



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

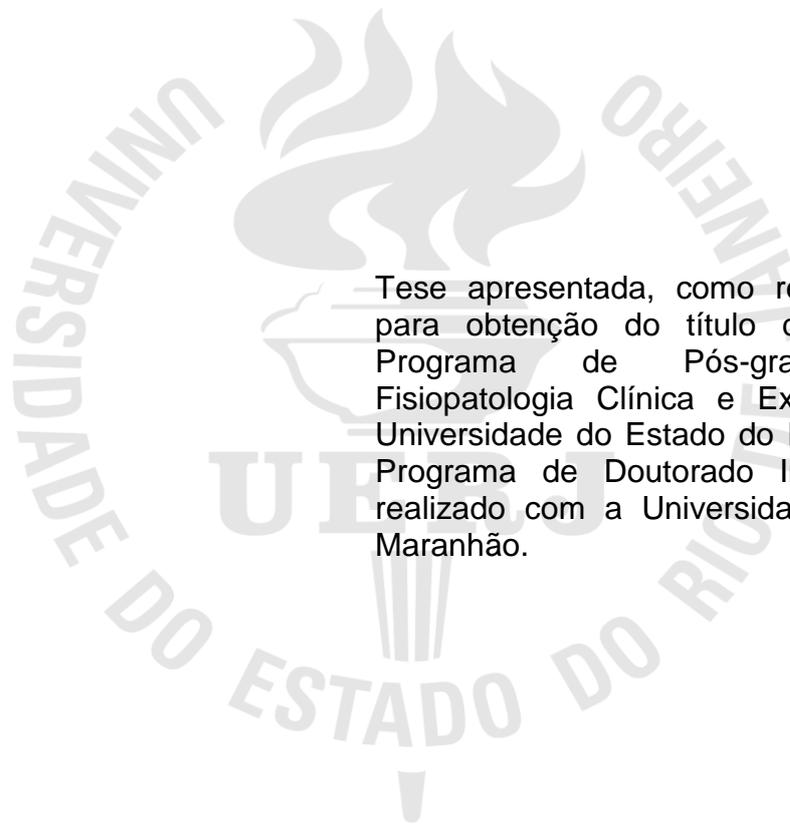
Antonio Gonçalves Filho

**Efeitos do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. na cistite
induzida pela ciclofosfamida**

Rio de Janeiro
2013

Antonio Gonçalves Filho

Efeitos do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. na cistite induzida pela ciclofosfamida



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Orientador : Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Coorientadora: Prof.^a Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

G635 Gonçalves Filho, Antonio.
Efeitos do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. na cistite induzida pela ciclofosfamida / Antonio Gonçalves Filho. – 2013.
47 f.

Orientador: Ruy Garcia Marques.

Coorientadora: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado em parceria com a Universidade Federal do Maranhão.

1. Produtos naturais – Teses. 2. Agentes antiinflamatórios – Teses. 3. Cistite. 4. Ciclofosfamida. 5. *Chenopodium ambrosioides*. I. Marques, Ruy Garcia. II. Nascimento, Flávia Raquel Fernandes do. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV Título.

CDU 616.62-002

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Antonio Gonçalves Filho

Efeitos do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. na cistite induzida pela ciclofosfamida

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Aprovada em 27 de março de 2013.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Universidade Federal do Maranhão

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ruy Garcia Marques (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Orlando José dos Santos
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Hélia de Lima Sardinha
Universidade Federal do Maranhão

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos docentes das Universidades brasileiras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha Coorientadora, Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento pela orientação, dedicação, paciência e por abrir as portas do LIF (Laboratório de Imunofisiologia) da UFMA (Universidade Federal do Maranhão) para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ruy Garcia Marques pela orientação e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura e a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental (FISCLINEX) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) por tornarem possível o sonho de fazer um doutorado.

À Prof.^a Dra. Maria do Desterro Soares Brandão do Nascimento que envidou esforços para que o Doutorado Interinstitucional (DINTER) UERJ/UFMA se tornasse uma realidade.

À Prof.^a Dra. Maria do Rosário da Silva Ramos Costa pelo empenho na coordenação do DINTER na UFMA.

À Prof.^a Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos pelo apoio na realização das dosagens de citocinas.

Ao Médico Patologista Pablo Gustavo Ribeiro Furtado pela realização dos exames de imunohistoquímica.

À Médica Patologista Ana Gisélia Portela de Araújo Cortês Nascimento pela realização dos exames anatomopatológicos.

Ao pessoal do LIF: Joleen Machado, Anne Karine Assunção, Aramys Silva dos Reis, Eder Fialho, Lucilene Amorim Silva, Graciomar Costa, Raimundo Carneiro Júnior, André Luiz Bandeira Dionizio Cardoso, Diêgo de Sousa Arruda, Pedro Paulo Pedro pela convivência prazerosa e pela ajuda na realização dos experimentos.

Às Prof.^{as} Dras. Sirliane de Sousa Paiva, Marizélia Rodrigues Costa Ribeiro, Maria do Carmo Lacerda Barbosa e ao Prof. Dr. Ivan Abreu Figueiredo pelo incentivo e exemplo de dedicação à docência.

À minha família e aos amigos pelo apoio incondicional nas vezes em que me fiz ausente.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPEMA pelo apoio à realização desta pesquisa.

Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino.

Paulo Freire

RESUMO

GONÇALVES FILHO, Antonio. *Efeitos do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. na cistite induzida pela ciclofosfamida*. 2013. 47 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

A cistite hemorrágica (CH) consiste em um processo inflamatório difuso de origem infecciosa ou não que resulta em um sangramento da mucosa vesical. As CH crônicas recorrentes induzidas pela ciclofosfamida (CYP) são um desafio na prática clínica pela alta morbidade e por vezes mortalidade dos pacientes. O tratamento da CH induzida pela ciclofosfamida consiste no uso de MESNA, disulfiram, N-acetilcisteína, anti-inflamatório, oxigênio hiperbárico, hiper-hidratação e irrigação vesical, mas novas terapias têm sido investigadas, inclusive usando produtos naturais. A espécie vegetal *Chenopodium ambrosioides* L., conhecida popularmente como mastruz, mastruço e erva-de-Santa-Maria, tem sido relatada pela população como anti-inflamatório e analgésico. O presente estudo investigou os efeitos do extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* na CH induzida pela ciclofosfamida em ratos. Vinte e nove ratos receberam 150 mg/kg de CYP por via intraperitoneal (i.p.) para indução de CH e em seguida foram divididos em três grupos: controle negativo (CN), tratados com soro fisiológico a 0,9%; extrato bruto hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* (EBHCa), tratado com dose única de 50 mg/kg de extrato bruto hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* (EBH) e controle positivo (CP), tratados com dose única de 15 mg/kg de diclofenaco de potássio, todos por gavagem. Após 48 horas da indução da CH os animais foram sacrificados para retirada da bexiga, que foi preparada para análise histopatológica e imuno-histoquímica. O EBH foi capaz de diminuir o peso da bexiga e histologicamente a inflamação aguda e crônica da bexiga, a extensão do infiltrado inflamatório na parede vesical e a neoformação capilar do mesmo modo que o diclofenaco de potássio, quando comparados ao grupo CN. Observou-se ainda uma redução da expressão imuno-histoquímica de cicloxigenase-2 (COX-2) e do fator nuclear kappa B (NFκB) na bexiga. No presente estudo o EBH das folhas de *Chenopodium ambrosioides* apresentou atividade anti-inflamatória, semelhante ao diclofenaco de potássio, no tratamento da CH induzida pela CYP.

Palavras-chave: *Chenopodium ambrosioides*. Cistite. Ciclofosfamida. Anti-inflamatório.

ABSTRACT

Hemorrhagic cystitis (HC) consists of a diffuse inflammatory process that results on the bleeding of the bladder mucosa due to infectious or noninfectious etiology. Chronically recurrent CYP induced HC remains a challenge to clinical practice given its high morbidity and sometimes mortality of patients. Treatment consists of administering MESNA, disulfiram, N-acetylcysteine, anti-inflammatory, hyperbaric oxygen, hyperhydration and bladder irrigation, though new therapies have been investigated, such as the use of natural products. Popularly known as mastruz, mastruço and erva-de-Santa-Maria, *Chenopodium ambrosioides* L. has been generally reported by people as having anti-inflammatory and analgesic effects. The following study investigated the effects of a hydroalcoholic crude extract (EBH) of *Chenopodium ambrosioides* leaves on cyclophosphamide (CYP) induced HC in rats. In order to induce HC, twenty nine rats were intraperitoneally (i.p.) administered 150mg/kg of CYP and then divided into three groups: negative control (NC) were treated with 0,9% saline solution; hydroalcoholic crude extract of *Chenopodium ambrosioides* (EBHCa) were treated with a single dose of 50 mg/kg of EBH administered and positive control (PC) were treated with a single dose of 15 mg/kg of diclofenac potassium, all of them by gavage. After 48 hours of HC induction, all rats were sacrificed, their bladders removed and prepared for histopathological and immunohistochemical analysis. EBH was able to decrease bladder weight and histologically decrease acute and chronic bladder inflammation, decrease on the infiltrated inflammatory extension of the bladder wall and capillary neoformation in the same way of those from group CN. There was also a reduction in the immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and nuclear factor kappa B (NF κ B) in the bladder. In this study, *Chenopodium ambrosioides* leaves EBH showed anti-inflammatory activity which was similar to results from diclofenac potassium used on treatment of CYP induced HC.

