

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
CURSO DE MEDICINA**



**EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA *CAESALPINIA
PYRAMIDALIS* (TUL.) REDUZ LESÃO À BEXIGA
URINÁRIA DE RATOS COM CISTITE
HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA**

JANAÍNA PEREIRA MORAES

**Aracaju-SE,
2014.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA-DME
CURSO DE MEDICINA**



**EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA *CAESALPINIA
PYRAMIDALIS* (TUL.) REDUZ LESÃO À BEXIGA
URINÁRIA DE RATOS COM CISTITE
HEMORRÁGICA INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA**

JANAÍNA PEREIRA MORAES

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado de Medicina da
Universidade Federal de Sergipe, como
requisito parcial para sua conclusão.

Orientador: Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo

**Aracaju-SE,
2014.**

Janaína Pereira Moraes

**EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA *CAESALPINIA
PYRAMIDALIS* (TUL.) REDUZ LESÃO À BEXIGA URINÁRIA
DE RATOS COM CISTITE HEMORRÁGICA INDUZIDA POR
CICLOFOSFAMIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Sergipe, como requisito parcial para sua
conclusão.

Aprovada em: __/__/__, Aracaju – SE.

Orientador: Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo

Autora: Janaína Pereira Moraes

BANCA EXAMINADORA

Agradecimentos

Agradeço, antes de tudo, à Deus, o médico dos médicos, que me ajudou a enfrentar toda minha jornada e cuidou de mim durante as adversidades.

Aos meus pais, que me acompanharam em todos os momentos e batalharam para que eu tivesse a melhor educação.

Ao meu orientador, que me acompanhou por quatro longos anos, transferindo grande carga de conhecimento científico e técnico, com paciência e generosidade, se disponibilizando para qualquer dúvida que eu apresentasse. Agradeço por sua compreensão e amizade. Almejo ser um ser humano íntegro igual a você.

Ao meu esposo, Davi Thiesse, por seu amor incondicional e por ter me apoiado em todas as minhas decisões. Amo você.

Aos meus amigos de curso que não mediam esforços para me ajudar. Juntos compartilhamos momentos grandiosos e inesquecíveis.

Lista de Siglas

OMS: Organização Mundial da Saúde
INCA: Instituto Nacional do Câncer
CP: Ciclofosfamida
HC: Cistite Hemorrágica
NF- κ B: Fator Nuclear κ B
AP-1: Protéina Ativadora-1
GSH: Glutathiona
ROS: Espécies Reativas de Oxigênio
SOD: Superóxido Dismutase
CAT: Catalase
GST: Glutathiona S-Transferase
GPx: Glutathiona Peroxidase
MAPK: Proteínas Cinasas Ativadas por Mitógeno
JNK: Cinase N-terminal c-jun
NO: Óxido Nítrico
NOS: NO Sintases
cNOS: NO Sintase constitutiva
iNOS: NO Sintase induzível
L-NAME: L-NG-Nitroarginina-Metil-Ester
L-NOARG: L-NG-Nitroarginina
AG: Aminoguanidina
PARP: Poli (ADO-ribose) polimerase
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α
INF- γ : Interferon- γ
IL1- β : Interleucina-1 β
IL-11: Interleucina 11
IL-4: Interleucina 4
PAF: Fator de Ativação Plaquetária
GAG: Glicosaminoglicana
ALT: Alanina Aminotransferase
AST: Aspartato Aminotransferase

COX-2: Ciclo-oxigenase 2

Sumário

1. REVISÃO DE LITERATURA	8
Câncer.....	8
Oxazoforinas e Cistite Hemorrágica	9
Interferência das Oxazoforinas no Equilíbrio Redox e na Cascata Inflamatória	11
Fisiopatogênese, Quadro Clínico e Histopatológico da Cistite Hemorrágica ...	14
Outros Efeitos Indesejados do Uso de Ciclofosfamida	15
Tratamento da Cistite Hemorrágica	15
Produtos Naturais.....	17
<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul.	18
Referências Bibliográficas.....	20
2. ARTIGO CIENTÍFICO	28
1. Introduction	28
2. Material and Methods	35
3. Results	36
4. Discussion.....	38
References.....	40

1. REVISÃO DE LITERATURA

Câncer

A partir do processo de urbanização, industrialização e desenvolvimento da ciência e tecnologia, o mundo tem experimentado uma transição demográfica, marcada pela redução da mortalidade e aumento da expectativa de vida, culminando com o envelhecimento populacional. Nesse contexto, as doenças crônico-degenerativas ganharam foco, à medida que as doenças infectocontagiosas reduziram no cenário mundial. A partir das mudanças ocorridas mundialmente, a população passou a se expor a uma série de fatores de riscos ambientais, relacionados ao processo de industrialização (físicos, químicos e biológicos), além de adotarem padrões de vida que aumentaram o risco neoplásico, como: tabagismo, alcoolismo, falta de atividade física, refeições de baixo teor nutricional, etc. Sendo assim, o câncer tornou-se, na atualidade, um problema de saúde pública mundial devido ao aumento de sua prevalência entre as doenças crônicas (GUERRA, MOURA GALLO, MENDONÇA, 2005; BRASIL, 2014).

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Nacional para Pesquisa em Câncer, da Organização Mundial de Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, no ano de 2012. Além disso, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que em 2014 e 2015 ocorrerão aproximadamente 576 mil casos novos de câncer no Brasil, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Dentre essas estimativas, o câncer mais incidente será o de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos), seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e cólo do útero (15 mil). Em relação aos tipos de câncer, nota-se uma transição epidemiológica no Brasil, com aumento dos tipos de câncer normalmente associados a alto *status* sócioeconômico - câncer de mama, próstata e cólon e reto - e, simultaneamente, a presença de incidência persistentemente elevadas de tumores geralmente associados com a pobreza - câncer de colo de útero, pênis, estômago e cavidade oral (KOIFMAN, KOIFMAN, 2003).

Diante das estimativas impactantes é importante realizar atividades de prevenção primária para tentar reduzir ou até eliminar os fatores de risco associados ao câncer, e que predispoem também à outras doenças crônicas, como controle do uso de tabaco, redução do consumo de álcool, dieta com qualidade nutricional e prática de atividades físicas regulares. Ademais a prevenção secundária para alguns tipos de câncer, como o de mama e de colo

uterino, também deve ser implementada e fazerem parte de políticas prioritárias para o combate e controle do câncer (GUERRA, MOURA GALLO, MENDONÇA, 2005).

Oxazoforinas e Cistite Hemorrágica

Entre os tipos de tratamento para o câncer, a quimioterapia é uma abordagem sistêmica e citotóxica que torna possível a cura de alguns tumores, além de permitir o tratamento precoce de metástases não detectáveis. Essa modalidade de tratamento traz inúmeros efeitos indesejados, os quais se relacionam ao fato de não afetarem exclusivamente as células tumorais (BONASSA, 2005). Exemplificando, temos os danos relacionados ao sistema urinário, que estão associados ao uso de ciclofosfamida e ifosfamida (KORKMAZ, TOPAL, OTER, 2007), sendo que a quimioterapia precisa ser muitas vezes interrompida devido a este efeito tóxico (LIMA et al., 2007).

A ciclofosfamida (CP) é um agente quimioterápico, antineoplásico, alquilante, do grupo das oxazoforinas (OTER et al., 2004), sendo seu efeito induzido através da formação de ligações cruzadas com o DNA do tumor (DANTAS et al., 2010). Este antineoplásico, é bastante empregado no tratamento do câncer de testículo, osteossarcoma, linfomas, dentre outros (HIGGS, NAGY, EINHOM, 1989). Devido as suas propriedades imunossupressoras também é largamente utilizada em outras condições, à exemplo de doenças auto-imunes como: lúpus eritematoso sistêmico e nefrite lúpica, artrite reumatoide (MONACH et al., 2010), vasculites sistêmicas: granulomatose de Wegener (KNIGHT et al., 2004) e doenças renais: nefrite lúpica, síndrome nefrótica resistente a esteróides, e glomeruloesclerose segmentar e focal. (MUKHTYAR et al., 2009; HAUBITZ, 2007). Ainda é empregada para anemia aplástica e em regimes de condicionamento antes de transplante de medula óssea (DEZERN et al., 2011). Por sua vez, a ifosfamida também pertence aos grupos das oxazoforinas e é amplamente utilizada, por exemplo, na quimioterapia de doenças linfoproliferativas, algumas de tumores sólidos e em doenças não neoplásicas, entre estas, o lúpus, a artrite reumatóide e a síndrome nefrótica (RATLIFF, WILLIAMS, 1998);

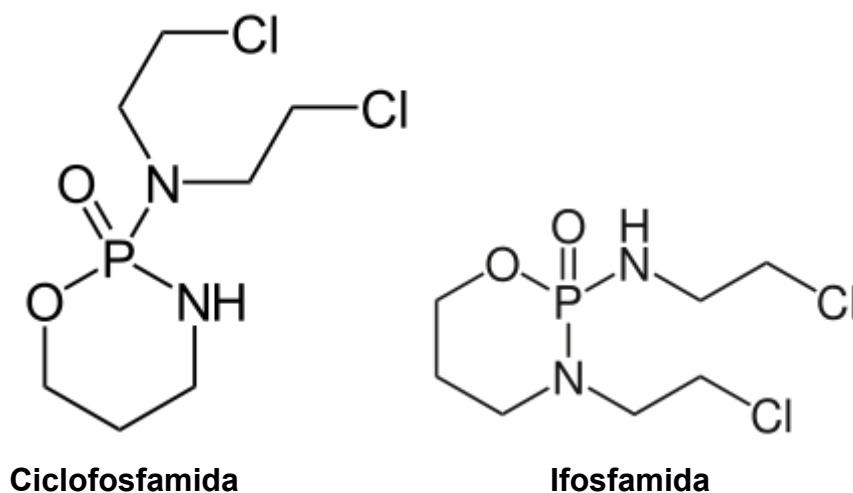


Figura 1: Estrutura química das oxazoforinas (ciclofosfamida e ifosfamida).

É importante salientar que a urotoxicidade deste grupo de fármacos não é devida a atividade alquilante direta sobre o sistema urinário, mas por causa da formação de metabólitos 4-hidroxilados (BROCK, POHL, STEKAR, 1981). A CP é uma pró-droga que sofre metabolismo hepático pelas enzimas microssomais, oxidases de função mista, do citocromo-P450, que transformam o fármaco nos compostos, 4-hidroxíciclofosfamida e aldofosfamida. Esses atingem as células tumorais, através da circulação sanguínea, e são convertidos em fosforamida, metabólito citotóxico ativo das oxazoforinas, acroleína, potencialmente urotóxica e o cloracetaldéido que pode causar encefalopatia (ZHANG et al., 2005). Conhece-se que a excreção renal de acroleína é altamente irritante para a bexiga urinária, causando diversos efeitos tóxicos (KEHRER, BISWAL, 2000) e é responsável pelo desenvolvimento de complicações potencialmente fatais, como a cistite hemorrágica (HC, STILLWELL, BENSON, 1988).

