

EFEITO PROTETIVO DO EXTRATO DE *ECHINODORUS GRANDIFLORUS* SOBRE O UROTELIO VESICAL DE RATOS COM CISTITE INDUZIDA POR CICLOFOSFAMIDA

Flávio Augusto Paulatti Frederico¹
Fernando Eduardo Paulatti Frederico²
Edson Martin Vieira³
Edson Geronimo⁴
Paula Montanhini Favetta⁵
Emerson Luiz Botelho⁶
Luciana Kazue Otutumi⁷
Andréia Assunção Soares⁸
Diego Lacir Froelich⁹
Ricardo de Melo Germano¹⁰

FREDERICO, F. A. P.; FREDERICO, F. E. P.; VIEIRA, E. M.; GERONIMO, E.; FAVETTA, P. M.; BOTELHO, E. L.; OTUTUMI, L. K.; SOARES, A. A.; FROELICH, D. L.; GERMANO, R. de M. Efeito protetivo do extrato de *Echinodorus grandiflorus* sobre o urotelio vesical de ratos com cistite induzida por ciclofosfamida. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. Umuarama. v. 26, n. 3, p. 1412-1426, set./dez. 2022.

RESUMO: A cistite hemorrágica e a cistite intersticial expressam uma etiologia variável, desde idiopática à provocada por fármacos, dentre eles a ciclofosfamida. A cistite apresenta tratamento multifatorial, e o potencial efeito satisfatório do uso da medicina complementar, vem ganhando espaço na prática médica. Assim o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito protetivo do extrato bruto de *Echinodorus grandiflorus* sobre a bexiga de ratos induzidos a cistite por ciclofosfamida. Utilizou-se neste estudo, 35 ratos, machos, *Wistar*, com peso médio de 321g, que foram submetidos a indução de cistite com uso de ciclofosfamida por via intraperitoneal e tratados com diferentes doses de extrato de *Echinodorus grandiflorus* (30, 100, 300mg) e o grupo controle com o fármaco Mesna. Todos os animais foram mortos no décimo sétimo dia e suas bexigas urinárias foram ressecadas para avaliação macro e microscópica, além da análise de hemograma e leucograma. A análise do sangue mostrou leucopenia com diferença significativa em todos os animais que receberam a ciclofosfamida. Observou-se que a dose de 300mg/kg do extrato bruto da planta, apresentou efeito protetivo no urotélio vesical, porém, inferior ao uso de Mesna. Diante dos resultados apresentados neste estudo sugere-se que o extrato de *Echinodorus grandiflorus* apresenta efeito protetivo no urotélio vesical na dose de 300mg/kg, porém estudos futuros quanto a dose e também a uma possível associação terapêutica ao Mesna devam ser realizados. Por se tratar de uma patologia com prevalência importante

DOI: [10.25110/arqsaude.v26i3.20228969](https://doi.org/10.25110/arqsaude.v26i3.20228969)

¹ Mestre em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. Universidade Paranaense (Unipar).

E-mail: flaviofrederico@prof.unipar.br

² Mestre em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. Universidade Paranaense (Unipar).

E-mail: fernandofrederico@prof.unipar.br

³ Graduada em Nutrição. Universidade Paranaense (Unipar). E-mail: edsonmartinv@gmail.com

⁴ Doutor em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. Universidade Paranaense (Unipar).

E-mail: e.geronimo@edu.unipar.br

⁵ Mestre em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. Universidade Paranaense (Unipar).

E-mail: nutripaulafavetta@gmail.com

⁶ Doutor em Farmacologia. Universidade Paranaense (Unipar). E-mail: emerson@prof.unipar.br

⁷ Doutora em Zootecnia. Universidade Paranaense (Unipar). E-mail: otutumi@prof.unipar.br

⁸ Doutora em Ciências Biológicas. Universidade Paranaense (Unipar). E-mail: andrea.assuncao@unipar.br

⁹ Mestre em Ciência Animal. Universidade Paranaense (Unipar). E-mail: diego.patovet@hotmail.com

¹⁰ Doutor em Biologia das Interações Orgânicas (Biologia Comparada). Universidade Paranaense (Unipar).

E-mail: germano@prof.unipar.br

e ser muitas vezes desagradável e limitante à vida, faz-se necessário o empenho em métodos terapêuticos alternativos aos atuais, afim de, diminuir os custos e efeitos colaterais dos métodos já documentados.

PALAVRAS-CHAVE: Bexiga urinária; Chapéu de couro; Quimioterápicos; Mesna.

EXTRACT OF *ECHINODORUS GRANDIFLORUS* PRESENTS RENOPROTETIC EFFECT ON RATS WITH ACUTE NEPHROTOXICITY INDUCED BY CYCLOPHOSPHAMID

ABSTRACT: Hemorrhagic cystitis and interstitial cystitis have a variable etiology, from idiopathic to drug-induced, including cyclophosphamide. Cystitis has a multifactorial treatment, and the potential satisfactory effect of the use of complementary medicine has been gaining ground in medical practice. Thus, the aim of the present study was to evaluate the protective effect of the crude extract of *Echinodorus grandiflorus* on the bladder of rats induced to cystitis by cyclophosphamide. In this study, 35 male Wistar rats, with an average weight of 321g, were submitted to cystitis induction with intraperitoneal use of cyclophosphamide and treated with different doses of *Echinodorus grandiflorus* extract (30, 100, 300mg) and the control group with the drug Mesna. All animals were killed on the seventeenth day and their urinary bladders were resected for macro and microscopic evaluation, in addition to the analysis of blood count and leukogram. Blood analysis showed leukopenia with a significant difference in all animals that received cyclophosphamide. It was observed that the dose of 300mg/kg of the crude extract of the plant had a protective effect on the vesical urothelium, however, it was inferior to the use of Mesna. In view of the results presented in this study, it is suggested that the *Echinodorus grandiflorus* extract has a protective effect on the vesical urothelium at a dose of 300mg/kg, but future studies regarding the dose and also a possible therapeutic association with Mesna should be carried out. Because it is a pathology with significant prevalence and is often unpleasant and life-limiting, it is necessary to commit to alternative therapeutic methods to the current ones, in order to reduce the costs and side effects of the methods already documented.

