm 0,49$ mg). O tratamento com ABIS reduziu o PUV nas três doses supracitadas (5 mg/kg: $16,9 \pm 0,75$; 10 mg/kg: $16,24 \pm 1,20$; 50 mg/kg: $13,96 \pm 1,58$ mg), contudo na análise histopatológica, a dose de 50 mg/kg apresentou proteção significativa. O ABIS (50mg/kg) atenuou de forma significativa ($p < 0,05$) os escores de dano histopatológico 1[1-3], escores macroscópicos de edema (E) e hemorragia (H) (E: 1 [1-2]; H: 1[1-2]); reduziu a permeabilidade vascular quantificada pelo método do azul de Evans ($8,67 \pm 1,85$ μ g/ml,) quando comparado com o grupo IFO (Histopatologia: 2 [2- 3]; E: 2,5 (1-3); H: 2,5(1-3); permeabilidade: $13,37 \pm 2,01$ μ g/ml). Adicionalmente, a injeção de IFO aumentou a expressão de *Il1beta* (SAL: $1,05 \pm 0,17$ vs. IFO: $396,9 \pm 126$), *Il33* (SAL: $1,15 \pm 0,29$ vs. IFO: $15,84 \pm 3,35$) e *Cox2* (SAL: $1,32 \pm 0,43$ vs. IFO: $39,09 \pm 12,21$) ($p < 0,05$). Contudo, o tratamento com ABIS diminuiu a expressão gênica de somente *Il-1 β* ($88,44 \pm 34,54$) e *Il-33* ($9,04 \pm 1,87$, $p < 0,05$), sem interferir na expressão de *Cox2* ($40,27 \pm 14,04$) quando comparado com o grupo IFO. De forma similar, o grupo tratado com ABIS reduziu a quantidade de macrófagos infiltrantes na bexiga, como detectado pela mensuração da imunofluorescência para F4/80 quando comparado ao grupo IFO. O tratamento com alfa-bisabolol atenuou a cistite hemorrágica pela diminuição dos eventos edematogênicos e da resposta inflamatória induzida pela ifosfamida.

Palavras-chave: óleo essencial; quimioterapia; inflamação.

ABSTRACT

Alpha-bisabolol attenuated hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide in mice

Hemorrhagic cystitis (HC) is an inflammatory pathology of the bladder induced by the accumulation of acrolein in the bladder, which is generated from the biotransformation of oxazaphosphorines, such as ifosfamide and cyclophosphamide. It is characterized by the presence of hematuria, dysuria, increased urinary frequency and urgency, and pelvic pain. It is estimated that 18-40% of patients treated with ifosfamide have hemorrhagic cystitis. Alpha-bisabolol (ABIS) is a terpene of the sesquiterpene class derived from chamomile (*Matricaria recutita*), one of the main plant species source of ABIS. Among the therapeutic effects presented by ABIS, the anti-inflammatory action can be highlighted. Evaluate the pharmacological activity of ABIS and study its anti-inflammatory effects on ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis (IFO). Cystitis was induced in male Swiss mice, aged 6 to 8 weeks, weighing between 20-24g, with a single dose of ifosfamide (IFO). The animals were divided into 5 groups (n=6/group): control (SF 0.9%, 10 ml/kg, i.p.), IFO (400 mg/kg, i.p.) and ABIS group in three doses (5, 10 and 50 mg/kg, p.o.), being administered one hour before the IFO. After 12 hours of IFO injection, the animals were euthanized with high anesthetic doses. Then, the bladders were removed and weighed to evaluate the bladder wet weight (UVW), the macroscopic analysis, the histopathological analysis according to Gray's criteria and the bladder permeability, mRNA expression of Il-1 β , Il-33 and Cox-2 by qPCR and F4/80 by immunofluorescence. For statistical analysis, the ANOVA/Bonferroni or Kruskal Wallis/Dunn tests were used with statistical significance of p<0.05 (approval opinion by CEUA-UFC n° 68310110222). IFO increased PUV (20.45 \pm 1.84 mg) compared to the negative control (saline: 8.29 \pm 0.49 mg). ABIS treatment reduced PUV at the three aforementioned doses (5 mg/kg: 16.9 \pm 0.75; 10 mg/kg: 16.24 \pm 1.20; 50 mg/kg: 13.96 \pm 1.58 mg), however, in the histopathological analysis, the dose of 50 mg/kg showed significant protection. ABIS (50mg/kg) significantly attenuated (p<0.05) histopathological damage scores I[1-3], macroscopic edema (E) and hemorrhage (H) scores (E: 1 [1-2]; H: 1[1-2]); reduced vascular permeability quantified by the Evans blue method (8.67 \pm 1.85 μ g/ml,) when compared to the IFO group (Histopathology: 2 [2-3]; E: 2.5 (1-3); H: 2.5(1-3); permeability: 13.37 \pm 2.01 μ g/ml). Additionally, IFO injection increased the expression of Il1beta (SAL: 1.05 \pm 0.17 vs. IFO: 396.9 \pm 126), Il33 (SAL: 1.15 \pm 0.29 vs. IFO: 15.84 \pm 3.35) and Cox2 (SALT: 1.32 \pm 0.43 vs. IFO: 39.09 \pm 12.21) (p< 0.05). However, ABIS treatment decreased the gene expression of only Il-1 β (88.44 \pm 34.54) and Il-33 (9.04 \pm 1.87, p<0.05), without interfering with Cox2 expression (40.27 \pm 14.04) when compared with the IFO group. Similarly, the ABIS-treated group reduced the amount of bladder-infiltrating macrophages, as detected by immunofluorescence measurement for F4/80 when compared to the IFO group. Treatment with alpha-bisabolol attenuated hemorrhagic cystitis by decreasing edematogenic events and the inflammatory response induced by ifosfamide.

Keywords: essential oil; chemotherapy; inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|------|
| Figura 1 - Mecanismo de alquilação da guanina do DNA | p.14 |
| Figura 2 - Estrutura química das oxazafosforinas | p.14 |
| Figura 3 - estrutura química do MESNA | p.17 |
| Figura 4 - Esquema patogênese CH | p.18 |
| Figura 5 - Ilustração da <i>Matricaria chamomilla</i> . | p.25 |
| Figura 6 - Estrutura química dos estereoisômeros do alfa-bisabolol. | p.27 |
| Figura 7 - Efeito de diferentes doses de alfa-bisabolol sobre o peso. úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida | p.38 |
| Figura 8 – Imagens representativas das bexigas | p.38 |
| Figura 9 – Fotomicrografia representativa das bexigas | p.40 |
| Figura 10 - Efeito de diferentes concentrações de ABIS sobre as alterações histopatológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. | p.40 |
| Figura 11 - Efeito do ABIS sobre os escores macroscópicos de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida | p.42 |
| Figura 12 - Efeito do ABIS sobre a permeabilidade vascular no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. | p.43 |
| Figura 13 - Efeito do ABIS sobre a expressão gênica de <i>Il33</i> , <i>Il1β</i> e <i>Cox2</i> na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. | p.44 |
| Figura 14 – Efeito do ABIS sobre a área de marcação de F4/80 | p.45 |
| Figura 15 - Imagens representativas de imunofluorescência para F4/80 em bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. | p.46 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIS – alfa-bisabolol
BSA - Albumina sérica bovina
CH - Cistite hemorrágica
COX-2 - Cicloxigenase 2
DNA – Ácido Desoxiribonucléico
ERK- Quinase regulada pela sinalização extracelular
G-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos
GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina
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-33 - Interleucina 33
IL-11 – Interleucina 11
iNOS - Óxido nítrico sintase
LAFICA- Laboratório de farmacologia da inflamação e do câncer
LUTS – Sintomas do Trato urinário inferior
MESNA – 2-mercapto-etano-sulfonato de sódio
NF κ B - Fator nuclear kappa B
NO - Nitrito
P38 - Quinase regulada pela sinalização extracelular
PAF- Fator de agregação plaquetário
PBS - Tampão fosfato-salino
PGE2- Prostaglandinas E2
RAW 264.7 - Linhagem de macrófagos murinos
RNA – Ácido Ribonucléico
ROS - Espécies reativas de oxigênio
TGI- Trato grato intestinal
TNFR1 - Receptor de TNF
TNFR2 - Receptor de TNF
TNF- α - Fatores de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

| | |
|---|--------------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | |
| 1.1. CÂNCER..... | |
| 1.2. QUIMIOTERÁPICOS: AS OXAZAFOSFORINAS COMO AGENTES ALQUILANTES..... | 12 |
| 1.3. PATOGÊNESE DA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA..... | 15 |
| 1.4. OS ÓLEOS ESSENCIAIS, OS TERPENOS, A CAMOMILA E O ALFA-BISABOLOL..... | 23 |
| 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA..... | 30 |
| 3. OBJETIVOS..... | 31 |
| 4. METODOLOGIA | 32 |
| 4.1. ANIMAIS | 32 |
| 4.2. DROGAS..... | 32 |
| 4.3. MODELO EXPERIMENTAL DA INDUÇÃO DE CISTITE POR IFOSFAMIDA..... | 32 |
| 4.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS..... | 33 |
| 4.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GERAIS DE INDUÇÃO DE CISTITE POR IFOSFAMIDA | 33 |
| 4.5.1. ANÁLISE PESO ÚMIDO VESICAL..... | 33 |
| 4.5.2. ANÁLISE MACROSCÓPICA..... | 33 |
| 4.5.3. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA..... | 34 |
| 4.5.4. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VESICAL..... | 35 |
| 4.5.5. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE mrna de IL-1 β , IL-33 e COX-2..... | 35 |
| 4.5.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO F4/80 POR IMUNOFLOURESCÊNCIA..... | 36 |
| 4.5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 37 |
| 5. RESULTADOS | |
| 5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOSE-RESPOSTA DE ALFA-BISABOLOL SOBRE PARÂMETROS EM PROTOCOLO DE CISTITE HEMORRÁGICA DE ANIMAIS INDUZIDA POR IFOSFAMIDA..... | 38 |
| 5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ALFA-BISABOLOL 50 MG/KG SOBRE PARÂMETROS MACROSCÓPICOS DE EDEMA E HEMORRAGIA EM PROTOCOLO DE CISTITE HEMORRÁGICA DE ANIMAIS INDUZIDA POR IFOSFAMIDA..... | 41 |
| 5.3. EFEITO DO ABIS SOBRE A PERMEABILIDADE VASCULAR NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA..... | 42 |
| 5.4. EFEITO DO ABIS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>Il1beta</i> , <i>Il33</i> E <i>Cox2</i> NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA..... | 43 |
| 5.5. EFEITO DO ABIS NA IMUNOMARCAÇÃO DE F4/80 NA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR IFOSFAMIDA..... | 44 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 47 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 55 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 56 |

1. Introdução

1.1. Câncer

O câncer se caracteriza como uma patologia que envolve dinâmicas alterações genômicas. O processo fisiopatológico se dá por uma rápida proliferação de células anormais que crescem além de seus limites usuais e que podem então invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos. (HANAHAN; WEINBERG, 2000; WHO, 2022). Atualmente, o câncer representa a segunda maior causa de mortes na população mundial, com 10 milhões de mortes registradas em 2020 (SUNG et al., 2021).

Uma das formas de tratamento mais comumente utilizada continua sendo a quimioterapia com fármacos antineoplásicos. Os fármacos desse grupo afetam tanto as células normais quanto as neoplásicas. Esses fármacos auxiliaram em um aumento na cura e sobrevida, mas também são responsáveis por efeitos adversos que reduzem a qualidade de vida dos pacientes. Entre os efeitos adversos à quimioterapia podemos citar a cistite hemorrágica induzida por oxazofosforinas, como a ifosfamida (PAYNE et al., 2013; MATZ & HSIEH, 2017).

1.2 Quimioterápicos: as oxazofosforinas como agentes alquilantes.

Atualmente, o tratamento com quimioterápicos é utilizado em quatro condições principais: (1) tratamento primário de indução para doença metastática avançada; (2) tratamento neoadjuvante para cânceres que se apresentam como doença localizada, para os quais formas locais de terapia, como cirurgia e/ou radioterapia são, por si só, insuficientes; (3) tratamento adjuvante de modalidades de tratamento local, como cirurgia e/ ou radioterapia; e (4) aplicação direta em locais reservados ou por perfusão local de regiões específicas do corpo diretamente afetadas pelo câncer (EDWARD CHU, 2013).

Os quimioterápicos usados nessas condições de tratamento apresentam compostos com acentuada variação na sua estrutura e em seu mecanismo de ação. Esses fármacos incluem: agentes alquilantes; análogos antimetabólitos do ácido fólico, das pirimidinas e das purinas; produtos naturais, hormônios e antagonistas hormonais; e uma variedade de agentes dirigidos para alvos moleculares específicos (CHABNER, 2018).

Os agentes alquilantes agem modificando a estrutura de DNA e apresentam-se como uma das principais armas terapêuticas no combate à malignidade, mesmo com a atual ênfase na busca de terapias-alvo específicas e direcionadas para doenças neoplásicas. Atualmente, essa classe farmacológica apresenta 6 classificações, dentre elas, as mostardas nitrogenadas, que possuem como representantes a ifosfamida, ciclofosfamida, mecloretamina, melfalan e clorambucil (JARDIM; BASTOS, 2013). Os efeitos clínicos das mostardas nitrogenadas só foram possíveis devido a inadvertida exposição de marinheiros durante a primeira guerra mundial ao “gás mostarda”. Esse gás, que é um poderoso vesicante, causava queimadura tópica na pele, nas mucosas, nos olhos e nos pulmões. Após maciça exposição, foi observada aplasia da medula óssea e do tecido linfóide, sugerindo que agentes alquilantes poderiam ter uso terapêutico em neoplasias malignas derivadas do sangue (CHABNER et al., 2018).

Quimicamente o grupo de agentes alquilantes possui em comum a capacidade de se ligar covalentemente a substâncias nucleofílicas específicas na célula, como o DNA, impedindo sua replicação. A etapa principal é a formação de um íon carbono com apenas seis elétrons em sua camada externa que reage de forma instantânea com um doador de elétrons, como os grupos amina ou hidroxila. A maioria dos agentes alquilantes são citotóxicos bifuncionais, ou seja, possuem dois grupos alquilantes (HANG et al., 2016).

O principal local para a alquilação do DNA é a posição N7 da guanina, mas outras bases nitrogenadas também são alquiladas, em menor grau. São elas: N1 e N3 de adenina, N3 da citosina e O6 da guanina, bem como átomos de fosfato e proteínas associadas ao DNA (figura 1). Essas ligações podem ser realizadas em uma ou nas duas fitas do DNA, devido a capacidade dos agentes alquilantes produzirem dois grupos alquilantes (CHU; SARTORELLI, 2017).

