



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS**  
**NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



Avaliação das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes  
de *Morus nigra* L. (*blackberry*) em um modelo murino de  
sepsse induzido por LPS

**KARINE DE PÁDUA LÚCIO**

Ouro Preto

2018

KARINE DE PÁDUA LÚCIO

Avaliação das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes  
de *Morus nigra* L. (*blackberry*) em um modelo murino de  
sepsis induzido por LPS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e  
Fisiológica

**Orientadora:** Prof. Dr<sup>a</sup> Daniela Caldeira Costa.

**Co-orientador:** Prof. Dr Allan Jefferson Cruz Calsavara

Ouro Preto

2018



**Universidade Federal  
de Ouro Preto**

*Reitor*

Prof.<sup>a</sup>. Cláudia Aparecida Marliére de Lima

*Vice-Reitor*

Prof. Hermínio Arias Nalini Júnior

*Pro-Reitor de Pesquisa e Pós Graduação*

Prof. Sérgio Francisco de Aquino

## **NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

*Coordenador*

Prof. Rogélio Lopes Brandão

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

*Coordenador*

Prof. Alexandre Barbosa Reis

L963a Lúcio, Karine de Pádua.  
Avaliação das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes de *Morus nigra* L. (blackberry) em um modelo murino de sepse induzido por LPS [manuscrito]  
/ Karine de Pádua Lúcio. - 2018.  
80f.: il.: color; graf; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Daniela Caldeira Costa.  
Coorientador: Prof. Dr. Allan Jefferson Cruz Calsavara.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.  
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Septicemia. 2. Inflamação. 3. Antioxidantes. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Calsavara, Allan Jefferson Cruz. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.94



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**Biológicas**



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Aos 06 dias do mês de abril do ano de 2018, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Karine de Padua Lucio, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Presidente - UFOP), pelo Prof. Gustavo Henrique Bianco de Souza (Membro - UFOP), pelo Prof. Leonardo Maximo Cardoso (Membro - UFOP) e pelo Prof. Allan Jefferson Cruz Calsavara (Co-Orientador - UFOP). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Karine de Padua Lucio 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Avaliação das Propriedades Anti-Inflamatórias e Antioxidantes de Morus Nigra (Blackberry) em Um Modelo de Sepsis Induzido Por Lps", na área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos, para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Prof. Gustavo Henrique Bianco de Souza; segundo, Prof. Leonardo Maximo Cardoso; terceiro, Prof. Allan Jefferson Cruz Calsavara; quarto, Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 06 de abril de 2018.

Presidente: Daniela Caldeira Costa Calsavara

Membro: Gustavo Henrique Bianco de Souza

Membro: Leonardo Maximo Cardoso

Membro: Allan Jefferson Cruz Calsavara

*“As pessoas mais bem-sucedidas atingem o topo não porque  
são livres de limitações, mas porque agem apesar delas.”*  
*(Michael K. Williams)*

*Dedico este trabalho a Deus,  
à Virgem Maria e a minha família.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À querida orientadora, Daniela Caldeira Costa, por ter me recebido de forma tão generosa em sua equipe e ter oferecido todos os recursos possíveis para que esse trabalho fosse desenvolvido. Obrigada pelos ensinamentos, incentivo, apoio e suporte durante esses anos que trabalhamos juntas. Sou muito grata pela sua paciência e compreensão principalmente nessa etapa final do nosso trabalho. Tenho você como uma grande referência profissional. Obrigada por tudo!

Ao co-orientador, Allan Jefferson Cruz Calsavara, que contribuiu com sugestões importantes e pertinentes para enriquecer esse trabalho. Muito obrigada!



## AGRADECIMENTOS

Obrigada a Deus por me fortalecer a cada dia, pela proteção e por iluminar minha caminhada.

Agradeço aos meus pais pelo carinho e por sempre me incentivarem a lutar pelos meus sonhos. Serei eternamente grata por todo apoio que sempre me deram. Tudo o que eu consegui conquistar até hoje eu devo a vocês.

Aos meus irmãos, em especial minha irmã Patrícia. Muito obrigada por ser essa pessoa presente em minha vida, com quem sempre posso compartilhar minhas alegrias e angústias. Obrigada pelos conselhos, puxões de orelha e principalmente pelo carinho!

Aos queridos amigos e também companheiros na ciência, Ana Carolina, Pedro, Bruna e Sttefany. Foi um prazer compartilhar meus dias de mestranda com vocês. Obrigada pelo companheirismo e generosidade de todos. Sou muito grata a Deus por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho. Estarei sempre torcendo pelo sucesso da equipe LBM e pelo sucesso pessoal e profissional de cada um de vocês. Sentirei muita saudade de todos.

À Carol, que foi quem me iniciou no mundo da pesquisa quando me acolheu como aluna de iniciação científica há aproximadamente sete anos atrás. Você se tornou uma grande amiga.

Às queridas Alice, Ana Maria, Mayara e Juliana pela companhia durante os experimentos, almoços no RU e pelos incontáveis lanches vespertinos na cantina do ICEB.

Aos amigos que fiz nos laboratórios vizinhos, em especial, à Aninha (LABIIN) e Leticia (LBTM). Obrigada pelo apoio, troca de experiências e também pela amizade.

Jamais poderia deixar de agradecer aos ex-alunos do LBM, em especial ao Joamyr, Carol, Glaucy, Bruno, Aline Mairynk, Lorena, e aos demais. Muitas das metodologias que utilizamos atualmente para testar nossas hipóteses foram brilhantemente padronizadas por vocês e é graças a elas que conseguimos trabalhar em nossos projetos.

Aos técnicos dos laboratórios que nos deram suporte para execução desse trabalho. Agradeço de forma particular aos técnicos Sr. Jair, Clodoaldo e Renata Rebeca. Obrigada por todo auxílio e presteza.

Agradeço aos professores André Talvani, Frank Bezerra, Célio Brandão, Gustavo Bianco e aos seus alunos pela parceria que ajudou a enriquecer nosso trabalho.

## **AGRADECIMENTOS AOS COLABORADORES**

Laboratório de Biologia Molecular e Celular;

Laboratório de Farmacognosia;

Laboratório de Imunologia da Inflamação;

Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos;

Laboratório de Imunoparasitologia;

Laboratório Fisiopatologia Experimental

Obrigado pelo suporte necessário para a realização deste trabalho.

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM)** e **Laboratório de Nutrição Experimental (Labnex)** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto com o auxílio financeiro da CAPES, FAPEMIG, CNPq e UFOP.

# SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS .....	XIVX
LISTA DE FIGURAS .....	XVX
RESUMO .....	XXI
ABSTRACT.....	XXII
<b>CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 – SEPSE - CONCEITOS E ASPECTOS RELEVANTES .....	3
2.2 – MODELOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS PARA O ESTUDO DA SEPSE .....	5
2.3- MECANISMOS MOLECULARES E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ENVOLVIDOS NA FISIOPATOLOGIA DA SEPSE .....	6
2.4- A IMPORTÂNCIA DO FÍGADO NA SEPSE .....	7
2.4- SEPSE E OS ANTIOXIDANTES.....	9
2.5- AMOREIRA PRETA (MORUS NIGRA. L) E SUAS PROPRIEDADES MEDICINAIS .....	12
<b>CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 – OBJETIVO GERAL.....	14
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
4.1 – MATERIAL BOTÂNICO.....	15
4.1.1 – <i>Obtenção da polpa amora</i> .....	15
4.1.2 – <i>Obtenção do extrato das folhas de amoreira</i> .....	15
4.2 – CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS .....	16
4.3 ANIMAIS E CUIDADOS ÉTICOS.....	16
4.4 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	17
4.5 - MANIFESTAÇÕES SISTÊMICAS PÓS-INDUÇÃO DA SEPSE .....	18
4.5.1 – <i>Curva de sobrevivência</i> .....	18
4.5.2 – <i>Análise do lavado bronco-alveolar</i> .....	19
4.5.3 - <i>Glicose sérica</i> .....	19
4.5.4- <i>Plaquetas</i> .....	19
4.6 - <i>Dosagem de citocinas</i> .....	19
4.7 – ANÁLISE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	20
4.7.1 – <i>Atividade da superóxido dismutase (SOD)</i> .....	20
4.7.2 – <i>Atividade da catalase (CAT)</i> .....	20
4.6.3 – <i>Glutaciona total e razão GSH/GSSG</i> .....	21
4.7.4 – <i>Atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx)</i> .....	22
4.7.5 – <i>Atividade da glutaciona redutase (GR)</i> .....	23
4.8 – <i>Dosagem de proteínas Totais</i> .....	24
4.9 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QRT-PCR) .....	25
4.9.1- <i>Extração do RNA</i> .....	25
4.9.2 – <i>Síntese do DNA complementar (cDNA)</i> .....	25
4.9.3 - <i>Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores</i> .....	26
4.9.4 - <i>Curva de eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores</i> .....	27
4.9.5 - <i>qRT-PCR</i> .....	27
4.10 - ZIMOGRAFIA.....	28
4.11 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO .....	29
4.12– ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
<b>CAPÍTULO 5 – RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 - ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	30
5.1.2- <i>Análise cromatográfica e espectral do extrato das folhas e da polpa de Morus nigra L.</i> .....	30
5.2 - ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	35
5.2.1 - <i>Manifestações sistêmicas após desafio com LPS</i> .....	35

5.3 - DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	37
5.3.1 – SOD, CAT e razão SOD/CAT.....	37
5.3.2 - <i>Glutathione peroxidase, redutase, total, oxidada, reduzida e razão (GSH/GSSG)</i> .....	38
5.4 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE <i>MORUS NIGRA L.</i> NO TECIDO HEPÁTICO .....	40
5.5 - EFEITO DA POLPA E DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>MORUS NIGRA</i> SOBRE A ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASE MMP-2 E MMP-9 .....	42
5.6- ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO.....	43
<b>CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS</b>	
A- Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico.....	62
B- Comprovante de cadastro no SisGen.....	63

## LISTA DE SIGLAS

ACCP: *American College of Chest Physicians*

LBA: Lavado bronco-alveolar

LPS: Lipopolissacarídeo

BSA : *Bovine serum albumin*

CAT: Catalase

CLUE-EM: Cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a espectrômetro de massas

CLUE-DAD-EM: Cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos acoplada a espectrômetro de massas

CLP: *Cecal ligation and puncture*

CCL-2: Quimiocina ligante 2

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DAD: Detector de arranjo de diodos

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTNB: Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EFLA: Extrato fluido livre de açúcar

EFS :Extração em fase sólida

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

GSHt: Glutathione total

GSSG: Glutathione oxidada

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peróxido de hidrogênio

HClO: Ácido hipocloroso

ILAS: Instituto latino americano da sepse

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IFN- $\gamma$ : Interferon gama

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

MMP-2: Metaloproteinase de matriz tipo 2

MMP-9: Metaloproteinase de Matriz tipo 9

MTT: *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*

NaCl :Cloreto de sódio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido)

NADP<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidado)

NO: Óxido nítrico

NF-κB: Fator de transcrição nuclear κB

OMS: Organização mundial de saúde

O<sup>•2-</sup>: Ânion superóxido

OH<sup>•</sup> : Radical hidroxila

PAF: Fator ativador de plaquetas

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PBS: Solução Salina Tamponada

PNPMF: Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos

SCCM: *Society of Critical Care Medicine*

SOD: Superóxido dismutase

SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment*

SSA: Ácido de sulfosalicílico

TNF: Fator de necrose tumoral

UV: Ultra violeta

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise qRT- PCR.....	26
Tabela 2- Compostos químicos identificados na do extrato das folhas de <i>Morus nigra</i> L.....	30
Tabela 3. Compostos químicos identificados na polpa de <i>Morus nigra</i> L.....	32
Tabela 4 - Resumo dos principais resultados observados com o pré-tratamento com o extratos das folhas e polpa de <i>Morus nigra</i> sobre os mediadores inflamatórios, status redox e manifestações sistêmicas em modelo experimental de sepse induzida por LPS.....	53



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de ativação imune e de imunossupressão que podem ser desencadeadas no fígado durante a sepse.....	9
Figura 2: Foto da árvore e frutos da amora ( <i>Morus nigra L.</i> ).....	12
Figura 3: Delineamento experimental.....	18
Figura 4: Perfil do extrato das folhas de <i>Morus nigra L.</i> .....	29
Figura 5: Perfil da polpa de <i>Morus nigra L.</i> .....	31
Figura 6: Estruturas químicas dos compostos identificados na composição da polpa e do extrato das folhas de <i>Morus nigra L.</i> .....	43
Figura 7: Avaliação da taxa de sobrevivência, infiltrado de leucócitos no lavado broncoalveolar, plaquetas, glicemia, concentrações séricas de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 em camundongos C57BL/6 tratados ou não com extrato das folhas ou polpa de <i>Morus nigra L.</i> .....	37
Figura 8: Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e razão SOD/CAT em fígado de camundongos C57BL/6 tratados ou não com extrato das folhas ou polpa de <i>Morus nigra L.</i> .....	39
Figura 9: Efeito de <i>Morus nigra</i> sobre glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, glutathiona total, glutathiona reduzida, glutathiona oxidada e razão GSH/GSSG em fígado de camundongos C57BL/6 tratados ou não com extrato das folhas ou polpa de <i>Morus nigra L.</i> .....	40
Figura 10: Avaliação da expressão e concentração de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF e CCL2 em fígado de camundongos C57BL/6 tratados ou não com extrato das folhas ou polpa de <i>Morus nigra L.</i> .....	42
Figura 11: Análise da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 em homogenato de tecido hepático de camundongos C57BL/6 tratados ou não com extrato das folhas ou polpa de <i>Morus nigra L.</i> .....	43
Figura 12: Análise histológica do fígado de camundongos C57BL/6 tratados ou não com extrato das folhas ou polpa de <i>Morus nigra L.</i> .....	44

## RESUMO

A sepse é uma doença complexa, de alta incidência nas unidades de terapia intensiva (UTIs) sendo a causa de muitos óbitos no mundo inteiro. A patogênese da sepse envolve uma resposta inflamatória desregulada com consequente produção de mediadores inflamatórios e espécies reativas. A produção e liberação excessiva dessas substâncias na circulação sistêmica desencadeiam as diversas alterações celulares e metabólicas que são observadas durante a evolução da doença. Alguns trabalhos científicos tem investigado plantas como *Morus nigra* L., conhecida popularmente como amoreira-preta, pois sabe-se que as plantas desse gênero apresentam um grande potencial terapêutico. Estudos já mostraram que as plantas pertencentes a este gênero são ricas em metabólitos secundários como os flavonoides que apresentam atividades biológicas importantes. Com base nesse contexto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes de *Morus nigra* L. em modelo murino de sepse induzido por LPS. Para isso, camundongos machos da linhagem C57Bl/6, com oito semanas de idade e peso médio entre 20-25g foram distribuídos em quatro grupos experimentais, a saber: controle (C), sepse (S), sepse tratado com extrato das folhas da amoreira (SF) e sepse tratado com a polpa de amora (SP). Os animais foram tratados com 100µl de seus respectivos tratamentos, por gavagem, durante vinte e um dias. A sepse foi induzida no 21º através de injeção intraperitoneal com lipopolissacarídeo (LPS). Os animais foram eutanasiados 24 horas após receberem a injeção de LPS e amostras de plasma, fígado e lavado bronco-alveolar foram coletados e armazenados para análises posteriores. Os dados obtidos a partir das dosagens laboratoriais foram analisados no software *GraphPad Prism 5.0* para Windows (San Diego, California, USA). Nossos resultados mostraram que os tratamentos com a polpa e o extrato das folhas diminuíram significativamente o infiltrado de leucócitos nos pulmões e os níveis séricos de TNF nos animais sépticos. Com relação aos marcadores de processos redox, ambos os tratamentos diminuíram significativamente a atividade antioxidante da enzima glutathiona peroxidase (GPx). No que diz respeito à metaloproteinase do tipo 2 (MMP-2) observamos que o tratamento com a polpa da amora foi capaz de reduzir significativamente a atividade dessa enzima em relação ao grupo sepse. Por fim, esses resultados positivos em conjunto, promoveram o aumento na sobrevivência dos animais sépticos que receberam o extrato das folhas ou a polpa de amora.

**Palavras -chave:** Sepse, inflamação, processos redox, antioxidantes, *Morus nigra* L.

## ABSTRACT

Sepsis is a complex disease of high incidence in intensive care units (ICUs) and is the cause of many deaths worldwide. The pathogenesis of sepsis involves a deregulated inflammatory response with consequent production of inflammatory mediators and reactive species. The production and excessive release of these substances into the systemic circulation trigger the various cellular and metabolic alterations that are observed during the evolution of the disease. Some scientific works have investigated plants like *Morus nigra* L., popularly known as blackberry, because it is known that plants of this genus have great therapeutic potential. Studies have shown that plants belonging to this genus are rich in secondary metabolites such as flavonoids that have important biological activities. Based on this context, the objective of our study was to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant properties of *Morus nigra* L. in murine model of sepsis induced by LPS. For this, male mice of the lineage C57Bl / 6, with eight weeks of age and average weight between 20-25g were distributed in four experimental groups: control (C), sepsis (S), sepsis treated with leaf extract mulberry (SL) and sepsis treated with mulberry pulp (SP). The animals were treated with 100µl of their respective treatments, by gavage, for twenty one days. Sepsis was induced at the 21st through intraperitoneal injection with lipopolysaccharide (LPS). The animals were euthanized 24 hours after receiving the LPS injection and plasma, liver and bronchoalveolar lavage samples were collected and stored for further analysis. The data obtained from the laboratory dosages were analyzed in GraphPad Prism 5.0 software for Windows (San Diego, California, USA). Our results showed that treatments with pulp and leaf extract significantly decreased leukocyte infiltrate in the lungs and serum TNF levels in septic animals. Regarding the markers of redox processes, both treatments significantly decreased the antioxidant activity of the enzyme glutathione peroxidase (GPx). As regards metalloproteinase type 2 (MMP-2), we observed that the treatment with the blackberry pulp was able to significantly reduce the activity of this enzyme in relation to the sepsis group. Finally, these positive results together promoted an increase in the survival of the septic animals that received the leaf extract or the blackberry pulp.

**Keywords:** Sepsis, inflammation, redox process, antioxidants, *Morus nigra* L.

## CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

A utilização popular de plantas medicinais para o tratamento e cura de doenças é uma prática antiga na humanidade (RIBEIRO, 2014). Ainda nos dias atuais, a população utiliza diversas plantas e seus derivados naturais para seus cuidados com a saúde e segundo a organização mundial de saúde (OMS), até o ano de 2006 aproximadamente 80% da população mundial utilizavam plantas medicinais com objetivos terapêuticos (FIRMO *et al.*, 2011). Segundo Gurib-Fakim (2006), cerca de 25% das prescrições médicas contém formulações baseadas em compostos derivados de plantas ou algum análogo sintético originado a partir delas. Nesse sentido, percebe-se que as plantas constituem fontes importantes de substâncias com potencial farmacológico.

As plantas medicinais são, reconhecidamente, importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. Sabe-se que cerca de 40% dos medicamentos disponíveis atualmente foram desenvolvidos a partir de alguma fonte natural como as plantas por exemplo (CALIXTO, 2001). Além disso, algumas drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS foram produzidas a partir de plantas (RATES., 2001). Esse contexto evidencia a importância dos estudos com plantas medicinais para a melhor compreensão dos seus efeitos benéficos e possíveis malefícios das mesmas.

O Brasil concentra cerca de 20% da biodiversidade mundial e é considerado o país com o maior potencial de implementação de práticas de preparo e utilização de plantas medicinais na área da saúde (ALMEIDA., 2011). Com base nesse contexto, a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos (PNPMF), aprovada em 2006 visa a utilização sustentável dessa biodiversidade e estimula o surgimento de estudos científicos que comprovem a eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos para prevenção e tratamento de doenças (TEIXEIRA, 2012). Essa política tem contribuído de forma importante para ampliação dos estudos científicos com plantas medicinais e pode colocar o Brasil em posição de destaque na produção e comercialização de medicamentos fitoterápicos no mundo (CARVALHO *et al.*, 2008).