Keywords: *Chenopodium ambrosioides*. Cystitis. Cyclophosphamide. Anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	19
Figura 2 –	Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (EBHCa) sobre os pesos das bexigas dos ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida (CYP).....	25
Figura 3 –	Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (EBHCa) sobre a celularidade da urina dos ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida (CYP).....	26
Figura 4 –	Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (EBHCa) sobre a análise histológica das bexigas dos ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida (CYP), segundo os critérios de Ramzi (1999), modificado.....	27
Figura 5 –	Fotomicrografias da histologia mostrando inflamação aguda nas bexigas de ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida.....	28
Figura 6 –	Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (EBHCa) sobre a expressão imuno-histoquímica de COX-2, NF κ B e iNOS nas bexigas dos ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida (CYP), segundo os escores de intensidade e distribuição.....	29
Figura 7 –	Fotomicrografias da imuno-histoquímica nas bexigas de ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida.....	30
Figura 8 –	Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (EBHCa) sobre a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no sobrenadante da cultura de células dos linfonodos drenantes da bexiga dos animais com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida (CYP).....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA	Ensaio citométrico de esferas ordenadas
CH	Cistite hemorrágica
CN	Controle negativo
COX-2	Ciclooxigenase dois
CP	Controle positivo
CYP	Ciclofosfamida
DAB	3, 3'-diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBH	Extrato bruto hidroalcoólico
EBHCa	Extrato bruto hidroalcoólico de <i>Chenopodium ambrosioides</i>
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
G	Gauge
HE	Hemotoxilina-eosina
IFO	Ifosfamida
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
i.p.	Intraperitoneal
LUTS	<i>Lower urinary tract symptoms</i> (sintomas do trato urinário inferior)
MESNA	Sódio-2-mercapto-etanosulfonato
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico

NO ₂ ⁻	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintetase
ONOO ⁻	Peroxinitrito
p	Nível de significância
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de solução produzido no Instituto Memorial Park Roswell
S.E.M.	Desvio padrão da média
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	18
1.1	Objetivo geral	18
1.2	Objetivos específicos	18
2	MÉTODO	19
2.1	Material vegetal	19
2.2	Preparação do extrato hidroalcoólico de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	20
2.3	Animais	20
2.4	Indução de cistite e tratamento dos animais	20
2.5	Morte dos animais e coletas realizadas	21
2.6	Análise histológica da bexiga	22
2.7	Análise imuno-histoquímica da bexiga	22
2.8	Determinação da produção de óxido nítrico	23
2.9	Dosagem de TNF-α na urina, no soro e nos linfonodos (sobrenadante)	23
2.10	Análise estatística	24
3	RESULTADOS	25
3.1	Efeito do tratamento com EBH de <i>Chenopodium ambrosioides</i> sobre o peso da bexiga e o infiltrado inflamatório na urina dos animais com cistite	25
3.2	Efeito do tratamento com EBH de <i>Chenopodium ambrosioides</i> sobre a resposta inflamatória aguda e crônica, a proliferação fibroblástica, a colagenização, a extensão do infiltrado inflamatório e a neoformação capilar	26
3.3	Efeito do tratamento com EBH de <i>Chenopodium ambrosioides</i> na expressão da COX-2, NFκB e iNOS na bexiga dos animais com cistite...	28
3.4	Efeito do tratamento com EBH de <i>Chenopodium ambrosioides</i> na concentração de TNF-α na urina, no soro e no sobrenadante da cultura de células dos linfonodos drenantes da bexiga dos ratos com cistite	31
3.5	Investigar a produção de óxido nítrico pelas células dos linfonodos drenantes da bexiga de animais com cistite	31

3.6	Efeito do tratamento com EBH de <i>Chenopodium ambrosioides</i> na celularidade dos órgãos linfóides dos animais com cistite.....	32
3.7	Efeito do tratamento com EBH de <i>Chenopodium ambrosioides</i> no peso médio do baço, do fígado, dos linfonodos e dos rins.....	32
4	DISCUSSÃO	34
5	CONCLUSÕES	38
	REFERÊNCIAS	39
	APÊNDICE A – Protocolo de análise histológica.....	45
	APÊNDICE B – Protocolo de análise imuno-histoquímica.....	47

INTRODUÇÃO

A cistite hemorrágica (CH) consiste em um processo inflamatório difuso de origem infecciosa ou não, que resulta em sangramento da mucosa vesical. As causas infecciosas são as mais frequentes e respondem de modo satisfatório ao tratamento. Porém, as CH crônicas recorrentes são um desafio na prática clínica, pela alta morbidade e por vezes mortalidade dos pacientes (Hadjibabaie et al., 2008; El-zimaity et al., 2000).

Dentre as causas mais frequentes de CH crônicas recorrentes estão a quimioterapia com as oxazafosforinas, como a ciclofosfamida (CYP) e seu análogo sintético, a ifosfamida (IFO), e as radioterapias pélvicas (Moy, 2012; Seber et al., 1999). A CYP é um agente alquilante citotóxico utilizado na quimioterapia para tratamento de doenças linfoproliferativas, alguns tumores sólidos e em doenças não neoplásicas, como síndrome nefrótica, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide (Korkmaz et al., 2012).

A CH ocorre em 10% a 40% dos pacientes submetidos a altas doses de ciclofosfamida para tratamento de tumores sólidos e em mais de 70% daqueles tratados após transplante de medula óssea (Shepherd, 1991). Clinicamente, manifesta-se com sintomas do trato urinário inferior agrupados sob a sigla LUTS (*lower urinary tract symptoms*): disúria, polaciúria, urgência miccional, nictúria, dor supra-púbica e hematúria microscópica ou macroscópica (Moy, 2012). Os pacientes com pequena hematúria podem apresentar anemia ferropriva, mas em casos severos pode ocorrer choque hipovolêmico. Esses sinais e sintomas podem persistir por semanas até anos, mesmo após a suspensão do uso da droga (Stillwell; Benson, 1988).

A urotoxicidade da CYP está associada à excreção renal de seus metabólitos 4-hidroxi, especialmente a acroleína, formada a partir da hidroxilação enzimática microsomal hepática da droga (Cox, 1979; Korkmaz et al., 2005; Chow et al., 2006).

Ribeiro et al. (2012) propuseram um modelo de quatro fases para explicar a cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida: fase inicial, fase de sinalização, fase ulcerativa e a fase de resolução. A fase inicial é caracterizada pelo acúmulo da acroleína na bexiga causando dano ao urotélio. Na fase de sinalização (inflamatória), as células epiteliais e do tecido conjuntivo, como os macrófagos, promovem um aumento local de citocinas inflamatórias, principalmente do fator de

necrose tumoral alfa (TNF- α) e da interleucina-1 β , pela via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B). Ocorrem também aumentos de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da expressão de enzimas inflamatórias, como a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e a cicloxigenase-2 (COX-2). A combinação de óxido nítrico (NO) e radicais superóxidos pode levar à produção do radical livre peroxinitrito (ONOO $^-$). Na fase ulcerativa (sintomática) há o desnudamento do epitélio e o aparecimento de úlceras que causam LUTS e disfunção vesical. Na quarta e última etapa, começa a ocorrer a reparação tecidual, possivelmente a partir da sinalização dos fibroblastos e aumento local de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de queratinócitos.

Dentre as alterações histológicas observadas na CH por CYP, podem ser destacadas: edema, hemorragia, com ou sem formação de coágulos vesicais, erosão e ulceração da mucosa, infiltração leucocitária e depósito de fibrina (Morais et al., 2009).

A incidência de complicações com o uso da CYP tem diminuído após o emprego de medidas profiláticas, como o uso de MESNA (sódio-2-mercapto-etanosulfonato) (Shepherd, 1991; Meisenberg, 1994) que se liga à acroleína, inativando-a. Lima et al. (2007), entretanto, detectaram que mesmo com o emprego da profilaxia clássica com três doses de MESNA, 66,7% dos paciente apresentavam lesões graves de bexiga à cistoscopia e 100% deles possuíam dano ao epitélio vesical. Há relato ainda de dermatose grave com o uso de MESNA (Lin; Keefe, 2011).

Devido à efetividade parcial com o uso de MESNA, outros métodos têm sido empregados para tratar ou prevenir a CH induzida pelo uso da CYP, incluindo o uso oral de disulfiram, N-acetil-cisteína e anti-inflamatórios, oxigênio hiperbárico, hiper-hidratação e a irrigação vesical com uma destas substâncias: solução salina, formalina, fenol, nitrato de prata e prostaglandina. Procedimentos mais agressivos, como embolização da artéria hipogástrica, cistectomia com derivação urinária e ampliação vesical são reservados para as hemorragias refratárias aos outros tratamentos (Chow et al. 2006).

Pesquisas científicas têm testado os efeitos de diversas substâncias na prevenção e/ou tratamento da CH induzida pela CYP (Ribeiro et al., 2012), sem ainda obterem resultados que modifiquem a evolução clínica dessa grave complicação.

No Brasil, diversas plantas são utilizadas na medicina popular e, por isso, o governo federal criou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem estimulado pesquisas científicas para a validação de propriedades farmacológicas de 71 plantas de interesse para o SUS (Sistema Único de Saúde), dentre elas, *Chenopodium ambrosioides* L. (Brasil, 2008).

Chenopodium ambrosioides tem sua origem nas Américas Central e do Sul e atualmente é uma espécie cosmopolita, silvestre ou cultivada; pode crescer até um metro de altura, possui forte odor aromático e é conhecida popularmente como mastruz, mastruço e erva-de-Santa-Maria (Lorenzi; Matos, 2002). O nome é originário do grego *chen* (ganso) e *podus* (pé) e se deve ao fato das folhas de algumas espécies se assemelharem a pés de ganso. O nome específico, *ambrosioides*, refere-se à semelhança de suas inflorescências às de *Ambrosia* sp. (Kismann, 1991). A família Chenopodiaceae engloba aproximadamente 120 gêneros, sendo que existem cerca de 250 espécies no gênero *Chenopodium* (Dinan et al., 1998; Jouad et al., 2001).

As folhas, as raízes e as inflorescências da planta, na forma de chá, infusão ou cataplasma, são utilizadas como anti-inflamatório, analgésico, cicatrizante, antitumoral e mais comumente como anti-helmíntico (Klicks, 1985; Kokanova-Nedialkova et al., 2009). No Brasil, *Chenopodium ambrosioides* é também utilizado como inseticida e repelente (Pio Correa, 1984; Vieira, 1992), antifúngico (Vieira, 1992), para tratar úlceras leishmanióticas (França et al., 1996; Moreira et al., 2002), inflamações (Moraes, 1996), contusões e equimoses (Lorenzi; Matos, 2002) e ainda como tônico (Mendes; Carlini, 2007).

O óleo essencial da planta exibiu potente atividade fungicida *in vitro*, inibiu a produção da principal micotoxina produzida por *Aspergillus flavus* (aflatoxina) e também impediu o crescimento de fungos em alimentos estocados (Kumar et al., 2007). O óleo essencial também apresentou excelente atividade contra *Trichomonas vaginalis in vitro*, com valor de concentração inibitória mínima semelhante ao metronidazol (Monzote et al., 2004).

A atividade antiprotozoário de *Chenopodium ambrosioides* já foi comprovada também contra as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O efeito anti-*Leishmania* já foi observado tanto para o óleo essencial como para o extrato hidroalcoólico em modelos *in vitro* e *in vivo* (Bezerra et al., 2006; Monzote et al., 2006; 2007a; 2007b; Patrício et al., 2008; Monzote et al., 2009).

O extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das folhas de *Chenopodium ambrosioides* foi capaz de inibir o crescimento do tumor de Ehrlich, tanto sólido quanto ascítico, em camundongos, aumentando a sobrevivência desses animais, quando comparados aos controles (Nascimento et al., 2006). Tal efeito imunestimulante pode ser decorrente da ativação dos macrófagos e do recrutamento de células pelos órgãos linfóides secundários, como o baço e os linfonodos (Cruz et al., 2007). Do mesmo modo, o uso intralesional deste extrato foi capaz de controlar a disseminação da infecção cutânea causada pela *Leishmania amazonensis* (Patrício et al., 2008).

Chenopodium ambrosioides apresentou potencial imunestimulante também através do aumento da proliferação de linfócitos murinos (Rossi-Bergmann et al., 1997) e do recrutamento e ativação de macrófagos *in vivo* e *in vitro* (Cruz et al., 2007).

Ibironke e Ajiboye (2007) observaram que o extrato metanólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides*, em doses orais que variaram de 300 a 700 mg/kg de peso do animal, possuía efeito anti-inflamatório, reduzindo o edema de pata induzido por carragenina e a formação de granuloma por implante de bola de algodão em ratos. Do mesmo modo, detectaram também efeito analgésico, pelo aumento do período de latência no teste da estimulação térmica em placa quente e redução do número de contorções induzidas por ácido acético. Da mesma forma, Sousa (2012) demonstrou efeito analgésico do extrato aquoso de *Chenopodium ambrosioides* em modelo de ácido acético em camundongos. Trivellato Grassi et al. (2012) encontraram efeitos analgésico, anti-inflamatório e cicatrizante do extrato etanólico obtido das folhas e do caule de *Chenopodium ambrosioides* por meio da inibição da atividade de mediadores químicos, como bradicinina, óxido nítrico, substância P, prostaglandina E₂ e TNF- α , além da inibição das enzimas mieloperoxidase e adenosina-deaminase.

Estudos da composição química têm demonstrado que *Chenopodium ambrosioides* é rico em flavonoides, terpenoides, esteróis e fenóis, produtos que têm propriedades anti-oxidantes e anticancerígenas (Di Carlo et al., 1999; Kiuch et al., 2002; Liu, 2004). Entre os terpenos há predominância dos monoterpenos que são encontrados no óleo essencial. Na maioria dos relatos, o ascaridol, um peróxido monoterpeno, é citado como o composto mais abundante, embora a literatura demonstre enorme variação percentual (0,7% – 86%) (Lawrence, 1999; Dembitsky

et al., 2008). Ao ascaridol têm sido atribuídas atividades antiplasmódio (Pollack et al 1990), analgésica e sedativa (Okuyama et al., 1993), antitumoral (Efferth et al., 2002) e antifúngica (Jardim et al., 2008). Outros trabalhos apontam que o ascaridol também pode estar relacionado com os efeitos tóxicos do óleo essencial (Simpfendorfer, 1944; Okuyama et al., 1993; Monzote et al., 2009).

Observa-se que os efeitos do extrato bruto de *Chenopodium ambrosioides* podem ser mediados por mecanismos diferentes dependendo do modelo experimental empregado, das partes da planta utilizadas e do método de obtenção do extrato, sendo necessários, portanto, novos estudos sobre a atividade biológica desta espécie.

Considerando a necessidade de se descobrir novas alternativas terapêuticas a partir das plantas de interesse para o SUS, esta pesquisa se propõe a investigar se o EBH das folhas de *Chenopodium ambrosioides* apresenta atividade anti-inflamatória na CH induzida pela CYP em ratos.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento oral com o EBH das folhas de *Chenopodium ambrosioides* na cistite induzida pela CYP em ratos.

1.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito do EBH no peso da bexiga e quantificar o infiltrado celular na urina dos animais com cistite;
- Avaliar a resposta inflamatória aguda e crônica, a proliferação fibroblástica, a colagenização, a extensão do infiltrado inflamatório e a neoformação capilar, por meio de análise histopatológica da bexiga dos animais com cistite;
- Determinar o efeito do EBH na imuno-histoquímica da bexiga dos animais com cistite para a expressão da COX-2, NF κ B e iNOS;
- Quantificar a citocina TNF- α na urina, no soro e no sobrenadante da cultura de células dos linfonodos drenantes da bexiga dos ratos com cistite;
- Investigar a produção de NO pelas células do sobrenadante da cultura de linfonodos drenantes da bexiga de animais com cistite;
- Realizar a contagem de células de órgãos linfóides dos animais com cistite: baço, linfonodos drenantes da bexiga e medula óssea;
- Verificar o peso do fígado, do baço, dos linfonodos drenantes da bexiga e dos rins nos animais com cistite.

2 MÉTODO

2.1 Material vegetal

A espécie vegetal apresenta a seguinte taxonomia (Plants Database, 2013):

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisão: Spermatophyta

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Carvophyllidae

Ordem: Carvophyllales

Família: Chenopodiaceae

Gênero: *Chenopodium* L.

Espécie: *Chenopodium ambrosioides* L.

As folhas de *Chenopodium ambrosioides* foram coletadas no Herbário Paz e Harmonia, no município de São José de Ribamar, MA, Brasil e identificadas no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil com exsicata de nº 0998.



Figura 1 – *Chenopodium ambrosioides*.

Legenda: Aspecto geral (A) e detalhe das partes aéreas da planta (B).

Fonte: Fotografias cedidas por Fernando José Brito Patrício

2.2 Preparação do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides*

As folhas foram secas a uma temperatura 30° C e em seguida o material seco (200 g) foi macerado a cada oito horas durante 24 horas com álcool etílico a 70%. Após 24 horas, o macerado foi filtrado e novamente foi acrescentado ao resíduo 01 (um) L de etanol a 70%. O mesmo procedimento foi repetido mais quatro vezes para que, finalmente, o extrato fosse concentrado com o auxílio de evaporador rotativo sob pressão reduzida. O extrato seco concentrado foi diluído em água apirogênica para uso na concentração de 50 mg/ml.

2.3 Animais

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, sendo 15 machos, pesando entre 340 e 470 g, e 15 fêmeas, pesando entre 210 e 280 g, adquiridos no Biotério Central da UFMA e transferidos para o Biotério do Laboratório de Imunofisiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde desta Universidade.

Os ratos foram alojados em gaiolas de 0,15 m², cinco animais em cada gaiola, em ciclos dia e noite de 12 horas, em condições de temperatura e umidade ambientais, recebendo ração padrão para ratos (Purina Labina[®], São Paulo, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum* durante sete dias para adaptação.

Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Maranhão (Protocolo: 012975/2008-43).

2.4 Indução de cistite e tratamento dos animais

Os animais pesados em balança eletrônica (MARTE[®], A500, São Paulo, São Paulo, Brasil), em seguida foi feita a indução da cistite em todos eles através da injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (Sigma[®]) na dose de 150 mg/kg de peso do animal. Trinta minutos após a indução os animais foram distribuídos aleatoriamente e tratados com dose única, conforme o grupo a que pertenciam:

- Grupo Controle Negativo (CN) composto por 10 animais, sendo cinco machos e cinco fêmeas: administrado soro fisiológico a 0,9%, 1 mL/kg, por gavagem;

- Grupo Extrato Bruto Hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* (EBHCa) composto por 10 animais, sendo cinco machos e cinco fêmeas: tratados com 50 mg/kg do EBH, por gavagem (Pereira et al., 2010);
- Grupo Controle Positivo (CP) composto por 10 animais, sendo cinco machos e cinco fêmeas: tratados com 15 mg/kg de diclofenaco de potássio (Medley[®]) também por gavagem.

2.5 Morte dos animais e coletas realizadas

Após 48 horas do tratamento, os animais foram anestesiados, com a utilização da associação do cloridrato de xilasina 10 mg/kg de peso do animal e cloridrato de quetamina 25 mg/kg de peso do animal por via intramuscular. Os ratos foram considerados anestesiados quando se apresentavam imóveis e com perda do reflexo corneano. Foram então fixados na mesa cirúrgica, tiveram a sua cavidade abdominal aberta, promovendo-se o inventário da cavidade à procura de aderências e infecções. Em seguida foi realizada a punção da bexiga urinária com seringa de 3 mL e agulha 13 x 4,5 mm para coleta da urina e punção da artéria aorta abdominal com *scalp* 27G em seringa de 3 mL para coleta de sangue. Antes do procedimento, porém, houve perda de um animal macho, pertencente ao CP.

A urina coletada foi submetida à contagem de células e em seguida congelada a -20°C para posterior dosagem de TNF- α , assim como o soro.

A bexiga urinária foi retirada através da secção do colo vesical, pesada em balança eletrônica e fixada em formol tamponado a 10% para posterior análise histológica e imuno-histoquímica.

Linfonodos retroperitoneais drenantes da bexiga foram retirados em número de 05 (cinco), pesados, triturados em 1 (um) mL de meio RPMI 1640 (Gibco, RockvilleMD[®]) para contagem de células em câmara de Neubauer e colocados em meio de cultura por 48 horas para avaliação da produção de óxido nítrico e de TNF- α no sobrenadante.

O baço foi retirado, pesado e depois triturado em 05 (cinco) mL de PBS para contagem de células. A medula óssea do fêmur esquerdo foi retirada por lavagem do canal medular com 01 (um) mL de PBS para contagem de células em câmara de Neubauer. Foram ainda retirados e pesados o fígado e os rins dos animais.

2.6 Análise histológica da bexiga

As bexigas dos animais foram fixadas em formol a 10% por 48 horas, quando então foram colocadas em cápsulas para a histotécnica e lavadas em água corrente por 15 minutos para retirada do excesso de formol do tecido. Depois, no autotécnico, sofreram desidratação em álcool etílico a 70%, 80% e 90% e posteriormente diafanização em xilol, impregnação por parafina a 58°C com formação de blocos.

Para cada bloco de parafina foram preparadas três lâminas com três cortes histológicos em cada uma delas. Os cortes foram realizados por micrótomo SPENCER® 820, regulado para 5 µM, conforme técnica descrita por Bancroft e Stevens (2012). A primeira lâmina foi corada pela técnica de hematoxilina-eosina (HE), para verificação do processo inflamatório conforme critérios estabelecidos por Ramzi, modificado (Gonçalves Filho et al., 2006) (Apêndice A), a segunda pela técnica do tricrômio de Masson para avaliação da proliferação fibroblástica e a terceira para análise imunohistoquímica.