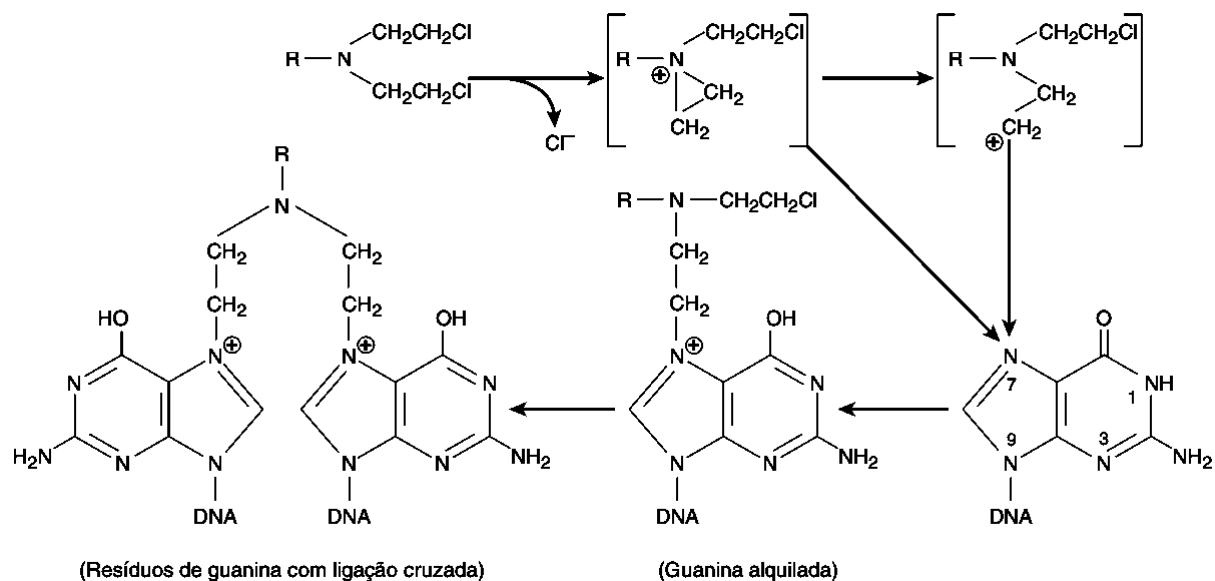


Figura 1 - Mecanismo de alquilação da guanina do DNA. Fonte: Katzung, Marters, Trevo (2016).

A ifosfamida e a ciclofosfamida fazem parte da classe farmacológica das oxazafosforinas e são pró-drogas que, quando metabolizadas pelas enzimas hepáticas, produzem substâncias eletrofílicas capazes de se unirem a moléculas de DNA ou RNA. Quimicamente estes compostos são isômeros de fórmulas ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$) que diferem entre si apenas pela posição de um grupamento cloretil (figura 2).

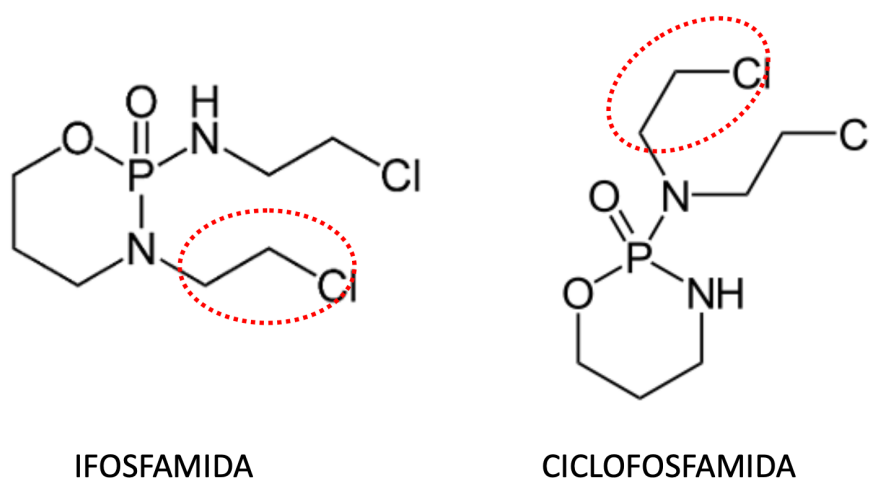


Figura 2 – Estrutura química das oxazafosforinas. Fonte: Mourão, (2012).

A ifosfamida é um análogo sintético da ciclofosfamida, utilizado como monoterapia ou em combinação com outros agentes quimioterápicos no tratamento de linfoma, linfoma não-Hodgkin e tumores refratários a terapias convencionais, como o sarcoma de tecidos moles e tumores de células germinativas testiculares (HIGGS, et al., 1989; ALI, et al., 2014). Este agente é um pró-fármaco administrado em sua forma inativa, sendo metabolizado no fígado por enzimas do citocromo P450, liberando desta maneira mostardas nitrogenadas citotóxicas, e acroleína, um metabólito inativo excretado na urina (ZHANG, et al., 2006; DECHANT, et al., 1991).

O efeito citotóxico se dá pela interação entre os metabólitos alquilantes e os grupamentos nitrogenados das moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA), além de outras proteínas, formando ligações covalentes com moléculas fundamentais para o metabolismo da célula, exercendo seus efeitos citotóxicos de modo independente ao ciclo celular (CHABNER et al., 2005). A acroleína é o metabólito responsável pelo efeito urotóxico da ifosfamida, sendo sua excreção renal altamente irritante para a bexiga. O acúmulo de acroleína na bexiga, leva à expressão de mediadores inflamatórios e enzimas como TNF- α , IL-1 β , ciclooxigenase 2 e óxido nítrico, além de provocar edema e hemorragia, caracterizando o efeito adverso mais comumente observado ao tratamento com oxazafosforinas, a cistite hemorrágica (GOMES, et al., 1995; MACEDO, et al., 2008; RIBEIRO, et al., 2002, KIMURA, et al., 1998).

1.3 Patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

A cistite é uma patologia inflamatória da bexiga caracterizada por alterações na mucosa que pode apresentar como sinais e sintomas hematúria, disúria, aumento da frequência e urgência urinária, além de dor pélvica intensa (SAKTHIVEL et al., 2008). A etiologia da doença provém de infecções bacterianas, virais, fúngicas, de origem idiopática ou ainda induzida por drogas antitumorais citotóxicas (ifosfamida e ciclofosfamida) (EPSTEIN, 2017). Estima-se que a cistite induzida por ifosfamida se desenvolve em 18-40% dos pacientes que são tratados com o fármaco. Manifesta-se como um amplo espectro de sinais e sintomas, desde hematúria moderada e irritação da bexiga até hematúria macroscópica severa com considerável risco de vida devido hemorragia persistente (LEE; ROMIH; ZUPANČIČ, 2014; RUSSO, 2000; THOMPSON et al., 2014; VAN DYK et al., 1972).

Somado a hematúria, os pacientes com cistite apresentam um conjunto de sintomas característicos, denominados LUTS (*lower urinary tract symptoms*): urgência urinária, frequente micção em pequenos volumes, esvaziamento incompleto da bexiga, dor e ardência durante micção. Nos homens, espasmos da bexiga podem gerar intensas dores referidas na glândula peniana. Dores suprapúbicas podem ser relatadas pelos pacientes, bem como lombalgias, podendo esta última ser associada a obstrução da bexiga. Em casos de sangramentos mais severos, pode ocorrer retenção urinária secundária causada pela obstrução do colo da bexiga pelos coágulos (LINDER; CHAO; GOUNDER, 2021).

A cistite hemorrágica (CH) é o resultado de um conjunto de eventos inflamatórios vesicais causados principalmente pela acroleína, um metabólito tóxico derivado das oxazafosforinas e excretado pela urina, causando edema e ulceração na mucosa vesical associados a hemorragia (COX, 1979). Como resposta a exposição da acroleína no organismo, as células adaptaram seu metabolismo bioquímico para proteção contra a toxicidade gerada pela substância. Um desses mecanismos envolve um componente tiol, a glutatona (SHAW; GRAHAM, 1987). Infelizmente, a concentração de glutatona na bexiga é bastante reduzida, deixando o órgão sem proteção contra os efeitos tóxicos da acroleína. (SIDAU; SHAW, 1984)

Com objetivo de proteger profilaticamente a mucosa vesical através do aumento da concentração de compostos tiol na mucosa vesical, Brock e seus colaboradores em 1984 testaram vários compostos do grupo tiol afim de selecionar uma substância que fosse efetiva na proteção profilática vesical da cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas. A figura 3 apresenta o composto selecionado por apresentar maior eficácia na uroproteção da CH, o 2-mercapto-etano-sulfonato de sódio (MESNA) (SHAW; GRAHAM, 1987).

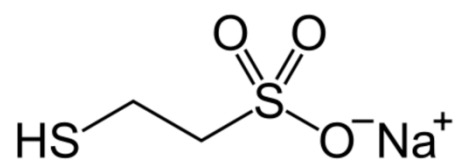


Figura 3: estrutura química do MESNA. Fonte: SHAW; GRAHAM, 1987.

Desde 1999 a Associação Americana de Oncologia Clínica (ASCO) define diretrizes para utilização de agentes protetores na quimioterapia e radioterapia. A última atualização dessas diretrizes ocorreu em 2008, onde é sugerida uma dose diária de MESNA equivalente a 60% da dose de ifosfamida, administrada em forma de bolus 15 minutos antes, 4 e 8 horas após a administração da ifosfamida (HENSLEY et al., 2009).

O MESNA atua como um desintoxicante do epitélio vesical na presença da acroleína na urina. Após a administração oral ou intravenosa, o fármaco permanece no sangue e é oxidado no plasma em DIMESNA. Somente uma pequena parte do MESNA permanece no sangue na sua forma ativa (figura 3). As duas formas intravasculares são hidrofílicas e rapidamente serão eliminadas pelos rins. Aproximadamente um terço do DIMESNA será convertido em MESNA no epitélio do túbulo renal pelas enzimas glutathione redutase. Os grupamentos tióis livres irão se ligar às ligações duplas da molécula da acroleína e formarão um composto inativo (DECHANT et al., 1991; GURTOO et al., 1988). Como a excreção urinária de MESNA excede em muito as concentrações plasmáticas de MESNA, ocorre a desintoxicação regional da ifosfamida no sistema urinário. Os efeitos tóxicos não urinários da ifosfamida não são reduzidos pelo MESNA concomitante e, mais importante, o MESNA não interfere com a atividade citotóxica da ifosfamida (HILGARD; POHL, 1990).

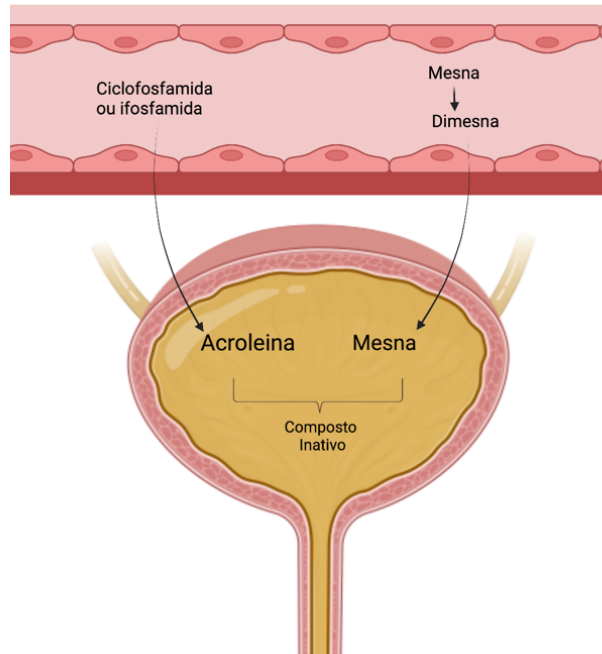


Figura 4: Esquema uroproteção do MESNA na CH. A figura mostra vaso sanguíneo com concentração de ciclofosfamida ou ifosfamida que, após metabolização e excreção forma o metabólito acroleína, que se acumula na bexiga. Parte do MESNA é oxidado no vaso sanguíneo em DIMESNA. Os dois compostos chegam à bexiga. Um terço do DIMESNA pode ser convertido em MESNA e se ligar a acroleína para formar o composto inativo. Fonte: Adaptado de TAKAMOTO et al., 2004.

De fato, o MESNA teve e tem um importante papel na diminuição da gravidade da CH. Para pacientes que recebem qualquer dose de ifosfamida ou aqueles com altas doses de ciclofosfamida, é recomendado realizar previamente a hiperidratação, irrigação contínua da bexiga e uso do MESNA (LINDER; CHAO; GOUNDER, 2021). Apesar da profilaxia, a cistite hemorrágica ainda continua sendo uma complicação comum do tratamento quimioterápico com altas doses de agentes alquilantes durante transplante de medula óssea, levando à hospitalização prolongada e até mesmo à morte (SHEPHERD, et al., 1991; MEISENBERG, et al., 1994; KOC, et al., 2000; EL-ZIMAITY, et al., 2004).

A profilaxia padrão com MESNA foi avaliada por Lima e colaboradores, onde foram pesquisadas possíveis alterações histológicas ou citoscópicas em bexigas de pacientes tratados com ifosfamida e protocolo de 3 doses do MESNA. Concluiu-se que o MESNA em seu protocolo para prevenção da CH não previne completamente o dano urotelial. As alterações citoscópicas foram encontradas em 66,7% dos pacientes e danos uroteliais como edema, exocitose e hemorragia em 100% dos pacientes (LIMA et al., 2007a). Dessa forma, apesar das medidas preventivas adotadas, a cistite permanece como um problema clínico não

solucionado, sendo necessário elucidar a patogênese da CH para a adoção de estratégias preventivas e terapêuticas efetivas (RIBEIRO et al., 2012).

Os primeiros estudos sobre a patogênese da CH tinham como único achado o efeito tóxico do metabólito acroleína (COX, 1979). Durante muito tempo, os mecanismos envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica eram desconhecidos. Nas duas últimas décadas vários estudos tentaram elucidá-los. Apesar da maior parte da literatura ser relativa à cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida, e poucos sobre ifosfamida, os mecanismos parecem ser similares (RIBEIRO, et al., 2012).

Pesquisadores do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da Universidade Federal do Ceará tem se dedicado desde a década de 90 em estudar os mecanismos de mediadores inflamatórios na fisiopatologia da CH induzida por oxazafosforinas. Lima e seus colaboradores em 1994 demonstraram o envolvimento de prostaglandinas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária (PAF) (LIMA, 1994). No estudo dos mediadores inflamatórios na CH induzida com ciclofosfamida, os resultados sugerem que existe um papel crucial das citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral (TNF-alfa) e interleucina-1 (IL-1) na patogênese da CH induzida por ciclofosfamida (GOMES et al., 1995).

O envolvimento do óxido nítrico (NO) e a modulação da óxido nítrico-sintetase induzida (iNOS) ativados pelo PAF foram avaliados na CH induzida por ciclofosfamida em modelo animal por Souza-Filho *et al.* em 1997. Os pesquisadores demonstraram que a hemorragia e os danos uroteliais poderiam ser bloqueados por inibidores da iNOS e que esse bloqueio foi revertido pela L-arginina e não pelo seu isômero inativo. Ainda complementaram seus resultados com análise imunohistoquímica do tecido vesical saudável mostrando grande quantidade de NO constituinte. Esse estudo sugere que o NO endógeno participa do dano vesical e do processo fisiopatológico da CH induzida por ciclofosfamida. Ainda sugerem a possibilidade da participação do PAF na patogênese da CH induzida por ciclofosfamida, possivelmente induzindo a iNOS (SOUZA-FILHO et al., 1997).