KEYWORDS: Chemotherapeutics; Leather hat; Mesna; Urinary bladder.

EXTRACTO DE *ECHINODORUS GRANDIFLORUS* PRESENTA EFECTO RENOPROTÉTICO EN RATAS CON NEFROTOXICIDAD AGUDA INDUCIDA POR CICLOFOSFAMIDA

RESUMEN: La cistitis hemorrágica y la cistitis intersticial tienen una etiología variable, desde idiopática hasta inducida por fármacos, incluida la ciclofosfamida. La cistitis tiene un tratamiento multifactorial, y el potencial efecto satisfactorio del uso de la medicina complementaria ha ido ganando terreno en la práctica médica. Así, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto protector del extracto crudo de *Echinodorus grandiflorus* sobre la vejiga de ratas inducidas a cistitis por ciclofosfamida. En este estudio, 35 ratas Wistar macho, con un peso promedio de 321g, fueron sometidas a inducción de cistitis con uso intraperitoneal de ciclofosfamida y tratadas con diferentes dosis de extracto de *Echinodorus grandiflorus* (30, 100, 300mg) y el grupo control con el fármaco Mesna. Todos los animales fueron sacrificados al decimoséptimo día y sus vejigas urinarias fueron resecaadas para evaluación macro y microscópica, además del análisis de hemograma y leucograma. El análisis de sangre mostró leucopenia con una diferencia significativa en todos los animales que recibieron ciclofosfamida. Se observó que la dosis de 300 mg/kg del extracto crudo de la planta tuvo un efecto protector sobre el urotelio vesical, sin embargo, fue inferior al uso de Mesna. En vista de los resultados presentados en este estudio, se sugiere que el extracto de *Echinodorus grandiflorus* tiene un efecto protector sobre el urotelio vesical a una dosis de 300 mg/kg, pero se deben realizar estudios futuros sobre la dosis y también una posible asociación terapéutica con Mesna. llevado a cabo. Por tratarse de una patología con una prevalencia importante y muchas veces desagradable y

limitante de la vida, es necesario apostar por métodos terapéuticos alternativos a los actuales, con el fin de reducir los costes y efectos secundarios de los métodos ya documentados.

PALABRAS CLAVE: Quimioterapéuticos; Sombrero de cuero Mesna; Vejiga urinaria.

1. INTRODUÇÃO

A ciclofosfamida, é pertencente a classe das oxazaforinas, citostático, e é usado desde a década de 1950 (NASCIMENTO, 2013). Tem ação efetiva no tratamento de doenças neoplásicas, como tumores sólidos, linfomas e não neoplásicas, como lupus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide (NASCIMENTO, 2013). A ciclofosfamida e seus metabólitos causam inflamação na bexiga e podem causar lesões renais (SINANOGLU *et al.*, 2012).

A cistite hemorrágica ou cistite intersticial, é uma complicação bem conhecida da ciclofosfamida (SANCHO *et al.*, 2017). Dentre os sintomas relacionados a doença vesical estão: aumento da frequência miccional, dor em baixo ventre e hesitação (RIBEIRO *et al.*, 2012; ALGE *et al.*, 2013; OKINAMI *et al.*, 2014; SANCHO *et al.*, 2014).

Por se tratar de uma doença de fatores etiológicos desconhecidos, o tratamento da cistite intersticial tem base no empirismo. O tratamento varia desde o uso medicamentoso a cirurgia em casos extremos, sendo a terapia clínica mais utilizada o uso de antidepressivos tricíclicos (COELHO, 2003).

A cistite causada pelo uso da ciclofosfamida é uma doença extremamente sintomática, podendo se manifestar na forma de cistite intersticial, síndrome da bexiga dolorosa ou na forma de cistite hemorrágica, estado mais grave. Na tentativa de se evitar os efeitos tóxicos causados pela acroleína, metabólito ativo da ciclofosfamida, é usado um agente antitóxico denominado Mesna (PHYSICANS DESK REFERENCE citado por SOUZA *et al.*, 2000).

A fitoterapia é caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas (NASCIMENTO, 2013), sendo os fitoterápicos são aqueles medicamentos cuja matéria prima é exclusivamente originária de vegetais (BRASIL, 2010).

O *Echinodurus grandiflorus* e *Echinodorus macrophyllus* são tradicionalmente usados na medicina complementar e a referência “chapéu de couro” é devido a semelhança textural e morfológica da planta (CORREIA JUNIOR; MING; SCHEFFE, 1994; SILVA JUNIOR, 1994). A espécie *E. grandiflorus* é comumente encontrada em ambientes aquáticos e alagados (MARQUES *et al.*, 2017).