A CP é administrada por via oral ou intravenosa e, por ser utilizada em um grande número de patologias, as doses deste fármaco são muito variáveis. No tratamento do lúpus eritematoso sistêmico, relata-se que uma dose de 1 g/m² de CP, a cada mês, durante um período de seis meses, melhora os sintomas da doença (MARTINELLI et al., 1996). Doses altas, a partir de 120 mg/kg (5000 mg/m²), durante dois a quatro dias, são utilizadas no condicionamento antes do transplante de medula óssea e doses de 50 mg/kg por dia, durante 4 dias mostram bons resultados no tratamento da anemia aplástica (DEZERN et al., 2011). Considera-se dose alta de CP ≥ 1500 mg/m²/dose, dose intermediária ≥ 750 mg e < 1500 mg/m²/dose e baixa dose < 750 mg/m²/dose, no entanto qualquer paciente que recebe

ciclofosfamida em qualquer dose tem o potencial de desenvolver toxicidade vesical no curso de seu tratamento (ROBINSON et al., 2014).

Interferência das Oxazoforinas no Equilíbrio Redox e na Cascata Inflamatória

Em doses baixas, a acroleína, reage rapidamente com muitos alvos celulares levando a diferentes efeitos, a exemplo da depleção de grupos tióis ou da ativação de genes envolvendo as vias do fator nuclear κ B (NF- κ B) ou proteína ativadora-1 (AP-1), bem como é capaz de iniciar a peroxidação lipídica e reagir com a glutatona (GSH) diminuindo seus níveis (ADAMS, KLAIDMAN, 1993; BISWAL et al., 2002; HORTON et al., 1999; SONG et al., 2014). Reduz também a atividade de outras enzimas antioxidantes conhecidas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona S-transferase (GST) e glutatona peroxidase (GPx, SONG et al., 2014). Em doses mais altas a acroleína reage também com outros alvos celulares como proteínas e DNA (TAKAMOTO et al., 2004).

Os mecanismos fisiopatológicos desencadeados pela acroleína parecem envolver espécies reativas de oxigênio (como óxido nítrico, superóxido e a consequente formação de peroxinitrito) que contribuem para suas ações deletérias (ABRAHAM, RABI, 2009a, b; KORKMAZ, TOPAL, OBTER, 2007; SONG et al., 2014). Portanto nota-se que a acroléina causa lesão a partir da interrupção do equilíbrio redox. Estudos prévios sugerem que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é mediada pela ativação das MAPK (proteínas cinases ativadas por mitógeno). Essa família de proteínas desenvolvem importante papel na transdução de sinal da superfície da célula para o núcleo (MCCUBREY, LAHAIR, FRANKLIN, 2006), diversos estudos demonstraram o papel das MAPKs na fisiopatogênese da cistite hemorrágica (CORROW, VIZZARD; 2007; CORROW, VIZZARD; 2009; CHUNG, ZHANG, QIAO; 2010; QIAO, GULICK; 2007) e um recente trabalho demonstrou aumento da fosforilação das MAPK: JNK (cinase N-terminal c-jun) e p38, em um modelo de HC induzida por CP em camundongos (SONG et al., 2014).

A evidência da produção de Óxido Nítrico (NO) em modelos de cistite hemorrágica não é um evento inédito, muitos outros estudos se propuseram a demonstrar sua importância. O NO é uma pequena e simples molécula que possui a capacidade de ser ao mesmo tempo benéfica, auxiliando em ações homeostáticas do organismo, assim como potencialmente tóxica, a depender de sua concentração e depuração tecidual. Em baixas concentrações, o NO age

como mensageiro intercelular, participando de funções fisiológicas, em concentrações intermediárias age como microbicida e na vigência de quadro inflamatório e doenças autoimunes, o NO pode ser produzido em altas taxas sendo tóxico para as células do hospedeiro (FLORA FILHO, ZILBERSTEIN; 2000).

As enzimas que sintetizam o NO são chamadas de NO sintases (NOS), existem 3 isoenzimas conhecidas, sendo duas constitutivas (cNOS) e uma induzível (iNOS; STUEHR et al., 1991). Diferentemente das outras isoformas, a sintase induzível produz NO em grande quantidade, o que a torna potencialmente lesiva e participativa em muitos processos patológicos, como processos inflamatórios e doenças autoimunes. O NO é uma molécula transitória, oxidando-se a nitrito e nitrato em menos de dez segundos (meia vida), portanto uma estimativa de sua produção pode ser feita de forma indireta ao medir as concentrações de nitrito e nitrato (FLORA FILHO, ZILBERSTEIN; 2000), como foi realizado por outros autores (ABRAHAM, RABI, KULOTHUNGAN, 2009b; KORKMAZ, OTER, SADIR, 2005; XU, CUBEDDU, MALAVE, 2001).

De acordo com o trabalho de Souza-filho *et al.* (1997), o NO está envolvido nos eventos inflamatórios que desencadeiam HC induzida por CP. Com o uso de inibidores de NOS, L-NG-Nitroarginina Metil Ester (L-NAME), L-NG-Nitroarginina (L-NOARG), observou-se que ao inibir a produção de NO, houve redução de parâmetros inflamatórios, como extravasamento de proteínas plasmáticas, peso da bexiga e parâmetros histopatológicos. A inibição promovida por L-NAME E L-NOARG foi revertida com o uso de L-arginina, confirmando o papel do NO na HC.

Publicações diversas indicam que a iNOS é a responsável pela produção de NO na patogênese da cistite (KORKMAZ *et al.*, 2005; SOUZA-FILHO *et al.*, 1997; XU, CUBEDDU, MALAVE, 2001). Korkmaz *et al.* (2005), inclusive comprovaram este fato, ao utilizar o tratamento com aminoguanidina (AG), inibidor preferencial da iNOS, e verificar redução da concentração de nitrato na bexiga e de lesões uroteliais desencadeadas pela CP. Tentando explicar o mecanismo de proteção da AG na HC, Abraham *et al.* (2009) demonstraram que este efeito era mediado pela inibição da nitração de proteínas, induzida pelo NO, e inibição da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP).

As citocinas são mediadores cruciais do processo inflamatório com papéis fisiológicos diversos, e algumas delas tem sido implicadas na modulação da resposta

inflamatória na cistite hemorrágica induzida por oxazafosforinas. O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β) são as principais citocinas pró-inflamatórias e o seu papel na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida ou ifosfamida tem sido investigado. Um dado interessante, publicado por Xu *et al.* (2001), diz respeito a importância do TNF- α e interferon- γ (INF- γ), como indutores da produção de NO, ao proporcionarem uma maior expressão de iNOS. Outros autores referem que a indução de iNOS no urotélio depende da ação sinérgica de IL-1 β e TNF- α , em modelos de HC induzida por ifosfamida em camundongos (RIBEIRO, *et al.*, 2002; XU, CUBEDDU, MALAVE, 2001). O estudo de Ribeiro *et al.* (2002) demonstrou que o tratamento com soro anti-TNF- α , ou anti-IL-1 β diminui o edema da bexiga urinária e as alterações microscópicas na bexiga urinária. O tratamento com L-NAME, talidomida (um inibidor de TNF- α) ou pentoxifilina (inibidor não específico de TNF- α e IL-1 β) também reduz esses parâmetros. Houve também a inibição da expressão de iNOS pelo tratamento com os soros anti-TNF- α ou anti-IL-1 β . Estes dados aumentam as evidências de que a sinalização por citocinas pró-inflamatórias é importante para a expressão de iNOS na bexiga urinária na HC experimental. Foi evidenciado que o tratamento prévio de animais com soro anti-TNF- α ou anti-IL-1 β reduz o edema da bexiga urinária e o extravasamento de proteínas plasmáticas para este tecido em camundongos injetados com CP. Além disso, algumas alterações histopatológicas da bexiga urinária tais como erosão da mucosa, hemorragia, edema, migração de leucócitos, deposição de fibrina e ulcerações são reduzidas pelo pré-tratamento com soro anti-TNF- α ou anti-IL-1 β (GOMES *et al.*, 1995).

Outros estudos investigaram o efeito de citocinas anti-inflamatórias na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida ou ifosfamida. Mota *et al.* (2007) demonstraram que a interleucina-11 (IL-11), uma citocina com efeito protetor em várias doenças inflamatórias, reduz o edema da bexiga urinária e o extravasamento de proteínas plasmáticas para a bexiga urinária, além de reduzir alterações microscópicas. Recentemente foi demonstrado que o tratamento com IL-4 exógena atenua a expressão de mediadores inflamatórios tais como TNF- α , IL-1 β e iNOS. Em adição, animais tratados com soro anti-IL-4, assim como animais nocautes para IL-4, exibem um gravidade da HC maior do que aquele observado em animais tratados somente com ifosfamida (MACEDO *et al.*, 2012).

Como discutido acima, o principal mecanismo que leva à lesão da bexiga urinária vista na HC é o aumento da expressão de iNOS e a consequente elevação dos níveis de NO. Esse evento, por sua vez, está sob a regulação de citocinas como TNF- α e IL-1 β , além de outros mediadores inflamatórios como IFN- γ e PAF.

Fisiopatogênese, Quadro Clínico e Histopatológico da Cistite Hemorrágica

A bexiga é a parte do trato urinário mais afetada pela acroleína, o restante deste trato é pouco lesado e seus efeitos sobre a bexiga têm sido atribuídos ao tempo de contato desta com a acroleína, devido ao armazenamento da urina (BJORLING, 2006). Sabe-se que o urotélio é revestido por uma parede de glicosaminoglicanas (GAG) que confere uma proteção fisiológica inicial ao órgão, um defeito ou lesão neste local causa a perda desta barreira, que se torna permeável, permitindo que o ciclo inflamatório ocorra (Bassi et al., 2011), provavelmente a acroleína deve agir quebrando esta barreira. Na bexiga, este metabólito causa descamação, afinamento e inflamação das paredes vesicais. Esta irritação desenvolve sangramento do revestimento endotelial vesical que inicialmente pode ser microscópico contudo pode evoluir para hematúria macroscópica e sangramento grave (WEST, 1997). Existe uma escala de classificação da HC desenvolvida por Droller, Saral, e Santos (1982) no qual há a definição de quatro graus de gravidade que variam de hematúria microscópica (grau 1) a hematúria macroscópica, formação de coágulos, e obstrução do trato urinário (grau 4).

Quanto aos sintomas clínicos urinários, provocados pelos agentes alquilantes, estes variam desde quadros mais transitórios como frequência urinária alterada, acompanhada de urgência urinária, desconforto suprapúbico, disúria, estrangúria com micro-hematúria, até quadros potenciais e graves de HC. Consequências tais como: fibrose cística, necrose, contraturas, refluxo vesico-ureteral, além da presença de hemorragia cística grave e expansiva em 4 % das mortes registradas, foram relatadas (PHILIPS et al., 1961). Em casos mais graves a HC está associada a elevada morbidade, hospitalização prolongada e em alguns casos morte, podendo exigir alternativas mais agressivas como cistectomia, desvio urinário supravesical e embolização seletiva de artéria vesical (DECKER et al., 2009).