O envolvimento dos neutrófilos no processo patogênico da CH induzida por ciclofosfamida também foi estudado por pesquisadores do nosso laboratório. O estudo demonstrou que lectinas com afinidade específica por resíduos de glicose-manose extraídas de plantas exercem atividade anti-inflamatória na CH induzida pela ciclofosfamida. As lectinas foram capazes de diminuir os danos uroepiteliais e sugere-se que essa atividade

venha do bloqueio competitivo da ligação com as selectinas, resultando em inibição da migração dos leucócitos (ASSEY et al., 1999).

A associação do MESNA com outros fármacos também foi alvo de estudo dos pesquisadores do LAFICA. Em 1999, Moraes e colaboradores estudaram a associação entre MESNA e dexametasona em CH induzida por ciclofosfamida ou ifosfamida. A dexametasona diminuiu o edema vesical e as alterações macroscópicas e microscópicas. O estudo mostra que a provável explicação para esse efeito protetor seria pela potente ação do corticoide em inibir a síntese de citocinas como TNF alfa e IL-1, PAF e iNOS. O estudo concluiu que o MESNA é fundamental para a uroproteção inicial, devido seu efeito neutralizador quanto ao dano urotelial da acroleína. Sugere-se que a dexametasona deva estar inibindo os mediadores do processo inflamatório que ocorre a seguir (MORAIS et al., 1999).

A CH agora induzida pela ifosfamida foi estudada para investigar a participação do NO e o envolvimento do TNF alfa e IL-1 beta na indução da produção do óxido nítrico. O estudo sugere que o NO produzido pela óxido nítrico sintetase induzida está envolvido no dano urotelial e nos eventos inflamatórios da CH induzida por ifosfamida. Esse processo parece depender sinergicamente da TNF alfa e da IL-1 beta (RIBEIRO et al., 2002). Posteriormente, foi investigada a participação da Cicloxigenase-2 (COX-2) sobre a CH induzida por ifosfamida. Nesse estudo foram adicionados ao MESNA inibidores da COX-2 (eterocoxib) e inibidores do TNF alfa (indometacina), resultando na redução da expressão de COX-2 e de alguns parâmetros macroscópicos e microscópicos. A adição do eterocoxib ou da indometacina nas duas últimas doses de MESNA mostrou ser mais eficiente que as três doses de MESNA isoladamente quando os tecidos foram avaliados microscopicamente (MACEDO et al., 2008a).

Em 2005, KORKMAZ e colaboradores avaliaram se o peroxinitrito também é responsável pelo dano vesical em CH induzida por ciclofosfamida. Os animais foram tratados com administração de ebsalem, uma substância que reage e elimina o peroxinitrito, e com um inibidor da NOS induzida. Os resultados mostraram que o efeito uroprotetor nos animais com ebsalem é semelhante com o efeito do inibidor da iNOS. O trabalho sugere que não apenas o óxido nítrico, mas também o peroxinitrito podem ser importantes na patogênese da CH induzida por ciclofosfamida (KORKMAZ et al., 2005).

O grupo de pesquisadores do LAFICA ainda pesquisou sobre o efeito de citocinas anti-inflamatórias na prevenção da CH induzida por ifosfamida. O alvo do trabalho foi

investigar o possível efeito protetor da interleucina-11 (IL-11) nessa condição. A IL-11 reduziu o peso úmido vesical, alterações macroscópicas e microscópicas de hemorragia e edema. O estudo sugeriu efeito protetor da IL-11 na CH induzida por ifosfamida, nunca relatado (MOTA et al., 2007). Outro estudo realizado para investigar os efeitos das citocinas na CH induzida por ifosfamida foi conduzido por Macedo *et. al.* em 2008. O trabalho demonstrou que a interleucina-4 (IL-4) exógena conseguiu proteger parcialmente o tecido vesical dos eventos inflamatórios do processo. Já a IL-4 endógena está envolvida no processo da CH induzida pela ifosfamida, exercendo ações anti-inflamatórias inibindo as citocinas pro-inflamatórias IL-1 beta e TNF alfa e as enzimas COX-2 e iNOS (MACEDO et al., 2012).

Os primeiros estudos sugeriram que os agentes alquilantes eram responsáveis diretos pela cistite hemorrágica, no entanto, estudos mostraram que o efeito urotóxico era proveniente de compostos excretados na urina, sendo constatado, por Cox *et al*, que a acroleína era o agente causador da cistite hemorrágica (COX, et al., 1979, PHILIPS, et al., 1961). Atualmente, sugere-se que a fisiopatologia da CH pode ser descrita em quatro estágios: 1) Fase inicial: ocorre quando a acroleína acumula-se na bexiga, ocasionando dano urotelial; 2) Fase inflamatória: quando ocorre *up-regulation* de fatores de transcrição, como NF- κ B e liberação local de citocinas inflamatórias por células residentes no epitélio e tecido conjuntivo, como macrófagos; 3) Fase sintomática: fase em que há descamação do urotélio e ulceração, além de dor e disfunção do órgão; 4) Fase de cicatrização: envolve o reparo tecidual e liberação local de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de queratinócitos (RIBEIRO, et al., 2012).

Juntamente com outros grupos, o LAFICA tem investigado o papel de mediadores inflamatórios na patogênese da cistite hemorrágica induzida por agentes alquilantes, a partir do desenvolvimento e aprimoramento de modelos experimentais de cistite hemorrágica induzida por ciclo e ifosfamida.

A interleucina-33 (IL-33) é uma citocina nuclear expressa por células endoteliais, células epiteliais e células semelhantes a fibroblastos, tanto durante a homeostase quanto na inflamação (CAYROL; GIRARD, 2018). O dano urotelial pode desencadear a liberação de IL-33, a qual atua como uma “alarmina” e desencadeia a proliferação e maturação de mastócitos, além de estimular a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. A interação de IL-33 e mastócitos possuiu uma grande relação em danos uroteliais e representa uma implicação importante na clínica urológica. Níveis urinários de IL-33 aumentam

significativamente em pacientes com uma condição urológica crônica e dolorosa, conhecida como cistite intersticial. Tal aumento, ocorre juntamente com o aumento do número de mastócitos (MARTIN JENSEN et al., 2018a). Tratamentos que possam gerar diminuição de IL-33 e da ativação e degranulação dos mastócitos tem um potencial terapêutico para a cistite intersticial (JANG; KIM, 2015; TSAI et al., 2017).

O fator de transcrição nuclear NF- κ B é um dos principais reguladores dos genes envolvidos nas respostas inflamatória e imune, estimulando a expressão de TNF- α , IL-1 β , COX-2 e iNOS. A primeira evidência da participação deste fator na patogênese da cistite hemorrágica foi descrita por Kiuchi e colaboradores, através da inibição de NF- κ B, o que diminuiu consideravelmente a expressão de COX-2 nas bexigas de animais tratados com ciclofosfamida (KIUCHI, et al., 2009; BALDWIN, et al., 1996).

Nosso grupo avaliou o papel da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, observando-se uma grande expressão de COX-2 na bexiga de animais tratados com este fármaco 24 horas após a administração de uma única dose deste, e o pré-tratamento com os inibidores de COX-2 etoricoxibe e indometacina diminuem a sua expressão por imunohistoquímica em bexigas de ratos pré-tratados com estes fármacos (MACEDO et al., 2008). A interleucina 1, importante mediador pró-inflamatório, teve seu papel comprovado na patogênese da cistite com o uso de anakinra, um antagonista do receptor de IL-1, o qual atenuou a hemorragia, edema, infiltração de neutrófilos e hiperalgesia. Resultados semelhantes foram observados no mesmo trabalho com a administração de infliximabe, anticorpo monoclonal que se liga à TNF- α . Além disso, o receptor TNFR2 parece estar relacionado com um efeito protetor sobre a cistite (LEITE et al., 2015).

Outra enzima fundamental para o desenvolvimento do dano urotelial e hemorragia na cistite é a iNOS. A utilização dos inibidores L-NAME e L-NOARG inibiu o extravasamento de proteínas plasmáticas e o aumento no peso úmido vesical, além de prevenir os danos à mucosa da bexiga, que foram revertidos pela administração de L-arginina, precursor do óxido nítrico e substrato da iNOS. Além disso, o PAF é um dos mediadores que contribuem para ativação do eixo L-arginina-NO, e a utilização de um antagonista do PAF reduz consideravelmente o extravasamento de proteínas plasmáticas e o aumento no peso úmido vesical em ratos submetidos ao tratamento com ciclofosfamida (SOUZA-FILHO, et al., 1997).

Mais recentemente, a influência da migração de neutrófilos para o dano vesical foi comprovada com a utilização de fucoidina, um inibidor de P e L-selectinas, e a depleção de neutrófilos com anti-Ly6G, onde em ambos os casos houve redução significativa em todos os parâmetros inflamatórios avaliados. De forma oposta, a utilização de G-CSF, fator de crescimento de colônia de granulócitos, mostrou-se extremamente nocivo, agravando a inflamação local nos animais tratados com ifosfamida (DORNELAS FILHO et al., 2018). Ainda no mesmo trabalho, a citocina IL-6 mostrou-se consideravelmente elevada na bexiga dos animais com cistite hemorrágica, abrindo perspectivas para a possível participação desse mediador na patogênese desse efeito adverso.

1.4 Os óleos essenciais, os terpenos, a camomila e o alfa-bisabolol

Os óleos essenciais são empregados e explorados há mais de 3.500 anos pela humanidade, com ampla utilização na perfumaria e cosmética. Os óleos essenciais são substâncias aromáticas complexas constituídos majoritariamente por terpenos ou seus derivados (THOMPSON, 2005). Estes últimos são compostos de moléculas orgânicas produzidas como metabólitos secundários derivados na sua maioria de plantas, para evitar injúrias promovidas por agentes externos. Quimicamente, os terpenóides são basicamente estruturados em blocos de 5 carbonos – unidades de isopreno (C_5H_8) – ligados entre si. Terpenos ou terpenóides são substâncias lipofílicas que são classificadas de acordo com a quantidade de resíduos de isopreno que sua estrutura possui (DE CORREIA et al., 2006) (vide Tabela 1).

| Classificação | Bloco de isopreno | Quantidade de carbono | Exemplo |
|----------------|-------------------|-----------------------|--|
| Hemiterpenos | 1 | 5 | Isopreno (monômero empregado na fabricação de borracha), prenol (odor frutado e utilizado na fabricação de perfumes) e ácido isovalérico (aroma característico de "queijo velho/chulé"). |
| Monoterpenos | 2 | 10 | Limoneno (aroma característico de fruta cítrica) e α -terpineol (aroma característico floral/pinho). |
| Sesquiterpenos | 3 | 15 | Farneseno ("diesel da cana"), nootkatona (aroma característico de toranja) e bisabolol (essência de camomila). |
| Diterpenos | 4 | 20 | Esteviosídeo (produção de adoçante natural a base de stevia) e sclareol (proveniente da sálvia - <i>Salvia sclarea</i>) |
| Triterpenos | 6 | 30 | Esqualeno (encontrado no óleo de fígado de tubarão) |
| Tetraterpenos | 8 | 40 | Carotenoides como o β -caroteno (pigmento da cenoura) e a zeaxantina (pigmento predominante em vegetais amarelos). |
| Politerpenos | >8 | >40 | Látex (borracha natural) |

Tabela 1: Classificação dos terpenóides. Adaptada de O. FELIPE; L. BICAS, 2017.

O alfa-bisabolol (ABIS) é um terpeno da classe sesquiterpeno, pois possui 15 carbonos em sua composição, ou seja, 3 blocos de isopreno, derivado principalmente da camomila (O. FELIPE; L. BICAS, 2017). Dentre as espécies de vegetais fonte de alfa-bisabolol, a mais amplamente estudada até o momento certamente é a *Matricaria recutita* (L.) ou simplesmente camomila. A infusão preparada com as flores desidratadas da camomila tem sido usado como planta medicinal há milhares de anos. Há relatos históricos que os egípcios consideravam a camomila como uma dádiva do deus sol e a utilizavam para tratar febre e insolação. As civilizações greco-romanas também utilizaram a camomila como planta medicinal e o termo camomila deriva da junção de duas palavras gregas que significam “maça da terra”, em virtude de seu aroma semelhante ao da maça. No século seis, foi utilizada por várias civilizações para tratar insônia, lombalgias, neuralgias, reumatismo, condições de pele, indigestão, flatulência e dor de cabeça. Na Alemanha, a camomila é conhecida com o termo “alles zutraut”, que significa “é capaz de tudo”, fazendo referência às suas inúmeras propriedades medicinais (GARDINER, 1999; KAMATOU; VILJOEN, 2010).

Existem várias espécies vegetais de camomila, mas a verdadeira camomila é definida como uma inflorescência de *Matricaria recutita* Linn., Asteraceae, sendo também conhecida como *Chamomilla recutita* (L.) e *Matricaria Chamomilla* L (figura 5). Apesar de estar praticamente em todo o globo, a camomila é originária da Europa e oeste asiático. As duas principais variedades de camomila são a camomila alemã (*Matricaria recutita*) e a camomila romana (*Anthemis nobilis*), sendo a primeira a mais potente, a mais cultivada e também a que recebe maior atenção da comunidade científica (GARDINER, 1999).



Figura 5: Ilustração da *Matricaria chamomilla*, também conhecida como camomila. Fonte: University and Jepson Herbaria; Collection: UCJEPS; Copyright © University and Jepson Herbaria http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=3333+3333+1207+0057

Os extratos das flores de camomila são bem documentados e são citados pela farmacopeia de 26 países, incluindo o Brasil. A camomila foi utilizada primariamente como sedativo, ansiolítico e antiespasmódico, e no tratamento de leve irritação na pele e na inflamação (GARDINER, 1999; SALAMON, 1992). Os primeiros estudos sugerem que a camomila possui ação bacteriostática, anti-inflamatória, sedativa, antisséptica e espasmolítica (GARDINER, 1999; MCKAY; BLUMBERG; MAYER, 2006).

A camomila alemã pode ser utilizada para tratar uma lista de condições e patologias, interna e externamente, desde irritações na pele e hemorroidas até úlceras e dores reumáticas (MANN; STABA, 1986). De acordo com Blumenthal em 1998, uma comissão germânica E, vinculada ao Instituto federal de medicamentos e dispositivos médicos da Alemanha, aprovou o uso externo da camomila para inflamações na pele, mucosas e região genital, doenças bacterianas de pele e infecções respiratórias. Oncologistas alemães usam uma preparação tópica de camomila (Kamillosan ®) para tratar úlceras bucais induzidas por quimioterápicos (BLUMENTHAL, 1998). Internamente, a camomila é usada como chá ou bebida tônica para tratar ansiedade, pesadelos, insônia e outros distúrbios do sono (MARTENS, 1995).

A camomila também é utilizada para tratar distúrbios do trato gastrointestinal (TGI) como flatulências, diarreias, náuseas e vômitos. A comissão germânica E recomenda o uso da camomila para espasmos e doenças de origem inflamatória do TGI (BLUMENTHAL, 1998; MCKAY; BLUMBERG; MAYER, 2006). Em 2006, um grupo de pesquisadores estudou o extrato de camomila em feridas de um modelo experimental em ratos. O estudo sugere que o extrato possui uma propriedade regeneradora em áreas lesionadas com aumento de fibras colágenas e fibroblastos na área e diminuição de células inflamatórias (JARRAHI et al., 2010).