A espécie *E. grandiflorus* é caracterizada com uma planta herbácea aquática pereneal que cresce a uma altura que varia de 0,4 a 0,7 m. As folhas são glabras e normalmente imersas em água, ou submersas sazonalmente, com folhas de lâminas ovadas de 8 a 40 cm x 5-30 cm cada. Os rizomas podem estar presentes e as raízes não são separadas (RATAJ, 1978; REGO, 1988; HAYNES; NIELSEN, 1995; MATIAS, 2007; BRASIL, 2010).

Há múltiplos usos da *E. grandiflorus* na medicina complementar, sendo usada para uma gama de doenças nas várias regiões do Brasil (MARQUES et al., 2017). Suas principais ações são: depurativa (CORREA, 1984; SILVA JUNIOR, 1994), anti-inflamória (DUTRA et al., 2006; GARCIA et al., 2010), anti-hipertensiva (PRANDO et al., 2016; TIBIRIÇÁ et al., 2007), anti-artrite (GARCIA, 2016a), diurético (PRANDO et al., 2016) e também atua na cascata da inflamação (MARQUES et al., 2017).

O extrato metanólico feito do rizoma tem potencial uso no manejo da dor e da inflamação (DUTRA et al., 2006), distúrbios renais (cálculos) e inflamação da bexiga (LORENZI; MATOS, 2002).

A literatura mostra um séria de casos em que o “chapéu de couro” tenha propriedades anti-inflamatórias contra a dor (DUTRA et al., 2006) e processos inflamatórios (GARCIA et al., 2010; GARCIA, 2014; GARCIA et al., 2016,a,b). Haje na cascata da inflamação (MARQUES et al., 2017). Demonstrou-se que essa flavona atua inibindo a ruptura da barreira induzida por lipopolissacarídeos, reduzindo a expressão de células de adesão e suprime a migração de leucócitos, bem como a hiperpermeabilidade celular, inibindo vários fatores de inflamação, tais como TNF-@, e dessa forma diminuindo o processo de inflamação (LEE et al., 2014).

A atividade antioxidante associada aos metabólitos que ocorrem naturalmente está relacionada à sua capacidade de neutralizar o radical livre de muitos compostos diferentes e normalmente estão ligados a flavonóides glicosilados e a outros derivados fenólicos (MARQUES et al., 2017).

Há um número limitado de estudos na literatura relacionados aos efeitos anti-inflamatório dos preparados medicinais da especie *E. grandiflorus* (MARQUES et al., 2017).

Devido à alta incidência de cistite induzida por ciclofosfamida em humanos (2 a 40%) (MANIKANDAN et al., 2012), torna-se necessária a investigação de terapêuticas passíveis de reverter estes efeitos colaterais. Sabe-se que, o extrato da planta *E. grandiflorus* apresenta dentre suas propriedades, importante efeito anti-inflamatório, com potencial ação também no urotélio, sendo uma fonte de estudo para terapia clínica, desta importante enfermidade em seres humanos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial efeito protetivo do extrato de *Echinodorus grandiflorus* em ratos induzidos a cistite pelo quimioterápico ciclofosfamida.

2. METODOLOGIA

2.1 Material vegetal

O do extrato de *E. grandiflorus* (Chapéu de Couro) foi obtido a partir da coleta de suas folhas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense (UNIPAR), *Campus 2* – Umuarama, Paraná-Brasil (S23°47'55-W53°18'48) no período de fevereiro de 2015 pela manhã.

2.2 Preparação do extrato hidroetanólico de *Echinodorus grandiflorus*

O material vegetal foi seco em estufa com circulação forçada de ar a 37°C por cinco dias. Após a secagem, o material foi submetido a trituração. A pulverização foi realizada em trituradores industriais, e em seguida, o material foi acondicionado em sacos duplos, de polietileno na parte interna e de papel Kraft na parte externa, até o preparo dos extratos brutos.

O extrato aquoso foi obtido por infusão, segundo o que é preconizado pelo uso popular (LORENZI; MATOS, 2002), com pequenas modificações. O material vegetal seco e moído (100g) foi submetida ao processo de extração por infusão com 1L de água em pré-ebulição. A extração foi realizada até que o meio de extração atingisse a temperatura ambiente por aproximadamente cinco horas.

O resíduo foi separado por filtração e o extrato obtido foi concentrado em evaporador rotatório até um volume de 200mL. O produto final obtido foi tratado com 600mL de etanol para precipitação das proteínas e polissacarídeos, obtendo-se um precipitado (PEI) e um sobrenadante etanólico do infuso (SEI). O SEI obtido foi liofilizado e armazenado em freezer (- 20°C) até sua utilização.

2.3 Fase experimental

Todos os procedimentos adotados na pesquisa tiveram aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA) da Universidade Paranaense – UNIPAR, com o número de protocolo 34635/2018.

Foram utilizados 35 ratos machos, linhagem *Wistar*, adultos, com 90 dias de idade, e massa corporal média de 321g, oriundos do Biotério da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais foram mantidos com livres acesso a água e alimentos e permaneceram em condições térmicas (22°C±2), com ciclos alternados de 12 horas de claro e escuro no Biotério de Manutenção Animal do Laboratório de Pesquisa Pré-clínica de Produtos Naturais e Bioativos da Universidade Paranaense.

Os animais permaneceram nesta condição por um período de 20 dias para adaptação, e após esse período, foram divididos em grupos para realização do experimento. Para tanto os animais foram pesados, e a partir da média ±10% do peso corporal, foram distribuídos nos diferentes grupos de tratamento e controle.

Grupo 1 (G1 – controle negativo): n = 5, os animais receberam água filtrada por gavagem, 1x ao dia durante 15 dias, e no 15º dia foi administrado solução de NaCl 0,9 % intraperitoneal na dose de 1,5ml/kg em dose única.

