

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Avaliação da eficácia de *Lactobacillus acidophilus* no tratamento da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em ratas wistar.

LIANDRA FERREIRA MINHOS

**Dourados - MS
2021**

LIANDRA FERREIRA MINHOS

Avaliação da eficácia de *Lactobacillus acidophilus* no tratamento da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em ratas wistar.

Área do CNPq: 2.10.00.00-0 Farmacologia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Márcio Eduardo de Barros

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia da Silva Lima Gehlen

Dourados - MS
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M664a Minhos, Liandra Ferreira

Avaliação da eficácia de *Lactobacillus acidophilus* no tratamento da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em ratos wistar. [recurso eletrônico] / Liandra Ferreira Minhos. -- 2021. Arquivo em formato pdf.

Orientador: Márcio Eduardo de Barros.

Coorientadora: Ana Cláudia da Silva Lima Gehlen.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Cistite Hemorrágica. 2. Ciclofosfamida. 3. Inflamação. 4. Probióticos. 5. Lactobacilos. I. Barros, Márcio Eduardo De. II. Gehlen, Ana Cláudia Da Silva Lima. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



UFPGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE

**DOURADOS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR **LIANDRA FERREIRA MINHOS** DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO “FARMACOLOGIA”.

Aos vinte dias do mês de julho de dois mil e vinte e um, às 13 horas e 30 minutos, em sessão pública, realizou-se por videoconferência a defesa de dissertação de Mestrado intitulada “**Avaliação da eficácia de *Lactobacillus acidophilus* no tratamento da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em ratas Wistar**” apresentada pela aluna **Liandra Ferreira Minhos**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Dr. Marcio Eduardo de Barros - PPGCS/UFPGD (presidente), Dr. Ricardo Fernandes/UFPGD e Dr.^a Simone Simionatto - PPGCS/UFPGD. Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua explanação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. **O presidente da banca abaixo-assinado atesta que os doutores Ricardo Fernandes e Simone Simionatto participaram de forma remota desta defesa de dissertação, conforme o § 3º do Art. 1º da Portaria RTR/UFPGD n. 200, de 16/03/2020 e a Instrução Normativa PROPP/UFPGD N° 1, de 17/03/2020, considerando a candidata APROVADA, conforme declarações anexas.** Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelo presidente da Comissão Examinadora.

Dourados, 20 de julho de 2021.

Dr. Marcio Eduardo de Barros - PPGCS/UFPGD

Dr. Ricardo Fernandes/UFPGD (participação remota)

Dr.^a Simone Simionatto - PPGCS/UFPGD (participação remota)

ATA HOMOLOGADA EM: ____ / ____ / ____, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFPGD.

**Pró-Reitoria de Ensino de Pós-Graduação
e Pesquisa Assinatura e Carimbo**

DEDICATÓRIA(S)

*Aos meus familiares
Meus pais, Luiz e Midiam, meu irmão Marcelo
Pelo apoio e confiança em minhas escolhas, torcendo por
meu sucesso e felicidade em todos os momentos.
Acima de tudo, dedico ao meu esposo Jean
que em todo momento me apoiou e incentivou a minha conquista.*

AGRADECIMENTO(S)

A Deus, por ter me dado a oportunidade de realizar mais esta etapa em minha vida profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Eduardo de Barros, por ter me acolhido e me orientado, por toda sua disponibilidade, compreensão, incentivo e paciência durante esse percurso de mestrado. Muito obrigada!

A minha coorientadora Prof.^ª Dr.^ª Ana Cláudia da Silva Lima Gehlen, por seu apoio, orientação, por sua paciência, por todos os conselhos, sua ajuda e confiança depositada em mim, e acima de tudo por sua amizade. Muito obrigada!

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Ariany Carvalho dos Santos, Prof. Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo e Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão, por todas as considerações, correções e sugestões de melhoria do trabalho.

Aos membros da banca de defesa, Profa. Dra. Simone Simionatto, Prof. Dr. Ricardo Fernandes, Prof. Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo e a Profa. Dra. Ariany Carvalho dos Santos, por todas as considerações, correções e sugestões de melhoria do trabalho.

Ao Prof. Me. Felipe F. B. Júnior pela parceria na realização das análises hematológicas e bioquímicas.

A Profa. Dra. Ariany C. Santos e ao Prof. Dr. Roosevelt I. C. Souza pela parceria na realização das análises histopatológicas.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para realização desse trabalho, muito obrigada!

A CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Composição da parede da bexiga	15
Figura 2 – Estrutura química das oxazafosforinas	18
Figura 3 – Esquematização da patogênese da cistite hemorrágica induzida pelas oxazafosforinas	21
Figura 4 – Estrutura química do Mesna	23
Figura 5 – Esquematização da atuação do Mesna na inativação da acroleína	24
Figura 6 – Mecanismos de ação dos lactobacilos na prevenção de infecções do trato urinário	28
Figura 7 – Respostas imunológicas induzidas por bactérias do ácido láctico	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Benefícios da intervenção farmacológica ou nutricional da utilização dos probióticos.....	26
Tabela 2 – Aplicabilidade e doses recomendadas para utilização de probióticos.....	27
Tabela 3 – Estudos das atuais aplicações dos probióticos em diversas doenças.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BAL	Bactérias do ácido láctico
CH	Cistite Hemorrágica
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
CYP	Ciclofosfamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EAS	Elementos Anormais do Sedimento
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos, órgão do governo estadunidense (<i>Food and Drug Administration</i>)
GC	Grupo Controle
GCZ	Grupo Controle Zero
GI	Grupo Inflamação
GL24H	Grupo Lactobacilos 24 horas
GM	Grupo Mesna
GM+L	Grupo Mesna+Lactobacilos
GTL	Grupo Tratamento Lactobacilos
ICS	Sociedade Internacional de Continência (<i>International Continence Society</i>)
IFO	Ifosfamida
IgA	Imunoglobulina A
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LUTS	Sintomas do Trato Urinário Inferior (<i>Lower Urinary Tract Symptoms</i>)
MDA	Malondialdeído
MESNA	2-mercaptoeano-sulfonato de sódio
NFκB	Fator Nuclear Kappa B
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
TLR	Receptor Toll-like (<i>Toll-like receptors</i>)
TNBS	Ácido 2,4,5-Trinitrobenzono-Sulfônico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)

TRPV1	Receptor Transitório Tipo Vaniloide Potencial 1(<i>Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1</i>)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WGO	Organização Mundial de Gastroenterologia (<i>World Gastroenterology Organisation</i>)

Avaliação da eficácia de *Lactobacillus acidophilus* no tratamento da Cistite Hemorrágica induzida por ciclofosfamida em ratas Wistar.

RESUMO

A cistite hemorrágica é uma complicação inflamatória que pode ser causada pela administração da ciclofosfamida, sendo esta, amplamente utilizada como agente antineoplásico. Na busca por novas alternativas terapêuticas estão os probióticos que são capazes de suprimir o processo inflamatório e, deste modo, podem ser utilizados na prevenção dessa doença. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da utilização de *Lactobacillus acidophilus* NCFM no tratamento de Cistite Hemorrágica induzida por ciclofosfamida em ratas Wistar. Utilizou-se 77 ratas Wistar de 8 semanas e peso médio de 250 gramas. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em grupos experimentais (n = 9): grupo controle (GC), grupo controle zero (GCZ), grupo inflamação (GI), grupos de tratamento agudo por 24 horas: grupo tratamento com lactobacilos por 24 horas (GL24H) e grupo mesna (GM), e ainda, grupos de tratamento crônico por 30 dias: grupo tratamento com 2×10^8 UFC lactobacilos (GTL) e grupo mesna+lactobacilos (GM+L). Os animais do grupo inflamação e dos grupos tratamento receberam injeção de ciclofosfamida (200 mg/kg, i.p) e após 24 horas foram tratados conforme respectivos grupos. Após o período de tratamento, os animais foram submetidos a eutanásia e coleta de sangue para realização de hemograma e análises bioquímicas. Foi coletada urina para exame de elementos anormais do sedimento (EAS) urinário e órgãos como bexiga, rim e fígado para exames histopatológicos. Com relação aos resultados dos animais do grupo inflamação, foi possível observar peso da bexiga e índice de edema estatisticamente maior, peso corporal estatisticamente reduzido, alterações macroscópicas com sinais de hemorragia na bexiga, lesões histopatológicas e alterações no hemograma com eritrócitos, hematócrito e plaquetas estatisticamente reduzidos, indicando sangramento pelo uso da ciclofosfamida. Houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros bioquímicos entre os grupos, mas dentro dos valores de referência de animais saudáveis, bem como os parâmetros analisados na urina dos animais. Os animais tratados com lactobacilos apresentaram urotélio íntegro, sem reação inflamatória e sem alterações na urina, alterações hematológicas e bioquímicas, da mesma maneira que os animais tratados com Mesna. Portanto, esta pesquisa demonstrou que a utilização de *L. acidophilus* reduziu a ação inflamatória e hemorrágica da ciclofosfamida na bexiga dos animais tanto a curto, quanto a longo prazo, apresentando-se como uma alternativa promissora de tratamento para a cistite hemorrágica.

Palavras-chave: Inflamação da bexiga. *Lactobacillus spp.* Probióticos.

Evaluation of the Efficacy of *Lactobacillus acidophilus* in the treatment of Cyclophosphamide-induced Hemorrhagic Cystitis in Wistar rats.

ABSTRACT

Hemorrhagic cystitis is an inflammatory complication that can be caused by the administration of cyclophosphamide, which is widely used as an antineoplastic agent. In the search for new therapeutic alternatives, probiotics can suppress the inflammatory process and, therefore, can be used to prevent this disease. Thus, this study aimed to evaluate the effects of using *Lactobacillus acidophilus* NCFM in the treatment of cyclophosphamide-induced Hemorrhagic Cystitis in Wistar rats. We used 77 8-week-old Wistar rats with an average weight of 250 grams. The animals were randomly distributed into experimental groups (n = 9): control group (CG), zero control group (GCZ), inflammation group (IG), 24-hour acute treatment groups: 24-hour lactobacilli treatment group (GL24H), and mesna group (GM), and chronic treatment groups for 30 days: treatment group with 2×10^8 UFC lactobacilli (GTL) and mesna+lactobacilli group (GM+L). The animals in the inflammation group and the treatment groups received an injection of cyclophosphamide (200 mg/kg, i.p) and after 24 hours were treated according to the respective groups. After the treatment period, the animals were euthanized, and blood collected for blood count and biochemical analysis. Urine was collected for examination of abnormal urinary sediment elements (EAS) and organs such as the bladder, kidney, and liver for histopathological examinations. Regarding the results of animals in the inflammation group, it was possible to observe statistically higher bladder weight and edema index, statistically reduced body weight, macroscopic changes with signs of bleeding in the bladder, histopathological lesions, and changes in the blood count with erythrocytes, hematocrit and platelets statistically reduced, indicating bleeding from the use of cyclophosphamide. There was a statistically significant difference in the biochemical parameters between the groups, but within the reference values of healthy animals, as well as the parameters analyzed in the animals' urine. The animals treated with lactobacilli showed intact urothelium, without inflammatory reaction and changes in urine, hematological and biochemical changes, in the same way as the animals treated with Mesna. Therefore, this research demonstrated that the use of *L. acidophilus* reduced the inflammatory and hemorrhagic action of cyclophosphamide in the bladder of animals both in the short and in the long term, presenting itself as a promising treatment alternative for hemorrhagic cystitis.

Keywords: Bladder inflammation. *Lactobacillus spp.* Probiotics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 ANATOMIA DO TRATO URINÁRIO.....	14
2.2 DISTÚRBIOS DO TRATO URINÁRIO INFERIOR.....	15
2.3 CISTITE HEMORRÁGICA (CH).....	16
2.4 CICLOFOSFAMIDA (CYP).....	18
2.5 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS PARA CISTITE.....	22
2.5.1 MESNA	23
2.6 PROBIÓTICOS.....	25
2.6.1 LACTOBACILOS	26
2.6.1.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	29
3 OBJETIVOS.....	33
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
5 APÊNDICES.....	45
5.1 ARTICLE 1: EVALUATION OF THE EFFICACY OF <i>Lactobacillus acidophilus</i> IN THE TREATMENT OF CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED HEMORRHAGIC CYSTITIS IN WISTAR RATS	46
6 CONCLUSÕES	67
7 ANEXOS.....	68
7.1 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	69

1 INTRODUÇÃO

A cistite é uma doença frequente que acomete homens e mulheres independentemente da idade e se tornou uma preocupação de saúde pública devido à grande recorrência de casos presentes pelo mundo, sendo, essa doença caracterizada como uma inflamação da mucosa vesical ocasionada pela colonização de bactérias enteropatogênicas nas células superficiais da bexiga ou decorrente de lesões por substâncias irritantes que levam a cistite hemorrágica ou intersticial. Durante sua vida, as mulheres têm 50% de chance de serem afetadas por cistite, e a cada ano 10% das mulheres são afetadas (CHAMBÔ, 2014).

No estado de Mato Grosso do Sul no ano de 2019, houve 560 internações e aproximadamente 28 óbitos de pacientes com cistite, já no período de janeiro de 2020 a janeiro de 2021, ocorreram 452 internações e 29 óbitos de pacientes com cistite no estado, sendo, igualmente comum no ambiente hospitalar e no ambiente comunitário (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). O uso inadequado ou automedicação de anti-inflamatórios e antibióticos promovem a recorrência da doença e acabam agredindo a saúde do indivíduo pela severidade dos efeitos colaterais relacionados ao consumo contínuo. Alguns medicamentos apresentam efeitos urotóxicos, como a utilização da ciclofosfamida, podendo levar a uma cistite do tipo hemorrágica (KARAM; HABIBI; BOUZARI, 2019).

A ciclofosfamida (CYP) é um agente alquilante do grupo das oxazafosforinas geralmente empregado no tratamento de neoplasias malignas e de diversas doenças reumatológicas, porém apresenta algumas reações adversas que incluem supressão da medula óssea, suscetibilidade a infecção, esterilidade e amenorreia, além de nefrotoxicidade e cistite, bem como complicações cardiovasculares (TELES et al., 2016). A ciclofosfamida possui metabólitos tóxicos como a acroleína que podem ser filtrados e excretados pelos rins e depositados na bexiga causando uma irritação na mucosa que leva a expressão de mediadores inflamatórios, dilatação vascular e fragilidade capilar, dando início ao processo inflamatório (KLIPPEL, 1995; SILVA JUNIOR et al., 2013).

Sendo assim, o uso da ciclofosfamida para indução de uma cistite inflamatória, se tornou um modelo utilizável para investigação de potenciais terapêuticos da doença (ZIRAK et al., 2020). Atualmente o tratamento mais utilizado para prevenção da cistite hemorrágica é a administração do Mesna (2-mercaptoetano-sulfonato de sódio) nos regimes de quimioterapia para anulação da acroleína na bexiga, entretanto o mesna não é um composto anti-inflamatório e não possui propriedades antioxidantes, em vista disso, não pode atuar na

modulação das vias inflamatórias envolvidas no desenvolvimento da cistite, além de possuir diversos efeitos colaterais, como: hipersensibilidade cutânea e sistêmica, náuseas, fadiga, cefaleia e diarreia (YILMAZ et al., 2015), sendo importante o estudo de alternativas terapêuticas para essa doença, tendo como exemplo, os probióticos que atuam em diversas disfunções do trato urinário (ALI et al., 2014).

Os probióticos são microrganismos não patogênicos que exercem efeitos benéficos a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (HILL et al., 2014). Geralmente são incluídos na suplementação alimentar sendo consumidos diariamente ou periodicamente pois atua na melhora dos processos inflamatórios, como em casos de colite, em que pode haver a redução das concentrações plasmáticas e teciduais de alguns marcadores inflamatórios (interleucinas 1, 2, 6, 7, Fator de Necrose Tumoral alfa- TNF- α , ácido tiobarbitúrico, óxido nítrico -NO e interleucina 1 beta), conferindo proteção fisiológica e histológica, além de atuar na imunomodulação do organismo (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2018; PLAZA-DÍAZ, et al., 2017; WGO, 2017). Por isso, estudos com probióticos estão sendo realizados com o objetivo de propor uma medida alternativa para o tratamento da cistite, visando diminuir os impactos causados ao organismo pelo uso de anti-inflamatórios e antibióticos, ou mesmo pelo Mesna em pacientes com uso de ciclofosfamida (SIHRA et al., 2018).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia do trato urinário

O sistema urinário é constituído pelos rins, ureteres, bexiga e uretra que de forma geral, participam da eliminação dos produtos do metabolismo e no controle do equilíbrio hídrico (POTTER; PERRY, 2009). A parte superior do trato urinário é constituída pelos rins e ureteres. Os rins são órgãos marrom avermelhados no formato de feijão e são encontrados no retroperitônio. Os rins possuem no seu ápice a glândula suprarrenal (responsável pelo balanço hídrico e atua na pressão arterial, através da liberação de hormônios). Além disso, o parênquima renal é dividido entre a medula e o córtex que contêm néfrons responsáveis pela filtração do sangue. Os rins auxiliam no controle da pressão arterial e na produção de glóbulos vermelhos por meio da renina e da eritropoietina, tal como são capazes de aumentar a absorção de cálcio no organismo, além de exercerem várias outras funções. Os ureteres são estruturas tubulares bilaterais de 22 a 30 cm de comprimento e são responsáveis pelo transporte da urina da pelve renal até a bexiga (CAMPBELL-WALSH, 2011).

A parte inferior do trato urinário é constituída pela bexiga e uretra (TARANTO, 2017). A bexiga é um órgão oco revestido por um epitélio transicional denominado urotélio e se encontra situada atrás da sínfise púbica, atuando como reservatório temporário e na eliminação periódica da urina, com capacidade aproximada de 300 a 500 ml de urina (POTTER; PERRY, 2009). A bexiga apresenta duas regiões, uma delas é o corpo da bexiga localizada acima dos orifícios uretrais e a outra é a base da bexiga que está abaixo dos orifícios uretrais, e é formada pelo músculo liso trígono e junção uretrovesical (PRADIDARCHEEP et al., 2011). O corpo da bexiga é composto histologicamente por quatro camadas: (1) a camada adventícia ou serosa que reveste a bexiga externamente; (2) a camada muscular constituída pelo musculo detrusor que é formado por fibras musculares que mudam de orientação e auxiliam na passagem da urina até a uretra; (3) a lâmina própria constituída de células intersticiais, bem vascularizada e com terminais nervosos e (4) o urotélio que é um epitélio pseudoestratificado formado por três tipos de células (basal, intermediária e superficial ou guarda-chuva) que juntas da camada de glicosaminoglicanos formam uma barreira impermeável a íons, solutos e patógenos, revestindo a bexiga internamente (Figura 1) (GARTNER, 2017; MERRILL et al., 2016).

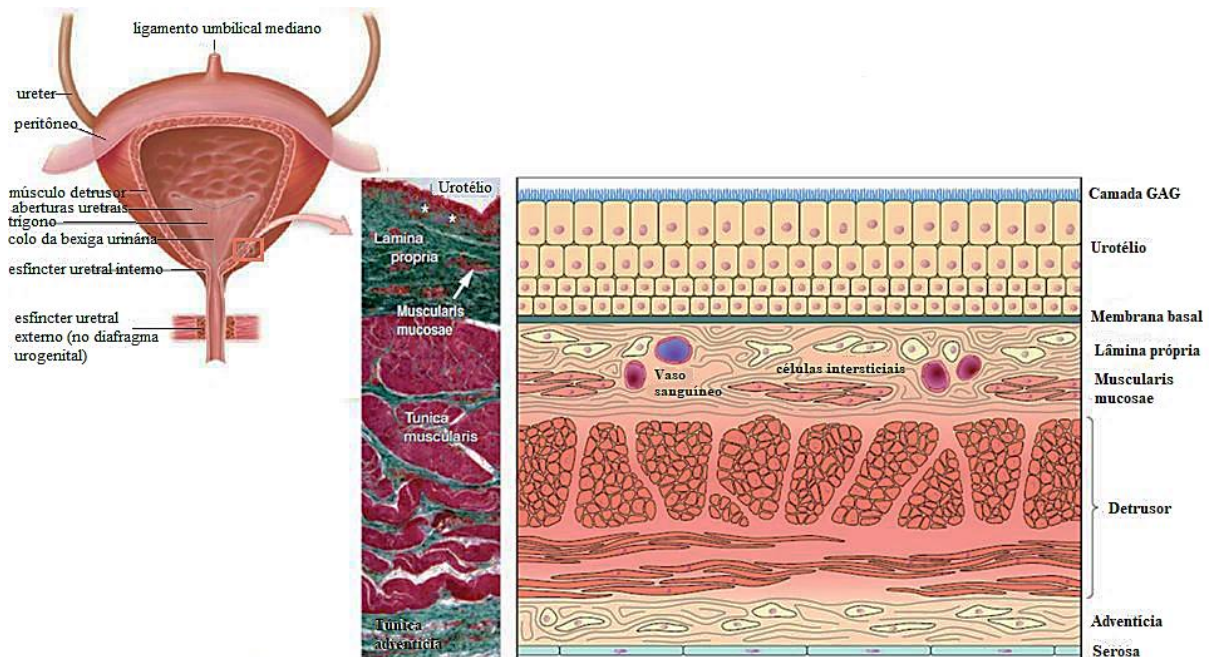


Figura 1 - Composição da parede da bexiga. Fonte: Adaptado de Taranto (2017, p. 171).