Os estudos com a camomila conseguiram identificar mais de 120 substâncias oriundas de suas flores (PINO et al., 2002). Dessas, os principais compostos são o alfa-bisabolol e seus óxidos entre 78% e os azulenos, incluindo o chamazuleno, variando entre 1-15% (MANN; STABA, 1986; MATOS et al., 1993). Em 1993, Matos e colaboradores publicaram os componentes do óleo essencial extraído das flores da camomila cultivada em solo brasileiro. O alfa-bisabolol e seus óxidos representam 53%, beta-farneseno 16%, chamazuleno 8% e outras substâncias (MATOS et al., 1993).

O alfa-bisabolol é um álcool sequeiterpênico monocíclico insaturado de ocorrência natural. Foi isolado pela primeira vez por Isaac e colaboradores em 1975 extraído da *Matricaria chamommila*. A molécula alfa-bisabolol foi isolada na forma de quatro estereoisômeros: (-)- α -bisabolol, (-)-epi- α -bisabolol, (+)- α -bisabolol e (+)-epi- α -bisabolol. O estereoisômero α -(+)-bisabolol é mais raro, enquanto que o α -(-)-bisabolol é o mais frequentemente encontrado em espécies vegetais (KAMATOU; VILJOEN, 2010) (figura 6).

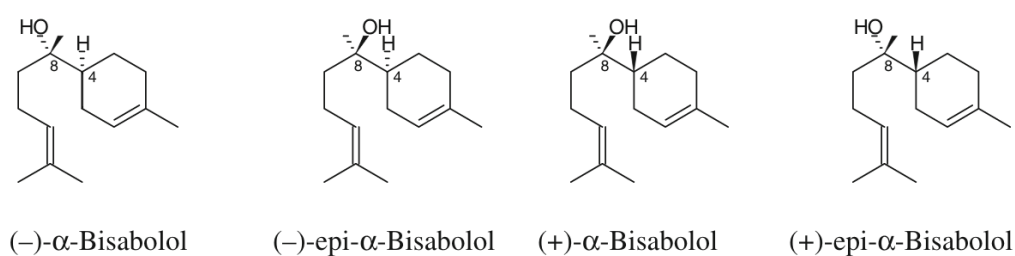


Figura 6: Estrutura química dos estereoisômeros do (2S)-6-metil-2-[(1S)-4-metilciclohex-3-en-1-il]hept-5-en-2-ol adaptada de KAMATOU; VILJOEN, 2010.

Ao fazer referência ao alfa-bisabolol, está implícito que estamos citando o isômero α -(-)-bisabolol (ABIS), também referido como levomenol. Além da fonte mais explorada para obter o ABIS (*chamomilla recutita L*), outras fontes são Sálvia (*Salvia runcinata*), (*Plinia cerrocampenesi*), e madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*) (De Souza, A.T, 2008) podendo ter até 85% de α -bisabolol. O estudo do ABIS gerou interesse devido seu potencial terapêutico e as suas múltiplas propriedades farmacológicas identificadas como anti-inflamatória, antioxidante, anti-infecciosa, anticâncer e cardioprotetor (DE SOUZA et al., 2008; JAVED et al., 2020a; KAMATOU; VILJOEN, 2010).

O ABIS apresenta-se como uma substância clara, amarela e líquida em temperatura ambiente. É praticamente insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos. Ao sofrer oxidação, poderá formar os óxidos de bisabolol A e B. Toxicidade aguda oral para o rato DL50 acima de 2 g/kg (SIGMA-ALDRICH, 2022). Algumas informações das propriedades do ABIS encontram-se no quadro abaixo.

| Característica | | Ref. |
|--------------------|--|------|
| Peso molecular | 222,37 g/mol | 1 |
| Fórmula | C ₁₅ H ₂₆ O | 1 |
| Densidade relativa | 0.929 g/cm ³ | 2 |
| Coloração | Amarelada | 2 |
| Ponto de ebulição | 135° C | 2 |
| Solubilidade | Água: insolúvel Solventes orgânicos: solúvel | 2 |

Quadro 1: Características gerais e físico-químicas do ABIS. REF: Referência. (1) –BATHIA et al, 2008; (2) Sigma-Aldrich, 2020.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram as inúmeras propriedades para o alfa-bisabolol, desde anti-inflamatórias até antineoplásicas (KAMATOU; VILJOEN, 2010). O estudo pioneiro de Torrado *et al.* em 1995 avaliou a toxicidade gástrica em ratos induzida pelo ácido acetilsalicílico. Os animais tratados com ABIS obtiveram um significativo efeito gastroprotetor (TORRADO et al., 1995). Uma ação anti-histaminérgica do ABIS e outros compostos de óleos essenciais da camomila foi revelada em estudo que demonstrou efeito inibitório do alfa-bisabolol na degranulação de mastócitos induzida inicialmente pelo sulfato de protamina (MILLER et al., 1996). Outra atividade atribuída foi o efeito anti-úlceras em modelo experimental que induzia as lesões na mucosa gástrica com etanol e indometacina. O ABIS conseguiu reduzir a agressão gástrica produzida pelo etanol (BEZERRA et al., 2009).

Para avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do ABIS, Leite *et al.* (2010) utilizaram o modelo experimental de dermatite induzida para analisar a atividade anti-inflamatória e dois modelos de nocicepção visceral para avaliar a antinocicepção. O estudo conclui que o ABIS possui um efeito anti-inflamatório tópico e ainda conseguiu reduzir a nocicepção visceral induzida (DE O. LEITE et al., 2011). Kim *et al.* (2011) também avaliaram a propriedade anti-inflamatória do ABIS e seus mecanismos de ação, mas em experimentos *in vitro*. Os pesquisadores demonstraram que o ABIS inibiu a

produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E₂ (PGE₂). Também foram observadas diminuições nas expressões dos genes da Cicloxigenase-2 (COX-2) e da Oxido nítrico sintetase induzida (iNOS). Ainda avaliaram a atividade do fator de transcrição proteína-1 (AP-1) e do NF-kappa B, mostrando que a ativação desses promotores foi reduzida na presença do ABIS nas vias de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) ERK e p38 (KIM et al., 2011a).

O efeito anti-inflamatório do α -bisabolol pode estar ligado a inibição de alguns proteínas, como oxido nítrico sintase induzida (iNOS), ciclooxigenase-2 (Cox-2) e os fatores de transcrição NF-Kb, ERK e p38 (Muñoz-Pérez VM, 2018). Além disso, foi demonstrado que α -bisabolol pode atuar como um inibidor dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Jeon JS, 2016).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas continua sendo uma complicação do tratamento, causando prolongamento na hospitalização, aumento da necessidade de intervenção médica, aumento da morbidade e, em alguns casos, levando a morte do paciente. Apesar das medidas profiláticas utilizadas na atualidade, as lesões uroteliais induzidas pelas oxazafosforinas são efeitos colaterais que acometem os pacientes oncológicos(LIMA et al., 2007a).

O MESNA, o agente protetor mais utilizado na clínica, apresenta uma ação essencialmente profilática. O fármaco não consegue prevenir por completo o dano à bexiga e não trata a CH já induzida. O MESNA ainda pode resultar em hipersensibilidade sistêmica e aumentar o risco de arritmias. A busca de novos meios preventivos e terapêuticos se torna fundamental para uma futura melhoria na qualidade de vida dos pacientes(LIMA et al., 2007b).

O alfa-bisabolol, assim como outros compostos derivados de óleos essenciais, são estudados quanto as suas propriedades diversas e possível uso terapêutico. O ABIS já foi estudado em diversas alterações patológicas, para a análise dos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, anti-infecciosos e cardioprotetores(AMARAL et al., 2021). ABIS e seus efeitos nunca foram avaliados na CH induzida por ifosfamida. Conhecendo os efeitos do ABIS em outros modelos animais, é relevante investigar o efeito do ABIS na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Avaliar a atividade farmacológica do álcool sequiterpênico ABIS sobre o modelo experimental de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

3.2 Objetivos específicos:

- Investigar a melhor dose do alfa-bisabolol com atividade anti-inflamatória;
- Avaliar os efeitos farmacológicos antiedematogênicos de diferentes concentrações do ABIS na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida;
- Estudar os mecanismos anti-inflamatórios do ABIS na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

4. METODOLOGIA

Os protocolos experimentais que serão descritos nessa seção foram realizados em sua maioria no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Também foram utilizadas as instalações do biotério setorial prof. Eduardo Torres do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da Faculdade de Medicina da UFC.

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 20-24 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em gaiolas adequadas, em um ambiente com temperatura controlada (22-25°C), exaustão de ar, ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão *ad libitum*, respeitando o número máximo de animais por gaiola. Os experimentos foram realizados de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com os preceitos do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC, onde o projeto do estudo foi aprovado com o número de protocolo 6831010222.

4.2. Fármacos

Ifosfamida (Holoxane, Baxter Hospitalar Ltda, frasco-ampola com 0,5g) e A-bisabolol (Sigma-Aldrich) foram diluídos em tween 80 e solução salina.

4.3. Modelo experimental de indução da cistite hemorrágica por ifosfamida

A indução da cistite hemorrágica foi feita pela injeção de uma dose única de 400 mg/kg de ifosfamida intraperitonealmente. A eutanásia deu-se 12 horas após a injeção, por sobredose de anestésico via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada uma incisão baixa no abdômen para retirada da bexiga, a qual teve o excesso de urina retirado com auxílio de papel de filtro. Em seguida, realizou-se a análise macroscópica e pesagem das bexigas.

4.4. Protocolos experimentais

Protocolo I: camundongos swiss machos foram divididos em cinco grupos. **Grupo A:** grupo controle tratado com salina (solução fisiológica 0,9%; 5 mL/kg i.p.) e **Grupo B, C, D e E:** grupo tratado com ifosfamida (400 mg/kg i.p.). Uma hora antes da administração da ifosfamida os animais foram tratados com a bisabolol. O **grupo B** com a bisabolol (5 mg/kg v.o.), **grupo C** com a bisabolol (10 mg/kg v.o.) **grupo D** com a bisabolol (50 mg/kg v.o.). Os animais foram submetidos à eutanásia em 12 horas após o tratamento. Esse protocolo teve como avaliação: peso úmido do animal, análise macroscópica e análise histopatológica. Após as análises dos resultados, foi selecionada a melhor dosagem.

Protocolo II: Camundongos swiss foram divididos em três grupos (n=7) **Grupo A:** controle negativo injetado com salina (solução fisiológica 0,9%, 5 mL/kg, i.p.); **Grupo B e C:** camundongos injetados com Ifosfamida (400 mg/kg i.p.); **Grupo B:** camundongos injetados com a bisabolol (a melhor dosagem encontrada após experimento I, v.o. uma hora antes da administração da Ifosfamida) + Ifosfamida (400 mg/kg i.p.). A eutanásia foi realizada 12 horas após a administração de ifosfamida. Esse protocolo analisou a permeabilidade vesical pela técnica de extravasamento com o Azul de Evans (AE).

Protocolo III: Camundongos swiss foram divididos em três grupos (n=7) **Grupo A:** controle negativo injetado com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.); **Grupo B e C:** camundongos injetados com Ifosfamida (400 mg/kg i.p.); **Grupo B:** camundongos injetados com a bisabolol (a melhor dosagem encontrada após experimento I, v.o. uma hora antes da administração da Ifosfamida) + Ifosfamida (400 mg/kg i.p.). A eutanásia foi realizada 12 horas após a administração de ifosfamida.

4.5. Avaliação dos parâmetros gerais de indução da Cistite Hemorrágica por Ifosfamida.

4.5.1. *Avaliação do peso úmido vesical*

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

4.5.2. *Análise macroscópica*

As bexigas foram avaliadas macroscopicamente quanto ao edema e hemorragia, segundo os critérios de Gray et al., 1986, onde:

Edema:

- 2 Severo (3+): edema interno e externo;
- 3 Moderado (2+): edema interno (mucosa);
- 4 Leve (1+): intermediário;
- 5 Normal (0): nenhum.

Hemorragia:

- ✓ 3+: coágulo intravesical;
- ✓ 2+: hematomas na mucosa;
- ✓ 1+: telangiectasia ou dilatação dos vasos da bexiga;
- ✓ 0: normal.

4.5.3. *Análise histopatológica*

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

(0) - Histologia Normal: caracterizada pelo urotélio normal, bem como ausência de úlcera e infiltrado inflamatório.

(1+) - Alterações Discretas: caracterizada por número de células epiteliais diminuídas pela descamação, “apagamento” das dobras habituais da mucosa em decorrência do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras.

(2+) - Alterações Moderadas: caracterizada por múltiplas ulcerações da mucosa, edema moderado, infiltrado inflamatório, depósito de fibrina e focos hemorrágicos.

(3+) - Alterações Intensas: caracterizada por múltiplas ulcerações da mucosa, erosão na mucosa, edema intenso, infiltrado inflamatório intenso, depósito de fibrina intenso e diversos focos hemorrágicos com possível transmural hemorragia.

4.5.4. Avaliação da permeabilidade vesical

A permeabilidade vascular vesical foi avaliada pela técnica de extravasamento com solução de Azul de Evans. O Azul de Evans é um corante que se liga à albumina plasmática. Devido a isso, havendo extravasamento de albumina para o tecido inflamado, devido aumento da permeabilidade e consequente edema, o corante extravasará para o interstício. Os animais são injetados, por via endovenosa, via plexo reto-orbital, com 2.5% de solução de azul de Evans (25 mg/kg), 30 minutos antes do sacrifício dos animais. As bexigas foram então retiradas, dissecadas e incubadas em solução de formamida (1 mL/bexiga) à 56°C por 12 h para extração do corante presente no tecido. O corante presente na solução foi mensurado em espectrofotômetro no comprimento de onda 630 nm. Os resultados foram expressos em microgramas de azul de Evans por mg bexiga (média ± SEM) (MACÊDO et al, 2011).

4.5.5. Determinação da expressão do mRNA de Il1beta, Il-33 e Cox-2 nas bexigas dos camundongos

Extração do RNA Total:

As amostras foram congeladas a -80°C até o momento da extração. Um homogenato com trizol será realizado, e em seguida, a extração de RNA foi realizada com o KIT Rneasy Liquid Tissue Mini (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com o protocolo do fabricante. Após a finalização do processo de extração, 1µl de RNA total de cada amostra foi dosado com o Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) com a finalidade de verificar a qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar(cDNA).

Síntese de cDNA:

A síntese de cDNA foi feita com o iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo da reação contém 1µl da enzima transcriptase reversa, 4µl do tampão SX iScript Reaction MIX (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), um volume da amostra de RNA uniformizado para 200ng/µl e completado a reação com água livre de nuclease em volume suficiente para completar 20µl. O protocolo padrão do termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, USA) foi: 25°C por 5 min, 42°C por 30min e 85°C por 5min. O cDNA foi armazenado em freezer a -200C até sua posterior utilização no PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

4.5.6. Análise da expressão do F4/80 por imunofluorescência

Os blocos de parafina contendo bexiga foram cortados, na espessura de 4 µm, 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-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 µL

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.