Grupo 2 (G2 - Cy): n = 6, os animais receberam solução de NaCl 0,9 % por gavagem na dose de 1,5 mL/kg por 15 dias;

Grupo 3 (G3 - Cy + EGRA 1): n = 6, os animais receberam o extrato da planta por gavagem na dose de 30mg/kg uma vez ao dia durante 15 dias;

Grupo 4 (G4 - Cy + EGRA 2): n = 6, os animais receberam o extrato da planta por gavagem na dose de 100mg/kg uma vez ao dia por 15 dias;

Grupo 5 (G5 - Cy + EGRA 3): n =6, os animais receberam o extrato da planta por gavagem na dose de 300mg/kg uma vez ao dia por 15 dias;

No 15º todos os animais dos grupos G2 a G5 receberam ciclofosfamida por via intraperitoneal na dose 150mg/kg, dose única.

Grupo 6 (G6 - controle positivo): n =6, os animais receberam solução de NaCl 0,9% por gavagem na dose de 1,5mL/kg por 15 dias, no 15º dia receberam ciclofosfamida por via intraperitoneal na dose de 150 mg/kg, dose única associado ao 2-mercaptoetanosulfonato sódico (MESNA), por via intraperitoneal na dose de 29,93mg/kg de peso corporal, em dose única. O cálculo da dose do MESNA foi realizado por extrapolação alométrica (PACHALY, 2006), baseada na dose diária de humanos que é de 600mg/kg/dia.

A gavagem foi realizada por meio da plicatura da pele na região dorso-cervical para contenção dos animais, e facilitação para introdução da cânula de administração do extrato, minimizando a falsa via que pode ocorrer durante o procedimento.

Durante as 48 horas após a administração da ciclofosfamida (G2 a G6) os animais foram monitorados para que se pudesse avaliar os seguintes parâmetros: grau de fechamento dos olhos, frequência respiratória e mobilidade (Adaptado de DORNELLES, 2013). Estes parâmetros serviram de subsídio para análise nociceptiva dos animais.

Ao final do período experimental os ratos foram anestesiados em câmara saturada com isoflurano 3%, com acompanhamento dos sinais vitais, os animais ficaram sob anestesia, sendo realizada um incisão ventral na linha alba, para exposição da veia cava caudal para coleta do sangue. O procedimento foi necessário para que se pudesse colher volumes superiores a 3mL de sangue para realização de hemograma e exames bioquímicos dos animais, que foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paranense (ROSSI-JESUS et al., 2015). Após a colheita do sangue os animais foram então mortos por hipersaturação ao anestésico.

Uma alíquota de sangue foi destinada para determinação da peroxidação lipídica. Os níveis de peroxidação lipídica no plasma dos ratos, foram determinados pelo método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) conforme descrito por Bhattacharya et al. (2003), com algumas modificações). Esta técnica quantifica moléculas de baixa massa molecular, predominantemente o dialdeído malônico (MDA), que reagem com o ácido tiobarbitúrico em meio

ácido. O composto MDA foi utilizado como curva padrão e os valores foram expressos por μmols MDA por mL de plasma.

Após a coleta do sangue, aprofundamento anestésico e constatada a morte, foram ressecadas as bexigas urinárias de todos os animais para avaliação macroscópica. A aparência da bexiga foi graduada de acordo com a escala estabelecida por Gray et al. (1986) para a presença de edema e hemorragia (Quadro 1).

Quadro 1: Escore para avaliação do dano macroscópico na bexiga urinária

	ESCORE	Edema	Hemorragia
Normal	0	Nenhum	Nenhum
Leve	1	Intermediário	Dilatação dos vasos da bexiga
Moderado	2	Restrito à mucosa interna	Hematomas na mucosa
Severo	3	Mucosa interna e externa	Coágulos intravesicais

Fonte: Adaptado de Dornelles, 2013

A bexiga urinária foi dissecada e cortada no seu plano sagital e imersa em solução de formalina tamponada à 10%. Após 48 horas foi acondicionada em álcool 70%, até seguir para as demais etapas histológicas.

Para confecção das lâminas, o material biológico obtido foi desidratado e embebido em parafina para cortes histológicos. Foram seccionados a uma espessura de $5\mu\text{m}$, transferidos para lâmina de vidro, desparafinados e corados com hematoxilina e eosina (HE). Foram então montados com a sobreposição de lamínulas e resina sintética.

Os cortes histológicos serviram de subsídios para avaliação do processo inflamatório nos diferentes grupos, e todas as alterações observadas foram fotomicrografadas para documentação dos resultados. As alterações histológicas foram classificadas segundo os critérios de Gray et al. (1986) (Quadro 2).

Quadro 2: Escore utilizado para a avaliação do dano microscópico na bexiga urinária

Escore	Escore Microscópico
	Avaliação
0	Epitélio normal, sem sinais de inflamação
1	Alterações discretas: diminuição do epitélio por descamação, achatamento das dobras da mucosa, edema e hemorragia leve, poucas ulcerações.
2	Alterações severas: erosão da mucosa, infiltração de células inflamatórias, edema e hemorragia acentuados, deposição de fibrina, múltiplas ulcerações.

Fonte: Adaptado de Dornelles, 2013

As fotomicroscopias digitais das preparações histológicas, foram obtidas com o auxílio de uma câmera (Moticam 5 de 5.0 Mega Pixels) acoplada a um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200), com as objetivas de 10x e 40x, utilizando-se o Software Motic Images Plus 3.0ML.