Por fim, a uretra é um tubo fibromuscular que se estende do orifício uretral interno ao externo, sendo formada por três camadas musculares, duas internas de músculo liso e uma camada mais externa de músculo estriado (rabdoesfincter), tem por função dar passagem a urina da bexiga para o exterior (PRADIDARCHEEP et al., 2011).

2.2 Distúrbios do trato urinário inferior

Os distúrbios do trato urinário inferior compreendem qualquer anormalidade na capacidade de armazenamento ou micção. Essas condições afetam a bexiga, próstata e uretra e estão relacionados com termos, sinais, observações urodinâmicas ou sensações anormais seguidas de dor, desconforto ou pressão na região suprapúbica ou retropúbica, que foram descritas pela Sociedade Internacional de Continência (ICS) como Sintomas do Trato Urinário Inferior ou “Lower Urinary Tract Symptoms” (LUTS) (CAMPBELL-WALSH, 2011).

Esses sintomas estão divididos em três grupos: os de armazenamento (que inclui aumento da frequência urinária, noctúria, urgência e incontinência urinária), sintomas relativos a micção (fluxo lento ou intermitente durante a micção, esforço ou hesitação) e pós-miccionais (sensação de esvaziamento incompleto ou gotejamento pós-micção), ou eles podem ser classificados de forma ampla por sintomas obstrutivos (bloqueio na saída da base da bexiga) e irritativos (hiperatividade da bexiga), geralmente referente a algum problema agudo do trato urinário como infecção e inflamação, ou ainda, por uma condição crônica de

obesidade, diabetes, pressão alta, apneia e estilo de vida (como fumar, ingerir álcool, muita cafeína e baixos níveis de atividade física) (ABRAMS et al., 2002).

É comum haver vários fatores agindo ao mesmo tempo para causar esses sintomas, mas a causa exata nem sempre é fácil de encontrar, por isso, vários testes são necessários para uma avaliação médica cuidadosa como: exames de urina (para verificar sinais de infecção ou câncer no trato urinário ou rins), exames de sangue (para verificar a função renal, hepática, presença de açúcares e gorduras), ultrassom (para medir a quantidade de urina deixada na bexiga após a micção), ressonância magnética (para verificar a presença de câncer), citoscopia (para avaliar a viabilidade da bexiga e uretra), além de histórico médico e exame físico, que irão auxiliar na melhor escolha de prevenção e tratamento (BROOK; WITTERT, 2018).

2.3 Cistite hemorrágica (CH)

A cistite hemorrágica (CH) se caracteriza pelo desenvolvimento de um processo inflamatório severo do trato geniturinário definido pela alteração da mucosa da bexiga (DORNELLES et al., 2014). A CH gera preocupação por sua alta prevalência, comum tanto em homens quanto mulheres, em todas as faixas etárias, proporcionando uma sensação exagerada de dor e hemorragia (IRWIN et al., 2011; MARTINS et al., 2012; SILVA JUNIOR et al., 2013). Clinicamente os sintomas manifestados são: o desenvolvimento de hematúria micro ou macroscópica, dor na região púbica, disúria, aumento na urgência e na frequência urinária, incontinência e noctúria (MANIKANDAN, KUMAR, DORAIRAJAN, 2010; MOY, 2016). Os pacientes podem apresentar ainda anemia ferropriva ou em casos severos choque hipovolêmico, sendo que esses sintomas podem persistir por semanas ou até anos (STILLWELL; BENSON, 1988).

As causas da CH estão relacionadas a processos infecciosos ou não infecciosos que levam ao sangramento da mucosa vesical com consequências variadas de acordo com sua intensidade (DORNELLES et al., 2014; EL-ZIMAITY et al., 2000; HADJIBABAIE et al., 2008; PAYNE et al., 2013; RIBEIRO et al., 2012). Segundo Moy (2016), a CH pode ocorrer como resultado de câncer de bexiga primário, consequência da imunossupressão ou por transplante de medula que do mesmo modo leva a uma cistite infecciosa ou induzida por tratamento antineoplásico ou radioterapia (GAVIN; KATZ, 2002).

Outras teorias é de que a CH pode ser causada por adenovírus, citomegalovírus ou poliomavírus, além disso, é possível que ocorra como uma doença secundária a um tumor necrosado da bexiga ou câncer de bexiga, sendo mais comum em mulheres e pacientes com

mais de 50 anos (PADUCH, 2007). No que se refere as mulheres, há uma proporção de 5:1 casos em homens devido a anatomia do trato urinário feminino em que a uretra e o anus são bastante próximos, facilitando a chegada de bactérias, ou por conta das alterações hormonais, que podem provocar irritações à parede da bexiga devido a menopausa ou ao período menstrual (BJORLING; WANG, 2001; CAPRONI, 2021).

A CH pode ocorrer frequentemente em crianças se estiver relacionada a uma causa infecciosa (PADUCH, 2007), como a presença de adenovírus (50 a 80% das fatalidades), e *Escherichia coli*. Aproximadamente 14,5% dos pacientes com CH apresentaram adenovírus e 17,4% apresentaram *E. coli*, mas 60% não continha qualquer agente infeccioso (MUFSON et al., 1976; NUMAZAKI et al., 1968).

As causas mais frequentes de CH estão relacionadas ao uso de quimioterápicos com oxazafosforinas, como a CYP e a ifosfamida (IFO) ou por radioterapias pélvicas (MOY, 2016). Estima-se que 10 a 40% dos pacientes submetidos a altas doses de CYP para tratamento de tumores, desenvolvem a CH e pelo menos 70% dos tratados após transplante de medula óssea também podem desenvolver (SHEPHERD, 1991). A ocorrência da CH pela aplicação das oxazafosforinas está relacionada com a eliminação de metabólitos tóxicos como a acroleína que promove um efeito inflamatório de intensidade variada mediante ativação de vias do processo inflamatório, liberando vários mediadores que intensificam o efeito citotóxico e causa o dano urotelial (RIBEIRO et al., 2012).

Logo, o diagnóstico da CH é realizado através da avaliação urológica completa (febre, calafrios, dor no flanco, histórico de hematúria inexplicável, sintomas obstrutivos, disfunção neurogênica da bexiga, cálculos renais, fístula, abuso de analgésico ou diabetes mellitus) e o histórico médico do paciente para reconhecer e corrigir anormalidades, evitando falhas que possam levar a reinfecção em pacientes com cistite infecciosa ou a recorrência em pacientes com CH (GUPTA et al., 2000).

Outra forma de diagnosticar a doença é avaliando a presença de prostaglandinas (JEREMY et al., 1987). Saban et al. (1997) demonstrou que com o aumento da inflamação, verificou-se maior liberação de prostaglandinas em pacientes com CH, sendo assim, é possível que estas possam atuar na regulação da atividade muscular do detrusor e na citoproteção do urotélio.

Atualmente, a CYP é utilizada como antineoplásico em vários tipos de câncer, incluindo linfomas, retinoblastoma, carcinomas de mama, imunossupressores em transplantes, na artrite reumatoide, granulomatose de Wegener e síndrome nefrótica (CHABNER et al., 2001).

Essas moléculas se tornam compostos eletrofílicos fortes, formando ligações covalentes com os grupos do DNA impedindo sua replicação, sendo que, a principal etapa da alquilação é a formação de íons carbônicos que reagem instantaneamente com os doadores de elétrons, transferindo um grupo alquila para um constituinte celular, ocorrendo no interior do núcleo e levando a morte celular (BARBIE; FRANK, 2009; CHU; SARTORELLI, 2014; RANG et al., 2012).

Baumann e Preiss (2001) demonstraram que a aplicação de ciclofosfamida para tratamento de distúrbios autoimunes (como lúpus eritematoso sistêmico) possui resultados significativos por seu efeito imunossupressor. Aliás, a CYP também é utilizada em transplante de células hematopoiéticas (RIBEIRO et al., 2012). Segundo a Sociedade Americana do Câncer, a incidência de neoplasias com tratamento por CYP prescrita pela Food and Drug Administration (FDA) foi de menos de 400 mil novos pacientes por ano, sendo prescrito para linfoma de Hodgkin, mieloma múltiplo, micose por fungos, linfoma não – Hodgkin e adenocarcinoma ovariano (FDA, 2017; MATZ; HSIEH, 2017; NIH, 2017).

Porém, apesar de sua eficácia, há evidências de efeitos colaterais, sendo o principal a CH (MATZ; HSIEH, 2017). Após a CYP ser metabolizada no fígado, ocorre a liberação da acroleína que é um metabólico urotóxico que se acumula na bexiga e pode causar estresse oxidativo e inflamação (MATZ; HSIEH, 2017). O estresse oxidativo gera em grande quantidade espécies reativas de oxigênio (ROS) que desencadeiam um processo irritativo no urotélio da bexiga, levando as manifestações características da doença (ulceração, hematúria, dor intensa e sintomas irritantes de micção) (HALDAR; DRU; BHOWMICK, 2014).

Da mesma forma, o estresse oxidativo pode ser uma possível causa ou consequência para a CH, pois o aumento excessivo pode ser prejudicial para peroxidação lipídica de membrana, agressões nas proteínas dos tecidos e membranas, enzimas, carboidratos e DNA que leva a processos inflamatórios, cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos (BARBOSA et al., 2010; BARREIROS, DAVID, 2006). O dano urotelial causado pelos radicais livres ocorre devido a redução da glutathiona endógena, ocasionando a formação desses radicais que desencadeia a peroxidação lipídica e diversos danos celulares (ALI et al., 2014).

Além disso, a CYP pode causar mielotoxicidade em humanos e camundongos, de forma que, um estudo demonstrou que camundongos de linhagem CBA, após 48 horas de aplicação de CYP intraperitoneal na dose de 250 mg/kg, teve o número de neutrófilos e linfócitos circulantes diminuídos, além de uma queda acentuada nos tipos celulares na medula óssea devido as alterações inflamatórias (EPSTEIN et al., 2009).

Essas alterações inflamatórias causadas pela CYP se devem a liberação de mediadores inflamatórios e hiperalgésicos como as quimiocinas, além da ativação de canais iônicos como o Receptor Transitório Tipo Vaniloide Potencial 1 (TRPV1) que atuam na manutenção da dor (WONG; GAVVA, 2009). Diferentes estudos demonstraram que o TRPV1 está presente nas células uroteliais de camundongos, ratos e humanos, sugerindo um papel de mecanossensibilidade visceral para esse receptor que funciona modulando as funções sensoriais da bexiga que afeta a frequência e a pressão da micção, contribuindo para hiperatividade e hiperalgesia mecânica, causada pela acroleína que se deposita na bexiga ocasionando a cistite (CHARRUA et al., 2009; FRIAS et al., 2012; KULLMANN et al., 2009; LEI; MALYKHINA, 2012).

Assim, a acroleína liberada pelas oxazafosforinas gera um processo inflamatório na bexiga que promove um aumento da permeabilidade vascular, extravasamento e formação de edema, levando a produção local de quimiocinas e a migração de leucócitos que desencadeia o processo da CH (FLOWER; PERRETTI, 2005).

O processo inflamatório gerado na bexiga contempla quatro fases: primeiro ocorre o dano urotelial pelo acúmulo da acroleína, depois ocorre a sinalização por meio de quimiocinas locais e a migração de macrófagos que promovem um aumento de citocinas inflamatórias (TNF α e da interleucina - 1 β pela via do Fator Nuclear kappa B – NF-kB), na terceira fase, há um aumento de espécies reativas de oxigênio e da expressão de enzimas inflamatórias Ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) que se combinam e levam a fase ulcerativa e por último, na quarta fase, ocorre a reparação tecidual a partir da sinalização dos fibroblastos e aumento dos fatores de crescimento, levando a CH (Figura 3) (RIBEIRO et al., 2012).

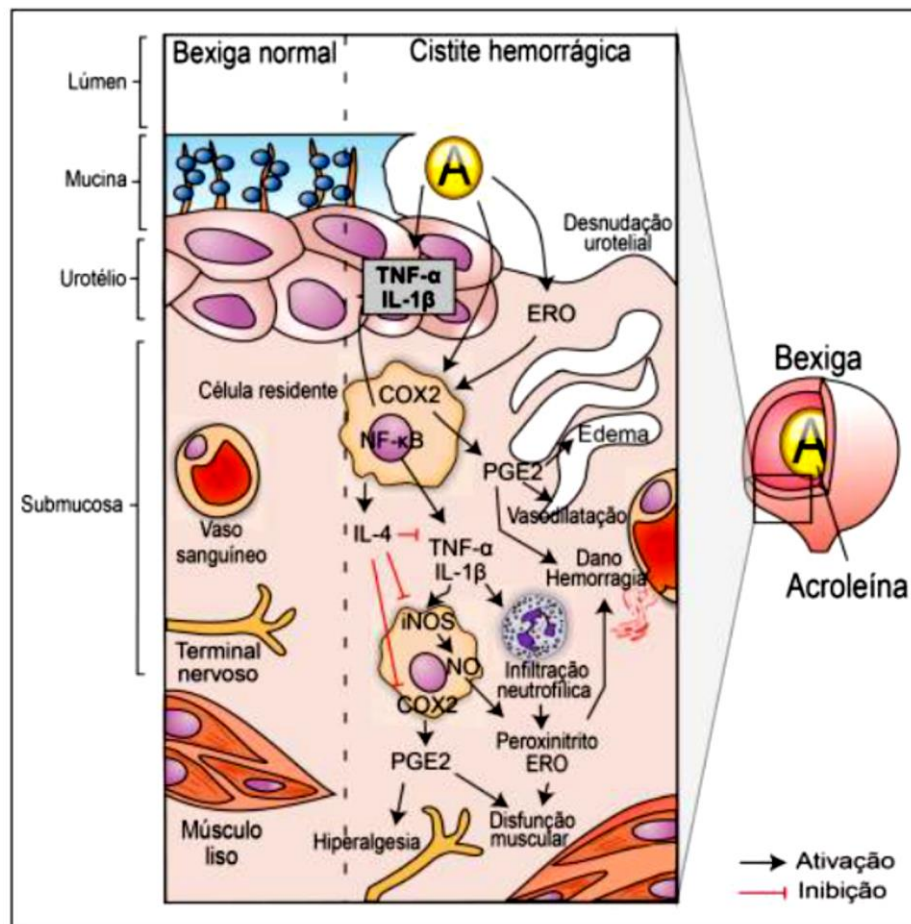


Figura 3 - Esquematização da patogênese da cistite hemorrágica induzida pelas oxazofosforinas. Fonte: Ferreira (2017, p.88).

Outra característica importante da CH causada pela CYP é a sensibilidade visceral que causa a percepção da dor em diferentes locais da lesão visceral real (CERVERO; LAIRD, 2004). Studeny et al. (2008) demonstrou que após 48 h de indução com CYP, os ratos apresentaram sensibilidade mecânica na pata traseira e no abdômen, o que indica que a CH está relacionada a uma doença periférica prolongada devido a liberação de citocinas, quimiocinas e os canais TRPV1 que faz com que haja um aumento da sensibilidade nos tecidos periféricos e não somente no local (FRIAS et al., 2012; LEI; MALYKHINA, 2012).

As alterações histológicas da CH (edema, hemorragia, erosão, ulceração e infiltração leucocitária) geralmente afetam mais a bexiga por ser mais suscetível a lesão pela acroleína devido sua função de reservatório que a leva a uma maior exposição ao metabólito tóxico (HU et al., 2003). Luetic et al. (2017) demonstraram que a CYP na dose de 150 mg/kg de peso do animal foi capaz de provocar CH em todos os animais da amostra, fora que, os ratos tiveram ganho de peso da bexiga úmida, necrose urotelial, edema vesical, erosão, hemorragia, inflamação, aumento dos níveis de NO e malondialdeído (MDA) e por fim, úlceras gástricas e

lesões no duodeno, além de serem observados lesões hepáticas no período tardio da administração da CYP.

Portanto, o modelo de cistite induzida por CYP vem sendo utilizado em ratos para verificação de tratamentos inflamatórios e nociceptivos (ARMS et al., 2010; SMALDONE et al., 2009). Estudos de Hu et al. (2003) e Velasco et al. (2001) relataram que a cistite induzida pela CYP resulta em inflamação local nos animais, associada a aumento da frequência urinária, redução do volume urinário, comportamentos caracterizados por fechamento, postura anormal e diminuição da taxa respiratória que podem ser controlados por analgésicos.

2.5 Tratamentos convencionais para cistite

Atualmente, os tratamentos para cistite infecciosa e inflamatória (cistite intersticial e hemorrágica) são baseados na prescrição de antibióticos e anti-inflamatórios para impedir a replicação dos uropatógenos e reduzir os sintomas envolvidos no desenvolvimento da doença, porém o número de recorrências ou ressurgimento da doença tem se elevado devido a resistência e a severidade aos medicamentos administrados, além do mais, o tratamento para CH ainda não possui 100% de eficácia e algumas medidas preventivas e profiláticas são empregadas apenas como uroprotetores (CAMPBELL-WALSH, 2011; MATZ; HSIEH, 2017; SIHRA et al., 2018).

O mesna e a hidratação intravenosa com diurese tem sido as medidas mais administradas para CH, porém é possível observar a doença em 10 a 40% dos pacientes tratados, sendo que, alguns pacientes podem desenvolver hipersensibilidade cutânea, dermatose grave e reações sistêmicas, além de demais efeitos colaterais como: náuseas, vômitos, cólica, diarreia, dor de cabeça, cansaço excessivo, dor nos membros e articulações, depressão, irritabilidade, falta de energia, hipotensão e aumento dos batimentos cardíacos, mostrando a importância do teste de novos compostos (LIMA et al., 2007; LIN; KEEFE, 2011; RIBEIRO et al., 2012; UYSAL et al., 2015).

Outros métodos igualmente empregados para CH e para a cistite induzida por ciclofosfamida incluem o uso oral de disulfiram, N-acetil-cisteína, anti-inflamatórios não esteroidais, corticoides, inibidores de NO sintase, oxigênio hiperbárico, hiper-hidratação e a irrigação vesical com as seguintes substâncias: solução salina, formalina, fenol, nitrato de prata, prostaglandina, sulfato de alumínio e potássio, além do mais, é importante a hidratação do paciente para manter o fluxo urinário (MORAES et al., 2013; PAYNE et al., 2013). A infusão intravesical de sulfato de potássio de alumínio e formalina atua como corrosivo

químico causando coagulação por precipitação e hidrólise de proteínas, respectivamente, e ainda, o oxigênio hiperbárico pode causar vasoconstrição e fibrose (HALDAR; BHOWMICK, 2014).

Alguns procedimentos mais agressivos podem ser utilizados como: a embolização da artéria hipogástrica, cistectomia com derivação urinária e ampliação vesical que somente são reservados para as hemorragias que não se recuperam com os outros tratamentos (CHOW et al. 2006). Muitos agentes uroprotetores tem sido testado para CH, como: resveratrol, anakinra, dissulfeto de dialila, pentoxifilina, dexametasona, glutatona e *Uncaria tomentosa*, na tentativa de diminuir os sintomas da doença, como coadjuvante do tratamento com mesna ou para eliminar as espécies reativas de oxigênio e inibir as citocinas pró-inflamatórias, porém nenhum destes tratamentos passaram do ensaio clínico por não ser completamente eficaz (MATZ; HSIEH, 2017). Desta maneira, tratamentos alternativos vêm sendo estudados para atuarem na prevenção dos distúrbios do trato urinário inferior.