4.5.7. Análise estatística

A análise estatística, realizada com o software GraphPad Prism®, versão 9.01, foi inicialmente realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Após verificar normalidade das amostras, realizado o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos, seguidos do teste de comparações múltiplas de Bonferoni ou teste de Dunn, baseando-se na continuidade das variáveis em análise. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade dose-resposta de alfa-bisabolol sobre parâmetros em protocolo de cistite hemorrágica de animais induzida por ifosfamida.

O protocolo foi realizado com a indução da cistite hemorrágica por ifosfamida 400 mg/kg via intraperitoneal. A administração de ABIS nas doses de 5 mg/kg, 10 mg/kg e 50 mg/kg foi realizada de acordo com o protocolo previamente descrito. Na análise do peso úmido vesical, observamos na figura 7 que a ifosfamida induziu o aumento do peso úmido vesical ($20,45 \pm 1,84$ mg/20g do animal) quando comparado com o controle negativo tratado apenas com salina ($8,29 \pm 0,49$ mg/20g do animal). Adicionalmente, o tratamento com ABIS nas três doses supracitadas reduziu esse parâmetro (ABIS 5 mg/kg: $16,9 \pm 0,75$; ABIS 10 mg/kg: $16,24 \pm 1,20$; ABIS 50 mg/kg: $13,96 \pm 1,58$ mg/20g do animal). Na figura 8 observamos as bexigas de cada um dos grupos.

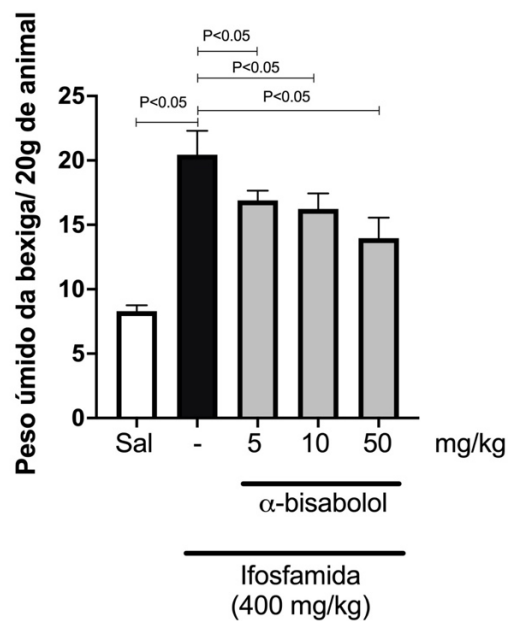


Figura 7 Efeito de diferentes doses de alfa-bisabolol sobre o peso úmido vesical na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Os resultados são apresentados como média \pm EPM ($n = 6$ /grupo). Para comparação entre os grupos, realizou-se a análise estatística com ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

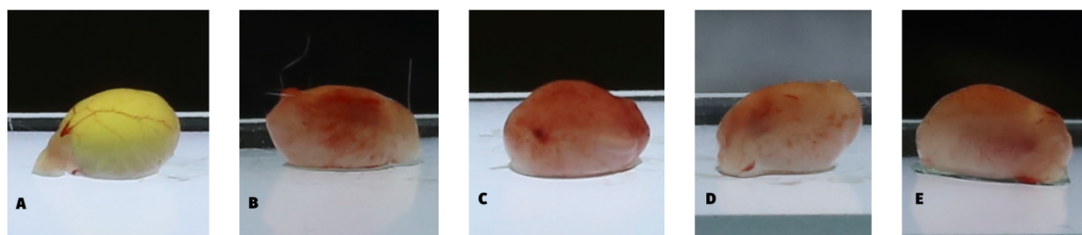


Figura 8 – Imagens representativas das bexigas.

A Salina. **B** IFO. **C** ABIS 5 mg/kg. **D** ABIS 10 mg/kg. **E** ABIS 50 mg/kg.

Na avaliação histopatológica das bexigas foram utilizados os critérios de Gray et al. (1986). Nas bexigas de animais injetados com Ifosfamida somente foi observado acentuado edema, hemorragia, congestão vascular e ulceração, apresentando escores de 2 (2-3), o que diferiu ($P < 0,05$) do grupo controle tratado com salina (0[0-0]), no qual foi observado tecido dentro dos padrões de normalidade, sem sinais de hemorragia (figura 9). Quanto aos animais tratados com ABIS, a dose de 50 mg/kg contribuiu para uma redução significativa ($P < 0,05$) dos escores de dano histopatológico para 1(1-3) quando comparadas com bexigas somente com ifosfamida. As bexigas dos grupos tratados com ABIS nas doses de 5 ou 10 mg/kg não apresentaram sinais de proteção versus o grupo ifosfamida. Os resultados são mostrados na figura 10 e na tabela 3.

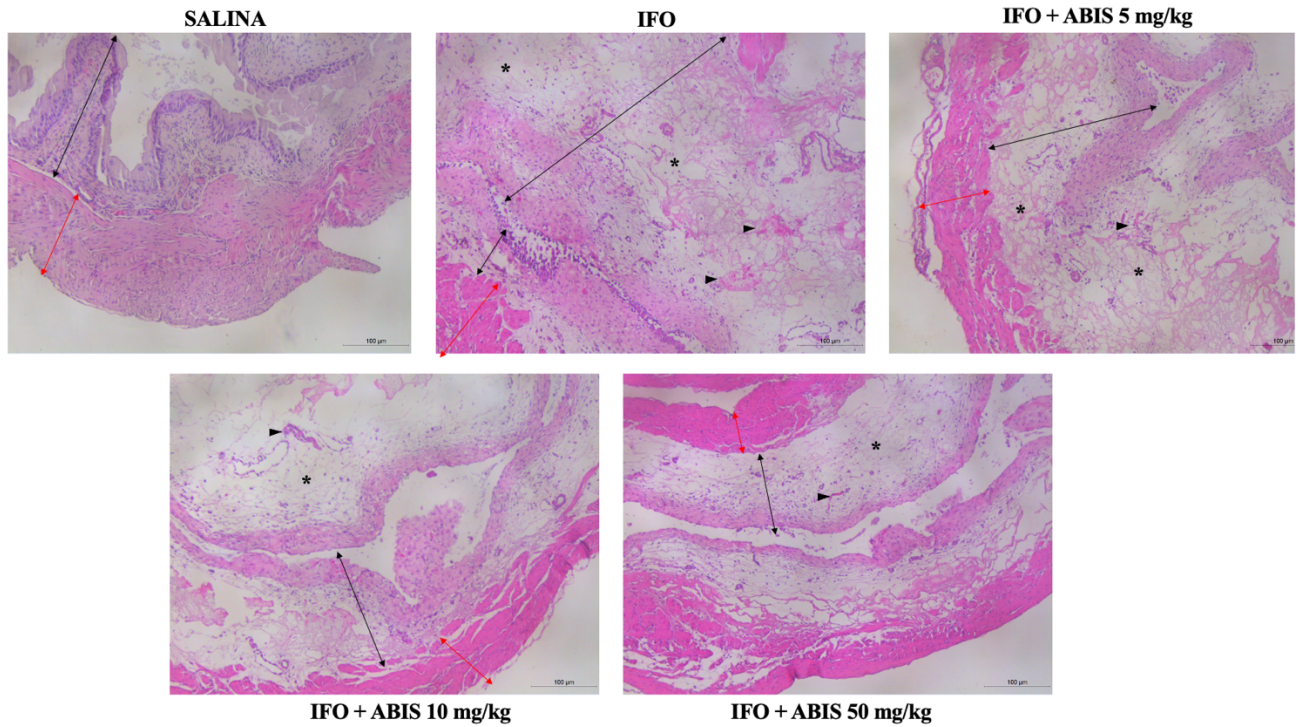


Figura 9 Fotomicrografias representativas das bexigas. As setas pretas representam o epitélio de revestimento e tecido conjuntivo. As setas vermelhas representam a camada muscular. Os asteriscos representam as áreas com edema e os triângulos representam as áreas de vasos com congestão vascular ou hemorragia. As bexigas foram processadas pela técnica de coloração de hematoxilina-eosina (HE) nos grupos experimentais. Barra da escala: 100 µm.

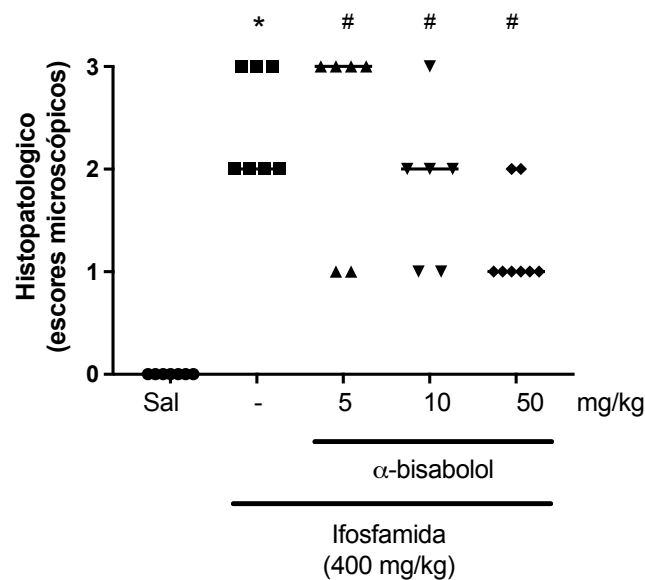


Figura 10. Efeito de diferentes concentrações de ABIS sobre as alterações histopatológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Os resultados são apresentados por medianas e valores mínimos e máximos. *P<0,05 versus o grupo salina; #P<0,05 versus ifosfamida.

| Grupos experimentais | Escore histopatológico |
|-----------------------------|-------------------------------|
| Salina | 0 (0-0) |
| Ifosfamida | 2 (2-3)* |
| IFO + ABIS 5 mg/kg | 3 (1-3) |
| IFO + ABIS 10 mg /kg | 2 (1-3) |
| IFO + ABIS 50 mg/kg | 1 (1-2)# |

Tabela 3. Diferentes concentrações de ABIS sobre as alterações histopatológicas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Os resultados são apresentados por medianas e valores mínimos e máximos. *P<0,05 versus o grupo salina; #P<0,05 versus ifosfamida.

5.2 Avaliação da atividade do alfa-bisabolol 50 mg/kg sobre parâmetros macroscópicos de edema e hemorragia em protocolo de cistite hemorrágica de animais induzida por ifosfamida.

A avaliação dos escores macroscópicos de edema (E) e hemorragia (H) mostram que a ifosfamida aumenta significativamente esses parâmetros [E: 2,5 (1-3); H: 2,5 (1-3)], quando comparados com o grupo o salina [E: 0 (0-0); H: 0 (0-0)]. Já o tratamento com ABIS na dose de 50 mg/kg mostrou significativa redução do edema e hemorragia [E: 1 (1-2); H: 1(1-2)] versus o grupo ifosfamida, como pode-se observar na figura 11.

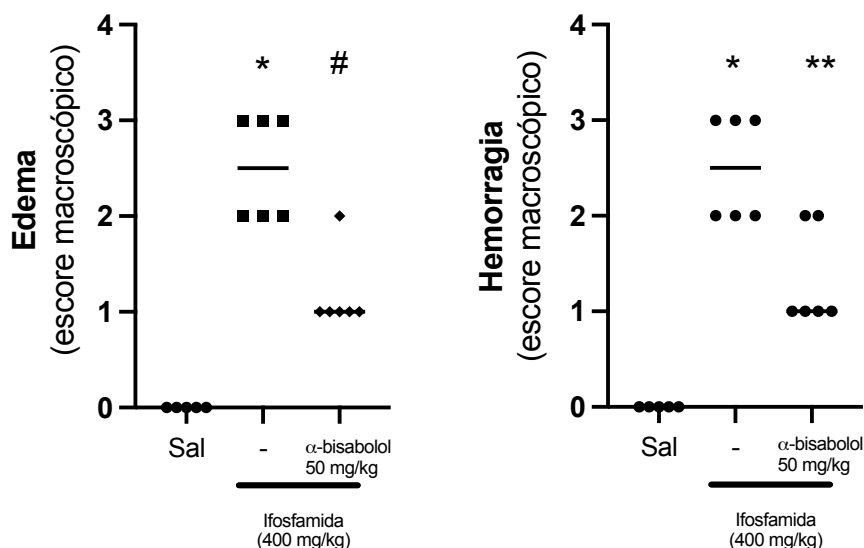


Fig 11. Efeito do ABIS sobre os escores macroscópicos de edema e hemorragia na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. O tratamento com ABIS na dose de 50 mg/kg reduz os escores de edema e hemorragia. Os resultados são apresentados por medianas e valores mínimos e máximos. A análise estatística foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. * $P < 0,05$ versus o grupo salina; # $P = 0,059$ versus ifosfamida; ** $p = 0,075$ versus ifosfamida.

5.3 Efeito do ABIS sobre a permeabilidade vascular na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

O tratamento com ifosfamida induziu um aumento significativo ($P < 0,05$) da permeabilidade vascular ($13,37 \pm 2,01 \mu\text{g/ml}$ de azul de Evans) medida através do extravasamento do corante na bexiga após 24 horas da sua administração quando comparado com o controle que recebeu somente salina ($0,26 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ de azul de Evans), como mostrado na figura 12. O grupo tratado com ABIS 50 mg/kg foi capaz de promover uma redução significativa desse parâmetro ($8,67 \pm 1,85 \mu\text{g/ml}$ de azul de Evans) versus o grupo tratado somente com as ifosfamida ($P < 0,05$).

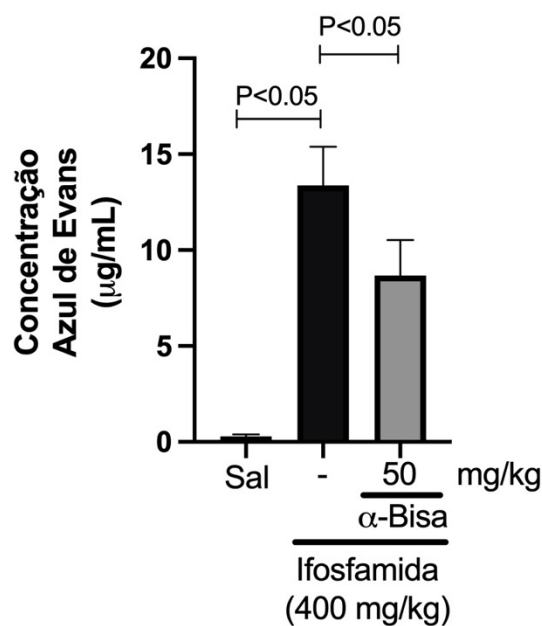


Fig. 12 Efeito do ABIS sobre a permeabilidade vascular no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. A análise estatística foi realizada com ANOVA, seguida de Bonferroni.