2.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas e os resultados dos exames clínico laboratoriais e do TBARS, foram primeiramente analisados em relação a normalidade pelo teste de Lilliefors, então analisados pela ANOVA e quando significativos foram submetidos ao pós-teste de Tukey, foi adotado o nível de significância a 5%, sendo os dados expressos como média \pm erro padrão da média.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A toxicidade da ciclofosfamida varia desde sintomas irritativos vesicais e transitórios. Pode apresentar hematúria, caracterizando quadro de cistite hemorrágica, que quando leve, não há risco para a vida (NASCIMENTO et al., 2013). A urotoxicidade está relacionada à formação de metabólitos tóxicos da ciclofosfamida no fígado e em parte, à atividade de alquilação direta no trato urinário (KORKMAZ et al., 2007).

Verificou-se, após administração única de ciclofosfamida na dose de 150mg/kg, a presença de leucopenia nos ratos pertencentes aos grupos G2 a G6, diferindo significativamente do grupo controle G1. Foi também encontrada redução no número de hemácias e na quantidade de hemoglobina, contudo, essa diferença não foi significativa. (Tabela 1).

Tabela 1: Análise dos parâmetros do hemograma após tratamento para avaliar o efeito protetor do extrato de *Echinodorus grandiflorus*, em ratos 48 horas após indução da cistite por ciclofosfamida (150mg/kg/dose única). Coleta de sangue foi realizada pela veia cava caudal, com os animais anestesiados com isoflurano momentos antes da morte. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de hemácias, hemoglobina e leucócitos dos animais do grupo controle (G1) e dos grupos tratamentos (G2 a G6).

Grupo	Hemácias (M)/ μ L	Hemoglobina g/dL	Leucócitos n./ μ L
Controle (G1)	8,105 \pm 0,224	14,67 \pm 0,14	6.465 \pm 630 ^a
Cy (G2)	7,175 \pm 0,147	13,15 \pm 0,18	2.598 \pm 337 ^b
Cy + Egra1 (G3)	7,280 \pm 0,203	13,17 \pm 0,12	1.843 \pm 154 ^b
Cy + Egra2 (G4)	7,305 \pm 0,131	13,35 \pm 0,29	1.760 \pm 568 ^b
Cy + Egra3 (G5)	7,102 \pm 0,338	13,00 \pm 0,61	2.570 \pm 571 ^b
Cy + Mesna (G6)	7,417 \pm 0,164	13,32 \pm 0,26	1.631 \pm 205 ^b

Cy – ciclofosfamida; Egra – *Echinodorus grandiflorus*. (M)/ μ L – Milhões por microlitro de sangue; g/dL – gramas por decilitro de sangue; n./ μ L – número/microlitro

Letras diferentes na mesma coluna indicam que a diferença foi significativa ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

A presença de leucopenia nos ratos que foram tratados com ciclofosfamida foi descrita por Hellman (1976), onde, após 24 horas da administração da ciclofosfamida, foi encontrada redução de grande parte das células precursoras presentes na medula, e também encontraram diminuição do potencial eritropoiético das células restantes.

Nascimento et al. (2013), salientam que a ciclofosfamida pode levar a hematúria leve quando há a presença da cistite hemorrágica, entretanto, a semelhança do presente trabalho, Hellman (1976) não observou queda significativa nos hematócitos, bem como, na hemoglobina, e atribuiu este

achado ao fato da aplicação de dose única de 150mg/kg deste quimioterápico não ser capaz de provocar quedas significativas em suas concentrações.

O TBARS plasmático não apresentou alterações significativas em nenhum grupo estudado conforme pode ser observado na Tabela 2. Segundo Sing (2012) a peroxidação lipídica, pode ser indicativo do processo inflamatório vesical, devido a produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROS), sendo verificadas quando o processo inflamatório tecidual é intenso e crônico, o que talvez pudesse ser encontrado caso o período experimental fosse superior a 48 horas. No presente estudo a peroxidação lipídica (TBARS) nos níveis plasmáticos não foram significativas nos diferentes grupos estudados.

Tabela 2: Níveis de estresse oxidativo – LPO no plasma de ratos que receberam dose única de ciclofosfamida e que foram previamente tratados com extrato de *Echinodorus grandiflorus*.

Grupo	TBARS ($\mu\text{mol MDA/mL plasma}$)
Controle (G1)	0,019 \pm 0,0040
Cy (G2)	0,018 \pm 0,0031
Cy + Egra1 (G3)	0,016 \pm 0,0010
Cy + Egra2 (G4)	0,018 \pm 0,0020
Cy + Egra3 (G5)	0,016 \pm 0,0030
Cy + Mesna (G6)	0,015 \pm 0,0010

MDA/mL: malonaldeído padrão por mL de plasma. μmol - micromol por decilitro. Cy – ciclofosfamida; Egra – *Echinodorus grandiflorus*.