Nos últimos anos houve um aumento no interesse sobre compostos naturais que podem prevenir ou reduzir os danos causados pela indução de uma resposta inflamatória (KAMIYAMA & SHIBAMOTO.,2012). Acredita-se que substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias podem atuar de forma a modular essa resposta inflamatória e melhorar a resistência do organismo contra patógenos (CHOI *et al.*, 2016). Nesse sentido, a sepse é uma doença grave que envolve uma complexa resposta inflamatória sistêmica e provoca disfunções severas em órgãos vitais podendo levar os indivíduos ao óbito. Esta doença

caracteriza-se pela grande produção de mediadores inflamatórios que são liberados pelas células do sistema imune que são ativadas de forma sistemática no curso dessa doença. Destaca-se ainda, a participação de espécies reativas de oxigênio e/ ou nitrogênio que são parte do mecanismo de defesa do organismo contra patógenos, mas que na sepse causam um desequilíbrio redox, pois são produzidas de forma excessiva (PRAUCHNER *et al.*, 2016). Nos últimos anos, inúmeros estudos têm investigado os efeitos de compostos naturais sob a forma de substâncias isoladas (MAURYA *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2015) e também extratos de plantas na sepse (CHOI *et al.*, 2016) e em ambos os casos os resultados têm sido bastante positivos. As plantas têm se mostrado fontes valiosas de componentes bioativos com atividades terapêuticas (EREL *et al.*, 2011). E nesse contexto a planta *Morus nigra L.*, popularmente conhecida como amoreira preta se destaca como uma planta de grande interesse científico pois é amplamente utilizada pela população devido a suas propriedades nutricionais e terapêutica (HASSIMOTO, 2013). Sendo assim, a hipótese do trabalho baseou-se no fato de que se a amoreira-preta apresenta substâncias bioativas que lhe proporciona atividades antioxidantes e anti-inflamatória e, sendo a sepse uma doença que causa uma resposta inflamatória desregulada bem como um desequilíbrio redox, será que o pré-tratamento com a polpa de amora e extrato das folhas de amoreira poderia aumentar a sobrevida dos animais e minimizar o desequilíbrio redox e inflamatório observado na sepse.

## CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 – Sepsis - conceitos e aspectos relevantes

A sepsis é uma das principais causas de óbitos nas unidades de terapia intensiva (UTIs) no mundo, ficando atrás apenas das mortes causadas por doenças coronarianas (SHUKLA *et al.*, 2014). Nos Estados Unidos, a sepsis é responsável por quase metade das mortes que ocorrem nos hospitais (SIMON FINFER e MACHADO., 2016) A incidência da sepsis tem se elevado nos últimos anos devido a fatores como o crescimento da população idosa e de pacientes imunossuprimidos, ao maior número de procedimentos invasivos realizados nos hospitais e também ao uso indiscriminado de antimicrobianos. Além disso, o aumento das notificações dos casos dessa doença pode ser fator preponderante para o aumento da incidência de sepsis no mundo (ILAS, 2015).

Anualmente são contabilizados aproximadamente 18 milhões de novos casos dessa doença no mundo com taxas de mortalidade entre 28 a 40%. No ano de 2009, 258 mil pacientes sépticos foram admitidos nas unidades de terapia intensiva nos EUA (YAN *et al.*, 2014). Os dados epidemiológicos que mostram a incidência e mortalidade por sepsis no Brasil são escassos, no entanto Simon Finfer e Machado (2016) relataram que a taxa de óbitos por essa síndrome nas UTIs brasileiras é de 55,7%. Um estudo utilizou dados provenientes do sistema brasileiro de informação de mortalidade e fez uma análise retrospectiva das mortes causadas por sepsis que foram registradas entre os anos de 2002 e 2010. Os resultados mostraram um aumento expressivo no número de mortes durante esse período. No ano de 2002 foram registradas 982.294 e em 2010 foram reportadas 1,133,761 de óbitos provocados pela sepsis. Ainda de acordo com esse estudo a taxa de mortalidade foi superior para indivíduos do sexo masculino e com idade superior a 60 anos (TANIGUCHI *et al.*, 2014). Em 2003, um estudo multicêntrico com duração de 30 dias incluindo, de forma proporcional, 65 hospitais de todas as regiões do Brasil, mostrou que a taxa de mortalidade chega a 46,6% em pacientes acometidos pela sepsis (SILVA *et al.*, 2014). Uma análise mais cuidadosa desses dados epidemiológicos deixa evidente que a sepsis se tornou um problema de saúde que acarreta elevados custos principalmente para o sistema público de saúde. Estima-se o custo médio envolvido no tratamento de um caso nos EUA é de aproximadamente 38 mil dólares, já nos países europeus ele varia entre 26 mil e 32 mil dólares. Um estudo multicêntrico realizado no Brasil entre 2003 e 2004 (COSTS), avaliou os custos diretos com a terapia de pacientes sépticos a partir do instante em que são admitidos nas UTIs até o momento de alta ou óbito e mostrou que o gasto médio é de 9.632 dólares por paciente. Este estudo mostrou ainda que o

custo diário com cada paciente é de aproximadamente 934 dólares sendo maior no tratamento de pacientes que evoluem para óbito (SOGAYAR *et al.*, 2008). Esses dados mostram uma forte relação entre a gravidade do quadro clínico do paciente com o aumento dos gastos no seu tratamento.

Ao longo dos anos, as definições de sepse e seus estágios clínicos passaram por modificações. No início da década de 90 o *American College of Chest Physicians (ACCP)* e a *Society of Critical Care Medicine (SCCM)* elaboraram os primeiros conceitos de sepse e choque séptico a partir da observação de parâmetros clínicos e laboratoriais dessa doença. De acordo com essa conferência, a sepse seria uma síndrome inflamatória sistêmica em resposta a uma infecção que quando acometia de forma importante a função de um órgão passava a ser denominada sepse grave. Os pacientes poderiam ainda progredir para choque séptico, estágio caracterizado por uma hipotensão refratária mesmo após ressuscitação hídrica adequada (BONE *et al.*, 1991). Em 2001, essas mesmas sociedades realizaram nova conferência no intuito de rever as definições e também os critérios diagnósticos da sepse (LEVY *et al.*, 2003). Nessa conferência, os critérios diagnósticos foram ampliados, no entanto as definições de sepse foram pouco modificadas.

Uma revisão mais atual dos conceitos de sepse e seus estágios clínicos foi realizada em 2014 por uma equipe de saúde composta por profissionais especialistas em cuidados intensivos que foram convocados pela *European Society of Intensive Care Medicine* e pela *The Society of Critical Care Medicine* (SINGER *et al.*, 2016). Auxiliados pelo conhecimento mais recente sobre as manifestações clínicas e laboratoriais da sepse e pelos registros eletrônicos dos inúmeros pacientes diagnosticados com essa doença, esses profissionais reformularam as definições de sepse com o intuito de melhorar os critérios diagnósticos e aumentar a rapidez com que esses pacientes recebem as intervenções terapêuticas. A partir dessa conferência, a sepse passou a ser definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. Entende-se por disfunção orgânica, a variação em 2 pontos no score SOFA. O score SOFA é uma ferramenta de predição de gravidade comumente utilizada nas unidades de terapia intensiva para avaliar, diariamente, o quadro dos pacientes internados nesse local. Segundo essas novas definições o estágio mais grave dessa doença, o choque séptico seria caracterizado por anormalidade celular/metabólica importante o suficiente para causar um aumento no risco de morte dos pacientes. Nesse estágio da doença os pacientes apresentam lactato sérico acima de 2mmol/L (18mg/dL) e uma hipotensão persistente que necessita de utilização de agentes vasopressores

para que a pressão arterial média se mantenha igual ou superior a 65mmHg (SINGER *et al.*, 2016).

## **2.2 – Modelos experimentais utilizados para o estudo da sepse**

A pesquisa básica tem utilizado modelos experimentais de sepse para compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese dessa doença e também para tentar descobrir possíveis alvos de intervenção terapêutica. Os modelos mais utilizados atualmente são os de endotoxemia, de administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) e o de perfuração e ligação do ceco (CLP) (ALVAREZ *et al.*, 2016). O modelo de endotoxemia consiste na administração de bactérias vivas ou de suas toxinas diretamente na corrente sanguínea dos animais e apresenta como vantagem, a capacidade de reproduzir muitos dos sintomas e sinais clínicos da sepse como as alterações hemodinâmicas e cardiovasculares bem como produção de grandes quantidades de citocinas na circulação. Uma desvantagem relacionada a esse modelo é que a incidência de sepse desencadeada pela entrada rápida de grande quantidade de bactérias ou toxinas microbianas na circulação sistêmica é pequena e isso faz surgir alguns questionamentos quanto à capacidade desse modelo de simular, de forma fidedigna, a evolução da doença que é observada em humanos (BENJAMIM., 2001). Um segundo modelo experimental de indução de sepse é o de administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS). Esse modelo tem sido amplamente utilizado por pesquisadores, pois, além de simular os sintomas e sinais clínicos da sepse ele possui notável reprodutibilidade e fácil execução (ALVAREZ e BOVERIS., 2004). Ao contrário do que se observa no modelo de endotoxemia, a introdução de antígenos microbianos no peritônio dos animais se assemelha mais ao que acontece na clínica já que a patologia se desenvolve a partir de um foco infeccioso e apenas posteriormente alcança a circulação sistêmica. É um modelo de evolução aguda e esse seria um ponto negativo a sua utilização uma vez que pode-se perder muitos animais nas horas seguintes à administração de LPS aos animais. O modelo de CLP é um dos mais utilizados e segundo evidências científicas, é o modelo que mais se assemelha à sepse clínica. Consiste em um procedimento cirúrgico no qual é feita uma ligação do ceco logo abaixo da válvula íleo-cecal. A ligadura pode causar uma isquemia mesentérica que culmina na perfuração intestinal e liberação do conteúdo fecal na cavidade abdominal. Essa sequência de eventos leva a uma peritonite bacteriana que na clínica é denominada sepse abdominal (ALVAREZ *et al.*, 2016). Um estudo comparou a taxa de mortalidade, resposta inflamatória aguda e morbidade entre os modelos de administração intraperitoneal de LPS e de CLP. Neste estudo, os autores



relataram haver poucas diferenças entre as metodologias com relação à evolução da doença. Eles observaram que a atividade motora, a letalidade, a letargia provocada pela doença e as alterações hematológicas periféricas foram semelhantes. No entanto, a concentração sérica de citocinas foi maior nas horas iniciais do desenvolvimento da sepse nos animais que receberam LPS via intraperitoneal. O mesmo comportamento de produção de citocinas foi observado no lavado peritoneal (REMICK *et al.*, 2000).

Os modelos animais de indução de sepse são ferramentas importantes e necessárias para o estudo dessa síndrome. Cada metodologia possui suas vantagens e aspectos limitantes e cabe ao pesquisador escolher o modelo que mais se adequa aos seus objetivos científicos.

### **2.3- Mecanismos moleculares e manifestações clínicas envolvidos na fisiopatologia da sepse**

A sepse pode ser desencadeada após a infecção por fungos, vírus e bactérias sendo que este último está correlacionado com a maioria dos casos diagnosticados (ILAS, 2015). Dentre as bactérias capazes de causar uma resposta inflamatória sistêmica desregulada, destaca-se a participação de bactérias Gram-negativas que possuem estruturas altamente imunogênicas denominadas lipopolissacarídeos (LPS). Essa endotoxina presente na membrana externa dessas bactérias é constituída por unidades repetidas de oligossacarídeos ligados ao lipídio A. No organismo do hospedeiro, o LPS pode ser reconhecido pelas células do sistema imune inato através de receptores *Toll like* do tipo 4 (TLR4). Esses receptores encontram-se expressos na superfície de células como macrófagos e neutrófilos e se especializaram no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (GAO e LI., 2017). Os receptores *Toll like* possuem um domínio extracelular composto por repetições de leucina ligados a um domínio TIR (receptor Toll-IL-1) intracelular que é responsável pela transmissão do sinal para o interior das células (KUZMICH *et al.*, 2017). A transdução de sinal via receptores TLR4 induz a ativação do NF- $\kappa$ B, que é um fator de transcrição capaz de estimular a transcrição de genes que codificam importantes mediadores inflamatórios como o TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 entre outros (SHUKLA *et al.*, 2014). A produção e posterior liberação dessas substâncias estimulam intensa resposta celular, e produção de mediadores inflamatórios secundários como outras citocinas, fatores do complemento, prostanóides, espécies reativas de oxigênio e fator ativador de plaquetas (PAF). Essas moléculas causam reativação dos fagócitos e da cascata inflamatória e dessa forma o estímulo inicial é perpetuado (CHOUSTERMAN *et al.*, 2017). Os mediadores inflamatórios são de extrema

importância para a resposta imunológica do hospedeiro contra o agente infeccioso, porém, durante a sepse o que se observa é uma liberação excessiva dessas moléculas. Essa resposta inflamatória desregulada promove várias modificações no endotélio vascular e nas funções de diferentes órgãos e tecidos. Esses mediadores são capazes de ativar cascata da coagulação, provocar dano endotelial difuso, aumentando a permeabilidade capilar causando edema intersticial. Essas alterações em conjunto, irão promover danos nos diferentes tecidos (SHUKLA *et al.*, 2014) e são na maior parte dos casos deletérias, podendo levar os pacientes ao óbito.

#### **2.4- A importância do fígado na sepse**

A sepse pode causar danos em órgãos que desempenham importantes funções no organismo como, por exemplo, o fígado.

O fígado é responsável por funções como desintoxicação, armazenamento, produção de energia, conversão de nutrientes, balanço hormonal e está envolvido até mesmo no processo de coagulação (CANABAL e KRAMER., 2008). Por exercer esse papel central na homeostase metabólica, os possíveis danos hepáticos causados pela sepse tem sérias implicações no prognóstico dos pacientes acometidos por essa doença.

Estudos clínicos e experimentais sugerem que a disfunção hepática é um dos sinais precoce da sepse, sendo considerado um fator de risco independente para um mau prognóstico da doença. Sabe-se que cerca de 39,9% dos pacientes sépticos apresentam disfunções hepáticas e 8,5% progridem para a falência desse órgão, além disso, esses pacientes apresentam uma elevada taxa de mortalidade, podendo chegar aos 68% (YAN., *et al* 2014). A grande susceptibilidade desse órgão aos insultos causados pela sepse deve-se em grande parte a sua localização anatômica que o torna permanentemente exposto a antígenos circulantes, endotoxinas e aos próprios microrganismos provenientes tanto do trato gastrointestinal através da veia porta hepática como também da circulação sistêmica (STRNAD *et al.*,2014). Essa constante exposição a sinais de danos também evidencia a importância desse órgão como um componente efetivo da resposta imunológica frente a agentes infecciosos.

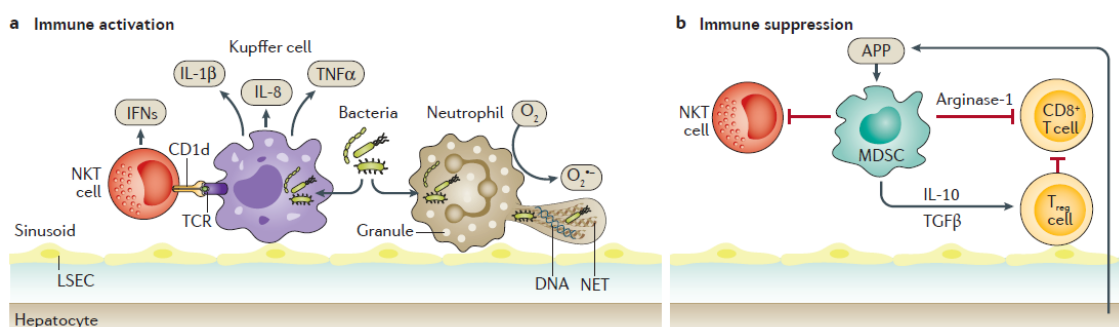
O tecido hepático é capaz de eliminar bactérias e seus produtos tóxicos da circulação sanguínea através da ação de vários tipos celulares presentes nesse órgão. Nesse contexto, destaca-se a ação das células de Kupffer, células do endotélio sinusóide, células estreladas e neutrófilos. Esses tipos celulares constituem a primeira linha de defesa deste órgão e quando

ativadas são responsáveis por regular a resposta imunológica seja através do aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios ou pela liberação de moléculas com atividade imunossupressoras.

Quando células estreladas e células de Kupffer são expostas a antígenos, elas rapidamente são ativadas e iniciam a produção de citocinas inflamatórias (TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  e CCL2). Através de quimiotaxia, neutrófilos e monócitos são recrutados para o tecido hepático e emitem sinais químicos para os hepatócitos que passam induzir a transcrição de genes que codificam mediadores inflamatórios e proteínas de fase aguda. Dessa forma, observa-se uma grande concentração de células do sistema imune no fígado no intuito de conter e neutralizar o agente infeccioso (TACKE e ZIMMERMANN., 2014). Estudos já evidenciaram que o fígado contribui de forma significativa para a produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio amplificando a resposta inflamatória sistêmica durante a sepse. Esse processo compromete o funcionamento de outros órgãos e sistemas, o que poderá agravar ainda mais a saúde dos pacientes e aumentar a taxa de mortalidade dos mesmos (SIORE *et.al.*, 2005).

Uma segunda resposta desencadeada pelo fígado frente ao estímulo imunológico produzido pelo agente infeccioso é a da imunossupressão (GUSTOT *et al.*, 2009). As proteínas de fase aguda que foram liberadas pela ativação das células de *Kupffer*, atraem monócitos e neutrófilos com atividades imunossupressoras. Essas células passam a secretar citocinas anti-inflamatórias como IL-10, Fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ). Esse mecanismo de imunossupressão pode induzir a tolerância do fígado a toxinas, suprimir a resposta inflamatória sistêmica e proteger os demais órgãos de possíveis danos durante a sepse (STRNAD *et al.*, 2016). No entanto, nem sempre o desenvolvimento dessa resposta imunossupressora do fígado será benéfica. Estudos já mostraram que pacientes que desenvolveram dessensibilização a toxinas passaram a apresentar monócitos com baixa expressão de receptores TLR4 com conseqüente diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF e, por isso, tornaram-se mais susceptíveis a reinfecções, causando também aumento no índice de mortalidade (BROAD *et al.*, 2006). Essas duas respostas podem ser visualizadas na figura abaixo (Fig 1).

**Fig 1.** Mecanismos de ativação imune (A) e de imunossupressão (B) que podem ser desencadeadas no fígado durante a sepse. (STRNAD *et al.*, 2016).



Com base no que foi exposto fica evidente o importante papel do fígado na resposta imune durante a sepse uma vez que ele contribui de forma satisfatória para a depuração de bactérias e outras toxinas e também é capaz de controlar a resposta inflamatória sistêmica por meio de mecanismos de imunossupressão. Nesse sentido, a avaliação da função hepática na sepse mostra-se relevante já que possui grande impacto sobre o prognóstico dos pacientes e pode ainda ser utilizada como um poderoso preditor de mortalidade nas unidades de terapia intensiva.

## 2.4- Sepse e os antioxidantes

A resposta inflamatória envolve a ativação de células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos). Macrófagos e neutrófilos são capazes de produzir uma variedade de produtos tóxicos para eliminar microrganismos patogênicos. Nesse contexto, destaca-se a produção de espécies reativas como o óxido nítrico (NO), o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que são utilizadas como um efetivo mecanismo de defesa contra agentes estranhos ao organismo (CARVALHO *et al.*, 2003). O aumento dessas substâncias é decorrente do aumento na expressão e atividade de importantes complexos enzimáticos presentes nos fagócitos como a NADPH oxidase que produz o ânion superóxido; a mieloperoxidase, que converte o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ácido hipocloroso (HClO) e radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) e ainda a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) responsável pela produção de NO (PARIHAR *et al.*, 2008). Durante a sepse observa-se um aumento excessivo dessas espécies reativas já que a resposta inflamatória se encontra desregulada e há intensa ativação das células fagocíticas. Essas espécies reativas são fortes oxidantes e podem reagir com importantes macromoléculas como proteínas, lipídios e até mesmo ácidos nucleicos alterando

a suas estruturas químicas e comprometendo o funcionamento de órgãos e sistemas (BREALEY *et al.*, 2002).

Sabe-se que células e tecidos apresentam mecanismos de defesas antioxidantes que previnem a produção de espécies reativas e mantêm o balanço redox da célula ou tecido (RAINS & JAIN, 2011). Antioxidantes são definidos como componentes que podem doar pelo menos um átomo de hidrogênio a um radical livre, agindo de forma preventiva contra a formação de espécies reativas, ou interceptando as reações através da inativação das espécies reativas que estejam em atividade. Os antioxidantes de forma geral podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (VINCENT, 2004; SIES, 1993).

Defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx), a glutatona redutase (GR) e a catalase (CAT). Antioxidantes não-enzimáticos são representados por ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatona (GSH), carotenóides, flavonóides e outros antioxidantes, os quais são capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs) (BOUDERBALA *et al.*, 2010 e LEE *et al.*, 2009). Dentre as principais enzimas antioxidantes, destacam-se a SOD, CAT e GPx.

A enzima SOD é capaz de converter o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Nos sistemas eucariontes existem três formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco (Cu/Zn-SOD) está presente principalmente no citoplasma e nos fluidos extracelulares, a SOD-manganês (Mn-SOD) está localizada principalmente nas mitocôndrias, enquanto que a SOD extracelular é exclusiva dos fluidos extracelulares. Esta enzima tem papel fundamental na defesa do organismo contra o ataque de EROs, pois atua através da dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (MARKLUND *et al.*, 1982). O  $H_2O_2$  formado pela SOD é rapidamente difundido através da membrana mitocondrial e transformado em água por enzimas antioxidantes como CAT e GPx (NAUDI *et al.*, 2012).