Foi realizado estudo microscópico do tecido vesical dos animais em microscópio óptico tetra-ocular (OLYMPUS® CH-30). O avaliador desconhecia o grupo do animal correspondente à lâmina estudada. Foram estudados todos os campos da lâmina com objetivas de 4 x, 10 x e 40 x e ocular de 10 x.

2.7 Análise imuno-histoquímica da bexiga

Foram utilizados os anticorpos para a COX-2, o NFκB e a iNOS da marca Spring®. Os clones utilizados foram SP21, policlonal e SP26 na titulação de 1:100. A recuperação antigênica deu-se em câmara a vapor na temperatura de 95°C por 45 minutos. Os anticorpos foram incubados em câmara escura por 30 minutos com seus respectivos polímeros. Foi utilizada solução de recuperação com pH 9.0 e tratada com peróxido de hidrogênio. Para a revelação foi utilizado 3, 3'-diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram montadas com Bálsamos do Canadá e analisadas no microscópio Nikon E200®.

Para a leitura das lâminas, elaborou-se um protocolo de análise imuno-histoquímica (Apêndice B), considerando-se a distribuição e a intensidade da

expressão em todos os campos. O avaliador desconhecia o grupo do animal correspondente à lâmina estudada.

2.8 Determinação da produção de óxido nítrico

A produção de NO foi determinada pela concentração de nitritos presente no sobrenadante da cultura de células linfonodais, conforme protocolo proposto por Ding et al. (1988). Para isso, 50 µL do sobrenadante da cultura de células foram incubados com mesmo volume do reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% naftilenodiamina dihidroclorido e 2,5% ácido ortofosfórico), por 10 minutos, à temperatura ambiente. A absorvância das amostras em 540 nm foi determinada em espectrofotômetro (MR 5000[®], Dynatech Laboratories Inc., Gainesville, VA, USA). Os resultados foram expressos como µM de NO₂⁻, fundamentado em uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas (5 - 60 µM) de nitrito de sódio (NaNO₂) diluído em meio RPMI.

2.9 Dosagem de TNF-α na urina, no soro e nos linfonodos (sobrenadante)

Para a quantificação da citocina TNF-α foi utilizada a técnica de CBA (ensaio citométrico de esferas ordenadas). Todos os reagentes utilizados foram provenientes do *Rat CBA Flex Set*[®], obtido da Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, EUA), segundo as orientações do fabricante.

As amostras de urina, do soro e do sobrenadante de cultura de células obtidas dos linfonodos foram centrifugados à 1500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Em placa de 96 poços fundo em U foram então adicionados 25 µL do *mix de beads* (esferas recobertas com anticorpos específicos contra a citocina a ser dosada) distinguíveis pela intensidade de fluorescência, 25 µL da curva de citocina padrão fornecida pelo fabricante e da amostra a ser testada, e incubadas por uma hora em temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, cada poço recebeu 25 µL de anticorpo conjugado a ficoeritrina. A placa foi incubada à temperatura ambiente por duas horas protegida da luz. Após o período de incubação, as amostras foram ressuspensas com 100 µL do tampão de lavagem e a placa foi centrifugada a 200 vezes g por cinco minutos. O sobrenadante foi então

descartado e as amostras foram ressuspensas em 100 μ L de solução tampão para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur[®] (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

A calibração do citômetro foi realizada utilizando *beads* de calibração fornecidas pelo fabricante, incubadas previamente com FITC (Isotilcianato de Fluoresceína), ou PE, conforme as recomendações do *kit*. Após a leitura dos padrões e das amostras, os dados foram analisados no *software* FCAP Array Software[®] (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL.

2.10 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (S.E.M.). A análise estatística foi feita por Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Tukey's ou teste *t* de Student, sendo que o nível de significância (*p*) utilizado para se rejeitar a hipótese da nulidade foi de 5% (*p* < 0,05).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do tratamento com EBH de *Chenopodium ambrosioides* sobre o peso da bexiga e o infiltrado inflamatório na urina dos animais com cistite

Os animais do grupo EBHCa (17,27 mg) e do grupo CP (17,24 mg) tiveram os pesos das bexigas menores quando comparados com o grupo CN (22,23 mg) (Figura 2).

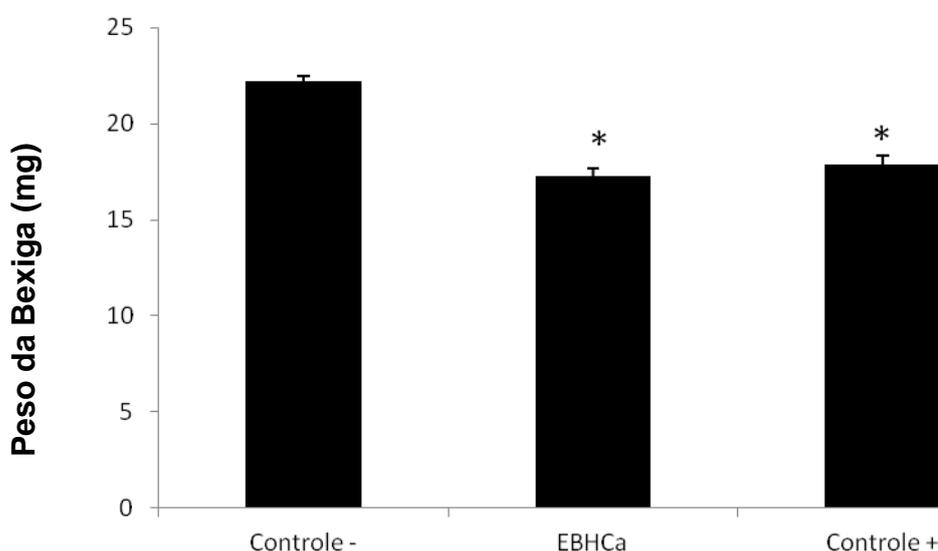


Figura 2 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* (EBHCa) sobre os pesos das bexigas dos ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida (CYP). Os animais foram tratados com dose única por via intraperitoneal: Controle - (negativo) (1 mL/kg de soro fisiológico a 0,9%), EBHCa (50mg/kg do EBHCa) e Controle + (positivo) (15 mg/kg de diclofenaco de potássio). Após 48 horas os animais foram mortos e a bexiga retirada e pesada. Os dados representam médias \pm S.E.M. * $p < 0,05$ em relação ao Controle Negativo (ANOVA).

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à contagem de células (Figura 3).

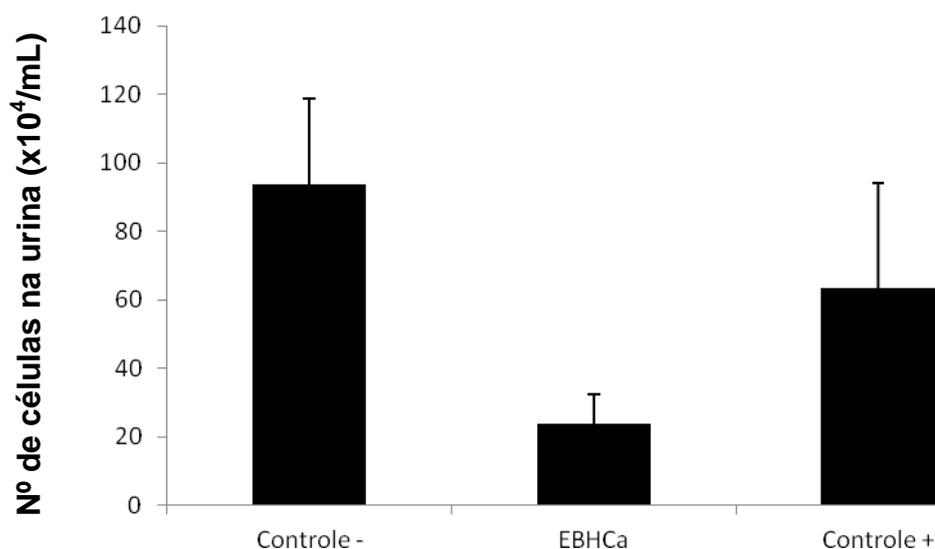


Figura 3 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* (EBHCa) sobre a celularidade da urina dos ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida (CYP). Os animais foram tratados com dose única por via intraperitoneal: Controle - (negativo) (1 mL/kg de soro fisiológico a 0,9%), EBHCa (50mg/kg do EBHCa) e Controle + (positivo) (15 mg/kg de diclofenaco de potássio). Após 48 horas os animais foram mortos e a urina foi coletada e realizada a contagem de células. Os dados representam médias \pm S.E.M. * $p < 0,05$ em relação ao Controle Negativo (ANOVA).

3.2 Efeito do tratamento com EBH de *Chenopodium ambrosioides* sobre a resposta inflamatória aguda e crônica, a proliferação fibroblástica, a colagenização, a extensão do infiltrado inflamatório e a neoformação capilar

A análise histológica demonstrou que todos os animais apresentaram cistite aguda hemorrágica. Quando comparados ao grupo CN, os animais do grupo EBHCa e CP apresentaram diminuição dos seguintes parâmetros: inflamação aguda, inflamação crônica, extensão do infiltrado inflamatório e neoformação capilar. Quando analisadas a proliferação fibroblástica e a colagenização, não houve diferença estatística entre os grupos (Figuras 4 e 5).