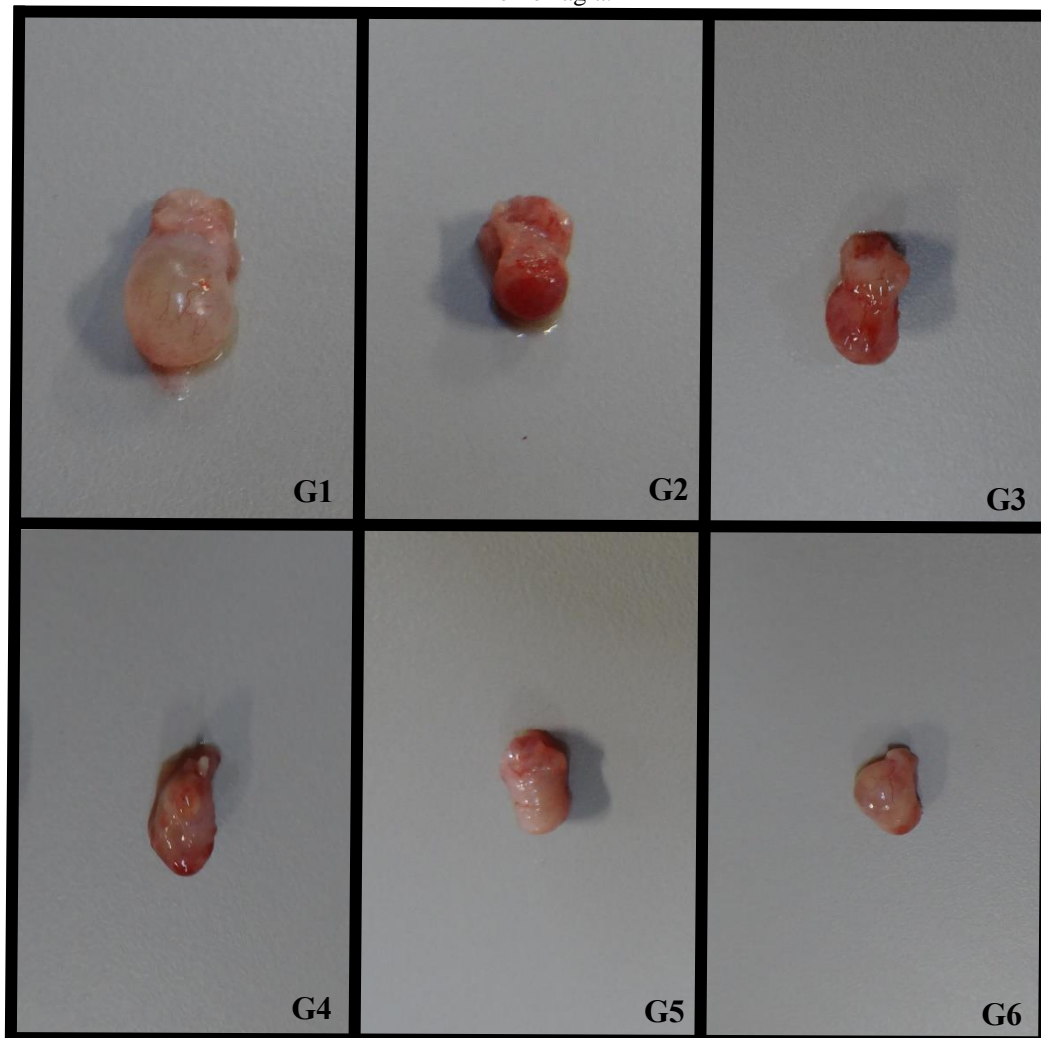
Na avaliação macroscópica das bexigas dos animais do G1, não foram observadas alterações em sua morfologia. No G2, os animais que foram induzidos a cistite com administração da ciclofosfamida, foram encontrados lesões severas tanto para edema como hemorragia. Nos animais dos grupos G3, G4 e G5, identificou-se edema e hemorragia intravesical leve. No grupo G6 não foram identificadas alterações macroscópicas na bexiga urinária, resultado semelhante aos encontrados no G1 (Tabela 3 e Figura 1).

Tabela 3: Efeitos protetor do tratamento com o extrato de *Echinodorus grandiflorus* na bexiga urinária de ratos induzidos a cistite por ciclofosfamida.

Grupo	Edema	Hemorragia
Controle (G1)	-	-
Cy (G2)	+++	+++
Cy + Egra1 (G3)	+	+
Cy + Egra2 (G4)	+	+
Cy + Egra3 (G5)	+	+
Cy + Mesna (G6)	-	-

Cy – ciclofosfamida; Egra – *Echinodorus grandiflorus*. Normal (-); Leve (+); Moderado (++); Severo (+++).

Figura 1: A avaliação macroscópica das bexigas dos ratos do grupo controle (G1) todos os indivíduos apresentaram aspectos anatômicos normais. Nos ratos do grupo G2 foram encontradas lesões severas tanto para edema como hemorragia. Nas bexigas dos animais dos grupos G3, G4 e G5 foi identificado edema e hemorragia intravesical leve. No grupo G6, dos ratos tratados com Mesna, a bexiga apresentou aspecto anatômico normal sem característica de edema ou hemorragia.