Histologicamente os trabalhos publicados expõe que a CP causa sérios prejuízos a arquitetura histológica da bexiga urinária, como erosão e ulceração epitelial, edema urotelial e da lâmina própria, hemorragia, exocitose, infiltrado leucocitário e esclerose e hialinização, resultado do reparo tecidual devido lesão inflamatória (AYHANCI et al., 2010; BOEIRA et al., 2011; OZCAN et al., 2005; SADIR et al., 2007; SANTOS Jr et al., 2010). O infiltrado leucocitário encontrado é predominantemente composto por leucócitos polimorfonucleares, os neutrófilos, conforme resultados de outro estudo (AYHANCI et al., 2010), que afirmou haver infiltrado de leucócitos polimorfonucleares com presença eventual de linfócitos em cortes de bexigas de ratos injetados com CP.

Outros Efeitos Indesejados do Uso de Ciclofosfamida

Os efeitos indesejados agudos documentados, pelo uso de CP, vão desde náusea, vômitos, halopécia, cistite hemorrágica, mielosupressão desencadeando infecções oportunistas, a casos mais graves e raros de pneumonite, cardio e hepatotoxicidade. A hepatotoxicidade foi bem demonstrada em publicação recente no qual a dose de 200 mg/kg intraperitoneal de CP em ratos foi capaz de elevar marcadores hepáticos séricos como Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Bilirrubina total e reduzir a albumina, também ocasionou peroxidação lipídica hepática, redução de enzimas antioxidantes (glutathione, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e elevação da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e TNF- α no fígado (GERMOUSH, MAHMOUD; 2014). Inclusive, alguns trabalhos evidenciaram hepatite em pacientes que receberam baixas doses de CP imediatamente após o tratamento (CLELAND BD, POKORNY CS; 1993; MURATORI et al., 2005) e um paciente desenvolveu falência hepática grave três horas após ter recebido 200 mg de CP endovenosa (SUBRAMANIAM et al., 2013). Portanto, este antineoplásico não só afeta a bexiga urinária, mas tem potencial para afetar toda a homeostase orgânica.

Apesar de tratar neoplasias, este quimioterápico, assim como outros, possui dose cumulativa e efeito carcinogênico, aumentando a incidência por exemplo de carcinoma de bexiga e linfoma (HAUBITZ, 2007).

Tratamento da Cistite Hemorrágica

O tratamento e a profilaxia não são capazes de bloquear totalmente os efeitos lesivos e o principal fármaco usado no tratamento da cistite hemorrágica é o mesna (2-mercaptoetano sulfonato), que se liga a acroleína na bexiga ou outras partes do sistema urinário, impedindo que a acroleína alcance o uroepitélio e exerça seus efeitos tóxicos (KEHRER, BISWAL, 2000). Antes da introdução do mesna, a incidência de HC era muito alta e chegava a 68% dos pacientes submetidos ao tratamento com oxazoforinas, com uma taxa de mortalidade de 4% para os casos mais graves (BURKERT, 1983; KATZ, 1995). Devido à boa eficácia, este fármaco teve seu uso terapêutico iniciado no final da década de 70 e se tornou a droga de escolha durante o tratamento de algumas patologias neoplásicas com oxazoforinas (BROCK, 1983).

Em uma análise de pacientes submetidos a transplante de medula óssea que fizeram uso de CP, Shepherd *et al.* (1991) demonstraram que a adição de mesna à terapia de hiper-hidratação não obteve efeito protetor para o desenvolvimento de HC, sendo que ambas as terapias se equivaleram. De acordo com o mesmo autor, 33% dos pacientes apresentaram cistite mesmo após profilaxia com o mesna. Outros trabalhos também não evidenciaram benefício na adição do mesna à terapia de hiper-hidratação para prevenção de cistite (MURPHY *et al.*, 1994). LIMA *et al.* (2007), expuseram que após o tratamento com o mesna, os danos provocados pelo uso da ifosfamida na bexiga de seres humanos diminuíram consideravelmente. Entretanto o mesna não foi capaz de oferecer uroproteção total, pois este fármaco não possui ação anti-inflamatória importante, devido ao fato de não reverter completamente os eventos inflamatórios na bexiga, embora seja importante na neutralização do efeito inicial ocasionado pela acroleína. Na verdade é conhecido que esta droga é apenas efetiva como meio de prevenção, sendo incapaz de tratar lesões estabelecidas de HC (SANTOS JR *et al.*, 2010) e por vezes pode desencadear, em crianças e adultos jovens, efeitos colaterais notáveis como hipersensibilidade cutânea e reações sistêmicas (KHAW *et al.*, 2007) e possivelmente tem um efeito tóxico na mucosa vesical (TSUBOI *et al.*, 2003).

Outras formas de tratamento usadas na prática clínica diária para profilaxia de HC é hidratação adequada com ou sem diuréticos para manter a diluição e fluxo urinário adequado (HASELBERGER, SCHWINGHAMMER, 1995), impedindo assim o acúmulo deste metabólito tóxico na urina.

Vários estudos usando animais de experimentação têm mostrado que fármacos como anti-inflamatórios não esteroidais, corticóides ou inibidores da síntese de óxido nítrico podem exercer efeitos protetores no sistema urinário de animais submetidos ao modelo de cistite induzida por ciclofosfamida ou ifosfamida (ABRAHAM, RABI, 2009a, b; MACEDO *et al.*, 2008). Outras publicações apresentam associações do fármaco de escolha, mesna, e anti-inflamatórios, como corticóides. Segundo Vieira *et al.* (2003), a substituição de uma ou duas doses de mesna, do esquema terapêutico habitual, por dexametasona alcança efeitos protetores equivalentes ao uso apenas da droga de escolha em um modelo de HC induzida por ifosfamida em ratos, onde se avaliou edema e análise macroscópica e histológica. Contudo o uso terapêutico apenas da dexametasona não foi capaz de bloquear os efeitos tóxicos vesicais promovidos pela oxazoforina. Esses fármacos, embora sejam eficazes, determinam outros efeitos indesejados que podem ser importantes, como os relacionados a distúrbios no trato

gastrointestinal para os anti-inflamatórios não esteroidais. Assim, outras opções, como as baseadas na fitoterapia podem ter importância fundamental no auxílio do tratamento dessa condição.

Produtos Naturais

Neste contexto, o bioma ao qual o estado de Sergipe pertence, a caatinga, é promissor como fonte de produtos naturais oriundos de plantas utilizadas popularmente para o tratamento de diversas enfermidades. A caatinga atinge quase 1 milhão de metros quadrados no Nordeste do Brasil, sua vegetação xerófila é assolada por longos períodos de secas e altas temperaturas. Devido à baixa renda familiar, o uso de plantas medicinais e a automedicação são muito disseminados na região (DESMARCHELIER et al., 1999). Conforme é descrito por Gomes (2007), o uso de plantas medicinais pelo homem é relatado desde os primórdios da humanidade e o interesse pela fitoterapia tem aumentado nas últimas décadas devido à necessidade crescente da população de buscar na natureza formas alternativas de tratamento e da indústria farmacêutica que visa os ganhos financeiros com essas descobertas.

O estudo desta diversidade biológica da caatinga tem sido impulsionado nos últimos anos pelo Ministério da Saúde, que busca inserir no âmbito do SUS a fitoterapia e o programa de pesquisas em plantas medicinais, dada a importância do estudo e utilização da diversa flora brasileira como alternativa a tratamentos convencionais, através de uma abordagem etnodirigida, tendo como base o conhecimento construído localmente a respeito dos recursos naturais e da aplicação dos mesmos (ALBUQUERQUE, HANAZAKI, 2006; BRASIL, 2006).

Diversos grupos de pesquisa tem se consolidado na região Nordeste e focado suas atividades na utilização de plantas da caatinga para o tratamento de condições inflamatórias e/ou dolorosas. O grupo de pesquisa intitulado “Plantas da região semiárida nordestina com fins terapêuticos”, cadastrado na base de grupos de pesquisa do CNPq, tem realizado vários estudos com extratos de plantas do estado de Sergipe e adjacências no intuito de validar o uso popular das mesmas e caracterizar suas atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante. Desta maneira, resultados preliminares indicam que o extrato proveniente da *Caesalpinia pyramidalis* (catingueira; SANTOS et al., 2011; SANTANA et al., 2012) possui potencial anti-inflamatório e antinociceptivo, bem como possuem ação

antioxidante. Esses resultados sugerem que os extratos destas espécies possam ser utilizados para estudos envolvendo outras condições patológicas (a exemplo da cistite hemorrágica) ou envolvendo o isolamento de compostos que podem ser os responsáveis pelas atividades observadas com o extrato bruto.

***Caesalpinia pyramidalis* Tul.**

A *Caesalpinia pyramidalis* Tul. é uma espécie pertencente ao gênero *Caesalpinia* e a família *Fabaceae*. Comumente encontrada na caatinga, habitando terrenos pedregosos, a “catingueira”, como é conhecida, tem a entrecasca utilizada popularmente para diversas funções: anti-inflamatória, digestiva, dispéptica, antipirética, afrodisíaca, expectorante na forma de decocto ou “garrafada” (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007; BAHIA et al., 2005; MENDES et al., 2000; SILVA, MATOS, 1998). Na literatura, já existem trabalhos avaliando o potencial deste extrato. De acordo com Santos et al., (2011), o extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* demonstrou ação anti-inflamatória ao reduzir a migração de leucócitos, em modelos de peritonite e edema de pata, induzidos por carragenina. Ainda apresentou ação antinociceptiva em contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste de formalina e teste de placa quente. O poder anti-oxidante das folhas e entrecasca da catingueira foram abordadas por Silva et al., (2011), no qual foi demonstrada a presença de um alto teor de flavonoides. Também foi evidenciado a capacidade da *Caesalpinia pyramidalis* em reduzir parâmetros inflamatórios em ratos com pancreatite aguda, por obstrução do ducto biliopancreático e ação antinociceptiva na hiperalgesia abdominal desses animais (SANTANA et al., 2012). A ação antinociceptiva do extrato também foi comprovada por Santos et al. (2013), no qual a *Caesalpinia pyramidalis* reduziu contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos e a dor neuropática causada pela injeção subplantar de capsaicina e glutamato, de maneira dose dependente, demonstrando a ação deste fitoterápico no receptor vanilóide tipo 1 (TRPV1) e via glutamatérgica. Foram utilizadas doses de 10-100 mg/kg, do extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis*, sendo que a dose de 100 mg obteve melhores resultados. Este mesmo trabalho evidencia a ação da catingueira na via do NO, pois a adição de L-arginina (precursor do NO) reverteu a antinocicepção promovida pelo extrato. Por fim, em publicação mais recente, o extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* apresentou atividade gastroprotetora ao reduzir o índice de lesão e área total de úlcera gástrica em modelos, em ratos, de úlcera induzidas por etanol e indometacina, sendo o extrato efetivo

nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg. Além de ter tido atividade anti-helicobacter pylori e ter estimulado a produção de muco, um protetor gástrico.