A catalase é uma hemoproteína que se localiza nos peroxissomos e catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (AEBI, 1984). É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (SCOTT *et al.*, 1991).

A glutatona peroxidase é uma enzima dependente de selênio que ao catalisar o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos converte a glutatona reduzida para o seu estado oxidado. Por isso outra enzima fundamental é a glutatona redutase, que regenera a glutatona

usada como doadora de hidrogênio pela GPx durante a eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (JOHANSEN *et al.*, 2005).

Durante a sepse, o aumento excessivo de espécies reativas pode depletar as defesas antioxidantes dos pacientes causando desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes corporais. Esse processo caracteriza o desequilíbrio redox celular (PRAUCHNER, *et al* 2016).

O desequilíbrio redox contribui de forma negativa para a progressão da sepse e nesse sentido muitos estudos tem avaliado os efeitos de compostos antioxidantes nessa síndrome. Mayura e colaboradores (2014) realizaram um estudo com camundongos albinos em um modelo de sepse induzido por CLP. Nesse trabalho os animais receberam ácido gálico (20mg/kg) durante os dois dias anteriores à indução da sepse e foram observadas significativas melhoras nos biomarcadores de desequilíbrio redox. Os autores observaram uma melhora significativa nas atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase e diminuição da lipoperoxidação nos animais que receberam o tratamento em relação aos não tratados.

Um estudo realizado com ratos sépticos que receberam ácido ascórbico (100mg/kg) mostrou que o tratamento foi capaz de reduzir a concentração sérica de aminotransferases, reduziu a peroxidação lipídica e aumentou a concentração hepática de glutathiona reduzida (GSH) nos animais que receberam o antioxidante (KIM e LEE., 2004). Silva *et al* (2016) avaliaram os efeitos da curcumina, um polifenol com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, em ratos *Wistar* submetidos a CLP. Os animais foram tratados com uma dispersão desse composto, via gavagem, sete dias antes de serem submetidos à indução da sepse e os resultados mostraram um significativa redução de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-6 no plasma e no lavado peritoneal, também houve redução das alterações volêmicas e glicêmicas que são tipicamente observadas na sepse.

Diversos estudos pré-clínicos têm relacionado os efeitos benéficos de compostos antioxidantes, principalmente à capacidade que eles têm de inibir a atividade transcricional do NF-kB, que é um importante fator de transcrição envolvido na resposta pró-inflamatória (SUN *et al.*,2010). Esses estudos mostram resultados animadores quanto à suplementação de antioxidantes e seu efeito sobre a resposta inflamatória em animais que são submetidos à sepse experimental, indicando que uma maior concentração desses compostos no organismo pode ser fundamental para o aumento da sobrevida e para modulação das alterações

patológicas que ocorrem durante a sepse. E nesse sentido muitos estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos benéficos potenciais de compostos antioxidantes isolados bem como de plantas medicinais em modelos experimentais de sepse.

## 2.5- Amoreira preta (*Morus nigra L.*) e suas propriedades medicinais

A utilização de plantas medicinais como forma de prevenção, tratamento e cura de doenças é uma antiga prática medicinal da humanidade (JUNIOR *et al*, 2005). Segundo a OMS, 85% da população mundial faz uso de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades, sendo que no Brasil 82% da população utiliza esse tipo de tratamento (FRANZOTTI, 2006). Nesse contexto, estudos estão sendo constantemente realizados com o objetivo de comprovar e validar os conhecimentos populares.

*Morus nigra L.* ou amoreira-preta, como é conhecida popularmente, é uma planta nativa do continente asiático que pertence à família Moraceae (PADILHA *et al*, 2009). Plantas desse gênero possuem porte médio e podem atingir de 4 a 5 metros de altura, possuem casca ligeiramente rugosa, escura e copa grande (Figura 2 A). As folhas têm coloração verde, com uma leve pilosidade que as tornam ásperas. As flores são de cor branco-amarelada e tamanho reduzido. As amoreiras crescem bem em todas as regiões do Brasil, apresentam crescimento rápido, e adaptam-se a qualquer tipo de solo, mas preferem os úmidos e profundos. No Brasil, a frutificação ocorre, geralmente, de setembro a novembro. Os frutos são pendentes e, quando completamente maduros, apresentam coloração de vermelho-escuro a quase preta com polpa vermelho-escuro comestível (Figura 2B). A coloração dos frutos pode variar de acordo com a espécie à qual pertencem e conforme o seu grau de maturação (EMBRAPA, 2008).

**Figura 2:** Foto da árvore (A) e frutos (B) da amora (*Morus nigra L.*)



Muitas espécies do gênero *Morus* podem ser encontradas em vários países e praticamente todas as partes da árvore tem sido utilizadas para ações farmacológicas no mundo (SINGAB *et al.*, 2005; PAWLOWSKA *et al.*, 2008).

Sabe-se que a *Morus nigra* contém substâncias químicas solúveis conhecidas como bioflavonóides. A esses compostos tem sido atribuído diversas propriedades medicinais do gênero *Morus* (URSELL, 2000; GONZÁLEZ *et al.*, 2010). Essa planta apresenta ainda, elevada quantidade de metabólitos secundários, sendo os principais, pertencentes à classe dos compostos fenólicos, responsáveis pela adstringência e sabor ácido que o fruto apresenta (ÖZGEN *et al.*, 2009). Quando comparada as outras duas principais espécies do gênero *Morus*, *Morus alba* e *Morus rubra*, a *Morus nigra* apresenta os maiores teores de compostos fenólicos totais e flavonóides (ERCISLI; ORHAN, 2007).

Pesquisas já demonstraram que extratos obtidos a partir dos frutos de amora exibem potencial antioxidante quando comparados ao antioxidante de referência trolox. Segundo Arfan (2012) o extrato fluido livre de açúcar (EFLA) da amora possui maiores teores de compostos fenólicos totais: 164mg/g (metanólico SFE) e 173mg/g (acetônico SFE), além de ácidos fenólicos, flavonoides, ácido clorogênico e rutina quando comparados ao EFLA da amora branca (ARFAN *et al.*, 2012).

Os frutos da amoreira são usados como anti-inflamatórios e agentes hemostáticos, a casca como analgésico nas odontalgias, as folhas como antídotos para picadas de cobra (SINGAB *et al.*, 2005; PAWLOWSKA *et al.*, 2008). Na Europa, as folhas da amoreira têm sido utilizadas para estimular a produção de insulina no tratamento do diabetes (ODY MNIMH, 2000; NADERI *et al.*, 2004).

Com relação à atividade anti-inflamatória dessa planta alguns estudos já demonstraram que os frutos são capazes de regular a resposta imunológica desencadeada por antígenos (HASSIMOTTO *et al.*, 2013), enquanto outras pesquisas revelaram que essa propriedade medicinal era exibida pelo extrato das raízes dessa planta (HUANG *et al.*, 2013). Padilha e colaboradores em 2010 demonstraram que as folhas de *Morus nigra* possuíam potencial anti-inflamatório, mas não estabeleceram seu mecanismo de ação.

Até o momento, poucas são as pesquisas direcionadas para a investigação dos efeitos das folhas e da polpa de *Morus nigra L.* no curso de uma resposta inflamatória sistêmica desregulada como a que ocorre na sepse.



## CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS

### 3.1 – Objetivo Geral

Avaliar as atividades anti-inflamatórias e antioxidantes de *Morus nigra L.* (blackberry) em um modelo de sepse induzido por LPS.

### 3.2 – Objetivos Específicos

#### Objetivo Específico 1 (Ensaio “*in vitro*”)

- Caracterizar a polpa e extrato das folhas de *Morus nigra L.* em relação a sua composição fitoquímica.

#### Objetivo Específico 2 (Ensaio “*in vivo*”)

- I- Avaliar a taxa de mortalidade dos animais após injeção de LPS;
- II- Avaliar as manifestações sistêmicas após desafio com LPS;
- III- Avaliar perfil inflamatório sistêmico após desafio com LPS;
- IV- Em amostras de fígado de animais controles e sépticos tratados ou não com a polpa ou o extrato das folhas de *Morus nigra L.*:
  1. Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutationala peroxidase e glutationala redutase;
  2. Quantificar glutationala total, oxidada e reduzida;
  3. Avaliar a atividade enzimática das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9);
  4. Quantificar citocinas pró e anti-inflamatórias;
  5. Avaliar a expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias;
  6. Avaliar possíveis alterações histológicas;

## CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 – Material Botânico

Exemplares de *Morus nigra* L. foram coletados em 2012 no município de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. A exsicata da planta foi preparada e identificada pela Doutora Viviane R. Scalon (identificação OUPR 27087), e posteriormente depositada no herbário José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Verificou-se que o exemplar coletado pertencia ao gênero *Morus* e a espécie tratava-se de *Morus nigra* L. A coleta do material botânico foi autorizada pelo SISBIO (anexo I) e sua utilização em nosso estudo foi cadastrada no SisGen (anexo II)

#### 4.1.1 – Obtenção da polpa amora

Para a obtenção da polpa de *Morus nigra* L., os frutos foram colhidos, imediatamente higienizados com água corrente e submetidos à extração, sendo prensados e em seguida com o auxílio de uma gaze limpa foi realizada uma filtração para a retenção da parte sólida (sementes e fibras). A polpa concentrada obtida, de coloração vinho e cheiro adocicado, não foi diluída para o ensaio *in vivo*. A polpa foi armazenada em freezer -80°C em alíquotas de 15mL. A coleta do material botânico foi autorizada pelo SISBIO (anexo I) e sua utilização encontra-se cadastrada no SisGen (anexo II)

#### 4.1.2 – Obtenção do extrato das folhas de amoreira

Para a obtenção do extrato das folhas de *Morus nigra* L., as folhas secas e trituradas foram submetidas à extração com água destilada e álcool etílico na proporção de 1:1 durante 24 horas em percolador. Em seguida foi realizada a filtração a vácuo e os extratos obtidos tiveram a água e o solvente evaporados em rotavapor (37°C). Todos os processos foram realizados ao abrigo da luz. O preparo do extrato hidroetanólico foi baseado no método descrito por GRANCE *et al.* 2008, HOSSEINZADEHH *et al.*, 1999 e ALMEIDA *et al.*, 2012. O extrato concentrado das folhas obtido, de coloração verde escura e cheiro adocicado, foi

dissolvido em água filtrada, tendo a concentração final de 150 mg/mL, sendo armazenados em freezer -80°C em alíquotas de 15mL.

#### **4.2 – Condições de CLUE-DAD-EM para análise do extrato das folhas e da polpa de *Morus nigra* L.**

O volume de injeção da amostra foi de 4µL, sendo a eluição em gradiente com H<sub>2</sub>O (0,1% ácido fórmico)/ ACN (0,1% ácido fórmico). O parâmetro cromatográfico usado compreendeu período de eluição linear (5-95% ACN de 0 a 10 min), mantendo-se, a seguir, um curto período de eluição isocrática (95% ACN de 10 a 11min), retornando a condição de eluição inicial 11 a 13 min (5% ACN).

Os espectros de massas foram obtidos com ionização por spray de elétrons sendo registrados em varredura completa (*full scan*) e sequencial ou tandem (EM/EM), nos modos positivo e/ou negativo no equipamento Waters ACQUITY® TQD equipado com analisador quadrupolo. As condições gerais de operação do equipamento durante as análises foram: voltagem capilar 3,5kv, voltagem de ionização:-4kv, voltagem do orifício: -60kv. As amostras foram injetadas por bomba de injeção automática com fluxo contínuo de 0,1 µL/min. Os espectros de ESI/EM/EM foram registradas com energia de 30 eV na faixa de *m/z* 100 a 2000 u.m.a.

#### **4.3 Animais e cuidados éticos**

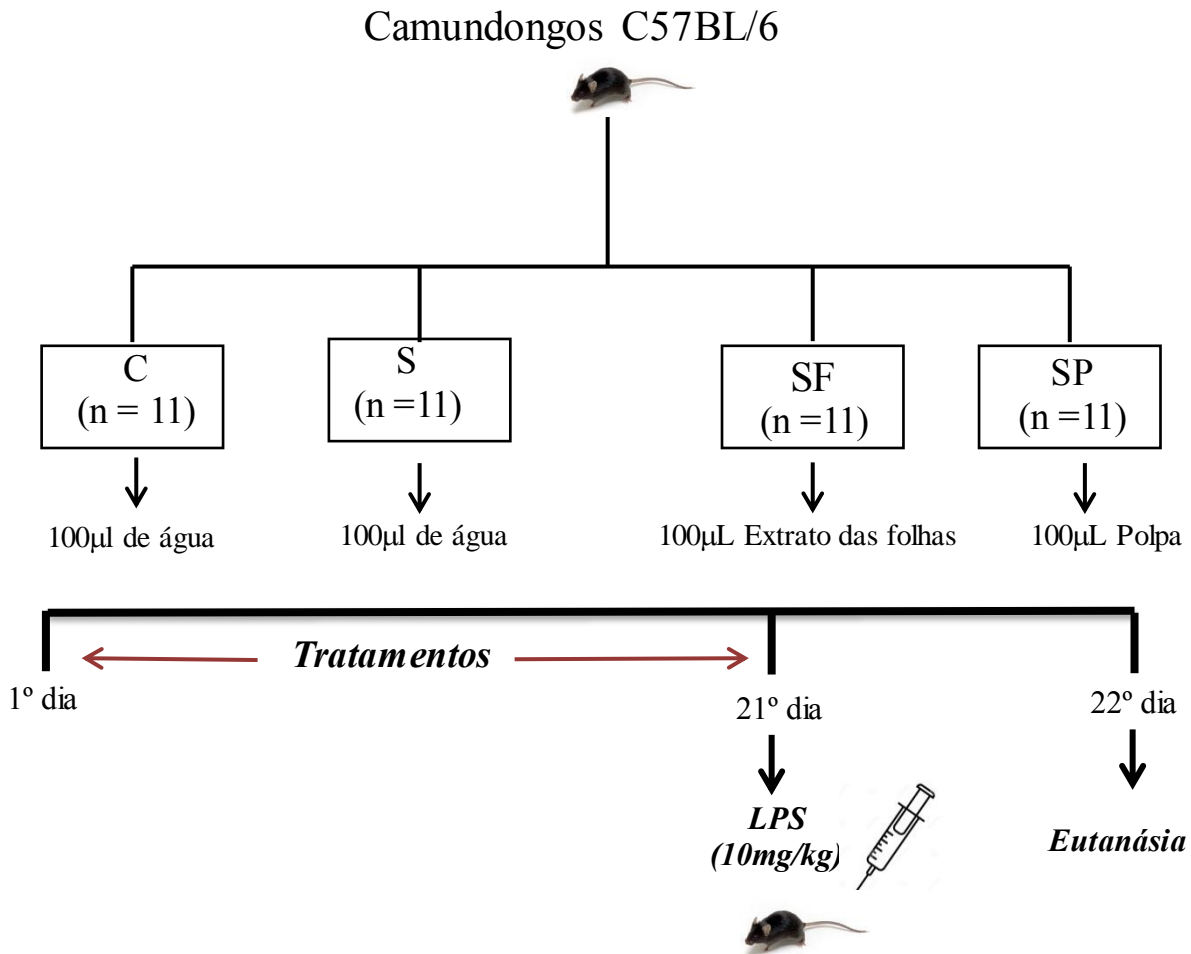
Nos experimentos foram utilizados camundongos machos, da linhagem C57BL/6, pesando entre 20-25 g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da UFOP. Foram mantidos 05 animais por gaiola, que foram dispostas em ambiente com temperatura, umidade e luminosidade controladas. Os animais receberam ração comercial para camundongo da marca Nuvilab e água *ad libbitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP sob o protocolo 2015/38

#### 4.4 - Delineamento experimental

O experimento teve duração de 22 dias e inicialmente os 44 animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, a saber: grupo controle (C), grupo sepse (S), grupo sepse + extrato das folhas (SF) e grupo sepse + polpa (SP). Durante 21 dias os animais receberam diariamente às 9 horas da manhã, 100 µl de seus respectivos tratamentos por gavagem orogástrica como descrito a seguir:

- Grupo controle (C): 100µl de água;
- Grupo sepse (S): 100µl de água;
- Grupo sepse + extrato das folhas (SF): 100µL (15mg/100µl) do extrato das folhas de *Morus nigra L.*
- Grupo sepse + polpa (SP): 100µL (15mg/100µL) da polpa dos frutos de *Morus nigra L.*

No vigésimo primeiro dia do experimento, a sepse foi induzida 1 hora após os animais terem recebido o último volume dos tratamentos. Os camundongos dos grupos S, SF e SP receberam injeção intraperitoneal única de LPS (0111:B4, Sigma Aldrich) o volume de 100 µL na dose de 10mg/kg (XU *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2015) já os camundongos do grupo controle receberam um volume 100 µL de solução salina estéril (PBS) através de injeção intraperitoneal. A eutanásia dos animais foi realizada por pulsão cardíaca e ocorreu 24 horas após a indução da sepse. As amostras biológicas (plasma, lavado bronco-alveolar e fígado) foram coletadas e armazenadas para análises posteriores.



**Figura 3.** Delineamento experimental. Camundongos C57BL/6 foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, a saber: Controle (C), Sepse (S), Sepse + Extrato das folhas (SF), Sepse + Polpa (SP).

#### 4.5 - Manifestações sistêmicas pós-indução da sepse

##### 4.5.1 – Curva de sobrevivência

As perdas de animais que ocorreram nos grupos experimentais nas horas posteriores à indução da sepse até momentos antes da eutanásia foram anotadas e um gráfico de análise de sobrevivência foi obtido. O intuito desse gráfico foi avaliar se os tratamentos eram capazes de exercer efeitos protetores sobre a vida dos animais em estudo.

#### **4.5.2 – Análise do lavado bronco-alveolar**

Após os animais serem eutanasiados, procedeu-se à coleta do lavado bronco-alveolar. A coleta das amostras foi realizada através de uma canulação da traquéia desses animais que possibilitou a infusão dos pulmões com solução salina (0,9% de NaCl) e coleta das amostras. O fluido foi colocado no gelo para manter a integridade das células ali presentes. Posteriormente, realizou-se a contagem total de leucócitos mono e polimorfonucleares na câmara de Neubauer e utilizou-se o corante azul de Trypan para a análise de viabilidade celular.

#### **4.5.3 - Glicose sérica**

A glicose sérica foi mensurada em amostras de sangue retiradas da veia da cauda dos animais antes da eutanásia dos mesmos utilizando-se para isso o glicosímetro Accu-Check®.

#### **4.5.4- Plaquetas**

A quantificação das plaquetas foi obtida a partir de hemograma realizado em equipamento automatizado (Mindray BC-2800 Vet Auto Hematology Analyzer ®)

#### **4.6 - Dosagem de citocinas**

As dosagens de citocinas (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 e CCL2) foram realizadas em amostras de plasma e de tecido hepático por meio de kits comerciais da marca *PeProtech*®.

Para dosar as citocinas presentes no fígado dos animais, aproximadamente 40 mg de tecido foi fracionada e posteriormente homogeneizada em solução salina (PBS). Em seguida, o homogenato foi centrifugado por 5 minutos a 3500 rpm a 4°C. O sobrenadante coletado foi utilizado nas dosagens posteriores. As amostras de plasma foram obtidas após processo de centrifugação e separação do sangue dos animais a 10000rpm por 10 minutos.

Para a dosagem, microplacas de alta afinidade foram sensibilizadas com 100 $\mu$ l de anticorpo monoclonal contra a proteína (ou peptídeo) a ser dosada, diluídos em tampão fosfato (PBS) contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Estas placas foram incubadas por 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os anticorpos não adsorvidos foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens com solução de 0,05% de Tween 20 em PBS. As placas foram então bloqueadas com 300 $\mu$ l/poço de uma solução contendo PBS - BSA 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. A seguir as placas foram novamente lavadas. As amostras de plasma ou de fígado foram aplicadas na placa e paralelamente, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para o estabelecimento da curva padrão.

Os anticorpos secundários foram diluídos em PBS -BSA 0.1% e incubados por duas horas à temperatura ambiente. Finalmente, 100 µl de estreptavidina ligada à peroxidase na diluição de 1:2000 em PBS - BSA 0.1% foram adicionados à placa e a mesma foi incubada por 30 minutos, ao abrigo da luz. Após a lavagem das placas foram adicionados 100 µl/poço do substrato ABTS -2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, Sigma®). Após 20 minutos de incubação em ausência de luz, a leitura da intensidade de coloração foi realizada em leitor de ELISA (Microplate Reader, model 680 BioRad) utilizando-se o comprimento de onda de 405nm

#### 4.7 – Análise das defesas antioxidantes

##### 4.7.1 – Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Para essa dosagem utilizou-se 100mg de tecido hepático que foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 12000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi coletado para ser utilizado como amostra biológica.