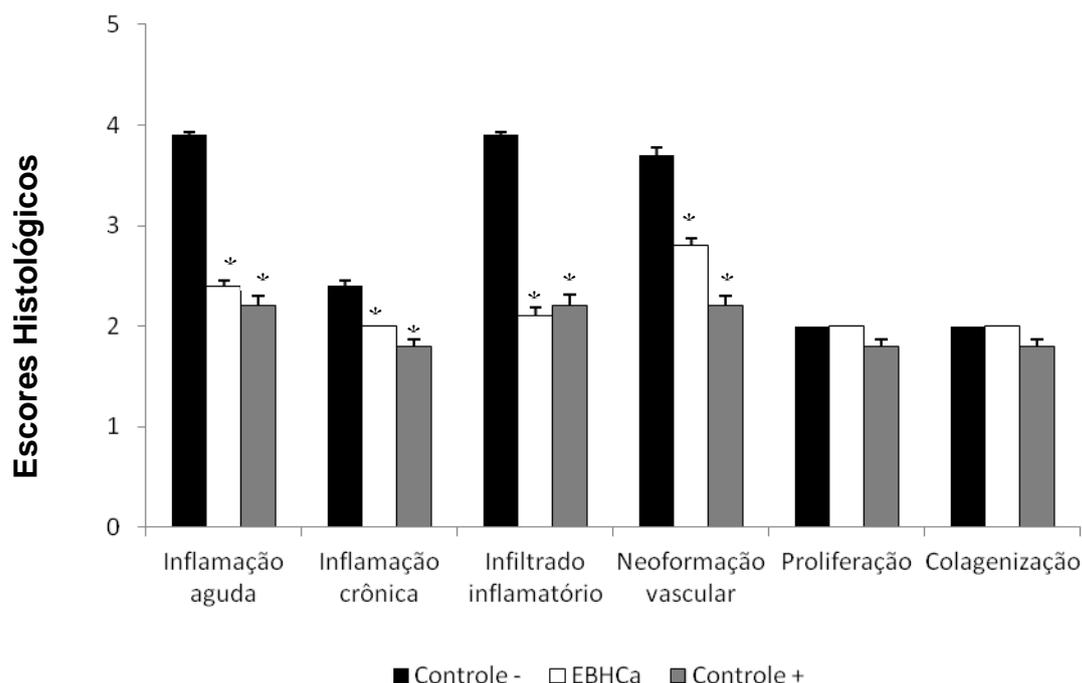


Figura 4 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* (EBHCa) sobre a análise histológica das bexigas dos ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida (CYP), segundo os critérios de Ramzi (1999), modificado. Os animais foram tratados com dose única por via intraperitoneal: Controle – (negativo) (1 mL/kg de soro fisiológico a 0,9%), EBHCa (50mg/kg do EBHCa) e Controle + (positivo) (15 mg/kg de diclofenaco de potássio). Após 48 horas os animais foram mortos, a bexiga retirada, processada e as lâminas coradas com hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson. Os dados representam médias \pm S.E.M. * $p < 0,05$ em relação ao Controle Negativo (ANOVA).

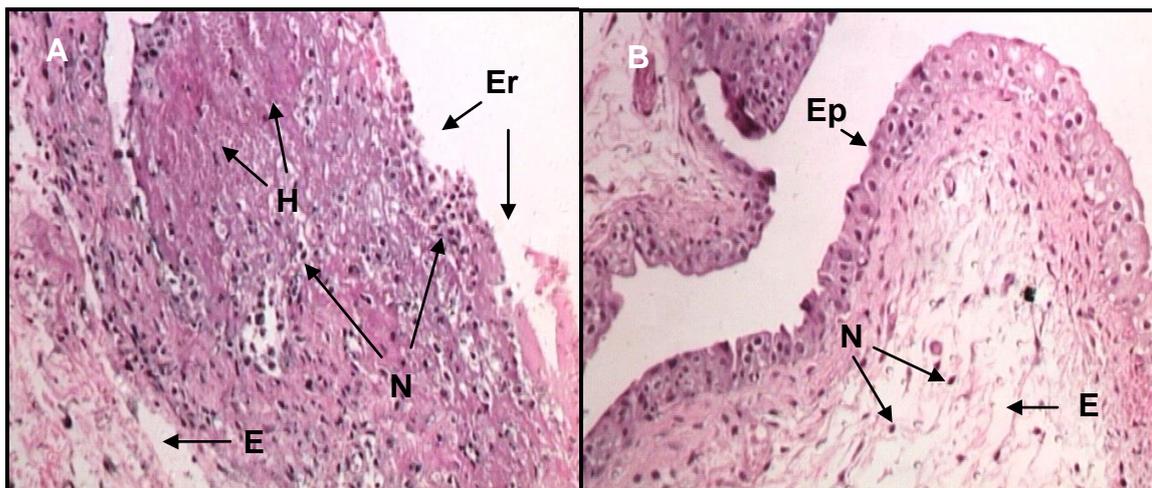


Figura 5 – Fotomicrografias da histologia mostrando inflamação aguda nas bexigas de ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida.

Legenda: A – Rato do grupo Controle Negativo, lâmina corada pela técnica hemotoxilina-eosina, aumento de 100x; B – Rato do grupo Extrato Bruto de *Chenopodium ambrosioides*, lâmina corada pela técnica hemotoxilina-eosina, aumento de 100x.

Nota: A – Observa-se reação inflamatória aguda acentuada, com numerosos neutrófilos (N) e hemácias (H), edema (E) e erosão do epitélio (Er); B – Observa-se reação inflamatória aguda moderada, com presença de neutrófilos (N) e edema (E) em mais de 50% do campo, epitélio íntegro (Ep).

3.3 Efeito do tratamento com EBH de *Chenopodium ambrosioides* na expressão da COX-2, NF κ B e iNOS na bexiga dos animais com cistite

A análise imuno-histoquímica das bexigas dos animais por meio de escore de distribuição e intensidade demonstrou menor expressão, em média, da COX-2 e do NF κ B nos grupos EBHCa e CP quando comparados ao grupo CN. Em relação à expressão do iNOS, apesar da média do escore numericamente menor nos grupos EBHCa e CP em comparação com o grupo CN, não houve diferença estatística entre os grupos (Figuras 6 e 7).

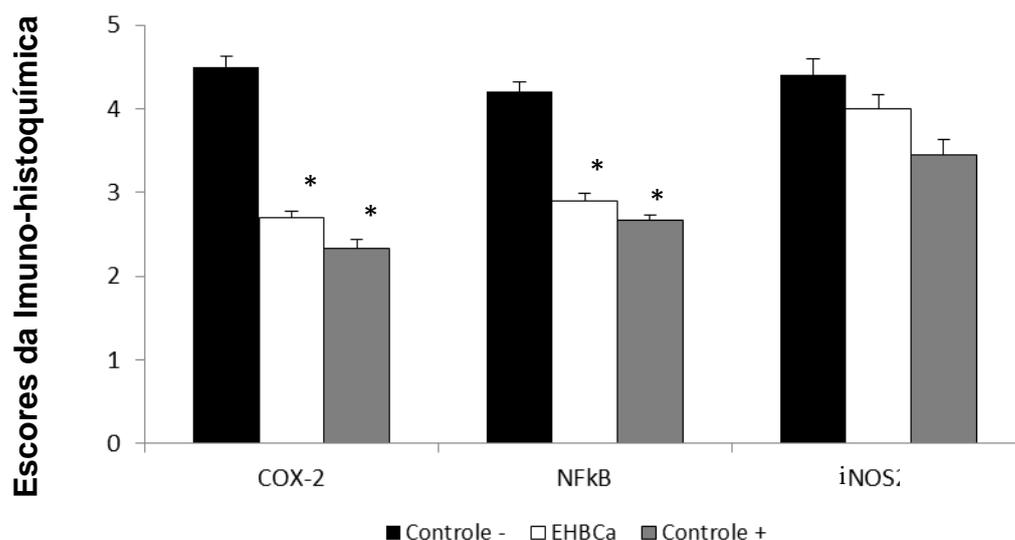


Figura 6 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* (EBHCa) sobre a expressão imuno-histoquímica de COX-2, NFκB e iNOS nas bexigas dos ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida (CYP), segundo os escores de intensidade e distribuição. Os animais foram tratados com dose única por via intraperitoneal: Controle - (negativo) (1 mL/kg de soro fisiológico a 0,9%), EBHCa (50mg/kg do EBHCa) e Controle + (positivo) (15 mg/kg de diclofenaco de potássio). Após 48 horas os animais foram mortos, a bexiga retirada, processada e as lâminas preparadas para leitura. Os dados representam médias \pm S.E.M. * $p < 0,05$ em relação ao Controle Negativo (ANOVA).

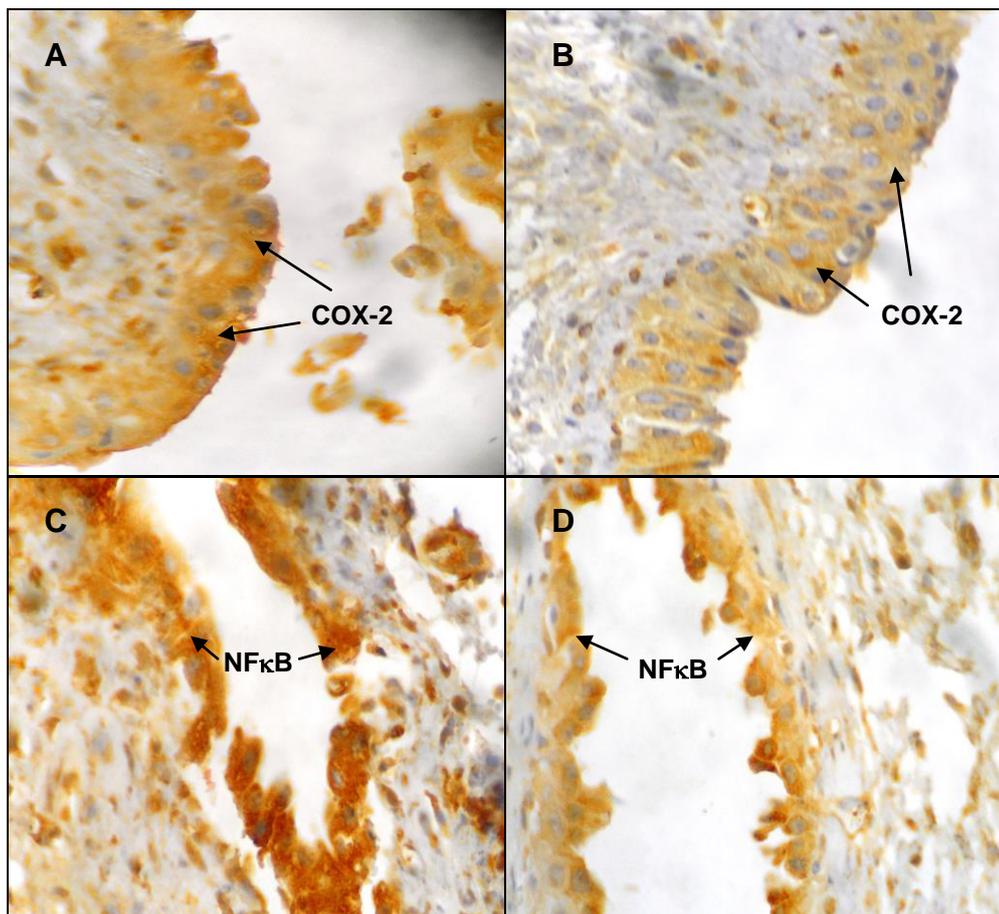


Figura 7 - Fotomicrografias da imuno-histoquímica nas bexigas de ratos com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida.