Com base nessas premissas, o presente trabalho se propôs a estudar o potencial do extrato da *Caesalpinia pyramidalis* no tratamento da cistite induzida pela ciclofosfamida, um agente antineoplásico, em ratos, o que poderia servir como terapia coadjuvante para os efeitos urotóxicos/inflamatórios observados no tratamento de diversas formas de câncer por fármacos da classe das oxazoforinas.

Referências Bibliográficas

ABRAHAM, P.; RABI, S. Protein nitration, PARP activation and NAD⁺ depletion may play a critical role in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in the rat. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 64, n. 2, p. 279-85, 2009a.

ABRAHAM, P.; RABI, S.; KULOTHUNGAN, P. Aminoguanidine, selective nitric oxide synthase inhibitor, ameliorates cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by inhibiting protein nitration and PARS activation. **Urology**, v. 73, n. 6, p. 1402-6, 2009b.

ADAMS JR, J.D.; KLAIDMAN, L.K. Acrolein-induced oxygen radical formation. **Free Radic Biol Med**, v. 15, p. 187–93, 1993.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P.D.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 678-689, 2007.

ARAÚJO-NETO, V.; BOMFIM, R.R.; OLIVEIRA, V.O.B.; PASSOS, A.M.P.R.; OLIVEIRA, J.P.R.; LIMA, C.A.; MENDES, S.S.; ESTEVAM, C.S.; THOMAZZI, S.M. Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Roemer &Schultes) T.D. Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2010: in press.

AYHanci, A.; YAMAN, S.; SAHINTURK, V.; UYAR, R.; BAYRAMOGLU, G.; SENTURK, H.; ALTUNER, Y.; APPAK, S.; GUNES, S. Protective Effect of Seleno-L-Methionine on Cyclophosphamide-Induced UrinaryBladder Toxicity in Rats. **Biol Trace Elem Res**, v. 134, n. 1, p. 98–108, 2010.

BAHIA, M.V.; SANTOS, J.B.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 16, p. 1402-1405, 2005.

BASSI, P.F.; COSTANTINI, E.; FOLEY, S.; PALEA, S. Glycosaminoglycan therapy for bladder diseases: emerging new treatments. **Eur Urol Suppl**, v. 10, p. 451–9, 2011.

BISWAL, S.; ACQUA AHENSAH, G.; DATTA, K., WU, X.; KEHRER, J.P. Inhibition of cell proliferation and AP-1 activity by acrolein in human A549 lung adenocarcinoma cells due to thiol imbalance and covalent modifications. **Chem Res Toxicol**, v. 15, p. 180–6, 2002.

BJORLING, D.E.; ELKAHWAJI, J.E.; BUSHMAN, W.; JANDA, L.M.; BOLDON, K.; HOPKINS, W.J.; WANG, Z.Y. Acute acrolein-induced cystitis in mice. **Journal Compilation**, v. 99, n. 6, p. 1523-29, 2007.

BOEIRA, V.T.; LEITE, C.E.; SANTOS JR, A.A.; EDELWEISS, M.I.; CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; MORRONE, F.B. Effects of the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* and its isolated compounds on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mouse. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 384, n. 3, p. 265-75, 2011.

BONASSA EMA. Enfermagem em terapêutica oncológica. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

BRASIL. **Estimativas 2014: incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro: 2014.

BROCK, N.; POHL, J.; STEKAR, J. Studies on the urotoxicity of oxazaphosphorinecytostatics and its prevention. Experimental studies on the urotoxicity of alkylating compounds. **Eur J Cancer**, v. 17, n. 6, p. 595–607, 1981.

BURKERT, H. Clinical overview of mesna. **Cancer Treat Ver**, v. 10, p. 175-81, 1983.

CHUNG, C.W.; ZHANG, Q.L.; QIAO, L.Y. Endogenous nerve growth factor regulates collagen expression and bladder hypertrophy through Akt and MAPK pathways during cystitis. **J Biol Chem**, v. 285, n. 6, p. 4206–4212, 2010.

CLELAND, B.D.; POKORNY, C.S. Cyclophosphamide related hepatotoxicity. **NZ J Med**, v. 23, n. 4, p. 408, 1993.

CORROW, K.A.; VIZZARD, M.A. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in urinary bladder in rats with cyclophosphamide-induced cystitis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 1, p. 125–134, 2007.

CORROW, K.A.; VIZZARD, M.A. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in bladder afferent pathways with cyclophosphamide-induced cystitis. **Neuroscience**, v. 163, n. 4, p. 1353 –1362, 2009.

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

DECKER, D.B.; KARAM, J.A.; WILCOX, D.T.; Pediatric hemorrhagic cystitis. **J Pediatr Urol**, v. 5, n. 4, p.254–264, 2009.

DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R.L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 1, p. 69-77, 1999.

DEZERN, A.E.; PETRI, M.; DRACHMAN, D.B.; KERR, D.; HAMMOND, E.R.; KOWALSKI, J.; TSAI, H.L.; LOEB, D.M.; ANHALT, G.; WIGLEY, F.; JONES, R.J.; BRODSKY, R.A. High dose cyclophosphamide without stem cell rescue in 207 patients with aplastic anemia and other autoimmune diseases. **Medicine (Baltimore)**, v. 90, n. 2, p. 89-98, 2011.

DROLLER, M. J.; SARAL, R.; SANTOS, G. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Urology**, v. 20, n. 3, p. 256-258, 1982.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Artigo de Revisão: Óxido Nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, n. 3, p. 265-71, 2000.

GERMOUSH, M.O.; MAHMOUD, A.M. Berberine mitigates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 140, n. 7, p. 1103-9, 2014.

GOMES, T. N. A., SANTOS, C.C.; SOUZA-FILHO, M.V., CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Participation of TNF- α and IL-1 in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis. **Braz J Med Biol Res**, v. 28, n. 10, p. 1103-08, 1995.

GUERRA, M.R.; MOURA GALLO, C.V.; MENDONÇA, G.A.S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

HASELBERGER, M. B.; SCHWINGHAMMER, T. L. Efficacy of MESNA for prevention of hemorrhagic cystitis after high-dose cyclophosphamide therapy. **Annals of Pharmacotherapeutics**, v. 29, n. 9, p. 918-921, 1995.

HAUBITZ, M. Acute and Long term Toxicity of cyclophosphamide. **Transplantationsmedizin**, v. 19, p. 26-31, 2007.

HIGGS, D.; NAGY, C.; EINHOM, L.H. Ifosfamide: a clinical review. **Semin Oncol Nurs**, v. 5, n. 2 Suppl 1, p. 70-7, 1989.

HORTON, N.D.; BISWAL, S.S. CORRIGAN, L.L.; BRATTA, J.; KEHRER, J.P. Acrolein causes inhibitor kappaB-independent decreases in nuclear factor kappaB activation in human lung adenocarcinoma (A549) cells. **J Biol Chem**, v. 274, n. 14, p. 9200–6, 1999.

KATZ, A.; EPELMAN, S.; ANELLI, A.; GORENDER, E.F.; CRUZ, S.M.; OLIVEIRA, R.M.; MARQUES, L.A. A prospective randomized evaluation of three schedules of mesna administration in patients receiving an ifosfamide-containing chemotherapy regimen: sustained efficiency and simplified administration. **J Cancer Res ClinOncol**, v. 121, n. 2, p. 128-31, 1995.

KEHRER, J.P.; BISWAL, S.S. The molecular effects of acrolein. **Toxicol Sci**, v. 57, n. 1, p. 6–15, 2000.

KNIGHT, A.; ASKLING, J.; GRANATH, F.; SPAREN, P.; EKBOM, A. Urinary bladder cancer in Wegener's granulomatosis: risks and relation to cyclophosphamide. **Ann Rheum Dis**, v. 63, p. 1307-11, 2004.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. **Mutat Res**, v. 544, n. 2-3, p. 305-11, 2003.

KORKMAZ, A.; OTER, S.; SADIR, S. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. **J Urol**, v. 173, n. 5, p. 1793-1796, 2005.

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**, v. 23, n. 5, p. 303-12, 2007.

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

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

MACEDO, F. Y. B.; MOURÃO, L.T.; FREITAS, H.C.; LIMA JR, R.C.; WONG, D.V.; ORIÁ, R.B.; VALE, M.L.; BRITO, G.A.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Interleukin-4 Modulates the Inflammatory Response in Ifosfamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 297-307, 2012.

MARTINELLI, R.; PEREIRA, L.J.; SANTOS, E.S.; ROCHA, H. Clinical effects of intermittent, intravenous cyclophosphamide in severe systemic lupus erythematosus. **Nephron**, v. 74, n. 2, p. 313-7, 1996.

MCCUBREY, J.A.; LAHAIR, M.M.; FRANKLIN, R.A. Reactive oxygen species- induced activation of the map kinase signaling pathways. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 9-10, p. 1775–1789, 2006.

MENDES, C.C.; BAHIA, M.V.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. **Fitoterapia**, 71: 205-207, 2000.

MONACH, P. A. Incidence and prevention of bladder toxicity from cyclophosphamide in the rheumatic diseases. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 1, p. 9-21, 2010.

MOTA, J. M.; BRITO, G.A.; LOIOLA, R.T.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.deA. Interleukin-11 Attenuates Ifosfamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. **International Braz J Urol**, v. 33, n. 5, p. 704-10, 2007.

MUKHTYAR, C.; GUILLEVIN, L.; CID, M.C.; DASGUPTA, B.; DE GROOT, K.; GROSS, W.; HAUSER, T.; HELLMICH, B.; JAYNE, D.; KALLENBERG, C.G.; MERKEL, P.A.; RASPE, H.; SALVARANI, C.; SCOTT, D.G.; STEGEMAN, C.; WATTS, R.; WESTMAN, K.; WITTER, J.; YAZICI, H.; LUQMANI, R.; EUROPEAN VASCULITIS STUDY GROUP. EULAR recommendations for the management of primary small and medium vessel vasculitis. **Ann Rheum Dis**, v. 68, n.3, p. 310–7, 2009.

MURATORI, L.; FERRARI, R.; MURATORI, P.; GRANITO, A.; BIANCHI, F.B. Acute icteric hepatitis induced by a short course of low-dose cyclophosphamide in a patient with lupus nephritis. **Dig Dis Sci**, v. 50, n. 12, p. 2364–65, 2005.

MURPHY, C.; HARDEN, E.; STEVENS, D.; LYNCH, J.; MONTES, V.; HERZIG, R. The addition of mesna to hyperhydration does not decrease the incidence of hemorrhagic cystitis in patients receiving high-dose cyclophosphamide. **Oncol Rep**, v. 1, n. 1, p. 265–6, 1994.

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**, v. 32, n. 3, p. 185–189, 2004.