2.5.1 Mesna

O mesna (2-mercaptoetano-sulfonato de sódio), é um composto tiol (Figura 4) utilizado na forma de comprimidos ou como solução injetável para prevenção de toxicidade das oxazafosforinas ao nível das vias urinárias, sendo atualmente, a medida profilática mais administrada para o tratamento ou prevenção da CH por ser capaz de inativar a acroleína liberada pela ciclofosfamida, promovendo uma desintoxicação dos metabólitos urotóxicos (LIMA et al., 2007).

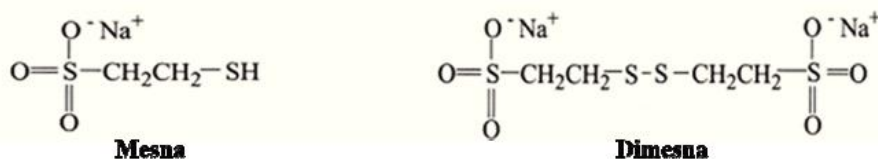


Figura 4 - Estrutura química do Mesna. Fonte: Matos (2013, p. 83).

O mesna quando entra na circulação é oxidada para Dimesna e 50% é filtrada pelo glomérulo e reduzida de volta a Mesna no epitélio tubular renal que é capaz de se combinar por ligação dupla com a acroleína ou outros metabólitos tóxicos provenientes das oxazafosforinas na bexiga e formar compostos estáveis e não tóxicos levando a excreção efetiva dos mesmos (Figura 5) (MARTINS et al., 2012; MATZ; HSIEH, 2017; SIU; MOORE, 1998). A incidência da CH diminuiu em 5% após o uso do mesna, sendo que, antes

os casos de CH em pacientes tratados com oxazafosforinas era de 68% com 4% de casos letais (LIMA et al., 2007).

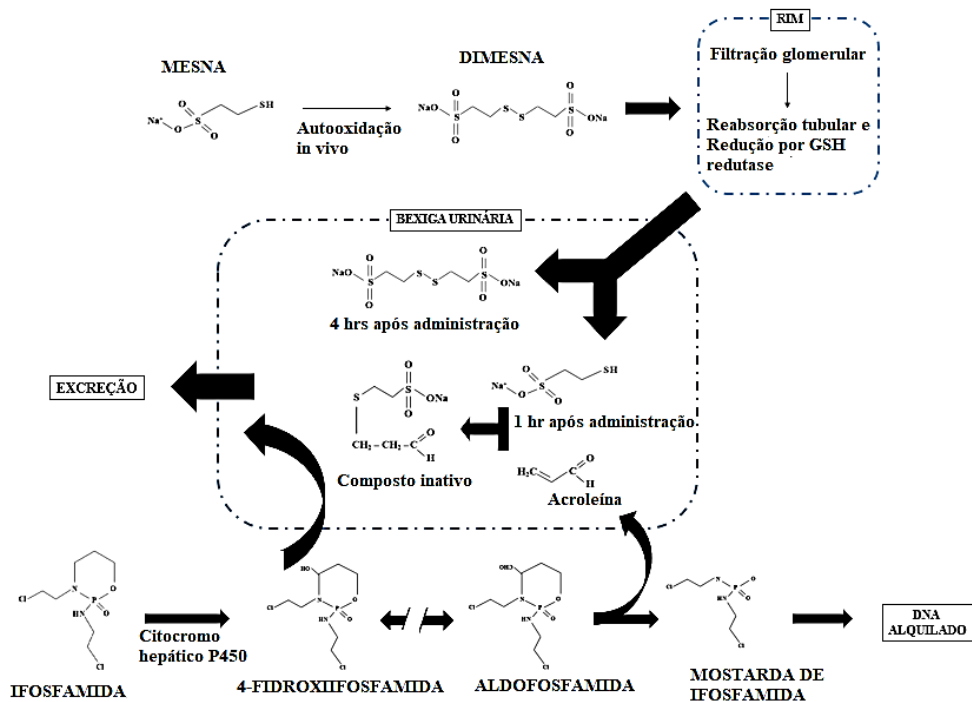


Figura 5 - Esquematização da atuação do Mesna na inativação da acroleína. Fonte: Adaptado de Siu; Moore (1998, p. 144-154).

A concentração considerada suficiente para neutralizar a acroleína, enquanto está sendo eliminada para eficácia do tratamento profilático, é de três doses de mesna, que devem ser 20% da dose da CYP ou IFO, sendo uma antes e outras duas após (4 e 8 horas) a administração por via intravenosa (SHAW; GRAHAM, 1987).

O Mesna também pode ser administrado por via oral, porém sua biodisponibilidade é menor tendo em consideração a intravenosa (50%), sendo necessária que a primeira dose seja de 20% por via intravenosa e as outras duas sejam 40% da dose da CYP ou IFO (2 e 6 horas após aplicação intravenosa) por via oral, de tal forma que, o mesna se ligará a acroleína tornando - a inativa ou com menor potencial urotóxico (SHAW; GRAHAM, 1987).

No entanto, o mesna é utilizado apenas como agente profilático por possuir uma estrutura polar que dificulta sua entrada nas células e alta solubilidade, que faz com que sua excreção renal seja mais rápida e a meia vida plasmática reduzida, além de que, não é eficaz em pacientes reumáticos e possui diversos efeitos colaterais, como: hipersensibilidade cutânea e sistêmica, náuseas, fadiga, cefaleia e diarreia (KHAW et al., 2007; THOMSON, 1998; YILMAZ et al., 2015). Posteriormente, Lima et al. (2007) descobriram que mesmo com as 3 doses de pré-tratamento com mesna, 66,7% dos pacientes ainda apresentavam alterações

histopatológicas na bexiga devido a ação da acroleína. Por isso, sua principal função é a prevenção da cistite, mas se ela já estiver estabelecida, a evolução da piora do quadro clínico ainda pode ocorrer (SANTOS-JÚNIOR et al., 2010).

Dessa maneira, mesmo como regime padrão de profilaxia, o Mesna possui limitações por sua rápida absorção e eliminação do organismo, além do desenvolvimento de danos colaterais, evidenciando a importância de pesquisas que investiguem novas substâncias potenciais na prevenção e/ou tratamento da CH induzida por oxazafosforinas.

2.6 Probióticos

Os probióticos são microrganismos vivos que em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro, sendo os principais do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* que se trata de bactérias gram-positivas, em forma de bastonetes ou cocobacilos, anaeróbios, ácido tolerantes e catalase negativo (FAO/WHO, 2001; HILL et al., 2014). Possuem atividade antimicrobiana, antioxidante, antidiarreica, anticancerígena, antilipidêmica e de intolerância à lactose por intermédio de mecanismos que estão ligados a manutenção do pH ácido, liberação de bacteriocinas, produção de peróxido de hidrogênio, prevenção da colonização de patógenos, degradação das toxinas e estímulo da imunidade do hospedeiro (AMDEKAR et al., 2010; BERNET et al., 1994; SINGH et al., 2008).

Essas bactérias são comensais e estão presentes naturalmente no nosso organismo, podendo ser encontradas no intestino, no leite materno, nas cáries dentárias, nas fezes e na vagina, até estão disponíveis comercialmente para consumo diário de 1-10 bilhões de unidades formadoras de colônia devido aos efeitos benéficos que trazem (FAO/WHO, 2001).

Segundo a World Gastroenterology Organisation (WGO) (2017), os probióticos podem afetar o ecossistema intestinal através da estimulação imunológica da mucosa, interagindo com microrganismos comensais ou patogênicos, gerando produtos metabólicos como ácidos graxos e se comunicando com as células do hospedeiro, criando mecanismos que melhoram o ambiente intestinal e a regulação negativa da inflamação que leva a resposta imune de fortalecimento intestinal e acaba por aumentar a barreira contra os potenciais patógenos. Por isso, os probióticos estão sendo tão utilizados como medidas profiláticas contra as mais variadas doenças.

2.6.1 Lactobacilos

As cepas de Lactobacilos compõem a microbiota normal do hospedeiro e são bactérias gram-positivas, não esporulantes, catalase-negativos e anaeróbicas facultativas (KAEWNOPPARAT S.; KAEWNOPPARAT N., 2009). Os lactobacilos frequentemente citados na literatura pertencem as bactérias do ácido láctico (BAL) que predominam no sistema digestivo, urinário e genital, sendo eles: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus lacti* (GOLDIN; GORBACH, 2008). São caracterizadas pela formação de ácido láctico como o metabólito primário do metabolismo do açúcar, promovendo um equilíbrio do pH local e interferindo na colonização por patógenos, além de, ter sido usado com sucesso no controle de diarreia, alergias alimentares e na doença inflamatória intestinal (ZHONG, ZHANG, COVASA, 2014). Ocorrem também em laticínios, carnes, plantas e produtos fermentados de valor comercial, pois seu crescimento provoca a acidificação do material alimentar, preservando o produto (CARR et al., 2002).

No que diz respeito aos seus benefícios, estes podem ser principalmente: imunológicos e não imunológicos, podendo atuar de forma conjunta dependendo da patologia do hospedeiro (Tabela 1):

Tabela 1 - Benefícios da intervenção farmacológica ou nutricional da utilização dos probióticos.

PROBIÓTICOS	
Benefícios imunológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Ativar os macrófagos locais para aumentar a apresentação dos antígenos para os linfócitos B e aumentar a produção de imunoglobulina A secretória (IgA) tanto local quanto sistematicamente. • Modular os perfis das citocinas. • Induzir tolerância aos antígenos alimentares.
Benefícios não imunológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Digerir alimentos e competir com os patógenos pelos nutrientes. • Alterar o pH local para criar um ambiente local desfavorável para os patógenos. • Produzir bacteriocinas para inibir os patógenos. • Fagocitar os radicais superóxidos. • Estimular a produção epitelial de mucina. • Aumentar a função da barreira intestinal. • Competir pela adesão com os patógenos. • Alterar as toxinas de origem patogênica.

Fonte: WGO (2017).

Segundo o Regulamento Técnico de 2005 da ANVISA, é importante que seja seguido a dose indicada para aplicabilidade das espécies, sendo assim, as cepas devem estar em uma

quantidade mínima viável de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para consumo, considerando a capacidade de sobrevivência das bactérias (Tabela 2) (STEFE; ALVES; RIBEIRO, 2008).

Tabela 2 - Aplicabilidade e doses recomendadas para utilização dos probióticos.

Cepa	Situação Clínica	Dose
<i>Lactobacillus casei</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Prevenção da diarreia associada a antibióticos em adultos - Prevenção de diarreia por <i>C. difficile</i> em adultos - Terapia adjuvante para erradicação de <i>H. pylori</i> - Complementa o crescimento do <i>Lactobacillus acidophilus</i> - Auxilia na digestão e redução à intolerância à lactose e constipação 	10^{10} ufc – 2 x dia
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Prevenção da enterocolite necrosante em lactente pré-maturo - Prevenção de diarreia por <i>C. difficile</i> em adultos - Prevenção da diarreia associada a antibióticos em adultos - Tratamento da diarreia aguda infecciosa em crianças - Produz enzima lactase - Aumenta a imunidade 	10^9 - 10^{10} ufc – 1 a 3x/dia
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Tratamento da diarreia aguda infecciosa em crianças - Prevenção da diarreia associada a antibióticos em crianças - Prevenção da diarreia associada a antibióticos em adultos - Prevenção da diarreia nosocomial em crianças - Terapia adjuvante para erradicação de <i>H. pylori</i> - Alivia alguns sintomas da síndrome do intestino irritável 	10^{10} - 10^{11} ufc - 2 x/dia
<i>Bifidobacterium lactis</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Prevenção da enterocolite necrosante em lactente pré-maturo - Prevenção de diarreia por <i>C. difficile</i> em adultos - Prevenção e manutenção da remissão na pouchit 	10^{10} ufc - 2xdia

Fonte: Adaptado de OMGE (2011).

Na edição de 2021, a Aliança Global para Probióticos publicou um Guia clínico para suplementos probióticos disponíveis no Canadá que contempla as aplicações probióticas na saúde dos adultos, disponibilizando as doses e orientando sobre o uso das espécies (SKOKOVIC-SUNJIC, 2021).

Com relação as doenças do trato urinário, atualmente os Lactobacilos estão sendo utilizados amplamente no tratamento da infecção do trato urinário devido a suas atividades que levam a uma exclusão competitiva, consistida principalmente por 6 mecanismos: 1) Na inibição competitiva pelos sítios de ligação das células, 2) Na co-agregação em torno de uropatógenos, impedindo com que eles se liguem aos receptores celulares, 3) Impedindo o desenvolvimento bacteriano pela produção de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácido láctico que deixa o ambiente desfavorável, 4) Na diminuição do pH do meio, deixando mais ácido pela produção do ácido láctico, 5) Como barreira para formação de biofilme bacteriano que pode ser pela co-agregação em torno do uropatógeno ou por ocupar os sítios de ligação das células e 6) Pela regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e TNF - α , regulando a expressão exagerada dessas citocinas e inibindo a ativação de mastócitos (Figura 6) (SIHRA et al., 2018).

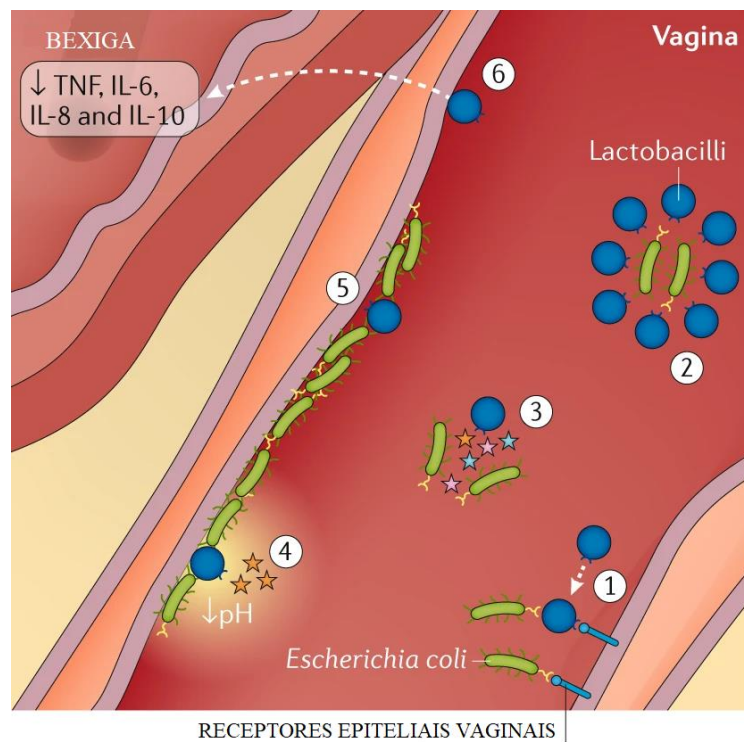


Figura 6 - Mecanismos de ação dos lactobacilos na prevenção de infecções do trato urinário. Fonte: Adaptado de SIHRA et al. (2018, p. 750-776).

Portanto, pesquisas estão investigando a estabilização da microbiota intestinal por *Lactobacillus acidophilus*, em doenças inflamatórias, devido a relação entre as moléculas e toxinas inflamatórias do intestino para o sangue que podem desencadear um estado inflamatório sistêmico no trato urinário (HE; XIE, 2020).

2.6.1.1 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus é uma espécie homofermentativa obrigatória do grupo BAL que produz ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos e está entre os lactobacilos menos tolerantes ao oxigênio (ALTERMANN et al., 2005). As cepas dessa espécie possuem forma de bastão, são Gram-positivas e crescem de forma otimizada de 37 a 42 ° C, além de que, atinge suas taxas de multiplicação mais altas em meio ligeiramente ácido de pH 5,5-6,0, sobrevivendo em ambientes hostis e ecossistemas gastrointestinais complexos (GANJI-ARJENAKI; MCFARLAND; EVANS; GOLDSTEIN, 2018; RAFIEIAN-KOPAEI, 2018;). Possui propriedades antimutagênicas, redutoras de colesterol e antagonismo contra bactérias patogênicas intestinais e alimentares (SAXELIN; TYNKKYNNEN; MATTILA-SANDHOLM, 2005).

Além disso, trabalhos evidenciaram que as bactérias do grupo BAL, podem ter aplicações terapêuticas em doenças inflamatórias por modular a imunidade inata e adaptativa dos hospedeiros (BEDAIWI; INMAN, 2014; VITETTA et al., 2013). Estudos de Alipour et al. (2014) e Vaghef-mehrabany et al. (2014) demonstraram que cepas de *Lactobacillus casei* na dose de 10⁸ UFC, foram capazes de promover significativa melhora da artrite reumatoide em pacientes do sexo feminino, pois eles levam a redução da proteína C reativa que estão relacionadas com maior sensibilidade da doença e atuou diminuindo as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-12 e no aumento da IL-10 que resultou na melhora dos sintomas da doença. Também observados em estudos de colite crônica e relacionados ainda com a diminuição da COX-2 (ASSIS, 2015; PEÑA; VERSALOVIC, 2003).

Peran et al. (2007) observaram que três probióticos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*) apresentaram atividade anti-inflamatória em ratos com colite induzida por ácido 2,4,6- trinitrobenzonosulfônico (TNBS). As bactérias do grupo ácido láctico podem regular a resposta inflamatória ao estimular as células a produzir citocinas, também podem ativar macrófagos, células natural killer e linfócitos T do hospedeiro para regular o sistema imunológico (KORETZ, 2018). As respostas imunológicas induzidas pelas espécies deste grupo ocorrem por duas vias principais: de inflamação e como resposta imune anticâncer. A resposta imune contra a inflamação envolve a ação do ácido lipoteicoico encontrado na parede bacteriana que pode estimular as células T a liberar interleucina (IL) - 10, IL-12 e aumentar os efetores Foxp3 + ROR γ t -Tregs. A resposta imune contra o câncer está relacionada com a estimulação de células T, células dendríticas, natural killer e células do complexo principal de histocompatibilidade classe II, para induzir IL-10, TNF- α , interferon

(IFN) γ e IL-1 β a inibir o crescimento do tumor (Figura 7) (ZHONG; ZHANG; COVASA, 2014).

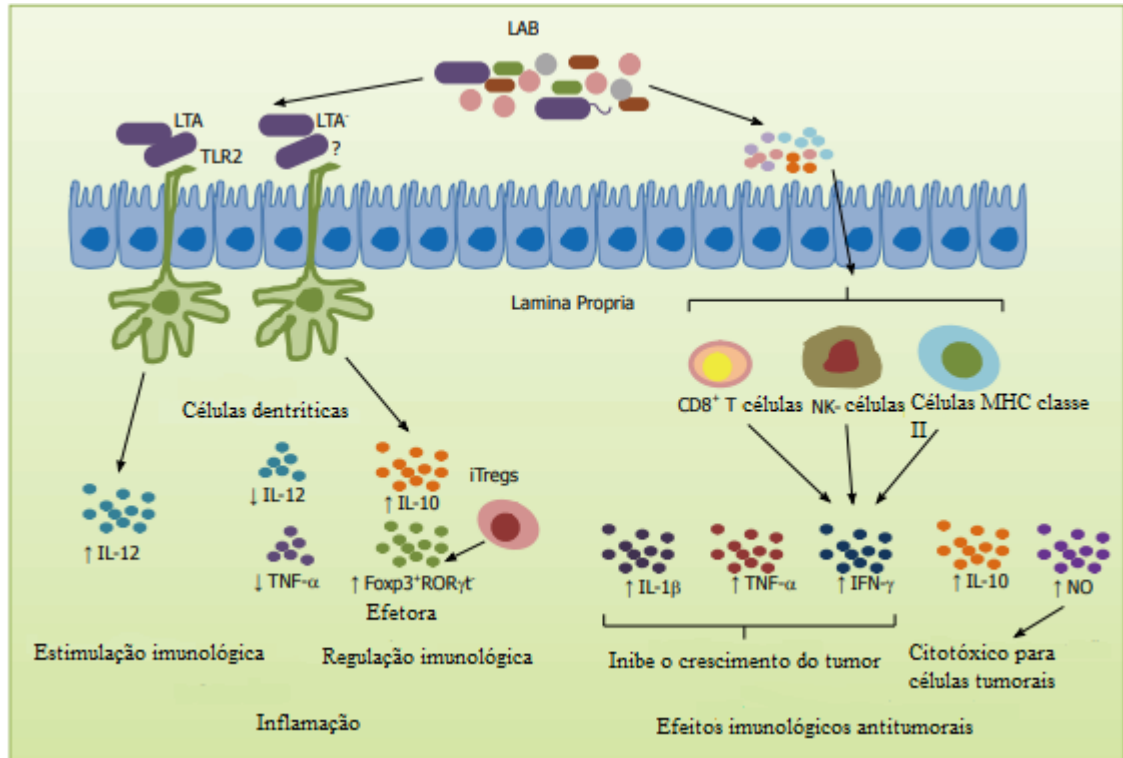


Figura 7. Respostas imunológicas induzidas por bactérias do ácido láctico. Fonte: Adaptado de ZHONG; ZHANG; COVASA (2014, p.7878-7886).