Legenda: A e C – Ratos do grupo Controle Negativo, aumento de 400x; B e D – Ratos do grupo Extrato Bruto de *Chenopodium ambrosioides*, aumento de 400x. Nota: A e B – Observa-se expressão positiva para COX-2 na coloração marrom com menor intensidade no grupo Extrato Bruto de *Chenopodium ambrosioides* (B), quando comparado com o grupo Controle Negativo (A). C e D – expressão positiva para NFκB na coloração marrom com menor intensidade no grupo Extrato Bruto de *Chenopodium ambrosioides* (D), quando comparado com o grupo Controle Negativo (C).

3.4 Efeito do tratamento com EBH de *Chenopodium ambrosioides* na concentração de TNF- α na urina, no soro e no sobrenadante da cultura de células dos linfonodos drenantes da bexiga dos ratos com cistite

A dosagem da citocina foi menor na urina e no sobrenadante da cultura de células dos linfonodos do grupo EBHCa quando comparado ao grupo CN, porém este resultado não foi estatisticamente significativo, demonstrando apenas uma tendência. Não houve produção de TNF- α no soro dos animais com cistite (Gráfico 8).

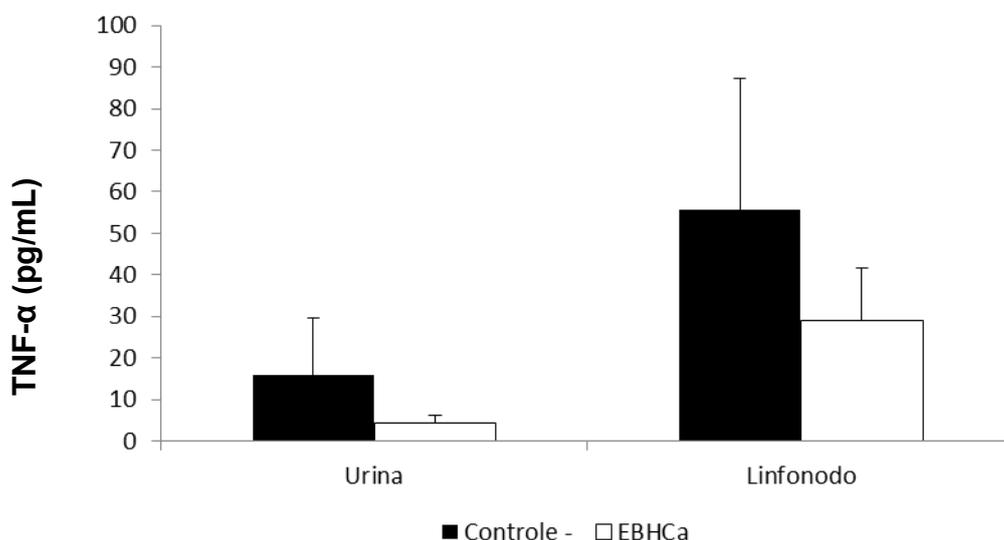


Figura 8 - Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* (EBHCa) sobre a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na urina e no sobrenadante da cultura de células dos linfonodos drenantes da bexiga dos animais com cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida (CYP). Os animais foram tratados com dose única por via intraperitoneal: Controle – (negativo) (1 mL/kg de soro fisiológico 0,9%) e EBHCa (50mg/kg do EBHCa). Após 48 horas, foram mortos e cinco linfonodos retroperitoneais drenantes da bexiga foram retirados, pesados, triturados em 1 mL de meio RPMI e colocados em meio de cultura por 48 horas. Os dados representam médias \pm S.E.M.

3.5 Produção de óxido nítrico pelas células dos linfonodos drenantes da bexiga de animais com cistite

A produção de óxido nítrico foi negativa em todas as amostras de sobrenadante da cultura de células dos linfonodos drenantes da bexiga dos animais com cistite.

3.6 Efeito do tratamento com EBH de *Chenopodium ambrosioides* na celularidade dos órgãos linfóides dos animais com cistite

Compararam-se as médias do número de células no baço, nos linfonodos drenantes e na medula óssea dos animais e não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias (\pm S.E.M.) dos números de células no baço, nos linfonodos drenantes e na medula óssea.

GRUPOS	Nº Células no Baço ($\times 10^8$ /mL)	Nº Células nos Linfonodos ($\times 10^4$ /mL)	Nº Células na Medula Óssea ($\times 10^4$ /mL)
Controle Negativo	486 (\pm 164,4)	252 (\pm 160,5)	63 (\pm 35,6)
EBHCa	478 (\pm 127,6)	157 (\pm 143,8)	69 (\pm 24,5)
Controle Positivo	538 (\pm 101,2)	238 (\pm 145,1)	47 (\pm 24,5)

3.7 Efeito do tratamento com EBH de *Chenopodium ambrosioides* no peso médio do baço, do fígado, dos linfonodos e dos rins

Quando realizada a comparação entre o peso médio dos órgãos semelhantes entre si: baço, fígado, linfonodos drenantes e rins, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias (\pm S.E.M.) dos pesos (mg) do Baço, do Fígado, dos Linfonodos e dos Rins.

GRUPOS	Baço	Fígado	Linfonodos	Rim Direito	Rim Esquerdo
Controle Negativo	3,97 (\pm 0,4)	102,83 (\pm 22,5)	0,17 (\pm 0,07)	10,98 (\pm 2,7)	10,68 (\pm 2,8)
EBHCa	4,01 (\pm 0,6)	97,66 (\pm 24,7)	0,14 (\pm 0,07)	12,40 (\pm 4,5)	12,39 (\pm 4,5)
Controle Positivo	3,85 (\pm 0,4)	98,03 (\pm 27,2)	0,16 (\pm 0,06)	11,46 (\pm 4,3)	11,10 (\pm 3,9)

4 DISCUSSÃO

A cistite hemorrágica é um efeito colateral bem conhecido nos pacientes em tratamento com a CYP, um agente alquilante do grupo das oxazafosforinas, fato que limita o uso clínico dessa droga. A acroleína, um metabólito resultante da hidroxilação hepática da CYP é o agente responsável pela sua urotoxicidade, por meio da ativação intracelular da produção de ROS e do NO que, por sua vez, ativam a via do NF κ B que leva à produção de citocinas, como o TNF- α e IL-1 β , e à expressão de iNOS, com conseqüente aumento de ROS e NO (Korkmaz et al., 2007; Ribeiro et al., 2012). O desfecho final dessa cascata de eventos é a cistite hemorrágica, decorrente do dano ao DNA da célula e da necrose celular, que se caracteriza por lesão do urotélio, dor, edema, necrose, ulceração, hemorragia, neovascularização e infiltração leucocitária (Assreuy et al., 1999; Korkmaz et al., 2007; Ribeiro et al., 2012). A bexiga é o órgão do trato urinário mais suscetível à lesão pela acroleína devido a sua função de reservatório e maior exposição ao metabólito tóxico (Hu et al., 2003). A CYP, na dose de 150 mg/kg de peso, foi capaz de provocar cistite hemorrágica em todos os animais dessa amostra.

Chenopodium ambrosioides apresentou atividade anti-inflamatória nas pesquisas desenvolvidas por Ibironke e Ajiboye (2007) e TrivellatoGrassi et al. (2012), que utilizaram modelos experimentais clássicos, como edema de pata e de orelha induzidos por carragenina e outras substâncias, formação de granuloma por implante de bola de algodão em ratos e pleurisia induzida por carragenina. A partir de tais evidências, nosso grupo decidiu investigar se *Chenopodium ambrosioides* apresenta atividade anti-inflamatória utilizando um modelo experimental que envolve processo inflamatório de uma víscera oca, no caso, a CH induzida pela CYP.

O uso popular de *Chenopodium ambrosioides* é decorrente do seu baixo custo, fácil acesso e manipulação, entretanto, na maioria dos casos, sem nenhuma comprovação científica de sua eficácia e dos seus efeitos colaterais (Oliveira, 2001). Como parâmetro de comparação, o controle positivo foi feito com um dos anti-inflamatórios não hormonais mais prescritos mundialmente que é o diclofenaco de potássio, cuja atividade terapêutica decorre da inibição da ciclooxigenase, reduzindo a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (Oliveira Junior, 2007). O MESNA, por sua vez, não possui atividade anti-inflamatória e nem é capaz de

promover a reparação tecidual. A sua ação na prevenção da CH induzida pela CYP decorre da inativação da acroleína eliminada pela urina (Santos Jr et al., 2010).

A inflamação é uma resposta complexa do tecido conjuntivo vascularizado e pode ser desencadeada por infecção, antígenos ou lesão tecidual e tem por função erradicar os agentes microbianos ou irritantes, e potencializar o reparo tecidual (Nathan, 2002; Tracey, 2002; Sherwood; Toliver-Kinsky, 2004; Flower; Perretti, 2005). Está dividida em várias etapas, que se iniciam com o aumento da permeabilidade vascular, extravasamento e formação de edema, característicos da fase aguda, até uma fase mais tardia que envolve migração celular. A migração é um processo dependente da produção local de quimiocinas que atuam principalmente na quimiotaxia de leucócitos, monócitos, neutrófilos e outras células efetoras do sangue para os locais com infecções ou lesões (Flower; Perretti, 2005).

No modelo experimental utilizado, o peso da bexiga dos animais dos grupos EBHCa e CP, que reflete de modo indireto a inflamação aguda (edema, congestão vascular e infiltrado celular), foi em média menor que no grupo CN, hipótese que se confirma após a análise histológica das bexigas que demonstrou menor inflamação aguda e menor extensão do infiltrado inflamatório nesses grupos. O menor infiltrado no tecido vesical dos animais dos grupos EBHCa e CP não se manteve quando realizada a análise da urina, cujo infiltrado inflamatório foi em média semelhante em todos os grupos, talvez porque o dano aos vasos sanguíneos e consequente hemorragia tenham causado grande extravasamento de células para a luz vesical.

Além de uma menor extensão do infiltrado inflamatório, o EBH e o diclofenaco foram capazes de diminuir a inflamação aguda e crônica e a neoformação vascular. Na resposta inflamatória, o aumento de células assim como o aumento da vascularização são indicativos de processo inflamatório aumentado (Flower; Perretti, 2005).

Quanto à proliferação fibroblástica e à colagenização, a análise histológica não revelou diferenças entre os grupos, possivelmente porque o modelo utilizado, onde os animais foram sacrificados 48 horas após a indução da cistite e do tratamento, abrangeu as etapas iniciais da inflamação, sem refletir a repercussão do tratamento nas etapas posteriores de reparação tecidual, quando há proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno e geralmente se iniciam a partir do terceiro dia (Philips, 2003).