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, onde 30 µL da amostra (diluída 20 vezes) foram utilizados. Em seguida, foi adicionado tampão fosfato (0,1M, pH 7,2), MTT (1,25 mM) e pirogalol (1000 µM), conforme tabela abaixo:

	Amostra (µL)	Tampão (µL)	MTT (µL)	Pirogalol (µL)
<b>Branco</b>	-	144	6	-
<b>Padrão</b>	-	129	6	15
<b>Amostra</b>	30 (já diluída)	99	6	15

A placa foi incubada em estufa a 37°C, por 5 minutos, e a reação foi interrompida após adição de 150 µl de DMSO. A leitura foi realizada a 570 nm, em leitor de ELISA. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

##### 4.7.2 – Atividade da catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de converter o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi (1984).

Resumidamente, um fragmento de 100 mg de tecido hepático foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato 0,1M, (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno foram adicionados 990 µL do mix de peróxido de hidrogênio (25 µL do peróxido 6% e 4975 µL de tampão fosfato), em seguida, a reação foi iniciada com a adição de 10 µL de amostra. As absorvâncias foram determinadas a cada 30 segundos, durante 3 minutos, a 240 nm, tendo como branco o tampão fosfato.

Para os cálculos foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Catalase (U/mg de proteína)} = \frac{\Delta A * \text{diluição}}{V * \epsilon * \text{mg de proteína}}$$

Onde:

$\Delta A$ : variação da absorvância

$\epsilon$ : Coeficiente de extinção molar (0,071mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup> / 1U)

V: Volume da amostra

#### 4.6.3 – Glutathiona total e razão GSH/GSSG

A glutathiona está presente nas células principalmente na sua forma reduzida (GSH) representando em torno de 90%, o restante aparece na forma de glutathiona oxidada (GSSG). Esta dosagem foi adaptada do kit comercial Sigma #CS0260, e utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutathiona total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, através da redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) à TNB.

Para realizar a dosagem, amostra de 100mg de tecido hepático foi homogeneizada com 1mL de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA) e, em seguida centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

A dosagem foi realizada em microplaca de 96 poços. Inicialmente foram adicionados aos poços 150 µl da mistura de trabalho que contém glutathiona redutase, DTNB e 100 mM tampão fosfato de potássio. Em seguida adicionou-se 10 µl de amostra para os testes e 10 µl de 100 mM tampão fosfato de potássio para o branco. As amostras foram incubadas por 5 minutos e em seguida a reação foi iniciada com a adição de 50 µl de solução de NADPH. Com o início da reação, a absorvância foi imediatamente medida a 405 nm utilizando um



leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 6 leituras com intervalo de 1 minuto entre cada leitura. A concentração de glutathiona total foi obtida através de uma curva padrão.

Para mensurar os níveis de glutathiona oxidada, o procedimento é o mesmo, porém a amostra biológica passa por um processo de derivatização antes do início da dosagem. Para isso deve ser feito uma alíquota de 100 µl de amostra e acrescentar à esta 2 µl de vinilpiridina e 5 µl de trietanolamina (TEA). Esta nova amostra deve ter o pH entre 6 e 7 e ficará incubada por uma hora. Após este período, utiliza-se 10 µl desta nova amostra para reagir com a mistura de trabalho, como anteriormente descrito. As concentrações de glutathiona total e oxidada são obtidas através de uma curva padrão realizada para cada uma das dosagens. A subtração da concentração de glutathiona oxidada do valor da concentração da glutathiona total fornece o valor da concentração da glutathiona reduzida.

#### **4.7.4 – Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)**

A atividade da enzima glutathiona peroxidase foi mensurada utilizando o “Glutathione Peroxidase Activity Kit” (Assay Designs Inc., catalog #900-158, Michigan, EUA) adaptado. O ensaio é baseado na oxidação da glutathiona reduzida a oxidada catalisada pela enzima glutathiona peroxidase. A glutathiona oxidada por sua vez é reciclada e convertida de volta a glutathiona reduzida pela enzima glutathiona redutase, utilizando NADPH. O decréscimo na absorvância medida a 340nm durante a oxidação do NADPH a  $\text{NADP}^+$  é indicativo da atividade de glutathiona peroxidase.

Para realizar a dosagem, uma amostra de 40mg de tecido hepático foi homogeneizado em 200 µl de tampão de ensaio proveniente do kit contendo 0,4 mM do inibidor de protease PMSF e 1% de Triton x-100. O homogenato foi centrifugado a 1000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para ser utilizado como amostra.

A dosagem foi realizada em microplaca de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 200µl do tampão de ensaio contido no kit com pH 7,0, 20 µl do mix de reação (contendo glutathiona reduzida, NADPH, glutathiona redutase e azida sódica), e 20 µl de amostra para os testes, padrão de glutathiona peroxidase para o controle positivo, e tampão de ensaio para o branco. A reação foi iniciada ao serem adicionados 20 µl de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a todos os poços. A absorvância foi imediatamente medida a 340 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 6 leituras com intervalo de 10 segundos entre cada leitura.

Para cálculo da atividade de glutathione peroxidase foi considerada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade em mmol/min/ml ou U/ml} = \frac{\Delta A_{340} \times DF}{6,22 \times V}$$

Onde:

Abs 340nm/minuto = Abs inicial – Abs final

$\Delta A_{340} = \Delta A_{340}/\text{min (branco)} - \Delta A_{340}/\text{min(teste)}$

6,22 =  $\epsilon$ mM do NADPH

DF = fator de diluição da amostra antes de adicionar à reação

V = volume da amostra em ml

#### 4.7.5 – Atividade da glutathione reductase (GR)

A atividade da enzima glutathione reductase foi determinada utilizando o “Glutathione Reductase Assay kit” (Sigma, Missouri, EUA). O ensaio é baseado na redução da glutathione pelo NADPH em presença de glutathione reductase.

Uma amostra de 50mg de tecido hepático foi homogeneizada com 500  $\mu$ l de tampão proveniente do kit (10 mM fosfato de potássio pH 7,5, 1 mM EDTA e 1mg/ml de albumina bovina sérica). O homogenato foi centrifugado a 1000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para ser utilizado como amostra.

O ensaio colorimétrico foi adaptado para ser realizado em microplaca de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 125  $\mu$ l de 2 mM glutathione oxidada, 40  $\mu$ l de tampão de ensaio proveniente do kit, 10  $\mu$ l de amostra para os testes, padrão de glutathione reductase para o controle positivo, e tampão de ensaio para o branco. Em seguida foram adicionados 62,5  $\mu$ l de 3 mM DTNB e a reação foi iniciada ao adicionar 12,5  $\mu$ l de 2 mM NADPH em todos os poços. A absorbância foi imediatamente medida a 412 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 11 leituras com intervalo de 10 segundos entre cada leitura.

Para o cálculo da atividade de glutathione reductase na amostra foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade da GR em Unidades/ml} = \frac{(\Delta A_{\text{amostra}} - \Delta A_{\text{branco}}) \times (\text{fator de diluição})}{\epsilon^{\text{mM}} \times \text{volume da amostra em ml}}$$

Onde,  $\epsilon^{\text{mM}}$  do DTNB = 14,15mm-1cm<sup>-1</sup>

#### 4.8 – Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951). O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteu, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul.

Inicialmente são preparadas as soluções reagentes conforme descrito abaixo:

- Reagente A: dissolve-se 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. A solução deve ser armazenada, no escuro, em temperatura ambiente.

- Reagente B: dissolve-se 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250mL de água destilada. Deve ser armazenada a temperatura ambiente.

- Reagente C: adiciona-se 1 mL do reagente A em 50mL do reagente B. Deve ser preparado na hora do teste.

- Reagente D: dissolve-se 1 mL de Folin-Ciocalteu em 1mL de água destilada. Deve ser preparado na hora do teste.

Foram realizados quatro pontos para a construção da curva padrão para proteínas totais, pelo seguinte procedimento:

P1- 25µL de uma solução estoque de proteínas a 0,2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,05mg/mL.

P2- 7,5µL de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,15mg/mL.

P3- 15µL de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,30mg/mL.

P4- 25µL de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,5mg/mL.

Para a realização da dosagem, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de amostra ou padrão em tubos de polipropileno, e completados para 100  $\mu\text{L}$  com água destilada. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foi feito apenas com 100  $\mu\text{L}$  de água destilada. Posteriormente adicionou-se 1 mL do reagente C em todos os tubos (incluindo branco e padrões). A mistura foi agitada no vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foi adicionado em cada tubo 100  $\mu\text{L}$  do reagente D. O volume foi misturado e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 660nm.

Após as leituras, foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) versus absorvância do padrão (Eixo X). A equação da reta gerada foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais nos homogenatos de tecidos. Todas as concentrações foram obtidas em mg/mL.

#### **4.9 – Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)**

A expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias no fígado foi avaliada através da técnica de qRT-PCR seguindo as etapas descritas a seguir.

##### **4.9.1- Extração do RNA**

A extração de RNA a partir dos fragmentos de 50 mg fígado foi realizada utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Cat#Z3100) seguindo as instruções do fabricante. Após finalizar a extração do RNA foi determinada a concentração e a pureza do RNA nas amostras em espectrofotômetro Nano Vue® (GE Healthcare, UK). A quantificação do RNA extraído foi mensurada no comprimento de onda a 260 nm considerando a relação entre os comprimentos de onda 260/280 como indicativo de pureza e a relação 260/230 como indicativo de contaminação. Foram aceitas razões acima de 1,8 para a quantificação da expressão gênica. (MANCHESTER, 1996; GALLAGHER e DESJARDINS, 2006; BECKER et al., 2010).

##### **4.9.2 – Síntese do DNA complementar (cDNA)**

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 $\mu\text{g}$  de RNA total, utilizando oligo (dT) (Applied Biosystems, Foster City, CA) e o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O meio de reação

continha 2  $\mu$ L de tampão 10x (500 mM de cloreto de potássio (KCl), 100 mM de Tris-HCl, 25mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), pH 8,3), 0,8  $\mu$ L da mistura de desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) 100 mM, 1  $\mu$ L de oligo (dT), 1  $\mu$ L da enzima transcriptase reversa MultiScribe (50 U/ $\mu$ L). A reação foi realizada nas seguintes condições: 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C em termociclador Biocycler modelo MJ96+.

#### 4.9.3 - Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os iniciadores utilizados para amplificar o gene de referência endógena,  $\beta$ -actina, e os genes IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 foram desenhados com base nas sequências de *Mus musculus*, disponíveis no banco de dados do GenBank (National Center for Biotechnology Information). As construções foram feitas com o auxílio do programa Primer-BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Tabela 5).

**Tabela 1-** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise qRT-PCR

<i>Gene</i>	Oligonucleotídeos iniciadores (sequência 5' para 3')
$\beta$ -actina (forward)	CTGAGCTGCGTTTTACACC
$\beta$ -actina (reverse)	CGCCTTCACCGTTCCCAGTT
IL-1 $\beta$ (forward)	AGAGCCCATCCTCTGTGACT
IL-1 $\beta$ (reverse)	GGAGCCTGTAGTGCAGTTGT
IL-6 (forward)	ACTTCCATCCAGTTGCCTTCT
IL-6 (reverse)	AGTCTCCTCTCCGGACTTGT
IL-10 (forward)	TGGGTTGCCAAGCCTTATCG
IL-10 (reverse)	CAGCTTCTCACCCAGGGAAT

#### 4.9.4 - Curva de eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores

Para determinar a eficiência da amplificação dos genes alvo e do gene de referência endógena foram construídas curvas padrões para cada amplificado, a partir de diluições seriadas do cDNA de uma mesma amostra. A análise de regressão linear dos valores de Threshold Cycle (TC) em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta ( $a$ , em  $y = ax+b$ ) que foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos iniciadores.

#### 4.9.5 - qRT-PCR

Para a análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real. A quantificação dos produtos formados durante os ciclos de amplificação foi realizada com o reagente Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, sendo adicionados em cada poço 2  $\mu$ L de cDNA (100 ng), 0,48  $\mu$ L de cada primer (forward e reverse, 10  $\mu$ M), 6  $\mu$ L Power de SYBR® Green Master Mix e volume final de água livre de DNase para 12  $\mu$ L. As reações foram realizadas nas seguintes condições, 50°C por 2min, 95° C por 10 min e então 40 ciclos de 95°C por 15s (desnaturação) e 60°C por 1min (anelamento dos iniciadores e extensão dos produtos) no termociclador ABI 7300 (Applied Biosystems, CA, USA). O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa 7000 System SDS Software (Applied Biosystems). Todas as análises foram realizadas em triplicata. A especificidade dos produtos obtidos foi confirmada pela análise das curvas de dissociação do produto amplificado ao final de cada reação.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica (CT comparativo ou  $\Delta\Delta$  CT), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as diferentes amostras. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene de referência endógena  $\beta$ -actina e uma amostra normalizadora (grupo C) foi utilizada como base para os resultados de expressão comparativa. De posse dos valores de CT, que corresponde ao número de ciclos na fase exponencial da PCR em que a fluorescência ultrapassa o valor basal, foi calculado o  $\Delta$  CT de cada amostra, na qual o valor do CT do gene de referência endógena foi subtraído do CT do gene alvo. Em seguida foram calculados os valores de  $\Delta\Delta$ CT, na qual o valor do  $\Delta$ CT da amostra normalizadora (grupo C) foi subtraído do  $\Delta$ CT das amostras teste (demais

grupos experimentais). Os valores do  $\Delta\Delta\text{CT}$  obtidos foram utilizados em uma fórmula aritmética para o cálculo final da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, dada por  $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$ .

#### 4.10 - Zimografia

Os fígados dos camundongos foram pesados e homogeneizados (na proporção de 100mg/400 $\mu\text{L}$ ) em tampão RIPA, acrescido de coquetel inibidor de protease (1:1000) a 4°C. Após a centrifugação (10 min, 10.000g), o sobrenadante foi coletado e usado imediatamente para dosagem de proteínas. A concentração proteica foi determinada utilizando-se uma curva padrão de albumina pelo método de *Lowry* (Lowry et al., 1951), utilizando-se o programa Microsoft Excel. Utilizou-se 30  $\mu\text{g}$  de proteína/poço para a realização do ensaio.

As zimografias foram executadas segundo protocolo previamente descrito por Sung *et al.*, (2007) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 8% contendo gelatina do tipo A de pele suína (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo. EUA) na concentração de 2 mg/mL e os géis de entrada poliacrilamida 5% (w/v) em placas de 0,75mm. A eletroforese foi realizada com a concentração de 30 $\mu\text{g}$  de proteína para cada amostra, acrescido (de acordo com cálculos realizados para cada amostra, pois há variação de volume) de tampão RIPA e tampão de amostra para SDS-PAGE. Antes da aplicação no gel as mesmas foram aquecidas por dois minutos a 37°C em banho úmido. Um volume de 10  $\mu\text{L}$  do marcador padrão de massa molecular (*BLUeye Prestained Protein Ladder – Genedirex*) foi utilizado em todas as corridas.

A corrida da eletroforese foi realizada durante 120 minutos a 100 V. Após a eletroforese, os géis foram cuidadosamente lavados 3 vezes em solução de Triton X-100 a 2.5% para total remoção do SDS seguido de incubação a 37°C por 18h em tampão contendo o substrato (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% NaN<sub>3</sub> (pH 7.5)). SDS é o agente responsável pela ativação das metaloproteases mesmo na forma inativa sem clivagem proteolítica (Talhok et al., 1991). Os géis foram corados com 0.05% Coomassie Brilliant blue G-250 por 3 horas e descorados com solução descorante (4% metanol, 8% ácido acético e água). A atividade da gelatinase foi visualizada por bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de proteína. As metaloproteases são secretadas na forma latente e necessitam da clivagem do terminal peptídico NH<sub>2</sub> para ativação.

Após descorar o gel da zimografia as bandas marcadas foram quantificadas com auxílio do software *Quantity One* (Biorad) utilizando uma estação de captura de imagem (*Carestream 4000 mm Pro Image Station*) e do software IMAGEJ versão 1.32j de domínio

público (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) onde a densidade óptica de cada banda foi detectada. Utiliza-se como parâmetro para análise o volume ajustado das bandas, que significa o volume total, diminuído do *background*. inicialmente o sistema de análise calcula a média dos valores de densidade óptica para a região delimitada pelo operador, esta região deve ter uma área suficiente para abrigar todas as bandas (uma de cada vez) visíveis no filme, não devendo ser alterada, quando se passa a analisar outra banda.

#### **4.11 – Análise histológica do fígado**

O fígado dos camundongos foi removido ao final do experimento e fixado em formol tamponado a 4%. Os fragmentos desse tecido foram então desidratados em série decrescente de álcoois e posteriormente embebido em parafina. Secções parafinadas de aproximadamente 4µm foram obtidas em micrótomo semiautomático, montadas e coradas pela técnica Hematoxilina & Eosina (H&E), para visualização de danos histológicos. As análises morfométricas foram realizadas no Laboratório Multiusuários do NUPEB. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Leica® acoplado a câmera digital DM5000, com o software de análises Leica Application Suite.

#### **4.12– Análise estatística**

Os dados foram submetidos a testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Todos dados apresentaram distribuição normal e foram analisados através da análise de variância univariada *One-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni's para determinação das diferenças entre os grupos. Os dados foram expressos em média ± erro padrão. Os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significantes. Todas as análises foram realizadas no software *GraphPad Prism* 5.0 para Windows (San Diego, California, USA).

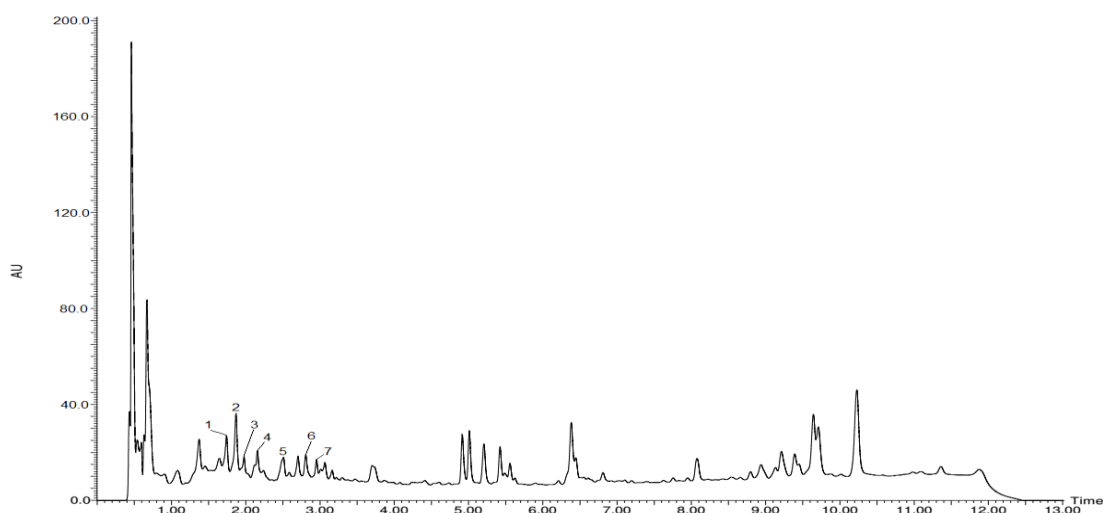


## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS

### 5.1 - Ensaios *in vitro*

#### 5.1.2- Análise cromatográfica e espectral do extrato das folhas e da polpa de *Morus nigra* L.

A polpa e o extrato das folhas de *Morus nigra* L. foram analisadas por CLUE-DAD-EM. Os resultados apresentados nas figuras 4 e 5 e nas Tabelas 2 e 3 mostram as substâncias fenólicas que foram identificadas na polpa e no extrato de *Morus nigra* L. respectivamente, incluindo os heterosídeos de flavonoides. As estruturas químicas dos compostos encontrados na composição do extrato das folhas e da polpa de *Morus nigra* L. , estão representadas na figura 6. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os resultados descritos na literatura. As buscas foram realizadas nas bases de dados disponíveis pela razão  $m/z$  obtida nos espectros.