OZCAN, A.; KORKMAZ, A.; OTER, S.; COSKUN, O. Contribution of flavonoid antioxidants to the preventive effect of mesna in cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **Arch Toxicol**, v. 79, n. 8, p. 461-465, 2005.

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

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

PHILIPS, F.S.; STEMBERG, S.S.; CRONIN, A.P.; VIDAL, P.M. Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. **Cancer Res**, v. 21, p. 1577–1589, 1961.

QIAO, L.Y.; GULICK, M.A. Region specific changes in the phosphorylation of ERK1/2 and ERK5 in rat micturition pathways following cyclophosphamide-induced cystitis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 3, p. 1368–1375, 2007.

RATLIFF, T.R.; WILLIAMS, R.D. Hemorrhagic cystitis, chemotherapy, and bladder toxicity. **J urol**, v. 159, n. 3, p.1044, 1998.

RIBEIRO, R.A.; FREITAS, H.C.; CAMPOS, M.C.; SANTOS, C.C.; FIGUEIREDO, F.C.; BRITO, G.A.C.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **The Journal of Urology**, v. 167, n. 5, p. 2229-2234, 2002.

ROBINSON, D.; SCHULZ, G.; LANGLEY, R.; DONZE, K.; WINCHESTER, K.; RODGERS, C. Evidence-Based Practice Recommendations for Hydration in Children and Adolescents With Cancer Receiving Intravenous Cyclophosphamide. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, v. 31, n. 4, p. 191-199, 2014.

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

SANTANA, D.G.; SANTOS, C.A.; SANTOS, A.D.; NOGUEIRA, P.C.; THOMAZZI, S.M.; ESTEVAM, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; CAMARGO, E.A. Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 445-55, 2012.

SANTOS, C.A.; PASSOS, A.M.P.R.; ANDRADE, F.C.; CAMARGO, E.A.; ESTEVAM, C.S.; SANTOS, M.R.V.; THOMAZZI, S.M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1077-1083, 2011.

SANTOS JR, A.A.; LEAL, P.C.; EDELWEISS, M.I.; LOPES, T.G.; CALIXTO, J.B.; MORRONE, F.B.; CAMPOS, M.M. Effects of the compounds MV8608 and MV8612 obtained from *Mandevilla velutina* in the model of hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 382, n. 5-6, p. 399-407, 2010.

SHEPHERD, J.D.; PRINGLE, L.E.; BARNETT, M.J.; KLINGEMANN, H.G.; REECE DE, PHILLIPS, G.L. Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. **J Clin Oncol**, v. 9, n. 11, p. 2016–20, 1991.

SILVA, C.H.; SOBRINHO, T.J.; CASTRO, V.T.; LIMA, D.da.C.; AMORIM, E.L. Antioxidant capacity and phenolic content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. And *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4728-4739, 2011.

SILVA, L.M.M.; MATOS, V.P. 1998. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul. - *Caesalpinaceae*) e de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart. - *Rhamnaceae*). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, p. 263-269, 1998.

SONG, J.; LIU, L.; LI, L.; LIU, J.; SONG, E.; SONG, Y. Protective effects of lipoic acid and mesna on cyclophosphamide- induced haemorrhagic cystitis in mice. **Cell Biochem Funct**, v. 32, n. 2, p. 125–132, 2014.

SOUZA-FILHO, M.V.; LIMA, M.V.; POMPEU, M.M.; BALLEJO, G.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R. de A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am J Pathol**, v. 150, n. 1, p. 247-56, 1997.

STILLWELL, T.J.; BENSON, R.C. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis: a review of 100 patients. **Cancer**, v. 61, n. 3, p. 451–457, 1988.

STUEHR, D.J.; CHO, H.J.; KWON, N.S.; WEISE, M.F.; NATHAN, C.F. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. **ProcNatlAcadSci**, v. 88, n. 17, p. 7773- 7777, 1991.

SUBRAMANIAM, S.R.; CADER, R.A.; MOHD, R.; YEN, K.W.; GHAFOR, H.Á. Low-dose cyclophosphamide-induced acute hepatotoxicity. **Am J Case Rep**, v. 14, p. 345-349, 2013.

TAKAMOTO, S.; SAKURA, N.; NAMERE, A.; YASHIKI, M. Monitoring of urinary acrolein concentration in patients receiving cyclophosphamide and ifosfamide. **J Chromatogr B AnalytTechnol Biomed Life Sci**, v. 806, n. 1, p. 59–63, 2004.

TSUBOI, K.; KISHI, K.; OHMACHI, K.; YASUDA, Y.; SHIMIZU, T.; INOUE, H.; MATSUMOTO, M.; HATTORI, K.; YOSHIBA, F.; WATANABE, S.; OGAWA, Y.; KAWADA, H.; YABE, H.; YABE,

M.; KATO, S.; HOTTA, T. Multivariate analysis of risk factors for hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 32, n. 9, p. 903–7, 2003.

VIEIRA, M.M.; BRITO, G.A.C.; BELARMINO-FILHO, J.N.; MACEDO, F.Y.B.; NERY, E.A.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Use of dexamethasone with mesna for the prevention of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **International Journal of Urology**, v. 10, n. 11, p. 595–602, 2003.

WEST, N. J. Prevention and treatment of hemorrhagic cystitis. **Pharmacotherapy**, v. 17, n. 4, 696-706, 1997.

XU, X.; CUBEDDU, L.X.; MALAVE, A. Expression of inducible nitric oxide synthase in primary culture of rat bladder smooth muscle cells by plasma from cyclophosphamide-treated rats. **Eur J Pharmacol**, v. 416, n. 1-2, p. 1-9, 2001.

ZHANG, J.; TIAN, Q.; YUNG CHAN, S.; CHUEN LI, S.; ZHOU, S.; DUAN, W.; ZHU, Y.Z. Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. **Drug Metab Ver**, v. 37, n. 4, p. 611-703, 2005.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

Hindawi Publishing Corporation
The Scientific World Journal
Volume 2013, Article ID 694010, 8 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/694010>

Research Article

The Ethanol Extract of the Inner Bark of *Caesalpinia pyramidalis* (Tul.) Reduces Urinary Bladder Damage during Cyclophosphamide-Induced Cystitis in Rats

Janaína P. Moraes,¹ Denyson S. Pereira,¹ Alexandre S. Matos,¹
Danielle G. Santana,¹ Cliomar A. Santos,¹ Charles S. Estevam,¹ Ricardo Fakhouri,²
Waldecy de Lucca Junior,³ and Enilton A. Camargo¹

¹ Department of Physiology, Federal University of Sergipe (UFS), 49100-000 São Cristóvão, SE, Brazil

² Department of Medicine, Federal University of Sergipe (UFS), 49060-000 Aracaju, SE, Brazil

³ Department of Morphology, Federal University of Sergipe (UFS), 49100-000 São Cristóvão, SE, Brazil

Correspondence should be addressed to Enilton A. Camargo; enicamargo@yahoo.com.br

Received 11 August 2013; Accepted 29 September 2013

Academic Editors: F. Manzo and S. Mutalik

Copyright © 2013 Janaína P. Moraes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Hemorrhagic cystitis (HC) is a common side effect of cyclophosphamide therapy, which deserves new therapeutic strategies, such as those based on natural products. The ethanol extract of the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* (Tul.) (EECp) possesses anti-inflammatory, antinociceptive, and antioxidant activities as previously showed by our group. We have investigated the effect of EECp on the cyclophosphamide-induced HC. Cystitis was induced in male Wistar rats by the injection of cyclophosphamide. These animals were pretreated with EECp (100–400 mg/kg), vehicle, or mesna. Myeloperoxidase activity and malondialdehyde formation were measured in urinary bladder and other tissues. Bladder edema and histopathological alterations and serum nitric oxide metabolites concentration NO_3^- were also evaluated. Treatment with EECp (100–400 mg/kg) or mesna impaired the increase of myeloperoxidase activity in urinary bladder and the serum NO_3^- induced by cyclophosphamide but did not reduce edema in this tissue, as did mesna. Total histological score was reduced by EECp (100 mg/kg). Lung myeloperoxidase activity, which was increased by cyclophosphamide, was decreased significantly by EECp (400 mg/kg). EECp also diminished the malondialdehyde formation in bladder, lung, and spleen, although these parameters were not affected by cyclophosphamide. These results indicate that EECp reduced urinary bladder damage during cyclophosphamide-induced HC in rats.

1. Introduction

The treatment of many neoplastic or nonneoplastic conditions with oxazophorines, mainly cyclophosphamide and ifosfamide, leads to hemorrhagic cystitis as an important side effect [1, 2]. Cyclophosphamide is an alkylating agent used, for example, to treat breast cancer, B-cell lymphoma, leukemia, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus and in bone marrow transplantation [1, 3, 4]. This compound acts by cross-linking strands of DNA, thus preventing the division of cells, but its hepatic metabolism forms acrolein, between other metabolites, that is recognized for the ulceration, hemorrhage edema, and necrosis of the urothelium during its excretion by the urine [4, 5].

The treatment of cystitis is usually performed by the use of mesna (2-mercaptoethane sulfonate sodium), which can bind to and inactivate acrolein in the urinary bladder or other parts of urinary tract [2, 6]. Other options to treat hemorrhagic cystitis are desirable and studies in experimental animals have shown that nonsteroidal anti-inflammatory agents, corticosteroids, or nitric oxide synthase inhibitors may exert protective effects on the urinary tract in cyclophosphamide or ifosfamide-induced cystitis [7–10].

Another opportunity to develop new options to treat cystitis is the use of natural products. In this regard, many studies have shown that extracts of medicinal plants or compounds isolated from these plants can reduce cystitis induced by oxazophorines in rodents. For example, Boeira et al. [11] recently

demonstrated that the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* (L.) and the isolated compounds quercetin, rutin, and gallic acid were effective in reducing cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mice. Also, the alcoholic extract of *Ipomoea obscura* (Linn.) was shown to ameliorate cyclophosphamide-induced bladder and renal toxicities [12] and the essential oil of *Satureja khuzestanica* (Jamzad) protected rats from cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis, mainly due to antioxidant capacity [13].

Caesalpinia pyramidalis Tul. (Fabaceae) is an endemic tree of the Northeast region of Brazil that is popularly known as “catingueira.” Parts of this plant, especially the inner bark or leaves, are traditionally used because of their anti-inflammatory, diuretic, dyspeptic, digestive, antipyretic, and expectorant effects [14]. Santos et al. [15] have demonstrated that the ethanol extract of the inner bark of this plant possesses anti-inflammatory and antinociceptive activities in rodents, as well as antioxidant capacity. More recently, Santana et al. [16] have showed that this extract reduced pancreatic inflammation and oxidative stress and hyperamylasemia and abdominal hyperalgesia observed in rats with common bile duct obstruction-induced acute pancreatitis. Collectively, these studies suggest that *C. pyramidalis* has a potential for the treatment of inflammatory and painful conditions of clinical relevance, in which oxidative stress is an important feature. In this way, the present study was designed to investigate the potential of *C. pyramidalis* to reduce hemorrhagic cystitis in rats.