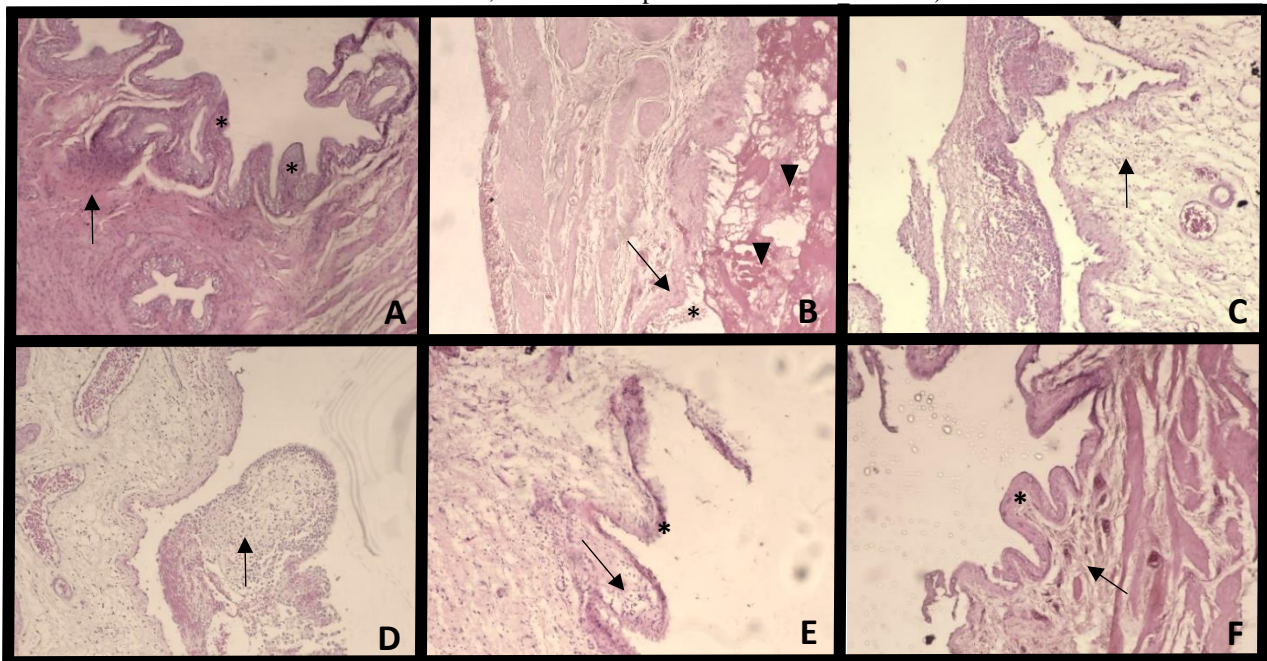
A ação protetiva do extrato da planta de *E. grandiflorus* pode estar associado ao seu efeito anti-inflamatório (MARQUES et al., 2017) que culminam com diminuição do edema tecidual. A redução da hemorragia nos grupos G3 a G5, reforçam o efeito protetivo do extrato bruto da *E. grandiflorus* sobre os vasos sanguíneos vesicais, principalmente pela produção do óxido nítrico (PRANDO et al., 2016), diminuindo a presença de coágulos intravesicais.

No grupo G6, o Mesna, que é o fármaco utilizado como medicamento na terapia coadjuvante de tratamento quimioterápico do câncer como antitóxico, mostrou efeito protetor no urotélio vesical de maneira a anular o efeito tóxico da acroleína sobre o epitélio vesical (CHOW et al., 2006), evidenciado pela ausência de edema e hemorragia.

Nas análises do tecido vesical, foi observado que, histologicamente o G1 apresentou epitélio e o estroma (conjuntivo) íntegros, descaracterizando quadro inflamatório. No G2 foram encontradas hemácias na luz do órgão, caracterizando a cistite hemorrágica e presença de descamação do epitélio,

além de leve inflamação evidenciado por células polimornucleares degeneradas. No G3 e G4, houve a presença de infiltrado inflamatório difuso acentuado no epitélio. No G5 notou a presença de descamação de epitélio e infiltrado inflamatório leve, sugerindo efeito protetor do extrato de *E. grandiflorus*. Não foram observadas lesões no G6 evidenciando o efeito protetivo do Mesna sobre o urotélio vesical (Figura 2).

Figura 2: Em A, do grupo controle (G1), as bexigas dos ratos apresentaram epitélio vesical (asterisco) e conjuntivos (seta) íntegros, descaracterizando quadro de inflamação. Nos ratos do G2 (B), que receberam ciclofosfamida, foram encontradas hemácias na luz do órgão (cabeça de seta), epitélio (asterisco) com descamação e células polimorfonucleadas degeneradas (seta) confirmando a cistite hemorrágica. Nos grupos G3 e G4 infiltrado inflamatório difuso acentuado (C e D - seta). Em E os ratos do G5 apresentaram infiltrados inflamatórios (seta) e descamação do epitélio (asterisco) leve, sugerindo efeito protetivo do extrato de *Echinodorus grandiflorus* no controle da cistite hemorrágica. No grupo G6 não foram encontrados achados dignos de nota, evidenciando o efeito protetor do Mesna sobre o epitélio (asterisco) e o conjuntivo sem infiltrado inflamatório (seta), das bexigas de ratos. (Material corado pela técnica de HE, fotomicroscopias com aumento de 100X).



Diferentes trabalhos sugerem que a *E. grandiflorus* apresentam efeitos anti-inflamatórios em suas diferentes formulações (GARCIA, 2016b), incluindo o infuso do extrato bruto, uma vez que foram isolados flavonóides que atuam sobre os receptores muscarínicos, induzindo a secreção endotelial de óxido nítrico e prostaglandinas (PRANDO et al., 2016), este último reduzindo o efeito inflamatório.