5.4 Efeito do ABIS sobre a expressão gênica de *Il1beta*, *Il33* e *Cox2* na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

Amostras de bexiga foram utilizadas para a quantificação da expressão gênica de marcadores da inflamação. O tratamento com a ifosfamida aumentou a expressão de *Il1beta* (SAL: $1,05 \pm 0,17$ vs. IFO: $396,9 \pm 126$), *Il33* (SAL: $1,15 \pm 0,29$ vs. IFO: $15,84 \pm 3,35$) e *Cox2* (SAL: $1,32 \pm 0,43$ vs. IFO: $39,09 \pm 12,21$) quando comparados com o grupo salina ($P < 0,05$). Adicionalmente, tratamento com ABIS reduziu a expressão de *Il1beta* (ABIS: $88,44 \pm 34,54$) e *Il33* (ABIS: $9,04 \pm 1,87$), sem interferir ($P > 0,05$) na expressão de *Cox2* (ABIS: $40,27 \pm 14,04$) quando comparado com o grupo ifosfamida (figura 13).

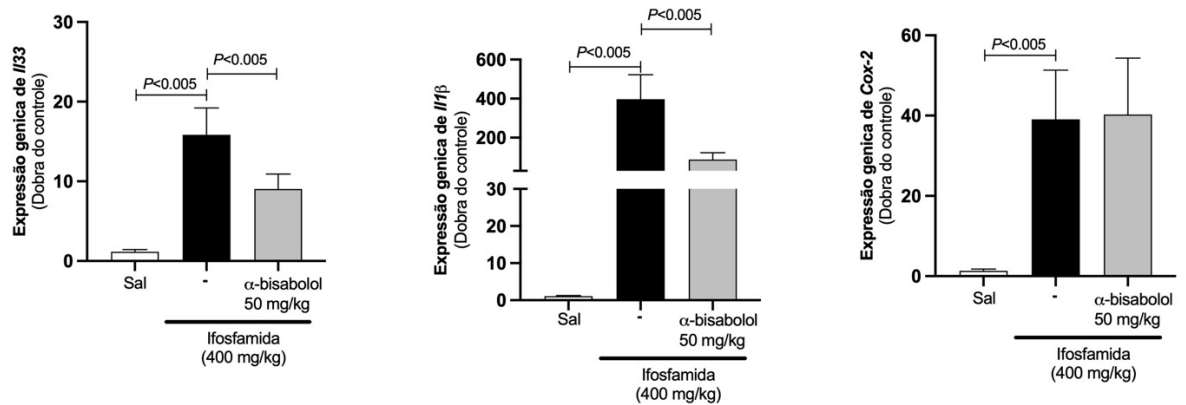


Fig. 13 Efeito do ABIS sobre a expressão gênica de *Il33*, *Il1β* e *Cox2* na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Os marcadores inflamatórios foram mensurados na bexiga. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

5.5 Efeito do ABIS na imunomarcação de F4/80 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.

A ifosfamida aumentou significativamente a expressão do F4/80 quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$), detectado por imunofluorescência. O grupo tratado com ifosfamida mostrou aumento ($p < 0,05$) da área de marcação para o F4/80 ($42,26 \pm 4,52$ % área de fluorescência) quando comparado com o grupo tratado somente com salina ($2,84 \pm 0,43$ % área de fluorescência), como evidenciado nas figuras 14 e 15. O grupo tratado com ABIS 50 mg/kg apresentou redução ($p < 0,05$) desse parâmetro ($9,02 \pm 0,25$ % área de fluorescência) versus o grupo tratado somente com ifosfamida.

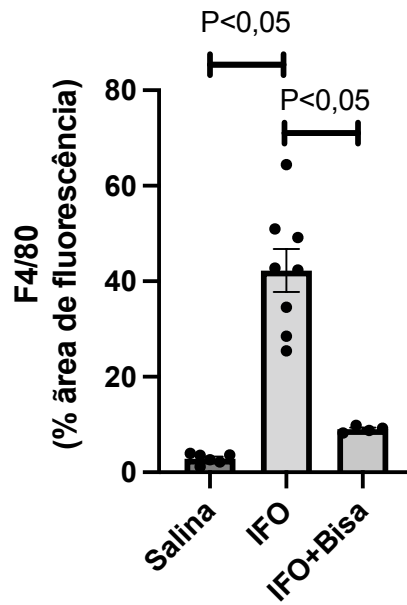


Fig. 14 Efeito do ABIS sobre a área de marcação para o F4/80 por imunofluorescência em bexigas de camundongos administrados com ifosfamida. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Bonferroni.

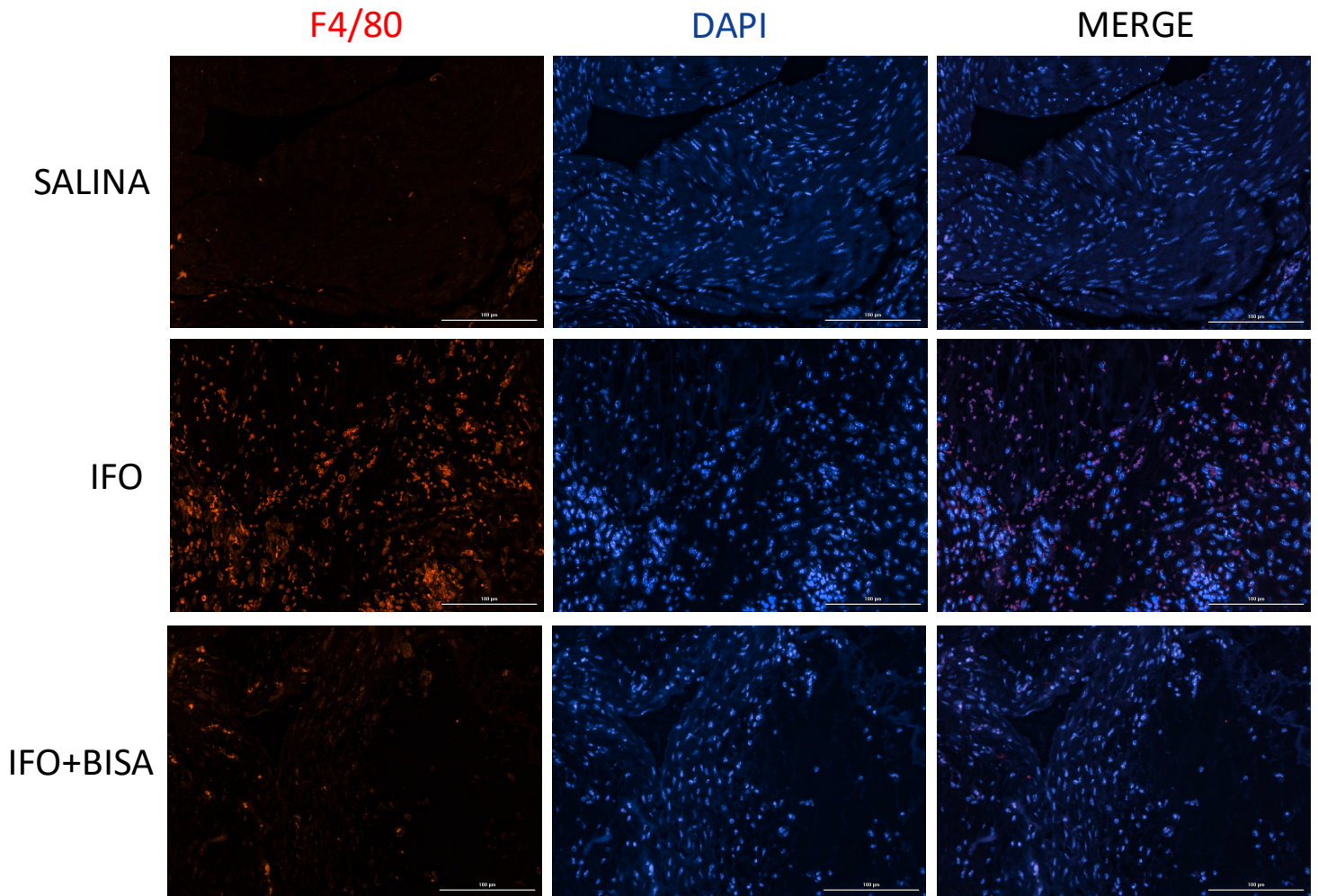


Fig. 15. Imagens representativas de imunofluorescência para F4/80 em bexiga de camundongos com cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Vermelho: F4/80; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x. Barra de escala: 100 μ m.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o terpeno α -bisabolol atenuou a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos Swiss. Tal resultado foi evidenciado pela redução do edema e hemorragia (escores macroscópicos, peso úmido vesical e permeabilidade vascular), redução de alterações histopatológicas e de parâmetros de inflamação.

A literatura provém consistentes relatos acerca dos efeitos do α -bisabolol como antimicrobiano, analgésico e anti-inflamatório (GUPTA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2002; VILJOEN; KAMATOU; DEMIRCI, 2006). Adicionalmente, vários modelos não-clínicos estudaram as propriedades de óleos essenciais ricos nesse composto ou deste isolado frente a patologias inflamatórias, como lesões incisionais ou desgranulação mastocitária (JARRAHI et al., 2010; KAMATOU; VILJOEN, 2010; MILLER et al., 1996), mas a eficácia do ABIS sobre a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos Swiss ainda não havia sido investigada. Com base nas evidências progressas acerca da atividade anti-inflamatória do ABIS, seu potencial efeito uroprotetor motivou essa pesquisa.

A manifestação da cistite hemorrágica por oxazafosforinas é bem descrita na literatura, onde tanto a administração de ifosfamida e de ciclofosfamida está, clinicamente, associada ao desenvolvimento de cistite hemorrágica em pacientes oncológicos. Experimentalmente, a injeção desses quimioterápicos reproduz com fidedignidade as características clínicas da cistite, marcadamente pelo espessamento da parede vesical e focos hemorrágicos na luz do órgão(LIMA et al., 2007b). A ifosfamida é um fármaco que, clinicamente, resulta em maior incidência da cistite hemorrágica. Por esse motivo, optou-se por esta como fármaco de escolha para a indução da cistite hemorrágica (RIBEIRO et al., 2002).

A primeira medida avaliada no nosso estudo, com o objetivo de testar o potencial efeito protetor do ABIS, foi o peso úmido vesical, método usado para quantificar o edema. Nesse experimento foram utilizadas três doses de ABIS, cuja escolha seguiu uma relação logarítmica entre as doses com o objetivo de identificarmos a dose capaz exibir os melhores resultados protetores (SALAHUDEEN; NISHTALA, 2017). Levamos em consideração, também, outros ensaios nos quais o ABIS foi testado para sua atividade anti-inflamatória e antinociceptiva(LEITE et al., 2011; ROCHA et al., 2011). Em tais

modelos, o ABIS evidenciou atividade farmacológica em faixas de doses que variam de 25 a 200 mg/kg de peso de animal (LEITE et al., 2011; ROCHA et al., 2011). De forma interessante, um estudo anterior havia destacado a atividade antinociceptiva do ABIS no modelo de dor visceral induzida por ciclofosfamida (LEITE et al., 2011), o que reforça a relevância da presente pesquisa. Apesar das três doses testadas no presente trabalho se mostrarem efetivas no controle do peso úmido vesical, a dose de 50 mg/kg foi a que mostrou maior redução. Além do parâmetro peso úmido vesical para a escolha da dose mais eficaz, utilizamos, também, o escore histopatológico. Novamente, a dose de 50 mg/kg foi a que evidenciou uma maior proteção contra alterações uroteliais e em tecido conjuntivo, além de prevenir a formação de focos hemorrágicos, quando comparada com o grupo das bexigas de animais tratados apenas com a ifosfamida. De forma interessante, as menores doses de ABIS, quais sejam, 5 e 10 mg/kg, não demonstraram efeito protetor quanto às alterações histopatológicas quando comparadas com o grupo ifosfamida. Frente aos resultados supracitados, a dose de 50 mg/kg foi, portanto, selecionada para dar continuidade aos experimentos subsequentes.

Após a escolha da dose de ABIS, o efeito antiedematogênico deste terpeno foi adicionalmente avaliado pela permeabilidade vascular ao Azul de Evans (YAO et al., 2018). Notavelmente, o ABIS (50 mg/kg) reduziu a permeabilidade vascular e consequente liberação do corante do sangue para os tecidos. A capacidade de terpenos em modular o edema e o processo inflamatório associado à cistite hemorrágica já é documentado (GONÇALVES et al., 2020b; KIUCHI et al., 2009a; WANG et al., 2021). De forma similar aos achados aqui reportados, Gonçalves et al. (2020) realizaram a investigação da ação anti-inflamatória do monoterpene α -felandreno na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos, sendo observado a redução da permeabilidade vascular (GONÇALVES et al., 2020a). Tal achado indica que o mecanismo de modulação desse evento edematogênico é inerente à classe dos terpenos.

O processo fisiopatológico da cistite hemorrágica está diretamente ligado à acroleína, que se acumula na bexiga e inicia o dano urotelial, expondo a camada conjuntiva e favorecendo a deflagração dos eventos clássicos da resposta inflamatória (BATISTA et al., 2006). Ribeiro e colaboradores em 2012 sugeriram um mecanismo para explicar a patogênese subjacente à cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Nesse modelo, em uma fase inicial, a ativação do fator de transcrição NF- κ B se mostra

aumentada, estimulando a produção de diversas citocinas como IL-1 β e TNF- α (KIUCHI et al., 2009b; RIBEIRO et al., 2012).

A IL-1 β é uma citocina crítica para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Pode estar presente nos tecidos, sendo produzida por qualquer tipo celular e atua em cooperação com diversas outras citocinas. É uma citocina crucial com função pró-inflamatória na patogênese do infarto agudo do miocárdio, da diabetes e da artrite reumatoide (DINARELLO, 2011a, 2011b). Compostos que possuem a função de reduzir a produção e/ou a atividade da IL-1 β são mais prováveis de impactarem positivamente no manejo da cistite hemorrágica na clínica (RIBEIRO et al., 2012).

No presente estudo mostramos que a expressão gênica da IL-1 β em animais tratados com a ifosfamida e ABIS (50 mg/kg) reduziu quando comparada aos animais tratados somente com ifosfamida. Esses resultados corroboram com o trabalho de Ribeiro e colaboradores (2012) que avaliaram a inibição de IL-1 β por pentoxifilina e o resultado foi redução das alterações macroscópicas e histopatológicas da bexiga em modelos de cistite hemorrágica. Outro trabalho consonante com o resultado da presente pesquisa é de Leite e colaboradores (2015) que inibiram seletivamente a IL-1 β através da administração de um antagonista para os receptores da IL-1, o IL-1ra, e obtiveram redução do edema, hemorragia, disfunção vesical e hiperalgesia vesical em animais injetados com ifosfamida (LEITE et al., 2015; RIBEIRO et al., 2012).

De forma análoga, em estudo que avaliou a ação anti-inflamatória do ABIS (50 mg/kg) em modelo animal de artrite reumatoide, foi revelada uma diminuição de IL-1 β no fluido sinovial dos animais tratados com ABIS, mostrando similaridade com os resultados do presente trabalho. Em ambos os trabalhos se evidencia a capacidade do ABIS em modular essa importante citocina da cascata inflamatória (HEIMFARTH et al., 2022).