As cepas de *L. acidophilus* tem ação no trato gastrointestinal, em doenças do trato respiratória e da pele, além de doenças crônicas. Alguns desses efeitos funcionais estão relacionados a frações celulares de exopolissacarídeos que apresentam propriedades imunomoduladoras, anti-hipertensivas, antitumorais e antioxidantes (GHANY et al., 2015). As atividades antioxidantes de bactérias do ácido láctico estão relacionadas a eliminação de espécies reativas de oxigênio pela inibição enzimática ou neutralização de radicais livres, reduzindo a oxidação de ascorbato no intestino (AMARETTI et al., 2013).

Essa atividade antioxidante dos lactobacilos pode ser importante contra a ação inflamatória da acroleína, pois esta, induz a produção de espécies reativas de oxigênio e de NO, induzindo fatores de transcrição, incluindo NF- κ B e proteína ativadora 1, que estimulam a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e interleucina-1beta [IL-1 β]) (KELLER, 2019). O estresse oxidativo também é comum em doenças inflamatórias intestinais e em alguns tipos de cânceres relacionados a liberação de radicais livres (GOUVEIA; LIMA, 2017).

Segundo Visser et al. (2006), a inflamação intestinal é paralela ao desenvolvimento de câncer colorretal, e alguns probióticos tem um papel importante no processo inflamatório aumentando a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Estudos de Mohamadzadeh et al. (2005) e Mayer et al. (2009) demonstraram que *L. acidophilus* estimulou células inatas para atuar nos processos inflamatórios, através da regulação de citocinas pela interação de proteínas da camada superficial com outros componentes da superfície celular, como ácido lipoteicóico, que pode estimular células dendríticas por meio do receptor Toll-like (TLR), resultando na liberação de citocinas.

Hu et al. (2020) observaram que *L. acidophilus* XY27 atuou na prevenção da colite induzida por DSS aumentando a capacidade antioxidante e regulando a expressão de genes relacionados à inflamação e a secreção de fatores inflamatórios. Lee et al. (2018) relataram que essa espécie de lactobacilos pode atuar no alívio da dor associada à osteoartrite e retardar a progressão da doença, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Deste modo, essas alterações dos componentes da superfície celular de *L. acidophilus* fornecem uma estratégia potencial para o tratamento de doenças inflamatórias e terapia do câncer.

Sendo assim, acredita-se que a aplicabilidade de *L. acidophilus* no tratamento da cistite de origem infecciosa ou inflamatória (Cistite intersticial e Cistite Hemorrágica) possa ser eficaz, devido a expressão de enzimas antioxidantes que podem degradar as espécies reativas de oxigênio diminuindo a irritação na mucosa da bexiga e interferindo no processo inflamatório (CARMEN et al., 2011). Desta forma, a utilização de *L. acidophilus* pode ser uma estratégia terapêutica de fácil acessibilidade e baixo custo, pois seus benefícios estão sendo amplamente estudados (Tabela 3).

Estudos de SEVENCAN et al. (2019) e GUARNER et al. (2017) demonstraram que probióticos como as espécies de lactobacilos podem atuar fortalecendo a mucosa vesical e desempenhando importantes efeitos imunológicos, como: a redução da ativação do fator NF- κ B, a maturação das células dendríticas, o aumento da atividade das células natural killer (NK) e a estimulação da síntese de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, suprimindo as citocinas inflamatórias e bloqueando o processo inflamatório local. Portanto, mais pesquisas são necessárias para avaliação da sua eficácia perante o quadro de CH induzida por ciclofosfamida.

Tabela 3 - Estudos das atuais aplicações dos probióticos em diversas doenças.

REFERÊNCIAS	TIPO DE ESTUDO	APLICABILIDADE	CEPA PROBIÓTICA	TRATAMENTO	RESULTADO
MUSA et al., 2017	Camundongos ICR	Neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo.	<i>Lactobacillus plantarum</i> (LAB1, LAB11, LAB12), <i>L. fermentum</i> (LAB9, LAB10), <i>L. casei</i> (LABPC).	28 dias/ via oral/ suspensão	Regulação positiva de antioxidantes e regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias no sangue.
YOON; KIM; YOON, 2018	Camundongos C57BL fêmeas	Cistite induzida por lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i> .	<i>L. curvatus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. brevis</i> .	14 dias/ via oral liofilizados	Redução da inflamação e de TNF- α no tecido da bexiga.
KORADIA et al., 2019	Mulheres	Cistite bacteriana.	<i>L. acidophilus</i> PXN 35 e <i>L. plantarum</i> PXN 47.	26 semanas/via oral/capsula	Redução da recorrência da ITU.
KUZMENKO; KUZMENKO; GYAURGIEV, 2019	Mulheres	Vaginite e cistite bacteriana.	<i>Lactobacillus casei var rhamnosus Döderlein</i> (Lcr35®) em combinação com antibiótico.	3 meses/ liofilizados/ via oral	Normalização do pH, da microbiota vaginal, redução dos sintomas, bacteriúria e leucocitúria.
RATHER et al., 2020	Camundongos ICR	Colite induzida por TNBS.	<i>L. sakei</i> Probio65.	7 dias/ via oral/ liofilizados	Redução das citocinas pró-inflamatórias no tecido do cólon.
LEE et al., 2020	Ratos F344	Carcinogênese de cólon.	<i>L. acidophilus</i> .	10 semanas/ Via oral/ alimentação	Redução de lesões pré-cancerosas do cólon e inibição da proliferação e inflamação celular.
PRASETYO et al., 2020	Ratos Sprague-Dawley	Pielonefrite.	<i>L. plantarum</i> IS-10506.	14 dias/ via oral/ micro encapsulado	Regulação da produção de IL-10 melhorando a lesão renal e ativação das células tronco tubulares renais.
LONGXIAN et al., 2021	Ratos Sprague-Dawley	Imunossupressão induzida por ciclofosfamida.	<i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus cereus</i> .	15 dias/ sonda gástrica/ suspensão	Alívio da inflamação sistêmica, disbiose metabólica e restauração da microbiota intestinal.
KIM et al., 2021	Camundongos C57BL	Colite induzida por DSS.	<i>L. acidophilus</i> (KBL402 e KBL409).	8 dias/ via oral/ suspensão	Regulação negativa de citocinas do Th1, 2- e 17, aumento de IL-10 no cólon e regulação imunológica.
MONTEROS et al., 2021	Camundongos BALB / C	Inflamação intestinal induzida por indometacina.	<i>L. casei</i> CRL 431.	7 dias/ via oral/ suplemento alimentar	Redução de TNF- α nos fluidos intestinais, aumento de IL-10 e redução de EROs no tecido intestinal.

3 OBJETIVOS

GERAL

Este estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos da utilização de *Lactobacillus acidophilus* NCFM no tratamento de cistite induzida por ciclofosfamida em ratas Wistar.

ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal de ciclofosfamida no desenvolvimento de cistite inflamatória ou hemorrágica em ratas Wistar;

Avaliar os efeitos do tratamento oral com *L. acidophilus* no peso da bexiga e no peso dos animais com cistite;

Avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas decorrentes da utilização de *L. acidophilus* em ratas com cistite;

Avaliar as lesões histopatológicas causadas pela indução da ciclofosfamida e compará-las aos animais tratados;

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, P.; CARDOZO, L.; FALL, M.; GRIFFITHS, D.; ROSIER, P.; ULMSTEN, U.; VAN KERREBROECK, P.; VICTOR, A.; WEIN, A. The standardization of terminology of lower urinary tract function. **Neurourol. Urodyn.**, v.21, p. 167-178, 2002.

ALI, S.A.; DANDA, S.K.; BASHA, S.A.A.B; RASHEED, A.; AHMED, O.; AHMED, M.M. Comparision of uroprotective activity of reduced glutathione with Mesna in Ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in rats. **Indian J. Pharmacol.**, v. 46, p. 105–108, 2014.

ALIPOUR, B.; HOMAYOUNI-RAD, A.; VAGHEF-MEHRABANY, E.; SHARIF, S.K.; VAGHEF-MEHRABANY, L.; ASGHARI-JAFARABADI, M.; NAKHJAVANI, M.R.; MOHTADI-NIA, J. Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial. **Int. J. Rheum. Dis.**, v.17, p.519-527, 2014.

ALTERMANN, E.; RUSSELL, W.M.; AZCARATE-PERIL, M.A. et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **P. Natl. Acad. Sci.**, v.102, p.3906–3912, 2005.

AMARETTI, A.; DI NUNZIO, M.; POMPEI, A.; RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; BORDONI, A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, p.809-817, 2013.

AMDEKAR, S.; DWIVEDI, D.; ROY, P.; KUSHWAH, S.; SINGH, V. Probiotics: multifarious oral vaccine against infectious traumas FEMS **Immunol. Med. Microbiol.**, v.58, p. 1–8, 2010.

ARMS, L.; GIRARD, B.M.; VIZZARD, M.A. Expression and function of CXCL12/CXCR4 in rat urinary bladder with cyclophosphamide induced cystitis. **Am J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 298, p. 589–600, 2010.

ASSIS, P. O. A. EFEITO DE PRODUTOS LÁCTEOS CAPRINOS SOBRE A DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL EM MODELO ANIMAL. 111f. **Dissertação (mestrado)** – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2015.

BARBIE, D.A.; FRANK, D.A. Farmacologia do câncer: síntese, estabilidade, e manutenção do genoma. IN: GOLAN, David E. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2. ed. Editora: **Guanabara Koogan**, 2009.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BAUMANN. F.; PREISS, R. Cyclophosphamide, and related anticancer drugs. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.**, v.764, p.173–192, 2001.

BEDAIWI, M.K.; INMAN, R.D. Microbiome, and probiotics: link to arthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 26, p.410-415, 2014.

BERNET, M.F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 liga-se a linhas intestinais humanas e inibe a ligação celular e a invasão celular por bactérias êntero virulentas. **Gut.**, v.35, p. 483–489, 1994.

BJORLING, D. E; WANG, Z.Y. Estrogen and neuroinflammation. **Urology.**, v.57, p. 40-46, 2001.

BROOK, N.; WITTERT, G. Lower Urinary Tract Symptoms. **Health Male Andrology Australia**, 2018. Disponível em: https://www.healthymale.org.au/files/resources/lower_urinary_tract_symptoms_fact_sheet_healthy_male_2019.pdf. Acessado em: 16/03/2021.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B.C. As bases farmacológicas da terapêutica. Goodman e Gilman. 9º edição, **McGraw Hill**, Nova Iorque, 1996.

CAMPBELL-WALSH, W. **Urology**. Editora: Elsevier, 10ª edição, v.4, 2011.

CAPRONI, P. Cistite (intersticial, aguda): o que é, sintomas e tratamento. **Redação Minuto Saudável**, 2021. Disponível em: <https://minutosaudavel.com.br/cistite/>. Acessado em: 05/06/2021.

CARMEN, S.; LEBLANC, A.M.; MIYOSHI, A.; ROCHA, C.S.; AZEVEDO, V.; LEBLANC, J.G. Potential application of probiotics in the prevention and treatment of inflammatory bowel diseases. **Ulcers.**, v. 2011, Article ID 841651, 2011.

CARR, F.J. A bactéria do ácido láctico: um levantamento da literatura. **Crit. Ver. Microbiol.**, v.28, p.281-370, 2002.

CERVERO, F.; LAIRD, J.M. Understanding the signaling and transmission of visceral nociceptive events. **J. Neurobiol**, v.61, p. 45–54, 2004.

CHABNER, B.A.; RYAND, D.P.; PAX-ARES, L.; GARCIS- CARBONERO, A.; CALARESI, P. Antineoplastic Agents. In: Brunton LL, Chabner B, Knollman BC. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Goodman and Gilman's, 10th editora: McGraw Hill, NewYork, p. 1389-1459, 2001.

CHAMBÔ, R. C. **Cistite Aguda**. Guia Rápido de Urologia (GRU) - Capítulo 4, 2014. Disponível em: http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1389957374capitulo4_cistite_aguda.pdf, Acessado em: 13/04/2020.

CHARRUA, A.; REGUENGA, C.; CORDEIRO, J.M.; CORREIADE-SÁ, P.; PAULE, C.; NAGY, I; CRUZ, F.; AVELINO, A. Functional transient receptor potential vanilloid one is expressed in human urothelial cells. **J. Urol.**, v. 182, p. 2944–2950, 2009.

CHOW, Y.; YANG, S.; HUANG, C.; TZEN, C.; HUANG, P.; SU, Y.; PAULUS S. WANG, P.S. Epinephrine promotes hemostasis in rats with cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Urology**, v. 67, p. 636–641, 2006.

CHU, E.; SARTORELLI, A.C. Quimioterapia do câncer. In: KATSUNG, B.G.; MASTER, S.B.; TREVOR, A.J. **Farmacologia básica e clínica**. 12 ed. Porto Alegre, v.1, p.1200, 2014.

DORNELLES, F.N.; ANDRADE, E.L.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Role of CXCR2 and TRPV1 in functional, inflammatory, and behavioral changes in the rat model of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 171, p. 452–467, 2014.

EL-ZIMAITY, M.; SALIBA, R.; CHAN, K.; SHAHJAHAN, M.; CARRASCO, A.; KHORSHID, O., CALDERA, H.; COURIEL, D.; GIRALT, S.; KHOURI, I.; IPPOLIT, C.; CHAMPLIN, R.; LIMA, M. Hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: donor type matters. **Blood.**, v.103, p. 4674-4680, 2000.

EPSTEIN, O.I.; DYGAJ, A.M.; SERGEEVA, S.A.; ZHDANOV, V.V.; KHRICHKOVA, T.Y.; STAVROVA, L.A.; ZYUZ'KOV, G.N. Experimental study of ultralow-dose antibodies to cyclophosphamide-on-cyclophosphamide myelotoxicity. **Bull. Exp. Biol. med.**, v. 147, p.323-327, 2009.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. **Fao food and nutrition paper**, v.85, p.6-13, 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>. Acessado em: 16/03/2021.

FERREIRA, F. C. S. Propriedades uroprotetoras dos compostos [6] -, [8] - e [10] -gingerol isolados do *Zingiber officinale* na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos. 88 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, 2017.

FDA. Food and Drug Administration. Cyclophosphamide for injection. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/012141s090,012142s112lbl.pdf. Acesso em: 12 de setembro de 2017.

FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance? **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 671-674, 2005.

FRIAS, B.; CHARRUA, A.; AVELINO, A.; MICHEL, M.C.; CRUZ, F.; CRUZ, C.D. Transient receptor potential vanilloid 1 mediates nerve growth factor-induced bladder hyperactivity and noxious input. **BJU Int.**, v. 110, p. 422–428, 2012.

GANJI-ARJENAKI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta-analysis and systematic review. **J. Cell Physiol.**, v. 233, p. 2091–2103, 2018.

GARTNER, L. **Tratado de Histologia**. Editora: Elsevier, 4ª Ed., p. 660, 2017.

GAVIN, P. J.; KATZ, B.Z. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. **Pediatrics.**, v. 110, p.9, 2002.

GHANY, K.; HAMOUDA, R.; ELHAFEZ, E.A.; MAHROUS, H.; SALEMBEKHIT, M. A potential role of *Lactobacillus acidophilus* LA1 and its exopolysaccharides on cancer cells in male albino mice. **Biotechnol Biotechnol Equipment.**, v. 29, p. 977-983, 2015.

GILMAN, A. The initial clinical trial of the nitrogen mustard. **Am. J. of Surg.**, v. 105, p.574-578, 1963.

GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L. Clinical indications for probiotics: an overview. **Clin. Infect. Dis.**, v.46, p.96–100, 2008.

GOODMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

GOUVEIA, S. S.; LIMA, A. A. Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica. **Braz. J. Surg. Clin. Res.**, v. 20, p. 174-179, 2017.

GUARNER, F.; SANDERS, M.E.; ELIAKIM, R.; FEDORAK, R.; GANGL, A.; GARISCH, J. (2017). Probiotics and Prebiotics. **World Gastroenterology Organisation Global Guidelines**, p.1-36, 2017. Disponível em: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics>. Acessado em: 03/04/2021.

GUPTA, K.; HOOTON, T.M.; ROBERTS, P.L.; STAMM, W.E. Patient-initiated treatment of uncomplicated recurrent urinary tract infections in young women. **Ann. Intern. Med.**, v.135, p. 9-16, 2000.

HADJIBABAIE, M.; ALIMOGHADDAM, K.; SHAMSHIRI, A.R.; IRAVANI, M.; BAHAR, B.; MOUSAVI, A.; JAHANI, M.; KHODABANDEH, A.; ANVARI, Y.; GHOLAMI, K.; GHAVAMZADEH, A. Continuous bladder irrigation prevents hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Urol. Oncol.**, v. 26, p.43-46, 2008.

HALDAR, S.; DRU, C.; BHOWMICK, N.A. Mechanisms of hemorrhagic cystitis. **Am. J. Clin. Exp. Urol.**, v. 2, p.199–208, 2014.

HE, H.; XIE Y. Effect of Different Hemodialysis Methods on Microbiota in Uremic Patients. **Biomed Res Int.**, v. 2020, Article ID: 6739762, 2020.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G. et al. Declaração de consenso da Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos sobre o escopo e o uso apropriado do termo probiótico. **Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol.**, v. 11, p.506–514, 2014.

HU, V.Y.; MALLEY, S.; DATTILIO, A.; FOLSOM, J.B.; ZVARA, P.; VIZZARD, M.A. COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 284, p. 574–585, 2003.

HU, T.; WANG, H.; XIANG, C.; MU, J.; ZHAO, X. Preventive Effect of *Lactobacillus acidophilus* XY27 on DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice. **Drug Des Devel Ther.**, v.14, p. 5645-5657, 2020.

IRWIN, D.E.; KOOP, Z.S.; AGATEP, B.; MILSOM, I.; ABRAMS, P. Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence, and bladder outlet obstruction. **BJU Int.**, v.108, p. 1132-1138, 2011.

JEREMY, J.Y.; TSANG, V.; MIKHAILIDIS, D.P.; ROGERS, H.; MORGAN, R.J.; DANDONA, P. Eicosanoid Synthesis by Human Urinary Bladder Mucosa: Pathological Implications. **Br. J. Urol., January**, v. 59, p. 36-39, 1987.

KAEWNOPPARAT, S.; KAEWNOPPARAT, N. Formulation and evaluation of vaginal suppositories containing *Lactobacillus*. **World Acad. Sci. Eng. Technol.**, v. 55, p. 640-643, 2009.

KARAM, M. R. A.; HABIBI, M.; BOUZARI, S. Infecção do trato urinário: patogenicidade, resistência a antibióticos e desenvolvimento de vacinas eficazes contra *Escherichia coli* uropatogênica. **Rev. Immunol. Mol.**, v. 108, p. 56-67, 2019.

KELLER, U. Nutritional Laboratory Markers in Malnutrition. **J. Clin. Med.**, v. 8, p. 775, 2019.

KIM, W. K.; HAN, D. H.; JANG, Y. J.; PARK, S. J.; JANG, S. J.; LEE, G.; HAN, H. S.; KO, G. P. Alleviation of DSS-induced colitis via *Lactobacillus acidophilus* treatment in mice. **Food Funct.**, v.12, p. 340-350, 2021.