Diante dos indícios relatados acima de atividade anti-inflamatória do EBH de *Chenopodium ambrosioides* na CH induzida pela CYP, foram realizadas análises imuno-histoquímicas para a investigação das vias de sinalização envolvidas nesse processo. Para tanto, verificou-se a expressão imuno-histoquímica da COX-2, do NF κ B e da iNOS na bexiga dos animais com cistite.

A COX-2 é uma isoenzima que, em resposta a estímulos inflamatórios e mitogênicos, converte o ácido araquidônico em prostaglandinas associadas à resposta inflamatória. A sua inibição seria responsável pelos efeitos terapêuticos dos anti-inflamatórios não hormonais (Kummer; Coelho, 2002). O EBH de *Chenopodium ambrosioides*, assim como o diclofenaco, foi capaz de diminuir a expressão de COX-2, quando comparados com o CN, sugerindo que a diminuição da inflamação está relacionada com a inibição da produção de prostaglandinas.

Macedo et al. (2008) demonstraram que a COX-2 participa da patogênese da CH induzida pela IFO e o tratamento com inibidores da COX-2 e do TNF- α reduz a expressão de COX-2. A participação da COX-2 foi também demonstrada na CH induzida pela CYP (HU et al., 2003) e que citocinas, com o TNF- α , são mediadores cruciais na indução da COX-2 (Macedo et al., 2012).

O NF κ B é um fator de transcrição nuclear que regula vários genes relacionados às respostas imune e inflamatória, como a expressão de iNOS, COX-2 e TNF- α e a sua supressão pode ser útil na atenuação de várias doenças inflamatórias (Kang et al., 2011; Vykhovanets et al., 2012). O EBH de *Chenopodium ambrosioides* também diminuiu a expressão de NF κ B demonstrando ser esta uma via envolvida na CH induzida pela CYP. Entretanto, não é possível descartar que a resposta inflamatória é atenuada pela inibição de outros fatores de transcrição.

O NO é um gás que regula uma série de importantes processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo o tônus vascular, leucócitos polimorfonucleares, adesão e inflamação. O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima NO sintetase (NOS). Há três subtipos de NOS: endotelial (eNOS), encontrada em células endoteliais e fibroblastos, que é responsável pela vasodilatação; neuronal (nNOS) encontrada no sistema nervoso, onde funciona como um importante sinalizador molecular e o induzível (iNOS), que pode ser encontrado em um número maior de células, como polimorfonucleares e macrófagos. A ativação da iNOS produz uma maior quantidade de NO que a eNOS. Há evidências que o NO produzido pela iNOS é tóxico, uma vez que a sua inibição

seletiva em modelos animais experimentais diminui a inflamação (Korkmaz et al., 2003; Aizawa et al., 2011).

O EBH de *Chenopodium ambrosioides* na presente pesquisa não foi capaz de diminuir a expressão de iNOS, apesar de haver uma tendência numérica que pode ser confirmada ou não em pesquisa futura com um número amostral maior que o atual. Oter et al. (2004) demonstraram que o NO produzido pela iNOS é um importante mediador na patogênese da CH induzida pela CYP.

A diminuição do NF κ B nos animais tratados com o EBH de *Chenopodium ambrosioides* nos motivou a investigar a produção de TNF- α , que é uma citocina de resposta inflamatória aguda e que está envolvida na fisiopatologia da CH induzida pela CYP (Ribeiro et al., 2012). O EBH não alterou a síntese de TNF- α na urina nem no sobrenadante da cultura de linfonodos drenantes da bexiga. Não houve produção desta citocina no soro, fato que sugere que a CH por CYP pode ser um modelo de inflamação local. Outro dado que reforça tal hipótese é o fato de não ter havido produção de NO pelas células do sobrenadante da cultura de linfonodos drenantes da bexiga dos animais com cistite.

O EBH de *Chenopodium ambrosioides* não interferiu na celularidade de órgãos linfoides, como o baço, os linfonodos drenantes e a medula óssea, assim como nos pesos médios do baço, do fígado, dos linfonodos drenantes e dos rins. Tais achados podem indicar ausência de efeitos tóxicos do EBH no presente estudo. Pereira et al. (2010) observaram que o uso do EBH na dose de 50 mg/kg, por um período de 15 dias, aumentou a celularidade dos linfonodos e da medula óssea, por possível efeito imunomodulador, porém aumentou também a ureia sérica e o peso do rim, achados que sugerem nefrotoxicidade.

As evidências da atual investigação indicam que o *Chenopodium ambrosioides* pode se constituir em alternativa terapêutica futura para a CH induzida pela CYP. Para tanto, são necessárias novas pesquisas para a caracterização dos componentes bioativos envolvidos na sua ação anti-inflamatória e o estabelecimento da dose terapêutica ideal que minimize seus eventuais efeitos tóxicos.

5 CONCLUSÕES

O EBH de folhas de *Chenopodium ambrosioides* apresenta atividade anti-inflamatória local semelhante ao diclofenaco de potássio nos animais com CH induzida pela CYP, o que foi evidenciado por:

- a) diminuição do peso da bexiga;
- b) redução da inflamação aguda e crônica, do infiltrado inflamatório e da neoformação capilar na bexiga dos animais com cistite;
- c) inibição da expressão de COX-2 e NFκB no tecido vesical dos animais com cistite.

Por outro lado, o EBH de folhas de *Chenopodium ambrosioides* não alterou os seguintes parâmetros avaliados:

- a) o infiltrado inflamatório na urina;
- b) a proliferação fibroblástica e a colagenização;
- c) a liberação de TNF-α na urina, no soro e no sobrenadante da cultura de células dos linfonodos drenantes da bexiga dos animais com cistite;
- d) a expressão da iNOS na bexiga e a produção de NO pelas células dos linfonodos drenantes da bexiga;
- e) a celularidade dos órgãos linfóides e peso do fígado, do baço, dos linfonodos drenantes da bexiga e dos rins nos animais com cistite.

REFERÊNCIAS

- Aizawa N, Igawa Y, Nishizawa O, Wyndaele J. Effects of Nitric Oxide on the Primary Bladder Afferent Activities of the Rat With and Without Intravesical Acrolein Treatment. *Eur Urol.* 2011; 59:264-71.
- Assreuy AM, Martins GJ, Moreira ME, Brito GAC, Cavada BS, Ribeiro RA, Flores CA. Prevention of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. *J Urol.* 1999; 161:1988–93.
- Bancroft JD, Stevens A. *Theory and practice of histological techniques.* London: Churchill Livingstone; 2012.
- Bezerra JL, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício FJ, Sousa SM, Amaral F MM, Rebelo JMM, Guerra, RNM, Ribeiro MNS, Nascimento FRF. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn.* 2006; 16:631-37.
- Brasil, 2008. Ministério Da Saúde, Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Portaria Interministerial nº 2960 em 9 de dezembro de 2008. Publica Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, 10 de dez.
- Chow YC, Yang S, Huang CJ, Tzen CY, Huang PL, Su YH, Wang PS. Epinephrine promotes hemostasis in rats with cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Urology.* 2006; 67:636–41.
- Cox PJ. Cyclophosphamide cystitis-identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol.* 1979; 28:2045-9.
- Cruz GVB, Pereira PVS, Patrício FJ, Costa GC, Sousa SM, Frazão JB et al.. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *J Ethnopharm.* 2007; 111:148-54.
- Dembitsky V, Shkrob I, Hanus LO. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky.* 2008; 152:209-15.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capassao F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 1999; 65:337-53.
- Dinan L, Whiting P, Scott AJ. Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of chenopodiaceae. *Biochem Syst Ecol.* 1998; 26:553–76.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 1988; 141:2407–12.

- Efferth T, Olbrich A, Sauerbrey A, Ross DD, Gebhart E, Neugebauer M. Activity of ascaridol from the anthelmintic herb *Chenopodium anthelminticum* L. against sensitive and multidrug-resistant tumor cells. *Anticancer Res.* 2002; 22:4221–24.
- El-Zimaity M, Saliba R, Chan K, Shahjahan M, Carrasco A, Khorshid O et al.. Hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: donor type matters. *Blood.* 2004; 103:4674-80.
- Flower RJ, Perretti M. Controlling inflammation: a fat chance? *J Exp Med.* 2005; 201: 671-74.
- França F, Lago EL, Marsden PD. Plants used in the treatment of Leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1996; 29:447-53.
- Gonçalves Filho A, Torres OJM, Campos ACL ; Tambara Filho R, Rocha ICA, Thiede A et al. Efeito do Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. *Acta Cir Bras.* 2006; 21:3-8.
- Hadjibabaie M, Alimoghaddam K, Shamschiri AR, Iravani M, Bahar B, Mousavi A et al.. Continuous bladder irrigation prevents hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Urol Oncol.* 2008; 26:43-6.
- Hu VY, Malley S, Dattilio A, Folsom JB, Zvara P, Vizzard MA. COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284:R574-85.
- Ibironke GF, Ajiboye KI. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. *Int J Pharmacol.* 2007; 3:111–15.
- Jardim CM, Jham GN, Dhingra OD, Freire MM. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *J Chem Ecol.* 2008; 34:1213-18.
- Jouad H, Haloui M, Rhiouani, Hilaly J El, Eddouks M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez – Boulemane). *J Ethnopharmacol.* 2001; 77:175-82.
- Kang CH, Choi YH, Choi W, Lee JD, Kim GY. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced iNOS, COX-2, and TNF- α Expression by Aqueous Extract of *Orixa Japonica* in RAW 264.7 Cells via Suppression of NF- κ B Activity. *Trop J Pharm Res.* 2011; 10: 161-68.
- Kismann, KG. Plantas infestantes e nocivas. São Paulo: BASF Brasileira; 1991.
- Kiuchi F, Itano Y, Uchiyama N, Honda G, Tsubouchi A, Nakajimashimada J. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *J Nat Prod.* 2002; 65:509–12.