4. CONCLUSÃO

A indução da cistite hemorrágica em modelos experimentais é comprovada neste estudo. A proteção do urotélio vesical é documentada da forma satisfatória por meio do uso do fármaco Mesna, enquanto que o uso do extrato da planta *E. grandiflorus* na dose de 300mg/kg apresentou efeito

Efeito protetivo do extrato...

protetor do urotélio vesical, sugerindo um potencial anti-inflamatório do extrato. Sugere-se que, em futuras pesquisas, o *E. grandiflorus* possa ser utilizado em doses maiores e avaliado o efeito protetivo do urotélio de maneira mais eficiente, ou ainda, que possa ser utilizado em associação com menores doses do Mesna, reduzindo os custos dos tratamentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Paranaense que por meio da Diretoria Executiva de Gestão da Pesquisa e Pós-graduação (DEGPP), apoiou o desenvolvimento desta pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- AUGÉ, C. *et al.* Relevance of the cyclophosphamide-induced cystitis model for pharmacological studies targeting inflammation and pain of the bladder. *European journal of pharmacology*, v. 707, n. 1-3, p. 32-40, 2013
- BHATTACHARYA, A.; *et al.* Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide treated autoimmune-prone MZB/W female mice. *Journal the American College of Nutrition*, v. 22, n. 5, p. 388-399, 2003.
- BRASIL. Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa, Brasília, 808 p., 2010.
- CHOW, Y. C. *et al.* Epinephrine promotes hemostasis in rats with cyclophosphamide induced hemorrhagic cytitis; *Urology*, v. 67, p. 639-641, 2006.
- COELHO, M. F., REBOLA, J. Cistite Intersticial Etiopatogenia e Atitudes Terapêuticas. *Acta Urológica*, v. 20, n. 3, p. 19-24, 2003.
- CORREA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. IBDF, Rio de Janeiro, 1984.
- CORREIA JUNIOR, C., MING, L. C., SCHEFFE, R. M. C. Plantas Medicinais. FUNEP, Jaboticabal, 2. ed., 1994.
- DORNELLES, F. N. Participação dos receptores CXCR2 e TRPV1 na cistite induzida por ciclofosfamida em ratos. 2013. 91. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- DUTRA, R.C. *et al.* Investigação das atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Juiz de Fora, v. 16, n. 4, p. 469-474, 2006.
- GARCIA, E. F. *et al.* Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicine*, v. 18, n. 1, p. 80-86, 2010.
- GARCIA, E. F. *et al.* Effect of the hydroethanolic extract from *Echinodorus grandiflorus* leaves and a fraction enriched in flavone-C-glycosides on anti-gen-induced arthrits in mice. *Planta Med.*, v. 82, n. 5, p. 407-413, 2016a.
- GARCIA, E. F. *et al.* In Vitro TNF-@ inhibition elicited by extracts from *Echinodorus grandiflorus* leaves and correlation with their phytochemical composition. *Planta Med*, v. 82, n. 4, p. 337-343, 2016b.
- GRAY, K.J., ENGELMANN U.H., JOHNSON E.H., FISHMAN I.J. Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (Cytosan). *J Urology*. v. 136, p. 497-500, 1986.
- HELLMAN, S.; GRATE, H. E. Effect of Cyclophosphamide on the Murine Hematopoietic Stem Cell Compartment as Measured by Different Assay Techniques. *Blood*, v. 38, n. 6, p.706-714, 1976.
- 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. 5, p. 303-312, 2007.

LEE, W. et al. Vascular Barrier protective effects of orientin and isorientin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Vascular Pharmacology*, v. 62,n.1, p. 3-14, 2014.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2 ed., 2002.

MANIKANDAN et al. Hemorrhagic Cystitis: A challenge to the urologista. *Indian Journal of Urology*, v. 26, n. 2, p. 159-166, 2010.

MARQUES, A. M. et al. *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, p. 1032-1047, 2017.

MARQUES, A. M.; PROVANCE-JR, D. W.; KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R. *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, p. 1032-1047, 2017.

NASCIMENTO E. L. Efeito Antioxidante do Fitomedicamento *Echinodorus macrophyllus* na nefrotoxicidade do quimioterápico ciclofosfamida. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem na Saúde do Adulto) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PACHALY, J. R. Terapêutica por Extrapolação Alométrica. In: CUBAS,Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária 1 ed. São Paulo: Roca, p. 1215-1223, 2006.

PRANDO, T. B. L. et al. Involvement of bradykinin B2, and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham &Schtdl.) Micheli. *Phytomedicine*, v. 23, p. 1249-1258, 2016.

RIBEIRO, R. A. et al. Tumor necrosis fator alpha and interleukin – 1 beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *Journal of Urology*, v. 167, p. 2229 -2234, 2002.

ROSSI-JESUS D., et al. Ninety-day oral toxicity assessment of an alternative biopolymer for controlled release drug delivery systems obtained from cassava starch acetate. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 1-7, 2015.

SANCHO, M. et al. Altered neuronal and endothelial nitric oxide synthase expression in the bladder and urethra of cyclophosphamidetreated rats, *Nitric Oxide. Biology and Chemistry*, v. 39, n. 1, p. 8–19, 2014.

SANCHO, M. et al. Proliferation of Interstitial Cells in the Cyclophosphamide-Induced Cystitis and The Preventive Effect of Imatinib. *BioMed Research International*, v. 2017, 2017.

SINANOGLU, O. et al. The Protective effects of spirulina in cyclophosphamide induced nephrotoxicity and urotoxicity in rats. *Basic and Translational Science*, v.80, n.6, p. 1392, 2012.

SING, A.P. et al. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Res*, v. 64, n. 1, p. 31-44, 2012.

SOUZA, C. A. et al. Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica. *Rev. bras. hematol. Hemoter*, v. 22, n. 2, p. 123-128, 2000.

FREDERICO, F. E. P. *et al.*

TIBIRIÇÁ, E. *et al.* Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, n.1, p. 50-55, 2007.

Recebido em: 14/11/2022

Aceito em: 20/12/2022