KHAW, S.; DOWNIE, P.; WATERS, K.; ASHLEY, D. H. J. Adverse hypersensitivity reactions to mesna as adjunctive therapy for cyclophosphamide. **Pediatr. Blood Cancer**, v.49, p. 341-343, 2007.

KLIPPEL, J.H. Cyclophosphamide: Ovarian and other toxicities. **Lupus**, v.4, p. 1-2, 1995.

KORADIA, P.; KAPADIA, S.; TRIVEDI, Y.; CHANCHU, G.; HARPER, A. Probiotic, and cranberry supplementation for preventing recurrent uncomplicated urinary tract infections in premenopausal women: a controlled pilot study. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v.17, p. 733-740, 2019.

KORETZ, R.L. Probiotics in Gastroenterology: how Pro Is the Evidence in Adults? **Am. J. Gastroenterol.**, v.113, p.1125-1136, 2018.

KULLMANN, F.A.; SHAH, M.A.; BIRDER, L.A.; DE GROAT, W.C. Functional TRP and ASIC-like channels in cultured urothelial cells from the rat. **Am J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 296, p. 892-901, 2009.

KUZMENKO, A.V.; KUZMENKO, V.V.; GYAURGIEV, T.A. [Experience of application of hormonal and probiotic therapy in the complex treatment of women in peri- and

postmenopausal with chronic recurrent bacterial cystitis in the background of vulvovaginal atrophy]. **Urology.**, v. 3, p.66-71, 2019.

LEE, C. W.; CHEN, H. J.; CHIEN, Y. H.; HSIA, S. M.; CHEN, J. H.; SHIH, C. K. Symbiotic Combination of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and *Lactobacillus acidophilus* Inhibits Colon Carcinogenesis in Rats. **Nutrients.**, v. 12, p. 103, 2020.

LEE, S. H.; KWON, J. Y.; JHUN, J. Y.; JUNG, K. A.; PARK, S. H.; YANG, C. W.; CHO, Y. S.; KIM, S. J.; CHO, M. L. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates pain and cartilage degradation in experimental osteoarthritis. **Immunol. Lett.**, v. 203, p. 6-14, 2018.

LEI, Q.; MALYKHINA, A.P. Colonic inflammation up-regulates voltage-gated sodium channels in bladder sensory neurons via activation of peripheral transient potential vanilloid 1 receptor. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 24, p. 575–585, 2012.

LEITE, C.V.G.; ALENCAR, V.T.L.; MELO, D.R.; MOTA, J.M.S.C.; MELO, P.H.; MOURÃO, L.T.C.; WONG, D. V. T.; MAGALHÃES, P. J. C.; SANTOS, A.A.; BRITO, G. A. C.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Target Inhibition of IL-1 Receptor Prevents Ifosfamide Induced Hemorrhagic Cystitis in Mice. **J. Urol.**, v. 194, p. 1777-1786, 2015.

LIMA, M. V. A.; FERREIRA, F.V.; MACEDO, F.Y.B.; BRITO, G.A.C.; 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.

LIN, C.Y.; KEEFE, M. Mesna-induced photodistributed dermatoses. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.37, p.358-60, 2011.

LONGXIAN, L.; DEGUANG, M.; YILING, D.; YAN, R.; JIANG, H. Mechanism of the Immunomodulatory Effect of the Combination of Live *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, and *Bacillus* on Immunocompromised Rats. **Front. Immunol.**, v.15, p. 2342, 2021.

LUETIC, K.; SUCIC, M.; VLAINIC, J.; HALLE, Z.B.; STRINIC, D.; VIDOVIC, T.; LUETIC, F.; MARUSIC, M.; GULIC, S.; PAVELIC, T.T.; KOKOT, A.; SEIWERTH, R.S.; DRMIC, D.; BATELJA, L.; SEIWERTH, S.; SIKIRIC, P. Cyclophosphamide induced stomach and duodenal lesions as a No system disturbance in rats: l-NAME, l-arginine, stable gastric pentadecapeptide BPC 157. **Inflammopharmacology**, v. 25, p.255–264, 2017.

MANIKANDAN, R.; KUMAR, S.; DORAIRAJAN, L.N. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. **Indian J. Urol**, v.26, p.159-166, 2010.

MARKOWIAK, P. SLIZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Symbiotic on Human Health. **Nutrients**, v. 9, p. 1021, 2018.

MARTINS, J.P.; SILVA, R.B.; COUTINHO-SILVA, R.; TAKIYA, C.M.; BATTASTINI, A.M.; MORRONE, F.B.; CAMPOS, M.M. The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v.165, p.183-196, 2012.

MATOS, A. S. Efeito do extrato etanólico da entrecasca de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Na cistite hemorrágica em ratos. 83 f. **Dissertação (Mestrado)** - Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, 2013.

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

MAYER, M.L.; PHILLIPS, C.M.; STADNYK, A.W.; HALPERIN, S.A.; LEE, S.F. Synergistic BM-DC activation, and immune induction by the oral vaccine vector *Streptococcus gordonii* and exogenous tumor necrosis factor. **Mol Immunol.**, v. 46, p. 1883-1891, 2009.

MCFARLAND, L.V.; EVANS, C.T.; GOLDSTEIN, E.J.C. Strain-Specificity and Disease-Specificity of Probiotic Efficacy: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Front Med.**, v.5, p.124, 2018.

MERRILL, L.; GONZALEZ, E.J.; GIRARD, B.M.; VIZZARD, M.A. Receptors, channels, and signaling in the urothelial sensory system in the bladder. **Nat. Ver. Urol.**, v.13, p. 193-204, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS)**, 2021. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>. Acessado em: 24/03/2021.

MOHAMADZADEH, M.; OLSON, S.; KALINA, W.V.; RUTHEL, G.; DEMMIN, G.L.; WARFIELD, K.L.; BAVARI, S.; KLAENHAMMER, T.R. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. **Proc. Natl. Acad Sci.**, v.102, p. 2880-2885, 2005.

MONTEROS, M.J.M.; GALDEANO, C.M.; BALCELLS, M.F. et al. Probiotic lactobacilli as a promising strategy to ameliorate disorders associated with intestinal inflammation induced by a non-steroidal anti-inflammatory drug. **Sci Rep.**, v. 11, p. 571, 2021.

MORAES, J.P.; PEREIRA, D. S.; MATOS, A.S.; SANTANA, D.G.; SANTOS, C.A.; ESTEVAM, C.S.; FAKHOURI, R.; LUCCA JUNIOR, W.; CAMARGO, E.A. The Ethanol Extract of the Inner Bark of *Caesalpinia pyramidalis* (Tul.) Reduces Urinary Bladder Damage during Cyclophosphamide-Induced Cystitis in Rats. **Sci. World J.**, v. 20, Article ID: 694010, 2013.

MOY, B. Cystitis in patients with cancer. **UpToDate**, 2016. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/cystitis-in-patients-with-cancer#H15>. Acesso em: 20 de agosto de 2016.

MUFSON, M.A.; BELSHE, R.B. A review of adenoviruses in the etiology of acute hemorrhagic cystitis. **J. Urol.**, v.115, p.191-194, 1976.

MUSA, N.; MANI, V.; LIM, S.; VIDYADARAN, S.; ABDUL MAJEED, A.; & RAMASAMY, K. O leite de vaca fermentado com lactobacilos atenuou a neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeos e o comprometimento da memória in vitro e in vivo. **Res. J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 488-495, 2017.

NIH. National Cancer Institute. Cyclophosphamide. Disponível em: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/cyclophosphamide>. Acesso em: 12 de setembro de 2017.

NUMAZAKI, Y.; SHIGETA, S.; KUMASAKA, T.; MIYAZAWA, T.; YAMANAKA, M.; YANO, N.; TAKAI, S.; ISHIDA, N. Acute hemorrhagic cystitis in children. Isolation of adenovirus type II. **N Engl. J. Med.** v. 28, p.700-704, 1968.

OMGE. Organização Mundial de Gastroenterologia. Guias práticos: Probióticos e Prebióticos, 2011. Disponível em http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/Probiotics_FINAL_pt_2012.pdf

PADUCH, R.; SZERSZEŃ, M.K.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 55, p. 315–327, 2007.

POTTER, P.; PERRY, A.G. Fundamentos de enfermagem. Editora: **Elsevier**, v.2, p.1480, 2009.

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

PEÑA, J. A.; J. VERSALOVIC, J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. **Cell. Microbiol.**, v. 5, p. 277-285, 2003.

PERAN, L.; CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; BAILON, E.; HENRIKSSON, A.; XAUS, J.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, p. 836-844, 2007.

PLAZA-DÍAZ, J.; RUIZ-OJEDA, F. J.; VILCHEZ-PADIAL, L. M.; GIL, A. Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Symbiotic in Intestinal Chronic Diseases. **Nutrhu.**, vol. 9, p. 6, 2017.

PRADIDARCHEEP, W.; WALLNER, C.; DABHOIWALA, N.F.; LAMERS, W.H. Anatomy and histology of the lower urinary tract. **Handb Exp. Pharmacol.**, v. 202, p. 117-148, 2011.

PRASETYO, R.V.; SURONO, I.; SOEMYARSO, N.A.; DJOJODIMEDJO, T.; RAUF, S.; NOER, M.S.; SUDARMO, S. M. *Lactobacillus plantarum* IS-10506 promotes renal tubular regeneration in pyelonephritic rats. **Benef. Microbes**, v. 11, p. 59-66, 2020.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R.J. HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 144-150, 2012.

RATHER, I. A.; BAJPAI, V. K.; CHING, L. L.; MAJUMDER, R.; NAM, G. J.; INDUGU, N.; SINGH, P.; KUMAR, S.; HAJRAH, N. H.; SABIR, J. S. M.; KAMLI, M. R.; PARK, Y. H. Effect of a bioactive product SEL001 from *Lactobacillus sakei* probio65 on gut microbiota and its anti-colitis effects in a TNBS-induced colitis mouse model, **Saudi J. Biol. Sci.**, v. 27, p. 261-270, 2020.

RIBEIRO, R. A.; LIMA-JUNIOR, R. C.; LEITE, C. A.; MOTA, J. M.; MACEDO, F. Y.; LIMA, M. V.; BRITO, G. A. Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches, and new insights. **J. Exp. Integr.Med.**, v. 2, p. 95-112, 2012.

SABAN, R.; KEITH, I.; BJORLING, D.E. Neuropeptide-mast cell interaction in interstitial cystitis. **Interstitial Cystitis.**, Edited by GR Sant. Philadelphia, Lippincott-Raven, v.283, p. 53– 65, 1997.

SANTOS-JÚNIOR, A.A.; LEAL, P.C.; EDELWEISS, M.I.A.; 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 –Schmiedeberg’s. **Arch. Pharmacol.**, v. 382, p. 399-407, 2010.

SAXELIN, M.; TYNKKYNEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T. DE VOS W.M. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.16, p.204–211, 2005.

SEVENCAN, N.O., ISLER, M., KAPUCUOGLU, F.N., SENOL, A., KAYHAN, B., KIZTANIR, S., & KOCKAR, M. C. Dose-dependent effects of kefir on colitis índice by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. **Food Sci. Nutr.**, v.7, p.3110-3118, 2019.

SHAW, I. C.; GRAHAM, M. I. Mesna – a short review. **Cancer Treat. Rev.**, v. 14, p. 67-86, 1987.

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

SIHRA, N.; GOODMAN, A.; ZAKRI, R.; SAHAI, A.; MALDE, S. Nonantibiotic prevention and management of recurrent urinary tract infection. **Nat. Rev. Urol.**, v.15, p.750 – 776, 2018.

SILVA JUNIOR, R.N.C., FIALHO, E.M.S., ASSUNÇÃO, A.K.M., MACHADO, J.L., ARRUDA, D., FURTADO, P.G.R., GONÇALVES FILHO, A., NASCIMENTO, F.R.F. Caracterização do modelo infamatório de cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos swiss. **Rev. Ciênc. Saúde**, São Luís, v.15, p. 55-67, 2013.

SINGH, V.; SINGH, K.; AMDEKAR, S.; SINGH, D.D.; TRIPATHI, P.; SHARMA, G.L.; YADAV, H. Innate and specific gut-associated immunity and microbial Interference. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 6–12, 2008.

SIU, L.L.; MOORE, M.J. Use of mesna to prevent ifosfamide-induced urotoxicity. **Care Cancer**, v. 6, p. 144–154, 1998.

SMALDONE, M.C.; VODOVOTZ, Y.; TYAGI, V.; BARCLAY, D.; PHILIPS, B.J.; YOSHIMURA, N.; CHANCELLOR, M.B.; TYAGI, P. Multiplex analysis of urinary cytokine levels in rat model of cyclophosphamide-induced cystitis. **Urology**, v. 73, p. 421–426, 2009.

SKOKOVIC-SUNJIC, D. Clinical Guide to Probiotic Products Available in Canada. **Applications, Dosage Forms and Clinical Evidence to Date** - 2021 Edition. Disponível em: http://www.probioticchart.ca/PBCAbout.html?utm_source=site_links&utm_medium=civ&utm_campaign=CDN_CHART.

STILLWELL, T.J.; BENSON, R.C. JR. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis: a review of 100 patients. **Câncer**. v. 61, p.451-7, 1988.

STEFE, C.A.; ALVES, M.A.R.; RIBEIRO, R.L. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos – Artigo de Revisão. **Revista Saúde e Ambiente**. v. 1, p. 16-33, 2008.

STUDENY, S.; CHEPPUDIRA, B.P.; MEYERS, S.; BALESTREIRE, E.M.; APODACA, G.; BIRDER, L.A.; BRAAS, K.M.; WASCHEK, J.A.; MAY, V.; VIZZARD, M. A. Urinary bladder function and somatic sensitivity in vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-/- mice. **J. Mol. Neurosci.**, v. 36, p.175–187, 2008.

TARANTO, M. G. O. POTENCIAL TERAPÊUTICO DO ATIVADOR DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL, BAY 58-2667, NA DISFUNÇÃO MICCIONAL ASSOCIADA À CISTITE INTERSTICIAL EXPERIMENTAL. 90f. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2017.

TELES, K.A.; SOUZA, P.M.; LIMA, F.A.C.; ARAÚJO, B. G.; LIMA, R. A. C. Rotina de administração de ciclofosfamida em doenças autoimunes reumáticas: uma revisão. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.57, p.596–604, 2016.

THOMSON, P. D. R. Physicians’Desk. Reference. **Medical Economics**. 52 ed. v. 52, p. 2299- 2302, 1998.

TRAVIS, L.B.; CURTIS, R.E.; GLIMELIUS, B.; HOLOWATY, E.J.; VAN LEEUWEN, F.E.; LYNCH, C.F.; HAGENBEEK, A.; STOVALL, M.; BANKS, P. M.; ADAMI, J. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin’s lymphoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 524-530, 1995.

UYSAL, E.; YILMAZ, H.R.; UGAN, Y.; ALTUNTAS, A.; DOGRU, A.; KUTLUCAN, A.; TUNC, S.E. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 29, p.559–563, 2015.

VAGHEF-MEHRABANY, E.; ALIPOUR, B.; HOMAYOUNI-RAD, A.; SHARIF, S.K.; ASGHARI-JAFARABADI, M.; ZAVVARI, S. Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. **Nutrition.**, v. 30, p.430-435, 2014.

VELASCO, C.; ANGELICO, P.; GUARNERI, L.; LEONARDI, A.; CLARKE, D.E.; TESTA, R. Effects of thenuclearfactor-kappaBinhibitors2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid and aspirin on micturition in rats with normal and inflamed bladder. **J. Urol.** v.166, p.1962–1968, 2001.

VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, p. 24-37, 2006.

VITETTA, L.; COULSON, S.; LINNANE, A.W.; BUTT, H. The Gastrointestinal Microbiome and Musculoskeletal Diseases: A Beneficial Role for Probiotics and Prebiotics. **Pathogens.** v. 14, p.606- 626, 2013.

WANG, D.; WANG, H. Oxazaphosphorine bioactivation and detoxification the role of xenobiotic receptors. **Acta Pharm. Sin. B.**, v. 2, p. 107-117, 2012.

WGO. World Gastroenterology Organisation. (2017). Probiotics and prebiotics. Obtained in: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-portuguese-2017.pdf>. Acessado em: 03/04/2021.

WONG, G.Y.; GAVVA, N.R. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: recent advances and setbacks. **Brain. Res. Rev.**, v. 60, p. 267–277, 2009.

YILMAZ, N.; EMMUNGIL, H.; GUCENMEZ, S. et al. Incidence of cyclophosphamide-induced urotoxicity and protective effect of mesna in rheumatic diseases. **J Rheumatol.**, v. 42, p. 1661 – 1666, 2015.

YOON, H.S.; KIM, Y. T. SHIM, B. S.; YOON, H. Preventive Effect of *Lactobacillus* Fermentation Extract on Inflammation and Cytokine Production in Lipopolysaccharide-Induced Cystitis in Mice. **Urogenital Tract Infection**, v. 13, p. 51-57, 2018.

ZHONG, L.; ZHANG, X.; COVASA, M. Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. **World J. Gastroenterol.**, v.20, p.7878-7886, 2014.

ZIRAK, M.R.; KARIMI, G.; RAHIMIAN, R.; JAFARIAN, A.H.; HAYES, A.W.; MEHRI, S. Tropisetron ameliorates cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 883, ID: 173310, 2020.

5 APÊNDICES

Artigo 1: Beneficial Microbes**(Qualis A2 – FI: 4.205)**

<https://s3-us-west-2.amazonaws.com/clarivate-scholarone-prod-us-west-2-s1m-public/wwwRoot/prod1/societyimages/bm/Guidelines%20for%20Authors%20Beneficial%20Microbes%202021.pdf>

5.1 ARTICLE 1: Evaluation of the Efficacy of *Lactobacillus acidophilus* in the treatment of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in Wistar rats

L.F. Minhos^{1*}, A.C.S.L. Gehlen², F.F.B. Júnior³, A.C. Santos¹, R.I.C. Souza¹ and M.E. Barros¹

¹ Federal University of Grande Dourados (UFGD), Faculty of Health Sciences, 79800-000 Mato Grosso do Sul, Brazil; ² “Julio de Mesquita Filho” São Paulo State University (UNESP), Faculty of General and Applied Biology, 01206-904 São Paulo, Brazil; ³ University Center of Grande Dourados (UNIGRAN), Department of Clinical Biochemistry, 79824-900 Mato Grosso do Sul, Brazil; liahminhos5@gmail.com

ABSTRACT: *Lactobacillus acidophilus* NCFM (2×10^8 CFU) was used in the treatment of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis (200 mg/kg, intraperitoneal) in 77 female Wistar rats. Rats were distributed into experimental groups (n = 9): control group (GC), zero control group (GCZ), inflammation group (GI), 24-hour acute treatment groups: 24-hour lactobacilli treatment group (GL24H) and mesna group (GM), and 30-day chronic treatment groups: lactobacilli treatment group (GTL) and mesna+lactobacilli group (GM+L). After treatment, animals were euthanized and biological materials were collected for blood count, biochemical analyses, examination of abnormal sediment elements (EAS), and histopathological analysis. GI results showed development of edema, macroscopic alterations, and signs of bleeding in the bladder; in addition, lesions in the urothelium and hemorrhage were also found. GL24H and GM presented intact urothelium, without inflammatory reaction and hematological or biochemical urine alterations. Therefore, this study demonstrated that *L. acidophilus* presented uroprotective effect against the action of cyclophosphamide in both the short and long term.

Keywords: bladder inflammation, probiotics, *Lactobacillus spp.*

1. Introduction

Hemorrhagic cystitis (HC) is an important complication of treatment using cyclophosphamide. The incidence of patients who develop hemorrhagic cystitis from the use of cyclophosphamide ranges from 2 to 40%, according to the dosage regimen and can reach 75% in patients receiving high intravenous dose (Manikandan and Kumar *et al.*, 2010). Cyclophosphamide is an alkylating drug used in the treatment of malignant neoplasms and immune system disorders. However, depending on the dose and continuity of treatment, this drug may be related to toxic side effects, such as hemorrhagic cystitis, alopecia, hematopoietic depression, gonadal dysfunction, nausea, vomiting, fulminant cardiac toxicity and gastrointestinal, renal, and pulmonary toxicities (Sherif, 2018).