Notavelmente, a IL-1 β faz parte de uma família de citocinas, que incluem a IL-18 e IL-33 (TEUFEL et al., 2022). De forma interessante, são expressas em formas inativas, pró-IL-1 β , pró-IL-18 e pró-IL-33, as quais, na vigência de um estímulo pró-inflamatório, são clivadas por caspase-1, via complexo inflamassoma, em suas formas ativas (DINARELLO, 2018). Considerando que a IL-33 faz parte dessa família de citocinas, é lúcido avaliar se esta teria papel na cistite hemorrágica.

Alinhado a esse raciocínio, o presente trabalho avaliou a expressão gênica da IL-33 e foi observado um aumento da expressão no grupo tratado somente com ifosfamida, quando comparada com o grupo salina, evidenciando a relação aumentada da IL-33 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. O tratamento com ABIS (50 mg/kg) mostrou redução dessa expressão. Os resultados estão em conformidade com os dados de Jensen e colaboradores (2018), que avaliaram a expressão de IL-33 em protocolo animal de cistite intersticial induzida por catelicidina LL-37 (um peptídeo humano presente em bexigas inflamadas). A indução com LL-37 foi realizada em animais WT (*wild type*, selvagens) e animais com deficiência de mastócitos. Os animais com deficiência de mastócitos mostraram diminuição da expressão de IL-33 quando comparados com os animais WT, e ainda obtiveram redução dos níveis de inflamação e da dor (JENSEN et al., 2018).

Não está claro como o ABIS modula a expressão de IL-1 β e IL-33, se de forma direta ou indireta., mas parte de seu efeito anti-inflamatório se evidenciou pela redução da expressão das referidas citocinas. Tais efeitos podem se dar, por exemplo, via inibição do inflamassoma (NAGOOR MEERAN et al., 2020; YANG et al., 2019). Meeran e colaboradores evidenciaram um efeito protetor do α -Bisabolol contra o infarto do miocárdio induzido por agonista β -adrenérgico em ratos. Esse efeito foi observado pela atenuação da inflamação, da disfunção lisossômica, da ativação do inflamassoma NLRP3 e da modulação o fluxo autofágico (NAGOOR MEERAN et al., 2020).

Outra possibilidade de modulação da expressão de citocinas da família da IL-1 pelo ABISA pode envolver o bloqueio de fatores de transcrição, como NF- κ B (KIM et al., 2011b) Alinhado a esse raciocínio, o estudo de Kim e colaboradores demonstrou que os efeitos inibitórios de α -bisabolol na resposta inflamatória induzida por LPS, um agonista de TLR4, em macrófagos RAW264.7 se dá através da inibição da sinalização de NF- κ B e AP-1 (ARUNACHALAM et al., 2022b; KIM et al., 2011b).

De forma interessante, um mecanismo adicional de ativação do inflamassoma e síntese de IL-1 e IL-33 envolve o estresse oxidativo (CAYROL; GIRARD, 2018). Adicionalmente, há relatos consistentes de que o estresse oxidativo serve como um ponto de verificação chave para a liberação de IL-33 pelo epitélio em modelos de lesão das vias aéreas (UCHIDA et al., 2017). Ainda, o estresse oxidativo é uma marca importante da cistite hemorrágica (ABRAHAM; RABI; SELVAKUMAR, 2009; KIM et al., 2015).

Considerando o marcante efeito antioxidante relatado para o ABIS (RAMAZANI et al., 2022), pode-se inferir que a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio possa ser o mecanismo pelo qual o ABIS reduza a expressão de IL-1 e IL-33 observada em nosso modelo.

Um ponto chave na ação de citocinas da família da IL-1 sobre seus receptores é a ativação de uma sequência de eventos de fosforilação que resulta na ativação da sinalização do NF- κ B e das vias de proteína quinase ativada por mitógenos, JNK e p38 (WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010a). Em conjunto, esses mecanismos culminam com a indução da expressão de genes alvo da via canônica da IL-1, como IL-6, IL-8, MCP-1, COX-2 e IL-1beta (WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010a). Nesse sentido, avaliamos o efeito do ABIS sobre a expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2).

As ciclooxigenases são enzimas que catalisam a complexa conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos, que atuam como gatilhos para desencadear respostas fisiológicas e fisiopatológicas do organismo (DANNENBERG et al., 2001; JAWABRAH AL-HOURANI et al., 2011). Das três isoformas descritas até o momento (COX-1, COX-2 e COX-3), a COX-2 é uma isoforma que se apresenta aumentada durante eventos inflamatórios. Expressa importante papel na dor, na ativação tumoral, nas doenças neurodegenerativas e na inflamação (DUBOIS et al., 1998; RIBEIRO et al., 2012). O papel da COX-2 já foi bem documentado em na patogênese da cistite hemorrágica (HU et al., 2003; LIMA et al., 2007b; MACEDO et al., 2007, 2008b, 2012).

Nosso grupo estabeleceu o papel da COX-2 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida ao se testar o efeito do etoricoxib (inibidor seletivo COX-2) e indometacina (inibidor não seletivo). Foi observado que a COX-2 é altamente expressa após 24 h de administração da Ifosfamida (MACEDO et al., 2008a). Outra importante contribuição do grupo sobre o papel da COX-2 na patogênese da cistite hemorrágica foi realizada por Ribeiro e Colaboradores (2002). Nesse trabalho foi investigado a participação de outras citocinas atuando junto com a COX-2. Tal estudo avaliou o efeito da administração de talidomida e pentoxifilina (inibidores não seletivos das citocinas) sobre a imun expressão da COX-2. Concluiu-se que esses fármacos previnem alguns dos parâmetros inflamatórios, quando comparados com o grupo injetado apenas ifosfamida. Por fim, foi feita a administração dos inibidores não seletivos de citocinas antes da ifosfamida,

resultando em uma menor expressão da COX-2. Esse achado demonstra que existe um papel das citocinas na indução da expressão da COX-2 no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida(RIBEIRO et al., 2002).

Em nosso trabalho realizamos a avaliação da expressão de *Cox2*, frente a sua já bem descrita importância na cistite hemorrágica. Marcadamente, o grupo tratado apenas com ifosfamida apresentou aumento da expressão de *Cox2* quando comparado com o grupo salina, o que corrobora com os achados supracitados. Por outro lado, o grupo injetado com ifosfamida e que recebeu o ABIS 50 mg/kg manteve os níveis elevados de expressão de *Cox2* quando comparado com o grupo tratado somente com ifosfamida. Apesar do ABIS ter, nessa pesquisa, se mostrado eficiente para diminuir alguns parâmetros do processo inflamatório da cistite hemorrágica, ele não foi capaz de modular a expressão de *Cox2*.

A superexpressão da enzima COX-2 está associada a várias condições fisiopatológicas, incluindo doenças inflamatórias. Assim, tal achado aparenta ser conflitante com o efeito anti-inflamatório descrito para o ABIS no presente estudo. Uma potencial justificativa para esse resultado pode envolver a regulação do gene COX-2 a qual é controlada em vários níveis, incluindo transcrição gênica e eventos pós-transcricionais (HARPER; TYSON-CAPPER, 2008). Conforme revisto por Harper e colaboradores, a estabilidade do mRNA de COX-2 e a eficiência da tradução são governadas por vários elementos regulatórios dentro da região 3' não traduzida (HARPER; TYSON-CAPPER, 2008). Curiosamente, o ABIS foi capaz de diminuir a expressão da COX-2 em modelos animais para a doença de Parkinson em ratos(JAVED et al., 2020b). O ABIS também foi capaz de modular expressão de COX-2 através de um modelo experimental de nefrotoxicidade induzida por doxorubicina em camundongos (ARUNACHALAM et al., 2022a). Esses autores utilizaram a dose de 25 mg/kg de ABIS e conseguiram ter redução de iNOS, TNF- α , COX-2 e outras citocinas (ARUNACHALAM et al., 2022a).

Tendo em vista que prostaglandinas tem um papel importante na gênese de eventos edematogênicos e que o ABIS foi capaz de atenuar significativamente o edema, pode-se sugerir que parte do efeito farmacológico desse terpeno envolva alguma regulação pós-translacional da COX-2. Uma hipótese envolve a redução da própria produção de prostaglandina E2 (PGE2). Um estudo *in vitro* com células RAW264.7,

macrófagos murinos, evidenciaram que concentrações não tóxicas de α -bisabolol (50,0 $\mu\text{g/mL}$) e de β -bisabolol (1,6-50,0 $\mu\text{g/mL}$) inibem significativamente a produção de mediadores inflamatórios, como óxido nítrico, PGE2 e TNF- α (EGBUTA et al., 2022). No presente estudo, contudo, não se quantificaram os níveis de PGE2.

Como mencionado anteriormente, citocinas da família da IL-1 tem papel importante na liberação de vários mediadores no contexto da inflamação, o que inclui a quimiocina MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos, também conhecida como *Chemokine (CC-motif) ligand 2 (CCL2)* (WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010b). A MCP-1 tem um papel importante na orquestração do processo inflamatório, por atrair células inflamatórias, como monócitos/macrófagos, e aumentar a expressão de citocinas no local da inflamação (SINGH; ANSHITA; RAVICHANDIRAN, 2021). No próprio contexto da cistite hemorrágica, os níveis urinários de MCP-1 são encontrados elevados (AUGÉ et al., 2013). No modelo experimental de cistite intersticial/síndrome de dor vesical, Xu e colaboradores desenvolveram um novo modelo de camundongo de secreção urotelial de MCP-1 (URO-MCP-1) (XU et al., 2016). Demonstrou-se que os camundongos URO-MCP-1 expressam mRNA de MCP-1 no epitélio da bexiga e proteína MCP-1 na urina e desenvolvem inflamação da bexiga 24 horas após a administração intravesical de uma única dose subnociva de lipopolissacarídeo (LPS) (XU et al., 2016). De forma interessante, as bexigas inflamadas de camundongos URO-MCP-1 exibiram níveis elevados do mRNAs de IL-1 β , IL-6, bem como aumento da infiltração de macrófagos (XU et al., 2016). Diante de tais evidências, buscamos verificar se o ABIS alteraria o padrão de acumulação de macrófagos durante a cistite hemorrágica, o que justificaria seu efeito anti-inflamatório.

A glicoproteína F4/80 presente nos macrófagos é usada amplamente para detectar a infiltração de macrófagos em tecidos inflamados. O anticorpo monoclonal anti-F4/80 foi desenvolvido para detectar antígenos presentes exclusivamente em fagócitos. A relação do infiltrado de macrófagos e a cistite hemorrágica foi estudada por Martins e colaboradores (2012), onde camundongos nocaute com deleção para o gene que expressa o receptor P2X7 (receptor purinérgico apontado como responsável por deflagar processos patológicos na bexiga) foram usados no experimento. Tal estudo mostrou uma diminuição da marcação de F4/80 em animais nocaute para P2X7, quando comparado com os animais selvagens (KHAZEN et al., 2005; MARTINS et al., 2012). De forma relevante, no presente trabalho avaliamos a marcação do F4/80 e pudemos observar um aumento da

imunofluorescência para esse marcador na bexiga de animais injetados com ifosfamida. Por outro lado, na bexiga dos animais tratados com ABIS (50 mg/kg) observou-se uma redução importante na marcação para F4/80, indicando a menor acumulação de macrófagos. Como descrito no modelo de cistite intersticial descrito por Xue *et al*, camundongos URO-MCP-1 e que apresentam acumulação consequente de macrófagos na bexiga, são hipersensíveis a irritantes da bexiga, como LPS, e desenvolvem dor pélvica e disfunção miccional após a indução da inflamação (XU et al., 2016), de forma análoga ao descrito para a cistite hemorrágica (MACEDO et al., 2011). Esses achados indicam a importância dos macrófagos na patogênese da cistite hemorrágica e que o ABIS, ao inibir a acumulação dessas células, tem a capacidade de interferir no desenvolvimento dessa toxicidade da ifosfamida.

Esses resultados, em conjunto, ressaltam a potencial aplicabilidade do ABIS na atenuação das manifestações inflamatórias associadas à cistite hemorrágica. Ao que parece, os achados experimentais ora descritos no presente trabalho parecem fenotípicos, visto que em seu mecanismo de ação o ABIS deve atuar por um alvo chave no topo de um braço da cascata inflamatória que contribui reduzir uma plêiade de mediadores e mecanismos inflamatórios descritos.

Esse trabalho sobre os efeitos do ABIS apresenta limitações, pois utilizamos somente uma administração um dos compostos derivado de óleo essencial uma hora antes da indução da CH com ifosfamida. Outras doses e outros tempos de administração podem gerar dados que elucidem ainda mais os efeitos farmacológicos do ABIS.

Observamos que muitas perguntas ainda permanecem abertas acerca do efetivo mecanismo de ação do ABIS como, por exemplo, 1) Como o ABIS regula o processamento e ativação de citocinas da família da IL-1?; 2) O ABIS modula a ação de prostaglandinas produtos da via da COX-2?; 3) Como o ABIS modula a migração de monócitos/macrófagos para o sitio de inflamação?

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados desse estudo, podemos concluir que:

- O α -bisabolol conseguiu reduzir os eventos edematogênicos na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.
- O α -bisabolol atenuou a resposta inflamatória na cistite hemorrágica via redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-33, e modulação negativa da migração de monócitos/macrófagos.
- Os efeitos do α -bisabolol observado não foram relacionados na modulação da ciclooxigenase-2 (COX-2).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, P.; RABI, S.; SELVAKUMAR, D. Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress and bladder injury in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rat. *Cell Biochemistry and Function*, v. 27, n. 1, p. 56–62, jan. 2009.

AMARAL, V. DO et al. Alfa-bisabolol: uma revisão de propriedades bioativas antiflogísticas. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 12, p. e447101220618, 26 set. 2021.

ARUNACHALAM, S. et al. α -Bisabolol Attenuates Doxorubicin Induced Renal Toxicity by Modulating NF- κ B/MAPK Signaling and Caspase-Dependent Apoptosis in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 18, 1 set. 2022a.

ARUNACHALAM, S. et al. α -Bisabolol Attenuates NF- κ B/MAPK Signaling Activation and ER-Stress-Mediated Apoptosis by Invoking Nrf2-Mediated Antioxidant Defense Systems against Doxorubicin-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Nutrients*, v. 14, n. 21, p. 4648, 3 nov. 2022b.

ASSEY, S. et al. PREVENTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED HEMORRHAGIC CYSTITIS BY GLUCOSE-MANNOSE BINDING PLANT LECTINS AMERICA% UROLOGICAL AsswuT~oS, I S C. [s.l: s.n.].

AUGÉ, C. et al. Relevance of the cyclophosphamide-induced cystitis model for pharmacological studies targeting inflammation and pain of the bladder. *European Journal of Pharmacology*, v. 707, n. 1–3, p. 32–40, maio 2013.

BATISTA, C. K. L. P. et al. A model of hemorrhagic cystitis induced with acrolein in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39, n. 11, nov. 2006.

BEZERRA, S. B. et al. Bisabolol-Induced Gastroprotection Against Acute Gastric Lesions: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide, and K ATP + Channels. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*, v. 12, n. 6, p. 1403–1406, 2009.

BLUMENTHAL, M. *The complete German commission E monographs*. London, England: Churchill Livingstone, 1998.