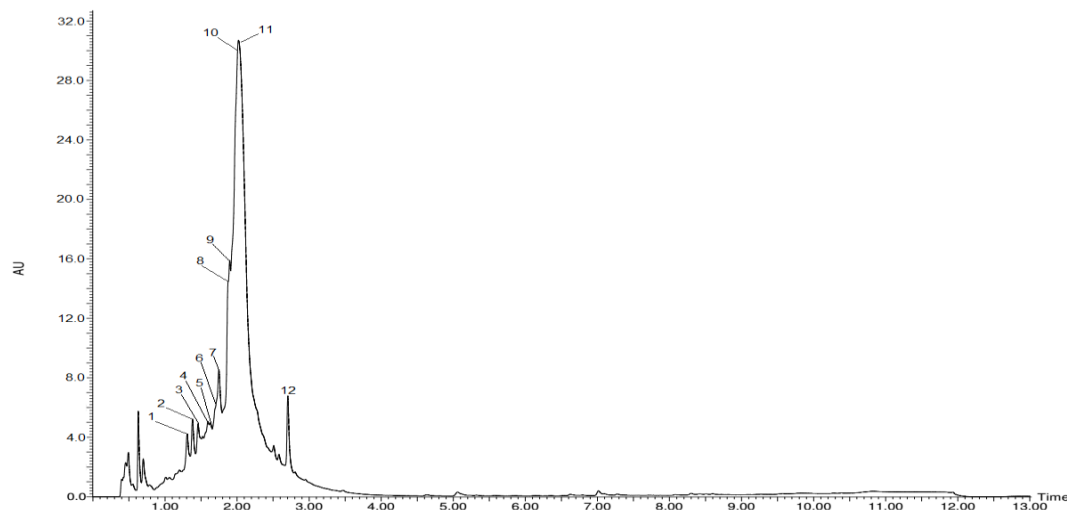


**Figura 4:** Perfil do extrato das folhas de *Morus nigra* L. Condições: CHS130 100 RP-18 de coluna (1.7  $\mu\text{m}$ , 50  $\times$  2mm i.d.). A eluição foi realizada com um gradiente linear de água 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo 0,1% de ácido fórmico (B) (a partir de 5% a 95% de B, em 11 min) e as impressões digitais UPLC foram registradas em um aparelho Waters Acquity com um detector UV-DAD (Waters 2996). Parâmetros de funcionamento do espectrômetro de massa foram: temperatura capilar 320°C; voltagem da agulha de spray fixada em 5 kV; ES tensão capilar 3 e - 47V para polaridade positiva e negativa, respectivamente; e lente do tubo deslocamento 0 e -25V para polaridade positiva e negativa, respectivamente. 1. Ácido 3-*O*-cafeoilquínico; 2. Ácido 4-*O*-cafeoilquínico; 3. Ácido 5-*O*-cafeoilquínico; 4. 6-hidroxi-luteolina-7-*O*-rutenosídeo; 5. Quercetina-3-*O*-furanosil-2-ramosil; 6. Quercetina-3-*O*-rutenosídeo; 7. Quercetina 3-*O*-glicosídeo.

**Tabela 2-** Compostos químicos identificados no extrato das folhas de *Morus nigra* L.

<b>Sinal</b>	<b>Composto</b>	<b>TR (min)</b>	<b>UV (nm)</b>	<b>LC-MS [M - H]<sup>-</sup> (m/z) (Fragmentação m/m)</b>	<b>LC-MS [M + H]<sup>+</sup> (m/z)</b>
1	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	1.76	323.1	353.3 (191.2; 179.3; 134.8)	355.4
2	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	1.88	321.1	353.4 (191.3; 179.2; 135.1)	355.7
3	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	1.99	323.1	353.5 (190.6; 179.2; 135.4)	355.9
4	6-Hidroxi-luteolina-7- <i>O</i> - rutenosídeo	2.17	265.3; 327.8	609.5 (301.1)	611.5
5	Quercetina-3- <i>O</i> -furanosil-2'''- ramnosyl	2.53	264.1; 357.8	579.2 (433.6; 301.0; 277.3)	581.7
6	Quercetina-3- <i>O</i> -rutenosídeo	2.70	255.3; 353.2	609.2 (301.0; 161.2)	611.2
7	Quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo	2.86	255.2; 355.3	463.1 (301.3)	465.2

TR (min): tempo de retenção em minutos, UV (nm): ultra violeta em nanômetros, LC-MS [M-H]<sup>-</sup>(m/z): cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo negativo, LC-MS [M+H]<sup>+</sup> (m/z) m/z: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo positivo, razão massa/carga.

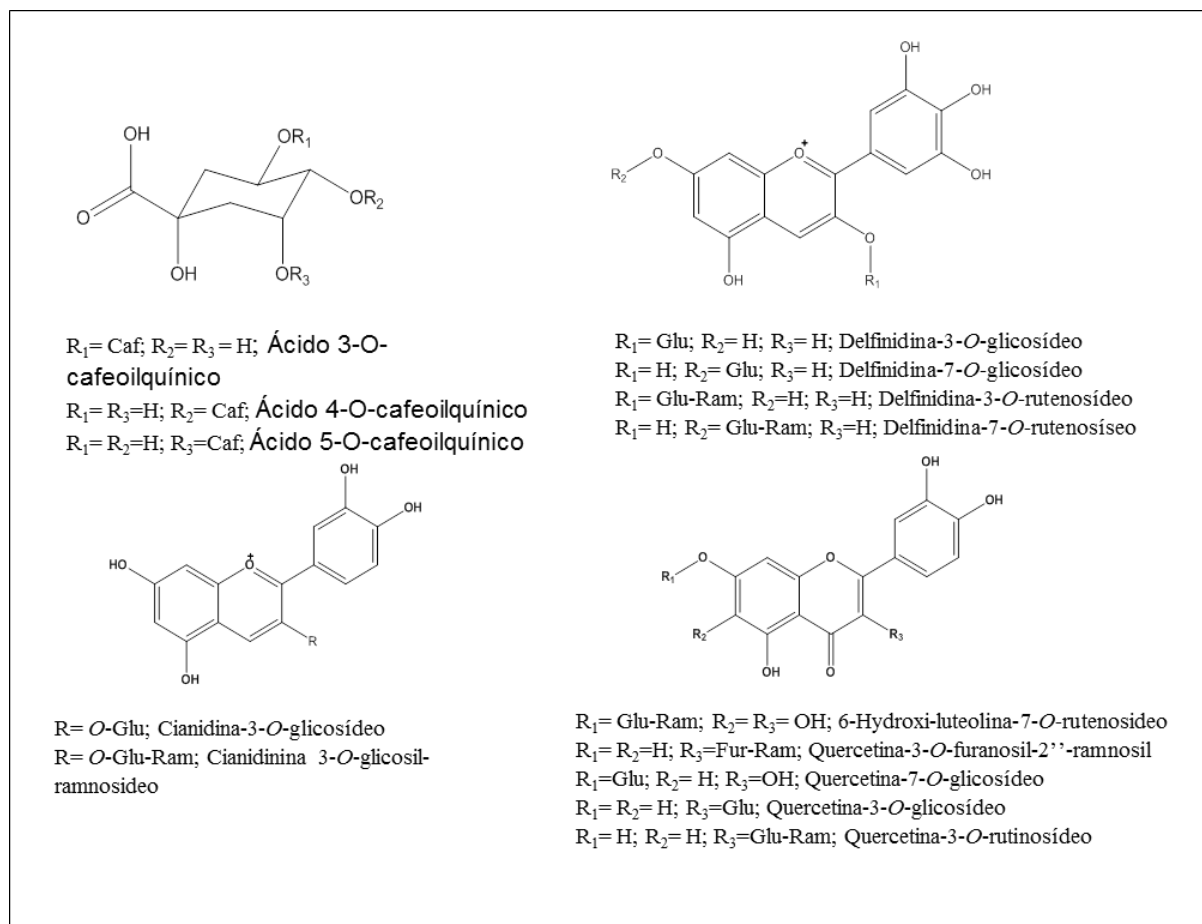


**Figura 5: Perfil da polpa de *Morus nigra* L.** Condições: CHS130 100 RP-18 de coluna (1.7  $\mu\text{m}$ , 50  $\times$  2mm i.d.). A eluição foi realizada com um gradiente linear de água 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo 0,1% de ácido fórmico (B) (a partir de 5% a 95% de B, em 11 min) e as impressões digitais UPLC foram registradas em um aparelho Waters Acquity com um detector UV-DAD (Waters 2996). Parâmetros de funcionamento do espectrômetro de massa foram: temperatura capilar 320°C; voltagem da agulha de spray fixada em 5 kV; ES tensão capilar 3 e - 47V para polaridade positiva e negativa, respectivamente; e lente do tubo deslocamento 0 e -25V para polaridade positiva e negativa, respectivamente. 1.Ácido 3-*O*-cafeoilquínico; 2. Ácido 4-*O*-cafeoilquínico; 3. Delfinidina 3-*O*-rutinoside; 4. Ácido 5-*O*-cafeoilquínico; 5. Delfinidina 7- *O*-rutinosideo; 6. Delfinidina-3-*O*-glucoside; 7. Cianidina 3-*O*-glucosideo; 8. Delfinidina7-*O*-glicosideo; 9. Cianidina3-*O*-glicosil-ramnosídeo; 10. Quercetina 3-*O*-rutinosídeo; 11. Quercetina 3-*O*-glicosídeo/ Quercetina 7-*O*-glicosideo; 12. Quercetina 7-*O*- glicosideo / Quercetina 3-*O*-glicosideo

**Tabela 3.** Compostos químicos identificados na polpa de *Morus nigra* L.

Sinal	Composto	TR (min)	UV (nm)	LC-MS [M - H] <sup>-</sup> (m/z) (Fragmentação m/m)	LC-MS [M + H] <sup>+</sup> (m/z) (Fragmentação m/m)
1	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	1.46	323.1	353.4 (191.1; 179.0; 134.8)	355.39
2	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	1.74	321.1	353.4 (191.1; 179.0; 135.2)	355.72
3	Delfinidina 3- <i>O</i> -rutinoside	1.88	280.4	611.3 (285.0; 302.8; 474.8)	611.3
4	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	1.93	323.1	353.4 (190.8; 179.0; 135.0)	355.92
5	Delfinidina 7- <i>O</i> -rutinoside	1.98	281.1	611.3 (285.0; 302.8; 474.8)	611.3
6	Delfinidina 3- <i>O</i> -glucoside	1.97	280.4	465.3 (285.2; 301.3; 329.2)	465.34
7	Cianidina 3- <i>O</i> -glucoside	1.99	280.1	447.3(287.0)	449.38
8	Delfinidina7- <i>O</i> -glicosideo	2.05	281.4	465.3 (285.2; 301.3; 329.3)	465.35
9	Cianidina3- <i>O</i> -glicosill- ramnosídeo	2.10	281.1	593.2 (449.1; 287.1)	595.42
10	Quercetina 3- <i>O</i> -rutinosídeo	2.70	255.4; 354.4	609.8 (301.3; 163.1)	611.60
11	Quercetina3- <i>O</i> -glicosídeo/ Quercetina 7- <i>O</i> -glicosideo	2.71	255.1; 359.1	463.5 (301.1)	465.35 (303.2)
12	Quercetina 7- <i>O</i> - glicosideo / Quercetina 3- <i>O</i> -glicosideo	2.82	254.1; 358.1	463.2 (301.0)	465.48 (303.4)

TR (min): tempo de retenção em minutos, UV (nm): ultra violeta em nanômetros, LC-MS [M-H]<sup>-</sup>(m/z): cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo negativo, LC-MS [M+H]<sup>+</sup> (m/z) m/z: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo positivo, razão massa/carga



**Figura 6:** Estruturas químicas dos compostos encontrados na composição da polpa e do extrato das folhas de *Morus nigra* L.

## 5.2 - Ensaios *in vivo*

### 5.2.1 - Manifestações sistêmicas após desafio com LPS

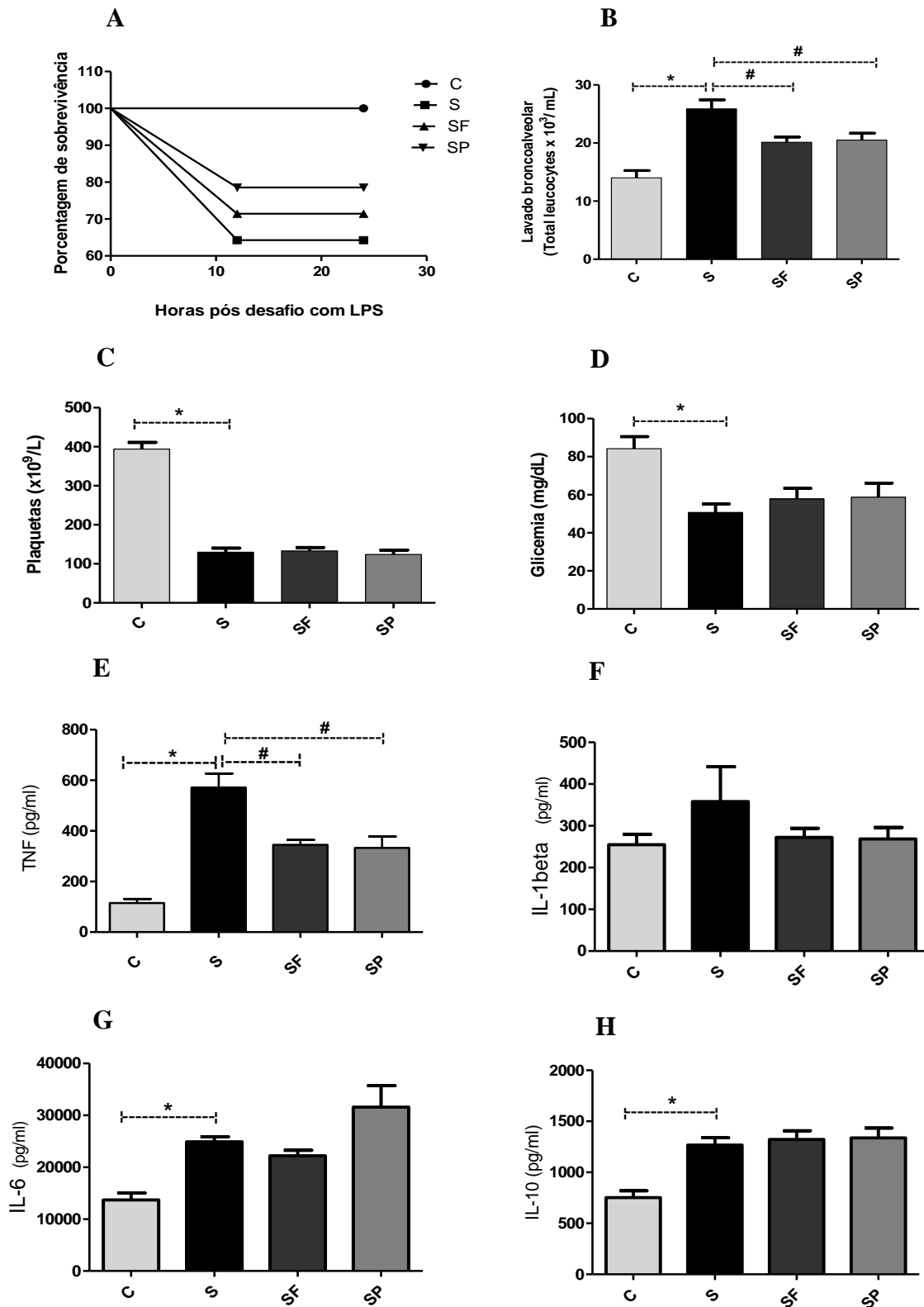
A análise da porcentagem de sobrevivência dos animais desafiados com LPS (10mg/Kg) sugere um efeito protetor tanto da polpa quanto do extrato das folhas de *Morus nigra* L. uma vez que a taxa de sobrevivência foi menor no grupo sepse (64,2%) quando comparados ao grupo sepse tratados com o extrato das folhas (SF) (71,42%) ou com a polpa (78,57%) de *Morus nigra* L. (SP) (gráfico A).

Ao avaliar o lavado bronco-alveolar dos grupos experimentais (gráfico B), observou-se um aumento no influxo leucocitário pulmonar nos animais do grupo sepse (S) em relação ao grupo controle (C). A contagem total de leucócitos no lavado bronco-alveolar mostrou ainda que ambos os tratamentos reduziram o recrutamento dessas células de defesa nos pulmões dos animais dos grupos SF e SP.

A avaliação do número de plaquetas (gráfico C) mostrou uma diminuição significativa das mesmas nos animais sépticos (S) em relação aos animais controle (C), além de evidenciar que os tratamentos não foram eficazes em alterar esse efeito.

Com relação à glicemia desses animais (gráfico D), observou-se uma redução desse parâmetro nos animais sépticos (S) em relação aos animais controle (C) e os tratamentos não foram capazes de reverter a hipoglicemia induzida pela administração do LPS.

Para avaliar o perfil sistêmico de produção de citocinas nos animais em estudo, realizou-se a determinação da concentração desses mediadores da resposta inflamatória em amostras de plasma (gráficos E-H). Os resultados apresentados no painel E mostram um aumento significativo de TNF nos animais sépticos (S) quando comparados aos animais do grupo controle. É possível observar também que ambos os tratamentos foram capazes de reduzir a concentração dessa citocina nos grupos SF e SP. No gráfico F, não observamos diferença estatisticamente significativa na concentração de IL-1 $\beta$  entre os grupos experimentais. Com relação à IL-6 (gráfico G), e IL-10 (gráfico H) observamos um aumento significativo dessas citocinas nos animais do grupo S em relação aos animais do grupo C e nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos SF e SP quando comparados ao grupo S.



**Fig 7.** (A) Avaliação da taxa de sobrevivência, (B) infiltrado de leucócitos no lavado broncoalveolar, (C) plaquetas e (D) glicemia, (E) concentrações séricas de TNF, (F) IL-1 $\beta$ , (G) IL-6 e (H) IL-10 em camundongos C57BL/6 controles (C), sépticos (S), sépticos tratados com extrato das folhas (SF) ou com a polpa (SP) de *Morus nigra* L. (\*) Representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e S e (#) entre S e SF ou S e SP.

### 5.3 - Defesas antioxidantes

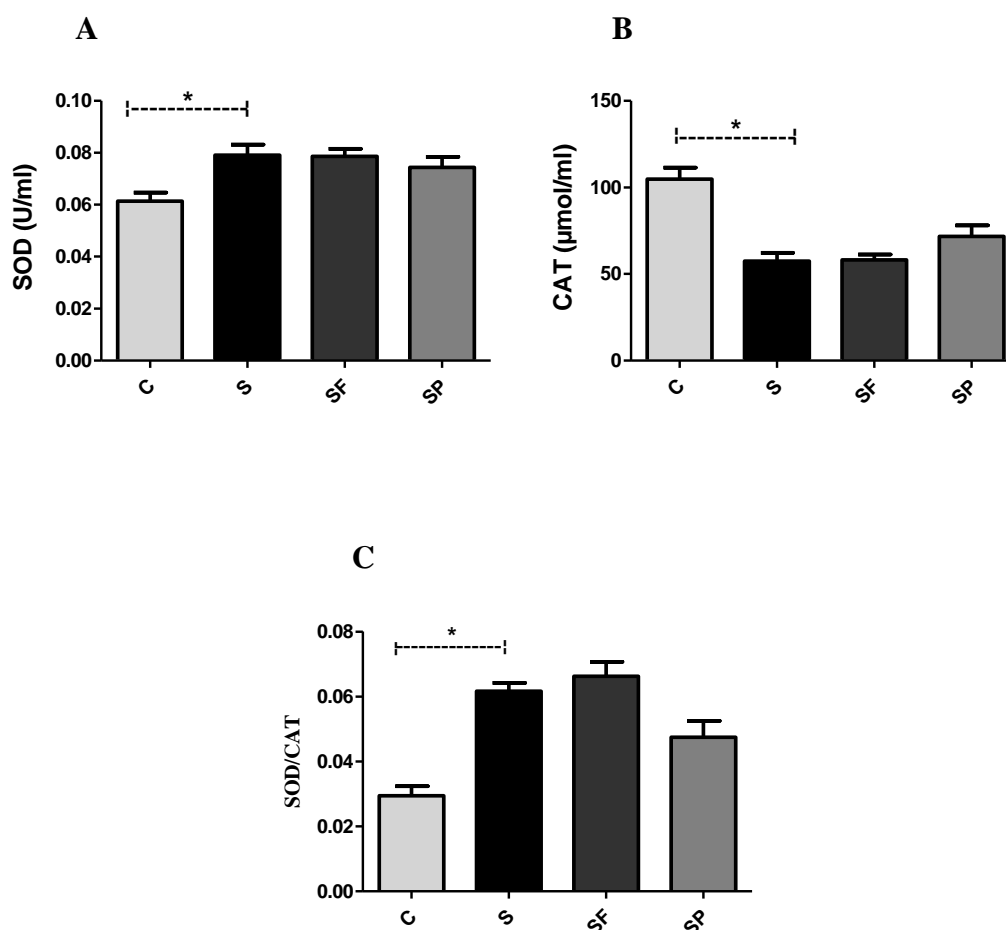
Para avaliar o efeito antioxidante da planta *Morus nigra* no modelo de sepse induzida por LPS, foram analisados alguns dos componentes enzimáticos da resposta antioxidante hepática como atividade da SOD e da CAT e também da GPx e GR como pode ser visualizado nas figuras 8 e 9. Os componentes não enzimáticos também foram avaliados através da determinação da concentração dos tripeptídeos GSht, GSSG e GSH (Figura 9).

#### 5.3.1 – SOD, CAT e razão SOD/CAT

Os resultados apresentados na figura 8A mostram um aumento significativo na atividade da enzima SOD nos animais sépticos (S) em relação aos animais do grupo controle (C). Observa-se também que os tratamentos não alteraram a atividade dessa enzima.