2. Material and Methods

2.1. Drugs and Reagents. Cyclophosphamide, mesna, hexadecyltrimethylammonium bromide, *o*-dianisidine hydrochloride, and Türk solutions were purchased from Sigma (USA). Isoflurane (Isoforine) was obtained from Cristália, Itapira, SP, Brazil. Other reagents were obtained from Merck.

2.2. Plant Material and Preparation of the Inner Bark Ethanol Extract. The inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* was collected at the Xingó Village, Canindé de São Francisco, Sergipe State, Brazil (09°66' 00" S, 37°78' 94" W). A specimen was identified by the botanist Dr. Ana Paula Nascimento Prata, Department of Biology at the Federal University of Sergipe, and deposited in the Herbarium of this institution (São Cristóvão, Sergipe, Brazil) under the registration number ASE 13,164. The inner bark was dried at 40°C with forced air for 2 days and subsequently powdered (2,840 g) and extracted by maceration at room temperature with 90% ethanol for 5 days. The extract was filtered in vacuum, and the solvent was removed using a rotary evaporator (45°C). The percentage of EECp yield was 2.6% (73.8 g). A chromatographic analysis of EECp was previously performed by our group [16].

2.3. Animals. Male Wistar rats (220–270 g, $n = 8/\text{group}$) were obtained from the Animal Center of the Federal University of Sergipe. Animals were maintained at $21 \pm 2^\circ\text{C}$ with free access to food (Purina) and filtered water under a 12:12 h light/dark cycle. The animals were deprived of food for 8 h

before the experiment, but had free access to water. All experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee for Animal Use in Research at the Federal University of Sergipe (protocol number 055/09), which was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care.

2.4. Induction of Hemorrhagic Cystitis. Hemorrhagic cystitis was induced by the injection of cyclophosphamide (200 mg/kg, 5 mL/kg, i.p.), according to previous studies [10, 17]. Control animals received saline (0.9%, 5 mL/kg, i.p.).

After 24 hours of cyclophosphamide injection, animals were anesthetized with inhalatory isoflurane (3%). Samples of blood were collected from the abdominal vein; animals were exsanguinated and submitted to transcardiac perfusion with saline 0.9% plus heparin (5 U/L). Urinary bladder tissue and samples of lung, spleen, liver, and kidney were collected for biochemical dosages.

2.5. Experimental Design. The following experimental groups were used: (i) Vehicle + Saline group: animals were orally pretreated with vehicle (tween 80, 5%, 10 mL/kg) 1 hour prior to injection of saline; (ii) Vehicle + cyclophosphamide group: animals were orally pre-treated with vehicle (tween 80, 5%, 10 mL/kg) 1 hour prior to injection of cyclophosphamide; (iii) EECp + cyclophosphamide group: animals were orally pre-treated with EECp (100, 200 or 400 mg/kg) 1 hour prior to injection of cyclophosphamide; (iv) Mesna + cyclophosphamide group: animals were treated with i.p. administration of mesna (40 mg/kg, 1 mL/kg), 5 min before and at 4 and 8 hours after injection of cyclophosphamide [7].

2.6. Determination of Urinary Bladder Edema. Edema of urinary bladder was estimated by weighting this tissue after dissection and expressing values as the result of urinary bladder weight (mg) divided by the whole body weight of animals (g) [18].

2.7. Determination of Biochemical and Inflammatory Parameters. For myeloperoxidase (MPO) activity determination, samples of urinary bladder, lung, spleen, liver, and kidney were collected, weighted, and homogenized with potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.0 containing 0.5% of hexadecyltrimethylammonium bromide), and 1 mL aliquots of the homogenates were incubated at 60°C for 2 h (for inactivation of catalase) and centrifuged (2 min, 8,000 $\times g$, 4°C). In a 96-well plate, aliquots of supernatant were incubated with a solution of *o*-dianisidine hydrochloride (0.167 mg/mL containing 0.005% H_2O_2). The MPO activity was measured kinetically in a microplate scanner (LabSystem Multiskan) at 460 nm

te p

and intervals of 15 s over a period of 5 min. Results were expressed as units of MPO per mg tissue (UMPO/mg tissue). An UMPO was considered as the amount of enzyme that degrades 1 mmol of hydrogen peroxide/min [18, 19].

For determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), samples of urinary bladder, lung, spleen,

liver, and kidney were weighted and homogenized in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) containing butylated hydroxytoluene (BHT, 12.6 mM). Then, aliquots of the homogenate (in duplicate) were incubated (90°C, 45 min) with thiobarbituric acid (TBA; 0.37%) in an acidic solution (trichloroacetic acid at 15% and hydrochloric acid at 0.25 N). At the end of incubation, the homogenates were centrifuged (5 min, 8,000 ×g), and aliquots from the supernatants were extracted with n-butanol, followed by stirring in a vortex for 30 s and further centrifugation (2 min, 8,000 ×g). The supernatant absorbance was measured at 535 nm in a microplate reader (corrected by the values of absorbance at 572 nm). The results were calculated using a molar extinction coefficient of $1.55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and expressed as pmol of malondialdehyde (MDA) formed per mg of tissue [16, 20].

Total nitrate/nitrite (NO_x^-) concentration was determined in serum submitted to ultrafiltration (10 kDa; Microcon centrifugal filter units) using the Griess reaction for nitrite, after the nitrate reductase-catalyzed reduction of nitrate to nitrite, as previously described [16].

Total leukocyte counts were performed in aliquots of 20 μL of peripheral blood taken from the tail vein of anesthetized rats, immediately before euthanasia. The total leukocyte count was performed in a Neubauer chamber. Results were expressed as number of leukocytes/mL of peripheral blood [16].

2.8. Histopathological Analysis. After euthanasia, bladders were removed, fixed in formalin, embedded in paraffin, and cut into 5 μm sections, which were stained with hematoxylin and eosin for morphological analysis ($n = 5$ animals). To evaluate the effect of EECp (100 or 400 mg/kg) on cyclophosphamide-induced cystitis, hemorrhage, edema, and leukocyte infiltration, mucosal ulceration and erosion were scored to reflect the severity of cystitis as follows: 0 = normal, 1 = mild changes, 2 = moderate changes, and 3 = severe changes. For each bladder, four sections were cut and scored.

2.9. Statistical Analysis. Results were expressed as mean $\pm$ SEM and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's *post hoc* test by using GraphPad Prism software (version 4.0). $p < 0.05$ was considered significant. For histological analysis, the results were expressed as the median (min–max) and analysis was performed first by using the nonparametric Kruskal-Wallis test to discover whether there was any difference between groups. The Mann-Whitney *U* test was then performed to analyze two groups consecutively.

3. Results

3.1. Effect of EECp on Urinary Bladder Alterations during Cyclophosphamide-Induced Cystitis. Injection of cyclophosphamide (200 mg/kg) markedly augmented the MPO activity in urinary bladder tissue, when compared with saline group ($p < 0.001$). The treatment with EECp significantly reduced this activity ($p < 0.001$ for 100 or 400 mg/kg and $p < 0.05$ for 200 mg/kg, $n = 8$; Figure 1).

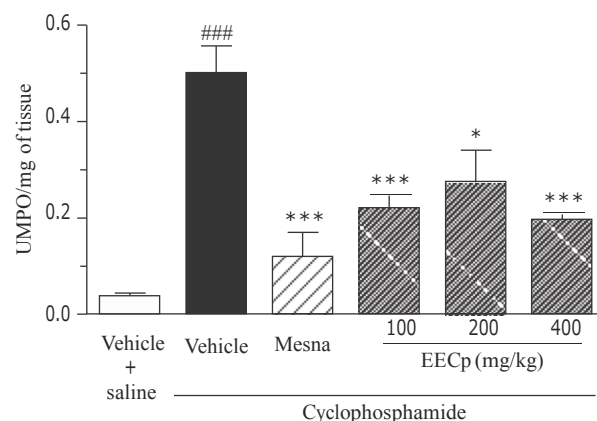


Figure 1: The ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) decreases the myeloperoxidase (MPO) activity in bladder of rats during cyclophosphamide-induced cystitis. Animals were treated with EECp (100–400 mg/kg, p.o.), vehicle, or mesna (40 mg/kg, i.p.) and injected with cyclophosphamide (200 mg/kg, i.p.). After 24 h, the MPO activity was determined in urinary bladder homogenate and was expressed as units (U) of MPO/mg of tissue. ### $p < 0.001$ versus vehicle + saline; * $p < 0.05$ or *** $p < 0.001$ versus vehicle + cyclophosphamide.

Additionally, administration of cyclophosphamide to rats significantly increased the urinary bladder weight, when compared with saline-treated rats ($p < 0.01$), which was inhibited ($p < 0.05$) by the treatment with mesna (40 mg/kg). The oral administration of EECp (100–400 mg/kg) did not change the urinary bladder weight, when compared to vehicle-treated rats (Figure 2).

Although the injection of cyclophosphamide did not cause MDA formation (62 ± 17 pmol of MDA/mg of tissue, $n = 8$) when compared with saline group (93 ± 21 pmol of MDA/mg of tissue, $n = 8$), the EECp significantly decreased the MDA content in urinary bladder tissue homogenate ($p < 0.05$ for each dose) at the doses of 100, 200, or 400 mg/kg (27 ± 13 , 48 ± 13 and 23 ± 12 pmol of MDA/mg of tissue, resp., $n = 8$) when compared with vehicle-treated animals.

3.2. Effect of EECp on MPO Activity and MDA Formation in Other Tissues, Total Peripheral Blood Leukocyte Counts and Serum NO_x^- Levels. The MPO activity in the lung tissue of rats injected with cyclophosphamide was also increased in about 120% ($p < 0.05$), when compared with saline-injected group. The pretreatment with EECp decreased significantly ($p < 0.05$) this activity at doses of 200 or 400 mg/kg, which was not observed for 100 mg/kg, when compared with cyclophosphamide group. Treatment with mesna did not alter MPO activity in lung, although there was a tendency to lower values in this group (Table I). In this tissue, there was no detectable difference in MDA formation after the cyclophosphamide injection, however, both the EECp (200 or 400 mg/kg) and mesna treatments significantly decreased the MDA formation in lung ($p < 0.05$, Table I).

In the spleen tissue there was no differences in the MPO activity or MDA formation after 24 h of the administration of

Table 1: Effect of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) on the myeloperoxidase (MPO) activity and lipid peroxidation of lung and spleen of rats during cyclophosphamide (CP)-induced cystitis.