- Kliks, MM. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evaluation and clinical field trials. *Soc Sci Med*. 1985; 21:879-86.
- Kokanova-Nedialkova Z, Nedialkov P, Nikolov SD. The genus *Chenopodium*: Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. *Pharmacog Rev*. 2009; 3:280-306.
- Korkmaz A, Oter S, Deveci S, Ozgurtas T, Topal T, Sadir S et al. Involvement of nitric oxide and hyperbaric oxygen in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. *J Urol*. 2003; 170:2498-502.
- Korkmaz A, Oter S, Sadir S, Coskun O, Topal T, Ozler M, Bilgic H. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. *J Urol*. 2005; 173:1793-6.
- Korkmaz A, Topal T, Oter S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol Toxicol*. 2007; 23:303–312.
- Korkmaz A, Ozturk M, Yildirim I. Hemorrhagic cystitis; an old story with new advancements. *J Exp Integr Med*. 2012; 2:93-4.
- Kumar R, Mishra AK, Dubey NK, Tripathi YB. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *Int J Food Microbiol*. 2007; 115:159–64.
- Kummer CL, Coelho TCRB. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002; 52:498–512.
- Lawrence BM. Wormseed or *Chenopodium* oil. *Perfum Flavor*, 1999; 24:45–6.
- Lin CY, Keefe M. Mesna-induced photodistributed dermatoses. *Clin Exp Dermatol*. 2011; 37:358–60.
- Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr*. 2004; 134:3479-85.
- Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2008.
- Macedo FY, Baltazar F, Mourao LC. Induction of COX-2 expression by acrolein in the rat model of hemorrhagic cystitis. *Exp Toxicol Pathol*. 2008; 59:425–430.
- Macedo FYB, Mourão LTC, Palheta Jr RC, Jucá DM, Lima Jr RCP, Neto JSC et al. Cyclooxygenase-2 contributes to functional changes seen on experimental hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide in rat urinary bladder. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 67:935–43.

Macedo FYB, Mourão LTC, Freitas HC, Lima-Júnior RCP, Wong DVT, Oriá RB et al.. Interleukin-4 Modulates the Inflammatory Response in Ifosfamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Inflammation*. 2012; 35:297-307.

Meisenberg B, Lassiter M, Hussein A, Ross M, Vredenburgh JJ, Peters WP. Prevention of hemorrhagic cystitis after high-dose alkylating agent chemotherapy and autologous bone marrow support. *Bone Marrow Transplant*. 1994; 14:287-91.

Mendes FR, Carlini E. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *J Ethnopharm*. 2007; 109:493-500.

Monzote L, Sariego I, Montalvo AM, Garrido N, Scull R, Abreu J. Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. *Rev Cubana Med Trop*. 2004; 56:230-33.

Monzote L, Montalvo AM, Almanonni S, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy*. 2006; 52:130-36.

Monzote L, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: a preliminary study. *Biomed Pharmacother*. 2007a; 61:148-53.

Monzote L, García M, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. *In vitro* Activity of an Essential Oil against *Leishmania donovani*. *Phytother Res*. 2007b; 21:1055-58.

Monzote L, García M, Montalvo AM, Linares R, Scull R. Effect of oral treatment with the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice, caused by *Leishmania amazonensis*. *Forsch Komplementärmed*. 2009; 16:334-38.

Moraes EM. Perfil botânico, químico, farmacológico e toxicológico das plantas medicinais utilizadas no Maranhão [trabalho de conclusão de curso]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão. Curso de Farmácia; 1996.

Morais MM, Belarmino-Filho JN, Brito GA, Ribeiro RA. Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis - comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32:1211-15.

Moreira RCT, Costa LCB, Costa RCS, Rocha EA. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. *Acta Farm Bonaerense*. 2002; 21:202-11.

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

Nascimento FRF, Cruz GVB, Pereira PVS, Maciel MCG, Silva IA, Azevedo APS et al.. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. Life Sci. 2006; 78:2650-53.

Nathan C. Points of control in inflammation. Nature. 2002; 420:846-52.

Okuyama E, Umeyama K, Saito W, Yamazaki M, Satake M. Ascaridole as a pharmacologically active principle of Paico, a medicinal Peruvian plant. Chem Pharm Bull. 1993; 41:1309-11.

Oliveira AB. Espectrofotometria no controle de qualidade de fitoterápicos da *Schinus terebinthifolius raddi*: uso de marcadores. [Dissertação]. São Luis: Universidade Federal do Maranhão. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde; 2001.

Oliveira Júnior JO, Serrano SC, Teodoro AL, Dana BA. Os anti-inflamatórios não hormonais. Rev Prat Hosp. 2007; 9:173-8.

Oter S, Korkmaz A, Oztas E, Yildirim I, Topal T, Bilgic H. Inducible nitric oxide synthase inhibition in cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. Urol Res. 2004; 32:185-9.

Patrício FJ, Costa GC, Pereira PVS, Aragão-Filho WC, Sousa SM, Frazão JB et al.. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. J Ethnopharm. 2008; 115:313-19.

Pereira WS, Ribeiro BP, Sousa AIP, Serra ICPB, Mattar NS, Fortes TS, Reis AS et al.. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. J Ethnopharm. 2010; 127:602-5.

Phillips LG. Cicatrização das feridas. In: Townsend Junior CM, autor. Sabiston tratado de cirurgia: as bases biológicas da prática cirúrgica moderna. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 141-53.

Pio Correa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal; 1984.

Plants Database [base de dados na internet]. Greensboro: United States Department of Agriculture - Natural Resources Conservation Service. [atualizada em 2013 Mar 4; acesso em 2013 Mar 8]. Disponível: <http://www.plants.usda.gov>.

Pollack Y, Segal R, Golenser J. The effect of ascaridole on the *in vitro* development of *Plasmodium falciparum*. Parasitol Res. 1990; 76:570-72.

Ribeiro RA, Lima-Junior RCP, Leite CAVG, Mota JMSC, Macedo FYB, Lima MVA et al. Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches and new insights. J Exp Integr Med. 2012; 2:95-112.

Rossi-Bergmann B, Costa SS, Moraes VLG. Brazilian medicinal plants: a rich source of immunomodulatory substances. Ciência e Cultura. 1997; 49:395-401.

- Santos Jr AA, Leal PC, Edelweiss MI, Lopes TG, Calixto JB, Morrone FB, et al. Effects of the compounds MV8608 and MV8612 obtained from *Mandevilla velutina* in the model of hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010; 382:399-407.
- Seber A, Shu XO, Defor T, Sencer S, Ramsay N. Risk factors for severe hemorrhagic cystitis following BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23:35-40.
- Shepherd JD, Pringle LE, Barnett MJ, Klingemann HG, Reece DE, Phillips GL. Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* 1991; 9:2016-20.
- Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin An.* 2004; 18:385-405.
- Simpfendorfer E. Intoxicación por ascaridol. *Rev Chilena Ped.* 1944; 15:388-93.
- Sousa LHA. Avaliação da Ação Analgésica do Extrato Hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos [trabalho de conclusão de curso]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão. Curso de Medicina; 2012.
- Stillwell TJ, Benson RC Jr. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis: a review of 100 patients. *Cancer.* 1988; 61:451-7.
- Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002; 420:852-9.
- TrivellatoGrassi L, Malheiros A, Meyre-Silva C, Buss ZS, Monguilhott ED, Frode TS et al.. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *J Ethnopharm.* 2012; 145:127-38.
- Vieira LS. Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais. São Paulo: Agronômica Ceres; 1992.
- Vykhovanets EV, MacLennan GT, Vykhovanets OV, Cherullo EE, Ponsky LE, Gupta S. Molecular Imaging of Nuclear Factor- κ B in Bladder as a Primary Regulator of Inflammatory Response. *J Urol.* 2012; 187:330-7.

APÊNDICE A - Protocolo de análise histológica

Lâmina N°: _____ ; Fotografia N° : _____ ; Data: ____/____/____

HEMATOXILINA-EOSINA**1) Inflamação Aguda:**

- (1) Somatório 0 (ausência de inflamação aguda)
- (2) Somatório 1 ou 2 (inflamação aguda discreta)
- (3) Somatório 3 ou 4 (inflamação aguda moderada)
- (4) Somatório 5 ou 6 (inflamação aguda acentuada)

Os critérios aplicados encontram-se no Quadro abaixo:

QUADRO 1 – CRITÉRIOS APLICADOS PARA AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO AGUDA

CRITÉRIOS	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2
NEUTRÓFILOS	ausentes	presente, em menos de 50% do campo	presente, em mais de 50% do campo
CONGESTÃO VASCULAR	ausente	presente, em menos de 50% do campo	presente, em mais de 50% do campo
EDEMA	ausente	presente, em menos de 50% do campo	presente, em mais de 50% do campo

2) Inflamação Crônica:

- (1) Ausente (não existe leucócitos mononucleares)
- (2) Discreta (leucócitos mononucleares isolados e esparsos)
- (3) Moderada (leucócitos mononucleares agregados atingindo parcialmente o campo)
- (4) Acentuada (leucócitos mononucleares agregados e confluentes atingindo todo o campo)

3) Proliferação Fibroblástica:

- (1) Ausente (não existe fibroblastos proliferados no campo de sutura)
- (2) Discreta (esparsos fibroblastos proliferados em meio ao tecido conjuntivo frouxo)
- (3) Moderada (pequenos feixes multidirecionais de fibroblastos)
- (4) Acentuada (fibroblastos constituindo feixes compactos arranjados multidirecionalmente)

4) Fibrose (colagenização):

- (1) Ausente (não existe fibras colágenas depositadas)
- (2) Discreta (deposição de fibras colágenas de pequena intensidade, caracterizada por esparsas fibras depositadas em meio aos fibroblastos proliferados)
- (3) Moderada (fibras de colágeno depositadas formam feixes espessos eosinofílicos, intercaladas com áreas de tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos proliferados)

(4) Acentuada (grande deposição de fibras colágenas com feixes espessos e compactos em meio a fibroblastos proliferados e sem áreas de tecido conjuntivo frouxo)

5) Extensão do Infiltrado na Parede:

- (1) Até a mucosa
- (2) Até a submucosa
- (3) Até a muscular
- (4) Até a serosa

6) Neoformação Capilar:

- (1) Ausente (ausência de vasos neoformados)
- (2) Discreta (pequena quantidade de vasos neoformados)
- (3) Moderada (moderada quantidade de vasos neoformados)
- (4) Acentuada (grande quantidade de vasos neoformados)

APÊNDICE B - Protocolo de análise imuno-histoquímica

Lâmina N°: _____; Fotografia N° : _____; Data: ____/____/____

CRITÉRIOS DE ANÁLISE		
ESCORE	DISTRIBUIÇÃO	INTENSIDADE
0	Ausente	Ausente
1	Em até 1/3 dos campos	Leve
2	Em mais de 1/3 e menos de 2/3 dos campos	Moderada
3	Em mais de 2/3 dos campos	Intensa

1. COX-2

DISTRIBUIÇÃO	0	1	2	3
INTENSIDADE	0	1	2	3
ESCORE TOTAL				

2. NF_κB

DISTRIBUIÇÃO	0	1	2	3
INTENSIDADE	0	1	2	3
ESCORE TOTAL				

3. iNOS

DISTRIBUIÇÃO	0	1	2	3
INTENSIDADE	0	1	2	3
ESCORE TOTAL				