Com relação à enzima catalase, observou-se uma diminuição em sua atividade nos animais do grupo S em relação aos animais do grupo C. Observou-se ainda que os tratamentos não alteraram esse efeito (figura 8B). Analisando o comportamento dessas duas enzimas em conjunto por meio da razão entre as suas atividades (SOD/CAT) é possível observar o aumento dessa razão nos animais sépticos (S) não tratados em relação aos animais controle (C) e nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos (figura 8C).





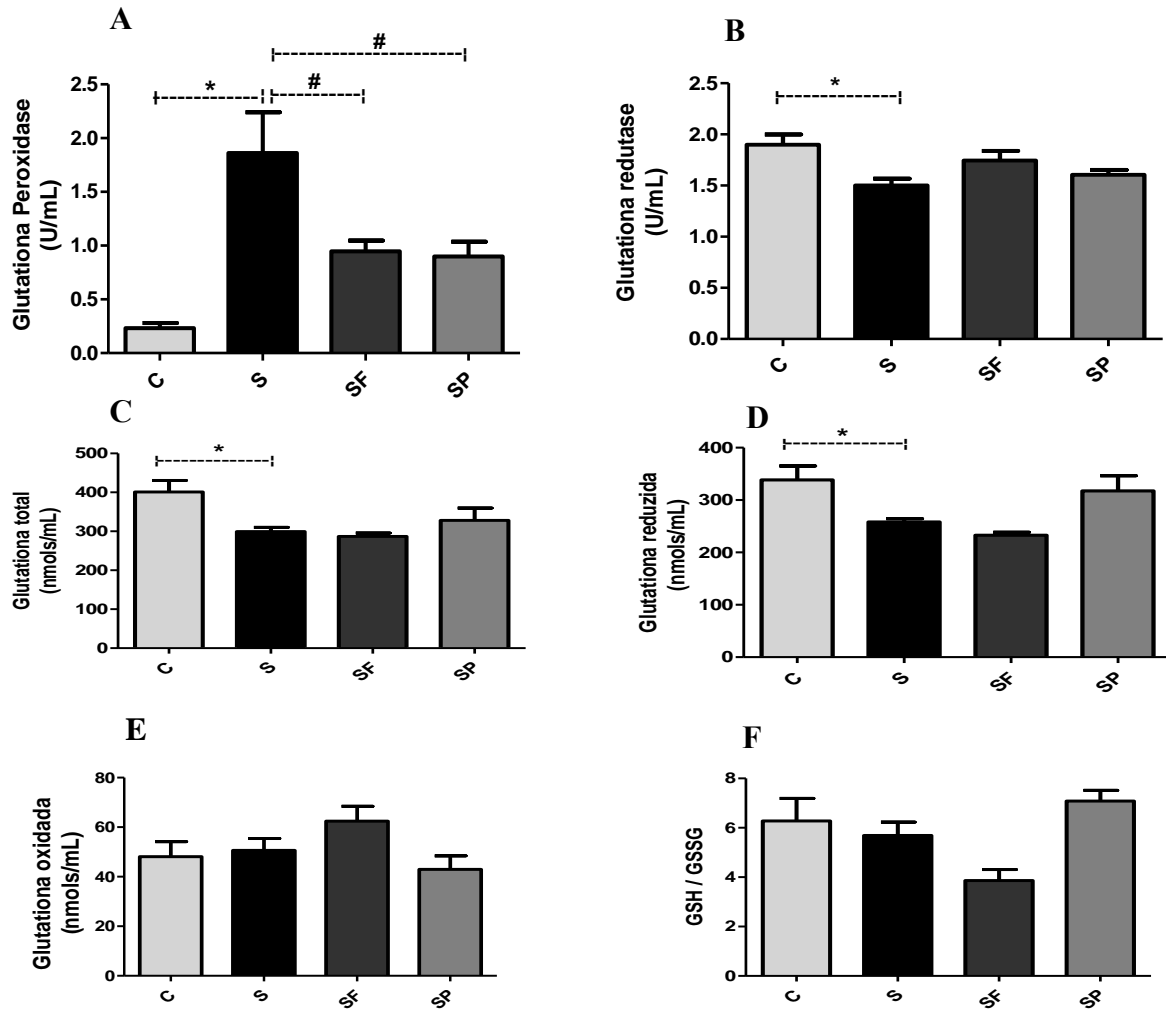
**Fig 8 .** Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e CAT (B) e razão SOD/CAT em fígado de camundongos C57BL/6 controles (C), sépticos (S), sépticos tratados com extrato das folhas (SF) ou com a polpa (SP) de *Morus nigra* L. (\*) Representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e S e (#) entre S e SF ou S e SP.

### 5.3.2 - Glutationa peroxidase, redutase, total, oxidada, reduzida e razão (GSH/GSSG)

Avaliando a atividade da glutaciona peroxidase (figura 9A), observa-se um aumento na atividade dessa enzima nos animais sépticos (S) em relação aos animais controle (C). Nota-se também que os tratamentos diminuíram a atividade dessa enzima nos animais dos grupos SF e SP em relação aos animais do grupo S. No que diz respeito à atividade da enzima glutaciona redutase (figura 9B), observou-se uma redução significativa na atividade dessa enzima nos animais do grupo S em relação ao grupo controle e nenhuma alteração foi observada em relação aos tratamentos.

Em relação ao metabolismo da glutaciona no tecido hepático avaliamos a concentração de glutaciona total (gráfico C) e de glutaciona reduzida (figura 9D) e pode-se observar uma redução significativa desses tripeptídeos nos animais do grupo S em relação aos animais

controle (C), observamos que os tratamentos não alteraram as concentrações destes quando comparadas com o grupo séptico (S). Não houve diferenças significativas na concentração de glutatona oxidada (figura 9E) nem na razão GSH/GSSG (figura 9F) entre os grupos experimentais.



**Fig 9.** Efeito de *Morus nigra* L. sobre glutatona peroxidase (A), glutatona redutase (B), glutatona total (C), glutatona reduzida (D), glutatona oxidada (E) e razão GSH/GSSG (F) em fígado de camundongos C57BL/6 controles (C), sépticos (S), sépticos tratados com extrato das folhas (SF) ou com a polpa (SP) de *Morus nigra*. (\*) Representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e S e (#) entre S e SF ou S e SP.

#### 5.4 - Avaliação do potencial anti-inflamatório de *Morus nigra L.* no tecido hepático

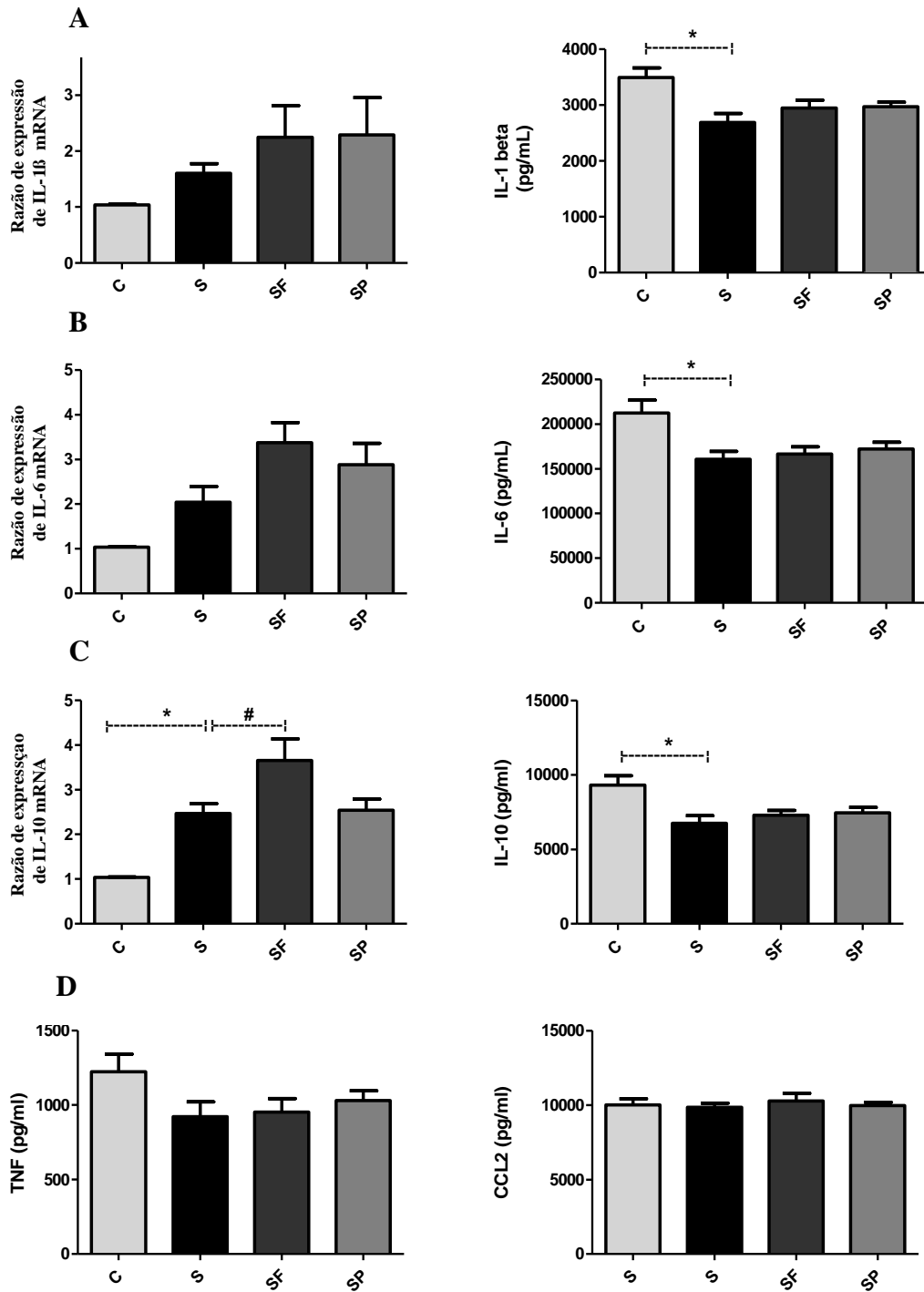
Para investigar o potencial anti-inflamatório da planta *Morus nigra L.* no tecido hepático, avaliamos os níveis de mRNA e de proteínas de importantes observadas durante a sepse nesse órgão.

Os resultados apresentados na figura 10A mostram que não houve diferença significativa nos níveis de mRNA de IL-1 $\beta$  entre os grupos experimentais. Por outro lado, a determinação da concentração dessa proteína no fígado revela uma diminuição da mesma nos animais pertencentes ao grupo séptico (S).

Com relação a expressão gênica de IL-6 também não houve diferença significativa entre os grupos avaliados, mas é possível observar uma diminuição significativa dessa citocina no fígado dos animais sépticos não tratados (S) em relação aos animais controle (C) (figura 10B).

A expressão gênica de IL-10 mostrou-se aumentada nos animais sépticos (S) em relação aos animais controle (C). Verificou-se ainda, que os animais que receberam o extrato das folhas (SF) aumentaram significativamente a concentração de mRNA dessa citocina quando comparados ao grupo (S). Ao analisar a concentração dessa proteína, observa-se uma redução significativa nos animais do grupo (S) em relação aos animais controle (C) e esse efeito não foi modificado pelos tratamentos (figura 10C).

A concentração em tecido hepático de TNF (figura 10D) e de CCL2 (figura 10E) também foram determinadas, mas não houve diferenças estatisticamente significativa entre os grupos experimentais nos níveis das mesmas.

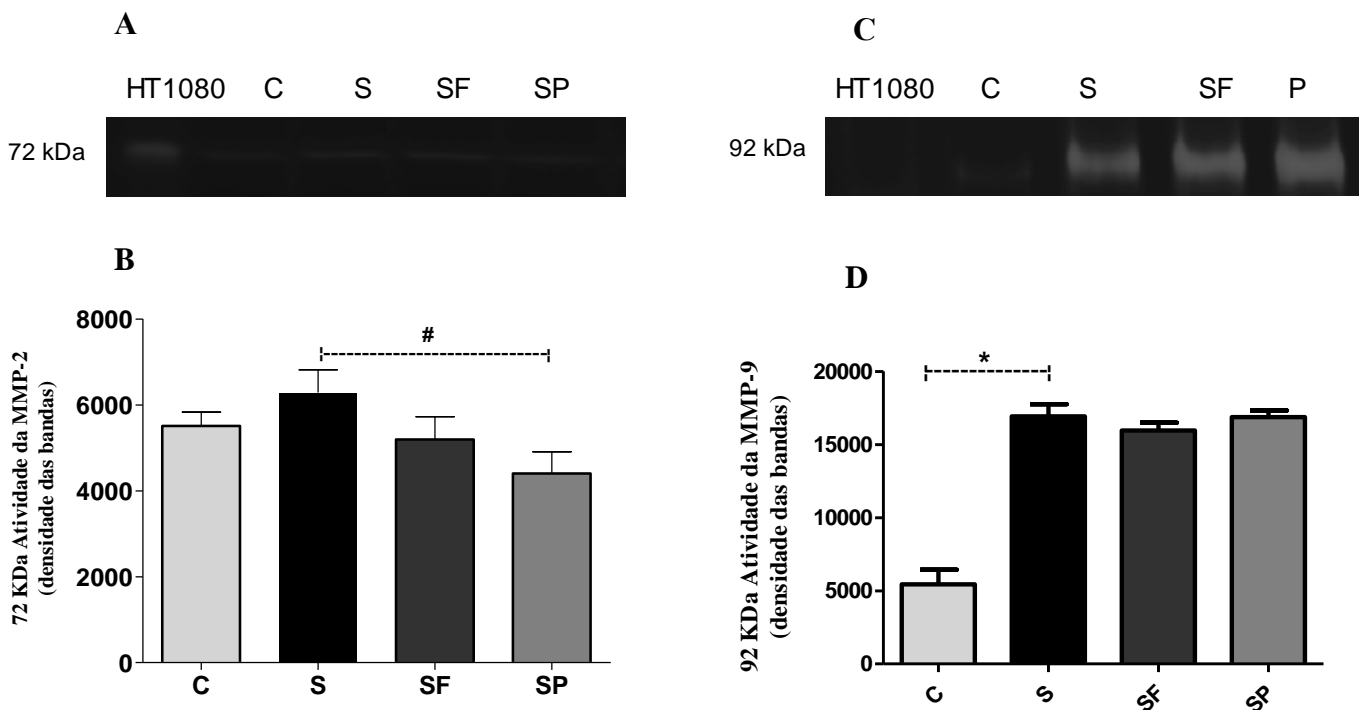


**Fig 10.** Avaliação da expressão e concentração de IL-1 $\beta$ (A), IL-6 (B), IL-10 (C), TNF (D) e CCL2 (E) em fígado de camundongos C57BL/6 controles (C), sépticos (S), sépticos tratados com extrato das folhas (SF) ou com a polpa (SP) de *Morus nigra* L. (\*) Representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e S e (#) entre S e SF ou S e SP.

## 5.5 - Efeito da polpa e do extrato das folhas de *Morus nigra* sobre a atividade das metaloproteinase MMP-2 e MMP-9

Os resultados representados na figura 11A e B mostram uma redução significativa na atividade da MMP-2 nos animais sépticos que foram tratados com a polpa de *Morus nigra* em relação aos animais sépticos não-tratados (S).

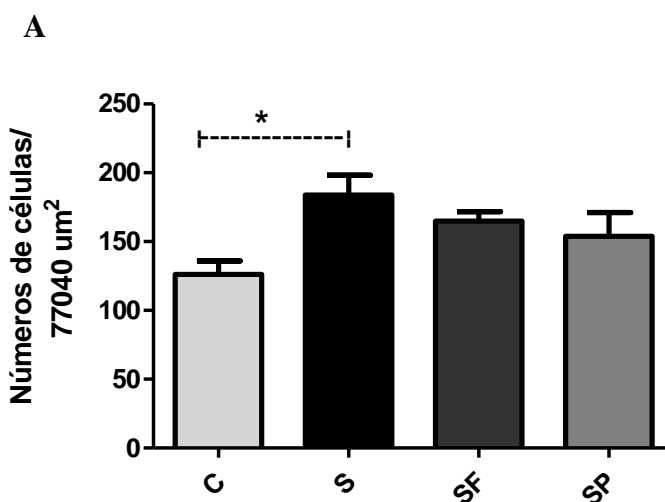
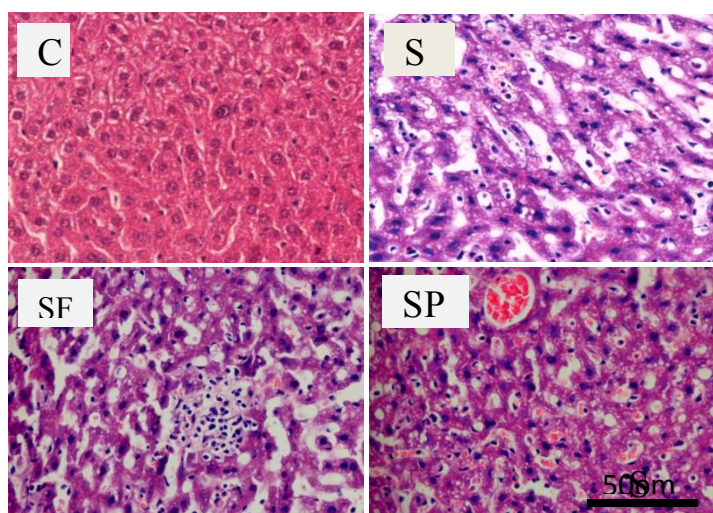
Com relação da MMP-9 (Fig 11C e D) observa-se um aumento significativo na atividade dessa enzima nos animais do grupo S em relação ao animais do grupo controle. Os tratamentos não modificaram a atividade dessa enzima nos animais dos grupos tratados (SF e SP) em relação aos animais do grupo S.



**Figura 11. Análise da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 em homogenato de tecido hepático de camundongos C57BL/6 controles (C), sépticos (S), sépticos tratados com extrato das folhas (SF) ou com a polpa (SP) de *Morus nigra* L. Imagem representativa das bandas de MMP-2 no gel (A), análise da atividade de MMP-2 (B), imagem representativa das bandas de MMP-9 no gel (C), atividade de MMP-9 (D). (\*) Representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e S e (#) entre S e SF ou S e SP.**

## 5.6- Análise histológica do fígado

A análise histológica revelou um aumento de células inflamatórias no fígado dos animais do grupo S quando comparados aos animais do grupo C. Observa-se ainda dilatação dos capilares sinusóides nos grupos dos animais sépticos que receberam ou não os tratamentos e algumas áreas com hiperemia (figura 12A). Não foram encontradas áreas de morte celular (necrose ou células em apoptose), áreas degenerativas ou fibróticas em nenhum dos animais dos grupos experimentais, tanto nas veias centro lobulares (VCL) quanto nos espaços porta (EP).



**Fig 12.** Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado (A). Análise morfométrica do influxo de células inflamatórias no fígado de camundongos C57BL/6 controles (C), sépticos (S), sépticos tratados com extrato das folhas (SF) ou com a polpa (SP) de *Morus nigra* L. (\*) Representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e S e (#) entre S e SF ou S e SP.

## CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO

A sepse é uma síndrome de grande complexidade e por isso possui vários pontos em potencial para intervenção terapêutica (SHUKLA., *et al* 2014). O desenvolvimento de um desequilíbrio redox na sepse já é bem estabelecido e mostra-se como um agente complicador, mas também como um alvo importante para possíveis terapias (PRAUCHNER., 2016).

Nos últimos anos, o interesse sobre as plantas do gênero *Morus* tem crescido e atualmente elas estão listadas pelo governo entre as plantas de interesse para pesquisa já que são amplamente utilizadas na medicina popular e possuem um grande potencial fitoterápico (PORTAL DA SAÚDE, 2013). As espécies desse gênero são conhecidas por possuírem grande concentração de metabólitos secundários, principalmente flavonoides, compostos aos quais a literatura científica atribui inúmeras atividades biológicas e terapêuticas (HAN *et al.*, 2007). Sabe-se que quase todas as partes dessas plantas são utilizadas na medicina popular e a cada uma delas tem sido associada a propriedades medicinais específicas. No que diz respeito à espécie *Morus nigra* L, os frutos e as folhas são as partes mais comumente utilizadas e estudadas (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

A concentração e o tipo de metabólito secundário nas plantas medicinais podem ser alterados por variáveis como sazonalidade, qualidade do solo em que são cultivadas, ritmo circadiano e também o estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra (GOBBONETO e LOPES., 2006). Baseado nisso, realizamos a caracterização fitoquímica de ambas as preparações utilizadas nesse estudo. Os resultados mostraram que na polpa há uma variedade maior de flavonoides devido à presença de antocianinas representadas pela delphinidina e pela cianidina. As antocianinas são pigmentos flavonoides que dão cor às flores e aos frutos de muitas plantas (KUSKOSKI *et al.*,2004) e muitos trabalhos vem associando a esses compostos atividades anti-inflamatórias, além da capacidade antioxidante; que é característica comum aos flavonoides (YAN *et al.*, 2015). A polpa e o extrato das folhas apresentaram em comum os seguintes compostos: ácidos cafeoilquímicos e quercetina. Os ácidos cafeoilquímicos possuem atividade antioxidante semelhante a outros ácidos fenólicos e são eficientes no sequestro de radicais livres e como quelantes de íons metálicos (PRAKASH *et al.*, 2007). Algumas propriedades terapêuticas do ácido cafeoilquímico estão relacionadas ao seu efeito anti-inflamatório, como inibidor da xantina-oxidase, modulador do desequilíbrio redox induzido pelo excesso de peróxido, atenuador da oxidação do colesterol, entre outras (IRAZ *et al.*,2005; MAURICIO, 2006). No que diz respeito a quercetina, sabe-se que é um flavonoide encontrado em diversas frutas e vegetais e tem demonstrado atividades antioxidante, anti-inflamatória, citoprotetora e até mesmo propriedade antialérgica (LUANGARAM *et al.*, 2007; GANESAN *et al.*, 2010). Os resultados obtidos a partir da

caracterização fitoquímica dos extratos evidenciaram que ambas as preparações poderiam atuar de forma positiva na fisiopatologia da sepse.