CAYROL, C.; GIRARD, J.-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunological Reviews*, v. 281, n. 1, p. 154–168, jan. 2018.

CHABNER, B. *Princípios gerais da quimioterapia do câncer*. Em: BRUNTON, L.; BJÖRN, K. (Eds.). *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman*. 13. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

CHABNER, B. et al. *Agentes Citotóxicos*. Em: BRUNTON, L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. (Eds.). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 13. ed. São Paulo: AMGH, 2018.

CHU, E.; SARTORELLI, A. *Quimioterapia do Câncer*. Em: KATZUNG, B. (Ed.). *Farmacologia Clínica e Básica*. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

COX, P. J. CYCLOPHOSPHAMIDE CYSTITIS-IDENTIFICATION OF ACROLEIN AS THE CAUSATIVE AGENT**Biochemical Pharmacology*. [s.l: s.n.].

DANNENBERG, J. et al. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *THE LANCET*, p. 544–551, 2001.

- DE CORREIA, SUZIMONE J. et al. Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das Folhas de Tapirira guianensis Quim. Nova. [s.l: s.n.].
- DE O. LEITE, G. et al. (-)- α -Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. *Fitoterapia*, v. 82, n. 2, p. 208–211, 2011.
- DE SOUZA, A. T. et al. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 47, n. 2, p. 182–187, 2008.
- DECHANT, K. L. et al. DRUG EVALUATION Ifosfamide/Mesna A Review of its Antineoplastic Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in Cancer. *Drugs*, v. 42, n. 3, p. 428–467, 1991.
- DINARELLO, C. A. Blocking interleukin-1 β in acute and chronic autoinflammatory diseases. *Journal of Internal Medicine*. Anais...jan. 2011a.
- DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, v. 117, n. 14, p. 3720–3732, 7 abr. 2011b.
- DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, v. 281, n. 1, p. 8–27, jan. 2018.
- DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease *FASEB J.* [s.l: s.n.].
- EDWARD CHU. Princípios da Oncologia Clínica. Em: HOFF, P. et al. (Eds.). *TRATADO DE ONCOLOGIA*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2013.
- EGBUTA, M. A. et al. In Vitro Anti-Inflammatory Activity of Essential Oil and β -Bisabolol Derived from Cotton Gin Trash. *Molecules*, v. 27, n. 2, p. 526, 14 jan. 2022.
- EPSTEIN, J. Robbins Basic Pathology. 10. ed. Philadelphia: Elsevier - Health Sciences Division, 2017. v. 1
- GARDINER, P. Chamomile (*Matricaria recutita*, *Anthemis nobilis*). Longwood Herbal Task Force. Disponível em: <<http://www.mcp.edu/herbal/default.html>>. Acesso em: 26 nov. 2022.
- GOMES, T. N. A. et al. PARTICIPATION OF TNF-ALPHA AND IL-1 IN THE PATHOGENESIS OF CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED HEMORRHAGIC CYSTITIS. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 28, n. 10, p. 1103–1108, 1995.
- GONÇALVES, R. L. G. et al. 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. 10, p. 1835–1848, 1 out. 2020a.
- GONÇALVES, R. L. G. et al. 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. 10, p. 1835–1848, 15 out. 2020b.
- GUPTA, V. et al. Pharmacological Potential of *Matricaria recutita*-A Review *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ijpsdr.com>.
- GURTOO, H. L. et al. Basis and new developments in the Field of oxazaphosphorines. *Cancer Investigation*, v. 6, n. 5, p. 513–532, 1988.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of preCell. [s.l: s.n.].

- HANG, P. et al. *Fármacos Anticâncer*. Em: RANG, P. et al. (Eds.). *Rang & Dale: Farmacologia*. 8. ed. [s.l.] Elsevier, 2016.
- HARPER, K. A.; TYSON-CAPPER, A. J. Complexity of COX - 2 gene regulation. *Biochemical Society Transactions*, v. 36, n. 3, p. 543–545, 1 jun. 2008.
- HEIMFARTH, L. et al. Pharmacological effects of a complex α -bisabolol/ β -cyclodextrin in a mice arthritis model with involvement of IL-1 β , IL-6 and MAPK. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 151, 1 jul. 2022.
- HENSLEY, M. L. et al. American society of clinical oncology 2008 clinical practice guideline update: Use of chemotherapy and radiation therapy protectants. *Journal of Clinical Oncology*, v. 27, n. 1, p. 127–145, 1 jan. 2009.
- HILGARD, P.; POHL, J. Oxazaphosphorine toxicity reduction by mesna. *Cancer Treatment Reviews*, v. 17, p. 17–220, 1990.
- HU, V. Y. et al. COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 284, p. 574–585, 2003.
- JANG, T. Y.; KIM, Y. H. Interleukin-33 and mast bridge innate and adaptive immunity: From the allergologist's perspective. *International Neurourology Journal Korean Continence Society*, , 2015.
- JARDIM, D.; BASTOS, D. *Agentes Alquilantes*. Em: HOFF, P. et al. (Eds.). *Tratado de Oncologia*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 707–722.
- JARRAHI, M. et al. Evaluation of topical *Matricaria chamomilla* extract activity on linear incisional wound healing in albino rats. *Natural Product Research*, v. 24, n. 8, p. 697–702, maio 2010.
- JAVED, H. et al. α -Bisabolol, a Dietary Bioactive Phytochemical Attenuates Dopaminergic Neurodegeneration through Modulation of Oxidative Stress, Neuroinflammation and Apoptosis in Rotenone- Induced Rat Model of Parkinson's disease. *Biomolecules*, v. 10, n. 10, p. 1–22, 1 out. 2020a.
- JAVED, H. et al. α -Bisabolol, a Dietary Bioactive Phytochemical Attenuates Dopaminergic Neurodegeneration through Modulation of Oxidative Stress, Neuroinflammation and Apoptosis in Rotenone- Induced Rat Model of Parkinson's disease. *Biomolecules*, v. 10, n. 10, p. 1–22, 1 out. 2020b.
- JAWABRAH AL-HOURANI, B. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors: A literature and patent review (2009 2010). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, set. 2011.
- KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, jan. 2010.
- KHAZEN, W. et al. Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Letters*, v. 579, n. 25, p. 5631–5634, 24 out. 2005.
- KIM, S. et al. Inhibitory effects of (-)- α -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. 10, p. 2580–2585, out. 2011a.
- KIM, S. et al. Inhibitory effects of (-)- α -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. 10, p. 2580–2585, out. 2011b.
- 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, 31 mar. 2015.

KIUCHI, H. et al. Sesquiterpene Lactone Parthenolide Ameliorates Bladder Inflammation and Bladder Overactivity in Cyclophosphamide Induced Rat Cystitis Model by Inhibiting Nuclear Factor- κ B Phosphorylation. *Journal of Urology*, v. 181, n. 5, p. 2339–2348, maio 2009a.

KIUCHI, H. et al. Sesquiterpene Lactone Parthenolide Ameliorates Bladder Inflammation and Bladder Overactivity in Cyclophosphamide Induced Rat Cystitis Model by Inhibiting Nuclear Factor- κ B Phosphorylation. *Journal of Urology*, v. 181, n. 5, p. 2339–2348, maio 2009b.

KORKMAZ, A. et al. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. *Journal of Urology*, v. 173, n. 5, p. 1793–1796, 2005.

LEE, G.; ROMIH, R.; ZUPANČIČ, D. *Cystitis: From urothelial cell biology to clinical applications*. BioMed Research International Hindawi Publishing Corporation, , 2014.

LEITE, C. A. V. G. et al. Target inhibition of IL-1 receptor prevents ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *Journal of Urology*, v. 194, n. 6, p. 1777–1786, 1 dez. 2015.

LEITE, G. DE O. et al. (–)- α -Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. *Fitoterapia*, v. 82, n. 2, p. 208–211, mar. 2011.

LIMA, M. ESTUDO DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA. Fortaleza/Ce: Universidade Federal do Ceará, 1994.

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, abr. 2007a.

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. 2007b.

LINDER, B.; CHAO, N.; GOUNDER, M. Chemotherapy and radiation-related hemorrhagic cystitis in cancer patients. Disponível em: <<https://www.uptodate.com/contents/chemotherapy-and-radiation-related-hemorrhagic-cystitis-in-cancer-patients>>. Acesso em: 17 nov. 2022.

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, 5 nov. 2007.

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*, 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, 3 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.

MANN, C.; STABA, E. J. *The chemistry, pharmacology, and commercial formulations of chamomile. Herbs, spices, and medicinal plants: recent advances in botany, horticulture, and pharmacology (USA)*, 1986.

- MARTENS, D. Chamomile: The Herb and the Remedy. *The Journal of the Chiropractic Academy of Homeopathy*, v. 6, p. 15–18, 1995.
- MARTIN JENSEN, 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. 2018a.
- MARTIN JENSEN, 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, 1 out. 2018b.
- MARTINS, J. P. 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.
- MATOS, F. J. A. et al. Constituents of Brazilian Chamomile Oil. *J. Essent. Oil Res*, v. 5, p. 337–339, 1993.
- MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B.; MAYER, J. A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother. Res*, v. 20, p. 519–530, 2006.
- MILLER, T. et al. Effects of some Components of the Essential Oil of Chamomile, *Chamomilla recutita*, on Histamine Release from Rat Mast Cells. *Planta Medica*, v. 62, p. 60–61, 1996.
- MORAIS, M. M. et al. Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis-comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. *Braz J Med Biol Res*, v. 32, n. 10, p. 1211–1215, 1999.
- MOTA, J. M. et al. Interleukin-11 Attenuates Ifosfamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. *International Braz J Urol*, v. 33, n. 5, p. 704–710, 2007.
- NAGOOR MEERAN, M. F. et al. α -Bisabolol protects against β -adrenergic agonist-induced myocardial infarction in rats by attenuating inflammation, lysosomal dysfunction, NLRP3 inflammasome activation and modulating autophagic flux. *Food & Function*, v. 11, n. 1, p. 965–976, 2020.
- O. FELIPE, L.; L. BICAS, J. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nova na Escola*, v. 39, n. 2, 2017.
- PINO, J. A. et al. Essential oil of chamomile *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. From Iran. *Journal of Essential Oil Research*, v. 14, n. 6, p. 407–408, 2002.
- RAMAZANI, E. et al. Pharmacological and biological effects of alpha-bisabolol: An updated review of the molecular mechanisms. *Life Sciences*, v. 304, p. 120728, set. 2022.
- RIBEIRO, R. et al. Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches and new insights. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, v. 2, n. 2, p. 95, 2012.
- RIBEIRO, R. A. et al. TUMOR NECROSIS FACTOR-AND INTERLEUKIN-1 MEDIATE THE PRODUCTION OF NITRIC OXIDE INVOLVED IN THE PATHOGENESIS OF IFOSFAMIDE INDUCED HEMORRHAGIC CYSTITIS IN MICE. *THE JOURNAL OF UROLOGY*, v. 167, p. 2229–2234, 2002.
- ROCHA, N. F. M. et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (–)- α -bisabolol in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 384, n. 6, p. 525–533, 26 dez. 2011.
- RUSSO, P. Urologic emergencies in the cancer patient. *Seminars in oncology*, v. 27, p. 284–298, 1 jul. 2000.
- SAKTHIVEL, S. K. et al. CXCL10 blockade protects mice from cyclophosphamide-induced cystitis. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*, v. 6, n. 1, p. 6, 28 dez. 2008.

SALAHUDEEN, M. S.; NISHTALA, P. S. An overview of pharmacodynamic modelling, ligand-binding approach and its application in clinical practice. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 25, n. 2, p. 165–175, fev. 2017.

SALAMON, I. Production of chamomile, *chamomilla recutita* (L.) rauschert, in slovakia. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, v. 1, n. 1–2, p. 37–45, 13 jul. 1992.

SHAW, I. C.; GRAHAM, M. I. Mesna-a short review *Cancer Treatment Reviews*. [s.l: s.n.].

SIDAU, B.; SHAW, I. Detection of sodium 2-mercaptoethanesulphonate (mesna) by hplc using post column reaction colorimetry and electrochemical detection. *Journal of chromatography*, v. 311, 1984.

SIGMA-ALDRICH. FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO (-)-Alfa-Bisabolol. Sigma-Aldrich São Paulo Sigma-Aldrich, , 3 dez. 2022.

SINGH, S.; ANSHITA, D.; RAVICHANDIRAN, V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *International Immunopharmacology*, v. 101, p. 107598, dez. 2021.

SOUZA-FILHO, M. et al. Involvement of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis The involvement of nitric oxide (NO) and the potential modulation of NO synthase (NOS) ac *American Journal of Pathology*. [s.l: s.n.].

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

TAKAMOTO, S. et al. Monitoring of urinary acrolein concentration in patients receiving cyclophosphamide and ifosfamide. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. *Anais...* 25 jun. 2004.

TEUFEL, L. U. et al. IL-1 family cytokines as drivers and inhibitors of trained immunity. *Cytokine*, v. 150, p. 155773, fev. 2022.

THOMPSON, A. et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of chemical- and radiation-induced cystitis. *Journal of Clinical Urology*, v. 7, n. 1, p. 25–35, 1 jan. 2014.

THOMPSON, R. Q. *Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition* (Worsfold, Paul; Tonshend, Alan; Poole, Colin). *Journal of Chemical Education*, v. 82, n. 9, p. 1313, 2005.

TORRADO, S. et al. Effect of dissolution profile and (-)-alpha-bisabolol on the gastrotoxicity of acetylsalicylic acid. *Die Pharmazie*, v. 50, n. 2, p. 141–143, fev. 1995.

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, 1 fev. 2017.

UCHIDA, M. et al. Oxidative stress serves as a key checkpoint for IL-33 release by airway epithelium. *Allergy*, v. 72, n. 10, p. 1521–1531, out. 2017.

VAN DYK, J. J. et al. Unexpected Toxicity in Patients Treated with Iphosphamide *CANCER RESEARCH*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/32/5/921/2389458/cr0320050921.pdf>>.

VILJOEN, A.; KAMATOU, A.; DEMIRCI, K. The Essential Oil Composition and Chemotaxonomy of *Salvia stenophylla* and its Allies *S. repens* and *S. runcinata*. *J. Essent. Oil Res*, v. 18, p. 37–45, 2006.

WANG, X. et al. Shionone alleviates NLRP3 inflammasome mediated pyroptosis in interstitial cystitis injury. *International Immunopharmacology*, v. 90, p. 107132, jan. 2021.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling*, v. 3, n. 105, 19 jan. 2010a.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling*, v. 3, n. 105, 19 jan. 2010b.

WHO. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

XU, S. et al. Transgenic Mice Expressing MCP-1 by the Urothelium Demonstrate Bladder Hypersensitivity, Pelvic Pain and Voiding Dysfunction: A Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain Research Network Animal Model Study. *PLOS ONE*, v. 11, n. 9, p. e0163829, 29 set. 2016.

YANG, Y. et al. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death & Disease*, v. 10, n. 2, p. 128, 12 fev. 2019.

YAO, L. et al. Evans Blue Dye: A Revisit of Its Applications in Biomedicine. *Contrast Media & Molecular Imaging*, v. 2018, p. 1–10, 2018.