Cyclophosphamide releases a toxic metabolite to the urothelium called acrolein, which deposits in the bladder causing irritation, urothelial damage, subepithelial edema, hemorrhage, leukocyte infiltration and necrosis, generating an inflammatory condition and bleeding of the bladder mucosa, with pathophysiology not fully understood (Sucic *et al.*, 2019).

After acrolein accumulation and established urothelial damage, the inflammatory process begins, which includes increase in NF κ B and presence of inflammatory cytokines (TNF- α and interleukin - 1 β), in addition to increase in ROS and inflammatory enzymes (NOS and COX2), which promote pain and bladder dysfunction, requiring the use of anti-inflammatory agents in the therapeutic process (Ribeiro *et al.*, 2012).

Currently, the indicated treatment for HC is the administration of Mesna (sodium 2-mercaptoethane sulfonate) for protection and acrolein detoxification. However, mesna is a partially effective method because it has polar structure that hinders its entry into the cell and high solubility, making its excretion faster. Moreover, 66.7% of patients treated with mesna still have histopathological alterations and it is not effective in rheumatic patients, with worsening evolution of the clinical condition of hemorrhagic cystitis (Uysal *et al.*, 2015). Mesna also has side reactions of cutaneous and systemic hypersensitivity, nausea, fatigue, headache, and diarrhea (Yilmaz *et al.*, 2015). Therefore, research with other methods is needed as an alternative to prevent recurrence and worsening of the disease.

Studies by Guarner *et al.* (2017) and Sevcenac *et al.* (2019) showed that probiotics such as lactobacilli species can act by strengthening the bladder mucosa and performing important immunological effects, such as: reduced activation of the NF- κ B factor, maturation of dendritic cells, increased activity of natural killer cells (NK) and stimulation of the synthesis of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, suppressing inflammatory cytokines and blocking the local inflammatory process. In this context, the aim of the present work was to evaluate the effects of using *L. acidophilus* NCFM in the treatment of cyclophosphamide-induced cystitis in female Wistar rats.

2. Materials and methods

Animals

Seventy-seven female rats of the species *Rattus norvegicus* and Wistar lineage were used, which were provided by the Central Animal Facility of the Federal University of Grande

Dourados (UFGD) aged 7-8 weeks and average weight of 150 to 250 grams. Animals were individually identified and placed in appropriate boxes (maximum 5 animals per box), with wood shavings and kept in standard laboratory conditions, with controlled light (12h light/12h dark), humidity and temperatures ($22 \pm 20^\circ\text{C}$), with free access to water and feed.

All experimental procedures and protocols are in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by the National Council for Animal Experimentation (CONCEA) and previously approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Grande Dourados, under protocol number 03/2020. The animals were randomly distributed into 7 groups by their initial weight, with 9 animals per group, where the ideal n was calculated by the formula: $n = 1 + [2C * (s/d)2]$ (Champion, 2015).

Standardization of the cystitis model and treatments

For cystitis induction, animals were weighed on an electronic scale (MARTE®, AD330), immobilized by detachment of the cervical dorsal skinfold and administered with a single dose of 200 mg/kg of animal weight of cyclophosphamide (CYP) dissolved in sterile water for intraperitoneal injection (Abraham *et al.*, 2009; Conklin *et al.*, 2009; Kiuchi *et al.*, 2009; Zirak *et al.*, 2020). Twenty-four hours after induction, animals were treated with 2×10^8 CFU/day of lyophilized *L. acidophilus* NCFM LEIBA® Reg. M.S.: 6.6325.0001.004-7 or MESNA, according to the group to which they belonged. After the time for cystitis development, the groups were tested for acute 24-hour treatments to have a comparison parameter with the MESNA application protocol and 30-day sub-chronic treatments to assess the feasibility of the use time.

Experimental Groups

1) Control groups and Inflammation group

- a) GCZ (Zero Control Group, $n = 9$): animals did not receive any type of treatment and there was no inflammation induction.
- b) GC (Control Group, $n = 9$): animals received intraperitoneal injection of sterilized water and treatment with 0.9% saline through gavage for 30 days.
- c) GI (Inflammation Group, $n = 9$): animals received single dose of 200 mg/kg of intraperitoneal CYP.

2) Acute treatment groups

- a) GM (Mesna Group, $n = 9$): animals received intraperitoneal dose of 40mg/kg of mesna 15 minutes before cyclophosphamide administration (200mg/kg, intraperitoneally) and shortly after induction, they received two more oral doses of 80 mg /kg of mesna 2 and 6 hours after cystitis induction (Shaw and Graham, 1987).
- b) GL24H (24-hour Lactobacilli Group, $n = 9$): animals were immobilized and received a dose of 2×10^8 CFU of lyophilized *L. acidophilus* dissolved in 0.9% saline, by gavage, and 15 minutes after, CYP was administered according to groups described above for inflammation induction; in addition, 2 and 6 hours after inflammation induction, 2×10^8

CFU of *L. acidophilus* were orally administered and after 24 hours, animals were euthanized.

3) Sub-chronic treatment groups

- a) GTL (Lactobacilli Treatment Group, n = 9): animals received a single intraperitoneal dose of 200 mg/kg CYP and 24 hours after cystitis induction, treatment was started. Lyophilized *L. acidophilus* was dissolved in 0.9% saline and 2×10^8 Colony Forming Units (CFU) were offered per gavage for 30 days (WGO, 2017).
- b) GM+L (Mesna + Lactobacilli Group, n =9): animals received intraperitoneal dose of 40 mg/kg of mesna and 15 minutes later, cystitis was induced with cyclophosphamide (200 mg/kg, i.p), being that, 2 and 6 hours after inflammation induction, 80 mg/kg of mesna were orally applied and after 24 hours, animals were treated with 2×10^8 CFU of *L. acidophilus* by gavage for 30 days, according to the experimental design below (Figure 1).

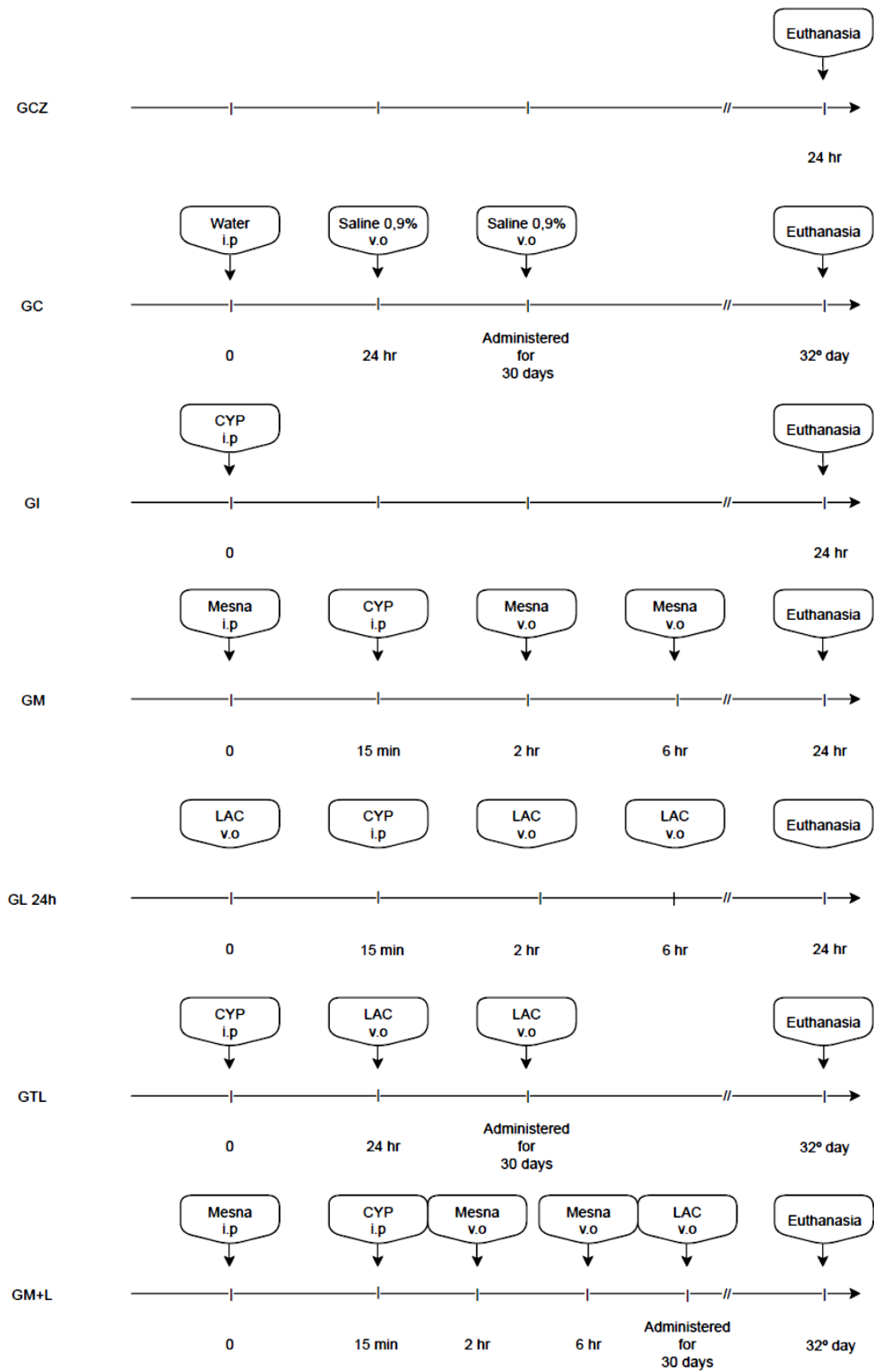


Figure 1. Experimental design of groups used

Histopathological analysis and bladder weight

After euthanasia, bladder, liver, and kidney were collected for histopathological analysis. Bladders were weighed on electronic scale and stored in 10% buffered formalin. To verify the presence of edema, the ratio between wet bladder weight (mg) and total animal weight (g) was used and values were expressed as urinary bladder mass/body mass (Macedo *et al.*, 2012). The other organs were placed in 10% formalin for analysis of lesions or edema.

For histopathological analysis, after fixation, organ fragments (bladder, liver, and left kidney) were cleaved, dehydrated in increasing ethyl alcohol concentrations, cleared in xylene, and embedded in paraffin. Sections were cut to four μm thickness and stained with hematoxylin and eosin (HE) for evaluation under light microscopy. The parameters analyzed were based on the presence or absence of reversible and/or irreversible cell damage. Urothelial lesions were classified according to the staging proposed by consensus of the World Health Organization/International Society of Urological Pathology (Epstein *et al.*, 1998).

Euthanasia and Blood Tests

After the treatment period, animals were immobilized and anesthetized using association of xylazine hydrochloride 30 mg/kg of animal weight and ketamine hydrochloride 180 mg/kg of animal weight via intraperitoneal route. Soon after, animals were returned to boxes and observed. Rats were considered anesthetized when they were immobile and with loss of corneal reflex. The pelvic region was disinfected with 0.5% chlorhexidine and the abdominal cavity was opened to collect organs and blood. Cardiac puncture was performed with the aid of 27 G scalp in a 3 ml syringe, so that the collected blood (1-2 ml) was transferred to serum and EDTA tubes for blood count and biochemical examination to evaluate the systemic action of CYP and renal and hepatic alterations in rats.

Blood count was performed using SYSMEX KX-21N equipment and the following parameters were evaluated: total leukocyte count, red cell count, hemoglobin concentration, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelet count, mean platelet volume, eosinophils, monocytes, neutrophils, and lymphocytes.

Biochemical analysis was performed using the Cobas equipment (Roche c111 model) and the following parameters were evaluated: glucose, total protein, creatinine, total cholesterol, albumin, uric acid, urea, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, high-density lipoprotein, and triglycerides.

Urine analysis

Collection of 24-hour urine samples was performed by metabolic cage for rats from all animals in each group. Analysis of abnormal sediment elements (EAS) was used to verify changes in the urinary or renal system of rats and was performed using reagent urophytes (Urigold/Analisa). According to manufacturer's instructions, pH, density, presence of red blood cells, leukocytes, nitrite, ketones, bilirubin, urobilinogen, protein, and glucose were

evaluated. The 24-hour creatinine test was performed using the Bioplus 2000 equipment and was used to assess renal changes resulting from the administration of cyclophosphamide by measuring creatinine present in urine.

Statistical analysis

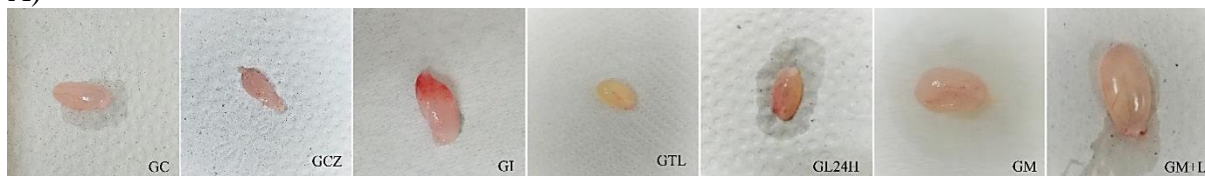
Results were presented as means \pm standard error of the mean (SEM) of an experimental number (n). For multiple comparisons, one-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Tukey's multiple comparison test. The significance level (p) to reject the null hypothesis was 5% ($p < 0.05$). The GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., California, USA) was chosen for analyses.

3. Results

Macroscopic alterations and assessment of the bladder/body weight ratio

Intraperitoneal cyclophosphamide dose of 200 mg/kg induced macroscopic alterations (color, vascularization) in the animals' bladder. The bladders of rats in the inflammation group (GI) presented signs of hemorrhage compared to the other groups (Figure 2A). The bladder weight/body weight (mg/g) ratio showed a significant increase in GI compared to the other groups ($p < 0.05$), indicating the formation of bladder edema (Figure 2B). With the analysis of bladder weight (mg), it was possible to verify a reduction in the results of rats that received oral treatment with mesna associated with lactobacilli (GM+L) (53.5 ± 47.7) compared to animals in GI (120.1 ± 41). ($p < 0.05$) (Figure 2C). Finally, the results of the body weight of the animals showed that the rats in the control group (CG) showed an increase in body weight (243.2 ± 12.1) compared to the zero-control group (GCZ) (186.1 ± 34.5), GI (105.8 ± 7.6), 24-hour lactobacilli group (GL24h) (170.2 ± 14.6) and mesna group (GM) (204.2 ± 10.2). The GCZ animals had higher body weight (186.1 ± 34.5) than the GI animals (105.8 ± 7.6) and reduced weight about the GM+L (242.4 ± 7.4). The GI animals had lower body weight compared to the other groups. The body weight of the GL24H animals was lower (170.2 ± 14.6) about the GM (204.2 ± 10.2) and GM+L (242.4 ± 7.4), as well as the animals of the GM had a significant reduction in body weight (204 ± 10.2) compared to GM+L (242.4 ± 7.4) ($p < 0.05$) (Figure 2D).

A)



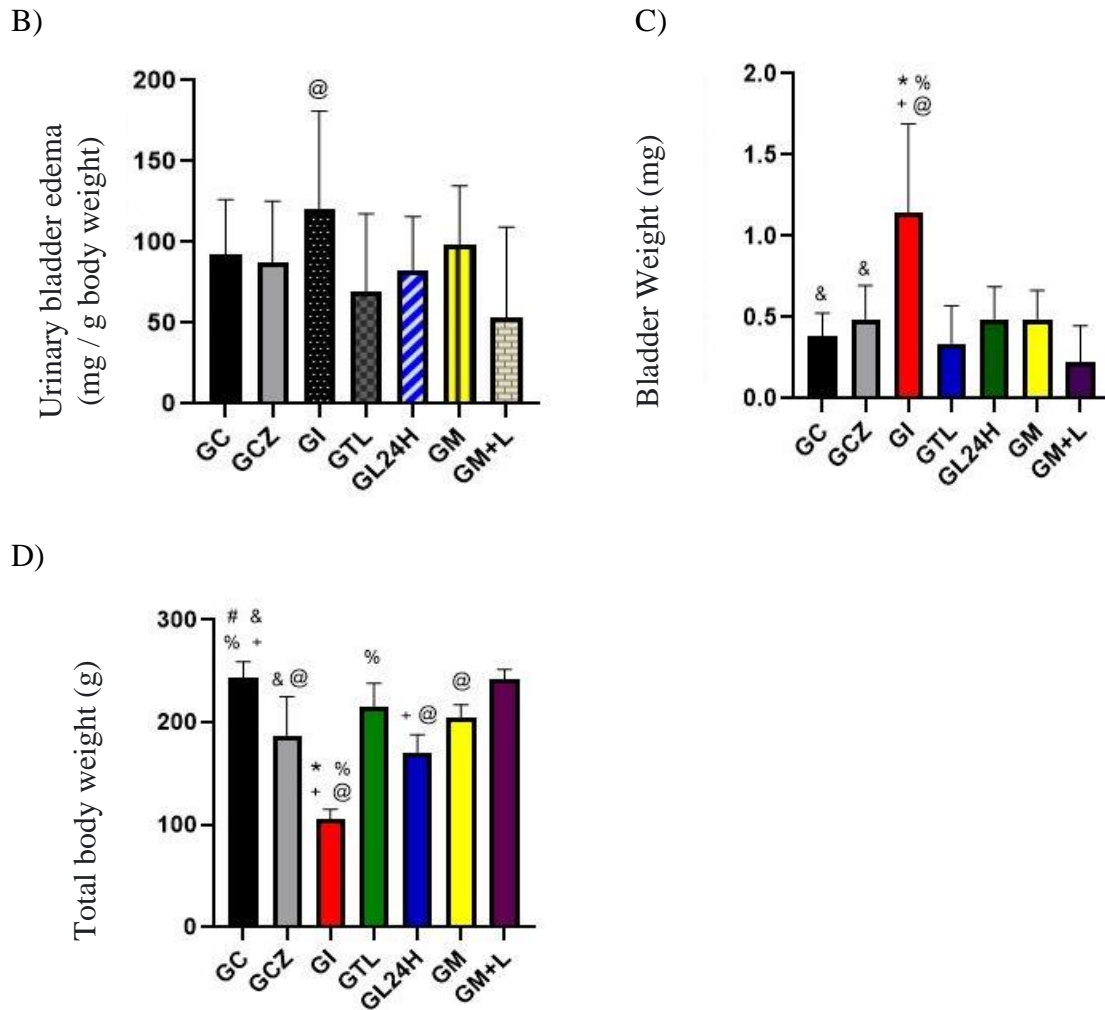


Figure 2. Macroscopic alterations of the bladder with the use of cyclophosphamide and treatments administered. A) representative image of isolated bladders. B) bladder weight (mg)/body weight ratio (g). C) bladder weight (mg) of animals after intraperitoneal administration of 200 mg/kg of cyclophosphamide and use of the respective treatments. D) body weight (g) of animals after treatments. GCZ (without administration of treatment and inflammation), GC (vehicle + 0.9% saline solution), GI (intraperitoneal cyclophosphamide 200mg/kg), GTL (oral administration of 2×10^8 CFU *L. acidophilus* for 30 days), GL24H (oral administration of 2×10^8 CFU *L. acidophilus*, 3 doses), GM (intraperitoneal 40 and 80 mg/kg) and GM+L (Mesna + Lactobacilli). Data represent means + S.E.M. For ANOVA and Tukey test comparisons, $n = 9$ animals/group). \$ $p < 0.05$ vs control group, # $p < 0.05$ vs zero control group, & $p < 0.05$ vs inflammation group, * $p < 0.05$ vs lactobacilli treatment group, % $p < 0.05$ vs 24 h lactobacilli group, + $p < 0.05$ vs mesna group and @ $p < 0.05$ vs mesna group in association with lactobacilli.

Histopathological examination of the bladder

Regarding the histopathological analysis of the animals' organs, no alterations were observed in the kidneys and liver of the rats in all groups. The urinary bladder of animals in the inflammation group, on the other hand, showed extensive areas of coalescent erosion of the transitional epithelium associated with marked edema and hemorrhage in the underlying lamina propria, with mild to moderate mononuclear inflammatory infiltrate and few

neutrophils, indicating alterations compatible with cystitis hemorrhagic fever, which was not observed in control groups and in the groups that received any type of treatment (Figure 3).