No presente estudo constatamos que a polpa e o extrato das folhas foram eficientes em promover a melhora de alguns marcadores da resposta inflamatória e do *status redox* em camundongos C57BL/6 que foram submetidos a sepse através de injeção intraperitoneal de LPS (10mg/kg). Os tratamentos diminuíram os níveis plasmáticos de TNF, o influxo de leucócitos nos pulmões e a atividade da glutathione peroxidase em relação aos animais sépticos que receberam apenas o veículo (S). Além disso, observamos ainda, que a polpa de amora reduziu significativamente a atividade da metaloproteinase 2 (MMP-2) no fígado desses animais. Analisamos a porcentagem de sobrevivência dos animais desafiados com LPS e os resultados nos mostraram uma maior sobrevida dos camundongos nos grupos que receberam a polpa (SP -78,57%) ou o extrato das folhas (SF- 71,42%) em relação aos animais que receberam apenas o veículo (S- 64,2%). Sugere-se que a maior sobrevivência observada nos grupos tratados tenha sido um reflexo da melhora de parâmetros sistêmicos e hepáticos que foram avaliados em nosso trabalho.

Com relação à curva de sobrevida dos animais estudados, YAN *et al* (2015) também verificaram em seu estudo um aumento na taxa de sobrevivência dos animais sépticos de 50% e 80% quando os animais receberam cianidina-3-*O*-glicosídeo nas doses de 10mg/kg e 30mg/kg, respectivamente. Um segundo estudo demonstrou que os animais que receberam ácido gálico (20mg/kg) dois dias antes da indução da sepse sobreviveram por mais horas que os animais sépticos que não haviam recebido tal tratamento (MAURYA *et al.*, 2014). Os nossos resultados juntamente com os relatos da literatura sugerem que substâncias antioxidantes podem exercer um efeito protetor sobre a vida de animais que são submetidos à sepse experimental.

Em nosso trabalho, analisamos os efeitos da planta *Morus nigra* L sobre alguns parâmetros sistêmicos que são tipicamente alterados pela sepse e que tem grande impacto no curso dessa doença. Avaliamos a concentração sérica das citocinas TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 que são consideradas importantes durante a sepse. Estudos anteriores demonstraram que TNF, IL-1  $\beta$  e IL-6 são as citocinas mais fortemente associadas com sepse e a super produção desses mediadores inflamatórios induz dano endotelial difuso, aumento da permeabilidade vascular, edema e vasodilatação. Esses processos em conjunto causam uma piora significativa do estado de saúde de indivíduos sépticos podendo levá-los ao óbito (ZHOU *et al.*,2014). Um estudo anterior avaliou a concentração sérica dessas mesmas citocinas em um modelo experimental de sepse induzida por LPS (10mg/kg) no qual camundongos C57BL-6 foram tratados, por gavagem, com quercetina (60mg/kg) por sete dias antes da indução da sepse.



Neste estudo o tratamento foi capaz de reduzir significativamente todas as citocinas pró-inflamatórias avaliadas (TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6) e aumentar a concentração de IL-10 (Wang *et al.*,2014). Yan *et al.* (2015) também observaram uma redução significativa na concentração sérica de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF em um modelo de sepse induzido por CLP no qual os animais receberam como tratamento o flavonoide cianidina-3-O-glicosídeo nas doses de 10mg/kg e 30mg/kg via intraperitoneal 30 minutos antes da cirurgia de indução da sepse. Os autores deste estudo observaram que o efeito benéfico foi dose-dependente.

O nosso delineamento experimental foi realizado por um período maior (21 dias) que os estudos anteriormente mencionados, nele observamos que os níveis de TNF foi reduzido significativamente pelos tratamentos. Outro ponto importante a ressaltar é que a maioria dos estudos disponíveis na literatura utilizaram como pre-tratamento os flavonoides isolados, como a quercetina e a cianidina (Wang *et al.*,2014; Yan *et al.* (2015) não refletindo, portanto, o hábito de consumo alimentar da população. Neste estudo optamos por avaliar o possível impacto de hábitos de consumo de fitoterápicos (folha de *Morus nigra* L.) ou seus frutos pela população sobre a sepse; assim fomos capazes de mimetizar da forma mais próxima possível a realidade de populações.

Sabe-se que os nutrientes ricos em antioxidantes apresentam uma variedade de substâncias que podem ter efeitos sinérgicos e ou antagônicos e que a biodisponibilidade destes metabolitos para exercer seus efeitos biológicos depende de outros fatores tais como, a absorção intestinal e o metabolismo de passagem (SIXEL e PECINALL., 2005; CHEN *et al.*, 2018). Sendo assim, nem sempre os efeitos positivos observados pelos tratamentos com substâncias antioxidantes isoladas podem ser extrapolados para o uso popular na prevenção de doenças. Desta forma, nosso estudo foi capaz de verificar se a polpa concentrada e o extrato bruto das folhas poderiam também ter efeitos positivos sobre a fisiopatologia da sepse tanto quanto os efeitos observados com as substâncias isoladas.

A sepse por ser uma síndrome de acometimento sistêmico pode causar danos a vários órgãos, sendo o pulmão um alvo frequente dessa patologia (LIU *et al.*,2018). Baseados nisso, avaliamos o influxo de leucócitos nos pulmões dos animais em estudo, a fim de avaliar possíveis danos provocados nesse órgão, bem como analisar os efeitos de ambos os tratamentos. Para isso realizamos a contagem total de células presentes no lavado broncoalveolar (LBA) e nossos resultados mostraram um aumento significativo de leucócitos nos animais sépticos (S) e uma redução significativa dessas células nos animais que receberam a polpa ou o extrato das folhas de *Morus nigra* L. Wang *et al* (2014) observaram que camundongos C57BL/6 que foram previamente tratados com quercetina antes de receberem injeção intraperitoneal de LPS, reduziram o recrutamento de leucócitos para os

pulmões e como consequência o dano tecidual foi menor quando esses animais foram comparados aos animais que receberam apenas veículo. Um segundo estudo em que ratos sépticos da linhagem *Sprague-Dawley* foram pré-tratados com cianidina-3-*O*-glicosídeo a concentração de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar também foi significativamente menor. Nossos resultados corroboraram com os resultados obtidos em estudos anteriores mostrando que os compostos antioxidantes podem diminuir o infiltrado inflamatório nos pulmões de animais sépticos.

A redução significativa na contagem de plaquetas conhecida como trombocitopenia, é uma das mais sérias e frequentes complicações que ocorrem durante a sepse. Essa alteração é considerada um forte preditor de mortalidade e é um reflexo de disfunção na cascata de coagulação (KOYAMA *et al.*, 2018). Além do seu importante significado clínico, a contagem de plaquetas tem sido utilizada para caracterizar uma disfunção orgânica de acordo com as novas definições de sepse. A disfunção de vários órgãos em pacientes sépticos tem sido atribuída a um estado pró-coagulante do organismo (THIERY-ANTER *et al.*, 2016) e por isso, neste trabalho avaliamos a concentração de plaquetas. Os resultados nos mostraram uma redução significativa de plaquetas nos animais sépticos (S) em relação aos animais controles (C) além de evidenciar que os tratamentos (SF e SP) não foram capazes de alterar esse parâmetro. Um estudo recente observou a redução significativa no número de plaquetas em camundongos BALB/c que foram desafiados com LPS (1 mg/kg) (SAKURAI *et al.*, 2017). Esse fenômeno pode acontecer em decorrência de uma diminuição da produção de plaquetas ou aumento na sua utilização no processo de coagulação já que ocorre uma intensa ativação desse sistema promovendo a deposição de microtrombos na microcirculação sistêmica com consequente consumo de grandes quantidades de plaquetas e fatores de coagulação (BOECHAT *et al.*, 2012). Já foi mostrado que durante a sepse, as plaquetas são recrutadas para diferentes órgãos como fígado e pulmão e isso também justificaria seu decréscimo no sangue periférico (SHUKLA *et al.*, 2014).

Avaliamos a glicemia dos animais pois sabe-se que a sepse é uma doença que pode afetar o metabolismo energético dos pacientes. Quanto a esse parâmetro, nossos resultados mostraram uma redução significativa na glicemia dos animais sépticos em relação aos animais controles. Foi possível observar também que os tratamentos não alteraram essa condição hipoglicêmica dos animais sépticos. Um estudo recente observou que ratos Wistar submetidos a CLP e tratados com curcumina, via oral, não apresentaram melhora na condição hipoglicêmica causada pela sepse. Sabe-se que a hiperglicemia ocorre frequentemente na fase inicial (6 primeiras horas), fase hiperdinâmica da sepse, quando o corpo gasta uma grande quantidade de energia (SILVA *et al.*, 2015). Acredita-se que seja devido ao aumento da

glicogenólise e gliconeogênese hepática mediada por hormônios do estresse, como glucagon, catecolaminas e epinefrina, que estão aumentados nesta fase (NORBURY *et al.*,2007). Na fase tardia da sepse (após 24 horas), pode ocorrer hipoglicemia, principalmente devido à diminuição dos estoques hepáticos de glicogênio que foram gastos anteriormente na fase hiperativa (MARIK e RAGHAVAN.,2004) e isso corrobora com os nossos resultados uma vez que os animais foram eutanasiados 24 horas após a indução da sepse.

Avaliamos o perfil antioxidante no fígado dos animais como forma de avaliar o desequilíbrio redox causado pela sepse e os efeitos da *Morus nigra* sobre as defesas antioxidantes.

Os antioxidantes enzimáticos constituem um dos mais importantes mecanismos de defesa do organismo contra o aumento excessivo de espécies reativas que pode ser observado no desequilíbrio redox. Atualmente sabe-se que o desequilíbrio redox está envolvido em diversas doenças como um agente complicador e devido a isso a avaliação do funcionamento do sistema antioxidante enzimático tem-se mostrado cada vez mais imprescindível (HE *et al.*, 2017). Baseados nisso, avaliamos as atividades das principais enzimas que compõe o sistema antioxidante enzimático.

As enzimas SOD e CAT contituem a primeira linha de defesa do organismo contra as espécies radicalares derivadas do oxigênio. Elas podem ser induzidas rapidamente em condições de desequilíbrio redox e a análise de suas atividades podem fornecer informações importantes sobre o perfil antioxidante de um tecido (ZHANG *et al.*, 2015). A análise da atividade dessas duas enzimas em nosso estudo mostrou um aumento significativo na atividade de SOD e uma diminuição na atividade de catalase nos animais sépticos (S) em relação aos animais controles (C). Verificamos também um aumento na razão SOD/CAT no grupo S em relação ao gupo C, observando ainda que os grupos SF e SP foram estatisticamente iguais aos animais do grupo S. Resultados semelhantes ao nosso já foram relatados na literatura. Andrades *et al* (2011) também verificou um aumento na atividade de SOD e diminuição na atividade de CAT nos rins e nos pulmões de animais que foram tratados com o antioxidante n-acetilcisteína nas primeiras horas após a indução da sepse por CLP. Analisando a razão entre as atividades dessas duas enzimas, observamos que ela manteve-se significativamente aumentada nos animais pertencentes aos grupos sépticos (S, SF e SP). Isso evidencia que o aumento na atividade de SOD ocorreu de forma isolada,ou seja, não foi acompanhado por um aumento da atividade de CAT. Nessa condição, a atividade de SOD geralmente não protege a célula de um possível desequilíbrio redox, ao contrário, sua ativação resulta em um aumento da produção de peróxidos de hidrogênio que pode mediar danos às membranas e outras biomoléculas por peroxidação ou reagir com ferro via reação de Fenton (STEPIEN *et al.*,

2017). Além disso, a enzima CAT que poderia converter o excesso de peróxido de hidrogênio pode ser inativada por esse acúmulo de peróxido na célula, uma vez que essas espécies reativas podem causar a oxidação do sítio ativo dessa enzima o que justificaria a diminuição da atividade dessa enzima. (PRAUCHNER *et al*, 2016). Andrades *et al* (2004) verificou que o desequilíbrio entre as atividades dessas duas enzimas antioxidantes culminou no aumento da lipoperoxidação celular (TBARs) em animais sépticos.

Como componente importante da defesa antioxidante enzimática, analisamos também o sistema glutiona. Nesse sentido, a enzima glutaciona peroxidase (GPx) tem se mostrado um importante biomarcador de estresse oxidativo em pacientes sépticos desempenhando um papel crítico na proteção de órgãos e tecidos vitais contra os danos oxidativos. A principal função bioquímica dessa enzima é catalisar a redução de peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos orgânicos e peróxidos lipídicos através da conversão de glutaciona reduzida (GSH) a glutaciona oxidada (GSSG) (LEE *et al*, 2017). Estudos já relataram que a bioatividade da GPx e conseqüentemente de todo o ciclo da glutaciona correlaciona-se inversamente com a gravidade e também mortalidade dos pacientes sépticos (MANZANARES *et al.*, 2009). Em nosso estudo, ao avaliar os componentes desse ciclo, nossos resultados mostraram um aumento significativo na atividade da enzima glutaciona peroxidase nos animais do grupo séptico (S) em relação aos animais controle (C). Observamos também que os tratamentos foram capazes de reduzir significativamente atividade dessa enzima nos animais tratados em relação aos animais que receberam apenas o veículo (S). Constatamos também uma redução na atividade da enzima glutaciona redutase nos animais do grupo sepse (S) em relação aos animais controle (C). Os tratamentos não alteraram a atividade dessa enzima. Com relação a quantificação do conteúdo total da glutaciona e suas frações, diferenças foram observadas apenas no conteúdo total e na fração reduzida nos animais do grupo sepse (S) em relação aos animais controle (C). O aumento da atividade da glutaciona peroxidase pode ser explicado por um mecanismo adaptativo do fígado em resposta ao acúmulo de peróxido de hidrogênio. O aumento da atividade da enzima SOD em todos os grupos sépticos (S, SF e SP) e o conseqüente aumento na produção de peróxido de hidrogênio não foi acompanhado pelo aumento da enzima catalase que é responsável por catalisar a hidrólise desse peróxido em moléculas de água e oxigênio. Sendo assim, o peróxido acumulado pode ter sido desviado para o sistema glutaciona pela ação da enzima glutaciona peroxidase. Isso justificaria o aumento da atividade dessa enzima nos animais sépticos (S). Muitos estudos já mostraram que o LPS pode elevar a atividade de enzimas antioxidantes como uma resposta ao aumento de espécies reativas causado por essa substância (EL-TANBOULY *et al.*, 2015, EL KEBBAJ *et al.*, 2015). Por outro lado, a atividade dessa enzima nos animais que receberam os

tratamentos pode ter sido reduzida pela ação antioxidante direta dos compostos fenólicos presentes nas duas preparações de *Morus nigra* L. que foram utilizadas nesse trabalho, em que os polifenóis são capazes de reagir diretamente com as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio neutralizando sua ação oxidante sobre o organismo (PAIVA *et al.*, 2015). A glutathione peroxidase utiliza como cofator a glutathione reduzida e isso explicaria a diminuição da concentração hepática desse cofator nos animais sépticos (S). Além disso, a diminuição de GSH poderia também ser justificada pela diminuição na atividade da glutathione reductase que é a enzima responsável por restaurar a concentração desse co-fator a partir da fração oxidada desse tripeptídeo. Maurya *et al.*, (2014) também encontrou uma diminuição nos níveis de GSH no fígado de camundongos albinos no modelo de sepse induzido por CLP.

Para investigar o potencial anti-inflamatório da planta *Morus nigra* L. sobre o tecido hepático, avaliamos os níveis de mRNA de genes que codificam algumas importantes citocinas produzidas durante a sepse. Paralelamente, também foi realizada a dosagem das proteínas de algumas dessas citocinas nesse tecido. No que diz respeito à expressão gênica das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Por outro, observamos um aumento significativo dos níveis de mRNA de IL-10 no grupo dos animais sépticos (S) em relação aos animais controles (C). Além disso, verificamos também um aumento significativo nos níveis de mRNA dessa citocina nos animais sépticos tratados com o extrato das folhas de *Morus nigra* L quando comparados aos animais sépticos (S). Ao avaliar a concentração das proteínas de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10, observamos que houve uma redução significativa dessas citocinas nos animais do grupo sepse (S) em relação aos animais controle (C). Além disso, observamos também que os tratamentos não exerceram efeitos estatisticamente significativos sobre a concentração dessas proteínas no fígado dos animais sépticos (SF e SP). Sabe-se que, no fígado, o LPS ativa as células de Kupffer que por sua vez iniciam a produção de citocinas pró- inflamatórias como IL-1  $\beta$  e IL-6. Com o intuito de regular uma possível resposta imunológica excessiva que possa lesionar o órgão, o fígado também é capaz de desenvolver uma resposta anti-inflamatória com a produção de proteínas com perfis imunoregulatórios como por exemplo a IL-10. No entanto, o que constatamos em nosso estudo foi uma redução significativa de ambas as classes de citocinas evidenciando uma possível resposta de imunossupressão nesse órgão. Alguns trabalhos anteriores já mostraram que a imunossupressão observada no fígado durante a sepse pode ser mediada por uma diminuição na expressão de receptores TLR4 na superfície das células de Kupffer e isso reduziria os efeitos inflamatórios do LPS (YAN *et al.*, 2014). A imunossupressão também poderia ocorrer via aumento na produção de IL-10 (STRNAD *et al.*, 2016). Em nosso trabalho observamos que o aumento na expressão genica de IL-10 não

foi acompanhado pelo aumento nos níveis hepáticos da mesma. Sabe-se que mecanismos pós-transcricionais podem ser responsáveis por impedir que o transcrito seja traduzido e expresso. Além disto, segundo Muftuoglu *et al* (2006) as principais alterações no fígado ocorrem de forma precoce nos modelos animais, mais precisamente às 6 horas após a indução da sepse. Sabendo que os resultados refletem exatamente a situação fisiológica dos animais no momento em que eles foram eutanasiados supõe-se que o aumento de IL-10 tenha ocorrido nas primeiras horas após a injeção de LPS declinando horas depois. Possivelmente, por esse motivo não conseguimos visualizar esse aumento em nosso estudo. Mas para verificar essa hipótese, um outro estudo precisa ser desenvolvido para avaliar o ciclo temporal de produção dessas citocinas nas horas posteriores à injeção de LPS.

A sepse está relacionada a eventos como hipoperfusão global e local, lesão endotelial difusa associada a um estado procoagulante e ativação sistemática das células do sistema imune (MAURYA *et al.*, 2014). Todos esses eventos contribuem de forma importante para as diversas disfunções orgânicas observadas durante a sepse e são originados em parte pelo aumento excessivo de citocinas e outros mediadores inflamatórios na circulação sistêmica. Sabe-se que o LPS é capaz de induzir a transcrição e aumento na atividade de diversas metaloproteinases, principalmente de MMP-2 e MMP-9 (BELLAVANCE *et al.*, 2008). As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases cálcio e zinco dependentes responsáveis pelo remodelamento e degradação da matriz extracelular da membrana basal (PENGBO *et al.*, 2015). Estas endopeptidases são também reguladores importantes dos processos fisiológicos, como a angiogênese, a morfogênese, a reparação tecidual, tendo participação em algumas doenças como câncer, doenças cardiovasculares, artrite, diabetes, entre outros (PAGE-McCAW *et al.*, 2007; GHAJAR *et al.*, 2008; . Nossos resultados mostraram uma redução significativa na atividade da MMP-2 nos animais sépticos que foram tratados com a polpa de amora em relação aos animais sépticos não-tratados (S). Com relação à atividade de MMP-9 observa-se um aumento significativo na atividade dessa enzima no fígado dos animais do grupo S em relação aos animais do grupo controle. Um estudo realizado com ratos wistar machos em um modelo experimental de sepse induzida por CLP, mostrou um aumento tanto na expressão quanto na atividade das metaloproteinases do tipo 2 e 9 no córtex cerebral e também no hipocampo de animais sépticos decorridas 24 horas da indução da sepse (DAL-PIZZOL *et al.*, 2013). Em nosso trabalho não verificamos o aumento na atividade de MMP-2, entretanto, sabe-se que a MMP-2 é uma enzima de expressão constitutiva, pouco responsiva à maioria de estímulos e a MMP-9 é induzível, sendo considerada um marcador da inflamação sistêmica em animais (OPDENAKKER *et al.*, 2001). Segundo Sachwani (2016), a MMP-9 pode ser considerada um biomarcador da

inflamação e durante a sepse tem sua atividade aumentada quando os neutrófilos são ativados no sítio da infecção. Esse processo poderá resultar em lesões teciduais, maior perpetuação do ciclo vicioso da inflamação e até mesmo destruição tecidual. Ainda nesse sentido, estudos clínicos já relataram um aumento na atividade de MMP-9 em indivíduos que não sobreviveram à sepse evidenciando uma relação entre os níveis séricos aumentados dessa enzima e a gravidade da doença (NAKAMURA *et al.*,1998).