Tissue	Group	MPO (UMPO/mg of tissue)	MDA (pmol of MDA/mg of tissue)
Lung	Vehicle + Saline	6.6 ± 1.7	35.0 ± 8.5
	Vehicle + CP	14.6 ± 1.7 [#]	40.2 ± 5.5
	Mesna + CP	11.1 ± 1.6	13.1 ± 4.8 [*]
	EECp (100 mg/kg) + CP	7.9 ± 2.5	52.8 ± 12.3
	EECp (200 mg/kg) + CP	6.4 ± 1.4 [*]	17.3 ± 4.3 [*]
	EECp (400 mg/kg) + CP	6.3 ± 1.2 [*]	12.7 ± 5.6 [*]
Spleen	Vehicle + Saline	16.3 ± 2.0	35.1 ± 7.2
	Vehicle + CP	20.7 ± 1.1	43.1 ± 10.7
	Mesna + CP	15.3 ± 1.7	18.9 ± 6.7
	EECp (100 mg/kg) + CP	17.2 ± 3.0	35.2 ± 16.1
	EECp (200 mg/kg) + CP	20.9 ± 2.7	22.8 ± 11.3
	EECp (400 mg/kg) + CP	27.1 ± 2.4	2.7 ± 2.0 [*]

Rats were treated with EECp (100–400 mg/kg), mesna (40 mg/kg), or vehicle and injected with saline or CP (200 mg/kg). After 24 h of induction, the MPO activity and malondialdehyde (MDA) formation were determined in the lung or spleen tissues. Data are expressed as mean ± SEM for $n = 8$ rats. [#] $p < 0.05$ versus respective vehicle + saline group; ^{*} $p < 0.05$ versus respective vehicle + CP group.

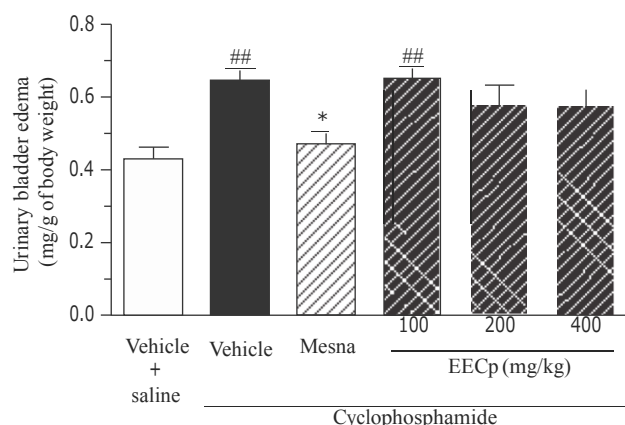


Figure 2: Urinary bladder weight of rats with cyclophosphamide-induced cystitis submitted to treatment with the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* (EECp). Animals were treated with EECp (100–400 mg/kg, p.o.), vehicle, or mesna (40 mg/kg, i.p.) and injected with cyclophosphamide (200 mg/kg, i.p.). After 24 h, the urinary bladder weight was measured and expressed as mg/g of whole body weight of animals. ^{##} $p < 0.01$ versus vehicle + saline; ^{*} $p < 0.05$ versus vehicle + cyclophosphamide.

cyclophosphamide to rats. However, it was also observed that EECp significantly reduced the MDA formation in spleen at the dose of 400 mg/kg, without affecting MPO activity in this tissue. Mesna did not modify these parameters in spleen (Table 1).

Liver and kidney tissue MPO activity and MDA formation were also measured and very low MPO activity was found in these tissues (lower than 0.05 UMPO/mg of tissue), with no difference between the groups evaluated (data not shown).

Total peripheral blood leukocyte counts were decreased significantly by the cyclophosphamide administration (6.7 ± 0.9 cells/mL), when compared with saline group (13.2 ± 1.0 cells/mL; $p < 0.001$). This reduction was not significantly

affected by the treatment with mesna (5.8 ± 1.6 cells/mL) or EECp at 100, 200, or 400 mg/kg (4.6 ± 0.9 , 4.8 ± 0.5 , and 5.3 ± 1.0 cells/mL, resp.).

Serum concentrations of NO_3^- were also augmented by the injection of cyclophosphamide ($59.8 \pm 4.9 \mu\text{M}$), when compared to saline-injected group ($10.3 \pm 2.2 \mu\text{M}$; $p < 0.001$). Treatment with EECp significantly reduced these concentrations at the doses of 100 mg/kg ($33.1 \pm 8.8 \mu\text{M}$, $p < 0.05$) or 400 mg/kg ($24.4 \pm 5.7 \mu\text{M}$, $p < 0.01$), as did the treatment with mesna ($20.8 \pm 5.2 \mu\text{M}$; $p < 0.01$). The treatment with the dose of 200 mg/kg was not tested for this parameter.

3.3. Effect of EECp on the Histopathological Alterations Induced by Cyclophosphamide. The administration of cyclophosphamide to rats caused histopathological alterations in the urinary bladder, which were characterized by moderate-severe edema of lamina propria and hemorrhage and severe mucosal ulceration and erosion, as well as leukocyte infiltration (Table 2 and Figures 3(c) and 3(d)), when compared with the saline-injected animals that presented normal pattern (Figures 3(a) and 3(b)). Presence of leukocyte in cyclophosphamide-injected and vehicle-treated animals was primarily characterized by polymorphonuclear cells in the lamina propria.

The treatment with EECp at 100 mg/kg decreased the leukocyte infiltration in the urinary bladder in a significant manner ($p < 0.05$, Table 2), but only showed a tendency to reduce the other parameters analyzed, although it diminished the total score of morphological alterations induced by cyclophosphamide (Table 2 and Figures 3(e) and 3(f)). The dose of 400 mg/kg also tended to improve the histology of urinary bladder, but it was not as effective as the lower dose of EECp used (Table 2 and Figures 3(g) and 3(h)). The dose of 200 mg/kg was not performed for this analysis. Treatment with mesna significantly reduced the effect of cyclophosphamide for all parameters evaluated (Table 2 and Figures 3(i) and 3(j)).

Table 2: Effect of ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) on the histopathological parameters during cyclophosphamide (CP)-induced cystitis in rats.

Group	Edema	Hemorrhage	Erosion and ulceration	Leukocyte	Total score
Saline + Vehicle	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
CP + Vehicle	2 (1-3) [#]	2 (1-3) [#]	3 (2-3) [#]	3 (3-3) [#]	11 (9-12) [#]
CP + Mesna	0 (0-1) [*]	0 (0-1) [*]	1 (1-2) [*]	0 (0-0) [*]	2 (2-4) [*]
CP + EECp (100 mg/kg)	1 (0-2)	1 (0-2)	2 (2-3)	1 (1-2) [*]	6 (4-8) [*]
CP + EECp (400 mg/kg)	1 (0-2)	1 (0-2)	2 (1-3)	3 (1-3)	9 (3-11)

Data are shown as median (min-max) for $n = 5$ animals. [#] $p < 0.05$ versus respective saline + vehicle group and ^{*} $p < 0.05$ versus respective CP + vehicle group.

4. Discussion

Treatment with cyclophosphamide, an alkylating agent, is largely known to cause urotoxic effects [1, 2]. In this study, cyclophosphamide injection to rats caused edema, increase of MPO activity, and histopathological alterations in the urinary bladder tissue, as expected [21], which were partially reduced by treatment with EECp, with the exception of bladder edema.

The pharmacological activity of *Caesalpinia pyramidalis* was described recently by a previous study [15], which demonstrated that treatment with EECp, at the same doses used in the present study, decreased inflammation in carrageenan-induced rat paw edema or mice peritonitis and inhibited the nociception induced by various stimuli and possessed in vitro antioxidant properties. As these properties would have value to treat hemorrhagic cystitis, we tested here the effects of this extract. In this way, although the pretreatment with EECp did not alter the urinary bladder edema, it reduced the neutrophil accumulation in this tissue, as measured by the MPO activity. This finding was confirmed for the dose of 100 mg/kg of EECp, through the histological analysis. Besides the inhibition of leukocyte infiltration, this dose of EECp tended to reduce the edema of the lamina propria, hemorrhagia, and the mucosal erosion and ulceration of urinary bladder. Interestingly, the higher dose utilized of EECp did not show a significant improvement of urinary bladder tissue histology, although a tendency for lower scores was observed. Taken together, these results suggest that even lower doses of EECp could be used in rats.

Interestingly, we did not detect lipid peroxidation in the urinary bladders, 24 h after the injection of cyclophosphamide, which contrasts with the findings by others [22–24], but it does not exclude the possibility that peroxidation may have occurred at previous experimental time points, which were not evaluated. In spite of this finding, we observed a reduced MDA formation in the bladders from animals treated with EECp, which enable us to speculate that the inhibitory effect of neutrophil infiltration is related to the diminishment of MDA formation by EECp. As a matter of interest, a similar link between reduced MDA formation and MPO activity was described by Santana et al. [16] in the model of acute pancreatitis induced by the common bile duct obstruction in rats. These results further agree with the previous data from Santos et al. [15], showing in vitro antioxidant activity and anti-inflammatory effect of EECp. All together, these data indicate

that EECp induced anti-inflammatory effect in urinary bladder during the cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis model in rats.

An additional important finding of this study is that the EECp treatment is able to reduce the serum concentrations of metabolites of NO in rats with cystitis. Overproduction of NO is a characteristic of the inflammatory process and it was showed that inhibition of inducible nitric oxide synthase isoform by aminoguanidine has beneficial effects in the cyclophosphamide-induced cystitis in rodents [10]. The fact that EECp reduced the serum concentrations of NO metabolites is in accordance with the protective effects of this extract in the urinary bladder, especially regarding to the decrease of the MDA levels in this tissue. Also, it is plausible that reduced NO metabolite formation, induced by EECp, in other organs may contribute to this effect.

In this study, the effect of EECp was also evaluated in some tissues of rats injected with cyclophosphamide, like lung, spleen, liver, and kidney, or in the leukocyte count in peripheral blood. It is interesting to note that cyclophosphamide treatment increased the MPO activity in lung. This result is in accordance with previous studies that showed the potential of cyclophosphamide to cause lung toxicity [25, 26]. However, no lipid peroxidation was detected in lung tissue in our study, which contrasts with other authors' findings [27]. The EECp pretreatment decreased MPO activity in lungs, reinforcing its anti-inflammatory activity, and decreased basal values of MDA formation in this tissue. Accordingly, a study from our group showed that the lung neutrophil infiltration and lipid peroxidation secondary to acute pancreatitis induced by bile duct ligation in rats was also reduced by treatment with EECp [16]. Spleen, liver and kidney MPO activities were not affected by cyclophosphamide or EECp, but EECp decreased the MDA formation in rat spleen, without affecting liver, and kidney lipid peroxidation. This may be linked with the antioxidant activity presented by EECp [15, 16], but it can be argued that the actual importance of this finding is related to the fact that administration of EECp, in the dose range used, does not lead to the injury of these tissues, especially liver and kidney. By comparison, previous data from our group showed that the treatment with the ethanol extract of *Sideroxylon obtusifolium*, in the same way that was used in the present study, increased lipid peroxidation in spleen and urinary bladder of rats [18].

Cyclophosphamide is also well known by its damaging effects in the hematopoietic stem cells and precursor cells and

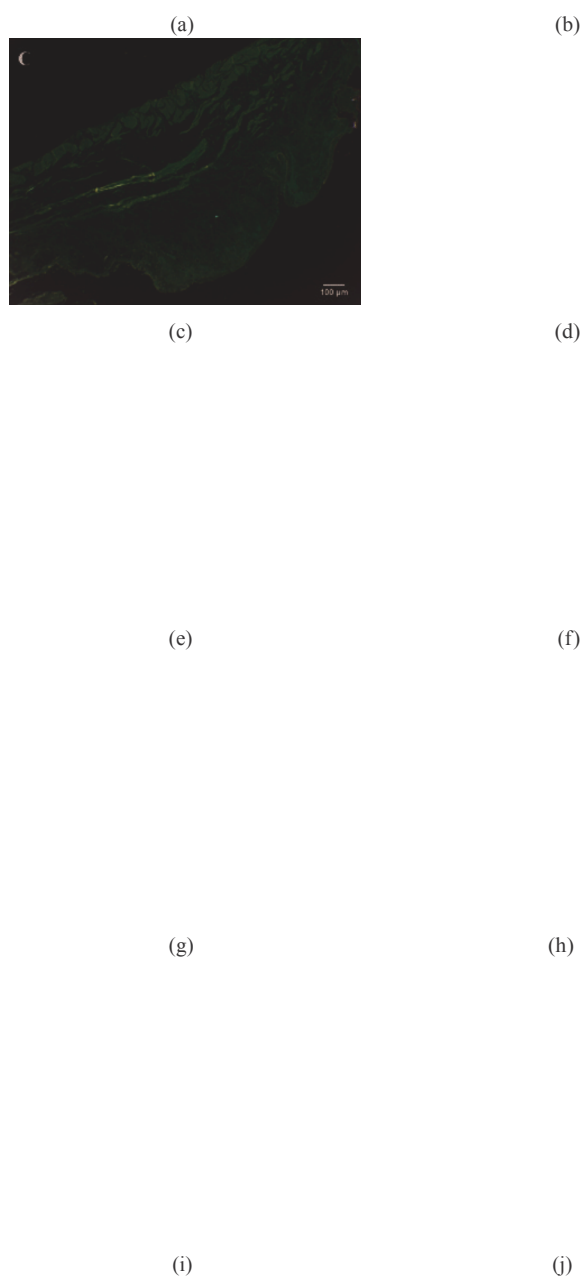


Figure 3: Light microscopy of the bladders of rats with cystitis. Original magnification of 10-fold (Panels (a), (c), (e), (g), and (i)) or 40- (Panels (b), (d), (f), (h), and (j)); hematoxylin and eosin staining. Panels (a) and (b) show control saline + vehicle rats with normal tissue histology. Panels (c) and (d) demonstrate that injection of cyclophosphamide induced mucosal erosion and ulceration, severe edema in the submucosal region (*), hemorrhagic foci (red arrows), and leukocyte infiltration (black arrows). Panels (e) and (f) indicate that EECp, at 100 mg/kg, reduced the cyclophosphamide-induced morphological alterations, affecting mainly the leukocyte infiltration and mucosal erosion/ulceration, which was not so clearly observed in the urinary bladders of EECp (400 mg/kg)-pretreated rats (Panels (g) and (h)) that still presented mucosal erosion, ulceration, edema in the submucosal region, and hemorrhagic foci. A slight leukocyte infiltration reduction was observed in these animals ((g) and (h)) when compared with animals pretreated with vehicle and injected with cyclophosphamide ((c) and (d)). Panels (i) and (j) show that mesna pretreatment almost completely reverted the damage induced by cyclophosphamide.

to the hematopoietic microenvironment, leading to myelosuppression [28, 29]. In our study, we detected a decrease in the total leukocyte number in peripheral blood that was not changed by EECp, indicating that this extract does not have any effect on the negative hematopoietic effects of cyclophosphamide.

The components of EECp are still poorly characterized, but the study by Santana et al. [16] has strongly suggested that rutin, a well-known flavonoid, is present in this extract. As a matter of interest, rutin, present in the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae), was shown to diminish the urinary bladder inflammation during cystitis induced by cyclophosphamide in mice [11]. Whether rutin is presented in EECp in a concentration high enough to reach biological significance for the effects of this extract is still not established, and the possibility that other compounds would contribute to these protective actions cannot be discharged.

In summary, we provided here evidence that demonstrate that EECp decreases cyclophosphamide-induced pathological alterations of urinary bladder, as neutrophil infiltration. This extract also does not have any deleterious effects, detected in terms of MPO activity and MDA formation, in lung, spleen, kidney, and liver. This indicates that EECp has a potential to treat cystitis induced by oxazaphosphorines.

Acknowledgments

The authors thank the Fundação de Apoio a Pesquisa e Inovação Tecnológica (FAPITEC/SE; no. 019.203.02344/2009-7) and the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq; no. 562478/2010-8) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support.

References

- [1] T. R. Ratliff and R. D. Williams, "Hemorrhagic cystitis, chemotherapy, and bladder toxicity," *The Journal of Urology*, vol. 159, no. 3, p. 1044, 1998.
- [2] A. Korkmaz, T. Topal, and S. Oter, "Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation," *Cell Biology and Toxicology*, vol. 23, no. 5, pp. 303–312, 2007.
- [3] P. Perini, M. Calabrese, L. Rinaldi, and P. Gallo, "Cyclophosphamide-based combination therapies for autoimmunity," *Neurological Sciences*, vol. 29, no. 2, pp. S233–S234, 2008.
- [4] S. Mukhtar and C. Woodhouse, "The management of cyclophosphamide-induced haematuria," *BJU International*, vol. 105, no. 7, pp. 908–912, 2010.
- [5] J. Zhang, Q. Tian, Y. C. Sui et al., "Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 37, no. 4, pp. 611–703, 2005.
- [6] J. P. Kehrer and S. S. Biswal, "The molecular effects of acrolein," *Toxicological Sciences*, vol. 57, no. 1, pp. 6–15, 2000.
- [7] M. M. Morais, J. N. Belarmino-Filho, G. A. C. Brito, and R. A. Ribeiro, "Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis—comparison of the effects of dexamethasone and Mesna," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 32, no. 10, pp. 1211–1215, 1999.
- [8] F. Y. B. Macedo, F. Baltazar, P. R. C. Almeida et al., "Cyclooxygenase-2 expression on ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 134, no. 1, pp. 19–27, 2008.
- [9] P. Abraham and S. Rabi, "Protein nitration, PARP activation and NAD⁺ depletion may play a critical role in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in the rat," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 64, no. 2, pp. 279–285, 2009.
- [10] P. Abraham, S. Rabi, and P. Kulothungan, "Aminoguanidine, selective nitric oxide synthase inhibitor, ameliorates cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by inhibiting protein nitration and PARS activation," *Urology*, vol. 73, no. 6, pp. 1402–1406, 2009.
- [11] V. T. Boeira, C. E. Leite, A. A. Santos Jr. et al., "Effects of the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* and its isolated compounds on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mouse," *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, vol. 384, no. 3, pp. 265–275, 2011.
- [12] T. P. Hamsa and G. Kuttan, "Protective role of *Ipomoea obscura* (L.) on cyclophosphamide-induced uro- and nephrotoxicities by modulating antioxidant status and pro-inflammatory cytokine levels," *Inflammopharmacology*, vol. 19, no. 3, pp. 155–167, 2011.
- [13] M. A. Rezvanfar, A. A. Farshid, R. A. Sadrkhanlou et al., "Benefit of *Satureja khuzestanica* in subchronically rat model of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis," *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 62, no. 3, pp. 323–330, 2010.
- [14] M. De Fátima Agra, P. F. De Freitas, and J. M. Barbosa-Filho, "Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 17, no. 1, pp. 114–140, 2007.
- [15] C. A. Santos, A. M. P. R. Passos, F. C. Andrade et al., "Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in Rodents," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 21, no. 6, pp. 1077–1083, 2011.
- [16] D. G. Santana, C. A. Santos, A. D. Santos et al., "Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 142, pp. 445–455, 2012.
- [17] H. Kiuchi, T. Takao, K. Yamamoto et al., "Sesquiterpene lactone parthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model by inhibiting nuclear factor-kappaB phosphorylation," *Journal of Urology*, vol. 181, no. 5, pp. 2339–2348, 2009.
- [18] D. S. Pereira, J. P. Morais, D. G. Santana et al., "Effects of the ethanol extract of the inner bark of *Syderoxylum obtusifolium* in the cyclophosphamide-induced cystitis in rats," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 7, pp. 1411–1417, 2013.
- [19] P. P. Bradley, D. A. Priebe, R. D. Christensen, and G. Rothstein, "Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 78, no. 3, pp. 206–209, 1982.
- [20] R. Bose, G. R. Sutherland, and C. Pinsky, "Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements," *Neurochemical Research*, vol. 14, no. 3, pp. 217–220, 1989.
- [21] O. Kanat, E. Kurt, U. Yalcinkaya, T. Evrensel, and O. Manavoglu, "Comparison of uroprotective efficacy of mesna and amifostine

- in cyclophosphamide- induced hemorrhagic cystitis in rats,” *Indian Journal of Cancer*, vol. 43, no. 1, pp. 12–15, 2006.
- [22] K. Bhatia, F. Ahmad, H. Rashid, and S. Raisuddin, “Protective effect of S-allylcysteine against cyclophosphamide-induced bladder hemorrhagic cystitis in mice,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 11, pp. 3368–3374, 2008.
- [23] A. A. Al-Yahya, A. A. Al-Majed, A. M. Gado et al., “Acacia senegal gum exudate offers protection against cyclophosphamide-induced urinary bladder cytotoxicity,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2, no. 4, pp. 207–213, 2009.
- [24] P. Abraham, B. Isaac, H. Ramamoorthy, and K. Natarajan, “Oral glutamine attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress in the bladder but does not prevent hemorrhagic cystitis in rats,” *Journal of Medical Toxicology*, vol. 7, no. 2, pp. 118–124, 2011.
- [25] J. M. Patel, “Metabolism and pulmonary toxicity of cyclophosphamide,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 47, no. 1, pp. 137–146, 1990.
- [26] A. H. Limper, “Chemotherapy-induced lung disease,” *Clinics in Chest Medicine*, vol. 25, no. 1, pp. 53–64, 2004.
- [27] M. Sulkowska, S. Sulkowski, E. Skrzydlewska, and R. Farbiszewski, “Cyclophosphamide-induced generation of reactive oxygen species. Comparison with morphological changes in type ii alveolar epithelial cells and lung capillaries,” *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 50, no. 3, pp. 209–220, 1998.
- [28] W. D. DeWys, A. Goldin, and N. Mantel, “Hematopoietic recovery after large doses of cyclophosphamide: correlation of proliferative state with sensitivity,” *Cancer Research*, vol. 30, no. 6, pp. 1692–1697, 1970.
- [29] K. Kusano, S. Ebara, K. Tachibana et al., “A potential therapeutic role for small nonpeptidyl compounds that mimic human granulocyte colony-stimulating factor,” *Blood*, vol. 103, no. 3, pp. 836–842, 2004.