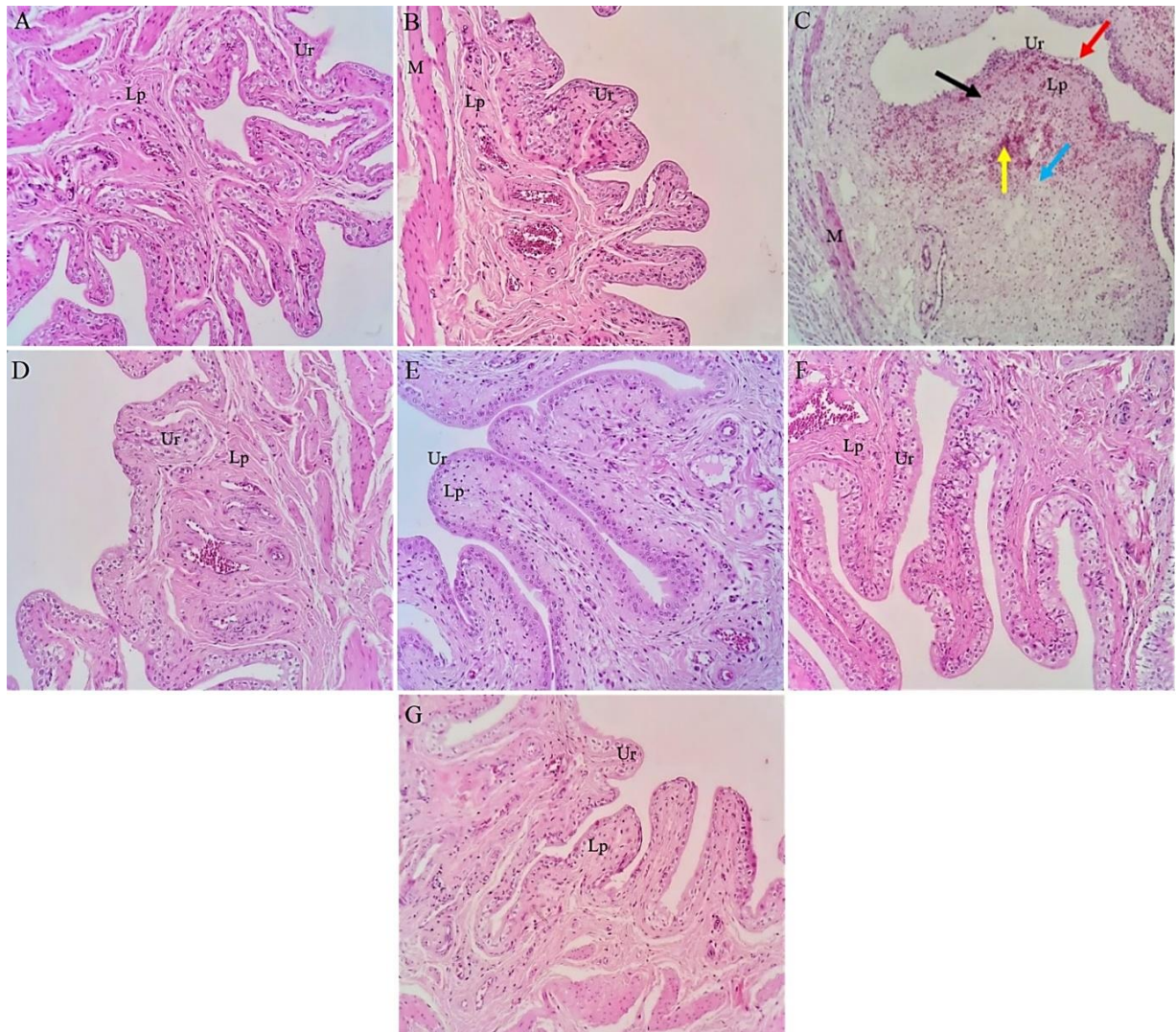


Figure 3. Photomicrographs of histopathological alterations in urinary bladders in GC (A), GCZ (B), GI (C), GTL (D), GL24H (E), GM (F) and GM+L (G) groups. Hematoxylin and Eosin (H&E), magnification x20. (A), (B) Normal urothelium composed of 2-3 cell types: basal cells, intermediate cells and superficial or umbrella cells. (C) Urothelial lesions caused by cyclophosphamide. (D), (E) Image of the bladder of animals treated with lactobacilli, demonstrating urothelium, lamina propria and intact muscle layer. (F), (G) Image of the bladder of animals treated with mesna and lactobacilli without lesions or alterations. GCZ (no administration of treatment and inflammation), GC (vehicle + 0.9% saline solution), GI (intraperitoneal cyclophosphamide 200 mg/kg), GTL (oral administration of 2×10^8 CFU *L. acidophilus* for 30 days), GL24H (oral administration of 2×10^8 CFU *L. acidophilus*, 3 doses), GM (intraperitoneal 40 and 80 mg/kg) and GM+L (Mesna + Lactobacilli). Arrows indicate the following histopathological alterations: red (epithelial erosion), blue (edema), yellow (hemorrhage) and black (inflammatory infiltrate). Ur (urothelium), Lp (lamina propria) and M (muscle layer or detrusor).

Evaluation of the hematological exam

The analysis of the blood count showed a reduction in erythrocytes, hematocrit, mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin (MCHC) concentration and platelets in the animals in the inflammation group compared to the other groups. The results of total leukocytes showed a reduction in GC in relation to GCZ, increase in GCZ concerning GI, GM, and GM+L. There was an increase in the mean corpuscular volume (MCV) of red blood cells in animals from the CG, GCZ and GL24H about GM and a reduction in animals from the GI and treatment group with lactobacilli (GTL) about the GL24H. A reduction in MCH was observed in the GC over the GCZ. The animals in the GC showed a reduction in MCHC in reference to the GCZ, GTL and GM, and an increase in this parameter was observed in the animals in the GCZ compared to GL24H, an increase in GTL to GL24H and a reduction in GL24H compared to the GM. The mean platelet volume (MPV) was higher in the GI animals compared to the others, still, there was an increase in this parameter in the CG regarding the GTL and GM+L, an increase in the GCZ regarding the GTL and a reduction in the GTL animals regarding the GL24H. The GL24H animals showed an increase in neutrophils about GM and GM+L and a reduction in relation to GC and GCZ. There was an increase in eosinophils in GL24H compared to GM+L. Lymphocyte values resulted in an increase in GC about GL24H, and in GCZ regarding GTL and GL24H, in addition, a reduction in GL24H was observed with GM and GM+L. Finally, there was no significant difference in hemoglobin and monocyte values in any group (Table 1).

Table 1. Blood count parameters after induction with cyclophosphamide and treatment of the animals.

	GC	GCZ	GI	GTL	GL24H	GM	GM+L
Total leukocytes (x10³/μL)	2.7±0.8 [#]	5.1±1.3 ^{&+@}	2.4±0.6	4.2±1.3	3.3±0.8	2.5±0.6	3.1±0.5
Erythrocytes (x10⁶/μL)	6.4±1.2 ^{&}	6.5±0.3 ^{&}	2.1±2.8 ^{*%+@}	6.4±0.7	6.9±0.2	6.2±0.1	6.7±0.3
Hemoglobin (g/dL)	12.5±2.4	13.3±0.4	11.4±0.5	12.6±1.2	13.5±0.2	12.2±0.3	13.4±0.5
Hematocrit (%)	38.3±7.4 ^{&}	38.6±1.9 ^{&}	24.7±16.4 ^{%@}	36.9±4	41.6±1.0	35.5±1.0	39.5±1.6
MCV (fL)	58.6±1.8 ⁺	58.8±1.2 ⁺	57.0±1.4 [%]	57.1±0.5 [%]	60.0±0.9 ⁺	56.5±0.5	58.2±0.2
MCH (pg)	19.0±0.7 ^{#&}	20.3±0.6 ^{&}	17.4±0.8 ^{*%+@}	19.6±0.4	19.5±0.3	19.4±0.5	19.7±0.1
MCHC (g/dL)	32.4±1.0 ^{#&+}	34.5±0.8 ^{&%}	30.6±2.2 ^{*%+@}	34.3±0.9 [%]	32.5±0.4 ⁺	34.4±0.9	33.9±0.2
Platelets (x10³/μL)	625±136.8	784.3±172.7 ^{&}	368.8±265.8 ^{%@}	462.7±268.9	766.2±67.5	602±132.6	773±62
MPV (fL)	8.5±0.2 ^{*@}	8.2±0.6 ^{&*+}	9.2±0.6 ^{*%+@}	7.3±0.1 [%]	8.3±0.4	7.7±0.2	7.5±0.1
Neutrophils(x10³/μL)	20.3±4 [%]	15±4.4 [%]	26.8±6.3	27±12	36.8±9.1 ^{+%@}	21.7±2.4	20.8±1.4
Eosinophils(x10³/μL)	1.5±0.8	2.5±0.9	2±0.8	2±0.6	2.8±1.6 [@]	2.4±0.4	1.1±0.6
Monocytes (x10³/μL)	3.2±1.1	5.2±1.1	4±2.2	5.8±2.5	3.7±1.7	4.6±0.7	3.2±0.7
Lymphocytes(x10³/μL)	74.8±5.2 [%]	79.5±5 [%]	67.2±7.9	65.1±11.6	56.4±9.6 ^{+%@}	73.1±3.1	74±2.2

Notes: data were expressed as mean ± S.E.M (n=9/group). GCZ, GC, GI, GTL, GL24H, GM, GM+L = see text. MCV = mean corpuscular volume; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MPV = mean platelet volume.

\$p < 0.05 vs control group.

#p < 0.05 vs zero control group.

&p < 0.05 vs inflammation group.

* p < 0.05 vs lactobacilli treatment group.

% p < 0.05 vs 24-h lactobacilli group.

+ p < 0.05 vs mesna group.

@ p < 0.05 vs mesna group in association with lactobacilli.

Biochemical analyses

Regarding the glucose analysis, there was a reduction in the values of GI animals compared to GTL and GM+L. About total protein, an increase in GCZ was observed in relation to GI and GM. Albumin values were increased in CG as for GI, GTL, GL24H, GM and GM+L, similarly, GCZ showed an increase in this parameter over GI, GL24H and GM and animals in GI showed a reduction in albumin values in reference to the GTL, GL24H and GM+L. The GCZ animals showed an increase in total cholesterol to the GTL and the GM animals had a reduction in the GC and GCZ. Considering the urea values, a reduction was observed in GM animals compared to GM+L. The CG animals had a reduction in uric acid values with the GCZ and it was possible to observe an increase in this parameter in the GCZ animals over the GTL, GM, and GM+L, in the same way as the GI animals regarding the GM+L. The results of alanine aminotransferase (ALT) showed a reduction in GC compared to GCZ, as well as in GL24H and GM concerning GM+L. Furthermore, an increase in this parameter was observed in GCZ over GL24H and GM, in GI compared to GM and GTL as to GL24H and GM. The GM animals had the lowest HDL values for the CG and GI. Finally, GL24H and GM animals showed reduced triglycerides compared to GCZ. There was no significant difference in creatinine and aspartate aminotransferase (AST) values between groups (Table 2).

Table 2. Serum biochemical parameters.

	GC	GCZ	GI	GTL	GL24H	GM	GM+L
Glucose (mg/dL)	217.4±39.2	247.8±92.7	145.4±30 ^{*@}	256.3±36.1	170.9±58.4 [@]	226.3±48.7	316.2±47.5
Total protein (g/L)	62.3±3.2	65.6±4.5 ^{&+}	56.4±4	60±6.6	60.3±1.9	55.4±4.1	59.8±4.5
Creatinine(mg/dL)	0.4±0	0.3±0	0.6±0.4	0.3±0	0.3±0	0.3±0	0.3±0
Total cholesterol (mg/dL)	67.0±17.6 ⁺	72.3±16.5 ^{*+}	69.9±10 ⁺	50.6±9.6	59.4±6	44.6±7.5	57.1±8.2
Albumin (g/L)	45.8±1.8 ^{&+@}	41.6±1.4 ^{&+%}	31.1±1.8 ^{*%@}	39.2±4.1	36±1.4	34.8±2.4	39.2±3.7
Uric acid (mg/dL)	2.7±0.4 [#]	5.3±2.5 ^{*+@}	3.8±0.9 [@]	2.1±0.2	3.2±1.7	2.2±0.4	1.3±0.3
Urea (mg/dL)	46.3±2.7	43.1±4.1	43.9±10	42.9±3.8	47.6±8.7	40.4±4.1 [@]	52.8±3.5
ALT(U/L)	35±3.6 [#]	52±7 ⁺	37.4±12.3 ⁺	47.6±10.5 ^{%+}	22.1±2.2 [@]	20.1±2.7 [@]	47.4±14.5
AST(U/L)	140.8±11.5	243.4±74.3	229.4±69.6	151.5±49.5	219.2±39.7	137.1±19.6	142.8±58.3
HDL (mg/dL)	44.3±12.6 ⁺	36.5±5.9	40.6±8.8	35.5±7	36.2±4.7	29.8±4.7	39.4±5.9
Triglycerides (mg/dL)	56.3±9.6	78.1±35.7 ^{&+%}	40.1±9.8	59±17.3	37.6±7.5	32.5±6.7	62.1±15.5

Notes: data were expressed as mean ± S.E.M (n=9/group). GCZ, GC, GI, GTL, GL24H, GM, GM+L = see text. ALT= alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; HDL = high lipoprotein density.

\$p < 0.05 vs control group.

#p < 0.05 vs zero control group.

&p < 0.05 vs inflammation group.

* p < 0.05 vs lactobacilli treatment group.

% p < 0.05 vs 24-h lactobacilli group.

+ p < 0.05 vs mesna group.

@ p < 0.05 vs mesna group in association with lactobacilli.

Urine Test Assessment

It was possible to verify the presence of blood in the urine of animals in the inflammation group by means of the reagent test. The presence of nitrite, ketones, bilirubin, urobilinogen, and glucose in the animals' urine was not observed. Regarding the density of the animals' urine, GM showed an increase compared to the other groups. The pH values were lower in GM animals with respect to GC, GI, GTL and GM+L and there was an increase in pH in GTL rats about GCZ, GL24H and GM+L. There was an increase in creatinine in GM animals compared to all others. Finally, there was an increase in the volume in animals from GTL

over GL24H and GM, and a reduction in GL24H compared to GM+L. There were presence of leukocytes and proteins, but within normal limits (Table 3).

Table 3. Urine physicochemical parameters.

	GC	GCZ	GI	GTL	GL24H	GM	GM+L
DENSITY	1005±0 ⁺	1004±1.9 ⁺	1003±2.2 ⁺	1004.4±0.9 ⁺	1007.7±3.7 ⁺	1019.4±5.1 [@]	1005±0.9
pH	7.8±0.1 ⁺	7.5±0.5 [*]	7.8±0.3 ⁺	8.5±0.4 ^{%+@}	7.5±0.4	6.5±0.5 [@]	7.5±0.4
CREATININE (mg/dL)	32.8±6.3 ⁺	30.7±9.3 ⁺	16.8±4.4 ⁺	28±5.8 ⁺	25±4.2 ⁺	64.3±18.7 [@]	33.6±8.6
VOLUME (ml)	10.3±2.1	8.6±7.6	11±4.2	14.6±1.5 ^{%+}	3.4±2.1 [@]	5.8±3.2	13.3±1.2

Notes: data were expressed as mean ± S.E.M (n=9/group). GCZ, GC, GI, GTL, GL24H, GM, GM+L = see text.

\$p < 0.05 vs control group.

#p < 0.05 vs zero control group.

&p < 0.05 vs inflammation group.

* p < 0.05 vs lactobacilli treatment group.

% p < 0.05 vs 24-h lactobacilli group.

+ p < 0.05 vs mesna group.

@ p < 0.05 vs mesna group in association with lactobacilli.

4. Discussion and conclusions

In this study, the development of CYP-induced hemorrhagic cystitis in female rats was confirmed by the presence of inflammation and hemorrhage formed in the animal's bladder which was also contemplated in other studies (Ayhanci *et al.*, 2020; Mahmoudi *et al.*, 2018; Zirak, 2020). In addition, it was possible to observe that the animals that received cyclophosphamide had an increase in bladder weight about the other groups, indirectly reflecting the acute inflammation due to the formation of edema, hyperemia, and cellular infiltrate, which was also mentioned by Hirshman *et al.* (2020) in their study, where there was an increase in vascularization and bladder weight of animals. However, the group that received Mesna treatment in association with *L. acidophilus* for 30 days had, on average, a reduction in bladder weight when compared to animals with hemorrhagic cystitis, indicating an efficacy of the treatment employed. Cyclophosphamide was also able to reduce the body weight of animals in the inflammation group, suggesting that its use may have caused stress to the animals due to pain or the inflammatory process. On the other hand, the animals in the mesna group and the group treated with 24-hour lactobacilli, likewise, received cyclophosphamide and were subjected to the same period of euthanasia as the animals in the inflammation group, managing to maintain normal body weight compared to the control group.

Ribeiro *et al.* (2012) divided the inflammatory process generated in the bladder into four phases: the initial phase, which is characterized by the accumulation of acrolein in the bladder causing damage to the urothelium. The signaling phase, in which macrophages promote the local increase of inflammatory cytokines, mainly tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1 β , via nuclear transcription factor-kappa B (NF κ B), increase in reactive oxygen species (ROS) and inflammatory enzymes, nitric oxide, inducible synthetase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). The ulcerative or symptomatic phase in which there is the denudation of the epithelium and the appearance of ulcers that cause LUTS and bladder dysfunction, and finally, the tissue repair phase, by signaling fibroblasts and local increase in

growth factors. Therefore, the fourth phase usually occurs within 24 hours of cyclophosphamide administration and provides an overview of the entire process as it contains the characteristics that there was deposition and presence of cytokines, demonstrating the degree of inflammation through the extension of fibrosis, with euthanasia being important during this period to evaluate the anti-inflammatory action of a compound to be tested.

In the histopathological analysis of the animals' bladder, the inflammatory process inferred by macroscopic alterations and the formation of edema in the inflammation group was confirmed. Zirak *et al.* (2020) demonstrated by histopathological analysis that the use of intraperitoneal cyclophosphamide (270 mg/kg) in rats resulted in massive bladder injury characterized by leukocyte infiltration and epithelial ulceration, as found in our results, in which areas of the injured urothelium, with edema formation, hemorrhage, and neutrophil infiltration could be observed in the bladder of animals in the inflammation group. However, the group treated with lactobacilli managed to keep the urothelium intact and without inflammatory reaction, in the same way as the animals in the mesna group, indicating a uroprotective effect that mitigated or prevented the action of the metabolite acrolein in the urothelium of the animals.

Another change caused by the administration of cyclophosphamide in animals was the reduction in the count of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, platelets, mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular hemoglobin (MCHC) concentration in animals in the inflammation group, at the dose of 200 mg /kg intraperitoneally, reflecting the blood loss caused by it, which has also been mentioned in other studies (Cengiz, 2019; El-Sebaey, *et al.* 2019). Furthermore, the mean platelet volume of animals with cystitis was greater compared to the others, which may indicate an increase in the production of platelets that are being rapidly destroyed, usually related to vascular or autoimmune diseases, or active bleeding, as observed in hemorrhagic cystitis, however, this is a value rarely mentioned in the literature and difficult to compare with reference values, so that, in this study, all of them had altered reference values in this parameter (6.4-7.5) (Kilanowicz *et al.*, 2019).

Regarding the blood count, it was also possible to observe high values of mean corpuscular volume in some groups, which may be due to the use of medication or indicate liver failure but are mainly related to anemia due to lack of vitamin B12, because when this parameter is reduced, may be indicative of iron deficiency if it is accompanied by low amounts of erythrocytes and hematocrit, as observed in GI animals (Maner and Moosavi, 2020). Also, the values of leukocytes in animals from GI were below the values of animals in the other groups, which may be related to the immunosuppressive activity of cyclophosphamide, which was attenuated in GL24H, as there was an increase in neutrophils and eosinophils that are related to immunostimulation exerted by lactobacilli, stimulating the production of immunoglobulins and local stabilization, suggesting that it is a form of rapid regulation of the immune system due to changes caused by cyclophosphamide in the bladder of animals (Cai *et al.*, 2020). On the other hand, lymphocyte values were lower in rats treated with lactobacilli for 24 hours and higher concerning the group treated with lactobacilli for 30 days when compared to the control group, demonstrating that long-term treatment with lactobacilli can be a better alternative to reduce the immunosuppressive effect caused by cyclophosphamide, as well as Lollo *et al.* (2012) observed an increase in lymphocyte values in rats fed for 2 weeks with cheese containing *L. acidophilus* LA 14 and *Bifidobacterium longum* BL 05, after immunosuppression caused by prolonged exercise. However, the values of MCH, MCHC,

total leukocytes and neutrophils were within the reference values (MCH = 16.6-22.8; MCHC = 30.4-43.9; total leukocytes: 2.3-9, 9; neutrophils: 3-46.2) (Sganzerla *et al.*, 2020).