No que diz respeito à análise histológica do fígado, foi observado um aumento significativo no influxo de leucócitos nesse tecido nos animais sépticos quando comparados aos animais controle. Observamos ainda que os tratamentos não foram capazes de alterar esse parâmetro uma vez que os grupos SF e SP foram estatisticamente iguais aos animais S. A análise da arquitetura do tecido hepático nos revelou um aparente aumento dos capilares sinusóides nos animais sépticos que pode ser explicado pelo influxo de leucócitos nesse órgão. Sakurai *et al* (2017) também observaram dilatação e congestionamento dos capilares sinusóides em animais sépticos em um modelo experimental de sepse induzida com LPS nas primeiras horas após indução. Os macrófagos residentes nesse tecido, também denominados por células de Kupffer são responsáveis pela produção precoce de citocinas inflamatórias na lesão hepática induzida pela sepse. A presença de bactérias nocivas e/ou endotoxinas fazem com que essas células de Kupffer aumentem produção e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL- 8 e proteína quimiotática de monócitos 1, bem como mediadores secundários de lesão tecidual, por exemplo, NO e espécies reativas de oxigênio e esses mecanismos poderiam justificar as alterações histológicas que foram encontradas no fígado dos animais sépticos (YAN *et al.*,2014).

Nossos resultados deixaram ainda mais evidente a complexidade da sepse mostrando que essa é uma doença capaz de comprometer de forma relevante a função de diversos órgãos, principalmente do fígado. Nosso estudo também mostrou que os tratamentos, o extrato das folhas e a polpa de *Morus nigra* L., produziram efeitos benéficos em parâmetros importantes que normalmente encontram-se alterados pelo desenvolvimento dessa síndrome (tabela 4).

**Tabela 4** - Resumo dos principais resultados observados com o pré-tratamento com os extratos das folhas e polpa de *Morus nigra* sobre os mediadores inflamatórios, status redox e manifestações sistêmicas em modelo experimental de sepse induzida por LPS.

<b>Parâmetros</b>	<b>Sepse</b>	<b>Folha + Sepse</b>	<b>Polpa + Sepse</b>
<b>Leucócitos no LBA</b>	↑↑	↓↓	↓↓
<b>Plaquetas</b>	↓↓	----	----
<b>Glicemia</b>	↓↓	----	----
<b>TNF-<math>\alpha</math> serico</b>	↑↑	↓↓	↓↓
<b>IL-6 serico</b>	↑↑	----	----
<b>SOD/CAT</b>	↑↑	----	----
<b>GPX</b>	↑↑	↓↓	↓↓
<b>GR</b>	↓↓	----	----
<b>GSH</b>	↓↓	↑↑	↓↓
<b>mRNA IL-10</b>	↑↑	↑↑	----
<b>TNF, IL-6 e IL-10 hepatico</b>	↓↓	----	----
<b>MMP-2</b>	----	↓↓	----
<b>MMP-9</b>	↑↑	----	----
<b>Infiltrado inflamatorio hepatico</b>	↑↑	----	----
<b>Sobrevida</b>	↓↓	↑↑	↑↑



## CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES

Analisando os resultados, podemos concluir que os tratamentos possuem ação anti-inflamatória e antioxidante. Ambas as preparações de *Morus nigra L.* utilizadas neste estudo promoveram efeitos benéficos por meio da redução na concentração sérica de TNF, considerado um importante mediador inflamatório na sepse além de reduzirem também o influxo de leucócitos para os pulmões, o que possivelmente amenizou os danos inflamatórios neste órgão. Os tratamentos atuaram também sobre a atividade de uma enzima essencial à defesa antioxidante no fígado que é a glutathione peroxidase. Sugere-se que os efeitos positivos produzidos pelos tratamentos se refletiram em uma maior sobrevivência dos animais sépticos. Isso mostra que os compostos químicos presentes em ambas as preparações conseguem modular, ao menos em parte, os danos causados pela sepse.

## CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**. v. 105, p. 106-121, 1984.
- ALMEIDA, M. Z. Plantas medicinais (online), 221 p. ISBN 978-85-232-1216-2, 2011.
- ALVAREZ, S. et al. Cardiac dysfunction, mitochondrial architecture, energy production, and inflammatory pathways: Interrelated aspects in endotoxemia and sepsis. **The International Journal of biochemistry & Cell Biology**. v.81, p.307-314, 2016.
- ALVAREZ, S. e BOVERIS, A. Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 37, p.1472–1478, 2004.
- ARFAN, M. KHAN, R. RYBARCZYK, A. AMAROWICZ, R. Antioxidant Activity of Mulberry Fruit Extracts. **International Journal of Molecular Sciences**. 13: 2472-2480. 2012.
- BELLAVANCE, M.A. et al. Recent advances in blood–brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. **The AAPS Journal**. v.10, p.166–177, 2008.
- BENJAMIM, C.F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina, Ribeirão Preto** v. 34, p. 18-26. 2001.
- BOUDERBALA, S. et al. Iridoid extracts from açugaiwa increase the antioxidant enzyme activities in red blood cells of rats fed a cholesterol-rich diet. **Nutrition Research**. v. 30, p. 358-365, 2010.
- BREALEY, D. et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. **Lancet**. v.360, p.219–23, 2002.
- BROAD, A. et al. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological “damage limitation” effect and an important potential opportunity for therapy. **Current Medicinal Chemistry**.v,13, n.21, p.2487–502, 2006.
- BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med**, V.115, n.6, 457-69, 1991.
- BOECHAT, T. O. et al. Trombocitopenia na sepse: um importante marcador prognóstico. **Revista Brasileira de Intensiva**. v. 24, n. 1, p. 35-42, 2012 .
- CARVALHO, A. C. B. et al. Situação de registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, 2008.
- CHOI, K.C. et al. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-septic potential of phenolic acids and flavonoid fractions isolated from *Lolium multiflorum*. **Pharmaceutical Biology**. v. 55, n. 1, 611–619. 2016.
- CALIXTO, J. B. et al. Biological activity of plant extracts: novemanalgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v. 2, p. 261-279, 2001.
- CHOUSTERMAN, B.G. et al. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. **Seminars in immunopathology**. v.39, n.5, p.517-528, 2017.

CANABAL, J.M e KRAMER, D.J. Management of sepsis in patients with liver failure. **Current Opinion Critical Care**. v.14, n.2, p.189–97, 2008.

CARVALHO, P. et al .Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. **Jornal de Pediatria. (Rio J.)**, Porto Alegre. v.79, n.2, p.195-204, 2003.

CHEN, J. et al. Effects of processing method on the pharmacokinetics and tissue distribution of orally administered ginseng. **Journal of ginseng research**. v.42, p.27-34, 2018.

DAL-PIZZOL, F. et al. Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood–brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis. **Molecular Neurobiology**. v.48, n.1, p.62-70, 2013.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/search?SearchableText=amora+preta&x=10y=9> .

EL-TANBOULY, D.M. et al. Pretreatment with magnesium ameliorates lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. **Pharmacological Reports**. v.67,p. 914–920, 2015.

EL KEBBAJ, R. Argan oil prevents down-regulation induced by endotoxin on liver fatty acid oxidation and gluconeogenesis and on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1<sub>α</sub>, (PGC-1<sub>α</sub>), peroxisome proliferator-activated receptor <sub>α</sub> (PPAR<sub>α</sub>) and estrogen related receptor <sub>α</sub> (ERR<sub>α</sub>).**Biochimie Open**. v.1, p. 51–59, 2015.

ERCISLI, S; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1380-1384. 2007.

EREL. S.B. et al. Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. **Pharmaceutical Biology**. v.49, p.840–849, 2011.

FERREIRA, A.L.A. e Matsubara, L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. Revista da Associação Médica Brasileira. v.43, 1997.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa, Universidade Federal do Maranhão (UFMA)**. v. 18, n. especial, 2011.

FINFER, S., MACHADO, F.R. The global epidemiology of sepsis. Does it matter that we know so little?. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 193, p.228–230, 2016.

FRANZOTTI, E. M. **Identificação de agonistas e antagonistas de receptores nucleares em extratos de plantas medicinais: *Morus nigra* L., *Plectranthus ornatus* Codd., *Ipomea cairica* (L) sweet e *Pouteria torta* (Mart.) radlk**. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Faculdade de Ciências da Saúde -Universidade de Brasília, 2006. Disponível em: <<http://repositorio.bce.unb.br/bitstream/10482/4645/1/tese.pdf>>.

GAO, D. e LI, W. Structures and recognition modes of toll-like receptors. **Proteins**. v.85, n.1, p. 3–9, 2017.

GANESAN, S. et al. Quercetin prevents progression of disease in elastase/ LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression. **Respiratory Research**. v.11, n.131, p. 1–15, 2010.

GHAJAR C. M., et al. Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis. **Critical Reviews Eukaryotic Gene Expression**. v. 18, p.251-278, 2008

GOBBO-NETO, L e LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30,n. 2, p. 374-381, 2007

GONZÁLEZ, E.A., AGRASAR, A.T., CASTRO, L.M.P., FERNÁNDEZ, I.O., GUERRA, N.P. Production and characterization of distilled alcoholic beverages obtained by solid-state fermentation of black mulberry (*Morus nigra L.*) and black currant (*Ribes nigrum L.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58: 2529–2535, 2010.

GRANCE S. R. M., et al. Baccharistramera: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 117, p. 28 – 33, 2008

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, n.27, p. 1-93, 2006.

GUSTOT, T. et al. Severe sepsis in cirrhosis. **Hepatology**. v.50, n.6, p.2022–33, 2009.

HASSIMOTTO. N.M et al. Inhibition of carrageenan-induced acute inflammation in mice by oral administration of anthocyanin mixture from wild Mulberry and Cyanidin-3-Glucoside. **BioMed Research International**.v.213, n.10,p 959-969, 2013.

HAN, W.L.Chemical constituents from leaves of *Morus multicaulis*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**. V.32, p. 695–698, 2007.

HE, L. et al. Antioxidantes maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 44, p. 532-553, 2017.

HUANG, H. et al. Mulberry and bioactive compounds the effects and molecular mechanisms *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Tradicional and Complementary medicine**. v.3,n.1, p. 7-15, 2013.

IRAZ M., et al. Role of vagal activity on bradycardic and hypotensive effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE). **Cardiovascular Toxicology** . v.5, p. 391-396, 2005

INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE SEPSE (ILAS). Sepsis: um problema de saúde pública. 2015. 90 p.

JOHANSEN J. S et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**. v. 4, p. 1-11, 2005.

JUNIOR, V. F. V; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**. v.28, n.3, p.519-528. 2005.

KAMIYAMA, M. e SHIBAMOTO, T. Flavonoids with potent antioxidant activity found in young green barley leaves. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**. v.60, 2012.

- KIM, J-Y, LEE S-M. Effect of ascorbic acid on hepatic vasoregulatory gene expression during polymicrobial sepsis. **Life Science**. V.75, p.2015–26, 2004
- KUSKOSKI, E. M. et al . Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimento**. v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004
- KOYAMA, K. et al. Time course of immature platelet count and its relation to thrombocytopenia and mortality in patients with sepsis. **Plos-one**. 2018
- KOURY, J. C. A. et al. Risk factors associated to mortality on septic patients in an intensive care unit of a general private hospital from Pernambuco. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 1, p. 23-30, 2007.
- KUZMICH, N.N. et al. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. **Vaccines**. v.5, n.4, 2017.
- LEE, W.-J. et al. Comparison of glutathione peroxidase-3 protein expression and enzyme bioactivity in normal subjects and patients with sepsis. **Clinica Chimica Acta**. 2017
- LEVY, M. M. et al. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Medicine**. v. 29, n. 4, p. 530-8, 2003.
- LU, W. et al. Tetramethylpyrazine showed therapeutic effects on sepsis- induced acute lung injury in rats by inhibiting endoplasmatic reticulum stress protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase (PERK) Signaling-Induced Apoptosis of Pulmonary Microvascular Endothelial Cells Endothelial Cells. **Medical Science Medical**. v 28, n.24, p.1225-1231, 2018.
- LUANGARAM, S. et al. Protective effects of quercetin against phenylhydrazine-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, n.3, p. 448-455, 2007.
- MANZANARES, W. et al. Serum selenium and glutathione peroxidase-3 activity: biomarkers of systemic inflammation in the critically ill?. **Intensive Care Medicine**. v. 35, n.5, p.882–889, 2009.
- MARKLUND, S. L. et al. Superoxide dismutase in extracellular fluids. **Clinica Chimica Acta**. v.126, p. 41-51, 1982.
- MARIK, P.E. e RAGHAVAN, M. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. **Intensive Care Medicine**.v. 30, p.748–756, 2004.
- MAURYA, H et al. Prophylactic Antioxidant Potential of Gallic Acid in Murine Model of Sepsis. **International Journal of Inflammation**. v.2014, 2014.
- MUFTUOGLU, M.A. et al. Liver injury in sepsis and abdominal compartment syndrome in rats. **Surgery Today**. v.36, n.6, p. 519–24, 2006.
- NAUDI, A. et al. Cellular Dysfunction in Diabetes as Maladaptive Response to Mitochondrial Oxidative Stress. **Experimental Diabetes Research**. p.1-14, 2012.

NAKAMURA, T. et al. Modulation of plasma metalloproteinase-9 concentrations and peripheral blood monocyte mRNA levels in patients with septic shock: effect of fiber immobilized polymyxin B treatment. **The American Journal of Medical Sciences**. v. 316, p. 355–360, 1998.

NORBURY, W.B et al Metabolism modulators in sepsis: propranolol. **Critical Care Medicine**. v. 35, p.616–620, 2007.

ODY, M. P. The Complete Guide Medicinal Herbal, 2nd ed. Dorling Kindersley, London. 2000.

OPDENAKKER, G. et al. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. **Trends in Immunology**.v.22,p.571-579, 2001.

PADILHA, M. M. **Estudo farmacognóstico, fitoquímico e farmacológico das folhas de Morus nigra L.(amoreira-preta)**.Dissertação (Mestradoem Ciências Farmacêuticas)- Universidade FederaldeAlfenas,2009. Disponível em: [http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/ Detalhe ObraForm.do?s elect\\_action=&co\\_obra=143445](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/ Detalhe ObraForm.do?s elect_action=&co_obra=143445)>.

PAGE-MCCAW, A., et al. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.8, p. 221-233, 2007.

PAIVA, F. A. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*) Protects against Oxidative Stressand  $\beta$ -Amyloid-Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2015.

PARIHAR, A. et al. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**. v.34, p.6–17, 2008.

PAWLOWSKA, A.M., OLESZEK, W., BRACA, A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra L.* and *Morus alba L.* (*Moraceae*) fruitsAgric. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 3377–3380, 2008.

PENGBO, W. et al. Interactions of central obesity with rs3918242 on risk of non-alcoholic fat liver disease: a preliminary case-control study. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. v.8, p.4165 – 4170, 2015.

PEREIRA JÚNIOR. et al. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. **Medicina**. Ribeirão Preto. v.31,p.349-362, 1998.

PORTAL DA SAÚDE. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agenciasaude/noticias-anterioresagencia-saude/3487>. Acessado em Dezembro de 2017.

PRAKASH D. et al. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. V. 58, p. 18 – 28, 2007.

PRAUCHNER, C.A. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. **Journal of the International Society for Burn Injuries**. v. 43, n.3, p. 471-485, 2016.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-13, 2001.

SACHWANI, G. R. The association between blood glucose levels and matrix metalloproteinase-9 in early severe sepsis and septic shock. **Journal of Inflammation**. v.13, n.13, 2016.

SAKURAI, K et al. Role for Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Platelet Aggregation in Early Sepsis-induced Hepatic Dysfunction. **In vivo**.v.31, p.1051-1058, 2017.

SIXEL, P.J e PECINALLI, N.R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, v.16, n. 13-14, 2005.

SCOTT M. D. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **The Journal of Laboratory Clinical Medicine**. v.118, p. 7-16, 1991.

SHUKLA, P. et al. Therapeutic interventions in sepsis: current and anticipated pharmacological agents. **British Journal of Pharmacology**. v.171, n. 22, p. 5011-31, 2014.

SILVA, L.S. et al. Curcumin suppresses inflammatory cytokines and heat shock protein 70 release and improves metabolic parameters during experimental sepsis. **Pharmaceutical Biology**. v. 55, n. 1, p. 269–276, 2016.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801-10, 2016.

SINGAB, A.N., EL-BESHBISHY, H.A., YONEKAWA, M., NOMURA, T., FUKAI, T. Hypoglycemic effect of Egyptian *Morus alba* root bark extract: effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacological**. 100: 333–338, 2005.

SIORE A.M. et al. Endotoxin-induced acute lung injury requires interaction with the liver. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**. v.289, n.5, p.769–76, 2005.

SOGAYAR A.M et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**.v.26,n.5, p.425-34, 2008.

STEPIEN, K. M et al. Evidence of Oxidative Stress and Secondary Mitochondrial Dysfunction in Metabolic and Non-Metabolic Disorders. **Journal of Clinical Medicine**. v. 6, n.7, 2017.

STRNAD, P. et al. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** . v.14, n.1.p. 55-66, 2017.

SUN, D. et al .A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. **Molecular Therapy**. v. 18, p.1606–1614, 2010.

SUNG M. M. et al. Matrix metalloproteinases-2 degrades the cytoskeletal protein  $\alpha$ -actinin in peroxybrite mediated myocardial injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 43:429-436, 2007.

TACKE, F. & ZIMMERMANN, H. W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. **Journal of Hepatology**. v.60, n.5, p. 1090–1096, 2014.

TANIGUCHI, L. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Critical Care**. v. 18, n.6, 2014.

TEIXEIRA, J. B. P. et al. A Fitoterapia no Brasil: da Medicina Popular à regulamentação pelo Ministério da Saúde (online). 2012.

THIERY-ANTER, N. et al. Is Thrombocytopenia an Early Prognostic Marker in Septic Shock?. **Critical Care Medicine**. v.44,n. 4, p.764-72, 2016.

URSELL, A. The Complete Guide Healing Foods. Dorling Kindersley, London. 2000.

YAN, X. et al. Cyanidin-3-O-glucoside attenuates acute lung injury in sepsis rats. **The Journal of Surgical Research**. v. 199, n.2, p.592-600, 2015.

YAN, J. et al. The role of the liver in sepsis. **International reviews of immunology**. V. 33, n.6. p. 498–510, 2014.

ZHOU, L. et al. Protective effect of astaxanthin against multiple organ injury in a rat model of sepsis. **Journal of Surgical Research**. v. 195, n. 2015, p. 559 -567, 2014.

WANG, L. et al. Protective effect of quercetin on lipopolysaccharide- induced acute lung injury in mice by inhibiting inflammatory cell influx. **Experimental Biology and Medicine**. 2014.



## ANEXOS

### C- Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

#### Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 57867-1	Data da Emissão: 08/03/2017 16:45
Dados do titular	
Nome: Daniela Caldeira Costa Calsavara	CPF: 012.965.966-56

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos..
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, biosprossecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
9	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outra

#### Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPECIE	Morus nigra

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 11166392



Página 1/1

## ANEXOS

### D- Comprovante de cadastro no SisGen



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**

**Cadastro nº AE1540B**

A atividade de acesso ao Conhecimento Tradicional Associado, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AE1540B**  
Usuário: **Daniela Caldeira Costa Calsavara**  
CPF/CNPJ: **012.965.966-56**  
Objeto do Acesso: **Conhecimento Tradicional Associado**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

#### Espécie

**Morus nigra L.**

#### Fonte do CTA

**CTA de origem não identificável**

Título da Atividade: **Avaliação da eficácia do tratamento com a polpa e extrato das folhas de Morus nigra L. (amora) sobre a modulação de parâmetros inflamatórios e do status redox em um modelo de sepse e os mecanismos envolvidos: um estudo in vitro e in vivo**

#### Equipe

<b>Daniela Caldeira Costa Calsavara</b>	<b>UFOP</b>
<b>Karine de Pádua Lucio</b>	<b>Universidade Federal de Ouro Preto</b>

Data do Cadastro: **01/06/2018 15:22:35**  
Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:23** de **01/06/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**