Regarding the biochemical analysis, these were performed to assess changes in blood parameters that would indicate kidney or liver damage or some metabolic abnormality. The animals from the GC, GCZ, GTL, GM, and GM+L had higher glucose values compared to the reference values of healthy animals (53-172). The increase in blood glucose may represent a metabolic disorder or kidney and liver disease if there is glycosuria, but the groups did not show glucose in the urine by dipstick test, thus, these glucose values may be related to the animals' lack of fasting (Alsahli and Gerich, 2017). In addition, total protein and albumin values were also altered from the reference values (albumin: 1.3–3.8; total protein: 5–7.7). Albumin is a marker of liver synthesis function because it is synthesized in the liver and together with the total protein, it may indicate liver or kidney disease if the values are increased, but histopathological findings did not show liver or kidney damage in the animals or elevation of the creatinine values (Alsahli and Gerich, 2017). However, the reduced albumin values in the GI may be related to the reduction in body weight of animals in this group, since albumin has a nutrient transport function, in addition to the fact that the reduced albumin values may occur due to inflammatory processes, as this protein tends to decrease its serum concentration in the acute phase by inhibiting its synthesis by pro-inflammatory cytokines, increasing vascular permeability, thus being lost by extravascular spaces (Keller, 2019).

Another important factor observed in the biochemical analysis was the reduction in total cholesterol in animals treated with lactobacilli. There is evidence in the literature that probiotic bacteria exert a hypocholesterolemic effect in animals and humans, moreover, it was possible to verify in our findings the same effect in animals in the group treated with Mesna (Kimoto *et al.*, 2002). There were also changes in alanine aminotransferase (ALT) values, and the serum level of ALT is a marker used to check damage to hepatocytes if it is increased, but the metabolic syndrome can also influence ALT values, including dyslipidemia, followed by high values of total cholesterol and triglycerides in the blood, as observed in the GCZ, GI, and GTL compared to the other groups, but there were no liver lesions on histopathological examination and the biochemical values were within the reference standard (Dong *et al.*, 2012). Furthermore, despite the significant differences in the values of total cholesterol, urea, uric acid, ALT, HDL, and triglycerides, all are within the reference values for healthy animals (total cholesterol: 54-96; urea: 24-54; uric acid: 1.2-3.4; ALT: 32-63; HDL: 35.5-45.4; triglycerides: 23-138), indicating that cyclophosphamide was not able to change these patterns and that the treatment groups maintained the normal metabolic values (Alsahli and Gerich, 2017; Lima *et al.*, 2014).

Finally, type 1 urine and 24-hour creatinine tests were performed to check for possible renal dysfunction caused by cyclophosphamide. There was an increase in urine density in the GM compared to the others, suggesting possible dehydration and renal changes that can be explained by the increase in urine creatinine in this group compared to the others, in addition, the low urine flow represented by the volume of animals in this group is an important risk factor for nephrolithiasis, increasing the supersaturation of all stone-forming salts so that these values are higher than those found in healthy rats (Ennis and Asplin, 2016; Martins *et al.*, 2018). Concerning urinary pH, it was possible to observe alkalization in the urine of animals that received *L. acidophilus*, and this alkalization is usually related to the presence of urease-producing bacteria, however, there was no presence of leukocytes and nitrite in the urine, moreover, the normalization rate can range from 6 to 8.5 (Han *et al.*, 2019; Martins *et*

al., 2018). Furthermore, *Lactobacillus spp.* they can alter the local environment through changes in pH and the release of chemicals (such as hydrogen peroxide), thus reducing the potential for colonization by uropathogenic bacteria (Sihra *et al.*, 2018).

According to Lima *et al.* (2007), the incidence of hemorrhagic cystitis can decrease up to 5% in patients treated with Mesna. In our study, it was possible to observe 100% reduction in hemorrhagic cystitis in rats treated with Mesna and *L. acidophilus* through histopathological analysis and hematological and biochemical parameters, demonstrating efficacy both with the administration of treatment for 30 days and by the mesna protocol used in GL24H animals, and the association of Mesna with Lactobacilli also showed satisfactory results in the treatment of hemorrhagic cystitis. Thus, all treatments were effective when compared with values of animals in the control groups, which suggests that the use of *L. acidophilus* may be a promising therapeutic alternative for HC.

The present work is the first study, whose effect of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM (LEIBA®) was tested for the treatment of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in female Wistar rats. Therefore, the results reported here have limitations. One of the main ones is the lack of knowledge of the previous status of the animals' intestinal microbiota before the intervention. Another limitation is the lack of further analysis to determine whether the lactobacilli dose administered reached its destination intact. Another specific point of consideration includes the absence of analysis of immunological parameters such as inflammatory and anti-inflammatory cytokines to observe the immune response to the treatments used, as well as the lack of evaluation of free radicals that may be involved in the inflammatory process, however, our findings were able to demonstrate the effect of cyclophosphamide on the development of HC and the protection exerted by lactobacilli in the bladder and blood parameters.

In conclusion, the use of *Lactobacillus acidophilus* was able to attenuate the inflammatory effects caused by cyclophosphamide in Wistar rats, reducing bladder edema, preventing urothelial and hemorrhagic lesions. In addition to maintaining normal hematological, biochemical, and urinary parameters both in the short term and in the long term, having action like Mesna, demonstrating uroprotective efficacy. Thus, it is possible to suggest that lactobacilli can be used in the treatment of hemorrhagic cystitis. However, further analyses are needed to improve the elucidation and deepen the anti-inflammatory aspects, in addition to the form of use, dosage and mechanisms that may be involved in the action of these probiotics.

Ethical statement

The author states that the experiment was carried out in accordance with the ARRIVE guidelines and in accordance with the UK Animal Laws OF 1986 (Scientific Procedures) and associated guidelines.

Declarations of interest

None.

Acknowledgments

The Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarship granted.

To the University Center of Grande Dourados (UNIGRAN) for using the laboratory.

References

Abraham, P., Rabi, S. and Selvakumar, D., 2009. Protective effect aminoguanidine Against oxidative stress and bladder injury in cyclophosphamide – induced hemorrhagic cystitis in rat. *Cell Biochemistry & Function* 27: 56-62.

<https://doi.org/10.1002/cbf.1534>

Alsahli, M. and Gerich, J.E., 2017. Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 133:1-9. DOI: [10.1016/j.diabres.2017.07.033](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.07.033)

Ayhanci, A., Tanriverdi, D.T., Sahinturk, V. *et al.*, 2020. Protective Effects of Boron on Cyclophosphamide-Induced Bladder Damage and Oxidative Stress in Rats. *Biological Trace Element Research* 197:184–191. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01969-z>

Cai, Z., Wang, P., Guo, Y., Zeng, X., Wu, Z. and Pan, D., 2020. S-layer protein modulates the stimulatory effects of *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074 by triggering PKC signaling cascade in RAW 264.7 cells. *Journal of Functional Foods*, v. 67, ID:103841. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103841>

Cengiz, M., 2019. Hematoprotective effect of boron on cyclophosphamide toxicity in rats. *Cellular and Molecular Biology* 64:62-65. PMID: [29729695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29729695/).

Champion, S. Basic Functions for Power Analysis. 2015. R package version 1.1-3. Accessed in: 01/08/2021. Available in <<https://CRAN.R-project.org/package=pwr>>.

Conklin, D.J., Haberzettl, P., Lesgards, J.F., Prough, R.A., Srivastava S. and Bhatnagar, A., 2009. Increased sensitivity of glutathione S-transferase P-null mice to cyclophosphamide induced urinary bladder toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331: 456-469. DOI: [10.1124/jpet.109.156513](https://doi.org/10.1124/jpet.109.156513)

Dong, M. H., Bettencourt, R., Brenner, D. A., Connor, E. B. and Loomba, R., 2012. Serum Levels of Alanine Aminotransferase Decrease with Age in Longitudinal Analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 10: 285-290. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2011.10.014>

El-Sebaey, A.M., Abdelhamid, F.M. and Abdalla, O.A., 2019. Protective effects of garlic extract against hematological alterations, immunosuppression, hepatic oxidative stress, and renal damage induced by cyclophosphamide in rats. *Environmental Science and Pollution Research* 26: 15559–15572. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04993-7>

Ennis, J. L. and Asplin, J. R., 2016. The role of the 24-h urine collection in the management of nephrolithiasis. *International Journal of Surgery* 36: 633-637. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2016.11.020>

Epstein, J.L., Amin, M.B. and Reuter, V.R., 1998. The World Health Organization / International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. The American Journal of Surgical Pathology 22: 1435-1448. DOI: [10.1097/00000478-199812000-00001](https://doi.org/10.1097/00000478-199812000-00001)

Guarner, F., Sanders, M.E., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A. and Garisch, J., 2017. Probiotics and Prebiotics. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines p.1-36. Available in: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-english-2017.pdf> Accessed in: 03/04/2021.

Han, L., Liu, C., Sun, W., Yang, X., Zhang, C., Zhao, B., Huang, C., Yang, J., Wang, L., Bai, H., Liu, J., Lim, M., He, R., Huang, J., Liu, P., Ju, D. and Lao, L., 2019. Twelve-week study of moxa smoke: occupational exposure in female rats. Journal of Traditional Chinese Medicine 39: 207-212. PMID: [32186043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32186043/).

Hirshman, N. A., Hughes Jr., F.M., Jin, H., Harrison, W. T., White, S. W., Doan, I., Harper, S. N., Leidig, P. D. and Purves, J. T., 2020. Cyclophosphamide-induced cystitis results in NLRP3-mediated inflammation in the hippocampus and symptoms of depression in rats. American Journal of Physiology-Renal Physiology 318: 354-362. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00408.2019>

Keller, U., 2019. Nutritional Laboratory Markers in Malnutrition. Journal of Clinical Medicine 8: 775. DOI: [10.3390/jcm8060775](https://doi.org/10.3390/jcm8060775)

Kilanowicz, A., Markowicz-Piasecka, M., Klimczak, M., Stragierowicz, J. and Sikora, J., 2019. Hexachloronaphthalene as a hemostasis disturbing factor in female Wistar rats – A pilot study. Chemosphere 228: 577-585. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2019.04.147](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.147)

Kimoto, H., Ohmomo, S. and Okamoto, T., 2002. Cholesterol removal from media by lactococci. Journal of dairy science 85: 3182-3188. DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74406-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74406-8)

Kiuchi, H., Takao, T., Yamamoto, K., Nakayama, J., Miyagawa, Y., Tsujimura, A., Nonomura, N. and Okuyama, A., 2009. Sesquiterpene lactose parthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model by inhibiting nuclear factor-Kappa B phosphorylation. The Journal of Urology 181: 2339-2348. DOI: [10.1016/j.juro.2009.01.015](https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.01.015)

Lima, C.M., Lima, A.K., Melo, M.G.D, Dória, G.A.A., Leite, B.L.S., Serafini, M.R., Albuquerque-Júnior, R.L.C. and Araújo, A.A.S., 2014. Hematological and biochemical reference values of rats (*Rattus norvegicus* Wistar strain) from Tiradentes University vivarium, Scientia plena, v.10, ID: 034601. Available in: <https://www.scienciaplena.org.br/sp/article/view/1784/948>

Lima, M. V. A., Ferreira, F.V., Macedo, F.Y.B., Brito, G.A.C. and Ribeiro, R.A., 2007. Histological changes in bladders of patients submitted to ifosfamide chemotherapy even with mesna prophylaxis. Cancer chemotherapy pharmacol 59: 643-650. DOI: [10.1007/s00280-006-0307-5](https://doi.org/10.1007/s00280-006-0307-5)

Lollo, P. C., Cruz, A. G., Morato, P. N., Moura, C. S., Carvalho-Silva, L. B. And Oliveira, C. A., 2012. Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. *Journal of Dairy Science* 95: 3549–3558. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5124>

Macedo, F.Y.B., Mourão, L.T.C., Freitas, H.C., Lima-júnior, R.C.P., Wong, D.V.T., Oriá, R.B., Vale, M.L., Brito, G.A.C., Cunha, F.Q. and Ribeiro, R.A., 2012. Interleukin-4 Modulates the Inflammatory Response in Ifosfamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Inflammation* 35: 297-307. DOI: [10.1007/s10753-011-9319-3](https://doi.org/10.1007/s10753-011-9319-3)

Mahmoudi, N., Eftekhazadeh, S., Golmohammadi, M., Khorramirouz, R., Hashemi, J., Kashani, Z., Alijani, M., Hamidieh, A.A. and Kajbafzadeh, A.M., 2018. Alleviation of Cyclophosphamide-induced Hemorrhagic Cystitis by Dietary Pomegranate: A Comparative Experimental Study with Mesna. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 40: 609-615. DOI: [10.1097/MPH.0000000000001203](https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000001203)

Maner, B.S. and Moosavi, L., 2020. Mean Corpuscular. *StatPearls* [Internet]. v. 2020, ID: 31424859. PMID: [31424859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31424859/)

Manikandan, R., Kumar, S. and Dorairajan, L.N., 2010. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. *Indian Journal of Urology* 26: 159-166. Doi: [10.4103/0970-1591.65380](https://doi.org/10.4103/0970-1591.65380)

Martins, A.A., Santos-Junior, A., Filho, E.R.T., Silva, H.L.A., Ferreira, M.V.S., Graça, J.S., Esmerino, E.A., Lollo, P.C.B., Freitas, M.Q., Ana, A.S.S., Costa, L.E.O., Raices, R.S.L., Silva, M.C., Cruz, A.G. and Barros, M.E., 2018. Probiotic Prato cheese consumption attenuates development of renal calculi in animal model of urolithiasis, *Journal of Functional Foods* 49: 378-383. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.041>

Ribeiro, R. A., Lima-Junior, R. C., Leite, C. A., Mota, J. M., Macedo, F. Y., Lima, M. V. and Brito, G. A., 2012. Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches, and new insights. *Journal of Experimental and Integrative Medicine* 2: 95-112. DOI:[10.5455/jeim.080312.ir.010](https://doi.org/10.5455/jeim.080312.ir.010)

Sevencan, N.O., Isler, M., Kapucuoglu, F.N., Senol, A., Kayhan, B., Kiztanir, S. and Kockar, M.C., 2019. Dose-dependent effects of kefir on colitis índice by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Food Science & Nutrition* 7: 3110-3118. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1174>

Sganzerla, J.T., Oliveira, M.C., Mayer, S.N., Witz, M.I., Allgaver, M.C. and Jr Miguens, S.A.Q., 2020. Hematological analysis of Wistar rats as a reference parameter for control groups in experimental research. *Stomatos* 26: 21-29. Available in: <http://www.periodicos.ulbra.br/index.php/stomatos/article/view/5227>

Shaw, I. C. and Graham, M. I., 1987. Mesna – a short review. *Cancer Treatment Reviews* 14: 67-86. [https://doi.org/10.1016/0305-7372\(87\)90041-7](https://doi.org/10.1016/0305-7372(87)90041-7)

Sherif, I.O., 2018. Uroprotective mechanism of quercetin Against cyclophosphamide induced urotoxicity: effect on oxidative stress and inflammatory markers. *Journal of Cellular Biochemistry* 119: 7441–7448. <https://doi.org/10.1002/jcb.27053>

Sihra, N., Goodman, A., Zakri, R., Sahai, A. and Malde, S., 2018. Nonantibiotic prevention and management of recurrent urinary tract infection. *Nature Reviews Urology* 15: 750 – 776. DOI: [10.1038/s41585-018-0106-x](https://doi.org/10.1038/s41585-018-0106-x)

Sucic, M., Luetic, K., Jandric, I., Drmic, D., Sever, A.Z., Vuletic, L.B., Halle, Z.B., Strinic, D., Kokot, A., Seiwerth, R.S., Zoricic, I., Blagaic, A.B., Seiwerth, S. and Sikiric, P., 2019. Therapy of the rat hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide. Stablegastric pentadecapeptide BPC 157, L-arginine, L-NAME. *European Journal of Pharmacology*, v. 861, ID:172593. DOI: [10.1016/j.ejphar.2019.172593](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172593)

Uysal, E., Yilmaz, H.R., Ugan, Y., Altuntas, A., Dogru, A., Kutlucan, A. and Tunc, S.E., 2015. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 29: 559–563. DOI: [10.1002/jbt.21728](https://doi.org/10.1002/jbt.21728)

World Gastroenterology Organisation (WGO), 2017. Probiotics and prebiotics. Available in: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-portuguese-2017.pdf>. Accessed in: 03/04/2021.

Yilmaz, N., Emmungil, H. Guçenmez, S., Ozen, G., Yildiz, F., Balkarli, A., Kimyon, G., Coskun, B. N., Dogan, I., Pamuk, O. N., Yasar, S., Cetin, G. Y., Yazici, A., Esmen, S. E., Cagatay, Y., Yilmaz, S., Cefle, A., Sayarlioglu, M., Kasifoglu, T., Karadag, O., Pehlivan, Y., Dalkilic, E., Kisacik, B., Cobankara, V., Erken, E., Direskeneli, H., Aksu, K. and Yavuz, S., 2015. Incidence of cyclophosphamide-induced urotoxicity and protective effect of mesna in rheumatic diseases. *The Journal of Rheumatology* 42: 1661 – 1666. DOI: [10.3899/jrheum.150065](https://doi.org/10.3899/jrheum.150065)

Zirak, M.R., Karimi, G., Rahimian, R., Jafarian, A.H., Hayes, A.W. and Mehri, S., 2020. Tropisetron ameliorates cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 883, ID:173310. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173310>

6 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a dose de 200 mg/kg de ciclofosfamida por via intraperitoneal foi capaz de induzir cistite nas ratas Wistar.

A administração oral de *Lactobacillus acidophilus* reduziu o desenvolvimento de edema na bexiga dos animais assim como o tratamento com Mesna e manteve o peso corporal semelhante aos animais dos grupos controle.

Tanto o tratamento com mesna quanto com lactobacilos não demonstraram alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos que pudessem estar afetando de forma negativa a saúde dos animais, constatando a capacidade dos lactobacilos em manter o bom funcionamento de rins, fígado e taxa glicêmica, sem a necessidade de ativação das células de defesa do organismo.

Os lactobacilos administrados aos animais tratados a curto prazo sugeriram a promoção de uma imunoestimulação ao organismo.

O tratamento a curto e longo prazo com lactobacilos foi capaz de manter as características morfológicas e histológicas do urotélio dos animais, tanto quanto observado pelo tratamento com Mesna, indicando um efeito uroprotetor dos lactobacilos contra os metabólitos urotóxicos da ciclofosfamida.

Portanto, o tratamento com *Lactobacillus acidophilus* é capaz de atenuar os efeitos inflamatórios ocasionados pela ciclofosfamida, sendo possível sugerir a utilização de lactobacilos no tratamento da cistite hemorrágica, porém mais estudos são necessários para melhor elucidação e aprofundamento dos aspectos anti-inflamatórios, além da forma de utilização, dosagem e dos mecanismos que possam estar envolvidos na ação destes probióticos.

7 ANEXOS

7.1 Parecer de aprovação do comitê de ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Dourados-MS, 27 de maio de 2021.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da Eficácia de *Lactobacillus spp.* e nanopartículas de *Quitosana* no tratamento da Cistite induzida por ciclofosfamida em ratas *Wistar***", registrada sob o protocolo de nº 03/2020, sob a responsabilidade de *Márcio Eduardo de Barros e Liandra Ferreira Minhos* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal Da Grande Dourados, em reunião de 30/04/2020.

<i>Finalidade</i>	() Ensino (X) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	10/07/2020 a 10/12/2020
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Nº de animais</i>	48
<i>Peso/idade</i>	150 g / 7 semanas
<i>Sexo</i>	Fêmeas
<i>Origem</i>	Biotério Central UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA