



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA DE
Agaricus brasiliensis E *Ilex paraguariensis* *in vitro* E EM MODELO DE SEPSE
MURINO.**

Kely Campos Navegantes

Belém – Pa

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA DE
Agaricus brasiliensis E *Ilex paraguariensis* *in vitro* E EM MODELO DE SEPSIS
MURINO.**

Autora: Kely Campos Navegantes

Orientadora: Prof^ª Dr.^a Marta Chagas Monteiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Belém –Pa

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Navegantes, Kely Campos

Atividade antimicrobiana, antioxidante e imunomoduladora de *Agaricus brasiliensis* e *Ilex paraguariensis* *in vitro* e em modelo de sepse murinho / Kely Campos Navegantes; orientadora, Marta Chagas Monteiro. - 2016.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.

1. Sepse. 2. *Agaricus brasiliensis*. 3. *Ilex paraguariensis*. 4. Plantas medicinais. I. Título.

CDD: 22. ed. : 615.321

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kely Campos Navegantes

Atividade antimicrobiana, antioxidante e imunomoduladora de *Agaricus brasiliensis* e *Ilex paraguariensis* *in vitro* e em modelo de sepse murino.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro (Orientadora)
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

Prof. Dr. Pedro Rosevelt Torres Romão
Instituição: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

Belém- Pa

2016

DEDICATÓRIA

Ao meu companheiro Bruno pelo amor e apoio incondicional e minha filha Kyara por ser um anjo em minha vida;
À minha família por ter me dado o suporte para chegar aonde cheguei;
À minha orientadora pela oportunidade de mostrar que eu sou capaz e pelo aprendizado;
Aos meus amigos/irmãos do laboratório Rafaelli, Rafael, Valter, Jordano, Walkyria, Dávila e Ana pois sem eles esse trabalho não seria possível.

EPÍGRAFE

“No final tudo dá certo, e se não deu é porque ainda não
chegou ao fim”.

Autor: Fernando Sabino

RESUMO

NAVEGANTES, K.C. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA DE *AGARICUS BRASILIENSIS* *ILEX PARAGUARIENSIS* *IN VITRO* E EM MODELO DE SEPSE MURINO. f.143. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

A sepse é uma disfunção orgânica causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção. Na abordagem terapêutica inicial da sepse são utilizados antimicrobianos de amplo espectro, que não é suficiente para o controle da infecção, sendo necessárias associações com outras terapias. Dessa forma, o *Ilex paraguariensis* por ser um potente antimicrobiano, antioxidante, e *Agaricus brasiliensis* possui propriedades imunomoduladora poderiam ser uma nova fonte de terapia. Assim, o presente estudo visou avaliar o efeito antimicrobiano, antioxidante e imunomodulador *in vitro* e *in vivo* dos extratos. Para tanto, neste estudo, foi avaliada a ação antimicrobiana *in vitro* dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* pelo método da microdiluição e espectrofotométrico para determinação de concentração inibitória Mínima e técnica de cultivo em placa de petri para a concentração bactericida mínima. Foi também avaliada a citotoxicidade em macrófagos, produção de óxido nítrico (NO), proliferação, fagocitose, capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) e determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). *In vivo*, os camundongos swiss com sepse induzida foram pré-tratados com os extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* e após 12 e 24 horas suas amostras coletadas, e avaliado a sobrevivência, migração leucocitária, hemograma, carga bacteriana, produção de NO, níveis de malonaldeído, TEAC em *ex vivo* avaliou-se capacidade fagocítica e liberação de EROs. O *A. brasiliensis* não apresentou atividade antimicrobiana *in vitro*, manteve as células viáveis, reduziu a capacidade fagocítica, aumentou NO, mas na presença de LPS reduziu o NO, apresentou efeito proliferativo, mas na presença do mitógeno teve efeito antiproliferativo e possui uma forte atividade antioxidante e capacidade de sequestro de radicais *in vitro*. O *I. paraguariensis* apresentou atividade antimicrobiana assim como efeito citotóxico, induziu à capacidade fagocítica dos leucócitos, aumentou NO, mas na presença de LPS reduziu, teve efeito proliferativo e atividade antioxidante com capacidade de sequestro de radicais *in vitro*. Em modelo de sepse *in vivo*, ambos aumentaram a sobrevivência dos animais. O *A. brasiliensis* reduziu o influxo de leucócitos enquanto que o *I. paraguariensis* aumentou. Somente *A. brasiliensis* teve o hemograma semelhante ao sham, ambos extratos reduziram a carga bacteriana e diminuíram os níveis de NO, MDA e aumentaram os níveis de antioxidante nos tecidos, além disso, ambos diminuíram a produção de ERO. Apesar de ambos extratos apresentarem excelentes resultados *in vitro*, o extrato aquoso de *A. brasiliensis* mostrou ser mais promissor que o extrato de *I. paraguariensis* como uma terapia adjuvante na sepse, devido sua elevada atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória *in vivo*.

Palavra-chave: Sepse, *Agaricus brasiliensis*, *Ilex paraguariensis*.

ABSTRACT

NAVEGANTES, K.C. EVALUATION ANTIMICROBIAL ACTIVITY, ANTIOXIDANT, AND IMMUNOMODULATORY OF *AGARICUS BRASILIENSIS* AND *ILEX PARAGUARIENSIS IN VITRO* AND MURINE MODEL OF SEPSIS. f.143.Masters Dissertation, Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2016.

Sepsis is an organ dysfunction caused by a dysregulated immune response to an infection, the initial therapeutic approach to sepsis are broad spectrum antimicrobials, which is not sufficient for control of infection, requiring association with other therapies. Thus, *Ilex paraguariensis* where to be a potent antimicrobial, antioxidant and *Agaricus brasiliensis* has immunomodulatory properties could be a new source of therapy. Thus, this study aimed to evaluate the antimicrobial effect, antioxidant and immunomodulatory *in vitro* and *in vivo* of the extracts. Therefore, in this study, we evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of aqueous extracts from *A.brasiliensis* and *I. paraguariensis* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by the method of microdilution and by spectrophotometry for determination of minimum inhibitory concentration and cultivation technique on petri dish for minimum bactericidal concentration, cytotoxicity in macrophages was evaluated, nitric oxide (NO) production, proliferation, phagocytosis, equivalent antioxidant capacity to Trolox (TEAC) and determination of the total antioxidant activity by capturing the free radical and reactive species production oxygen (ROS). In the swiss mice with induced sepsis were pretreated with aqueous extracts of *A.brasiliensis* and *I. paraguariensis*, after 12 and 24 hours collected their samples and evaluated the survival, leukocyte migration, hemogram, bacterial load, NO production, malondialdehyde (MDA), TEAC and *ex vivo* we evaluated phagocytic capacity and release of ROS. The *A.brasiliensis* showed no antimicrobial activity *in vitro*, remained viable cells reduced the phagocytic capacity, increased NO, but in the presence of LPS reduced, showed proliferative effect, but in the presence of mitogen had antiproliferative effect and has a strong antioxidant activity and capacity to sequester radicals *in vitro*. *I.paraguariensis* presented antimicrobial activity as well as cytotoxic effect induced phagocytic capacity increased NO, but in the presence of LPS reduced, had proliferative effect, antioxidant activity and capacity to sequester radicals *in vitro*. *In vivo* model of sepsis, both increased the survival of animals, *A.brasiliensis* reduced leukocyte influx while Ilex increased, only *A.brasiliensis* had hemogram similar to sham, both extracts reduced bacterial load and levels decreased NO, MDA and increased antioxidant levels in the tissues, in addition, both reduced the production of both extracts present ERO. Although excellent *in vitro* results, the aqueous extract from *A.brasiliensis* was found to be most promising as an adjuvant therapy in sepsis that *I. paraguariensis* due to its high antimicrobial activity, antioxidant and anti-inflammatory *in vivo*.

Keyword: Sepsis; *Agaricus brasiliensis*; *Ilex paraguariensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Estrutura da parede celular de bactérias gram-negativas e gram-positivas.	23
Figura 02: (A) modelo de LPS; (B) bicamada fosfolipídica normal (C) membrana externa com LPS de gram-negativas.	24
Figura 03: Diagrama esquemático da sepse e o sistema imunológico.	27
Figura 04: A produção de espécies reativas por fagócitos	28
Figura 05: Cascata da coagulação na sepse.	30
Figura 06: Áreas de ocorrência de erva-mate.	33
Figura 07: <i>Ilex paguariensis</i> .	34
Figura 08: <i>Agaricus brasiliensis</i> .	38
Figura 09: Localização da β -D-glucana na parede celular. A) Estrutura da parede celular; B) β -D-glucana (1 \rightarrow 3) com ramificação β -(1 \rightarrow 6).	39
Figura 10: Delineamento experimental dos testes <i>in vitro</i> .	46
Figura 11: Ilustração da obtenção de leucócitos do sangue periférico.	48
Figura 12: Delineamento experimental <i>in vivo</i> .	55
Figura 13: Procedimento da CLP.	57
Figura 14: Controles para a determinação do CIM e CBM para <i>S.aureus</i> .	62
Figura 15: Determinação de CIM e CBM de <i>A.brasiliensis</i> frente à <i>S.aureus</i> .	63
Figura 16: Determinação de CIM e CBM de <i>I.paraguariensis</i> frente à <i>S.aureus</i>	62
Figura 17: Controles para a determinação do CIM e CBM para <i>E.coli</i> .	64
Figura 18: Determinação de CIM e CBM do <i>A.brasiliensis</i> frente à <i>E.coli</i> .	65
Figura 19: Determinação de CIM e CBM de <i>I.paraguariensis</i> frente à <i>E.coli</i>	65
Figura 20: Viabilidade celular macrófagos peritoneais.	68
Figura 21: Atividade Fagocítica <i>in vitro</i> .	70
Figura 22: Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais após o tratamento de <i>A. brasiliensis</i> (2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL) com ou sem LPS (10 μ g/mL) incubados por 24 e 48 horas.	71
Figura 23: Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais após o tratamento de <i>I. paraguariensis</i> (1,81; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL) com ou sem LPS (10 μ g/mL) incubados por 24 e 48 horas.	71
Figura 24: Avaliação da proliferação celular de esplenócitos de camundongos swiss estimulados ou não com ConA (10 μ g/mL) e tratados com extratos aquosos de <i>A. brasiliensis</i> nas concentrações de 2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL.	72
Figura 25: Avaliação da proliferação celular de esplenócitos de camundongos swiss estimulados ou não com ConA (10 μ g/mL) e tratados com extratos aquosos de <i>I.paraguariensis</i> nas concentrações de 1,85; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL.	73
Figura 26: Avaliação da capacidade antioxidante dos diferentes extratos aquosos de <i>A. brasiliensis</i> , <i>I.paraguariensis</i> , e do padrão ácido gálico. (A e B) Capacidade antioxidante pelo método do TEAC (C e D) Atividade sequestrante de DPPH*.	75
Figura 27: Avaliação da liberação de espécies reativas de oxigênio por polimorfonucleares de sangue periférico tratadas com <i>A. brasiliensis</i> e com <i>I.paraguariensis</i> , induzidas com ou não tBPH (40 μ M) por 30 minutos de incubação.	76
Figura 28: Taxa de sobrevivência dos animais Sham e com sepse por 16 dias. Os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=5 por grupo): 1-grupo Sham e os	77

demais tiveram sepse e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (salina+CLP), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I.paraguariensis* (22,2 mg/Kg).

- Figura 29:** Peso corporal dos animais Sham e com sepse no decorrer do tempo. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (salina+CLP), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I.paraguariensis* (22,2 mg/Kg). 78
- Figura 30:** Migração leucocitária no lavado peritoneal nos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I.paraguariensis* (22,2 mg/Kg). Neutrófilos (A) 12 horas após a CLP (B) 24 horas após a CLP; Mononucleares (C) 12 horas da CLP; (D) 24 horas da CLP. 80
- Figura 31:** Produção de óxido nítrico nos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I.paraguariensis* (22,2 mg/Kg). 83
- Figura 32:** Produção de óxido nítrico nos tecidos de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I.paraguariensis* (22,2 mg/Kg). 84
- Figura 33:** Produção de MDA no soro e peritônio de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I.paraguariensis* (22,2 mg/Kg). 85
- Figura 34:** Produção de MDA nos órgãos dos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I.paraguariensis* (22,2 mg/Kg). 86
- Figura 35:** Capacidade antioxidante total no soro e peritônio de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I.paraguariensis* (22,2 mg/Kg). 87
- Figura 36:** Capacidade antioxidante total nos órgãos de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I.paraguariensis* (22,2 mg/Kg). 88
- Figura 37:** Capacidade Fagocítica *ex vivo*. Leucócitos provenientes dos animais sham, e dos animais com sepse pré-tratados com Ceftriaxona (20 mg/kg), com extrato aquoso de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) e com extrato aquoso de *I.paraguariensis* (22,2 mg/Kg) foram removidos após 24 horas da CLP e 89

incubados com partículas de Zymosan (5×10^6) e avaliada em espectrofotômetro.

Figura 38: Liberação de EROs dos leucócitos peritoneais dos animais com sepse. Leucócitos provenientes dos animais Sham, e dos animais com sepse pré-tratados com Ceftriaxona (20 mg/kg), com extrato aquoso de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) e com extrato aquoso de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg) foram removidos após 24 horas da CLP e incubados ou não com tBHP e produção de EROs foi avaliada por fluorescência. 90

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Biomarcadores da sepse.	22
Quadro 02: Abordagens de intervenções terapêuticas na sepse.	31
Quadro 03: Classificação taxonômica de <i>Ilex paraguariensis</i> .	34
Quadro 04: Estudos que mostram a atividade antimicrobiana de <i>Ilex paraguariensis</i> .	36
Quadro 05: Classificação Taxonômica de <i>Agaricus brasiliensis</i> .	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Score do SOFA relacionado a Sepse.	21
Tabela 02: Estratégias terapêuticas potenciais da sepse.	36
Tabela 03: Atividade biológica dos compostos encontrados em <i>Ilex paraguariensis</i> .	66
Tabela 04: Comparação do CIM pelo método da Resazurina (colorimétrico) o método espectrofotométrico (turbidimétrico).	67
Tabela 05: Porcentual de inibição das bactérias frente aos extratos aquosos <i>Agaricus brasiliensis</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> .	67
Tabela 06: IC ₅₀ dos extratos aquosos de <i>Agaricus brasiliensis</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> frente à <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .	67
Tabela 07: Valores da concentração citotóxica (CC ₅₀) de <i>Agaricus brasiliensis</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> frente à macrófagos peritoneais.	68
Tabela 08: Índice de seletividade (IS) e citotoxicidade dos extratos aquosos de <i>A. brasiliensis</i> e <i>I. paraguariensis</i> , frente aos macrófagos peritoneais e as bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .	68
Tabela 09: Avaliação da capacidade antioxidante pelo método do TEAC e DPPH, do controle ácido gálico, dos extratos <i>A. brasiliensis</i> e <i>I. paraguariensis</i> em diferentes concentrações.	74
Tabela 10: Parâmetros hematológicos dos grupos sham, dos animais com sepse pré-tratados com salina, Ceftriaxona (20 mg/kg), <i>A. brasiliensis</i> (135 mg/Kg) ou <i>I. paraguariensis</i> (22,2 mg/Kg) após 24 horas de sepse induzida.	81
Tabela 11: Carga bacteriana nos animais Sham e com sepse pré-tratados com salina, Ceftriaxona, <i>A. brasiliensis</i> e <i>I. paraguariensis</i> após 12 horas de indução de sepse.	82
Tabela 12: Carga bacteriana nos animais Sham e com sepse pré-tratados com salina, Ceftriaxona, <i>A. brasiliensis</i> e <i>I. paraguariensis</i> após 24 horas de sepse induzida.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A.brasiliensis</i>	<i>Agaricus brasiliensis</i>
<i>A.blazei</i> Murril	<i>Agaricus blazei</i> Murril
ACCP	American College of Chest Physicians
AP-1	Ativador de proteína 1
ATCC	American Type Culture Collection
CD	Cluster of Differentiation
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC ₅₀	Concentração Citotóxica 50%
CLP	<i>cecal ligation puncture procedure</i> - Ligação e perfuração do ceco
CI ₅₀	Concentração Inibitória 50%
COX	Ciclo-oxigenase
CONA	Concavalina A
DCFH	Diclorodidrofluoreceína
DCFH-DA	Diclorodidrofluoreceína
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FT	Fator tecidual
IC ₅₀	Concentração Inibitória 50%
<i>I.paraguariensis</i>	<i>Ilex paraguariensis</i>
IL	Interleucina
LA	Lípido A
<i>L. Monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LBP	Proteína de Ligação
LPS	Lipopolissacarideo
LTA	Ácido Lipoteicóico
L-NAME	Inibidor competitivo do óxido nítrico sintase
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GSH	Glutathiona reduzida
H ₂ DCFH-DA	2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína
IS	Índice de Seletividade
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
IKK	I kappa B kinase
JNK	Proteína quinase c-Jun N-terminal
MAPK	proteína ativada por mitogénio via cinase
MIF	Fator de Inibição da Migração
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MSEC	Métodos de substituição extracorpórea
NOD	Domínio de recrutamento
NO	Óxido nítrico

NFκB	Factor nuclear κB
ONOO-	Peroxinitrito
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAI-1	Plasminogênio 1
PAM	Pressão arterial média
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão Fosfato-salino
PMNs	Polimorfonucleares
RPMI	Instituto Memorial Park Roswell
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SIS	<i>American Thoracic Society</i>
SNC	Sistema nervoso central
TAC	Capacidade Antioxidante Total
tBHP	Tert-Butyl hydroperoxide
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TLR	Toll-Like receptor
TREM-1	Receptor de superfície expresso em células mieloides
UCLA	Instituto de Otorrinolaringologia da Universidade da Califórnia
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPA	Universidade Federal do Pará
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
CO ₂	Dióxido de Carbono
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fostato de Potássio dihidrogenado
Na ₂ HPO ₄	Fostato de sódio dibásico
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NED	Cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina
NO ₂	Nitrito
OH•	Radical hidroxila
O ₂ •	Ânion superóxido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Sepsis	20
2.2 Fisiopatologia da sepsis	23
2.2.1 A SEPSIS E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	24
2.2.2 A SEPSIS E O ESTRESSE OXIDATIVO	28
2.2.3 ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS NA SEPSIS	29
2.3 Terapia	30
2.3.1 PRODUTOS NATURAIS COMO TERAPIA DA SEPSIS.....	32
2.4 <i>Ilex paraguariensis</i> – ERVA-MATE	33
2.4.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE	33
2.4.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA	34
2.4.3 COMPOSTOS QUÍMICOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	35
2.5 <i>Agaricus brasiliensis</i> – Cogumelo do Sol	37
2.5.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE.....	37
2.5.2 COMPOSTOS BIOATIVOS DE <i>Agaricus brasiliensis</i> E SUAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS.	39
3. OBJETIVO	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
3.2.1 TESTES <i>IN VITRO</i>	41
3.2.2 TESTES <i>IN VIVO</i> :.....	42
3.2.3 TESTE <i>EX VIVO</i> :	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Animais de experimentação	43

4.2 Amostras biológicas	43
4.3 Reagentes	44
4.4. Inóculo de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	44
4.4.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO DE <i>Escherichia coli</i> E <i>Staphylococcus aureus</i> ..	44
4.5. Fornecimento e preparo do extrato aquoso de <i>Agaricus brasiliensis</i>	45
4.6 Fornecimento e preparo do extrato aquoso de <i>Ilex paraguariensis</i> A.ST.-HILL ...	45
4.7 Testes <i>in vitro</i>	46
4.7.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS	46
4.7.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DE ESLENÓCITOS	47
4.7.3 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO	47
4.7.4 VIABILIDADE CELULAR DE MACROFAGOS PERITONEAIS.....	48
4.7.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE MICROBIANA DOS EXTRATOS DE <i>Agaricus brasiliensis</i> E <i>Ilex paraguariensis</i> POR MICRODILUIÇÃO	48
4.7.6 AVALIAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	50
4.7.7 CITOTOXIDADE PELO MÉTODO DIRETO 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2YL)- 2,5-DIFENIL BROMETO DE TETRAZOLINA (MTT)	50
4.7.8 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).....	51
4.7.9 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCÍTICA.....	51
4.7.10 DOSAGEM DE ÓXIDO NITRICO	52
4.7.11 PROLIFERAÇÃO CELULAR	52
4.7.12 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	53
4.7.13 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ESPECIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)	54
4.8 Testes <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	54
4.8.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	55

4.8.2 MODELO DE SEPSE INDUZIDA POR TRANSFIXAÇÃO DO COTO-CECAL	56
4.8.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS COM SEPSE INDUZIDA COM TRATAMENTO	57
4.8.4 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL, SANGUE E ÓRGÃOS	57
4.8.5 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA INDUZIDA POR SEPSE E EFEITO DO TRATAMENTO COM O <i>Agaricus brasiliensis</i> E <i>Ilex paraguariensis</i> EM ANIMAIS	58
4.8.6 HEMOGRAMA	59
4.8.7 AVALIAÇÃO DA CARGA BACTERIANA	59
4.8.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NITRICO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	59
4.8.9. DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEIDO (MDA) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	59
4.8.10. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EQUIVALENTE AO TROLOX (TEAC) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	60
4.8.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA <i>EX VIVO</i>	60
4.8.12. QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ROS INTRACELULAR <i>EX VIVO</i>	61
4.9 Análise estatística	61
5 RESULTADOS	62
5.1 Testes <i>in vitro</i>	62
5.1.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	62
5.1.2 CITOTOXICIDADE CELULAR	68
5.1.3 SELETIVIDADE	69
5.1.4 CAPACIDADE FAGOCÍTICA	69
5.1.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	70
5.1.6 PROLIFERAÇÃO CELULAR	72
5.1.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	73
5.1.8 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)	75

5.2 Testes <i>in vivo</i>	77
5.2.1 SOBREVIDA	77
5.2.2 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL	78
5.2.3 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA	78
5.2.4 HEMOGRAMA	81
5.2.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA BACTERIANA EM TECIDOS	82
5.2.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO.....	83
5.2.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONALDEÍDO (MDA)	85
5.2.8 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO DE TEAC	86
5.2.9 CAPACIDADE FAGOCÍTICA DOS LEUCÓCITOS PERITONEAIS	89
5.2.10 LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).....	89
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÃO	112
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	114
ANEXOS	11439

1. INTRODUÇÃO

Sepse é uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção (SEYMOUR et al. 2016). É uma das principais causas de morte entre os pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (HOTCHKISS, 2001). Na América Latina em geral, dados consistentes sobre a incidência são escassos, no entanto segundo o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), em 2014, 59% dos pacientes dos 112 hospitais públicos e privados apresentaram sepse grave com a taxa de mortalidade de 31,6% (ILAS, 2014). Estudos adicionais colocam o Brasil entre os países que apresentam a maior incidência e mortalidade por sepse em UTI's (KAUSS et al. 2010).

O desenvolvimento da sepse depende das relações estabelecidas entre micro-organismo com o hospedeiro (BOECHAT e BOECHAT, 2010). Primeiramente ocorre o reconhecimento dos padrões moleculares relacionados aos patógenos (PAMPS), pelos receptores de reconhecimento padrão (PRR), das células do sistema imune, estas por sua vez liberam mediadores inflamatórios como citocinas, óxido nítrico (NO), proteínas de fase aguda e fator tissular (TF) (SRISKANDAN e ALTMANN, 2008; SIQUEIRA-BATISTA et al. 2011; PETERS e COHEN, 2013) resultando na vasodilatação, hipoperfusão tecidual, choque e falência de órgãos (TUPCHONG et al. 2015). Durante a sepse, também ocorrem alterações bioquímicas que conduzem a um desequilíbrio no sistema redox com redução dos níveis plasmáticos de glutathiona (GSH), tioredoxinas e selênio (BERGER e CHIOLÉRO, 2007; ANDRADE et al. 2011).

Fatores como o quadro clínico instável do paciente, tempo de duração da hospitalização e internação prévia (TACCONELLI, et al. 2008; CHEN, et al. 2008), falta do planejamento quanto ao uso de antimicrobianos (GANDHI et al. 2010; SALOMÃO et al. 2011) associada a presença de patógenos potencialmente multirresistentes, (VOGELAERS et al. 2010; PRADIPTA et al. 2013), torna necessária a associação dos antibióticos com outras medidas terapêuticas, tais como terapia nutricional, imunoterapia e uso de antioxidante (PEREIRA JUNIOR et al. 1998; GROENEVELD et al. 2001; WILSON, 2013). Desta forma, a busca por novas substâncias a partir de produtos naturais oriundo de plantas medicinais e cogumelos podem vir a ser utilizados como possíveis terapias.

O uso de plantas medicinais no passado era adotada pela população carente da área rural ou urbana, devido à fácil disponibilidade e menores custos (SHALE et al. 1999). Dentre as plantas medicinais, a *Ilex paraguariensis* A.St.Hill conhecida popularmente como erva-mate (LORENZI e MATOS, 2002), que apresenta propriedades antimicrobianas e antioxidante, quais

já foram associadas à compostos como: derivados do ácido caféico, o linalol, α -ionona, β -ionona, α -terpineol, ácido octanóico, geraniol, 1-octanol, nerolidol, geranilactona e eugenol (KUBO et al. 1993; SCHINELLA et al. 2000; BURRIS et al. 2012).

Outra terapia alternativa a partir de produtos naturais é o uso de cogumelos, como o *Agaricus brasiliensis*, conhecido popularmente como “cogumelo do sol” (MOURÃO, 2008). Este macrofungo tem propriedade imunomoduladora (NAVEGANTES, 2013), antitumoral (MORI et al. 1987, DALLA-SANTA et al. 2013), antioxidante (SOARES et al. 2009), antidiabética (KIM et al. 2005) entre outras. Além disso, o *Agaricus brasiliensis* é rico em proteínas, vitaminas, sais minerais (REIS et al. 2012), polissacarídeos, especialmente β -D-glucanas (MIZUNO e NISHITANI, 2013).

Desta forma, estudos que avaliem o efeito antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante dos extratos de *Ilex paraguariensis* e *Agaricus brasiliensis in vitro* e em modelo murino de sepse seriam de grande importância ao surgimento de possíveis terapias eficientes, de baixo custo e menor resistência bacteriana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sepsis

A *Society of Critical Care Medicine* e a *European Society of Intensive Care Medicine*, recentemente realizaram o terceiro consenso para a definição de sepsis e choque séptico (“*Sepsis-3*”). Com base em evidências científicas e devido à inadequada especificidade e sensibilidade dos critérios deixa de existir o termo SIRS e a sepsis grave por se tratar de um termo redundante. Foi mantido apenas as nomenclaturas sepsis e choque séptico, porém com maior especificidade na descrição, no diagnóstico, no relato e no tratamento (SINGER et al. 2016).

Portanto, fica definido que a sepsis é uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada à uma infecção, obedecendo ao critério clínico da suspeita ou certeza de infecção com aumento agudo de ≥ 2 ou mais pontos “*Sequential Organ Failure Assessment*” (SOFA) em resposta à uma infecção, que está associada a uma mortalidade hospitalar superior a 10% (SEYMOUR et al. 2016).

O choque séptico trata-se de uma sepsis acompanhada por profundas anormalidade circulatórias e celulares/metabólicas capazes de aumentar a mortalidade substancialmente. Seu critério clínico consiste na presença da sepsis confirmada, mais a necessidade de vasopressor para elevar a PAM acima de 65mmHg e lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL) após a reanimação volêmica adequada. Esta combinação está associada com taxa maiores que 40% da mortalidade hospitalar (SHANKAR-HARI et al. 2016).

Para a triagem de pacientes propensos a ter sepsis, é utilizado um modelo clínico chamado de “*quick Sequential Organ Failure Assessment*” (qSOFA), que pode avaliar o paciente sem exigir testes laboratoriais e de forma rápida diferente do SOFA (Tabela 01) que necessita de testes laboratoriais. Os critérios usados no q SOFA são: PA sistólica menor que 100mmHg, frequência respiratória igual ou maior que 22/min e alteração do estado mental (GCS < 15). Cada variável conta um ponto no score, em que uma pontuação igual ou maior a 2 indica maior risco de mortalidade ou permanência prolongada na UTI (SEYMOUR et al. 2016).

Tabela 01. Escore do SOFA relacionado a Sepses. Adaptado de Singer et al. (2016)

Sistema	Escore				
	0	1	2	3	4
Respiratório PaO₂/FiO₂ mmHg (kPa)	>400 (53,3)	<400 (53,3)	<300(40)	<200 (26,7) com suporte respiratório	<100 (13,3) com suporte respiratório
Coagulação Plaquetas, x10³/uL	≥150	<150	<100	<50	<20
Hepático Bilirrubina:mg/dL (umol/L)	<1,2	1,2 - 1,9 (20-30)	2 - 5,9 (33-101)	6 - 11,9 (102-204)	>12 (204)
Cardiovascular	PAM ≥ 70mmHg	PAM < 70mmHg	Dopamina <5; dobutamina	Dopamina5-15; epinefrina<0,1; Norepinefrina<0,1	Dopamina5-15; epinefrina≥0,1; Norepinefrina>0,1
Nervoso Central Escala de Glasgow (coma)	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	<6
Renal Creatinina: mg/dL (umol/L) Débito Urinário (mL/d)	< 1,2 (110)	1,2 - 1,9 (110-170)	2 - 3,4 (171-299)	3,5 - 4,9 (300-440) <500	>5 (440) <200

Legenda: FIO₂:Fração inspirada de Oxigênio; PAM: Pressão Arterial Média; PaO₂: Pressão de oxigênio arterial

Apesar dos avanços nos cuidados de saúde, a sepse ainda representa a principal causa de morte nas UTIs em todo o mundo, no qual um quarto dos pacientes que desenvolvem sepse morrem durante a internação e o choque séptico é associado com a mortalidade de 50% (MAYR; YENDE e ANGUS et al. 2014). Nos Estados Unidos da América a sepse é a principal causa de morte entre os pacientes na UTI (HOTCHKISS, 2001) e na Europa 35% dos pacientes internados em UTI's apresentam quadro séptico em algum momento de sua estada, sendo que 27% morrem de sepse (VICENT et al. 2006). Na América Latina em geral, dados consistentes sobre a incidência são escassos, no entanto um estudo realizado por Sales Júnior (2006), analisou 75 UTI's de 65 hospitais, observou que 19,60% dos pacientes apresentavam sepse e 50,80% choque séptico. Estudos adicionais colocam o Brasil entre os países que apresentam a maior incidência e mortalidade por sepse em UTI's, cerca de 64% dos pacientes morrem por choque séptico (KAUSS et al. 2010; ILAS, 2014).

A análise do hemograma e testes de esfregaço sanguíneo são geralmente os primeiros resultados a serem obtidos, e irão auxiliar a equipe de saúde a diagnosticar a sepse. O paciente séptico pode apresentar leucocitose ou leucopenia e ainda a pancitopenia pode ser encontrada. Além destes, há neutrofilia com desvio à esquerda e a presença de granulócitos imaturos com granulações tóxicas (JACOB, 2002). Somado ao hemograma faz-se a análise bioquímica, haja vista que o paciente terá uma grande variação de eletrólitos e níveis séricos de enzimas do fígado, devido a hipóxia (CARVALHO, 2003).

Além do uso de resultados laboratoriais indiretos e exames bacteriológicos, já existem alguns diagnósticos por biomarcadores que são mais específicos, mostrados no quadro 01, entretanto estes muitas vezes não são usados na prática clínica (HOBSON e WONG, 2011; REINHART et al. 2012). Atualmente os estudos concentram-se na proteômica seguido pela genômica e transcritômicos, com o objetivo de definir as proteínas nas células, tecidos ou organismos, e sua relação com o processo séptico (CAO e ROBINSON, 2014). Sabe-se que o genótipo afeta a gravidade da doença infecciosa e muitos estudos têm demonstrado a associação entre a variabilidade genômica de um indivíduo com o desfecho de doenças inflamatórias e infecciosas (PRUCHA et al. 2015).

MARCADOR	MOTIVO	REFERÊNCIA
Proteína C-reativa	Presente na fase aguda da inflamação e ajuda a distinguir infecção viral de bacteriana.	ARNAUD et al. 2005; HARAN et al. 2013.
Procalcitonina	Peptídeo precursor da calcitonina. Atua como um quimiocina, modula a indução de citocinas anti-inflamatórias e induz a produção da isoforma induzível da oxido nítrico sintase (iNOS).	NYLEN et al.1998; SIMON et al. 2008; HENRIQUEZ-CAMACHO e LOSA, 2014
Interleucinas (IL) IL-6,IL-8,IL-10, fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-1 β	Mediadores envolvidos em todo processo da sepse, capazes de quantificar a severidade.	EICHACKER et al. 2002; SHULTE et al. 2013.
Proteína de ligação de Lipopolissacarídeo (LBP)	Responsável por facilitar a ligação do CD14 a endotoxina. Capaz de distinguir a etiologia infecciosa da não infecciosa.	PRUCHA et al. 2003; MIERZCHALA et al. 2011; HENRIQUEZ-CAMACHO e LOSA, 2014.
Marcadores de superfície celular de leucócitos (CD64)	Presente em neutrófilos ativados com uma excelente sensibilidade e especificidade.	BHANDARI et al. 2008; ICARDI et al. 2009.
Forma solúvel do receptor de ativador de plasminogênio tipo uroquinase (suPAR)	O uPAR é expresso em vários tipos celulares, está presente em funções como migração, adesão, angiogênese entre outros. Está relacionado com a mortalidade do paciente.	BACKES et al. 2012; HENRIQUEZ-CAMACHO e LOSA, 2014
D-dimer	Produto da degradação da fibrina, associado à trombose nos pacientes com sepse.	DEITCHER et al. 1993.
(sCD14-ST)-Presepsina	Fragmento solúvel de CD14 (Glicoproteína expressa na superfície de monócitos e macrófagos, receptor de LPS). Apresenta em níveis elados em pacientes sépticos.	NOVELI et al. 2013; MASSON et al. 2014; HENRIQUEZ-CAMACHO e LOSA, 2014.
Receptor de superfície expresso em células mielóides (TREM-1)	Receptor expresso em fagócitos pela exposição de bactérias e fungos. Tem como finalidade distinguir etiologia infecciosa da não infecciosa.	FERAT-OSORIO et al. 2008; HENRIQUEZ-CAMACHO e LOSA, 2014
CD73	Proteína de superfície celular com papel fundamental na geração de adenosina extracelular. Medeia os efeitos anti-inflamatórios.	VOLMER;THOMPSON;BLAC KBURN, 2006; BELLINGAN et al,2014.

Quadro 01: Biomarcadores da sepse.

2.2 Fisiopatologia da sepse

Os microrganismos em geral (vírus, bactéria, fungos, protozoários) podem iniciar o processo infeccioso de sepse. Segundo Sales Júnior (2006), um estudo epidemiológico realizado com 65 hospitais no Brasil, mostrou a incidência de gram-negativos foi de 40,1% e gram-positivos 32,8%, enquanto que de fungos foi de 5% em pacientes com sepse. Estudos recentes realizado pela “*European Prevalence of Infection in Intensive Care*” mostraram que a incidência de bactérias gram-positivas (46,8% dos casos) e gram-negativas (62,2%), no que *Staphylococcus aureus* é predominante (20,5%) seguido de *Pseudomonas* (19,9%), *Enterobacteriaceae* (16,0%) (MAYR;YENDE;ANGUS, 2014).

As bactérias se classificam de acordo com a característica de sua estrutura da parede celular (gram-positivas e gram-negativas) e morfologia (Figura 01). As gram-positivas possuem uma camada espessa de peptidoglicano e são desprovidas de lipídeos na parede celular, juntamente com ácido teicóico e ácido lipoteicóico (LTA), que é ancorado à membrana celular (MAGRO, 2014; BROWN et al. 2015). As bactérias gram-positivas produzem exotoxinas potentes que são proteínas secretadas, onde a porção A, é responsável por modificar a célula alvo levando à morte celular ou a outros efeitos patológicos, enquanto que a porção B se liga aos receptores de superfície celular e transloca a porção A para o citosol. Normalmente a toxina AB é sintetizada e segregada a partir do agente como uma forma inativa, sendo ativada através de uma clivagem proteolítica (SUN, 2012).

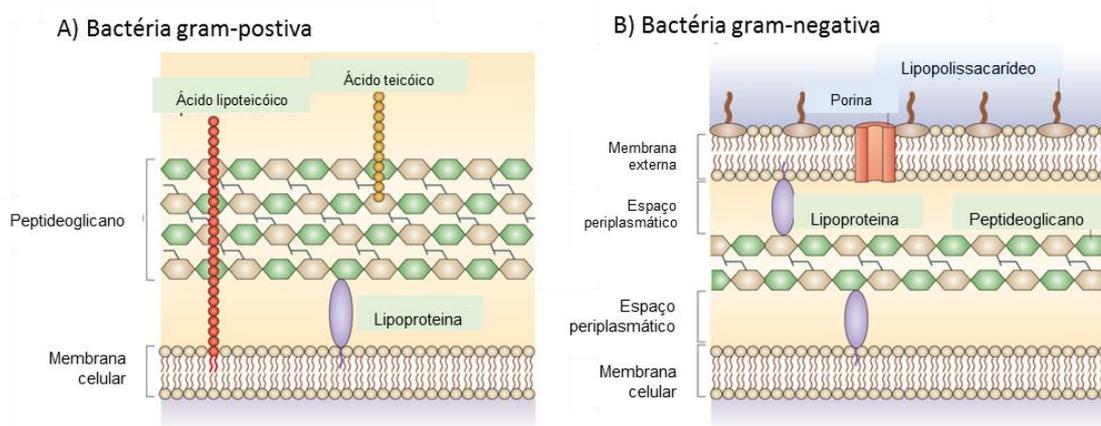


Figura 01: Estrutura da parede celular de bactérias gram-negativa e gram-positiva. A) Bactérias gram-positivas têm uma única membrana lipídica rodeado por uma parede celular constituída por uma camada espessa de peptidoglicano e ácido lipoteicóico, que é ancorado à membrana celular. B) A parede celular de bactérias gram-negativas, consiste de uma fina camada de peptidoglicano no espaço periplasmático entre as membranas lipídicas, interior e exterior. Fonte: adaptado de Brown, et al. (2015).

As bactérias gram-negativas, por sua vez possuem uma fina camada de peptidoglicano no espaço periplasmático entre as membranas lipídicas, interior e exterior, em que fica incorporada a molécula de lipopolissacarídeo (LPS) (COHEN, 2002; BROWN et al. 2015), composta por polissacarídeo ligado covalentemente ao lípidio A e cadeia O, que é única para cada sorotipo bacteriano, e importante fator de virulência (KABANOV et al. 2010) (Figura 02). O LPS é liberado na corrente circulatória após a morte ou a lise destas, ativando monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (PMNs) além de estimular as células hospedeiras a produzir diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6.

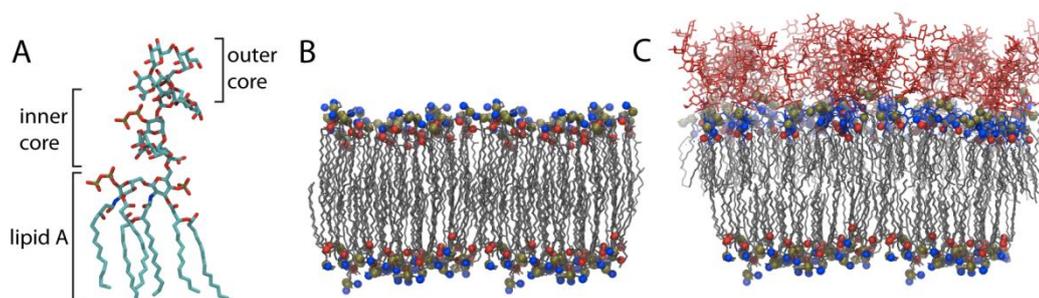


Figura 02: (A) modelo de LPS; (B) bicamada fosfolipídica normal (C) membrana externa com LPS de gram-negativas. Fonte: <http://simbac.gatech.edu/outer-membrane-proteins/>

2.2.1 A SEPSE E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA

O organismo possui duas linhas de defesa: a imunidade celular e a humoral. A defesa celular compreende no reconhecimento de constituintes da parede celular da bactéria após a ligação do complemento e anticorpo, ou após serem apresentadas por células fagocitárias (monócitos, macrófagos e neutrófilos). A defesa humoral compreende no sistema complemento, anticorpos e proteínas de fase aguda (AMERSFOORT, 2003).

2.2.1.1 Imunidade Celular

Células do sistema imunológico expressam um conjunto de receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão os que iniciam rapidamente a resposta após a detecção do dano tecidual ou infecção microbiana. A infecção microbiana é detectada através do PAMP (BIANCHI, 2007). Esses PAMP irão ativar células do sistema imune inato, tais como os monócitos, macrófagos, PMN e células endoteliais (OPAL, 2007; NIJLAND, 2014).

Os receptores Toll-Like (TLR) funcionam como receptores de reconhecimento padrão presentes nos macrófagos, nas células dendríticas e nos PMN. Os TLR-4 irão reconhecer o LPS

enquanto que, o TLR-2 irão reconhecer os PAMP de bactérias gram-positivas, incluindo lipoproteínas, lipopeptídeos, peptidoglicanos e LTA. Quando algum PAMP é reconhecido por algum receptor TLR, a proteína MyD88 recruta cinases associadas ao receptor da IL-1 para ativar o fator β associado ao receptor do fator de necrose tumoral. Esse ativa o fator de crescimento beta associado a cinase 1, que por sua vez, promove ativação do complexo IKK. O complexo promove a fosforilação do I κ B e a sua degradação resulta no NF- κ B, que será translocado para ao núcleo para induzir a expressão das citocinas inflamatórias tais como TNF- α e IL-1, e das moléculas de adesão (AMERSFOORT, 2003; PARK et al. 2009; FERRAZ et al. 2011; NIJLAND, 2014).

O TNF- α e IL-1 são as primeiras citocinas a serem liberadas pelos macrófagos ativados, e podem atuar em diferentes células, tais como os macrófagos, células endoteliais e neutrófilos (SCHULTE, 2013). O TNF- α , atua em macrófagos promovendo a ativação e diferenciação além de aumentar a sobrevivência destas células e assim como a IL-1, induz a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias [(IL-6, IL-8 e fator de inibição da migração (MIF)], mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN). Nas células endoteliais, o TNF- α aumenta a expressão das moléculas de adesão, tais como a molécula de adesão intracelular (ICAM)-1 e a molécula de adesão vascular (VCAM)-1 além de quimiocinas (NAKAE et al. 1996; SHIMAOKA e PARK, 2008). Nos neutrófilos, o TNF- α promove o recrutamento para o sítio de inflamação (LOKUTA e HUTTENLOCHER, 2005; SCHULTE, 2011).

As citocinas IL-1 e IL-6 também são importantes na indução dos efeitos pró-coagulantes na sepse, onde o LPS e/ou outros componentes microbianos, induzem a expressão do TF e aumento da síntese do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) em células endoteliais (COHEN, 2002; AIRD, 2003; RUSSEL, 2006).

Além dessas citocinas, a proteína de alta mobilidade Box-1 (HMGB1), uma proteína cromossômica não histona abundantemente distribuída e existente na forma nuclear, citoplasmática e ligada à membrana. Esta proteína medeia respostas inflamatórias na endotoxemia, artrite e sepse (MENDES, 2014).

2.2.1.2 Imunidade Humoral

O sistema complemento (SC) é um dos principais mecanismos efetores da imunidade humoral. Existem três vias de ativação do complemento: a via clássica, que é ativada por certos

isotipos de anticorpos ligados aos antígenos; a via alternativa, que é ativada sobre as superfícies das células microbianas, na ausência de anticorpos; e a via das lectinas, que é ativada por uma lectina plasmática. Todas as vias de ativação do complemento irão resultar na proteólise da proteína do complemento C3 para gerar produtos biologicamente ativos e a subsequente ligação covalente do produto de C3 (JANEWAY et al. 2001; ABBAS, 2012).

A ativação da via clássica do SC é iniciada pela ligação C1q de uma imunoglobulina. A via alternativa é ativada continuamente na fase fluida em pouca intensidade, na presença de um ativador exógeno. Isso inicia uma cascata de eventos proteolíticos resultando na formação de C5 convertase da via clássica e alternativa que cliva a molécula de C5 em C5b e C5a. As duas anafilotoxinas geradas, C3a e C5a, induzem mudanças que são características da resposta inflamatória aguda. A C5a é um potente agonista para células mielóides e não-mielóides, enquanto que C3a tem habilidade de causar a desgranulação de basófilos e mastócitos, resultando na liberação de aminas vasoativas (histamina) (WARD, 2004).

Na sepse, estudos demonstram que a molécula de complemento C5a aparece no plasma de roedores após o modelo de perfuração-ligação do ceco (PETER e WARD, 2010). Tal molécula interage com os receptores C5aR, C5L2 em fagócitos como neutrófilos e macrófagos, resultando na paralisia da via de sinalização quinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2) e MAPK. A interação de C5 com receptores em polimorfonucleares resultam no comprometimento da resposta imune inata com intensa supressão de fagocitose, quimiotaxia e explosão respiratória (MENDES, 2014).

O fragmento C5b liga-se por sua vez, a C6, C7 e C8 para formar o complexo C5b-8. A ligação de C9 forma o C5b-9 ou o complexo lítico de membrana (CLM) este complexo, também conhecido como complexo de ataque à membrana (MAC) ou complexo terminal do complemento (TCC), quando formado na superfície de bactérias, leva a formação de “poros”, que permitem um influxo descontrolado de água e íons, com turgência e lise celular subsequentes (VOGOT et al. 1992). Este complexo também ativa as células endoteliais, resultando no aumento da produção de IL-8 e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1) (KILGORE et al. 1996).

A sepse reflete uma complexa interação entre mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, resumidas na figura 03, que em conjunto, contribuem para a disfunção orgânica e morte.

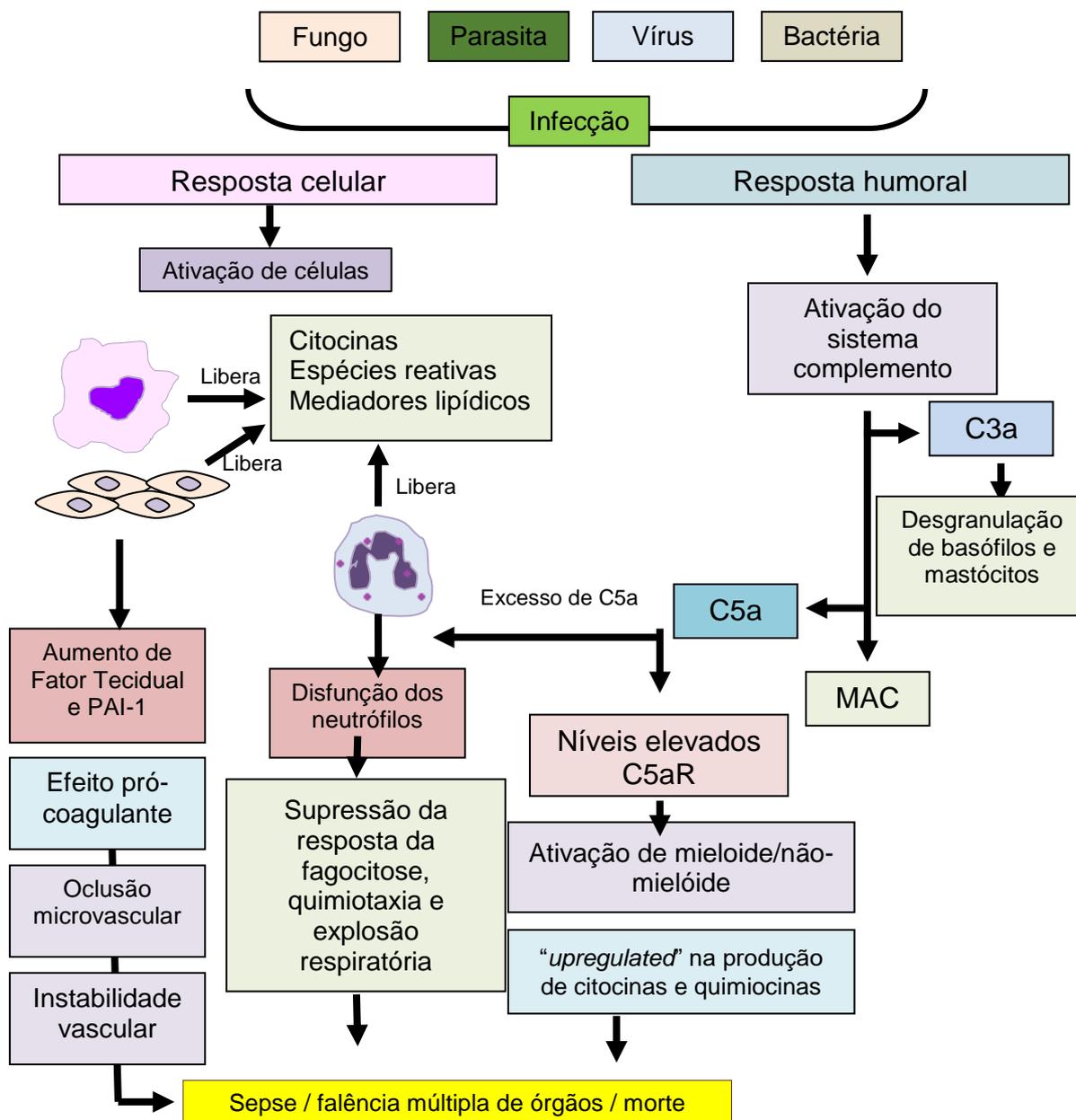


Figura 03: Diagrama esquemático da seps e o sistema imunológico. Após a infecção por micro-organismos, ocorre a resposta celular por macrófagos/monócitos, células endoteliais e neutrófilos, com a produção de citocinas (ex. TNF- α e IL-1), espécies reativas e mediadores lipídicos, com a ativação das células endoteliais há aumento de fator tecidual e da síntese do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), resultando na oclusão microvascular e instabilidade vascular. Além disso, na resposta humoral, ocorre a ativação do sistema complemento com objetivo de formar o complexo de ataque à membrana (MAC), e há a geração de C3a que tem como função a desgranulação de basófilos e mastócitos, e a geração de C5a, que leva a ativação de células mielóides e não-mielóides, com conseqüente aumento da produção de citocinas e quimiocinas. O excesso de C5a leva à disfunção dos neutrófilos, com a supressão da fagocitose, quimiotaxia e queima respiratória, resultando na falência de múltiplos órgãos e conseqüentemente a morte do indivíduo. Fonte: Autor e adaptado de Albrecht et al. (2005).

2.2.2 A SEPSE E O ESTRESSE OXIDATIVO

Durante um processo infeccioso, os neutrófilos e monócitos/macrófagos, liberam mediadores inflamatórios, incluindo IL-1, IL-6 e TNF (WANG et al. 2014), assim como produzem espécies reativas de oxigênio (ERO), por meio da explosão oxidativa. Tais células consomem a molécula de oxigênio (O_2) durante seu metabolismo, com transferência de elétron, mediado pelo NADPH oxidase (NOX), levando a produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e, em seguida dismutação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (YESILKAYA et al. 2013). Durante a reação de Fenton o H_2O_2 produzido, sofre redução para formar radicais hidroxil (OH^{\cdot}) altamente reativo, ou será metabolizado pela enzima mieloperoxidase (MPO) resultando na formação de ácidos (REPETTO et al. 2012; KEHRER e KLOTZ, 2015) (Figura 04).

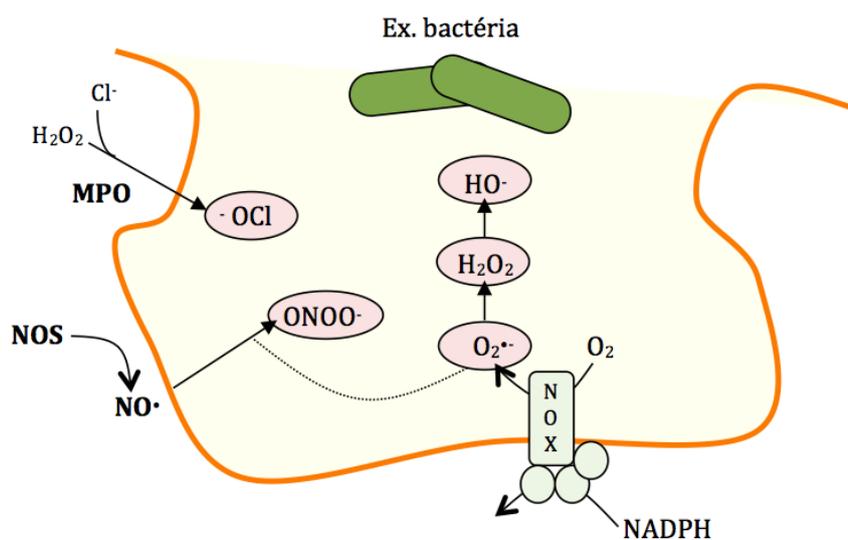


Figura 04: A produção de espécies reativas por fagócitos. Os fagócitos são capazes de gerar espécies reativas por meio do “oxidative burst”, mediado por NADPH oxidase (NOX). Peróxido de hidrogênio produzido durante a reação, pode sofrer redução para a forma do radical hidroxil, ou ser metabolizado pelo mieloperoxidase (MPO) com formação de ácidos. A óxido nítrico sintase (NOS) irá produzir óxido nítrico, outro radical que pode originar outras espécies reativas, como o peroxinitrito. Fonte: Adaptado de Kehrer e Klotz (2015).

Além das ERO, durante a fagocitose ocorre a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (SIKORA, 2002; FIALKOW et al. 2007; GALLEY et al. 2001; KAYMAK et al. 2011), tais como, o óxido nítrico (NO), e peróxido nitrito (ONOO) (KAYMAK et al. 2011). O NO é um dos principais mediadores inflamatórios na sepse, desempenhando papel de vasodilatador. Existem três isoformas de NO sintase (NOS): NOS neuronal (nNOS), NOS

endotelial (eNOS) e NOS induzida (McKINNON et al. 2006; SINGER et al. 2013). O NO mantém a homeostase vascular, incluindo a modulação do tônus vascular, a regulação local de crescimento celular, entre outras (TOUSOULIS, 2012).

Nos pacientes com sepse, os níveis de espécies reativas estão elevados e os sistemas antioxidantes apresentam-se reduzidos, com a diminuição da superóxido dismutase, glutathione peroxidase e depleção da glutathione (SULIMAN et al. 2004; ZANG et al. 2007; MUHL et al. 2011). Como consequência desse desequilíbrio, as espécies reativas causam uma série de modificações reversíveis e irreversíveis tóxicas nas biomoléculas, tais como carbonilação de proteínas e peroxidação lipídica levando à danos em células próprias, inclusive no endotélio (CIMOLAI et al. 2015; YU et al. 2015).

2.2.3 ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS NA SEPSE

Durante a sepse, diversos componentes da microcirculação são afetados causando uma disfunção na sua função reguladora (EDUL et al. 2010). Primeiramente, as células endoteliais, se tornam menos sensíveis aos agentes vasoativos. Após a deformabilidade das hemácias torna-se reduzida, o que pode causar a obstrução vascular. Na Terceira etapa, a ativação sistêmica da resposta inflamatória leva à um estado pró-coagulante, com formação de microtrombos e diminuição do fluxo tissular. Finalmente, a ativação leucocitária leva ao extravasamento do conteúdo nuclear, com formação de “*neutrophil extracellular traps*”, também relacionada à redução do fluxo sanguíneo e disfunção orgânica (MENDES, 2014).

A extensão da ativação da cascata de coagulação durante a sepse pode variar de proporções insignificantes para a ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CIVD) (RITTIRSCH, FLIERL e WARD, 2008). A desregulação do sistema hemostático resulta em maiores complicações como trombose microvascular, hipoperfusão, e por fim em síndrome de disfunção orgânica múltipla e morte (HARDAWAY; WILLIAMS; VASQUEZ, 2001).

Na sepse a cascata de coagulação, tem lugar quando o fator tecidual (FT) é exposto, após indução, por LPS, citocinas inflamatórias ou endotoxinas (BURDON et al. 2000; RIEWALD e RUF, 2003). O FT se liga ao fator VIIa, ativando-o e o complexo fator VIIa/tromboplastina ativa o Fator X em Xa. O fator Xa converte a protrombina em trombina, o que por sua vez resulta na clivagem do fibrinogênio em fibrina (HENKIN, 2009) como mostrado na figura 05.

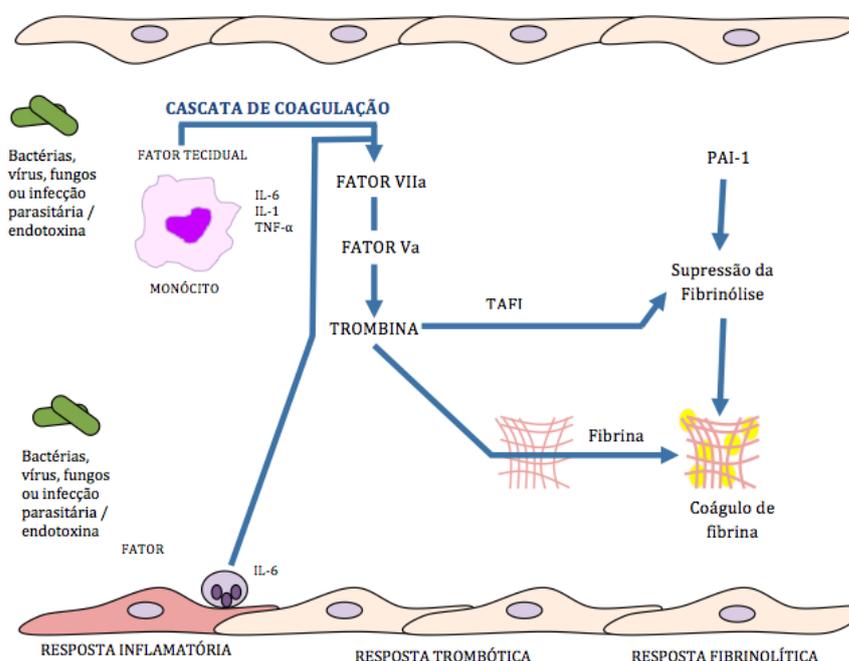


Figura 05: Cascata de coagulação na sepse. O fator tecidual é exposto, após indução, por padrões moleculares associados a agentes patogênicos, tais como lipopolissacarídeo (LPS), citocinas inflamatórias ou endotoxinas. O FT se liga ao fator VIIa, ativando-o e o complexo fator VIIa/tromboplastina ativa o Fator X em Xa. O fator Xa converte a protrombina em trombina, o que por sua vez resulta na clivagem do fibrinogênio em fibrina. Apesar da ação do inibidor da fibrinólise trombina-ativável (TAF-1), durante a sepse há aumento da síntese do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), com supressão da fibrinólise resultando no aumento de coágulo de fibrina. Fonte: Adaptado de Bernad et al. (2001)

Na sepse o LPS e o $\text{TNF-}\alpha$ diminuem a síntese de trombosmodulina e o receptor endotelial da proteína C, impedindo a ativação da proteína C e aumentando a síntese do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), interrompendo a fibrinólise (RUSSEL, 2006).

2.3 Terapia

Em pacientes com sepse, as primeiras horas são de valiosa importância para a evolução da sepse. Terapias de suporte como corticosteroides, terapia nutricional, imunomoduladores e antioxidantes na UTI são essenciais para trazer benefícios necessários na mudança do desfecho da sepse (PEREIRA JUNIOR et al. 1998; MENDES, 2014).

A abordagem inicial é a terapia com antimicrobianos empírica, após a realização de uma hemocultura, independente do agente agressor. Os mais indicados são os antimicrobianos de amplo espectro, como os desenvolvidos nas últimas décadas: carbapenem, cefalosporinas de 3º

e 4º geração, substituindo associações utilizadas de aminoglicosídeo com β -lactâmico. Apesar de ser o tratamento inicial, a literatura mostra que os antimicrobianos podem aumentar a resposta inflamatória devido à lise dos microrganismos, com liberação de endotoxinas e consequentemente produção de mediadores endógenos, por isso há necessidade de verificar o risco e benefício do uso de antimicrobianos (PEREIRA JUNIOR et al. 1998; CARVALHO et al. 2003).

Como medida de suporte na sepse é utilizado a reposição volêmica, pois ocorre uma grande perda de fluidos que gera hipovolemia na sepse (BONE, 1991; HANNA, 2003; CORRÊA et al. 2007). Além deste, o uso de drogas vasoativas é indicado caso a reposição volêmica seja insuficiente. Deve ser observada, durante 30 minutos, a reposição volêmica. Após esse prazo, se a pressão arterial sistólica não atingir 90 mmHg, devem ser administradas catecolaminas. A droga de escolha nesses casos tem sido a dopamina em altas doses (maiores que 20mg/kg/min), a fim de atingir os objetivos terapêuticos. Caso não haja resposta, descontinua-se a dopamina e administra-se noradrenalina (HANNA, 2003).

Atualmente, existem alguns fármacos em pesquisa com base na fisiopatologia molecular da sepse como mostrados no quadro 02.

AGENTE	MECANISMO DE AÇÃO
Sequestrante de LPS	Neutraliza a atividade do LPS
Inibidores do HMGB-1	Bloqueia a atividade do HMGB-1
Inibidores do MIF	Atua frente ao MIF
Peptídeos antimicrobianos	Antibacteriano e neutraliza a atividade do LPS
Curcumina	Inibe a atividade transcriptora de NF- κ B
Diacereína	Reduz a síntese e a atividade das citocinas pró-inflamatórias
Proteína C recombinante ativada	Bloqueia os fatores Va e VIIIa, inibe a produção de citocinas
Antagonista dos TLR4	Bloqueia o TLR 4
Antagonista do receptor C5a e inibidor do C1	Previne a ativação do sistema complemento
Dispositivos removedores de endotoxinas	Se liga e neutraliza a atividade do LPS
Inibidores de caspases	Atividade anti-apoptótica
Agonistas dos receptores beta do estrogênio	Suprime a transcrição de genes pró-inflamatórios
Estatinas	Inibem a ativação induzida por LPS de NF- κ B e tem ação antioxidante

Quadro 02. Abordagens de intervenções terapêuticas na sepse. Fonte: Adaptado de Shukla et al. (2014)

2.3.1 PRODUTOS NATURAIS COMO TERAPIA DA SEPSE

No Brasil, o uso de plantas medicinais e a automedicação são práticas comuns, devido a fatores como crenças, carências econômicas, dificuldade de acesso à assistência médica ou ainda por influência da mídia que promove os produtos naturais (ARRAIS et al. 1997; LOYOLA-FILHO et al. 2002).

Poucos estudos são voltados para o uso de plantas medicinais como adjuvante no tratamento da sepse. Um estudo realizado por Yang et al. (2009), administrou por via oral *Alpini katsumadai* Hayata em diferentes concentrações, uma hora antes e duas horas após a indução da sepse por CLP e observou que elevou significativamente a taxa de sobrevivência e a pressão arterial média dos animais. Além disso, no mesmo estudo, os animais tratados foram protegidos de lesões e disfunções nos tecidos do pulmão e fígado.

Maria-Ferreira et al. (2013), mostraram que a fração solúvel com polissacarídeo de *Ilex paraguariensis* impediu a letalidade causada por sepse polimicrobiana em ratos, significativamente comparado a dexametasona, um anti-inflamatório esteroidal. Estes autores observaram a redução na migração de neutrófilos, e a inibição também das enzimas pró-inflamatórias, tais como a iNOS e Ciclo-oxigenase -2 (COX-2). Estudos anteriores de Popov et al. (2011), mostraram que a ação de *Capsicum spp* no modelo de sepse inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a sobrevivência dos animais.

Assim como nas plantas medicinais, o estudo acerca de cogumelos medicinais como uma possível terapia adjuvante é reduzida. Bernardshaw e colaboradores (2006), através do modelo de peritonite experimental (indução por meio da administração oral de fezes de ratos), mostraram que o extrato de *Agaricus blazei* Murril, foi capaz de reduzir a septicemia nos camundongos que consumiram o cogumelo por via oral antes da indução da peritonite experimental além do aumento da sobrevivência destes animais.

2.4 *Ilex paraguariensis* – ERVA-MATE

2.4.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE

A origem da planta *Ilex paraguariensis* St. Hil. está localizada em uma região que se estende do leste do Paraguai, através de Missões do Norte da Argentina para os estados do Paraná e Santa Catarina no Brasil. Antes da chegada dos europeus na América, a erva era consumida pelos nativos como uma infusão de folhas secas e esmagadas. A secagem era feita usando uma lâmpada rudimentar feita a partir de uma vara de bambu e fibras vegetais. Existem indicações do comércio entre os Guaranis e os habitantes do Império Inca, porém não se sabe a magnitude (BURTNIK, 2006).

A árvore de erva-mate é uma espécie da América do Sul, nativa das florestas paranaenses, 80% de sua ocorrência é no Brasil, mas também existe naturalmente na Argentina e no Paraguai (Figura 06). De acordo com a classificação botânica oficial seu nome científico é *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (SAINT-HILAIRE, 1995). Sua classificação científica é descrita de acordo com o Sistema de Classificação de Cronquist (BURTNIK, 2006) (Quadro 03).

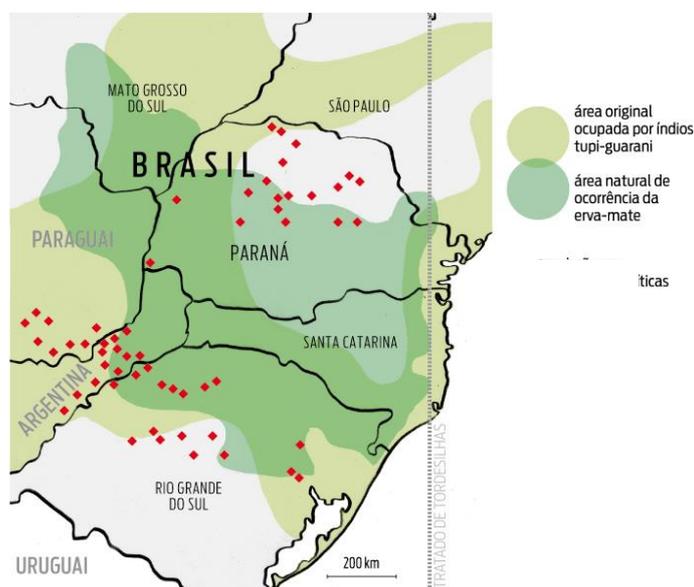


Figura 06: Áreas de ocorrência de erva-mate. Fonte: http://www.ufrgs.br/alimentus1/objetos/erva-mate/agri_regioes.html

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	
Divisão	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe:	Dicotyledonae
Ordem:	Celastrales
Família:	Aquifoliaceae
Espécie	<i>Ilex paraguariensis</i> Saint-Hilaire; Mém. Must.d' Hist. Nat. Paris 9: 351, 1822
Sinonímia botânica:	<i>Ilex domestica</i> Reissek; <i>ilex mate</i> Sainte- Hilaire
Nomes populares:	Erva-mate, carrasqueira-mansa, erva-do-paraguai

Quadro 03- Classificação taxonômica de *Ilex paraguariensis*. Fonte: autor

2.4.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

Ilex paraguariensis é uma árvore perene, que pode crescer a uma elevação de até 8-15 metros, as folhas possuem de 5- 8 cm de comprimento, são verdes, duradouras e com bordas serrilhadas. O florescimento ocorre durante a primavera, predominantemente no mês de outubro produzindo flores pequenas, unissexuais, que têm em torno de quatro ou cinco pétalas brancas, agrupadas em cimeiras fasciculadas nas axilas das folhas (Figura 07). As bagas são de cor vermelha contendo 4-5 sementes que são dispersas por aves. Há certa dificuldade na polimerização natural, pois muitas sementes que parecem ser maduras não têm mais do que uma fração de um embrião, o que ocorre por que embora em todas elas se encontrem estames e pistilos, nas femininas, os estames não funcionam e, nas masculinas, o pistilo aborta (ZANON, 1988; HECK e MEJIA, 2007; BRACESCO et al. 2011).

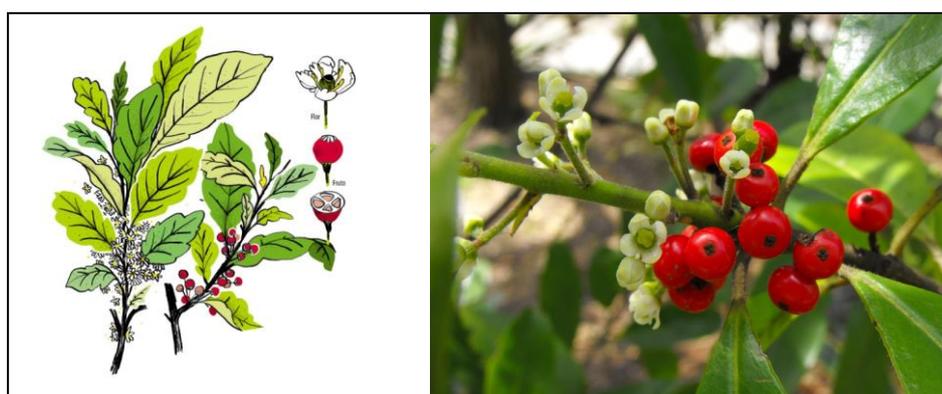


Figura 07: *Ilex paraguariensis*. Fonte: <http://www.gazetadopovo.com.br/vidacidadania/especiais/erva-mate/origens.jpg>

De acordo com Bittencourt Filho (1983), a erva-mate diferencia-se em quatro tipos:

- Erva-mate com folhas pequenas, coriáceas e talo branco;

- Erva-mate com folhas pequenas, coriáceas e talo roxo;
- Erva-mate com folhas grandes, membranáceas e talo branco;
- Erva-mate com folhas grandes, membranáceas e talo roxo.

2.4.3 COMPOSTOS QUÍMICOS DE *Ilex paraguariensis* E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.

2.4.3.1 Compostos químicos.

Fatores como o uso de folhas secas ou frescas (BASTOS et al. 2006), intensidade de luz, idade, componentes do solo, condições agrônômicas e fatores genéticos (JACQUES et al. 2007) podem influenciar na composição e na concentração de polifenóis, xantinas, derivados de cafeoil, saponinas minerais no produto final (BASTOS et al. 2006; ISOLABELLA et al. 2010).

A composição de *Ilex paraguariensis* inclui polifenóis, que são a classe de compostos que possuem anel benzeno com um ou mais grupos hidroxil. A concentração de polifenol no chá de erva-mate está associado à capacidade antioxidante (CHANDRA e De MEJIA, 2004; HECK e De MEJIA, 2007). Outra classe presente são as xantinas entre elas estão a teofilina, teobromina e a cafeína (ATHAYDE et al. 2000). No mate também foram encontrados os derivados do cafeoil, que incluem ácido cafeico, ácido clorogênico, 4-dicaffeoilquinico, taninos (HEINRICHS e MALAVOLTA, 2001; BIXBY et al. 2005; BASTOS et al. 2007; HECK e MEJIA, 2007; MENINI et al. 2007; de MORAIS et al. 2009; SUGIMOTO, 2009; BRACESCO et al. 2010; BURRIS et al. 2012; BOJIC et al. 2013), além das vitaminas (A, B1, B2, C e E) (BORILLE et al. 2005; BORTOLUZZI et al. 2006; KASPARY e VALDUGA, 2008).

2.4.3.2 Atividades biológicas

Nos últimos anos, tem aumentado o número de pesquisas com *Ilex paraguariensis* devido às suas propriedades farmacológicas onde tais compostos seriam responsáveis por sua atividade antioxidante, antimicrobiana, antidiabética e analgésica (FILIP et al. 2001; HECK e DE MEJIA, 2007; FILIP et al. 2010), inibidor da lipo-oxigenase, anticancerígeno, anti-ulcera (ARBISER et al. 2005; HECK e DE MEJIA, 2007); atividade anti-inflamatória (RAUHA et al., 2000; PUANGPRAPHANT e DEMEJIA, 2009); antiobesidade, diurética, vasodilatadora (ITO et al. 1997; HECK e DE MEJIA, 2007) (Tabela 02).

Tabela 02: Atividade biológica dos compostos encontrados em *Ilex paraguariensis*. Fonte: BURRIS, et al. (2012).

COMPOSTO	ATIVIDADE BIOLÓGICA
Cafeína	Anticarcinogênico, antiobesidade, antioxidante, antitumoral, diurético, estimulante.
Ácido Clorogênico	Antioxidante, analgésico, antiarterioesclerótico, antimicrobiano, antidiabético, antitumor, clorético.
Clorofila	Antibacteriano, anticancer.
Colina	Antidiabético, colinérgico e lipotrópico.
Ácido Nicotínico	Clorético, hipocolesterômico.
Ácido Pantotênico	Antialérgico, antiarrítmico.
Rutina	Antioxidante, antitumoral, antiulcera, inibidor AMPc-fosfodiesterase, inibidor da topoisomerase-II e vasodilatador.
Taninos	Antioxidante, antitumoral, inibidor da lipoxigenase e inibidor da MAO.
Theobromina	Inibidor da AMPc, AMPc-fosfodiesterase, diurético, estimulante e miorelaxante.
Teofilina	Inibidor da AMPc, AMPc-fosfodiesterase, diurético, clorético, estimulante, vasodilatador, miorelaxante.
Ácido ursólico	Analgésico, antioxidante, inibidor protease, inibidor da topoisomerase-II, antiarrítmico, anticancer, antialzheimer.

AMPc: adenosina monofosfato cíclico, MAO: monoamina oxidase.

Apesar de inúmeras atividades descritas pela literatura, três são consideradas principais: a antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória. A atividade bacteriostática ou bactericida de extratos de erva-mate frente à cepas padrões ATCC de bactérias gram-positivas e negativas e de fungos (De BIASI et al. 2009) assim como de isolados de focos infecciosos (GONÇALVES et al. 2005; GIROLOMETTO, et al. 2009; BONA et al. 2010), foram relatadas diversas vezes na literatura como mostrado no quadro 04

	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
Bactérias	<i>Escherichia coli</i>	SCHENKEL et al. 1996 BURRIS et al. 2012
	<i>Helicobacter pylori</i>	BONIFÁCIO et al. 2014
	<i>Staphylococcus aureus</i>	De BIASI et al. 2007; CARELLI et al. 2011; MARTIN et al. 2013
	<i>Listeria monocytogenes</i>	MARTIN et al. 2013
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	De BIASI et al. 2007; CARELLI et al. 2011
	<i>Salmonella enteritidis</i>	MARTIN et al. 2013
	<i>Streptococcus mutans</i>	KUBO et al. 1993
	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
Fungos	<i>Candida utilis</i>	KUBO et al. 1993
	<i>Malassezia furfur</i>	FILIP et al. 2010
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	KUBO et al. 1993
	<i>Pityrosporum ovale</i>	KUBO et al. 1993
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KUBO et al. 1993
	Trichophyton metagrophytes	KUBO et al. 1993

Quadro 04 – Estudos que mostram a atividade antimicrobiana de *Ilex paraguariensis*.

Devido aos seus compostos, como os fenólicos, a ingestão dos extratos de *Ilex paraguariensis*, pode contribuir para aumento das defesas antioxidantes no organismo (SCHINELLA et al. 2000; DE MEJIA, 2010). Schinella, Fantinelli e Mosca (2005), demonstraram que o extrato de *Ilex paraguariensis* (30µg /ml) administrado nos ratos 10 minutos antes da isquemia foi capaz de atenuar as disfunções miocárdicas provocadas por isquemia, além da diminuição do dano oxidativo através do mecanismo dependente de NO.

Os efeitos anti-inflamatórios, de *Ilex paraguariensis* vem sendo demonstrado por ser capaz de inibir a COX-2, prostaglandina, e iNOS/NO (PUANGPRANPHANT E MEJIA, 2009; BRACESCO et al. 2010). Em um estudo realizado por Arçari (2011), o extrato de erva-mate, foi capaz de reduzir ao nível basal o TNF- α , IL-6 e o iNOS, após os animais serem submetidos a dietas ricas em gordura, atuando como um potencial anti-inflamatório.

2.5 *Agaricus brasiliensis* – Cogumelo do Sol

2.5.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE

Em 1960, em Piedade interior do Estado de São Paulo (Brasil), foi encontrado um cogumelo diferente. Amostras do fungo foram enviadas ao Japão, em 1965 para estudo no Institute Iwaide. Em 1967, Dr. Heinemann, cientista belga, identificou o fungo e o denominou de *Agaricus blazei Murill*, espécie natural na América do Norte, mas já descrita por W.A. Murill, em 1945. Wasser et al. (2002) propuseram para esta espécie nativa do Brasil uma nova denominação, *Agaricus brasiliensis* (WASSER et al. 2002; COLAUTO et al. 2012).

O nome *A. blazei* cogumelo brasileiro é atribuída por Heinemann. Porém, estudos realizados por Kerrigan (2005) indicaram que esta espécie, descrito em 1893, é biológica e geneticamente identificada como *Agaricus subrufescens* Peck 25 (KERRIGAN, 2005; LAVITSCHKA, 2007). Este cogumelo é referido (incorretamente) como *A. blazei* Murill', *A. blazei* sensu Heinemann (Quadro 05).

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA			
	HEINEMANN (1967)	WASSER (2002)	KERRIGAN (2005)
Reino:	<i>Fungi</i>	<i>Fungi</i>	<i>Fungi</i>
Divisão:	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>
Subdivisão:	<i>Homobasidiomycetidade</i>	<i>Homobasidiomycetidae</i>	-
Ordem:	<i>Agaricales</i>	<i>Agaricales</i>	<i>Agaricales</i>
Família:	<i>Agaricaceae</i>	<i>Agaricaceae</i>	<i>Agaricaceae</i>
Gênero	<i>Agaricus</i>	<i>Agaricus</i>	<i>Agaricus</i>
Espécie:	<i>Agaricus blazei</i> Murill	<i>Agaricus brasiliensis</i>	<i>Agaricus subrufescens</i>
Nomes populares:	Cogumelo do sol, Cogumelo da vida, Agaricus jun17, <i>Agaricus sylvaticus</i>		

Quadro 05: Classificação Taxonômica de *Agaricus brasiliensis*.

No Japão este cogumelo é conhecido como cogumelo Himematsutake e nos Estados Unidos, como cogumelo Royal Agaricus, Royal Sun Agaricus ou Almond Portobello. Nos dias de hoje na Inglaterra, Flórida, Bélgica, é identificado como cogumelo Himematsutake. No Brasil como cogumelo Piedade, cogumelo do Sol, cogumelo de Deus, cogumelo princesa, *Agaricus brasiliensis*, (Figura 08) *Agaricus blazei* Murill (sensu Heinemann) e, mais recentemente, Champignon do Brasil (AMAZONAS, 2005).



Figura 08- *Agaricus brasiliensis* Fonte: www.medicalmushrooms.net

2.5.2 COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Agaricus brasiliensis* E SUAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS.

2.5.2.1 Compostos bioativos.

O cogumelo do sol tem em sua composição proteínas, carboidratos e minerais (LARGETEAU et al. 2011). O corpo de frutificação contém 38-45% de proteína, 38-45% de carboidratos, 3-4% de gordura e 5-7% minerais (MIZUNO, 1995; AMAZONAS, 2005). Mas os (1→6)-(1→3)-β-D-glucano e (1→4)-α-glucano, encontrados nos corpos de frutificação do cogumelo do sol que é responsável pela sua atividade biológica, são responsáveis pela sua capacidade antitumoral e imunomoduladora (MOURÃO et al. 2011) (Figura 09).

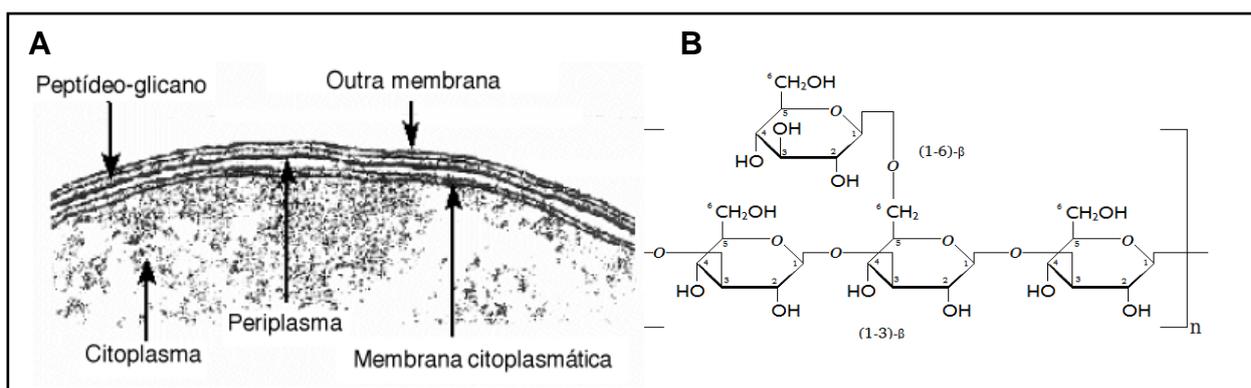


Figura 09: Localização da β-D-glucana na parede celular. A) Estrutura da parede celular; B) β-D-glucana (1→3) com ramificação β-(1→6). Fonte: Adaptado de Mantovani (2008) e Park et al. (2003).

2.5.2.2 Propriedades farmacológicas

Nossos estudos anteriores mostraram que *A. brasiliensis* tem propriedade imunomoduladora onde o micélio de *A. brasiliensis* (LPB), foi capaz de inibir a proliferação de esplenócitos e reduzir os níveis de NO por macrófagos peritoneais de camundongos swiss, enquanto que o seu exopolissacarídeo teve o efeito oposto, aumentou a proliferação assim como a produção de NO (NAVEGANTES et al. 2013). Dalla-Santa et al. 2013, também demonstrou o aumento de células TCD4⁺ e subconjuntos CD25⁺CD4⁺ em órgãos periféricos de camundongos após a administração de *A. brasiliensis*.

Estudos *in vitro* mostram que o *A. brasiliensis* em monócitos e células endoteliais é capaz de aumentar os níveis de citocinas como IL-1 β e IL-6 (BERNARDSHAW et al. 2005a). Além dessas citocinas também aumenta os níveis de TNF- α , IL-8 e IL-12 (SORIMACHI et al. 2001; KASAI et al. 2004). *In vivo*, também foi capaz de aumentar os níveis de IL-8 e TNF- α (BERNARDSHAW et al. 2005b). Outra atividade no sistema imune foi demonstrada por Nakajima et al. (2002), em que o *A. brasiliensis* aumentou a produção de anticorpos em esplenócitos, os níveis de IgG e o número de linfócitos T, além da capacidade fagocíticas dos polimorfonucleares.

A atividade antitumoral, também foi demonstrada por nosso grupo, em os camundongos swiss que foram inoculados com o sarcoma 180 e receberam uma suplementação dietética com 100 e 50% de micélio de *A. brasiliensis* na ração comum, apresentaram crescimento tumoral inibido, prevenindo também a perda de peso corporal (DALLA-SANTA et al. 2013).

Em relação a atividade anti-inflamatória, foi demonstrada por Padilha e colaboradores (2009), este estudo em que administrou o extrato alcalino do cogumelo por via oral e constataram a inibição do edema induzido por nistatina. Além disso, ainda no mesmo estudo o cogumelo inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após a injeção de carragenina. Song (2012), observou em mastócitos de murinos, houve a inibição da produção de IL-6, a produção de prostanglandina D e de leucotrienos.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e imunomoduladora de *Agaricus brasiliensis* e *Ilex paraguariensis* *in vitro* e em modelo de sepse murino.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 TESTES *IN VITRO*

- Avaliar atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, dos extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* e *Agaricus brasiliensis* por obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Avaliar a citotoxicidade das diferentes concentrações dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* em macrófagos peritoneais de camundongos swiss, pelo método direto MTT;
- Avaliar capacidade fagocítica dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* em macrófagos peritoneais de camundongos swiss;
- Verificar a concentração de nitrito em macrófagos peritoneais de camundongos swiss após os estímulos dos extratos aquosos *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*;
- Avaliar a proliferação celular de esplenócitos provenientes de camundongos swiss após a incubação com diferentes concentrações dos extratos aquosos *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* na presença ou não do mitogeno Concavalina A (ConA);
- Avaliar a capacidade antioxidante total pelo método do TEAC e DPPH dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*;
- Avaliar a liberação de ERO por leucócitos proveniente do sangue periférico humano na presença de diferentes concentrações dos extratos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* com ou sem o oxidante tBHP.

3.2.2 TESTES *IN VIVO*:

- Avaliar a sobrevivência dos animais pré-tratados ou não com extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* e submetidos CLP;
- Avaliar parâmetros hematológicos dos animais pré-tratados ou não com extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* 12 e 24 horas após CLP;
- Avaliar a migração leucocitária no lavado peritoneal de animais pré-tratados com os extratos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* com 12 e 24 horas após CLP.
- Verificar a carga bacteriana no baço, coração, pulmão, fígado, exsudato peritoneal e sangue nos animais com sepse pré-tratados ou não com extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*;
- Verificar a concentração de nitrito no sangue e no exsudato peritoneal em animais com sepse tratados ou não com o extrato de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*;
- Avaliar a peroxidação lipídica, no baço, coração, pulmão, fígado, exsudato peritoneal e sangue dos animais sépticos pré-tratados ou não com extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*;
- Avaliar a capacidade antioxidante total no baço, coração, pulmão, fígado, exsudato peritoneal e sangue nos animais com sepse pré-tratados ou não com extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*;
- Avaliar a produção de ERO pelos macrófagos peritoneais dos animais com sepse tratados ou não com o extrato de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*.

3.2.3 TESTE *EX VIVO*:

- Avaliar a produção de ERO pelos macrófagos peritoneais dos animais com sepse tratados ou não com o extrato de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* na presença ou não do oxidante tBHP;
- Avaliar a capacidade fagocítica dos leucócitos provenientes dos animais sépticos pré-tratados ou não com extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

O projeto foi previamente submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPA, obedecendo-se aos critérios, de acordo com as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais, sob o parecer de número 02/15. (ANEXO 1)

Para isso, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss machos e fêmeas (n=60), pesando em torno de 20 a 30 gramas, oriundos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA). Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6-18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água. O número de animais que foram utilizados se restringiu ao mínimo necessário para os ensaios pré-clínicos. Para os experimentos *in vivo* foram utilizados no projeto aproximadamente 60 animais distribuídos em 5 grupos. Para os experimentos *in vitro* foram utilizados 2 por experimento, com a utilização de 10 animais durante o projeto.

Todos os animais experimentais foram submetidos a eutanásia pelo método recomendado para a Ordem Rodentia - Roedores e pequenos mamíferos - que é o da exsanguinação por punção cardíaca após anestesia geral de acordo com a Resolução Normativa nº 6, de 10 de julho de 2012 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais 24 horas após a realização do modelo experimental da sepse foram anestesiados para a eutanásia com cetamina (75mg/kg) e xilazina (15mg/kg) intraperitoneal por meio do aprofundamento da anestesia (dobro do valor) seguido de exsanguinação por punção cardíaca. Todos os animais experimentais eutanasiados foram mantidos em freezer até o momento do descarte pela empresa responsável, seguindo normas internacionais.

4.2 Amostras biológicas

Os leucócitos foram obtidos a partir de amostras do sangue venoso de voluntários saudáveis, do sexo masculino e feminino com idade entre 18 e 30 anos e de diferentes tipos sanguíneos, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 2). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor

de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPa), sob parecer número: 1.090.857 e CAAE: 42985315.0.0000.0018 (ANEXO 3).

4.3 Reagentes

Neste estudo foram utilizados Azul de trypan 0,4% (SIGMA), ácido etilenodiaminotetracetato (EDTA) 5% (BIOLAB), Ágar Muller Hinton(X), tamão fosfato salina (PBS) 10x (800 g de NaCl, 20 g de KCl, 144 g de Na₂HPO₄ e 24 g de KH₂PO₄ em 8 L de água destilada), reagente de griess (Sulfanilamida 1% (w/v) em H₃PO₄ 10% e o segundo reagente que é formado por alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% em água), concavalina A (SIGMA), meio RPMI 1640 (10.44 gramas em 900mL de água destilada com agitação suave e constante até o meio ser completamente dissolvido, posteriormente adicionaram-se 2.00 gramas de Bicarbonato de Sódio em pó ou 26.67mL de solução Bicarbonato de Sódio 7,5%).

4.4. Inóculo de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

4.4.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas cepas de *S. aureus* (ATCC 6538) e *E. coli* ATCC (8739). A obtenção dos inóculos seguiu a norma M7-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico”.

Após o período de incubação, 3 a 4 colônias dessas bactérias foram selecionadas e transferidas para tubo estéril contendo 1 ml de meio caldo Mueller-Hinton. Quando necessário, realizou-se ajustes para o alcance da concentração desejada de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml, sendo compatível com a escala 0,5 de Mc Farland (CLSI, 2009). Em seguida, realizou-se a incubação dos tubos, cada um contendo a concentração do inóculo 1×10^8 UFC/ml por 1 hora para alcançar o crescimento exponencial das bactérias. Após esse tempo, diluições seriadas foram realizadas até a obtenção do inóculo 1×10^3 UFC/ml.

4.5. Fornecimento e preparo do extrato aquoso de *Agaricus brasiliensis*

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* seco e pulverizado foi fornecido gentilmente pela professora Herta Stuz Dalla Santa da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Paraná, Brasil.

Para a obtenção do decocto de *A. brasiliensis*, 2 g do cogumelo seco e pulverizado foram fervidos com 20 ml de água destilada estéril. Após a extração, o decocto foi filtrado e submetido a liofilização para eliminação da água. Posteriormente foi preparada uma solução mãe de 100mg/mL em água destilada estéril, para a realização dos testes foram utilizadas as concentrações de 1,40; 2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL a partir da solução mãe.

Para os experimentos *in vivo*, foi escolhida a melhor concentração dos testes *in vitro* e calculada a dose para os testes *in vivo*. Dessa forma o volume correto de extrato a ser administrado no camundongo para a dose final de 135mg/Kg de peso de camundongo, foram realizados cálculos dos pesos dos animais. Cada animal foi pesado antes da administração da dose correspondente.

4.6 Fornecimento e preparo do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* A.ST.-HILL

As folhas liofilizadas de *I. paraguariensis* A.ST.-HILL foram fornecidos pela professora Herta Stuz Dalla Santa da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Paraná, Brasil.

Para a obtenção do decocto de *I. paraguariensis*, 2 g das folhas liofilizadas foram fervidas com 20 ml de água destilada estéril. Após a extração, o decocto foi filtrado e submetido a secagem em estufa à 40°C para eliminação da água. Posteriormente foi preparada uma solução mãe de 100mg/mL em água destilada estéril, para a realização dos testes foram utilizadas as concentrações de 0,92; 1,85; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL a partir da solução mãe.

Para os experimentos *in vivo*, foi escolhida a melhor concentração dos testes *in vitro* e calculada a dose para os testes *in vivo*. Dessa forma o volume correto de extrato a ser administrado no camundongo para a dose final de 22,5mg/Kg de peso de camundongo, foram realizados cálculos dos pesos dos animais. Cada animal foi pesado antes da administração da dose correspondente.

4.7 Testes *in vitro*

Os testes *in vitro*, consistiu em avaliar atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* frente à *E.coli* e *S.aureus* e verificar capacidade antioxidante total dos extratos. Neste estudo foram utilizados macrófagos recrutados de camundongos swiss para a realização do teste de citotoxicidade (CC₅₀) e avaliação da capacidade fagocítica e com o sobrenadante foi realizado a dosagem de nitritos. Os esplenócitos dos camundongos foram obtidos para o teste de proliferação celular. Por último foi avaliado a liberação de ERO por leucócitos do sangue periférico de humanos. (Figura 10)

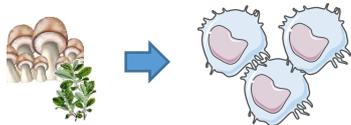
DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	
Extrato aquoso de <i>A.brasiliensis</i> e <i>I.paraquariensis</i>	
	Atividade antimicrobiana (Técnica da microdiluição e espectrofotométrica – CIM e CBM) Atividade antioxidante (TEAC e DPPH)
Macrófagos peritoneais de camundongos swiss	
	Citotoxicidade (método direto MTT) Capacidade Fagocítica (Zymosan) Dosagem de óxido nítrico (Reação de Griess)
Esplenócitos de camundongos swiss	
	Proliferação celular (método direto MTT)
Leucócitos do sangue periférico humano	
	Avaliação da liberação de ERO (DCFH-DA)

Figura 10: Delineamento experimental dos testes *in vitro*. Fonte: Autor.

4.7.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS

Para a coleta de macrófagos peritoneais de camundongos swiss, foi administrado intraperitoneal 3 mL de meio tioglicolato (KASVI®) a 3% a fim de recrutar os macrófagos. 2 dias após a administração, os macrófagos foram coletados e lavados com 5 mL de PBS 1X. Posteriormente centrifugados (1500RPM, 4°C por 5 min), lavados, e ressuspensos em PBS

1X, e posteriormente foram contados na câmara de Neubauer em microscópio óptico usando o azul de trypan (0,4%) (Biolab®) para avaliar a viabilidade.

4.7.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DE ESPLÊNOCITOS

Os baços dos animais foram extraídos em condições assépticas e transferidos para um tubo de polietileno contendo meio RPMI-1640. Os baços foram macerados, com a ajuda do embolo de uma seringa contra uma cesta de metal com poros de 40µm. A suspensão celular foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado (1% de penicilina/streptomicina e 10% de Soro Bovino Fetal), para a contagem de células viáveis, através da coloração com o Azul de trypan de (Biolab®)

4.7.3 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

As amostras de sangue (5 mL de sangue venoso) foram coletadas com Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (New Prov) a 5%, posteriormente foi adicionado 5 mL de solução salina 0,9% e homogeneizado, com cautela o sangue-solução salina foi passado para um novo tubo contendo 3mL de Histopaque®-1077 (SIGMA-ALDRICH®) (Figura 11-A)

Após esse procedimento o tubo foi centrifugado por 30 minutos à 3000 RPM. E então após a centrifugação os componentes do sangue ficaram separados (Figura 11-B) o plasma foi descartado e a camada dos leucócitos foi transferida para um novo tubo Falcon®. Posteriormente foi acrescentado PBS 1x até completar o tubo para a lavagem, (Figura 11-C) e centrifugado por 5 minutos à 1200 RPM, passado o tempo descartou-se o sobrenadante, deixando apenas o pellet de células (Figura 11-D) e ressuspensas em 1 mL de RPMI completo. (Figura 11-E).

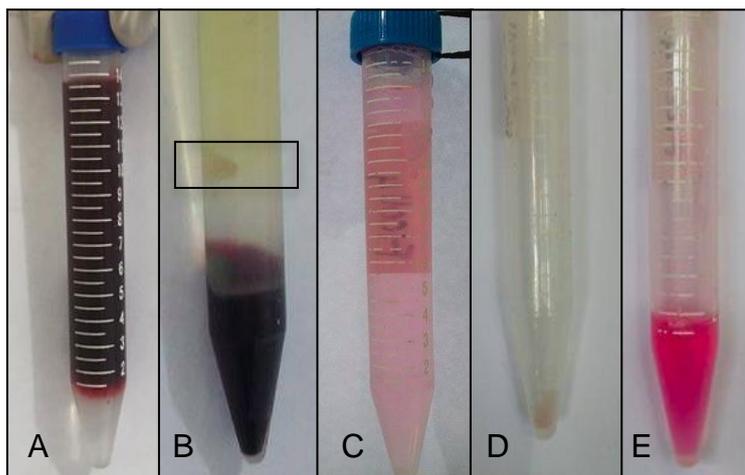


Figura 11: Ilustração da obtenção de leucócitos do sangue periférico. (A) Tubo falcon contendo sangue:salina (1:1) com Ficoll. (B) Após centrifugação, em ênfase a nuvem leucocitária. (C) Lavagem das células com RPMI completo. (D) Após centrifugação pellet de células. (E) Pellet ressuspensionado em 1mL de RPMI completo. Fonte: Autor.

4.7.4 VIABILIDADE CELULAR DE MACROFAGOS PERITONEAIS

Foi preparada uma solução de Azul de Trypan (BioLab®) a 0,4% em um eppendorf. Qual deste foi retirado 32 μ L de solução para 8 μ L de células e foi pipetado 15 μ L em câmara de Neubauer. Foi feita uma contagem separada para células viáveis e não viáveis, sendo que as células que coraram de azul foram consideradas não viáveis. Posteriormente foi realizado um cálculo para determinar qual o volume necessário para obter 2×10^5 de células.

4.7.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE MICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Agaricus brasiliensis* E *Ilex paraguariensis* POR MICRODILUIÇÃO

Foi utilizado a metodologia descrita por Mendes et al. (2011) do método de microdiluição o qual utiliza microplaca com 96 poços. Os extratos diluídos foram colocados em cada poço da microplaca uma alíquota de 100 μ L de cada concentração foi adicionada juntamente com 100 μ L de inóculo bacteriano (1×10^3 UFC/ml), obtendo concentrações de: 22,5-1,40mg/ml para *A. brasiliensis* e 14,83-0,92mg/mL para *I. paraguariensis*. Cada ensaio foi realizado em duplicata para cada concentração de extrato acima descrita e cada bactéria testada. Como controle negativo foi utilizado o meio caldo Muller-Hinton (solvente) e para controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol contra bactérias gram-positivas (250

$\mu\text{g/mL}$) e/ou a penicilina-estreptolisina para bactérias gram-negativas (10000unit/10mg). E ao final deste processo a microplaca foi incubada a 37°C por 24 horas.

4.7.5.1 Obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) é considerada como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impedirá o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade ou de pelo menos 50% do micro-organismo avaliado (efeito bacteriostático). Para a obtenção de CIM neste estudo foi utilizado o parâmetro da mudança de coloração obtida no teste colorimétrico utilizando a resazurina (MONTEIRO et al. 2012), sendo esse um parâmetro para avaliar a potência *in vitro* da amostra testada (MENDES, 1997; CLSI, 2009).

A resazurina é um corante que apresenta uma coloração azul, utilizada como referência em testes de viabilidade celular, em contato com as células viáveis sofre uma redução, sendo transformada em resofurina e mostrando uma coloração rosa (ALVES et al. 2008 e MONTEJANO et al. 2005).

4.7.5.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM é a menor concentração de um agente microbiano capaz de matar 99 a 100% dos micro-organismos testados. A CBM foi obtida a partir da técnica de contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

Para a obtenção do CBM, $10\mu\text{L}$ de cada poço, com resultados efetivo de atividade antimicrobiana, contendo diferentes inóculos bacterianos e extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*, foram semeados em placas de petri contendo Ágar Muller-Hinton (AMH), em seguida incubados por mais 24 horas a 37°C para posterior leitura das UFC.

Todos os ensaios foram realizados com o controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol foi utilizado em bactérias gram-positivas na concentração de $250\mu\text{g/ml}$, e para bactérias gram-negativas, foi o antibiótico penicilina-estreptolisina para controle de positivo, na concentração 10000unit/10mg.

4.7.6 AVALIAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foi utilizada e adaptada a metodologia descrita por Sultanbawa 2009, em que, após o preparo do inóculos das cepas de *S.aureus* (ATCC 6538) e *E.coli* (ATCC 8739) os extratos diluídos foram colocados em cada poço da microplaca uma alíquota de 100µL de cada concentração foi adicionada juntamente com 100µL de inoculo bacteriano (1×10^3 UFC/ml), obtendo concentrações de: obtendo concentrações de: 22,5-1,40mg/ml para *A. brasiliensis* e 14,83-0,92mg/mL para *I. paraguariensis*. Cada ensaio foi realizado em duplicata para cada concentração de extrato acima descrita e cada bactéria testada. Como controle negativo foi utilizado o meio caldo Muller- Hinton com a bactéria, controle positivo o antimicrobiano comercial cloranfenicol contra bactérias gram-positivas (250 µg/mL) e a penicilina-estreptolisina para bactérias gram-negativas (10000unit/10mg), para o branco apenas o meio caldo Muller- Hinton, também foram adicionado 100µL de cada concentração com 100µL de caldo Muller-Hinton a fim de subtrair a densidade dos extratos. Ao final deste processo a microplaca foi incubada a 37°C por 24 horas.

Após as 24 horas de incubação, a placa foi lida em leitor de ELISA, a 600nm após agitar gentilmente por 10 segundos. A porcentagem de inibição bacteriana foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = [1 - (\text{Ab}_{\text{Scontrole}} - \text{Ab}_{\text{Sextrato}}) \times 100] \quad (1)$$

4.7.7 CITOTOXIDADE PELO MÉTODO DIRETO 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2YL)-2,5-DIFENIL BROMETO DE TETRAZOLINA (MTT)

Este ensaio foi realizado de acordo com Mosmann, (1983) e baseia-se na avaliação da viabilidade celular a qual é quantificada pela redução do MTT (coloração amarela) a formazan (coloração roxa). Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional a viabilidade celular. Após a obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos swiss e a contagem, foi distribuído em microplacas de 96 poços, de fundo U, células (2×10^5 células/mL) com os estímulos (*A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*) em diferentes concentrações (*A. brasiliensis* - 1,40; 2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL e de *I. paraguariensis* - 0,92; 1,85; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL); o controle positivo – Triton X-100 (SIGMA-ALDRICH®) a 10% e

controle negativo – somente as células. Posteriormente foi incubado por 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C.

Após o tempo foi adicionado na placa 20 µL de MTT em todos os poços utilizados, e incubado novamente por 3 horas, em estufa de CO₂ a 37°C. Passado o tempo foram adicionado 40 µL de HCl 6N-isopropanol e incubado *overnight*. No dia seguinte foi realizada a leitura em espectrofotômetro de microplacas à 550 nm (MOSMANN, 1983).

Para a determinação da Concentração Citotóxica (CC₅₀) foram utilizado as absorbâncias encontradas e realizada uma análise de regressão linear no programa Excel®.

4.7.8 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

O Índice de Seletividade foi determinado para avaliar o nível de segurança das amostras, com atividade antimicrobiana em macrófagos peritoneais, sendo calculado através da razão entre a CC₅₀ em macrófagos e a concentração inibitória (CI₅₀) para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (REIMÃO, 2009).

Fórmula:

$$IS = CC_{50} \text{ em macrófagos} / CI_{50} \text{ contra a bactéria} \quad (2)$$

Os resultados obtidos foram avaliados através da comparação de seus valores a 10, onde valores maiores que 10 são considerados seletivos e com boa atividade antimicrobiana e inferiores significam uma maior toxicidade para o macrófago com baixa seletividade (GALLÉ et al. 2013).

4.7.9 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCÍTICA

Alíquotas (0,1mL) da suspensão de macrófagos (2x10⁵ céls/mL) foram adicionados aos poços de placas de cultivo celular de fundo chato de 96 poços. Em seguida 10µL de Zymosan fixadas em vermelho neutro (1x10⁸ partículas.mL⁻¹) foram adicionados a cada poço. Após a incubação por 30 minutos em estufa de CO₂ a 5% a 37 °C, as células foram fixadas com solução de cálcio-formol de Baker (4% formaldeído, 2% sódio clorídrico, 1% acetato de cálcio) em cada poço. Após 30 minutos, foi realizada a lavagem com PBS 1X e adicionado à solução de

extração. Após 30 minutos foi realizada a leitura da placa em um espectrofotômetro de microplacas em absorvância de 550nm. Os resultados foram expressos em abs/número de células (BONATTO et al. 2004).

4.7.10 DOSAGEM DE ÓXIDO NITRICO

O NO foi mensurado como nitrito (NO_2). A concentração de nitrito foi mensurada pela reação de Griess. No qual o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração rosa-avermelhada, de acordo com a equação da figura 20. A reação é controlada pelo tempo, e o produto é determinado após 10 minutos.

Para tal, colocou-se 100 μL do sobrenadante do cultivo celular e 100 μL do reagente de Griess e posteriormente foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e absorvância mensurada a 550 nm. A concentração de NO_2 foi determinada de uma curva-padrão feita com NaNO_2 e expressa em μM (STUEHR e MALETTA, 1985).

4.7.11 PROLIFERAÇÃO CELULAR

A cultura dos esplenócitos foram preparadas utilizando uma modificação do método descrito por (KIM et al. 2006). Células do baço de camundongos swiss a uma densidade de 2×10^5 células/mL foram incubadas com os extratos aquosos de *A. brasiliensis* - 1,40; 2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL e de *I. paraguariensis* - 0,92; 1,85; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL na presença ou não de 10 $\mu\text{g/mL}$ de Concanavalina A, em estufa de CO_2 a 5% a 37 °C durante 24 ou 48 horas em 96-poços de fundo plano. Foram adicionados vinte microlitros de MTT (5mg/mL) após o término da cultura e após 3 horas de incubação foi adicionando, 40 uL de de solução de HCl 6N com isopropanol a cada poço. As placas foram incubadas “overnight” a temperatura ambiente. As densidades ópticas foram medidas a 540 nm utilizando um espectrofotômetro de microplacas como descrito por Mosmann et al. 1983.

4.7.12 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

4.7.12.1 Avaliação da capacidade antioxidante total pela redução do radical ABTS•+

Seguiu-se o método proposto por Miller et al. (1993) modificado por Re et al. (1999). Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (SIGMA-ALDRICH A1888) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$; SIGMA-ALDRICH 60490), produzindo diretamente o radical cátion ABTS•+, cromóforo de coloração verde/azul. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, determinando uma descoloração. Uma solução de estoque estável de ABTS •+ será produzida por reação de uma solução aquosa a 7 mmol/L de ABTS com 2,45 mmol de persulfato/L de potássio (concentração final) posteriormente a solução será deixada em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 12-16 h antes de usar (PELLEGRINI,1999). No dia da análise será preparada uma solução trabalho de ABTS+ obtida a partir da diluição da solução de estoque em etanol para uma absorbância de $0,70 \pm 0,02$ AU a 734 nm, verificada por um espectrofotômetro (Fento, São Paulo, Brasil; 800 XI) O ácido gálico, um conhecido antioxidante foi usado como controle padrão. Os resultados dos extratos foram expressos em porcentagens.

4.7.12.2. Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre (DPPH)

A técnica foi adaptada de Rufino et al. (2007). O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (DPPH), o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos irá se determinar a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres.

O controle negativo foi feito pela adição de etanol e DPPH e o controle positivo foi feito pela adição de solução de um padrão (TROLOX) e DPPH. Em um tubo foi adicionado 50 μ L de amostra de *Agaricus brasiliensis* ou *Ilex paraguariensis*, 600 μ L de uma solução de DPPH 0,1mM, exceto nos brancos, e foi adicionado 350 μ L de água destilada, aguardou-se 30 minutos a 37°C e realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 517nm.

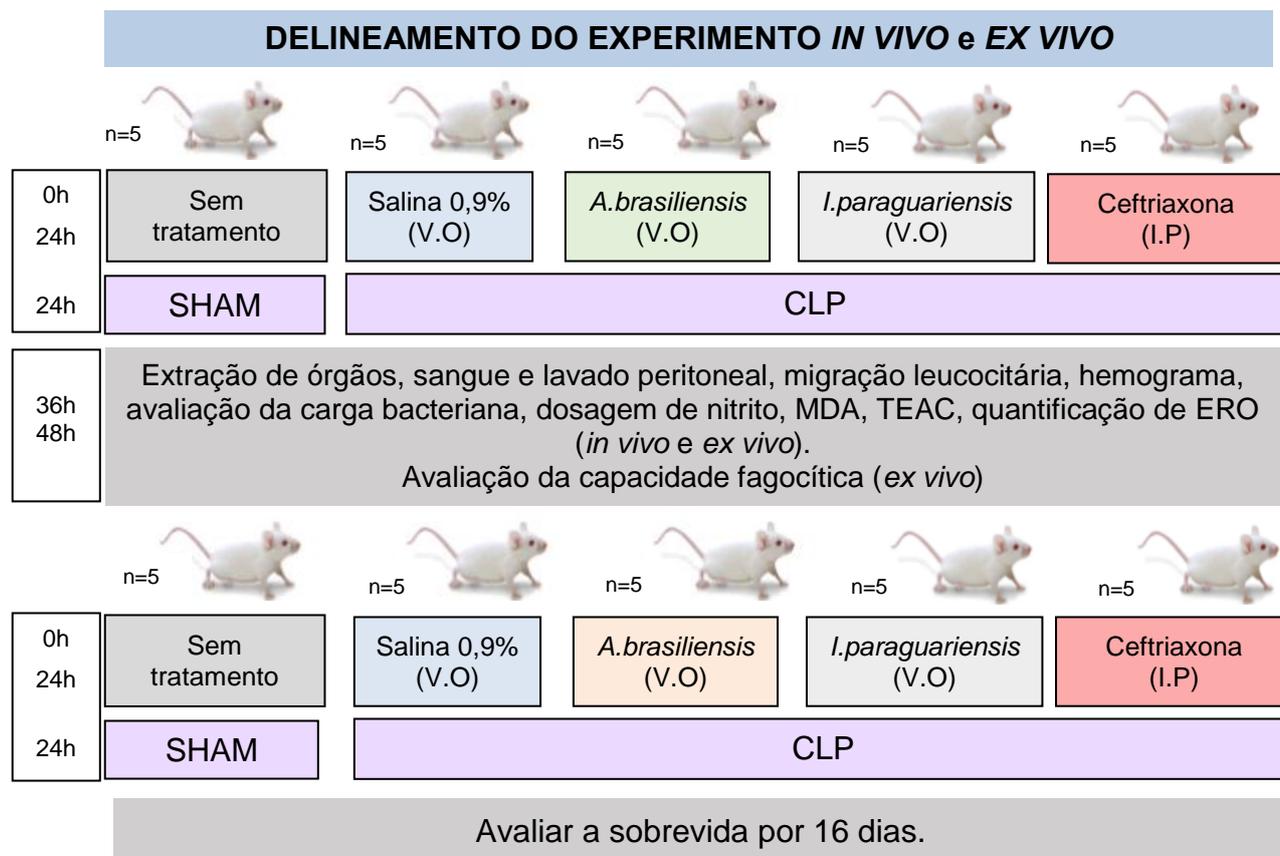
4.7.13 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

A quantificação de ERO intracelular foi realizada de acordo com Ferreira-Cravo et al. (2007). O método consiste na capacidade do DCFH-DA atravessar a membrana celular e ser hidrolisado por esterasas celulares, onde sofre um processo de oxidação, culminando no surgimento da forma fluorescente, diclorofluoresceína (DCF). É importante ressaltar que este composto não é específico para o H₂O₂, podendo sofrer a oxidação de outras espécies reativas.

Os leucócitos coletados do sangue venoso humano na concentração de 2x10⁵ cél/mL, foram pré-tratados com as concentrações mais eficazes de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* nos testes antimicrobianos e antioxidante *in vitro* e incubados por 30 minutos a 37°C. Posteriormente foi adicionado 2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFH-DA) a 10µM, e imediatamente feita a leitura (tempo zero) e a cada 5 minutos até completar 30 minutos de leitura à λ=488nm (laser azul) e com um filtro de emissão de λ=530 nm (RICHARD et al. 2002; GRASSO et al. 2003) no espectrofotômetro VICTOR®. A quantidade de ERO intracelular foi expressa em intensidade de fluorescência.

4.8 Testes *in vivo* e *ex vivo*

Para a realização da avaliação antimicrobiana, antioxidante e imunomoduladora dos extratos *in vivo*, foram utilizados camundongos swiss, de ambos os sexos, estes foram divididos em grupos e pré-tratados com solução salina 0,9%, ceftriaxona (20mg/Kg/camundongo) e com os extratos de *Agaricus brasiliensis* (135mg/Kg/camundongo) e *Ilex paraguariensis* (22,2mg/Kg/camundongo) 24 horas antes da indução da sepse e no dia do procedimento. Para a indução da sepse foi usado o método da ligadura e punção do ceco (Cecal ligation and puncture - CLP), e foram sacrificados com 12 horas ou 24 horas após o procedimento. Os órgãos foram extraídos, o exsudado peritoneal e o sangue coletados para a avaliação da migração leucocitária, hemograma, avaliação da carga bacteriana, dosagem de óxido nítrico, avaliação da capacidade fagocítica, TEAC, MDA e avaliação da liberação de ERO. Paralelo a este, foi avaliado a sobrevivência dos animais. Um delineamento experimental é demonstrado na Figura 12



Legenda: CLP: cecal ligation and puncture I.P: intraperitoneal; V.O: Via oral.

Figura 12: Delineamento experimental *in vivo*. Fonte: Autor

4.8.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para esse estudo os animais foram divididos em 5 grupos:

- **GRUPO 1 (Controle-Sham):** Animais receberam exatamente os mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da indução de sepse – 5 animais;
- **GRUPO 2 (Controle-Salina):** Animais receberam tratamento com solução salina 0,9% estéril por gavagem (150uL) 24 horas antes e no tempo anterior a indução de sepse – 5 animais;
- **GRUPO 3 (Controle-Cef):** Animais receberam tratamento com Ceftriaxona (20mg/Kg/camundongo) por via intraperitoneal 24 horas antes e no tempo anterior a indução de sepse – 5 animais;
- **GRUPO 4 (Ab + CLP):** Animais receberam tratamento do extrato aquosos de *A. brasiliensis* (135mg/Kg/camundongo) 24 horas antes e no tempo anterior a indução de sepse – 5 animais;

- **GRUPO 5 (Ilex + CLP):** Animais receberam tratamento do extrato aquosos de *I. paraguariensis* (22,2mg/Kg/camundongo) 24 horas antes e no tempo anterior a indução de sepse – 5 animais.

4.8.2 MODELO DE SEPSE INDUZIDA POR TRANSFIXAÇÃO DO COTO-CECAL

O modelo CLP inicialmente foi proposto em ratos, porém posteriormente foi adaptado para o uso em camundongos, seguindo a metodologia de Cuenca et al. 2010. Os camundongos foram anestesiados com uma solução contendo cetamina (75mg/kg) e xilazina (15mg/kg), na proporção 1:1 por via intraperitoneal (Figura 13-A) posteriormente foi realizada a depilação da parede abdominal, a assepsia do campo operatório com povidona e álcool a 70° (Figura 13-B). Foi realizada uma pequena incisão e o ceco exteriorizado com auxílio de uma pinça cirúrgica. Com um fio de algodão 2-0 agulhado foi feita a ligadura do ceco a um centímetro da válvula ileocecal (Figura 13-C). Após a ligadura, o coto isolado do ceco foi transfixado com a agulha de 22 gauss a partir do ponto de ligadura até a porção mais distal do ceco (Figura 13-D). O fio foi seccionado a um centímetro do ponto de saída, funcionando desse modo como dreno do conteúdo cecal para a cavidade peritoneal, como mostrado na figura 24 (D'ACAMPORA e LOCKS,2014). Após o procedimento o animal foi suturado com um fio de seda 3-0, e a região limpa com álcool 70° (Figura 13-E), posteriormente foi administrado 1 mL de solução salina estéril subcutâneo, para a desidratação (Figura 13-F). Durante o tratamento foi ministrado Bupremorfina (0,05 a 0,1mg/kg) para as dores provenientes do procedimento cirúrgico e para os animais controle-sham (da cirurgia), o ceco foi exteriorizado sem a realização da transfixação. Os animais foram colocados em gaiolas pós-operatória (com pisos aramados em aço inox) individuais, sob luz incandescente por 1 hora.

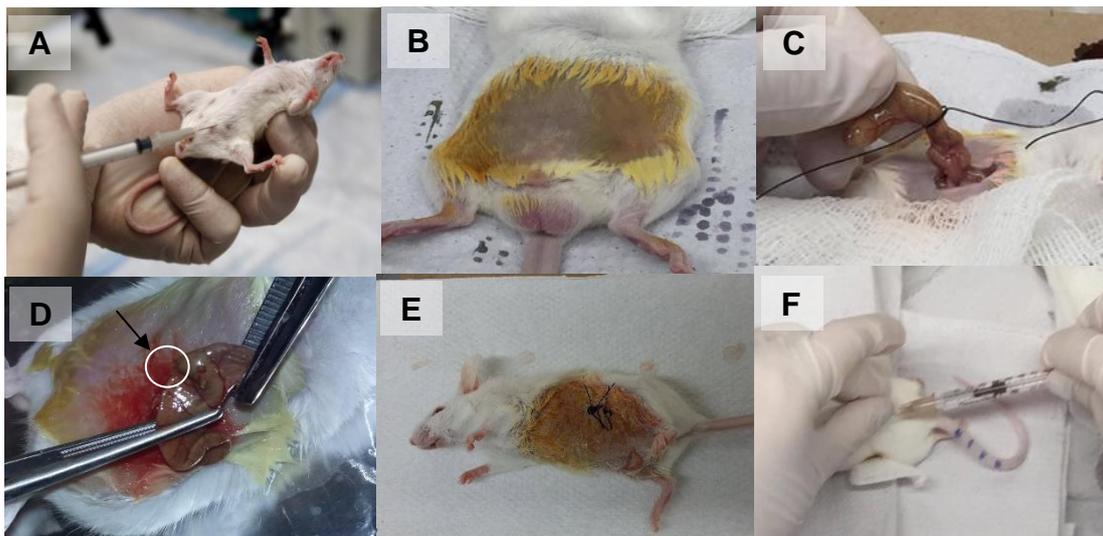


Figura 13: Procedimento da CLP. (A) Administração de 60 μ L anestésico por via intraperitoneal em camundongos Balb/C; (B) Assepsia da região abdominal com povidona e álcool 70° após a raspagem; (C) Ceco exteriorizado e a ligadura do ceco (D) Perfuração com agulha 22 gauss e exposição das fezes após a perfuração (seta e círculo); (E) Sutura após a CLP com fio de seda 3-0; (F) Administração de 1mL de solução fisiológica 0,9%. Fonte: Autor

4.8.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS COM SEPSE INDUZIDA COM TRATAMENTO

Foi realizado o procedimento de CLP nos camundongos e foram tratados conforme descrito anteriormente. Os animais foram observados por no máximo 16 dias após a cirurgia e o tratamento, sendo anotados, os pesos diariamente e os horários de óbito dos animais no protocolo de pesquisa. Foi construída uma curva de sobrevivência dos animais em relação ao tempo decorrido após o procedimento.

4.8.4 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL, SANGUE E ÓRGÃOS

4.8.4.1 Coleta do lavado peritoneal

Após 12 e 24 horas de indução de CLP, os animais foram submetidos à sedação (Xilazina e Cloridrato de Cetamina), na proporção de 1:1, por via intraperitoneal. A coleta do lavado peritoneal consistiu na lavagem do peritônio com 3mL de PBS 1X acrescida de EDTA 1mM. As amostras foram, então, armazenadas em tubos tipo falcon de 15 ml devidamente identificados. Para as análises no conteúdo do sobrenadante, o mesmo foi obtido através de

centrifugação (5 minutos a 1500 RPM) e congelado em freezer -80°C até o momento das análises.

4.8.4.2 Coleta do sangue

Após a sedação foi realizada a coleta da amostra de sangue, por via intracardíaca após 12 e 24 horas de indução de CLP. O volume total de sangue coletado foi colocado em tubos de vidro contendo EDTA para a realização do hemograma, e posterior separação do soro por centrifugação (5 min a 1500 RPM) sendo todas as amostras devidamente identificadas. O soro foi mantido em freezer -80°C até o momento das análises.

4.8.4.3 Coleta e preparo de órgãos

O baço, coração, fígado e pulmão foram coletados 12 e 24 horas após a CLP. Cada órgão coletado, foi lavado com PBS 1x e armazenados em tubos do tipo eppendorf de 1,5mL. Os órgãos foram macerados em homogeneizador de tecidos (Ultra Turrax T25 Basic) na presença de PBS 1X. Posteriormente foi centrifugado por 10 minutos a 3000 RPM e o sobrenadante coletado em eppendorfs devidamente identificados e mantidos em freezer -80°C até o momento das análises.

4.8.5 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA INDUZIDA POR SEPSE E EFEITO DO TRATAMENTO COM O *Agaricus brasiliensis* E *Ilex paraguariensis* EM ANIMAIS

Foi realizada a avaliação da migração leucocitária no lavado peritoneal. Após os animais serem sacrificados 12 e 24h após CLP, foi realizada a assepsia com álcool 70% no abdome dos animais e injetados 3 mL de PBS estéril contendo EDTA (1mM) na cavidade peritoneal. Posteriormente aspirado, centrifugado e o pellet foi ressuspenso em RPMI completo. A contagem global de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e expressa como número de 10⁶ células/mL. A contagem diferencial foi realizada com 100 células diferenciando os tipos celulares de acordo com Lindstrom et al. 2015, a partir do lavado preparado em citocentrífuga (INBRAS®) à 1500 RPM por 10 minutos. As lâminas foram coradas com Panótico rápido (INTERLAB®) e realizada a contagem de 100 leucócitos em microscópio óptico. Os resultados

foram expressos como número de neutrófilos e mononucleares presentes no lavado peritoneal x 10⁶/cavidade.

4.8.6 HEMOGRAMA

Para avaliação dos parâmetros hematológicos, 500µL do sangue coletado dos animais com EDTA 5% foi analisado no aparelho hematológico automatizado (poch – 100iV Diff, Sysmex Corp). Os seguintes parâmetros foram analisados: hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas e contagem global e diferencial de leucócitos.

4.8.7 AVALIAÇÃO DA CARGA BACTERIANA

Para a realização deste ensaio foram utilizadas as amostras coletadas 12 e 24h após da CLP. Para a quantificação da carga bacteriana, foram retirados 100 µL do lavado peritoneal, sangue e do homogenizado dos órgãos, e realizada diluições seriadas com PBS1x nas proporções 1:10 e 1:100. As amostras foram semeadas (10 uL) por esgotamento, sob condições estéreis, em placas de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton. Em seguida cultivado em estufa bacteriológica na temperatura de ± 37 °C, para posterior contagem de UFC em 24 h.

4.8.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NITRICO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O óxido nítrico (NO) foi mensurado como nitrito (NO₂) seguindo a metodologia descrita no item 4.7.10. Foram utilizadas 100 µL das amostras do soro, sobrenadante do lavado peritoneal e dos órgãos (baço. Coração. Fígado, pulmão) de todos os grupos (Sham, Salina, Ceftriaxona, *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*) 12 e 24 horas após a CLP.

4.8.9. DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEIDO (MDA) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A fim de avaliar a peroxidação lipídica como indicador de estresse oxidativo. Foi utilizada a técnica que baseia-se na reação do MDA e outras substâncias com o ácido

tiobarbitúrico (TBA; SIGMA-ALDRICH T5550) em pH baixo e temperatura elevada, formando o complexo MDA-TBA de coloração rósea. O procedimento foi de acordo com fundamentos propostos por Khonn & Livesedge (1944), adaptados por Percário et al. (1994), método que consiste no preparo inicial do fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4 75 mM, Synth, 35210) em água acidificada (pH 2,5). Esta solução é utilizada na preparação do TBA (10 nM). Adiciona-se 500 μl de amostra à 1000 μl da solução de ácido tiobarbitúrico 10 nM. Em seguida leva-se ao banho-maria (95°C x 60 min); após a incubação deixa-se esfriar a temperatura ambiente; adiciona-se 4,0 ml de álcool 1-butílico, homogeneiza-se bem em vórtex e posteriormente submete-se a centrifugação a 175 x g (15 min); coleta-se 3,0 ml do sobrenadante para leitura espectrofotométrica a 535 nm. Utilizou-se como padrão o 1,1,3,3, tetrahidroxipropano (SIGMA-ALDRICH, T9889) para a realização da curva padrão.

4.8.10. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EQUIVALENTE AO TROLOX (TEAC) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foi determinada de acordo com a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox. O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico; SIGMA-ALDRICH 23881-3) é um potente antioxidante análogo hidrossolúvel da vitamina E.

A avaliação da capacidade antioxidante total das amostras biológicas foram determinadas de acordo com a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox seguindo a metodologia descrita no item 4.7.12.1. Foram utilizadas 30 μL das amostras do soro, sobrenadante do lavado peritoneal e dos órgãos (baço, Coração, Fígado, pulmão) de todos os grupos (Sham, Salina, Ceftriaxona, *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*) 12 e 24 horas após a CLP. Os resultados foram expressos como TEAC no mmol de Trolox por quilograma.

4.8.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA *EX VIVO*

Para a avaliação da atividade fagocítica, os macrófagos peritoneais provenientes dos animais sépticos 24 horas após a CLP de todos os grupos (Sham, Salina, Ceftriaxona, *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*) foram coletados, e uma concentração de 2×10^5 céls/mL foram

incubadas com 10 μ L de Zymosan fixadas em vermelho neutro (1×10^8 partículas.mL⁻¹) por 30 minutos em estufa de CO₂ a 5% a 37 °C, seguindo a metodologia descrita no item 4.7.9

4.8.12. QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ROS INTRACELULAR *EX VIVO*

Para a quantificação da liberação de ROS intracelular, foram coletados macrófagos peritoneais de todos os grupos experimentais (Sham, Salina, Ceftriaxona, *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*) 24 horas após a CLP. Uma concentração de 2×10^5 céls/mL de cada animal foram incubadas com 10 μ M H₂DCFH-DA seguindo a metodologia descrita no item 4.7.13. Além destas, para verificar a capacidade de reverter a liberação ou aumentar das células *ex vivo*, em uma outra placa de fundo U, a concentração de 2×10^5 céls/mL dos mesmos animais foram incubadas com tBHP (40 μ Mol) por 30 minutos em estufa de CO₂ a 5% a 37 °C, posteriormente adicionado 10 μ M H₂DCFH-DA seguindo a metodologia descrita no item 4.7.13.

4.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística, onde cada parâmetro foi analisado inicialmente em relação aos possíveis pontos discrepantes (outliers), sendo utilizado o cálculo do intervalo interquartil. O teste t de Student foi utilizado para verificar a existência de diferenças significativas para cada parâmetro analisado em cada grupo do início ao final do estudo. Para cada parâmetro analisado foi realizada Análise Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para a comparação de pares de médias. Para verificação de possível correlação entre parâmetros, foi realizado o teste de correlação de Pearson. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Testes *in vitro*

5.1.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

5.1.1.1 Teste de microdiluição

5.1.1.1.1 Bactéria Gram-positiva: Bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Foi avaliada a atividade antibacteriana pelo método da microdiluição em caldo, com coloração por resazurina, dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* nas concentrações de 1,40; 2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL e de *I. paraguariensis*, 0,92; 1,85; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL frente à bactéria gram-positiva *S. aureus* ATCC 6538, e foi determinado a CBM e a CIM. Como controle para o CIM e CBM, o positivo consistiu no inóculo na presença de cloranfenicol (250 µg/mL) e o negativo apenas o inóculo foi semeado. (Figura 14)

Para o extrato *A. brasiliensis* não foi possível determinar a CIM, nem a CBM, pois houve crescimento bacteriano em todas as concentrações avaliadas frente a *S. aureus* (Figura 15). No entanto, com o extrato aquoso de *I. paraguariensis*, a CIM foi obtida na concentração de 2,81 mg/mL e a CBM em 3,70 mg/mL, conforme Figura 16.

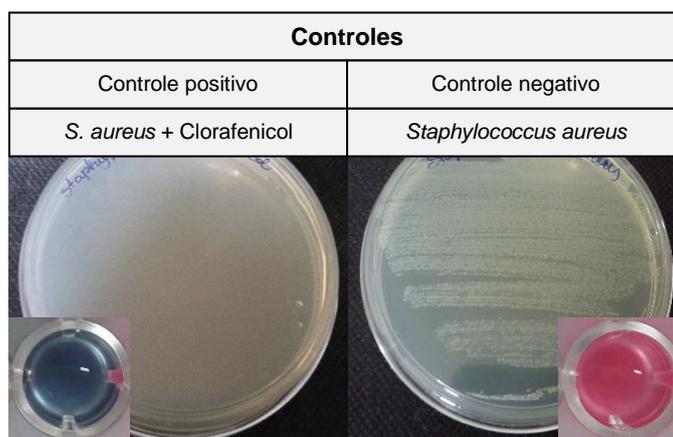


Figura 14: Controles para a determinação do CIM e CBM para *S.aureus*. A) Controle positivo: *S.aureus* na presença de Cloranfenicol. B) Controle negativo: *S.aureus* na ausência do antibiótico Cloranfenicol

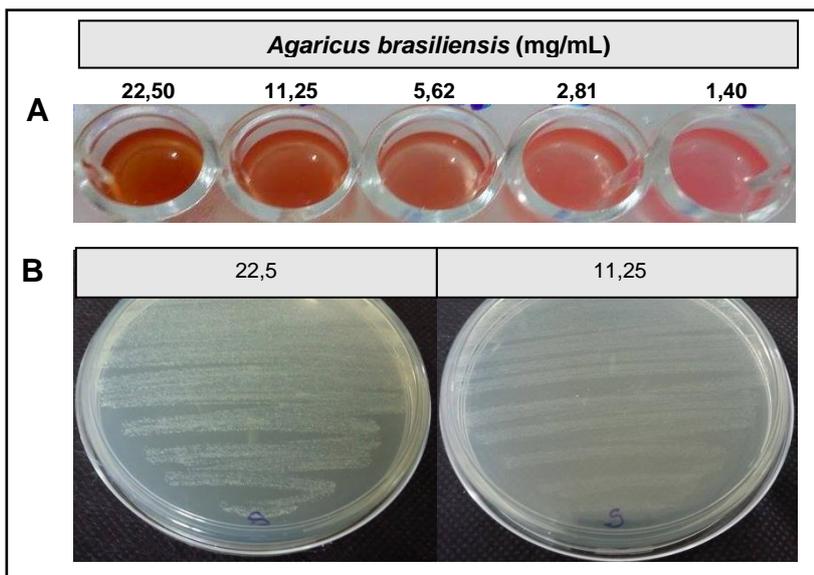


Figura 15: Determinação de CIM e CBM de *A. brasiliensis* frente à *S.aureus* (A) Ensaio da Resazurina para obtenção do CIM: não foi possível obter a CIM dentro das concentrações testadas. (B) Não foi possível obter CBM.

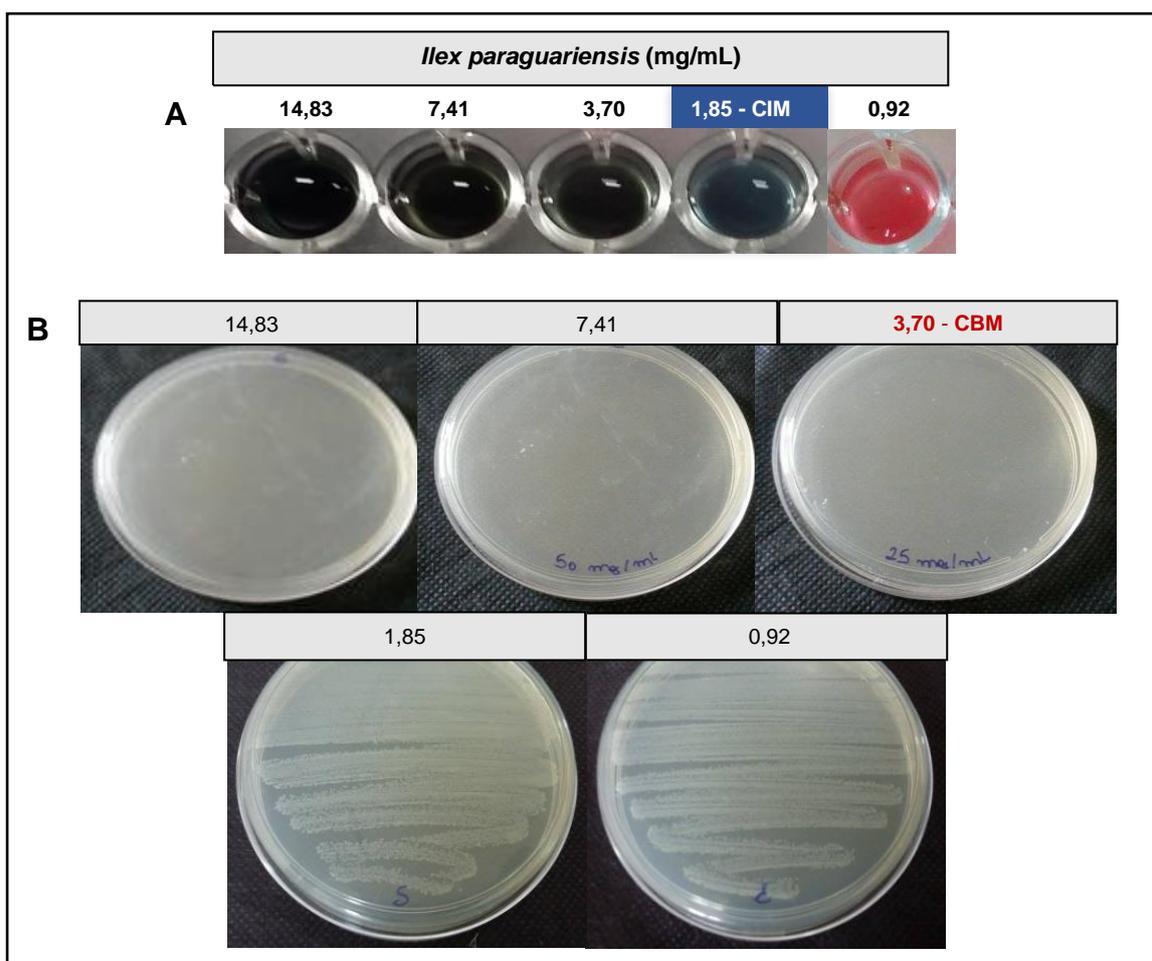


Figura 16: Determinação de CIM e CBM de *I. paraguariensis* frente à *S.aureus* (A) Ensaio da resazurina para obtenção do CIM: o extrato obteve o CIM de 1,85 mg/mL. (B) CBM do extrato encontrado foi de 3,70 mg/mL.

5.1.1.1.2 Bactéria Gram negativa: *Escherichia coli* ATCC 8789

Foi avaliada a atividade antibacteriana pelo método da microdiluição, dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* nas concentrações de 1,40; 2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL e de *I. paraguariensis* (0,92; 1,85; 3,70; 7,41; 14,83 mg/ML) frente à bactéria *E. coli* ATCC 8789 e foi determinado a CBM e a CIM. Como controle para o CIM e CBM, o positivo consistiu no inóculo na presença de c penicilina-estreptolisina (10000unit/10mg) e o negativo apenas o inóculo foi semeado. (Figura 17)

O extrato de *A. brasiliensis* também não inibiu o crescimento da *E. coli*, com isso não foi possível obter o CIM e CBM nas concentrações avaliadas (Figura 18). Enquanto, que com o extrato de *I. paraguariensis*, o CIM e o CBM foram obtidos na concentração de 3,70 mg/ mL (Figura 19).

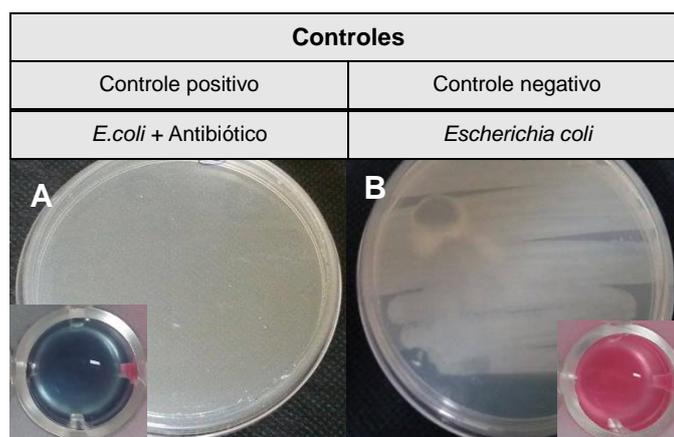


Figura 17: Controles para a determinação do CIM e CBM para *E.coli*. A) Controle positivo: *E.coli* na presença de penicilina-estreptolisina B) Controle negativo: *E.coli* na ausência do antibiótico penicilina-estreptolisina.

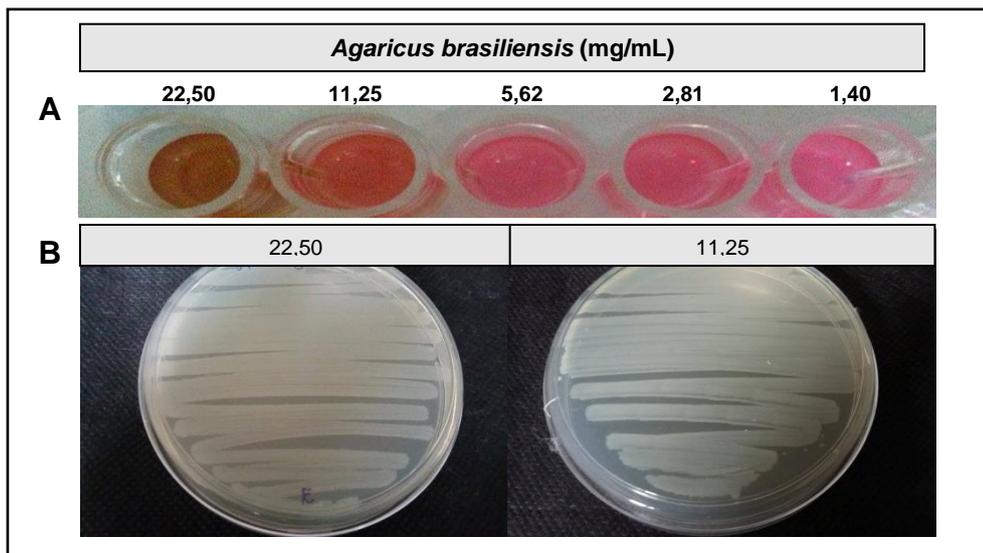


Figura 18: Determinação de CIM e CBM do *A. brasiliensis* frente à *E.coli* (A) Ensaio da Resazurina para obtenção do CIM: A CIM não foi obtida nas concentrações testadas. (B) CBM não foi obtido nas concentrações testadas.

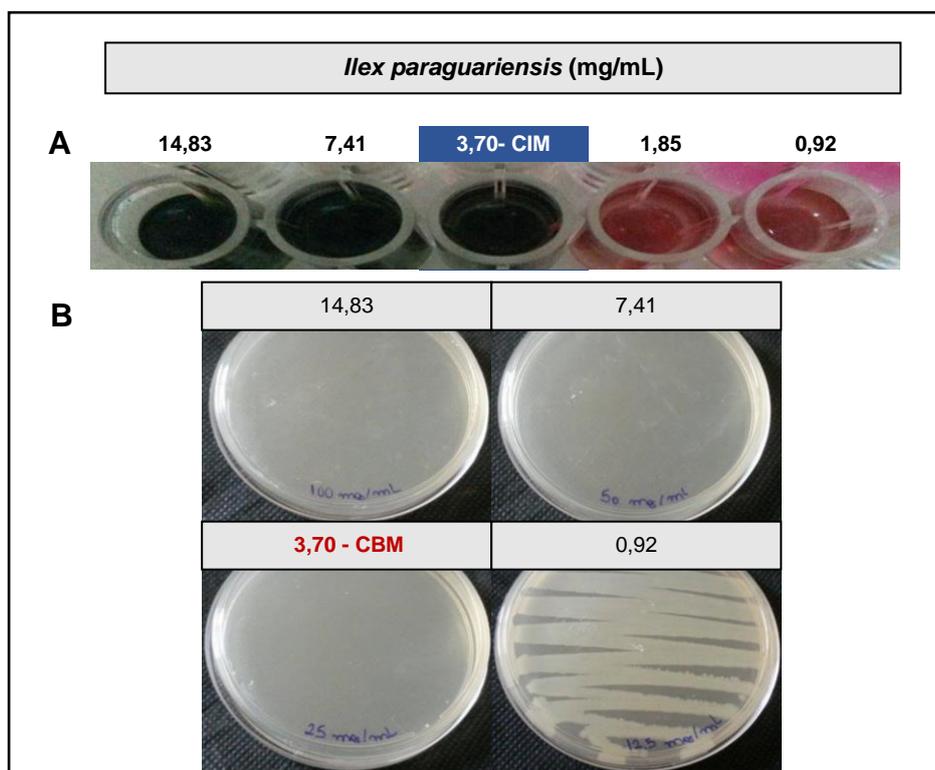


Figura 19: Determinação de CIM e CBM de *I. paraguariensis* frente à *E.coli*(A) Ensaio da Resazurina para obtenção do CIM: A CIM de *Ilex paraguariensis* foi de 3,70 mg/mL. (B) CBM de obtido de *Ilex paraguariensis* foi de 3,70 mg/mL.

A tabela 03 expressa os resultados obtidos nos ensaios de microdiluição com os extratos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Em resumo, os dados mostram que o *A. brasiliensis* não apresentou ação antimicrobiana frente às bactérias nas concentrações testadas, enquanto o *I. paraguariensis* foi capaz de inibir o crescimento a partir da concentração de 1,85 mg/mL *S. aureus* e 3,70 mg/mL *E.coli*. Além disso, a razão entre o CBM e o CIM obteve o valor de um (1), mostrando que o *I. paraguariensis* tem ação bactericida *in vitro*.

Tabela 03: Valores de CIM e CBM.

Extrato	Bactéria, CIM e CBM (mg/mL)					
	<i>S. aureus</i>			<i>E.coli</i>		
	CIM	CBM	CBM/CIM	CIM	CBM	CBM/CIM
<i>Agaricus brasiliensis</i>	>22,5	>22,5	ND	>22,5	>22,5	ND
<i>Ilex paraguariensis</i>	1,85	3,70	2	3,70	3,70	1

ND: Não Detectado

5.1.1.2 Ensaio espectrofotométrico para atividade antimicrobiana

Os extratos aquosos de *A. brasiliensis* (1,40; 2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL) e de *I. paraguariensis* (0,92; 1,85; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL) foram incubados com as bactérias *S. aureus* e *E. coli* à 37°C por 24 horas, após esse tempo foi avaliado o crescimento bacteriano pelo método espectrofotométrico. O objetivo destes dados é comparar o crescimento bacteriano por dois métodos de detecção, a obtenção de CIM pelo método colorimétrico da Resazurina e por valores de absorvâncias com o espectrofotômetro (Tabela 04). Além disso, os resultados também foram expressos em porcentagem de inibição das bactérias (Tabela 05) e o IC₅₀ (mg/mL) (Tabela 06).

A Tabela 04 mostra que a análise do crescimento bacteriano pelo método espectrofotométrico obteve valor similar a técnica de CIM por coloração por resazurina para ambas as bactérias, com o valor de CIM não detectável para *A. brasiliensis*, enquanto que para o *I. paraguariensis*, os valores de CIM foram de 1,85 e 3,7 e mg/mL para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

Tabela 04: Comparação do CIM pelo método da Resazurina (colorimétrico) o método espectrofotométrico (turbidimétrico).

Extrato	CIM (mg/mL)			
	Resazurina		Espectrofotométrico	
	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
<i>Agaricus brasiliensis</i>	>22,5	>22,5	>22,5	>22,5
<i>Ilex paraguariensis</i>	3,70	1,85	3,70	1,85

Quanto os percentuais de inibição para *S. aureus*, o extrato *A. brasiliensis* na maior concentração (22,50 mg/mL) apresentou uma inibição do crescimento desta bactéria de 33,3% (Tabela 05), com o valor de IC₅₀ de 32,20 mg/mL (Tabela 06). Enquanto que o *I. paraguariensis* desde a concentração de 3,70 mg/mL foi capaz de matar 100% da população bacteriana (Tabela 05), obtendo um IC₅₀ de 4,25 mg/mL (Tabela 06).

Quanto a *E. coli*, o extrato *A. brasiliensis* na maior concentração (22,50 mg/mL) foi capaz de inibir 38,5% do crescimento de *E.coli* (Tabela 05), apresentando um IC₅₀ de 121,85 mg/mL, (Tabela 06). Por outro lado, o *I. paraguariensis* a partir da concentração de 3,70 mg/mL levou a 100% de inibição do crescimento (Tabela 05), com um IC₅₀ de 9,19 mg/mL (Tabela 06).

Tabela 05: Percentual de inibição das bactérias frente aos extratos aquosos *Agaricus brasiliensis* e *Ilex paraguariensis*.

<i>Agaricus brasiliensis</i>			<i>Ilex paraguariensis</i>		
Concentração (mg/mL)	Porcentagem de inibição (%)		Concentração (mg/mL)	Porcentagem de inibição (%)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1,40	7,2	4,5	0,92	11	6,3
2,81	8,9	8,8	1,85	22,6	10,4
5,62	7,2	11,4	3,70	100	100
11,25	16,1	15,2	7,41	100	100
22,50	33,3	38,5	14,83	100	100

Tabela 06: IC₅₀ dos extratos aquosos de *Agaricus brasiliensis* e *Ilex paraguariensis* frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Extrato	IC ₅₀ (mg/mL)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>Agaricus brasiliensis</i>	32,20	121,85
<i>Ilex paraguariensis</i>	4,25	9,19

5.1.2 CITOTOXICIDADE CELULAR

No presente estudo foi avaliado a citotoxicidade em macrófagos peritoneais dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* nas concentrações (1,40; 2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL) e de *I. paraguariensis* (0,92; 1,85; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL) pelo método de redução do tetrazólio (MTT).

O *Agaricus brasiliensis* manteve 100% da viabilidade celular em todas as concentrações testadas, obtendo a concentração citotóxica (CC₅₀) em 581,12 mg/mL. Enquanto, que o *Ilex paraguariensis* na concentração de 7,41 mg/mL foi capaz de reduzir a viabilidade para 87%, e a concentração de 14,83 mg/mL para 67.2% obtendo a CC₅₀ de 19,43 mg/mL (Figura 20 e Tabela 07, respectivamente).

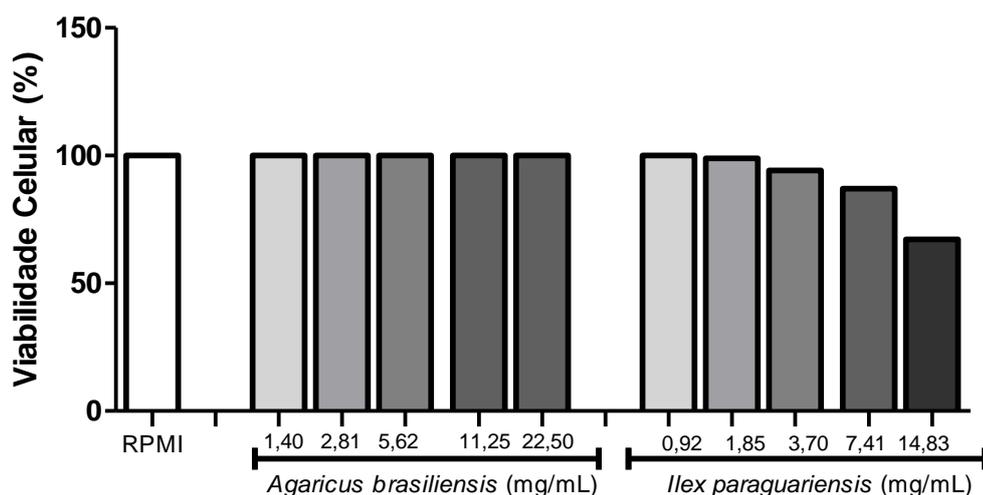


Figura 20: Viabilidade celular macrófagos peritoneais expresso em porcentagem (%), após incubar por 24 horas os extratos aquosos de *A. brasiliensis* nas concentrações de 1,40; 2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL e de *I. paraguariensis*, 0,92; 1,85; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL

Tabela 07: Valores da concentração citotóxica (CC₅₀) de *Agaricus brasiliensis* e *Ilex paraguariensis* frente à macrófagos peritoneais.

Extrato aquoso	CC ₅₀ (mg/mL)
<i>Agaricus brasiliensis</i>	581,12
<i>Ilex paraguariensis</i>	19,43

5.1.3 SELETIVIDADE

Os valores de seletividade foram calculados para *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*, baseado nos valores de CC_{50} e IC_{50} para cada bactéria testada. Com isso, a Tabela 08 mostra que *A. brasiliensis* é mais seletivo do que *I. paraguariensis*, principalmente frente à *S. aureus* que o índice de seletividade de 18,04 comparado ao IS de 4,57 para *I. paraguariensis*. Quanto à *E.coli*, o IS para *A. brasiliensis* foi de 4,77, enquanto para o *I. paraguariensis* foi de 2,11, mostrando pouca seletividade entre macrófagos e *E. coli* (Tabela 08).

Tabela 08: Índice de seletividade (IS) e citotoxicidade dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*, frente aos macrófagos peritoneais e as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Extrato	Macrófagos	<i>S.aureus</i>	IS ^c	Macrófagos	<i>E.coli</i>	IS ^c
	CC_{50}^a (mg/mL)	IC_{50}^b (mg/mL)		CC_{50}^a (mg/mL)	IC_{50}^b (mg/mL)	
<i>A. brasiliensis</i>	581,12	32,20	18,04	581,12	121,85	4,77
<i>I. paraguariensis</i>	19,43	4,25	4,57	19,43	9,19	2,11

^a 50% de Concentração citotóxica; ^b Concentração inibitória; ^c Relação entre CC_{50} e IC_{50} .

5.1.4 CAPACIDADE FAGOCÍTICA

Para avaliar o efeito dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* (5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL) e de *I. paraguariensis* (3,70; 7,41; 14,83 mg/mL) sobre a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais, estas células foram incubadas por 30 minutos com partículas de Zymosan (5×10^6) na presença ou não dos extratos, à 37°C e 5% de CO_2 .

A Figura 21 mostra que as concentrações de *A. brasiliensis* reduziram significativamente a capacidade fagocítica de macrófagos comparada ao grupo sem o *A. brasiliensis* ($p < 0.001$). Por outro lado, com *I. paraguariensis* somente na menor concentração (3,70mg/mL) foi capaz de reduzir a atividade fagocítica dos macrófagos, enquanto a maior concentração (14,83mg/mL) aumentou a atividade fagocítica desta célula comparado ao grupo sem *I. paraguariensis* ($p < 0.001$). (Figura 21)

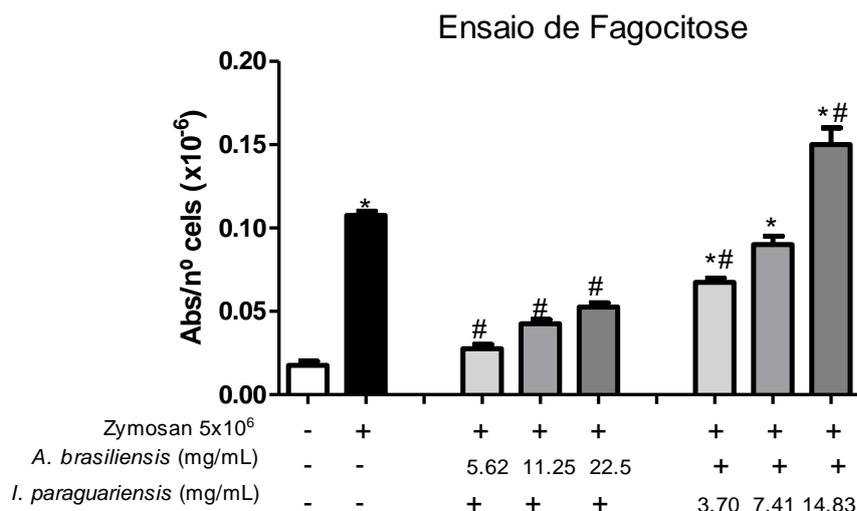


Figura 21: Capacidade Fagocítica *in vitro*. Macrófagos peritoneais recrutados de camundongos swiss foram estimulados com partículas de Zymosan (5×10^6) e tratados com *A. brasiliensis* (5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL) e *I. paraguariensis* (3,70; 7,41; 14,83 mg/mL). * $p < 0.001$ comparado ao controle RPMI, # $p < 0.001$ comparado ao controle Zymosan.

5.1.5 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Para a avaliação da produção do NO, macrófagos peritoneais foram tratados com diferentes concentrações dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* (2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL) e *I. paraguariensis* e incubados ou não com LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) por 24 e 48 horas. A incubação com o *A. brasiliensis* nas células sem estímulo (LPS), após 24 e 48 horas, foi capaz de aumentar a produção de NO em todas as concentrações testadas (2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL) comparado ao controle RPMI. Por outro lado, nas células estimuladas com LPS, em 24 horas, as concentrações (2,81; 5,62; 11,25 mg/mL) de *A. brasiliensis* foram capazes de reduzir a produção de NO em comparação ao controle LPS ($p < 0,05$). Entretanto, após 48 horas, somente a menor concentração de *A. brasiliensis* (2,81 mg/mL) continuou inibindo a produção de NO, enquanto as concentrações 5,62 e 11,25 mg/mL induziram aumento nos níveis de NO comparado ao controle LPS (Figura 22).

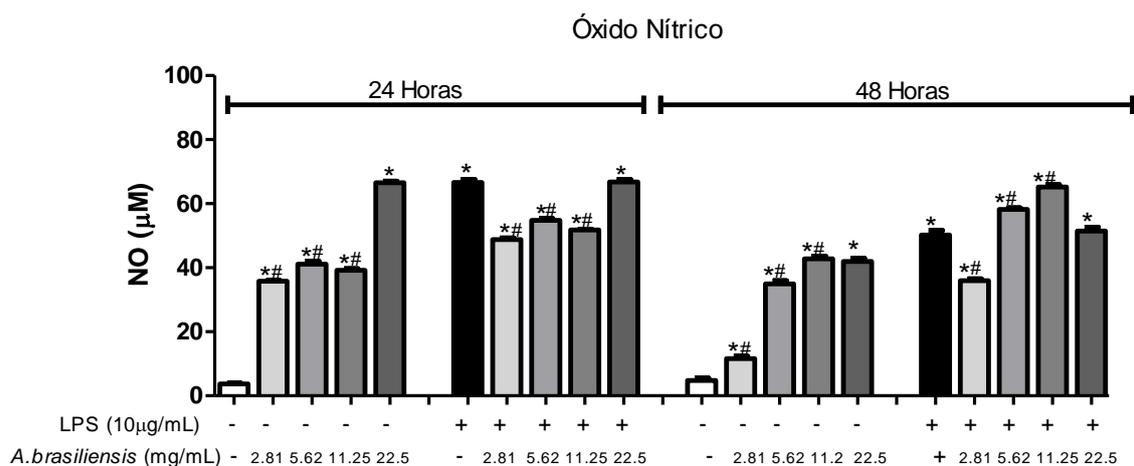


Figura 22: Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais após o tratamento de *A. brasiliensis* (2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL) com ou sem LPS (10µg/mL) incubados por 24 e 48 horas. *p<0,05 comparado ao controle RPMI, #p<0,05 comparado ao controle LPS.

Todas as concentrações de *I. paraguariensis* nas células sem estímulo (LPS), após 24 e 48 horas de incubação, também foram capazes de estimular a produção de NO comparado ao controle RPMI. Por outro lado, nas células estimuladas com LPS, em 24 horas, as concentrações (1,81; 7,41 e 14,83 mg/mL) de *I. paraguariensis* foram capazes de reduzir a produção de NO comparado ao controle LPS (p<0,05). Entretanto, após 48 horas, somente as concentrações (3,70 e 7,41 mg/mL) inibiram os níveis de NO, enquanto a concentração 1,81 mg/mL estimulou a produção de NO comparado ao LPS (Figura 23).

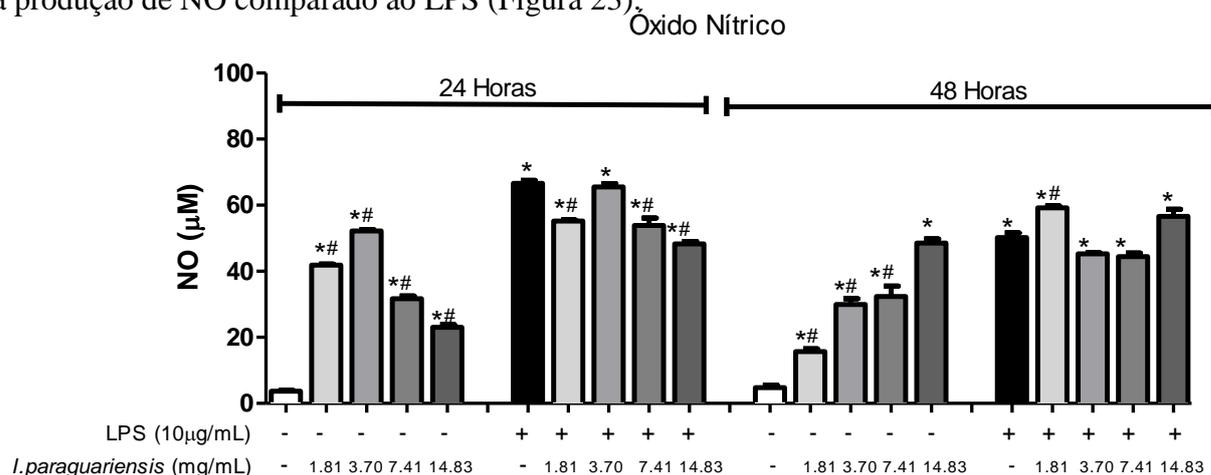


Figura 23: Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais após o tratamento de *I. paraguariensis* (1,81; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL) com ou sem LPS (10µg/mL) incubados por 24 e 48 horas. *p<0,05 comparado ao controle RPMI, #p<0,05 comparado ao controle LPS.

5.1.6 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Esplenócitos murinos foram estimulados ou não com o mitógeno Con A (10 μ g/mL) e tratados ou não com os extratos aquosos de *A. brasiliensis* nas concentrações (2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL) e *I. paraguariensis* (1,85; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL), em seguida incubados por 24 horas ou 48 horas a 37°C e 5% de CO₂.

Todas as concentrações do extrato *A. brasiliensis* em 24 e 48 horas foram capazes de estimular a proliferação de esplenócitos, mesmo sem a presença de ConA, quando comparado ao controle RPMI. No entanto, na presença de ConA, a maior concentração de *A. brasiliensis* (22,50mg/mL) foi capaz de inibir a proliferação dos esplenócitos induzida pelo mitógeno em 24 de incubação. Entretanto, após 48 horas, as concentrações de *A. brasiliensis* não alteraram o efeito proliferativo induzido pelo ConA (Figura 24).

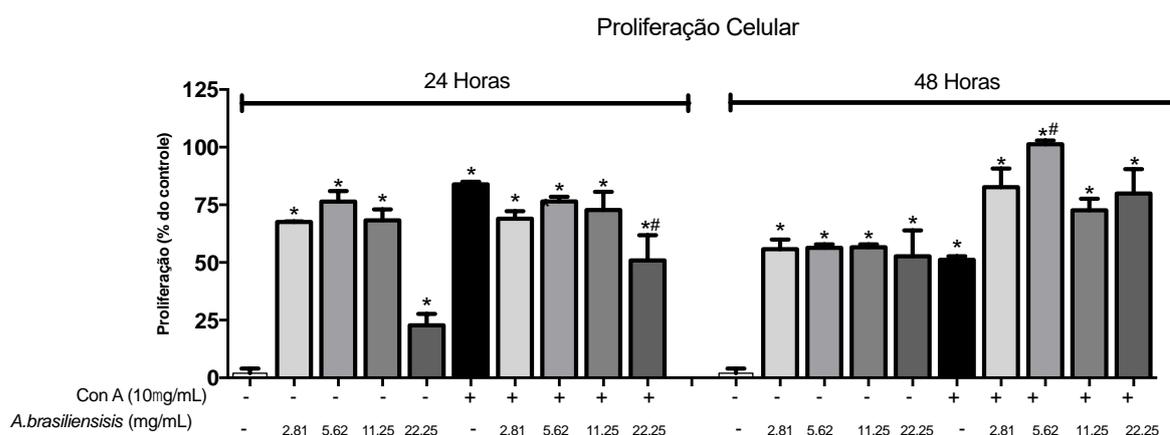


Figura 24: Avaliação da proliferação celular de esplenócitos de camundongos swiss estimulados ou não com ConA (10 μ g/mL) e tratados com extratos aquosos de *A. brasiliensis* nas concentrações de 2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL. * $p < 0,05$ comparado ao controle RPMI, # $p < 0,05$ comparado ao controle Concavalina A.

Em relação ao extrato do *I. paraguariensis*, a maioria das concentrações foram capazes de induzir a proliferação de esplenócitos mesmo sem o ConA, em 24 e 48 horas após incubação comparado ao controle RPMI. Quando incubado com o mitógeno, a maior concentração de *I. paraguariensis* (14.83mg/mL) apresentou efeito antiproliferativo comparado ao grupo ConA em 24 e 48 horas após a incubação (Figura 25)

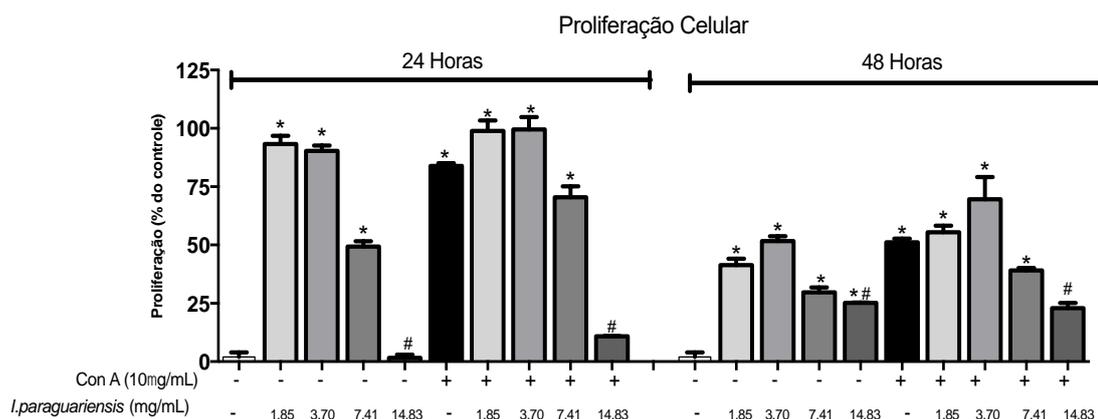


Figura 25: Avaliação da proliferação celular de esplenócitos de camundongos swiss estimulados ou não com ConA (10µg/mL) e tratados com extratos aquosos de *I. paraguariensis* nas concentrações de 1.85; 3.70; 7.41; 14.83 mg/mL. *p<0,05 comparado ao controle RPMI, #p<0,05 comparado ao controle Concavalina A.

5.1.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Foi realizada a avaliação atividade antioxidante total dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* nas concentrações (1,40; 2,81; 5,62; 11,25 e 22,50 mg/mL) e de *I. paraguariensis* (0,92; 1,85; 3,70; 7,41; 14,83 mg/mL), assim como do padrão ácido gálico nas concentrações (0,0062; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1 mg/mL) pelo método da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), em que é definido como a concentração de Trolox e pelo método da determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre (DPPH). Os valores foram expressos em porcentagem na tabela 09, e quanto maior o valor do TEAC e DPPH, mais forte é o potencial antioxidante e de captura de radical livre, respectivamente.

Tabela 09: Avaliação da capacidade antioxidante pelo método do TEAC e DPPH, do controle ácido gálico, dos extratos *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* em diferentes concentrações.

Capacidade Antioxidante*		
Amostra (mg/mL)	TEAC (%)	DPPH (%)
Ácido Gálico		
0,00625	7,64±0,25	13,58±0,76
0,012	17,42±0,36	19,87±1,53
0,025	33,41±2,28	39,13±0,65
0,05	58,26±2,96	62,5±3,40
0,1	98,48±0,49	94,17±0,10
<i>Agaricus brasiliensis</i>		
1,40	91,46±2,19	18,60±3,62
2,81	99,12±0,85	41,06±1,16
5,62	98,74±0,09	59,57±1,68
11,25	99,01±0,46	69,11±1,68
22,50	98,93±1,07	70,85±2,33
<i>Ilex paraguariensis</i>		
0,92	92,53±0,07	9,71±1,94
1,85	92,91±1,08	14,11±0,38
3,70	92,88±0,22	19,70±0,25
7,41	93,65±1,17	27,03±0,77
14,83	94,12±0,97	44,72±4,27

*Valores expressos em média e desvio-padrão em duplicata.

As análises mostram que desde as menores concentrações, os extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* tiveram uma excelente atividade antioxidante pelo ensaio de TEAC, mostrando uma atividade similar a maior concentração do padrão Ácido gálico (0,1 mg/mL). No ensaio de DPPH, o extrato aquoso de *A. brasiliensis* mostrou melhor atividade de captura de radicais livres que o extrato de *I. paraguariensis*. De acordo com a Tabela 09 foi possível perceber que o *A. brasiliensis* desde a concentração de 5,8 mg/mL foi capaz de capturar mais de 40% de moléculas de DPPH, enquanto uma concentração do *I. paraguariensis* (7,41 mg/mL) foi capaz de capturar somente 27% de radicais livres. No entanto, ambos os extratos apresentaram menor eficiência na atividade de captura de radicais livres quando comparado ao ácido gálico que em menor concentração (0,1mg/mL) que os demais compostos, obteve 94% de captura (Figura 26-C)

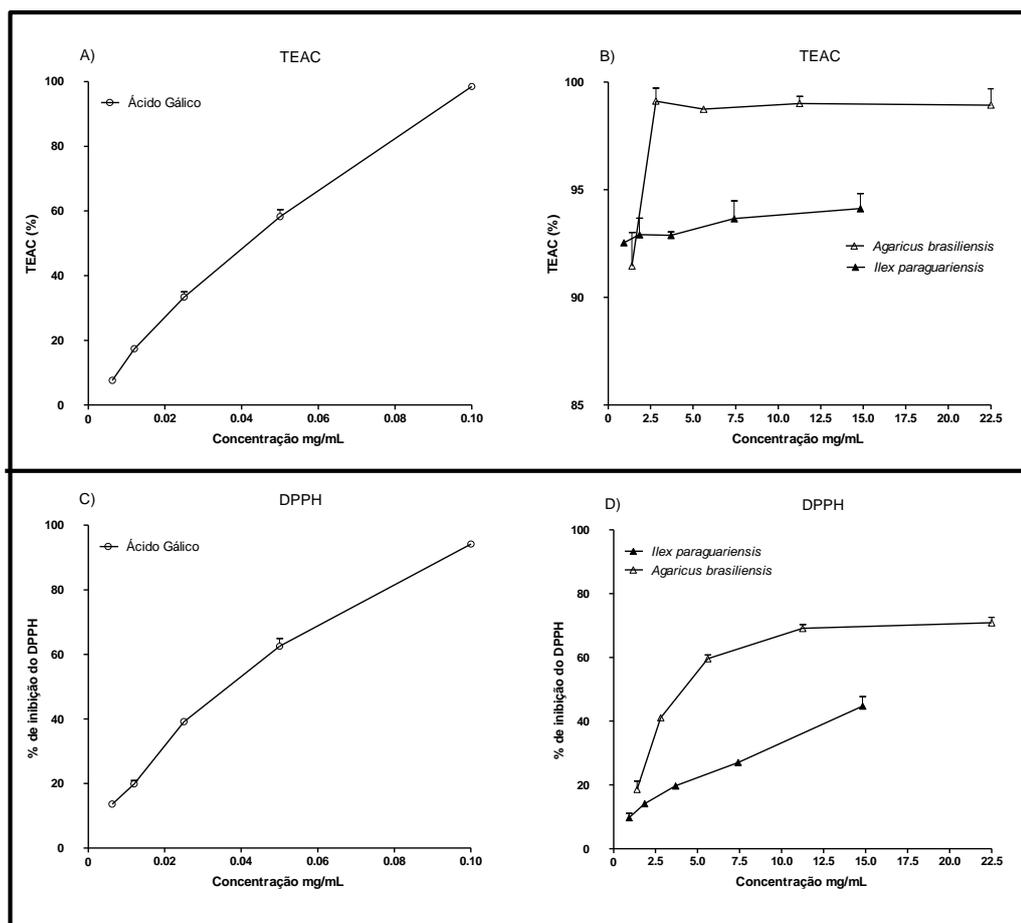


Figura 26: Avaliação da capacidade antioxidante dos diferentes extratos aquosos de *A. brasiliensis*, *I. paraguariensis*, e do padrão ácido gálico. (A e B) Capacidade antioxidante pelo método do TEAC (C e D) Atividade sequestrante de DPPH*.

5.1.8 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Leucócitos provenientes do sangue periférico humano foram estimuladas ou não com o tBHP (40 μ M) e tratadas com extratos aquosos de *A. brasiliensis* nas concentrações (5,62; 11,25 e 22,50 mg/ml) e de *I. paraguariensis* (3,70; 7,41; 14,83 mg/mL), e incubados por 30 minutos a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente com adição de 10 μ M H₂DCFH-DA foi quantificado a liberação de ERO intracelular.

Todas as concentrações do extrato de *A. brasiliensis* e de *I. paraguariensis* foram capazes de inibir a produção basal de ERO, visto que os valores obtidos de ERO foram inferiores ao grupo RPMI (Figura 27-A e 27-B). Similarmente, quando as células foram estimuladas com tBHP e tratadas com os extratos de *A. brasiliensis* (Figura 27-A) e de *I. paraguariensis* (Figura 27-B), ambos os extratos foram capazes de inibir a produção de ERO

induzida pelo tBHP. Entretanto, o extrato de *I. paraguariensis* foi mais eficaz que o *A. brasiliensis*, visto que desde a sua menor concentração (3,70 mg/mL) foi capaz de inibir a produção de ERO com valores menores que o basal (grupo RPMI).

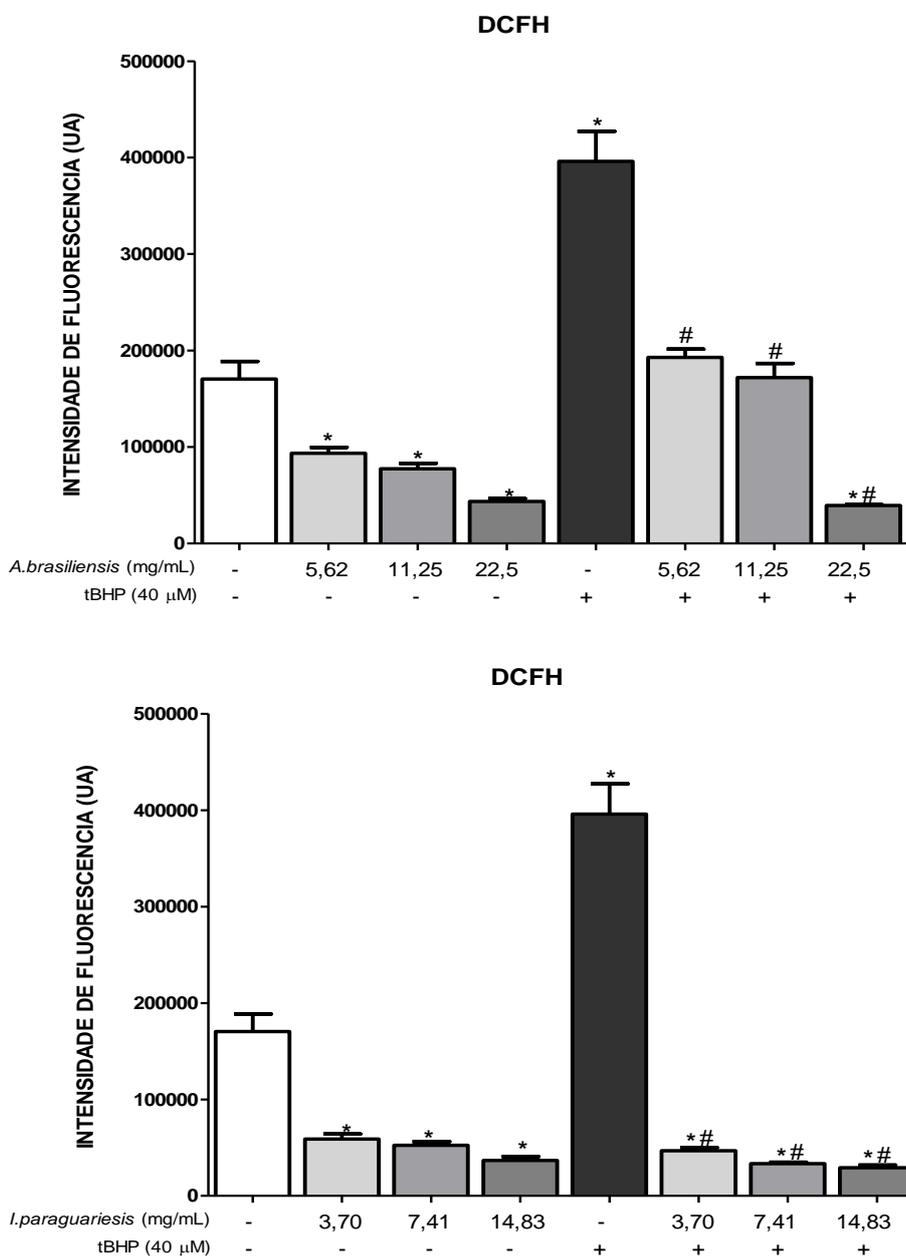


Figura 27: Avaliação da liberação de espécies reativas de oxigênio por polimorfonucleares de sangue periférico tratadas com *A. brasiliensis* e com *I. paraguariensis*, induzidas com ou não tBHP (40μM) por 30 minutos de incubação. (A) Polimorfonucleares tratadas com *A. brasiliensis* e induzidas ou não com tBHP. (B) Polimorfonucleares tratadas com *I. paraguariensis* e induzidas ou não com tBHP. Valores expressos em intensidade de fluorescência (UA). *p<0.05 comparado ao controle RPMI, #p<0.05 comparado ao controle tBHP.

5.2 Testes *in vivo*

5.2.1 SOBREVIDA

Para a taxa de sobrevivência, os animais foram divididos nos seguintes grupos: sham (que foi feita a cirurgia, mas não foi realizado a CLP) e os grupos dos animais submetidos à indução de sepse por CLP que foram tratados com os seguintes compostos: solução salina 0,9%, Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg). Em seguida, os animais foram avaliados por 16 dias até o óbito.

A Figura 28 mostra que todos os animais Sham sobreviveram pelo menos até o 16º dia (100% sobrevivência) e os animais com sepse pré-tratados com salina ou ceftriaxona morreram em até 6 dias após o CLP. Por outro lado, todos os animais com sepse e pré-tratados com *A. brasiliensis* sobreviveram pelos 16 dias (taxa de 100%), enquanto 50% dos animais com sepse pré-tratados com *I. paraguariensis* morreram no 5º dia.

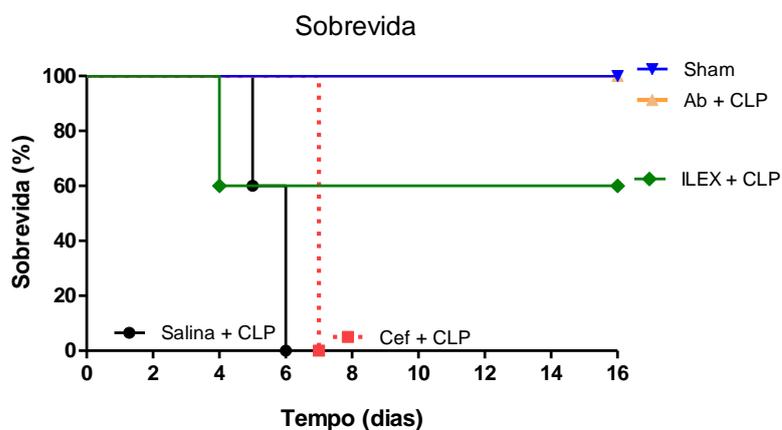


Figura 28: Taxa de sobrevivência dos animais Sham e com sepse por 16 dias. Os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=5 por grupo): 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (salina+CLP), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg).

5.2.2 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Foi avaliado o peso corporal como indicativo de saúde dos animais. Para isso, avaliou-se o peso corporal em grama de acordo com os tempos 0 (T0); 24 (T24); 36 (T36) e 48 horas (T48) nos grupos Sham; e os grupos com sepse (CLP) pré-tratados com solução salina 0,9%, Ceftriaxona (20 mg/kg), com extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou com extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg).

O grupo sham teve um aumento do peso corporal de aproximadamente 21,5% do T0 a T48, diferente de todos os grupos submetidos ao CLP e pré-tratados que tiveram redução de peso a partir de 24 horas (grupo salina = redução de 16,6% no T36 e 41,10% no T48; grupo Cef= redução de 6% (T36) e 24%(T48); grupo *A. brasiliensis* = ganho de 9,10% no (T24), manteve o peso no T36 e redução de 3,10% (T48); grupo *I. paraguariensis*= ganho de 4,45% no T24, manteve no T36, e perda de 15% em (T48) (Figura 29).

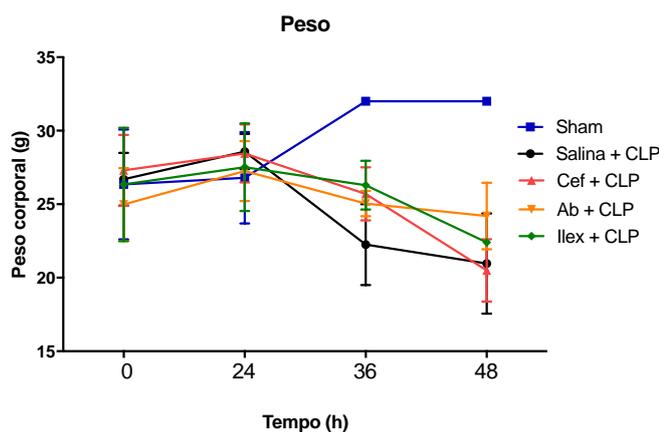


Figura 29: Peso corporal dos animais Sham e com sepse no decorrer do tempo. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (salina+CLP), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg). Resultados expressos como a média \pm d.p.

5.2.3 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

5.2.3.1 Lavado peritoneal

Em relação ao influxo de leucócitos para o peritônio, avaliou-se o número de neutrófilos e mononucleares nos tempos de 12 e 24 horas após a indução de sepse nos animais dos grupos:

Sham; sepse (CLP) pré-tratados com solução salina 0,9%, ceftriaxona (20 mg/kg), *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou com extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg).

Em relação aos neutrófilos, os animais com sepse tratados com salina apresentaram aumento significativo de neutrófilos desde a 12^a hora, com pico de migração em 24 horas. Os animais com sepse tratados com ceftriaxona ou *I. paraguariensis* tiveram um aumento acentuado de neutrófilos em 12 horas comparado ao grupo Sham e CLP+salina. No entanto, em 24 horas, os animais com sepse tratados com ceftriaxona apresentaram diminuição abrupta destas células na cavidade peritoneal, retornando aos níveis basais, enquanto, os animais com sepse tratados com *I. paraguariensis* mantiveram os mesmos níveis de neutrófilos neste tecido. Por outro lado, o tratamento com *A. brasiliensis* inibiu o influxo de neutrófilos induzido pelo processo de sepse nos tempos de 12 e 24 horas comparado aos animais com sepse tratados com salina (Figura 30-A e 30-B).

Em relação aos mononucleares, de maneira geral, todos os animais com sepse apresentaram o influxo destas células em 12 horas, com aumento acentuado em 24 horas. Dentre os tratamentos, o *I. paraguariensis* foi capaz de potencializar a migração de mononucleares em 24 horas, enquanto os tratamentos com Ceftriaxona ou *A. brasiliensis* inibiram significativamente o influxo destas células em 24 horas comparado aos animais com sepse tratados com salina (Figura 30-C e 30-D).

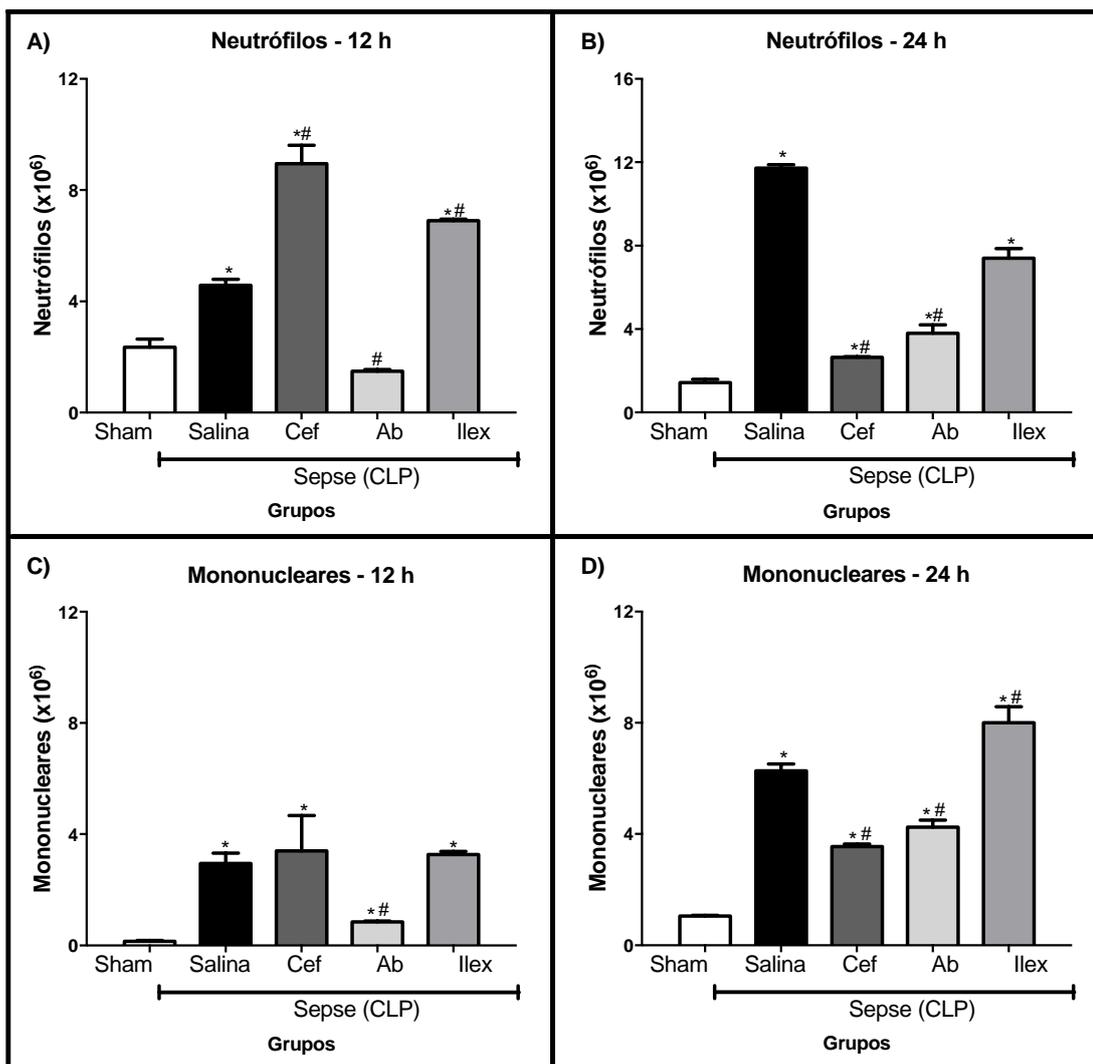


Figura 30: Migra33o leucocit3ria no lavado peritoneal nos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pr3-tratados com: solu33o salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg). Neutr3filos (A) 12 horas ap3s a CLP (B) 24 horas ap3s a CLP; Mononucleares (C) 12 horas da CLP; (D) 24 horas da CLP. * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina. ANOVA de medidas repetidas.

5.2.4 HEMOGRAMA

Na avaliação dos parâmetros hematológicos (Tabela 10), os animais com sepse pré-tratados com salina tiveram valores normais para o eritrograma, mas apresentaram uma leve linfocitopenia e neutrofilia e aumento de plaquetas. Enquanto que os animais pré-tratados com o antibiótico ceftriaxona apresentaram linfocitose, e o tratamento com *I. paraguariensis* apresentou linfocitopenia e elevada neutrofilia, hematócrito abaixo do valor de referência e plaquetopenia. O tratamento com *A. brasiliensis* não alterou os parâmetros hematológicos em relação ao grupo Sham.

Tabela 10: Parâmetros hematológicos dos grupos sham, dos animais com sepse pré-tratados com salina, Ceftriaxona (20 mg/kg), *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg) após 24 horas de sepse induzida

HEMOGRAMA					
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	Sham	Salina + CLP	Cef + CLP	<i>A. brasiliensis</i> + CLP	<i>I. paraguariensis</i> + CLP
Hemácias (x10⁶/mL)	5,04	6,10	5,10	6,19	4,61
Hemoglobina (milhão/m³)	8,9	10,8	8,9	11	7,9
Hematócrito (%)	33	41	27	41	25*
VCM (micra)	65,1	67,2	53,1	65,8	53,6
HCM (mcg)	17,7	17,7	17,5	17,8	17,1
CHCM (g%)	27,1	26,3	33,0	26,8	31,6
Leucócitos (/mm³)	2.000	2.200	3.300	2.200	2.500
Eosinófilos (%)	0	1	1	1	2
Basófilos (%)	0±0	0	0	0	0
Linfócitos (%)	71 (1420)	57* (1254)	69* (2277)	66 (1452)	28* (700)
Monócitos (%)	2	7	2	2	3
Segmentados (%)	27 (540)	35 (770)	28 (924)	31 (682)	67* (1675)
Plaquetas (/mm³)	522.000	782.000*	621.000	664.000	336.000*

Legenda: CEF: ceftriaxona, CLP: cecal-ligation perforation

CHCM= Concentração de hemoglobina corpuscular média; HCM: Hemoglobina corpuscular média; VCM: Volume corpuscular média.

5.2.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA BACTERIANA EM TECIDOS

Para a carga bacteriana foi quantificado o número de UFC presentes no sangue, lavado peritoneal e nos órgãos (baço, coração, fígado e pulmão) nos tempos de 12 e 24 horas após a indução de sepse nos animais dos grupos: Sham; e com sepse (CLP) pré-tratados com solução salina 0,9%, ceftriaxona (20 mg/kg), com extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou com extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg).

Os animais com sepse pré-tratados com salina apresentaram elevada carga bacteriana em todos os tecidos coletados nos tempos de 12 para 24 horas após a sepse. Todos os animais com sepse que receberam tratamento com ceftriaxona, *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* tiveram redução significativa na carga bacteriana em todos os tecidos coletados, sendo que o grupo ceftriaxona apresentou bactéria no baço e soro. O grupo *A. brasiliensis* apresentou bactéria no coração, peritônio e soro nas primeiras 12 horas, que diminuiu após 24 horas, pois somente foram detectadas bactérias no coração e baço. Os animais com sepse tratados com *I. paraguariensis* apresentaram carga bacteriana no lavado peritoneal com 12 horas, no entanto com 24 horas, a carga bacteriana foi detectada na maioria dos tecidos avaliados (Tabela 11 e 12).

Tabela 11: Carga Bacteriana nos animais Sham e com sepse pré-tratados com salina, Ceftriaxona, *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* após 12 horas de indução de sepse.

GRUPOS	UFC/mL ⁻¹ (x10 ³)					
	Órgãos					Sangue
	Baço	Coração	Fígado	Pulmão	Lav. Peritoneal	
SHAM	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Salina + CLP	2,5±0,70	0,5±0,70	3±1,41	19,5±2,12	11,5±0,70	4,5±0,70
Cef + CLP	0,5±0,70	ND	ND	ND	ND	ND
<i>A. brasiliensis</i> + CLP	ND	2,5±0,70	ND	ND	6,5±0,70	10±1,41
<i>I. paraguariensis</i> + CLP	ND	ND	ND	ND	29,5±0,70	ND

ND: não detectado

Tabela 12: Carga Bacteriana nos animais Sham e com sepse pré-tratados com salina, Ceftriaxona, *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* após 24 horas de sepse induzida.

GRUPOS	UFC/mL ⁻¹ (x10 ³)					
	Órgãos					Sangue
	Baço	Coração	Fígado	Pulmão	Lav. Peritoneal	
SHAM	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Salina + CLP	4,5±0,70	3,5±0,70	2±1,41	3±1,41	4±4,24	3,5±2,12
Cef + CLP	1,5±0,70	ND	ND	ND	ND	1±1,41
<i>A. brasiliensis</i> + CLP	1,5±0,70	1,5±0,70	ND	ND	ND	ND
<i>I. paraguariensis</i> + CLP	3,5±0,70	3±1,41	ND	ND	0,5±0,70	2±1,41

ND: não detectado

5.2.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO

5.2.6.1 Produção de óxido nítrico no soro e lavado peritoneal

Os animais com sepse tratados com salina apresentam aumento significativo na produção de NO no soro e lavado peritoneal, principalmente 12 horas após a indução de sepse, mantendo-se até 24 horas no soro comparado aos animais controle (Figura 33-A e 33-B). Os tratamentos com Ceftriaxona e *A. brasiliensis* foram capazes de inibir a produção de NO no soro desde 12 horas, permanecendo até 24 horas (Figura 31-A e 31-B), enquanto no lavado peritoneal, o *A. brasiliensis* induziu um aumento significativo de NO comparado aos controles sham e tratados com salina a partir de 12 horas da sepse (Figura 31-C e 31-D). Por outro lado, o tratamento com *I. paraguariensis* em 24 horas aumentou a produção de NO no soro, comparado aos animais com sepse tratados com salina (Figura 31-A e 31-B).

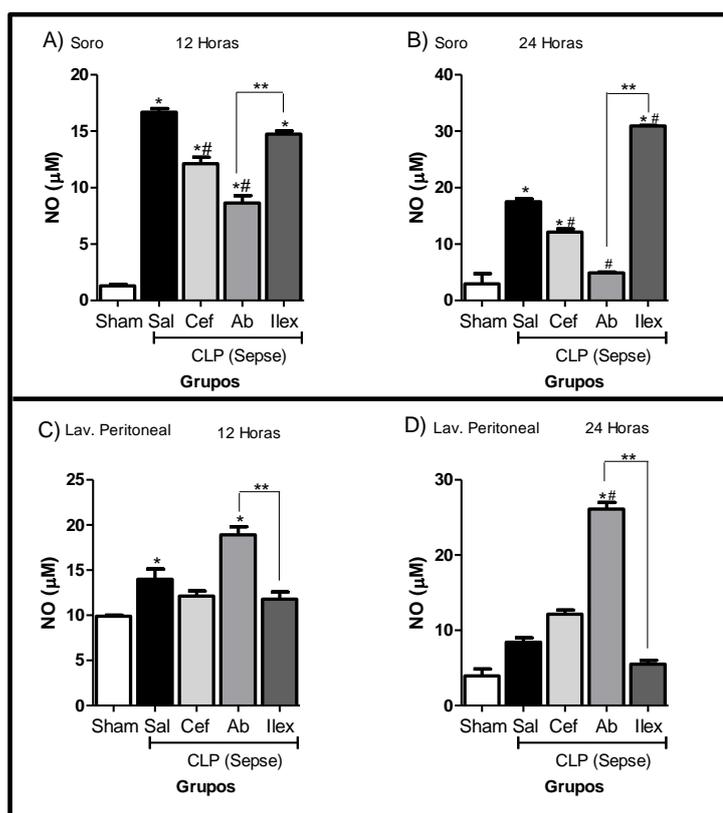


Figura 31: Produção de óxido nítrico nos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg). Produção de NO no soro (A) 12 horas após a CLP (B) 24 horas após a CLP; Produção de NO no lavado peritoneal (C) 12 horas da CLP; (D) 24 horas da CLP. * $p < 0.05$ comparado ao grupo sham # $p < 0.05$ comparado ao grupo CLP+salina.

5.2.6.2 Produção de óxido nítrico nos tecidos

Os animais com sepse tratados com salina apresentaram aumento significativo em todas as amostras nos dois tempos avaliados comparados ao grupo Sham (Figura 32-A e 32-B). Dentre os grupos, os tratamentos com *I. paraguariensis* e *A. brasiliensis* foram os que levaram a maior redução na produção de NO nos órgãos como baço, fígado e pulmão a partir de 12 horas, permanecendo até 24 horas, comparado aos animais com sepse tratados com salina (Figura 32-A).

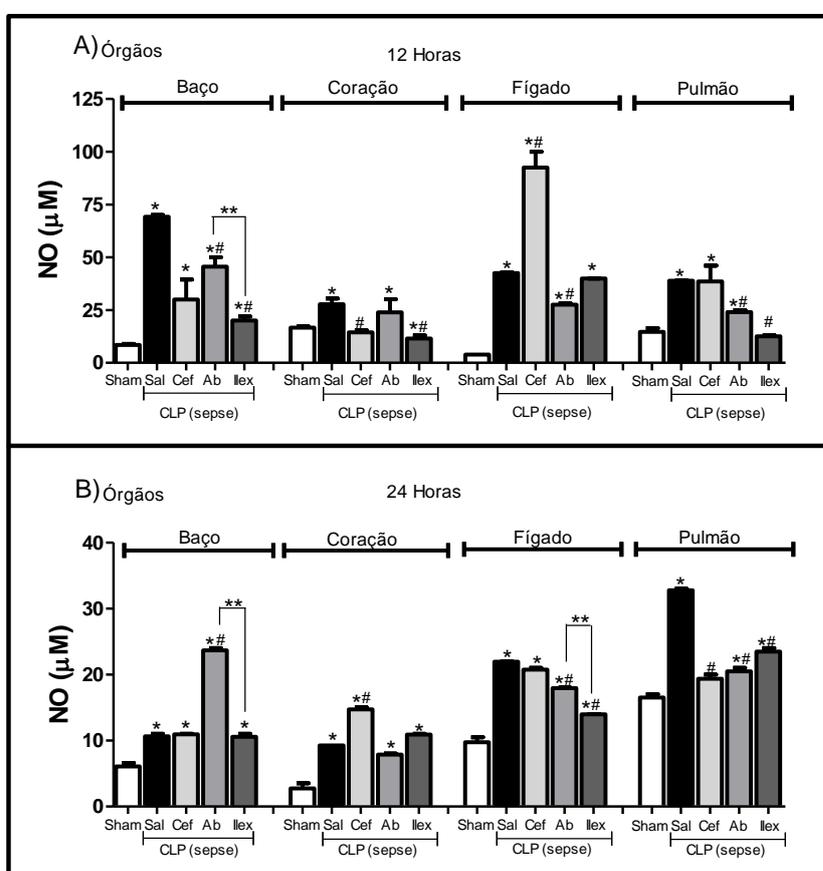


Figura 32: Produção de óxido nítrico nos tecidos de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg). Produção de NO nos órgãos (A) 12 horas após a CLP (B) 24 horas após a CLP; * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina.

5.2.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONALDEÍDO (MDA)

5.2.7.1 Produção de MDA no soro e lavado peritoneal

Os animais com sepse tratados com salina apresentaram aumento de MDA no soro e lavado peritoneal em todos os tempos avaliados. Todos os tratamentos (*A. brasiliensis*, *I. paraguariensis* ou Ceftriaxona) levaram a diminuição nos níveis de MDA no soro e lavado peritoneal, a partir de 12 horas após CLP, permanecendo pelo menos até 24 horas, comparados com o grupo com sepse tratados com salina (Figura 33-A).

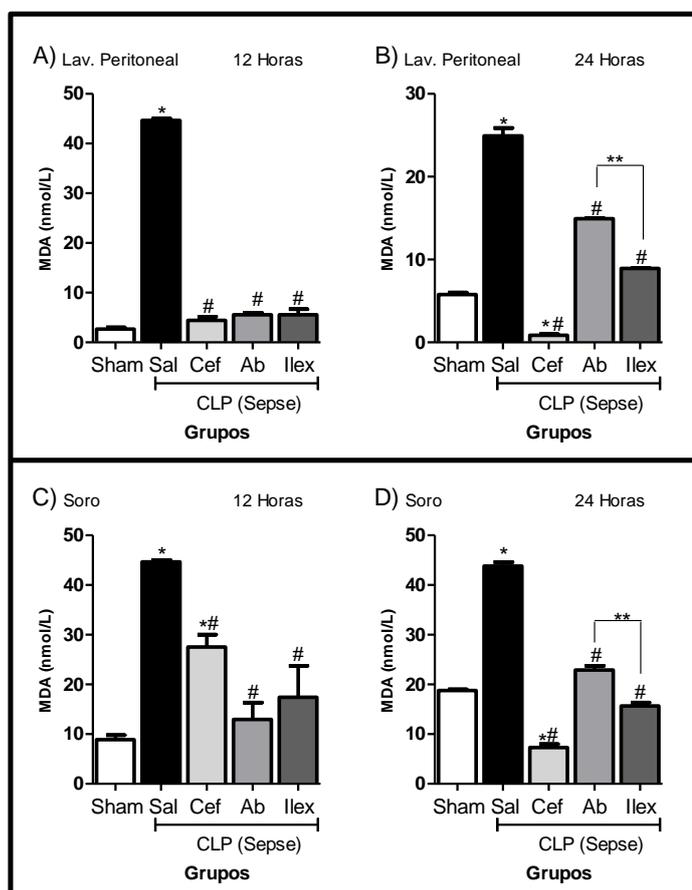


Figura 33: Produção de MDA no soro e peritônio de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg). Produção de MDA no lavado peritoneal (A) 12 horas após a CLP (B) 24 horas após a CLP; Produção de MDA no soro (C) 12 horas da CLP; (D) 24 horas da CLP *p<0,05 comparado ao grupo sham #p<0,05 comparado ao grupo CLP+salina.

5.2.7.2 Produção de MDA nos tecidos

Os animais com sepse tratados com salina apresentaram aumento nos níveis de MDA em todos os órgãos avaliados com 12 e 24 horas após CLP (Figura 34-A e 34-B). Todos os tratamentos (*A. brasiliensis*, *I. paraguariensis* ou Ceftriaxona) foram capazes de reduzir significativamente os níveis de MDA no coração, fígado e pulmão principalmente no tempo de 12 horas após CLP, comparado aos animais com sepse tratados com salina (Figura 34-A).

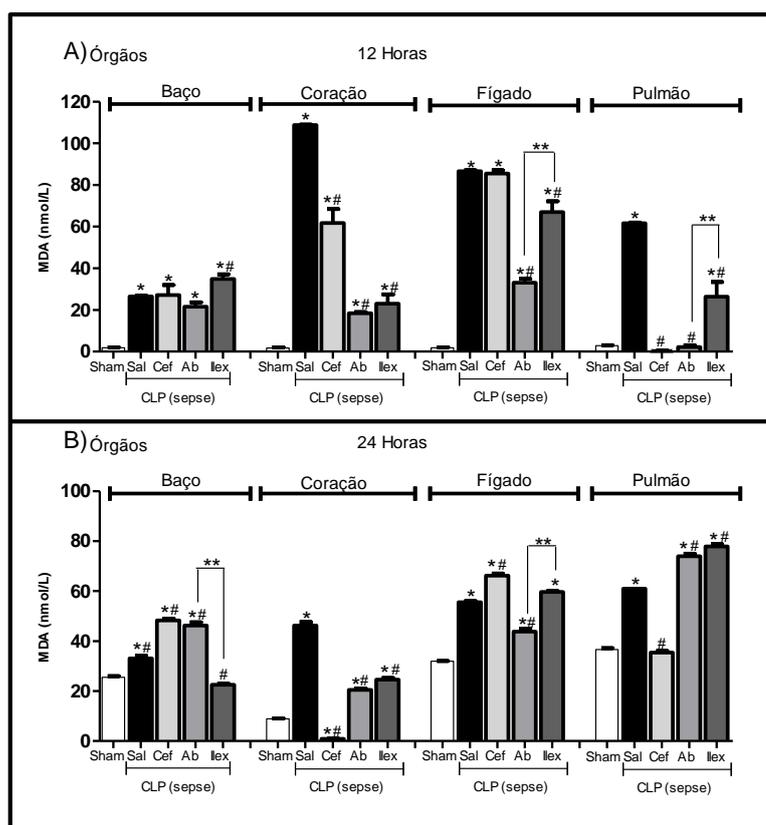


Figura 34: Produção de MDA nos órgãos dos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg). Produção de MDA nos tecidos (A) 12 horas após a CLP (B) 24 horas após a CLP; * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina.

5.2.8 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO DE TEAC

5.2.8.1 Capacidade antioxidante total no soro e lavado peritoneal

Os animais com sepse tratados com salina apresentaram redução na capacidade antioxidante total (TEAC) no lavado peritoneal nos tempos avaliados, mas o mesmo não foi observado soro. Todos os tratamentos foram capazes de elevar os níveis de antioxidantes no tempo de 12 horas após CLP no lavado peritoneal comparado aos animais com sepse tratados com salina, no entanto somente o tratamento com *A. brasiliensis* manteve os níveis aumentados até 24 horas. No soro, não teve alteração significativa entre os grupos com 12 horas e com 24 horas os níveis do sham do *A. brasiliensis* e caíram, enquanto o grupo salina e ceftriaxona permaneceram elevados. O grupo *I. Paraguariensis* também apresentou baixa capacidade antioxidante comparado ao grupo salina com 24 horas após a CLP (Figura 35).

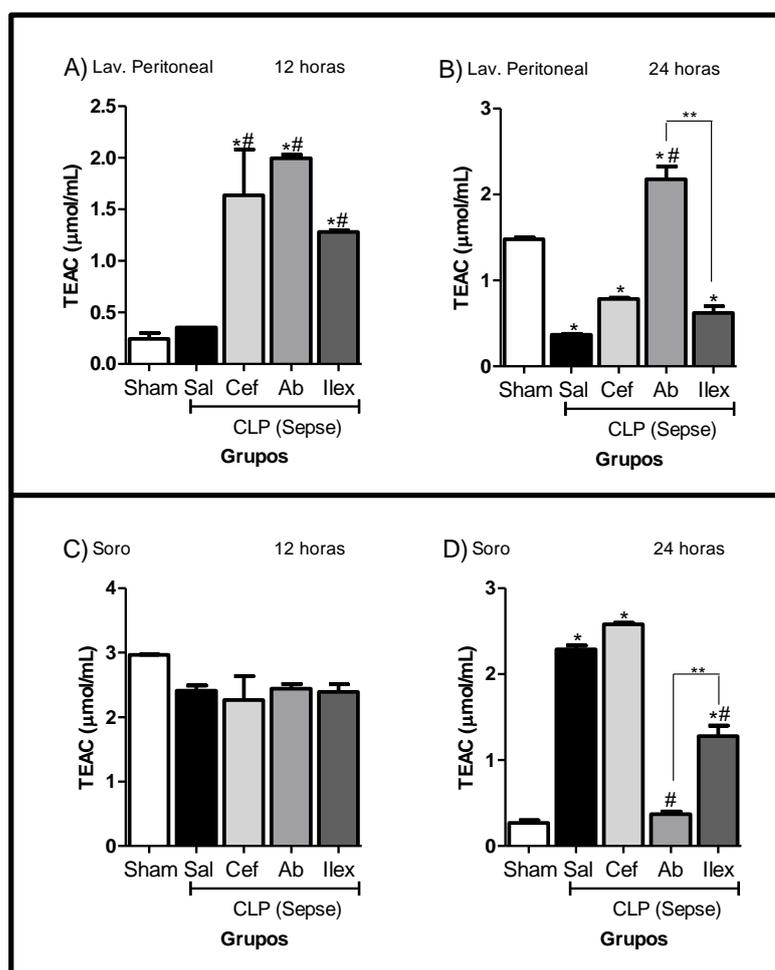


Figura 35: Capacidade antioxidante total nos sangue e peritônio de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg). Níveis de antioxidantes no lavado peritoneal (A) 12 horas após a CLP (B) 24 horas após a CLP; Níveis de antioxidantes no soro (C) 12 horas da CLP; (D) 24 horas da CLP * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina.

5.2.8.2 Capacidade antioxidante total nos órgãos

Os animais com sepse e tratados com salina apresentaram níveis reduzidos de antioxidantes no coração e fígado, no tempo de 12 horas e baço e pulmão em 24 horas. Os tratamentos, principalmente com *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* foram capazes de aumentar os níveis de antioxidantes na maioria dos órgãos (baço, fígado e pulmão), principalmente no tempo de 24 horas comparado ao grupo CLP+salina (Figura 36-B)

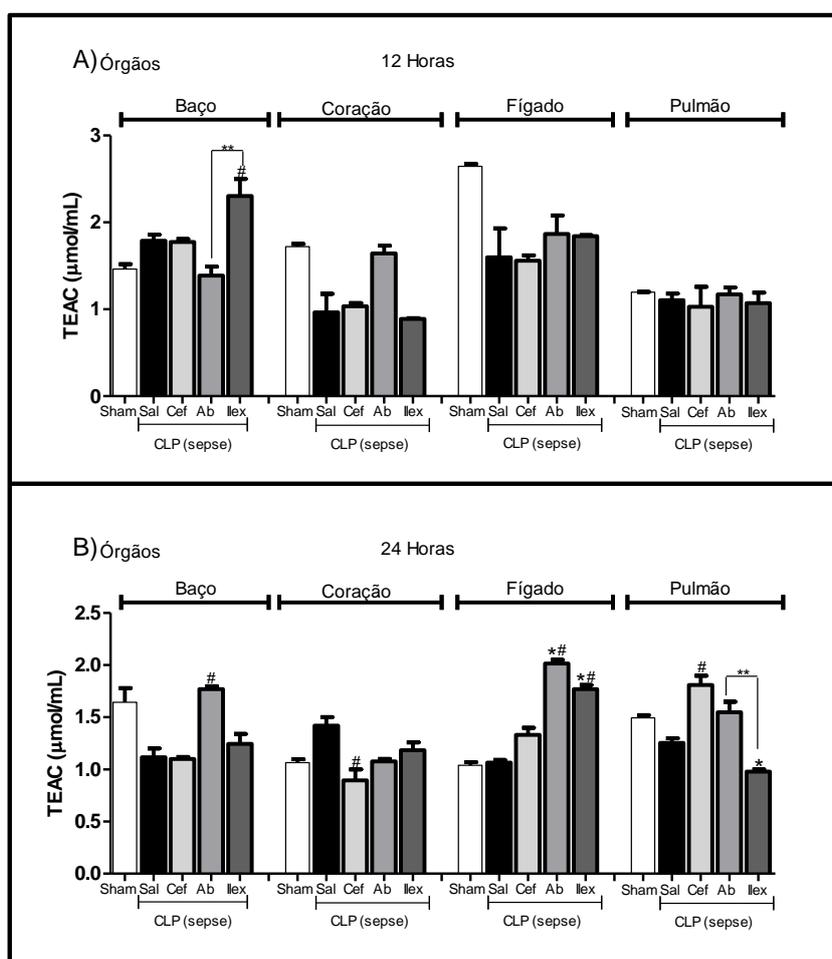


Figura 36: Capacidade antioxidante total nos órgãos de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), extrato de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) ou extrato de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg). Níveis de antioxidantes nos órgãos (A) 12 horas após a CLP (B) 24 horas após a CLP; * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina.

5.2.9 CAPACIDADE FAGOCÍTICA DOS LEUCÓCITOS PERITONEAIS

Os leucócitos dos animais com sepse tratados com salina e Ceftriaxona apresentaram atividade fagocítica similar ao grupo sham. Entretanto, os tratamentos com *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* foram capazes de estimular a capacidade fagocítica comparado aos animais com sepse tratados com salina. Além disso, o tratamento com *I. paraguariensis* foi bem mais eficiente em estimular a fagocitose do que o *A. brasiliensis* (Figura 37).

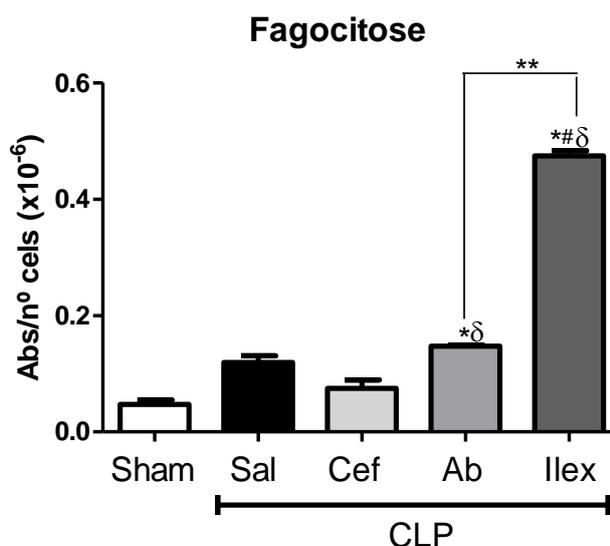


Figura 37: Capacidade Fagocítica *ex vivo*. Leucócitos provenientes dos animais sham, e dos animais com sepse pré-tratados com Ceftriaxona (20 mg/kg), com extrato aquoso de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) e com extrato aquoso de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg) foram removidos após 24 horas da CLP e incubados com partículas de Zymosan (5×10^6) e atividade fagocítica foi avaliada em espectrofotômetro. *p<0,05 comparado ao controle Sham, #p<0,05 comparado ao grupo CLP+salina e δp<0.05 comparado ao grupo ceftriaxona.

5.2.10 LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Os leucócitos peritoneais de animais com sepse tratados com sepse produziram altos níveis de ERO mesmo sem a estimulação com tBHP comparado aos animais Sham. Todos os tratamentos (*A. brasiliensis*, *I. paraguariensis* ou Ceftriaxona) foram capazes de manter a produção de ERO similar aos animais Sham como mostrado na figura 38-A. Quando as células foram estimuladas com o agente oxidante tBHP, os leucócitos de animais com sepse tratados com salina produziram altos níveis de ERO similar ao grupo sham, e todos os tratamentos, e

principalmente o *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*, inibiram a produção de ERO induzida pelo tBHP (Figura 38-B).

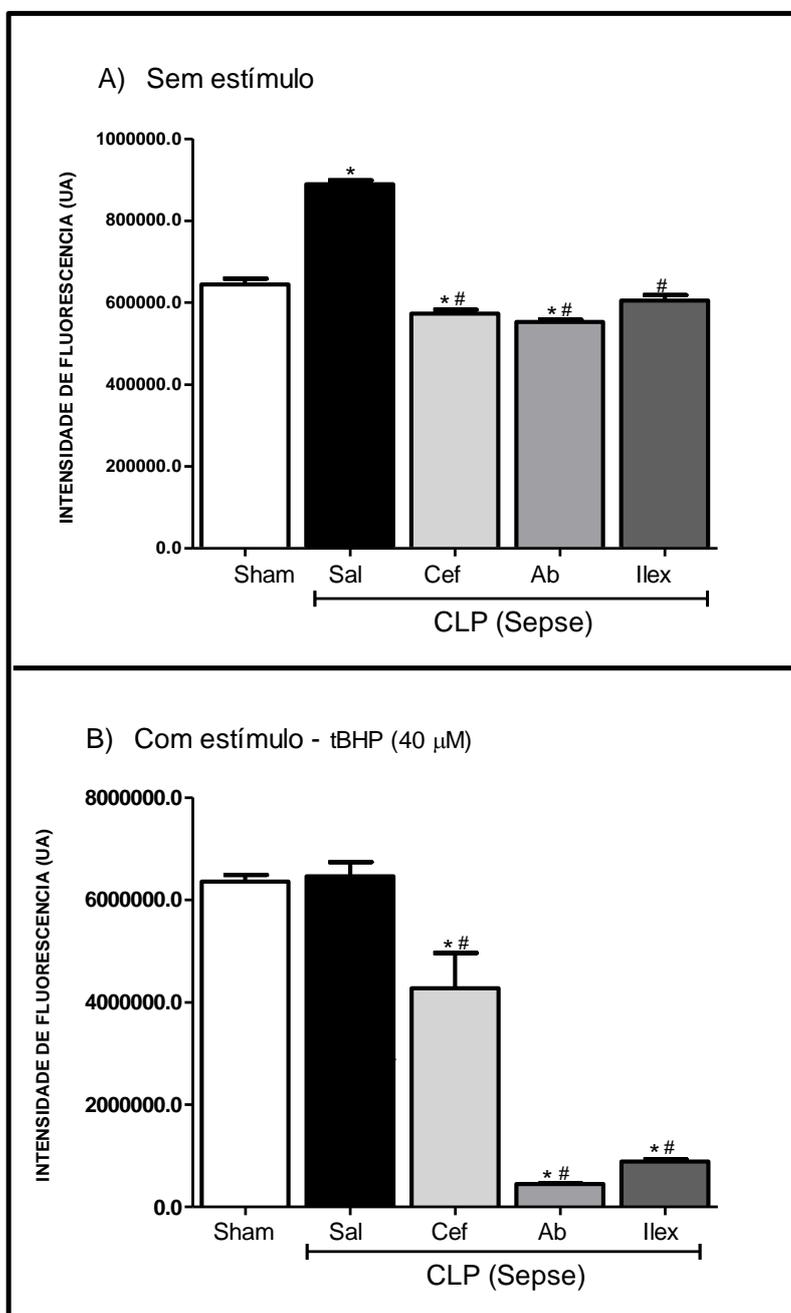


Figura 38: Liberação de ERO dos leucócitos peritoneais dos animais com sepse. Leucócitos provenientes dos animais Sham, e dos animais com sepse pré-tratados com Ceftriaxona (20 mg/kg), com extrato aquoso de *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) e com extrato aquoso de *I. paraguariensis* (22,2 mg/Kg) foram removidos após 24 horas da CLP e incubados ou não com tBHP e produção de ERO foi avaliada por fluorescência. * $p < 0,05$ comparado ao controle Sham, # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina.

6 DISCUSSÃO

Um estudo publicado pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) em 2014, 59,5% dos pacientes internados (que constam no banco de dados Nacional- cerca de 112 hospitais públicos e privados) apresentam sepse grave, no período de 2005 a 2014, com a taxa de mortalidade de 31,6% (ILAS, 2014). Evidenciando a importância da busca de novos fármacos a partir de produtos naturais, como plantas e cogumelos medicinais, que visem a reverter essa situação que a cada ano agrava.

Em nosso trabalho o método de extração foi a infusão, a qual é amplamente utilizada, além de ser a forma na qual se mais consome mundialmente os produtos naturais (BRAIBANTE et al. 2014). Foi avaliada a atividade antimicrobiana, antioxidante e imunomoduladora do cogumelo *A. brasiliensis*, popularmente conhecido como cogumelo do sol, e do extrato de *I. paraguariensis* conhecido como erva-mate.

No presente estudo, o cogumelo *A. brasiliensis in vitro* não apresentou atividade antimicrobiana e nem efeito citotóxico, reduziu a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais, reduziu a produção de NO e mostrou ser antiproliferativo, além disso, teve uma excelente atividade antioxidante. *In vivo*, o cogumelo foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais sépticos, diminuiu o influxo de leucócitos para o sítio inflamatório, foi capaz de reverter as alterações hematológicas, apresentou atividade antimicrobiana, reduziu os níveis de NO, MDA, além de aumentar a capacidade antioxidantes nestes animais e reduzir a produção de ERO.

O *I. paraguariensis in vitro* apresentou atividade antimicrobiana frente à gram-negativa e gram-positiva e frente à leucócitos peritoneais teve efeito citotóxico, também aumentou a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais, aumentou os níveis de NO e reduziu na presença de LPS, teve efeito proliferativo em esplenócitos, e atividade antioxidante. *In vivo*, o extrato aumentou a sobrevivência dos animais sépticos, aumentou o influxo de mononucleares, potencializou as alterações hematológicas dos animais, reduziu a carga bacteriana, diminuiu a produção de NO e MDA, aumentou a capacidade antioxidante e reduziu a produção de ERO.

Segundo a literatura o *A. brasiliensis* é rico em proteínas, carboidratos e minerais além de polissacarídeo que possuem diversas propriedades medicinais como imunomoduladora (NAVEGANTES et al. 2013) especialmente em β -glucana (HARDY, 2008). Este polímero, mostrou ser capaz de ativar os leucócitos e outras células do sistema imunológico, além de induzir a produção de mediadores pró-inflamatórios (CHANPUT et al. 2012), capacidade antitumoral (REN, PERERA e HEMAR, 2012), antioxidante (TOKLU et al. 2006; MOURÃO

et al. 2011), anti-inflamatória (DORE et al. 2007). Estudos mostram que cogumelos como *Agaricus biosporus*, *Lactarius rufus* (RUTHES et al. 2012) e o *Agaricus blazei* Murril (BERNARDSHAW, 2006) elevaram a sobrevida de animais sépticos.

Autores relatam que o *I. paraguariensis* tem em sua composição polifenóis, xantinas e derivados do cafeoil, além de vitaminas (KASPARY e VALDUGA, 2008; BOJIC et al. 2013). Apresenta propriedades antioxidantes, vasodilatadora, efeitos antimutagênicos (BRACESCO et al. 2011), anti-inflamatória (SCHUBERT et al. 2007). Com isso, assim como os cogumelos, também existem estudos na literatura comprovando o efeito de outras plantas medicinais no tratamento da sepse, tais como *Camelia sinensis* (SCOPARO et al. 2012), *Eugenia uniflora* (RATTMANN et al. 2012) e *Corudalis bugeana* Turcz (HE et al. 2014).

Inicialmente, avaliou-se a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* e de *I. paraguariensis* frente às bactérias *S.aureus* e *E.coli*, que são importantes agentes etiológicos causadores de infecções de tecido profundo, bacteremias e sepse, que apresentam elevada resistência aos antimicrobianos disponíveis (POWERS e WARDENBURG, 2014). Os dados mostraram que o extrato aquoso de *A. brasiliensis* apresentou fraca atividade antimicrobiana *in vitro* frente às bactérias testadas, sendo que as concentrações capazes de inibir 50% (IC50) das cargas bacterianas foram de 32,20mg/mL para *S.aureus* e 121,85mg/mL para *E.coli*. Nesse sentido, LUND et al. (2009) também avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos etanólicos de *A. brasiliensis* (100% de EtOH, EtOH a 75%, e 50% de EtOH, v / v) frente à *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Neste estudo o extrato etanólico 100% apresentou inibição do crescimento bacteriano, com CIM e CBM entre 87,4 e 444,5mg/mL.

Stojkovic et al. (2014) avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos etanólico e metanólico de *A. brasiliensis* frente à *S.aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *E.coli* e *Enterobacter cloacae*. Todos os extratos apresentaram baixa atividade antimicrobiana, sendo que o extrato etanólico mostrou ser mais eficaz do que o metanólico. Essa diferença de atividade é explicada por Mazzutti et al. (2012), em que diferentes técnicas de extração e solventes aplicados à *A. brasiliensis* leva à diferentes atividades frentes à diversos tipos de bactérias.

Em relação ao extrato aquoso de *I. paraguariensis*, nossos dados mostraram que esta planta possui propriedades antimicrobianas frente às bactérias gram-positiva (*S. aureus*) e gram-negativa (*E. coli*), com valores de CIM de 1,85 e 3,70 mg/mL, respectivamente. Além disso, este extrato apresentou ação bactericida, visto que a razão entre o CIM e CBM foi inferior

à quatro para ambas as bactérias, seguindo os critérios de Tetz e Tetz (2015). Estes dados já vêm sendo mostrado nos últimos anos, em que diversos estudos relataram o potencial antimicrobiano do extrato de *Ilex paraguariensis* frente às bactérias gram-positivas, negativas e a fungos (BIASI et al. 2009). Nesse sentido, Martin et al. (2013) mostraram que tanto o extrato metanólico como o etanólico de erva-mate apresentou atividade antimicrobiana frente à *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* e à *E. coli*, em diferentes concentrações de 0,78 a 25mg/mL. Outro estudo realizado por BIAISI et al. (2009), em que foi testado o extrato de folhas e ramos de *I. paraguariensis* nas concentrações de 50 e 100mg/mL frente à diferentes bactérias (*E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S.aureus*, *Staphylococcus epidermidis*). Os dados mostraram que o extrato apresentou atividade antimicrobiana na menor concentração, principalmente contra *P.mirabilis*, *S. aureus*, *S.epidermidis* e *C. albicans*. Diferentemente de Burris et al. (2011), em que o extrato aquoso de erva-mate, obtido de diversos lugares, teve atividade antimicrobiana frente à *E.coli* e *S.aureus*.

A atividade antimicrobiana de *I. paraguariensis* tem sido atribuída à diversos fatores. Kubo et al. (1993) mostraram que extratos de erva-mate apresentaram efeito antimicrobiano frente à *Streptococcus mutans* e dez compostos foram identificados com potencial antimicrobiano: linalol, alfa-ionona, beta-ionona, alfa-terpineol, ácido octanoico, geraniol, 1-octanol, nerolidol, geranilactenona e eugenol. Além disso, estes extratos mostraram ser rico em compostos fenólicos, que são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana (MARTIN et al. 2013). Um estudo realizado por Martin (2013), mostrou a relação do pH com a atividade antimicrobiana, no qual o extrato inibiu o crescimento de *S. aureus* no pH 7 e 8, no entanto no pH 6 não foi mais capaz de inibir o crescimento bacteriano, o mesmo aconteceu quando foi testado frente à *L.monocytogenes* e *S.Enteritidis*. Fonseca et al. (2000) também mostraram que o extrato de *I. paraguariensis* possui efeito genotóxico e mutagênico, com indução lisogênica em bactérias com pontos de mutação, o que levaria à morte bacteriana.

Posteriormente, avaliou-se o efeito das diferentes concentrações dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* em macrófagos peritoneais murinos. Na citotoxicidade, o extrato de *A. brasiliensis* manteve as células viáveis em todas as concentrações testadas, com uma concentração citotóxica 50% de 581,12 mg/mL. Estes dados foram semelhantes ao estudo de De Kuo et al. (2002), que mostraram que células polimorfonucleares do sangue periférico humano incubadas com frações de *A. brasiliensis* em diferentes concentrações por quatro dias, manteve as células viáveis.

Outros estudos avaliaram a toxicidade deste cogumelo, Chang et al. (2012), administrou doses de 0,1 e 10,5 mg/rato diariamente por 28 dias, e observaram que não houve alteração

histológica e macroscópica significativa nos órgãos avaliados. Frente às células tumorais mesmo em baixas concentrações, como a 0,33mg/mL apresentando atividade citotóxica (ORSINE et al. 2013). Esta atividade foi atribuída ao polissacarídeo β -glucana, presente em grande quantidade em *A. brasiliensis*. (PARK et al. 2003). Além disso, Kobayashi et al. (2005) mostraram que a β -glucana induz a fosforilação de p38MAPK em células de câncer ovariano, e administração de um inibidor da p38MAPK antes do tratamento com o polissacarídeo inibiu este efeito citotóxico. Com isso, estes autores sugeriram que *A. brasiliensis* pode interagir com o p38 MAPK e p53, levando à parada do ciclo G2/M, consequentemente a morte celular. Outro mecanismo proposto, para a apoptose induzida pelo extrato, é a de que o *A. brasiliensis* pode atuar por um mecanismo mitocondrial, mediado por ERO, aumentando a atividade de caspases (KIM et al. 2011).

Quando testado a viabilidade celular da *I. paraguariensis*, as concentrações maiores de 7,41 e 14,83mg/mL reduziram significativamente a viabilidade celular, semelhante a literatura. Wnuk et al. (2009) testaram a infusão de mate em cultura de linfócitos, e observou que em altas concentrações levou a apoptose e ao aparecimento de micronúcleos, confirmando a citotoxicidade e a genotoxicidade do extrato. Além disso, os autores sugeriram que tal efeito pode ser devido a presença da cafeína e xantina, porém os efeitos foram dependentes do tipo celular e da concentração do extrato, assim como a cafeína em concentrações de 10mM pode induzir apoptose e a parada do ciclo celular (JANG et al. 2002; GABRIELLI et al. 2007).

Goldenberg (2002), afirma que o uso constante de chá mate foi considerado um fator de risco para o câncer de orofaringe e oral, assim como diversos estudos epidemiológicos demonstram a relação entre a bebida mate com o risco de câncer (WNUK et al. 2009). Além disso, Leitão e Braga (1994) e Fonseca et al. (2000) relataram que o extrato de *I. paraguariensis* aumentou a frequência de aberrações cromossômicas em células periféricas humanas.

A partir dos valores encontrados de CC_{50} e IC_{50} foi possível calcular o índice de seletividade (IS), sendo considerado significativo um valor IS maior ou igual a 10 (GALLÉ et al. 2013). Este índice possibilita inferir se um extrato é mais seletivo para as células eucarióticas ou para os micro-organismos testados. No presente estudo, o extrato aquoso de *A. brasiliensis* apresentou maior seletividade para *S.aureus* (18,04), e menor para *E.coli* (4,77), por outro lado o *I. paraguariensis* foi menos seletivo tanto para *S.aureus* (4,57) quanto para *E.coli* (2,11).

Dessa forma, um extrato deve ser mais seletivo para o agente patogênico haja vista que os PMNs e macrófagos tem um papel importante na destruição de patógenos. Tais células migram para o sítio inflamatório para reconhecer, ingerir e degradar estes micro-organismos, processo chamado de fagocitose (FREEMAN e GRINSTEIN, 2014). Além disso, estas células

podem fagocitar partículas, células mortas e detritos ambientais, e também são responsáveis pela apresentação de antígenos às células T, com produção de citocinas e quimiocinas (UNDERHILL e GOODRIDGE, 2012).

Em *in vitro* foi avaliado a capacidade fagocítica dos macrófagos na presença de diferentes concentrações dos extratos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*. Nossos dados mostraram que o *A. brasiliensis* reduziu a capacidade fagocítica de macrófagos, enquanto o *I. paraguariensis* aumentou esta capacidade fagocítica. Contrariamente aos nossos dados, outros estudos mostraram que o *A. brasiliensis* foi capaz de aumentar a capacidade fagocítica na presença de *Candida albicans* (FUJIMYA et al. 1998; MIYAGAWA, 2013) dependente da concentração (NAVEGANTES et al. 2013).

Nesse sentido, Martins (2008) mostrou que PBMC incubado com o *A. brasiliensis* apresentou maior capacidade fagocítica frente a *C.albicans*, no entanto quando estas células foram tratadas com anti-TRL2 e anti-TRL-4 houve uma redução significativa nesta atividade, sugerindo que esses receptores podem estar envolvidos na atividade fagocítica induzida pelo cogumelo. De maneira similar, Snriderle et al. (2013) mostraram que macrófagos peritoneais estimulados com LPS e tratados com 1 \rightarrow 6- β -glucana proveniente de *A. brasiliensis* apresentaram redução da ativação dos macrófagos induzido pelo LPS, sugerindo que o polissacarídeo competiu com o LPS pelo receptor TLR-4. Dessa forma, tais dados explicam os nossos dados, sugerindo que os polissacarídeos do cogumelo possam competir com as partículas de zymosan pelos receptores TLR, tornando possível a inibição da atividade fagocítica pelo cogumelo. Além dos receptores TRL, também estão envolvidos no mecanismo da fagocitose os receptores Fc e Dectina-1, que é um receptor β -glucano, responsável pelo reconhecimento da parede celular do zymosan (STUART e EZEKOWITZ, 2005; UNDERHILL e GOODRIDGE, 2012).

Nas células tratadas com *I.paraguariesis*, a capacidade fagocítica aumentou significativamente de maneira dose-dependente. Na literatura não há relatos da atividade fagocítica do extrato de *I. paraguariensis*. Entretanto, sabe-se que o *I. paraguariensis* é rico em polifenóis e vários estudos mostram a ação imunomoduladora destes compostos (CUEVAS et al. 2013). Um estudo realizado por Monobe et al. (2010) mostraram que os polifenóis, especificamente o pirogalol, interferiu na atividade fagocítica de macrófagos. O pirogalol pode ser encontrado a partir da degradação dos ácidos fenólicos durante um tratamento térmico da erva-mate (VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003).

Durante a infecção na sepse, para restringir os agentes patogênicos pode ocorrer uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, com produção de citocinas pró-inflamatórias e

produção de espécies reativas, processo conhecido como “*burst oxidativo*” (ALONSO de VEGA et al. 2002; CHIA-CHANG et al. 2005). O óxido nítrico é uma dessas espécies, e desempenha um papel crucial na defesa do hospedeiro frente a estes micro-organismos. No entanto o excesso de produção de NO tem implicado no surgimento de várias doenças e lesão dos órgãos (BEJAMIN et al. 2002).

Macrófagos peritoneais tratados com o extrato aquoso de *A. brasiliensis* nas primeiras 24 horas, tiveram aumento na produção de NO em todas as concentrações testadas. O mesmo foi observado por Sorimachi et al. (2001), em que mostraram que *in vitro* os corpos frutíferos do cogumelo induziram a secreção de NO por macrófagos derivados de ratos. Quando as células foram estimuladas com o LPS, o *A. brasiliensis* foi capaz de diminuir os níveis de NO *in vitro*. Nesse sentido, Zhu et al. (2011) mostraram que o polissacarídeo beta-glucana administrado por gavagem em ratos foi capaz de reduzir a expressão da iNOS. Além disso, estudos anteriores do nosso grupo mostraram que macrófagos peritoneais estimulados com o mitógeno Con A e tratados com *A. brasiliensis* também apresentaram redução dos níveis de NO (NAVEGANTES et al. 2013).

O extrato de *I. paraguariensis*, aumentou os níveis de óxido nítrico em macrófagos peritoneais. Esta atividade que pode ser atribuída aos polifenóis, como a quercetina (PIGNATELLI et al. 2006), haja vista que já é relatado na literatura que os polifenóis estimulam a formação de NO, por meio do aumento da fosforilação da enzima NOS (LUNDBERG et al. 2015).

As células quando estimuladas com LPS e tratado com *I. paraguariensis*, apresentaram redução nos níveis de NO. O mesmo foi relatado por Puangraphant e Mejia (2009), em que macrófagos humanos ativados por LPS na presença do extrato de *I. paraguariensis* apresentaram inibição da resposta pró-inflamatória com bloqueio da COX-2 e inibição do NO e citocinas pró-inflamatórias. Outro estudo realizado por Schinella et al. (2005) mostrou que o extrato aquoso de erva-mate foi capaz de diminuir os níveis de NO em ratos com disfunção cardíaca (SCHINELLA et al. 2005).

No presente estudo, também foi avaliado o efeito proliferativo em esplenócitos murinos. Os dados mostraram que o tratamento com o cogumelo induziu efeito proliferativo de esplenócitos. O mesmo foi observado em nossos estudos anteriores (NAVEGANTES et al. 2013) e por Chan et al. (2007). Segundo Hashimoto et al. (2006), o cogumelo *A. brasiliensis*, além de polifenóis possui polifenol-oxidase e peroxidase, que são enzimas que interagem com os compostos fenólicos originando polifenóis polimerizados de alto peso molecular, que seriam responsáveis por algumas atividades biológicas. Nesse contexto, Yamanaka et al. (2012)

mostraram que esses polifenóis polimerizados são capazes de induzir a proliferação de esplenócitos murinos.

Por outro lado, alguns estudos mostram que células estimuladas com Con A e tratadas com *A. brasiliensis* exibiram efeito antiproliferativo. Tsai et al. (2013) mostraram que o cogumelo teve efeito antiproliferativo em mononucleares do sangue periférico humano estimuladas com fitohemaglutinina. Esse efeito foi observado também em células cancerígenas, efeito atribuído a beta-glucana e ao Agarol, um ergosterol presente no *A. brasiliensis* (TAKAKU et al. 2001; SHIMIZU et al. 2016) devido a parada do ciclo celular (HSIAO et al. 2007).

Os dados mostram que o tratamento com *I. paraguariensis* em células estimuladas com o ConA levou à um efeito antiproliferativo de maneira dose-dependente. Também não há relatos na literatura sobre esta atividade antiproliferativa em esplenócitos, entretanto este efeito foi relatado frente às células cancerígenas (BOAVENTURA et al. 2015).

Durante a sepse ocorre uma excessiva produção de radicais livres (CHERIAN et al. 2007), sendo assim foi avaliada a capacidade antioxidante dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis*. Os dados mostram que o extrato de *A. brasiliensis* apresentou excelente atividade antioxidante pelo método de ABTS e sequestro de DPPH. De maneira similar, Carvajal et al. (2012), mostraram a excelente capacidade antioxidante do extrato de *A. brasiliensis*, principalmente do corpo de frutificação e da massa micelial, através do sequestro de DPPH, ABTS e a capacidade de quelar Fe^{++} . Além disso, Gan et al. (2013) comprovaram a atividade antioxidante de compostos fenólicos em extratos etanólicos de *A. brasiliensis* e à outros componentes antioxidantes presentes em extratos aquosos deste cogumelo, enquanto que Mourão et al. (2011) relataram que β -glucanas são as principais responsáveis pela atividade antioxidante.

Quanto ao extrato de *I. paraguariensis*, os dados mostraram que este extrato apresentou notória atividade antioxidante. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, em que a atividade antioxidante já é amplamente relatada em modelo *in vitro* e *in vivo*. Nesse contexto, Gugliucci e Stahl (1995) mostraram a capacidade do extrato de *I. paraguariensis* em inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade *in vitro*. Assim como, Schinella et al. (2000) mostraram a capacidade deste extrato em inibir a peroxidação lipídica em microssomas de fígados de ratos. A atividade de erva-mate é atribuída principalmente aos compostos fenólicos (BASTOS et al. 2007).

O excesso de espécies reativas pode oxidar os componentes celulares e inibir as funções fisiológicas além de dano celular como já foi mencionado anteriormente (VALKO et al. 2007).

O método comumente utilizado para detectar essas espécies é o DCFH-DA. Este composto é capaz de penetrar na membrana celular onde o é hidrolisado em DCFH, que por sua vez reage com ERO gerando DCF, e seu aumento indica presença de radicais intracelulares (HUANG et al. 2014). Nosso estudo mostrou que o *A. brasiliensis* foi capaz de inibir a produção de ERO induzida pelo oxidante tBHP. Esses dados estão de acordo com Huang et al. (2014), em que o extrato metanólico de *A. brasiliensis* inibiu significativamente a liberação de ERO e aumentou a viabilidade celular comparada às células que somente tiveram dano induzido pelo peróxido de hidrogênio. Angeli et al. (2006) mostraram que a β -glucana de *A. brasiliensis* protegeu os linfócitos humanos de ERO, impedindo o dano ao DNA. Estes polissacarídeos podem atuar na varredura de radicais superóxido, hidroxila e inibindo a peroxidação lipídica (CASTRO et al. 2014).

As células que foram tratadas com o extrato aquoso de *I. paraguariensis* na presença do oxidante, também tiveram uma redução significativa da liberação de ERO. Tamura et al. (2013) também mostrou esse efeito ao tratar hepatócitos que sofreram oxidação pelo etanol com extrato de erva-mate, onde estas células apresentaram níveis basais de ERO após o tratamento. A literatura mostra que o consumo de erva-mate está associado à diminuição da peroxidação lipídica e aumento da expressão gênica de enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase) (MATSUMOTO, 2009).

Após todos os testes *in vitro*, foi avaliado o efeito dos extratos em modelo de sepse em murinos induzida pelo método CLP. O CLP, é considerado o modelo padrão-ouro para a investigação da sepse *in vivo*, pois se trata de um procedimento simples e se assemelha à progressão e às características da sepse humana (DEJAGER et al. 2011). O CLP em camundongos reproduz uma série de características chave da peritonite bacteriana secundária em seres humanos, incluindo a infecção polimicrobiana, (OZMENT et al. 2012; SIEMPOS et al. 2014), características hemodinâmica, com a presença das fases hiper-inflamatória e de imunossupressão (HOLLENBERG et al. 2001; DOERSCHUG et al. 2004; DEJAGER et al. 2011).

A técnica envolve uma laparotomia mediana no abdome do animal, com a exteriorização do ceco e a ligadura distal à válvula e posteriormente a perfuração da região ileocecal. Este processo cria uma perfuração do intestino com o vazamento dos conteúdos fecais no peritônio, o qual estabelece uma infecção com uma flora bacteriana mista e fornece uma fonte inflamatória (WICHTERMAN et al. 1980; AYALA et al. 2000; RITTIRSCH et al. 2009). A gravidade da doença, tal como avaliada pela mortalidade, podem ser ajustados através do calibre da agulha de punção ou o número de perfurações (WICHTERMAN et al, 1980;

RITTIRSCH et al. 2009). Dentro de 12 horas, as bactérias serão detectáveis no peritônio, e com 24 no sangue e em outros órgãos, embora isto possa variar dependendo da severidade do modelo utilizado (DELANO, 2007).

Após a indução de sepse nos animais, avaliou-se alguns parâmetros que indicam o estado geral de saúde dos animais, tais como temperatura corporal, peso corporal, consumo de água e alimento e atividade dentro da gaiola (NEMZEK et al. 2008; MORAAL et al. 2012; GRANGER et al. 2013). Os animais com sepse que receberam o tratamento com salina apresentaram perda significativa de peso corporal e redução no consumo de água e ração, com morte no sexto dia após a CLP. Segundo Conn (2008) e Bejamim et al. (2000), o modelo de CLP considerado moderado pode sobreviver até 5 dias após o procedimento cirúrgico. Siempos et al. (2014) mostrou que 60% dos animais do modelo CLP moderado morrem até 7 dias após o procedimento.

Durante o processo inflamatório da sepse ocorre a ativação e migração leucocitária do lúmen vascular para o sítio inflamatório, em que os PMNs e os monócitos são os principais componentes da resposta imune inata, e essenciais para a defesa do organismo frente à patógenos (OCUIN et al. 2011; BOOMER; GREEN; HOTCHKISS, 2014). Nos animais com sepse e pré-tratados com salina, observou-se migração de neutrófilos e mononucleares para o sítio inflamatório no peritônio nas primeiras 12 horas após a CLP com pico de migração após 24 horas. Ocuin et al. (2011) também mostrou que após 12 horas após a sepse houve recrutamento de neutrófilos e monócitos para o peritônio na CLP moderada. No modelo de CLP severo embora ocorra uma estimulação exacerbada da resposta imune, há falência da migração celular, principalmente de neutrófilos (MARSHALL, 2005; MARTIN et al. 2010). O mesmo foi observado por Benjamin et al. (2000) no modelo CLP após 24 horas do procedimento.

Além da migração leucocitária, durante a sepse ocorre disfunção hematológica, sendo uma manifestação precoce da sepse grave (GOYETTE; NIGEL; ELY, 2004). Entre as anormalidades mais comum está a anemia, que é de origem multifatorial, podendo ser diagnosticada pela redução do número de eritrócitos, queda do hematócrito ou pela diminuição na concentração de hemoglobina (MENDES, 2014). Além disso, ocorre a leucocitose, trombocitopenia e ativação do sistema de coagulação (GOYETTE; NIGEL; ELY, 2004).

Em relação ao eritrograma, os resultados do presente estudo, não foi possível observar alteração neste parâmetro, haja vista que os valores permaneceram dentro da referência. No modelo séptico após 24 horas, os animais com sepse apresentaram $6,10 \times 10^6$ /mL de hemácias, hemoglobina de 10,8 g/dl e hematócrito de 41%, enquanto que na literatura, os valores de referência de hemácias é de $5.1 \pm 0.3 \times 10^6$ /mL (REIS et al. 2000; BRANCO et al. 2011). Nesse

sentido, Xiao et al. (2006) mostraram que após o quarto dia da indução de sepse houve queda na hemoglobina.

Os animais sépticos pré-tratados com salina apresentaram aumento no número de plaquetas, similar a outros estudos como de Ponte et al. (2008) e Reis et al. (2000). A trombocitose na fase inicial da sepse é uma característica frequente (TAYLOR et al. 2002) O mesmo foi observado por Taniguchi et al. (1990), que mostraram aumento de plaquetas no modelo CLP após 16 horas. Segundo Croner et al. (2006), o contínuo recrutamento de plaquetas e leucócitos leva à leucopenia e trombocitopenia, que é observada em modelo CLP severo (BRUN-BUISSON et al. 1995).

Xiao et al. 2006, observaram leucopenia dentro de 24 horas após a CLP, devido à redução de linfócitos, apesar da contagem global de leucócitos dos animais tratados com salina se encontrar dentro dos valores normais ($2.96 \pm 1.22 \times 10^3/\text{mm}^3$) (VERÇOSA JÚNIOR et al. 2004; BRANCO et al. 2011). O grupo sham apresenta os valores de monócitos e neutrófilos dentro dos valores encontrados por Vasconcelos et al. 2007 ($=2.00 \pm 0.35\%$) e Ponte et al. 2008 ($=27.8 \pm 5.2\%$) respectivamente.

Como já mencionado anteriormente, o modelo CLP é caracterizado pela translocação bacteriana, com conseqüente infecção polimicrobiana. Entre as bactérias mais prevalentes e identificadas neste tipo de modelo estão as *Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis*; *Proteus mirabilis*; *Klebsiela pneumoniae*; e *Enterobacter agglomerans* (NASSIF et al. 2004; RITTIRSCH, 2009; CUENCA, 2010).

Os camundongos sépticos pré-tratados com salina, apresentaram elevado aumento da carga bacteriana no lavado peritoneal, soro e nos tecidos coletados nos dois tempos avaliados, sendo que no sítio inflamatório houve redução da carga 24 horas após CLP, que pode ser justificado pela fagocitose realizada pelos leucócitos recrutados (XIAO et al. 2006).

Além da fagocitose, os leucócitos também produzem espécies reativas de nitrogênio, principalmente o NO pela ação da enzima iNOS, e junto com seus produtos gerados pela sua interação com outros intermediários irão atuar como microbicidas (KAPLAN et al. 1996; OCUIN et al. 2011). Nos animais com sepse pré-tratados com salina, observou-se aumento da produção de NO pelos leucócitos no lavado peritoneal e no soro destes animais.

O aumento da produção de NO está associado à ativação da iNOS nos leucócitos tanto em pacientes com sepse como em modelos de animais sépticos e sua relação com a gravidade da doença já está bem documentada (OCHOA et al. 1991; GOMEZ-JIMENEZ et al. 1995; LIU et al. 1997; WOLKOW et al. 1998; HOLLENBERG et al. 2000; ANDRADES et al. 2011). Vários estudos também mostram que o aumento excessivo na produção de óxido nítrico em

animais com sepse grave leva a redução da migração leucocitária, principalmente neutrófilos. Apesar do mecanismo não estar ainda elucidado, sabe-se que o NO modula a interação dos leucócitos com as células endoteliais alterando a adesão e a transmigração de neutrófilos (BENJAMIN et al. 2000; RIOS-SANTOS et al. 2007; SOUZA et al. 2011). Em nosso dado, no modelo de sepse moderado, há baixa quantidade de NO e elevada migração de neutrófilos no peritônio destes animais com 24 horas. Os efeitos deletérios do NO já é demonstrado na literatura, sendo que o NO interage por exemplo com ânion superóxido gerando o peroxinitrito (ONOO^-), um agente oxidante responsável pela peroxidação lipídica. Whiteman e Halliwell (1996) mostraram que a falha na migração leucocitária na sepse severa foi mediada pelo peroxinitrito. Posteriormente, Clements et al. (2003) mostraram que ao tratar os animais com um sequestrador de ONOO^- houve um aumento da migração leucocitária e reduziu a carga bacteriana na circulação.

A geração controlada desses ERO no espaço extracelular tem como função eliminar patógenos. No entanto, o excesso de ERO podem induzir efeitos deletérios como danos no DNA, perda da função de enzimas, reagir com lipídeos das membranas celulares produzindo peroxidação lipídica, resultando em produtos finais como o MDA e outros aldeídos que levam à morte celular (TUKAMOTO, 2008; PINTO et al. 2012; ALKHARFY et al. 2015; WEIDINGER e KOZLOV, 2015). Nesse sentido, nos animais com sepse e pré-tratados com salina, os níveis de MDA estavam elevados no peritônio, no soro e nos órgãos como baço, coração, pulmão e fígado dos animais sépticos.

Nesse sentido, a geração de ERO no peritônio dos animais sépticos e pré-tratados com salina foi avaliado pelo método de DCFH-DA, e foi observado um aumento significativo da geração destas espécies comparado ao controle sham. Nossos dados estão de acordo com Inada et al. (2001), em que demonstraram a produção de radicais no sangue e no lavado peritoneal com 4 e 24 horas após CLP em ratos, sendo que 4 horas os animais apresentaram níveis maiores. Wang et al. (2014), avaliou em camundongos a geração de ERO, e observaram um aumento significativo 24 horas após CLP. Ao avaliar *ex vivo* a formação de ERO na presença do tBHP (estimulo), observamos a redução na geração comparado ao grupo sem estímulo. Martins et al. (2003) mostraram que neutrófilos provenientes de pacientes sépticos quando estimulados *in vitro* por bactérias ou endotoxinas, irão apresentar níveis altos de ERO, no entanto pacientes com sepse proveniente de gram-negativas tiveram redução.

A produção de ERO excessiva nos tecidos está associado à falência múltipla de órgãos. No coração, o ONOO^- seria responsável pela desnaturação proteica, alteração no fluxo de cálcio e redução da respiração mitocondrial e consequente disfunção cardíaca, que está

presente em 40% dos casos. O mesmo já foi observado em modelo animal séptico (ISHIDA et al. 1996; XIE et al. 1998; WANG et al. 1999 e YU et al. 2005; DROSATOS et al. 2015). Além deste, a apoptose de cardiomiócitos através da ativação extrínseca (TNF- α , com ativação da caspase 8) ou por vias intrínsecas (mitocondrial) também é um fator importante na sepse (IWATA e de CLARO, 2011).

O fígado pode ser afetado na sepse, haja vista que possui o sistema hepato-esplênico, que drena diretamente dentro do fígado um terço do fluxo sanguíneo, sendo que, quando presente é indicativo de mau prognóstico (ABRAHAM e SINGER 2007; HENKIN et al. 2009). Segundo Recknagel et al. (2012), a disfunção hepática ocorre frequentemente no início da sepse, como já foi mostrado em modelo de CLP, que após uma hora e meia do procedimento já é possível observar a disfunção. Assim como nosso estudo, níveis altos de MDA também foram encontrados em fígados de camundongos 16 horas após sepse induzida (DEAR et al. 2006).

O pulmão também é um órgão que é afetado na sepse, independentemente se o foco é pulmonar ou extrapulmonar (EGGIMANN et al. 2010). Xuefei et al. (2012) mostraram que pulmões de ratos após 6,12 e 24 horas de sepse induzida por CLP, apresentaram altos níveis de MDA comparado ao controle sham. Os animais apresentavam também alterações pró-inflamatórias com edema pulmonar e infiltração de neutrófilos. Zolalim et al. (2015) também evidenciaram altos níveis de MDA nos pulmões de ratos sépticos. Segundo Weiland et al. (1986), a gravidade da lesão pulmonar está correlacionada com a migração de neutrófilos e o acúmulo de produtos citotóxicos derivado destes no espaço alveolar. Dahl et al. (2007) e Kliment et al. (2008) afirmam que a produção de espécies reativas é responsável pelo aumento da inflamação pulmonar. Constantino et al. (2014) mostrou a associação do ONOO⁻ com a inflamação em pulmões de ratos com sepse.

Os animais possuem um sistema antioxidante enzimático e não enzimático que atuam contra radicais livres e outros oxidantes. A capacidade antioxidante total pode ser avaliada pelo método do sequestro do radical ABTS⁺ (KAMBAYASHI et al. 2008; ALARM et al. 2013). Os animais sépticos e pré-tratados com salina apresentaram baixos níveis da capacidade antioxidante nos dois tempos após CLP no lavado peritoneal enquanto que no soro aumentou após 24 horas.

Nesse sentido, Chia-Chang et al. (2006) avaliaram a capacidade antioxidante total no soro de pacientes com sepse grave, observaram o aumento significativo dos níveis de capacidade antioxidante total nos pacientes sépticos comparado com os pacientes saudáveis, concluindo que os níveis dos antioxidantes no soro dos pacientes estão relacionados com a severidade da sepse. Esse resultado pode ser justificado pela produção excessiva de espécies

reativas durante o início da sepse pelos leucócitos ativados (ELEWA et al. 2015). Na sepse, o aumento exacerbado de substâncias pró-oxidantes pode levar à uma redução nos estoques de antioxidantes, que são insuficientes para neutralizar o dano celular provocado por estes radicais. Por este fato a suplementação com antioxidantes torna-se necessária (CARVALHO et al. 2003; PETRONILHO et al. 2016).

Ao avaliar a capacidade funcional dos leucócitos recrutados dos animais pré-tratados com salina, verificou-se a capacidade fagocítica, a qual não foi significativamente alterada quando comparada ao grupo sham. Hofman et al. (2000) avaliaram o índice fagocítico dos leucócitos *ex vivo* antes e após a migração destes através das camadas de epitélio intestinal, e observaram que estes leucócitos apresentavam índice de fagocitose superior quando comparado ao índice das células antes do deslocamento. Outro estudo por mostrou que as células de pacientes com sepse apresentaram atividade fagocitária superior quando comparada às células de voluntários sadios. Além disso, Kauffmann et al. (2006) observaram por meio da fagocitose de partículas de zymosan por leucócitos de pacientes com sepse, no qual a supressão da atividade fagocitária varia de acordo com a severidade da doença.

A sepse é tratada comumente com terapia antimicrobiana controlando a infecção, além do uso de terapias de suporte (ANDRADES et al. 2011). Dessa forma, animais sépticos foram pré-tratados com ceftriaxona (20mg/Kg), considerada um dos antibióticos mais utilizados em caso de sepse (OMS, 2008). Posteriormente foi avaliada migração leucocitária, parâmetros hematológicos e oxidativos. Os animais pré-tratados com ceftriaxona morreram em até seis dias após a CLP e tiveram uma redução de peso menor que o grupo salina. Doerschung et al. (2004) mostraram que os antibióticos foram capazes de aumentar a sobrevivência dos animais comparado ao controle CLP, entretanto não foram capazes de evitar a mortalidade dos animais. Segundo Conn (2008), os antibióticos apenas diminuem a severidade da sepse. Outro estudo realizado por Tumbull et al. (2003), em que pré trataram os animais sépticos com ceftriaxona 12 horas antes da CLP e depois de 12 horas em 12 horas por sete dias, também observaram aumento da sobrevivência destes animais, especialmente nos camundongos jovens.

Em relação a migração leucocitária, pode-se observar que os animais com sepse tratados com ceftriaxona apresentaram aumento de neutrófilos e mononucleares quando comparado ao grupo tratado com salina, entretanto com 24 horas houve redução significativa de neutrófilos, retornando a níveis basais. Resultado semelhante foi observado por Gomes et al. (2004), em que outros antibióticos como ciprofloxacina, clindamicina e imipenem diminuíram o influxo de neutrófilos para cavidade peritoneal 24 horas após a CLP. Majhi et al. (2014) mostraram que

a ceftriaxona diminuiu o influxo de PMN para o sitio de inflamação no modelo inflamatório testado.

Fatores como a endotoxemia pode resultar na redução da capacidade de resposta quimiotática dos neutrófilos, com conseqüente redução da capacidade fagocítica e do “*burst oxidative*” (REED et al. 2004). Sabe-se que um dos problemas envolvendo a terapia com antimicrobianos na sepse é a liberação de componentes da parede bacteriana durante a lise destas (LEPPER et al. 2002; ROSA et al. 2004). A ceftriaxona é uma cefalosporina de terceira geração, que age interferindo na síntese dos peptidoglicanos bacterianos após a ligação às proteínas de ligação de beta lactâmicos, com conseqüente inativação de um inibidor das enzimas autolíticas na parede celular levando à lise celular. Estudos mostram que a ceftriaxona e o meropenem são antibióticos que tem maior indução na liberação desses produtos (STUERTZ et al. 1998; NAU e EIFFERT, 2002; SILVA, et al. 2014).

Os parâmetros hematológicos como número de hemácias, hemoglobina, e número de plaquetas dos animais pré-tratados com ceftriaxona se apresentaram dentro dos valores normais proposto na literatura (REIS et al. 2000; PONTE et al. 2008). No entanto, o hematócrito dos animais com sepse tratados com ceftriaxona se apresentou abaixo do valor de referência (BRANCO et al. 2011) comparado aos animais com sepse com salina. Fatores como altos níveis de mediadores inflamatórios e aumento de espécies reativas de oxigênio podem resultar na deformidade de hemácias com conseqüente redução da massa eritrocitária aliada à hemodiluição resultando na diminuição do hematócrito, sendo considerado como um marcador laboratorial da sepse (JOHN et al. 2005; JUNCAL et al. 2011).

O leucograma dos animais apresentou leucocitose devido à linfocitose. Apesar de a leucocitose inicial da sepse está intimamente relacionada com a neutrofilia e não a linfocitose (MENDES,2014). Segundo Martinez e Figueiredo (2003), o aumento de linfócitos pode estar associado à infecções por bacilos gram-negativos. Os animais sépticos que foram pré-tratados com o ceftriaxona não apresentaram crescimento bacteriano após 12 horas de CLP, e tiveram uma redução significativa no baço, porém após 24 horas teve aumento da carga no soro e no baço.

O baço tem a capacidade de remover eritrócitos danificados e bactérias presentes no sangue, tendo um papel fundamental na sepse (PASTER, 2016). Ding et al. (2004) mostraram que as células dendríticas imaturas do baço diminuiram ao longo de 24 horas após CLP, a perda da capacidade das maduras em produzir citocinas como a IL-12, tem como conseqüência a imunossupressão e falha no combate da infecção. Em casos que a sepse causada por gram-

negativas, o dano em tecidos como o baço é maior, devido à ativação exacerbada das células presentes no órgão pelo LPS (ALTAMURA et al. 2001).

Quanto aos níveis de NO nos animais que foram pré-tratados com o antibiótico, no soro houve uma redução comparada ao grupo salina e no lavado não teve diferença estatística. Enquanto que nos órgãos apresentou uma redução maior com 24 horas após CLP. Majhi et al. (2014) observaram a redução da expressão da iNOS após o tratamento com ceftriaxona do modelo infecção pulmonar por *S.pneumoniae*. Quanto à liberação de ERO pelos leucócitos presentes no lavado peritoneal dos animais que receberam ceftriaxona, observou-se que o antibiótico manteve a níveis basais e na presença do oxidante tBHP inibiu a liberação de ERO. Como isso, sugere-se que a ceftriaxona apresenta uma atividade antioxidante.

Ao avaliar a peroxidação lipídica no lavado e no soro, os animais que foram pré-tratados com ceftriaxona apresentaram redução de MDA, assim como no coração e o pulmão. Amin et al. (2014) mostraram que os níveis de MDA reduziram após 7 dias de tratamento com o antibiótico nos ratos. No pulmão, os níveis de MDA aumentaram com 24 horas, Doerschung et al. (2004) verificou que o antibiótico apenas é capaz de retardar a lesão pulmonar.

Ao avaliar a peroxidação lipídica no fígado, foi possível observar um aumento significativo de MDA após 24 horas. Resultado que já foi demonstrado por Chakraborty et al. (2005) em que observaram que a ceftriaxona induziu peroxidação lipídica nos hepatócitos de bode 24 horas após o tratamento e Alhumaidha (2014) relatou o aumento de MDA nos fígados de ratos wistar após o tratamento com ceftriaxona com doses de 180mg/Kg. No baço também foi observado esse aumento, que pode ser justificado pela ativação exacerbada dos esplenócitos com aumento de ERO, levando ao dano além do aumento da carga bacteriana neste órgão (HURLEY, 1995; ALTAMURA et al. 2001; DALHOFF, 2005)

Ao avaliar a capacidade antioxidante total dos animais pré-tratados com ceftriaxona no sítio inflamatório, observou-se aumento de TEAC nas primeiras 12 horas após CLP, porém houve redução com 24 horas. Diversos estudos relatam uma atividade antioxidante do antibiótico ceftriaxona como o de Yilmaz et al. (2011) que administrou intraperitoneal a ceftriaxona (200mg/Kg) durante 10 dias em camundongos com estresse induzido e observou o aumento da glutatona peroxidase e catalase modulando o sistema antioxidante desses animais. Amin (2014) também relatou que nos animais que foram tratados com ceftriaxona apresentaram aumentos dos níveis de GSH. Recentemente, Hunssein et al. (2016) mostraram que o tratamento com ceftriaxona (200mg/Kg) em ratos com inflamação, levou ao aumento significativo da concentração de GSH e da atividade da catalase, além de reduzir as concentrações de MDA no hipocampo destes animais.

A capacidade funcional dos leucócitos provenientes de camundongos que foram pré-tratados com a ceftriaxona foi semelhante ao grupo sham. O antibiótico pode ter levado à falha na fagocitose, devido a endotexemia. No entanto, não há estudos recentes sobre a ceftriaxona alterar a capacidade funcional dos leucócitos, mas Wenishc (1995) mostrou que os pacientes com sepse severa que fizeram uso de ceftriaxona tiveram a capacidade fagocítica aumentada a partir do terceiro dia de tratamento. Ekinici et al. (2002) também relataram a capacidade de macrófagos fagocitar *Salmonella typhi in vitro* na presença de ceftriaxona.

Os animais com sepse que foram pré-tratados com *A. brasiliensis* (135 mg/Kg) apresentaram uma sobrevida de 100%, e recuperaram o peso corporal a partir do 4º dia. Nesse sentido, Bernardshaw et al. (2006), administraram o cogumelo do sol em camundongos BALB/c um dia antes da indução da peritonite letal e observaram que a taxa de sobrevida aumentou significativamente em comparação aos animais que receberam pré-tratamento com PBS, mostrando a eficácia do cogumelo quando administrado profilaticamente. Hetland et al. (2013) também observou o aumento da sobrevida quando o cogumelo é administrado 24 horas antes da peritonite polimicrobiana.

Quanto à migração leucocitária, o tratamento com *A. brasiliensis* nos animais com sepse inibiu a migração leucocitária no lavado peritoneal induzida pela infecção bacteriana. O mesmo efeito foi observado por Mourão et al. (2011), que fez a administração do extrato do cogumelo por 18 dias por gavagem em ratos *wistar*, e obteve como resultado a alteração da capacidade de migração de leucócitos para o foco da lesão induzida por carregenina. Outro estudo realizado por Padilha et al. (2009) mostraram que o tratamento com extrato aquoso de *A. blazei*, foi capaz de regular a migração leucocitária assim como a liberação dos fatores quimiotáticos mostrando seu efeito imunomodulador e anti-inflamatório em diferentes modelos de inflamação aguda e crônica.

O fato de o *A. brasiliensis* reduzir a migração leucocitária, pode ser importante durante a fase inicial da sepse, haja vista que inicialmente a resposta pró-inflamatória é dominante, e o excesso de infiltração de neutrófilos pode levar à produção exacerbada de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas, ERO e enzimas lisossomais, como a mieloperoxidase. Estes mediadores podem alterar a homeostase, contribuindo para o dano celular e a falha de múltiplos órgãos. Essa desregulação leva à “imunoparalisia”, com a apoptose das células T e células dendríticas, alteração funcional de monócitos e redução do recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação aumentando o risco de infecções secundárias (LANDRY & OLIVER, 2001; MENDES, 2014; LÁSZLÓ, 2015)

O tratamento com *A. brasiliensis* reverteu os parâmetros hematológicos induzidos pela sepse, retornando aos níveis normais, de acordo com os valores de referência relatados por Restell et al. (2014) e Verçosa et al. (2004) para camundongos swiss. Como foi observado anteriormente, o *A. brasiliensis* não apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* nas concentrações testadas. No entanto, o tratamento com cogumelo apresentou redução da carga bacteriana no sítio inflamatório comparado ao grupo pré-tratado com salina, sendo que com 24 horas após não foi possível detectar a presença de bactéria.

Alguns estudos mostram a ação antimicrobiana indireta do *A. brasiliensis* de acordo com Hetland et al. (2013) o tratamento com o cogumelo reduziu significativamente a contagem das colônias bacterianas no sítio inflamatório em modelo de peritonite polimicrobiana. Bernardshaw et al. (2006), pré-trataram animais sépticos com o cogumelo e mostraram também a redução significativa da carga bacteriana. Segundo Lima et al. (2016), o mecanismo pelo qual o cogumelo tem ação antimicrobiana *in vivo* e não *in vitro* se deve a interação das substâncias bioativas como o polissacarídeo glucana que tem a capacidade de aumentar a atividade antimicrobiana de células mononucleares e polimorfomonucleares, intensificando a atividade funcional (Vannucci et al. 2013). A quantidade desses componentes bioativos irão variar de acordo com as condições de cultivo (solo, clima entre outros), extração (tipo de solvente e a metodologia) e o procedimento de armazenamento (DAI et al. 2010, LIM et al. 2012 e MONTROYA et al. 2013). Tryggestad et al. (2013) sugerem que o cogumelo atua na ativação de NF- κ B através de TLR-2. Além disso, Sokovic et al. (2014) sugerem que o cogumelo pode levar à indução de “*quorum sense*”, formação do biofilme e na motilidade da *Pseudomonas aeruginosa* de forma mais eficaz que a streptomomicina e ampicilina.

O extrato de *A. brasiliensis* elevou os níveis de NO no sítio inflamatório nos dois tempos avaliados, enquanto que no soro teve redução dos níveis de NO. Ao avaliar nos órgãos, observou-se a redução 12 e 24 horas após CLP, com exceção do baço em que teve aumento com 24 horas após CLP. Como mostrado *in vitro*, estudos anteriores mostraram a capacidade do *A. brasiliensis* em estimular a secreção de NO e H₂O₂ por macrófagos à fim de destruir os patógenos. Com isso, o cogumelo não atua diretamente na bactéria, como já foi mostrado *in vitro* em nosso estudo, e sim por meio da modulação do sistema imune por componentes como beta-glucanos presentes no cogumelo (OHNO et al. 1996; SORIMACHI et al. 2001; SHIMIZU et al. 2002; BIEDRON et al. 2012; VANNUCCI et al. 2013).

Entretanto, o cogumelo também é capaz de agir como anti-inflamatório inibindo a produção de NO, prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias (CARVALHO et al. 2001). O mesmo foi observado por Yurkiv et al. (2015), que administraram por via oral o cogumelo em

ratos diabéticos e observaram a diminuição da atividade da enzima NOS. Borys et al. (2015), também relataram a redução da atividade da enzima NOS após a administração oral do cogumelo na concentração de 1g/Kg nos ratos.

Sabe-se que o excesso de espécies reativas podem levar ao dano celular, com isso, os leucócitos provenientes dos animais com sepse pré-tratados com *A. brasiliensis* apresentaram redução das ERO intracelular. Quando avaliado *ex vivo* na presença de um oxidante (tBHP) os níveis também de ERO reduziram significativamente comparado ao grupo sham. Este resultado é semelhante ao *in vitro* também foi observado por Huang et al. (2014) que observou que o *A. brasiliensis* reduz a liberação de ERO induzida por H₂O₂. Tal atividade antioxidante é atribuída ao ergosterol e a beta-D-glucanas (BROWN et al. 2001; MOURÃO et al. 2011) Estudos *in vivo*, como de Johnson et al. (2012), mostraram que voluntários saudáveis que fizeram a ingestão do cogumelo apresentaram redução de ERO, principalmente dos íons superóxido.

Nesse estudo também foi observado que o *A. brasiliensis* atuou como protetor, em que foi capaz de reduzir os níveis de MDA no sitio inflamatório e no soro. Outros estudos também mostraram esse efeito, como o realizado por Zhang et al. (2010) que administrou 100mg/kg por gavagem de *A. brasiliensis* em ratos wistar, por 10 semanas e posteriormente induziu isquemia miocárdica, e observou que o cogumelo reduziu significativamente os níveis de MDA nos ratos (ZHANG et al. 2010). Outro estudo realizado por Sá-Nkanishi (2014) em dois grupos de ratos, um receberam várias doses de 200mg/kg por 21 dias e outro em dose única. Observaram a redução dos níveis de MDA sendo o melhor resultado no tratamento único.

Neste estudo os níveis de antioxidantes estavam elevados no lavado peritoneal nos dois tempos e nos órgãos com 24 horas após CLP. Comprovando sua atividade antioxidante que também foi observada *in vitro*. Nossos resultados corroboram com Thomaz et al. (2014) em que administraram *A. brasiliensis* em hamsters por via oral, por 40 dias, e observaram que os animais que receberam o cogumelo apresentaram um aumento significativo da concentração de antioxidantes no plasma.

Quando avaliada a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais provenientes dos camundongos pré-tratados com o cogumelo, o resultado foi semelhante ao *in vitro*, no qual não houve alteração da fagocitose na concentração testada em comparação ao controle salina. Diferente do estudo realizado por Ishii et al. (2011) com camundongos swiss, pré-tratados e tratados com doses contínuas de 20mg/kg do cogumelo, foi observado o aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos esplênicos destes animais. Martins et al. (2008) mostrou o aumento da fagocitose por macrófagos residentes frente à *C.albicans*.

Os camundongos sépticos que foram pré-tratados com extrato aquoso de *I. paraguariensis* apresentaram uma sobrevida de 50% até o décimo sexto dia, assim como foi observado uma recuperação do peso corporal a partir do 4º dia assim como no grupo do *A. brasiliensis*. O processo de infusão da erva-mate é capaz de extrair metabólitos primários e secundários, tais como os polissacarídeos como o ramnagalacturonana. Um estudo realizado por Dartora et al. (2013) relatou aumento da sobrevida dos animais com sepse induzida por CLP que foram tratados com o ramnagalacturonana extraído do *I. paraguariensis* por via oral.

Ao avaliar a migração leucocitária, o *I. paraguariensis* se mostrou o oposto do *A. brasiliensis*, pois o extrato de erva mate aumentou a migração de neutrófilos e de mononucleares a partir de 12 horas após CLP. Em contraste, Schinella et al. (2014) mostraram o efeito anti-inflamatório do extrato de erva-mate em três modelos de inflamação *in vivo*, e observaram a supressão do infiltrado de neutrófilos em todos os casos. Luz et al. (2016) mostraram que diferentes frações de *I. paraguariensis* diminuíram a migração leucocitária na pleura em modelos murinos tratados com o extrato do vegetal. Dartora et al. (2013) também avaliou a migração de neutrófilos através do ensaio de MPO, e observaram a redução do influxo destas células. Outro estudo realizado por Lanzetti et al. (2008) relatou que o número e a atividade de macrófagos reduziram significativamente após o tratamento de camundongos com o extrato de *I. paraguariensis*.

Os animais que foram pré-tratados com *I. paraguariensis* apresentaram uma redução significativa nos parâmetros hematológicos como o número de hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas comparado ao grupo sham (RESTELL et al. 2014). Durante a sepse, a anemia pode ser resultado de perdas sanguíneas, diminuição na hematopoese ou hemólise, que pode ser diagnosticada pela diminuição de eritrócitos ou queda do hematócrito e de hemoglobina. Dessa forma, níveis baixos do hematócrito e hemoglobina estão relacionados ao mal prognóstico dos pacientes com sepse, resultando na diminuição do transporte de oxigênio (JUNCAL et al. 2011; COSTA et al. 2014).

Outro fator que reduz o hematócrito, hemácias e hemoglobina é a hemodiluição com redução da viscosidade do sangue (MOH et al. 2014). Yu et al. (2015) administraram por 6 semanas erva-mate em voluntários saudáveis e observaram a diminuição da viscosidade do sangue com aumento do fluxo sanguíneo. Além disso, Braga et al. (2013) mostraram que o extrato aquoso de *I. paraguariensis* altera a morfologia das hemácias independente das doses testadas (12,5; 50 e 200 mg/mL) e inibe a coagulação induzida por trombina (BERGER et al. 2012), mas não resulta em hemólise (PERALTA et al. 2013)

O leucograma dos animais sépticos pré-tratados com erva-mate, apresentou leucocitose por neutrofilia além de linfocitopenia. Fonseca et al. (2000) relataram que o extrato de erva-mate pode produzir alterações cromossômicas em linfócitos humanos. Oberholzer et al. (2001) afirma que a depressão imune resultante da perda de linfócitos pode ser o fator chave para a redução da sobrevivência da sepse em murinos (PABLO et al. 2014)

O extrato *I. paraguariensis* apresentou excelente atividade antimicrobiana *in vitro*, porém *in vivo*, os animais com sepse pré-tratados com o extrato no sítio inflamatório apresentaram elevada carga bacteriana comparado ao grupo tratado com salina após 12 horas após CLP, sendo que com 24 horas foi possível detectar elevada carga bacteriana na maioria dos tecidos avaliados. Gonzalez-Gil et al. (2014) também relataram que *in vivo* a erva-mate não apresentou ação antimicrobiana frente à *Salmonella enteritidis*, enquanto que *in vitro* apresentou elevada atividade antimicrobiana.

Quanto a produção de NO, os animais sépticos que foram pré-tratados com extrato aquoso de *I. paraguariensis*, no soro tiveram aumento da produção de NO, resultado semelhante ao encontrado *in vitro* em nosso estudo. Estudos mostram a capacidade do extrato de *I. paraguariensis* de aumentar os níveis de NO endotelial (BAISHC et al. 1998). Gao et al. (2013) também relataram o aumento de NO no sangue de ratos com dieta hiperlipidêmica.

No sítio inflamatório e nos tecidos, observa-se que o tratamento com *I. paraguariensis* levou uma redução de NO nos tempos avaliados. O mesmo efeito foi observado *in vitro* na presença de LPS. Nossos dados corroboram com Dartora et al. (2013) que mostraram que o polissacarídeo ramnogalacturonana proveniente de *I. paraguariensis* reduziu os níveis de iNOS, sendo que na concentração de 10mg/Kg foi capaz de chegar a níveis basais. Segundo Puangpraphant e Mejia (2009), a interação dos componentes primários, as saponinas e a quercetina presentes na erva-mate seriam responsáveis pela redução de NO.

Em relação à liberação de ERO, os camundongos sépticos pré-tratados com o extrato de erva-mate apresentam níveis de ERO nos leucócitos semelhantes ao grupo sham, e na presença do tBHP, o *I. paraguariensis* também foi capaz de inibir a liberação de ERO induzida pelo estímulo, confirmando a atividade antioxidante de *I. paraguariensis*. Nesse sentido, os compostos presentes na erva-mate são capazes de atuar como doadores de hidrogênio ou supressores de oxigênio singleto, reduzindo a geração de espécies reativas (BRANCO et al. 2013).

Nossos resultados também mostraram que o grupo pré-tratado com *I. paraguariensis* apresentaram níveis reduzidos de MDA no soro e no lavado peritoneal. Nos órgãos, esse efeito foi melhor observado no coração, fígado e pulmão com 12 horas após CLP. Estudos mostram

que o extrato de *I. paraguariensis* é capaz de proteger hemácias e órgãos contra a peroxidação lipídica quando incubadas com H₂O₂, devido sua atividade antioxidante (MATSUMOTO et al. 2009; PERALTA et al. 2013). Bracesco et al. (2003) e Miranda et al. (2008) também mostraram que o consumo do chá de erva-mate protegeu os hepatócitos de camundongos swiss do dano induzido por peróxido de hidrogênio, em que a atividade é atribuída ao ácido clorogênico, rutina e quercetina encontradas nessa planta.

A capacidade antioxidante total do extrato *I. paraguariensis in vitro* foi excelente comparado ao padrão Ácido gálico, e o tratamento dos animais com sepse com *I. paraguariensis* levou a um aumento dos níveis de antioxidantes no lavado peritoneal e no baço, e com 24 horas após CLP esse efeito foi melhor observado no fígado e pulmão. Filip et al. (2000) e Matsumoto et al. (2009) afirmaram que o uso de *I. paraguariensis* por infusão mantém as propriedades antioxidantes e o consumo regular pode melhorar as defesas antioxidantes combatendo o estresse oxidativo.

As células provenientes do lavado peritoneal dos animais sépticos pré-tratados com *I. paraguariensis* apresentaram aumento significativo da capacidade de fagocitar partículas de zymosan, que foi mais eficiente que o cogumelo *A. brasiliensis*. O extrato de *I. paraguariensis* apresentou o mesmo resultado *in vitro* como já discutido anteriormente.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo avaliamos a atividade antimicrobiana, antioxidante e imunomoduladora dos extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* *in vitro* e *in vivo*.

Nos ensaios *in vitro*

- Quanto à avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro*, o *A. brasiliensis* não mostrou atividade antimicrobiana e nem efeito citotóxico, enquanto que o *I. paraguariensis* apresentou elevada atividade antimicrobiana frente às bactérias testadas, principalmente as gram-positivas, assim como efeito citotóxico.
- O cogumelo *A. brasiliensis* reduziu a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais, enquanto que o extrato de *I. paraguariensis* estimulou esta capacidade *in vitro*.
- Quanto a produção de NO *in vitro*, as células que foram tratadas com o cogumelo e com *I. paraguariensis* apresentaram aumento dos níveis de NO, sendo que na presença do LPS, ambos extratos reduziram os níveis de NO, atuando como anti-inflamatório.
- Os esplenócitos na presença somente de *A. brasiliensis* ou *I. paraguariensis* apresentaram efeito proliferativo, entretanto na presença do mitógeno ConA, o *A. brasiliensis* e a maior concentração de *I. paraguariensis* tiveram efeito antiproliferativo.
- Os extratos aquosos de *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* apresentaram forte atividade antioxidante e capacidade de sequestro de radicais *in vitro*.

No modelo de sepse *in vivo*

- Os animais com sepse tiveram diminuição na sobrevida, e os tratamentos destes animais com *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* elevou a sobrevida.
- A sepse induziu aumento de neutrófilos e mononucleares, e o tratamento com *A. brasiliensis* reduziu o influxo de neutrófilos e mononucleares, enquanto o *I. paraguariensis* induziu influxo de mononucleares.
- Os animais com sepse apresentaram aumento de plaquetas e linfocitopenia. O tratamento com *A. brasiliensis* conseguiu reverter as alterações induzidas pela sepse, retornando aos níveis normais. Entretanto, o tratamento com *I. paraguariensis* potencializou as alterações

hematológicas induzidas pela sepse caracterizando a piora do quadro clínico, com consequente redução de hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetopenia, e linfocitopenia.

- Os animais com sepse apresentaram elevada carga bacteriana no lavado peritoneal, soro e em todos os tecidos coletados, caracterizando uma infecção polimicrobiana. Os tratamentos destes animais com *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* diminuiu a carga bacteriana nos tecidos avaliados.
- A sepse induziu elevada produção de NO e MDA no soro, no lavado peritoneal e órgãos avaliados. Os tratamentos destes animais com *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* diminuíram a produção de NO, MDA e elevados níveis de antioxidantes nos tecidos avaliados.
- Os animais com sepse apresentaram aumento da liberação de ERO pelas células peritoneais, e os tratamentos com *A. brasiliensis* e *I. paraguariensis* diminuíram a produção de ERO.

Apesar de ambos extratos apresentarem excelente resultados *in vitro*, o extrato aquoso de *A. brasiliensis* mostrou ser mais promissor que o extrato de *I. paraguariensis* como uma terapia adjuvante na sepse, devido sua elevada atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória *in vivo*.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBAS, A.K.; ANDREW, H.H.; LICHTMAN, S.P. Imunologia celular e molecular. **Elsevier**, ed.7, p.112, 2012.

AÇARI,D.P.;BARTCHEWSKY,W.JR.; dos SANTOS,T.W. et al. Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Mol Cell Endocrinol** V.335, p.110-115, 2011.

AIRD,W.C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. **Blood**, v. 101, n.10, p.3765-3777, 2003

ALARM, N.;JAHAN,N.; RAFIQUZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidante activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21,n. 2, p.143-152, 2013.

ALVES,P.M. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microorganismos do biofilme dental e cepas do gênero Candida. **Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.42, n.2, p.222-224,2009.

ALBRECHT, E.A. e WARD, P.A. Complement-induced Impairment of the innate immune system during sepsis. **Current infectious disease reports**, 7:349-354,2005

AMAZONAS,M.A.L. Champignon do Brasil (*Agaricus brasiliensis*), Nutrition, Health, Market Demands and Regulatory Concerns. **Acta Edulis Fungi**V.12, p. 111–119. 2005.

ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V.C.; HAAS, V.J. Occurrence of multi-resistant bacteria in the intensive care unit of a brazilian hospital of emergencies. **RBTI** , V.18, n.1, p. 27- 33, 2006.

ANDRADES, M.E.; MORINA,A.; SPASIC,S.; SPASKJEVIC,I. Bench-to- bedside review:sepsis-from the redox point of view. **Critical care**, DOI: 10.1186/cc10334, 2011.

ANGUS, D.C., et al., Epidemiology of severe sepsis in the United States: analys is of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, V.29,n.7, p. 1303- 10. 2001.

ARNAUD, C.; BURGER, F.; STEFFENS, S.; et al. Statins reduce interleukin-6 i induced Creactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** V.25 p.1231–6, 2005.

ARBISER, J.L.;LI, X.C.;HOSSAIN, C.F.;NAGLE, D.G.;SMITH, D.M.;MILLER, P.; et al.. Naturally occurring proteasome inhibitors from mate tea (*Ilex paraguayensis*) serve as models for topical proteasome inhibitors. **Journal of Investigative Dermatology**, V.125, p.207-212, 2005

ARRAIS, P. S. D. et al. Perfil da automedicação no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, , v. 31,n. 1, 1997.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in food plants. **Mut. Res.**, v.523-524, p.9-20, 2003.

AZAM, S., et al., "Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties.", **Toxicol In Vitro**, V. 18, pp. 555-561, 2004.

BAQUERO F. AND BLÁZQUEZ J. Evolution of antibiotic resistance, **Tree**, V.12, p.482-487, 1997.

BACKES, Y.; VAN DER SLUIJS, K.; MACKIE, D.; et al. Usefulness of suPAR as a biological marker in patients with systemic inflammation or infection: a systematic review Intensive," **Care Medicine**, v. 38, n.9, p. 1418–1428, 2012.

BELLINGAN, G.; MAKSIMOW, M.; HOWEL, D.C.; et al. The effect of intravenous interferonbeta-1a (FP-1201) on lung CD73 expression and on acute respiratory distress syndrome mortality: an open-label study. **Lancet Respir Med**, V.2, p.98–107, 2014.

BERGER, M.M.; CHIOLÉRO, R.L. Antioxidant supplementation in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. **Crit Care Med**. V. 35, n.9, p. 584- 590, 2007.

BEJAMIM,C.F.;FERREIRA,S.H.;CUNHA,F.d.Q. Role of Nitric Oxide in the Failure of Neutrophil Migration in Sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p.214-223, 2000.

BELLINGAN, G.; MAKSIMOW, M.; HOWEL, D.C.; et al. The effect of intravenous interferonbeta-1a (FP-1201) on lung CD73 expression and on acute respiratory distress syndrome mortality: an open-label study. **Lancet Respir Med**, V.2, p.98–107, 2014.

BERNARD, G.R.; VINCENT, J.L.; LATERRE, P.; et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. **N Engl J Med**, v. 344, p. 699–709, 2001.

BERNARDSHAW, S.; HETLAND, G.; ELLERTSEN L.K.; ASLAND TRYGGESTAD, A.M., JOHNSON, E. An Extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill differentially stimulates and human vein endothelial cells *in vitro*. **Inflammation**, V.29, p.147-5, 2005a.

BERNARDSHAW S.; JOHNSON, E.; HETLAND, G. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill administered orally protects against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **Stand J Immunol**, V.62, p.393-8, 2005b.

BERNARDSHAW,S.;HETLAND,G.;GRINDE,B.; JOHNSON,E. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill protects against lethal septicemia in a mouse modelo of fecal peritonitis. **SHOCK**, V.25, n.4, p.420-425, 2006.

BÉZIVIN,C.;TOMASI,S.;LOHÉZIC-LE,D.F.;BOUSTIE,J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human câncer cell lines. **Phyomedicine**. Vol. 10 (6-7), p. 499-503, 2003

BHANDARI, V.; WANG, C.; RINDER, C.; RINDER, H. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. **Pediatrics** V.121, p.129–34, 2008.

BIANCHI, M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J Leukoc Biol**. V. 81, n.1, p. 1-5, 2007.

BIEDRON, R. TANGEN,; J.M.'MARESZ, K.;HETLAND, G. Agaricus blazei Murill-immunomodulatory properties and health benefits. **Functional Foods in health and disease**, v.2,n.11, p. 428-447, 2012.

BITTENCOURT F, A. Manual Técnico de Plantio de erva mate. In: **Programa Planalto Verde, Centro Agropecuário Municipal**, Guarapuava, PR,p. 10, 1983.

BITENCOURT,J.; ZUFFELLATO-RIBAS,K.C.; WENDLING,L.; KOEHLER,H.S. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.Hill.) provenientes de brotações rejuvenescidas.**Rev. Bras. PI. Med.** V.11,n.3,p.277-281,2009.

BIASI, B.; GRAZZIOTIN, N.A.; HOFMANN, A.E.J. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilexparaguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Ver BrasFarmacogn.**V.19,582-585,2009.

BLUNCK, R.; SCHEEL, O.; MUÈLLER, M.; BRANDENBURG, K.; SEITZER, U.; SEYDEL, U. New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvement of a K⁺ channel in transmembrane signaling. **J Immunol**,V.166, p.1009±15,2001.

BOECHAT, A.L. e BOECHAT, N.O. Sepse: diagnóstico e tratamento. **Rev Bras Clin Med**, v.8(5), p. 420-427, 2010.

BOUAYED, J.; BOHN, T. "Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state.Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses", **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, V. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

BOJÍC,M.; SIMON H.; SARIC, D.; MALES,Z. Determination of Flavonoids, Phenolic Acids, and Xanthines in Mate Tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hill). **J. Anal Methods Chem**, 2013.

BOUCHON, A.; DIETRICH, J.; COLONNA, M. Cuttingedge: inflammatory responses can be triggered by TREM1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. **J Immunol**, V. 164, p. 4991–5,2000.

BOUCHON, A.; FACCHETTI, F.; WEIGAND, M.A.; COLONNA, M. TREM-1 amplifiesinflammationandis a crucial mediatorofsepticshock. **Nature**, V. 410, p.1103–1177,2001.

BONATTO,J.R.S.; FOLADOR,A.;AIKAWA,J.;YAMAARI,K.;PIZATTO,N. et al. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cell Immunol**, v.231, p. 56-62,2004.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med**, V.115, n.6, p. 457-469, 1991.

BORRELLI, E.; ROUX-LOMBARD, P.; GRAU, G.E.; et al. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. **CritCareMed**, V.24, p.392±7,1996.

BORILLE, W.M.A.; REISSMANN, B.C.; FREITAS, S.J.R. Relação entre compostos fitoquímicos e o nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* de St. Hil.). **Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos**, v.23, n.1, p.183-98, 2005.

BORTOLUZZI, A.L.M. et al. Quantificação de metilxantinas e compostos fenólicos em amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas. **Anais...Posadas: Actas**, 2006. p.143-7.

BRAIBANTE, M.E.P.; SILVA, D.; BRAIBANTE, H.T.S.; PASINATO, M.S. A química dos chás. **Quím. Nova esc.** V.00,n.0, 2014.

BROWN, J. HAMMERSCHMIDT, S.; ORIHUELA,C. *Streptococcus pneumoniae*: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions, **Elsevier Inc.** V.1, p.145-146, 2015.

BROWN, G.D. GORDON,S. A new receptor for beta-glucans. **Nature**, v.413, p.36-37, 2001.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**. doi:10.1016/j.jep.2010.06.032, 2011.

BURTNIK, O. J. Yerba Mate: Manual de Producción. **INTA, AER Santo Tomé, Corrientes**,p.52, 2006.

BURRIS, K.; HARTE, F.; DAVIDSON, M.; STEWART,N. ;ZIVANOVIC, S.Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hill.): A review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, V.72,p.268- 274,2012.

CAO, Z.; ROBINSON, R.A. The role of proteomics in understanding biological mechanisms of sepsis. **Proteomics Clin Appl**, v. 8(2-3),p. 35-52, 2014

CARDOSO, C.V.P.; MARQUES, M.A.P.; ARAÚJO-JORGE, T.C.; CASTRO, S.L.; RIVERA, M.T. In: Doença de Chagas. Manual para experimentação animal. **Fundação Oswaldo Cruz**, Cap 12, p. 203-208, 2000.

CARVALHO, P.R.A.; TROTTA, E.A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. **Jornal de Pediatria**, V. 79, 2003.

CARVALHO, C. ALVES,N.C.;MONTEIRO,A.C.; PELÓGIA,N.C.C.Antinoceptive and anti-inflammatory effect of *Agaricus blazei* Murill in rats submitted to the modified formalina test. **Revista Dor**. Vo.12, 2011.

CARVAJAL,A.E.S.S.; ELOÁ,A.;SOARES,A.A.; ELER,G.J.; NAKASHIMA,A.T.A.; BRACHT,A.; PERALTA,R.M. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (*A.blazei*) and their antioxidant properties. **LWT-Food Science and Technology**. V.46, n.2, p.493-499,2012.

CERWINKA, W. H.; COOPER, D.; KRIEGLSTEIN, C.; et al. Superoxide mediates endotoxin induced platelet endothelial cell adhesion in intestinal venules. **Am J Physiol Heart CircPhysiol**, V. 284, n.2, p. H535-41,2003.

CHANG, J.B.; LU, H.F.; LIAO, N.C.; et al. Evaluation of genotoxicity and subclinical toxicity of *Agaricus blazei* Murrill in the Ames test and in histopathological and biochemical analysis. **In Vivo**,V.26, n.3, p. 437-45.2012.

CHANPUT,W.; REITSMA, M. et al. Beta-glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages. **Mol Nut. Food Res**, V.56,n.5, p.822-833,2012.

CHAN,Y.; CHANG,T.; CHAN,C. et al. Immunomodulatory effects of *Agaricus blazei* murill in balb/cByJ mice, **J Microbiol Immunol Infect**. V. 40, p. 201-208, 2007.

CHEN, Q.H.; ZHENG, R.Q.; LIN, H.; WANG, H.L.; LU, N.F.; SHAO, J.; YU, J.Q. The impact of sepsis bundles on mortality in patients with sepsis shock: a prospective clinical study. **Chinese critical care medicine**. V. 20(9), p. 534-537, 2008.

CHERIAN,S.; JAMESON,S.;RAJARAJESWARI,C.; et al. Oxidative stress in sepsis in children. **Indian J Med Res**. V.125,n.2,p.143-8,2007

CHIAHARA, G. et al. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity especially lentinan, from *Lentinus edodes*.**Cancer Research**, V.30, p. 2776-2781, 1970.

CHUANG,C.; SHIESH, S.; CHI,C. et al. Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis. **Critical care**, DOI: 10.1186/cc4826, 2006.

CIMOLAI, M.C.; ALVAREZ, S.; BODE,C.; BUGGER, H. Mitochondrial Mechanisms in Septic Cardiomyopathy. **Int J Mol Sci**. V.3(8), p.17763-78, 2015.

CLEMENT, M.K.; SIEMSEN,D.W.; SWAIN,S.D. et al. Inhibition of action polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses. **J Leukoc Biol**, v.73, p.344-55, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.(CLSI).Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- 9ed. Vol.29 no2, 2012.

COHEN, J., The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, V.420, p.885-891, 2002.

CONN,P.M. Sourcebook of models for biomedical research. **Human press Inc**. Cap. 50, p.473-478, 2008.

CONCEIÇÃO, M.S.;FERREIRA,C.C.D.; NASCIMENTO,K.O. O papel coadjuvante das catequinas do chá-verde (*Camellia sinensis*) na redução da adiposidade. **Rev. verde de agroecologia e des. sustentável**. V.9,p.47-54,2014.

CONSTATION, L.; CASAGRANDE, R.; GIOMBELLI, V.R. et al. Regulation of lung oxidative damage by endogenous superoxide dismutase in sepsis. **Int. care Med. Exp.**, Doi:10.1186/2197-425x-2-17, 2014.

COLAUTO, N. B.; DIAS, E. S.; GIMENES, M. A.; da EIRA, A. F. Genetic characterization of isolates of the basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, p. 131-133, 2002.

COLAUTO, N.B.; EIRA, A.F.; LINDE, G.A. Cryopreservation of *A. blazei* in liquid nitrogen using DMSO as cryoprotectant. **Biosci. J.** v.28, n.6, p. 1034-1037, 2012.

CORRÊA, P.B.F.; PANCOTO, J.A.T.; OLIVEIRA-PELEGRIN, G.R.; CÁRNIO, E.C.; ROCHA, M.J.A. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, V.183 n.1-2, p.17- 25, 2007.

CUENCA, A.G.; MATTHEW, J.D. PHILIP, A.; EFRON, M.D. et al. Current Protocols in Immunology: Cecal Ligation and Puncture. **Current Protocols in Immunol.** 2010.

CRUZ, S.J.; KENYON, N.J.; SANDROCK, C.E. Bench-to-bedside review: the role of nitric oxide in sepsis. **Expert review**, V.3, p.511-521, 2009.

DALLA-SANTA, H.S.; RUBERL, R.; VITOLA, F.M.D.; et al. *Agaricus brasiliensis* mycelium supplementation in Sarcoma 180 tumour-bearing mice reverses the immune response induced by the tumour. **Food and Agricultural Immunology**. V.24, n° 2, 2013.

DARTORA, N.; SOUZA, L.M.; PAIVA, S.M.M et al. Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: A potential adjuvant in sepsis treatment. **Carbohydrate Polymers**. V.92 (2), p. 1776-1782, 2013.

D'ACAMPORA, A.J.; LOCKS, G.F. Median lethal needle caliber in two models of experimental sepsis. **Acta Cir. Brasil**. V.29, 2014.

DE BIASI, B.; GRAZZIOTIN, N.A.; HOFMANN, JUNIOR A.E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Rev. bras. farmacogn.** 19, n.2:582-5, 2009.

DE BONA EAM, PINTO FGS, BORGES AMC, WEBER LD, FRUET TK, ALVES LFA, et al / UNOPAR Cient., **Ciênc. Biol. Saúde**. V.12, n.3, p.45-48, 2010.

DECKER, E. "Phenolics: prooxidants or antioxidants?", **Nutr Rev**, V. 55, pp. 396-398, 1997.

DEITCHER, S.R.; EISENBERG, P.R. Elevated concentrations of cross-linked fibrin degradation products in plasma. An early marker of gram negative bacteremia. **Chest**, V.103, p.1107-12, 1993.

DELLINGER, R.P.; CARLET, J.M.; MASUR, H.; et al - Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. : **Crit Care Med**, v.32, p.858-873, 2004.

DORE, C. M. P. G.; AZEVEDO, T. C. G.; SOUZA, M. C. R.; et al. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. **Int. Immunopharmacology**, V.7, p.1160–1169, 2007.

DOERSHUNG, K.C.; POWERS, L.S.; MONICK, M.M.; THOME, P.S.; HUNNINGHAKE, G.W. Antibiotics delay but do not prevent bacteremia and lung injury in murine sepsis. **Crit care med**. V. 32, n.2, p.489-494, 2004.

DROSATOS, K.; LYMPEROPOULOS, A.; KENNEL, P.J. et al. Pathophysiology of Sepsis-related Cardiac dysfunction: Driven by inflammation, energy mismanagement, or both?. **Curr Heart Fail Rep**. V. 12, n.2, p. 130-140, 2015.

ELEWA, A.; ANBER, N.; ZAKI, M.E.S.; DEEK, A.B.S.E. Evaluation of soluble E-selectin and total antioxidant capacity as prognostic biomarkers of sepsis in children. **Int J, Curr Microbiol.App. Sci**. v.4, n.11, p.665-673, 2015.

EICHACKER, P.Q.; PARENT, C.; KALIL, A.; et al. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, V.166, p.1197–205, 2002.

FANG, F.C., Antimicrobial actions of nitric oxide. **Supplement**. V.27, p.S10, 2012.

FAURE, E.; THOMAS, L.; XU, H.; MEDVEDEV, A.E.; EQUILIS, O.; ARDITI, R. Bacterial lipopolysaccharide and IFN γ induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF- κ B activation. **J Immunol**, V.166, p. 2018–24, 2001.

FERREIRA, E.L.; SAMPAIO, G.R.; TORRES, E.A.F.S.; BASTOS, D.H.M. Natural antioxidant from yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) prevents hamburger peroxidation. **Brasilian Archives of Biology and Technology**. V.54, p. 802-809, 2011.

FERAT-OSORIO, E.; ESQUIVEL-CALLEJAS, N.; WONG-BAEZA, I.; et al. The increased expression of TREM-1 on monocytes is associated with infectious and noninfectious inflammatory processes. **J Surg Res**, V.150, p.110–7, 2008.

FERRAZ, E.G.; SILVEIRA, B.B.B.; SARMENTO, V.A.; SANTOS, J.N. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **Ver Gaúcha Odontol**. V.59, p.483-490, 2011

FILIP, R.; DAVICINO, R.; ANESINI, C. Antifungal Activity of the Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis* Against *Malassezia furfur*. **Phytotherapy research**. v. 24, p. 715-719, 2010.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radic Biol Med**, V.42, n.2, p.153-64, 2007.

FILIP R, LOTITO SB, FERRARO G, FRAGA CG Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutr Res.**, V.20, p.1437-1446, 2000.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, V.72, p.774-778, 2001.

FONSECA, C.A.S.; OTTO, S.S.; PAUMGARTTEN, F.J.R.; LEITÃO, A.C. Nontoxic mutagenic and clastogenic activities of mate chimarrão (*Ilex paraguayensis*). **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, V.19, p.333-346, 2000.

FREEMAN, S.A.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. **Immunol Rev**. V.262, n.1, p.193-215, 2014.

FUKUMOTO, L.R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem**, V.48, p.3597-3604, 2000.

GABRIELLI, B.; CHAU, Y.Q.; GILES, N.; HARDING, A.; STEVENS, F.; BEAMISH, H. Caffeine promotes apoptosis in mitotic spindle checkpoint-arrested cells. **J. Biol. Chem**. V.282, p.6954-6964, 2007.

GAMBERO, A. e RIBEIRO, M.L. The positive effects of Yerba Maté (*Ilex paraguayensis*) in obesity. **Nutrients**. V.7, n.2, p. 730-750, 2015.

GAN, C.H.; NURUL AMIRA, B.; ASMASH, R. Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis*). **International Food Research Journal**, V.20, n.3, p.1095-1102, 2013.

GANDHI, N.R.; NUNN, P.; DHEDA, K.; SCHAAF, H.S.; ZIGNOL, M.; VAN SOOLINGEN, D.; JENSEN, P.; BAYONA, J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. **Lancet**, v. 22, p. 1830-1843, 2010.

GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. The immuno-inflammatory cascade. **Br J Anaesth**, V.77, p.11-16, 1996.

GIROLOMETTO, G, AVANCINI, C.A.M, CARVALHO, H.H.C, WIEST JM. Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguayensis* A.St.-Hil.). **Rev. Bras. Pl. Med**. V.11, n.1, p.49-55, 2009.

GOODE, H.F.; COWLEY, H.C.; WALKER, B.E.; HOWDLE, P.D.; WEBSTER, N.R. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. **Crit Care Med**, V.23, p.646-651, 1995.

GOLDENBERG, D. Maté: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**. V.38, n.7, p.646-649, 2002.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores. **Arquivo do Instituto Biológico**. V.72, n.3, p.353-8, 2005.

GONZALES-GIL F.; DIAZ-SANCHEZ, P.; PENDLETON, S.; et. al. Yerba mate enhances probiotic bacteria growth in vitro but as a feed additive does not reduce *Salmonella* Enteritidis colonization in vivo. **Poult Science**. V.93, n.2, p.434-40, 2014.

GUGLIUCCI, A.; STAHL A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguayensis*. **Biochemistry and Molecular Biology international**. v.35, p.47-56, 1995.

GUGLIUCCI A. Antioxidant effect of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V.224,p.338-344,1996.

GUTTERIDGE, J. M., Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, **Clin.Chem**, V.41 p.1819-1828, 1995.

GRUITHUISEN, V.P.F., Hippocrates des Zweytenäch te medizinische Schriften, ins Deutsche übersetzt. Ignaz Josef Lentner, Munich, Germany, 1814.

GROENELVELD, J. et al. Regional differences in vascular reactivity in sepsis and endotoxemia. In: Vicent J, ed. Yearbook Intensive Care Emerg. Med. Berlin, **Springer**, p. 221-232, 2001.

HARDAWAY, R.M.; WILLIAMS, C.H.; VASQUEZ, Y. Disseminated intravascular coagulation in sepsis. **Semin Thromb Hemost**. V.27, n.6, p. 577-583, 2001.

HANNA, N. Sepsis and septic shock. **Topics in Emergency Medicine**. V.25, n.2, 158-165, 2003.

HASHIMOTO,S.;AKANUMA,A.N.;MOTOI,M. et al. Effect of culture condition on the chemical composition and biological activities of *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (Agaricomycetideade). **Int J Med Mushr**, v.8, p. 329-341, 2006.

HARDY, M. L. Dietary supplement use in cancer care: Help or harm. **Hematology/Oncology. Clinics of North America**, V. 22, p.581–617,2008.

HARAN, J.P.; BEAUDOIN, F.L.; SUNER, S.; LU, S. C-reactive protein as predictor of bacterial infection among patients with an influenza-like illness. **Am J Emerg Med**; V.31, p.137–44, 2013.

HATTON, G.; OCEANA, S.;COLLART, D. Separation of PBMCs from Blood Samples Using the New Thermo Scientific Benchtop 1-Liter Centrifuge. **Thermo Scientific**, 2009

HE, Z.; CHEN,P.;PENG,Z.;JIN, L. Effect of Corynoline Isolated from *Corydalis bungeana* Turcz on Lipopolysaccharides-Induced Sepsis *In vivo* and *In vitro*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.13(1), p.81-86,2014.

HEBRA F. HöchstwichtigeErfahrungenüber die Ätiologie der in Gebäranstalt enepidemischen Puerperalfieber. **Zeitschr. Ges. Arzte Wien**, V.4, p.242–244, 1947.

HECK, C.I.; MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of food science**.v. 72, p.138-151, 2007

HELFAND W.H; COWEN D.L. Pharmacy – an illustrated history, Harry N.Abrams, New York. 1990.

HELM, C.V.; CORADIN, J.H.; KESTRING, D.R. Avaliação da composição química dos cogumelos comestíveis *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus* Portobello, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*. Comunicado Técnico 235, **Embrapa**, p.889-898, 2009

HETLAND, G.; JOHNSON, E.EIDE, D.M. et al. Antimicrobial effects of β -glucans and pectin and of the *Agaricus blazei*-based mushroom extract, AndoSan™. Examples of mouse models for pneumococcal-, fecal bacterial-, and mycobacterial infections. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, **technology and education**. p.889-898, 2013.

HENRIQUEZ-CAMACHO, C. e LOSA, J. Biomarkers for sepsis. **BioMed Research Int.** v. 2014, p.1-6, 2014.

HOBSON, M.J.; WONG, H.R. Finding new therapies for sepsis: the need for patient stratification and the use of genetic biomarkers. **Critical Care**, DOI: 10.1186/cc10527, 2011.

HOTCHKISS, R.S.; TINSLEY, K.W.; SWANSON, P.E.; et al. Sepsis-induced apoptosis cause progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. **J Immunol.** v. 1;166, p. 6952-6963, 2001.

HUANG, H.; HSU, T.; CHAO, H. et al. Inhibition of melanogenesis in murine melanoma cells by *Agaricus brasiliensis* methanol extract and anti-reactive oxygen species (ROS) activity. **Academic journals**. v.8, N.6, p.519-524, 2014.

ICARDI, M.; ERICKSON, Y.; KILBORN, S.; STEWART, B.; GRIEF, B.; SCHARNWEBER, G. CD64 index provides simple and predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients. **J Clin Microbiol**, v.47, p.3914–3919, 2009.

Institute Latin American Sepsis. Relatório Nacional, 2014 Disponível em WWW.ilas.org.br< Acesso: 06 de Setembro de 2015.

INADA, T.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y.; FUJISAWA, J.; NAKAO, S. Propofol depressed neutrophil hydrogen peroxide production more than midazolam, whereas adhesion molecule expression was minimally affected by both anesthetics in rats with abdominal sepsis. **Anesth Analg.** V.92(2), p. 437-441, 2001

INOHARA, N.; OGURA, Y.; CHEN, F.F.; MUTO, A.; NUNÄEZ, G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. **J BiolChem**, V.276, p.2551±4, 2001.

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, V.1336, p.323-330, 1997.

IKEKAWA, T. et al. Antitumor Activity of Aqueous Extracts of Edible Mushrooms **Cancer Research**, [S.I], n.29, p. 734-735, 1969.

IZAWA, S.; INOUE, Y. A screening system for antioxidants using thioredoxin-deficient yeast: Discovery of thermostable antioxidant activity from *Agaricus blazei* Murill. **Appl Microbial Biotechnol**, v.64, p.537-42, 2004.

JACOB, J. Pathophysiology of sepsis. **Am J Health Syst. Pharm.** V.59, n.1, 2002.

JANG, M.H.; SHIN, M.C.; KANG, I.S. et al. Caffeine induces apoptosis in human neuroblastoma cell line SK-N-MC. **J Korean Med Sci**, n. 17, ed. 5, p. 647-648, 2002.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. et al. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5th edition, New York> **Garland Science**, 2001.

JOHNSON, E.; FORTLAND, D.T.; HETLAND, G.; et al. Effect of AndoSan on expression of adhesion molecules and production of reactive oxygen species in human monocytes and granulocytes *in vivo*. **Scand J Gastroenterol**. V.47, p. 984-992, 2012.

JÚNIOR, G.A.P.; MARSON, F.; ABEID, M. et al. – Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. **Medicina**, v. 31, p. 349-362, 1998.

KAUSS, I.A.; GRION, C.M.; CARDOSO, L.T.; et al. The epidemiology of sepsis in a Brazilian teaching hospital. **Braz J Infect Dis.**; v.14: p.264-270, 2010

KAMBAYASHI, Y.; BINH, N.T.; ASAKURA, H.W. et al. Efficient assay for total antioxidant capacity in human plasma using a 96-well microplate. **J clin Biochem Nutr.**, v.44, n.1, p.46-51, 2009.

KASAI, H.; HE L.M.; KAWAMURA, M.; et al. IL-12 Production Induced by *Agaricus blazei* Fraction H (ABH) Involves Toll-like Receptor (TLR). **Evid. Based. Complement Alternat. Med**, v.1, p.259-67, 2004.

KAUFMANN, I.; HOELZ, A.; SCHILIEPHAKE, F. et al. Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. **SHOCK**, v. 26, p. 254-261, 2006.

KASPARY, R.; VALDUGA, E. Benefícios da erva-mate, Disponível em: <<http://www.erva-mate.com/beneficios.html>>. Acesso em: 27 mar. 2008.

KAYMAK, C.; BASAR, H.; SARDAS, S. Reactive Oxygen Species (Ros) Generation in Sepsis. **FABAD J. Pharm. Sci**, v. 36, p. 41-47, 2011.

KABANOV, D.S.; PROKHORENKO, I.R. Structural analysis of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. **Biochemistry (Mosc)**, v.75(4), p. 383-404, 2010.

KEHRER, J.P.; KLOTZ, L.O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. **Crit Rev Toxicol**. V.45(9), p.765-798, 2015.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. *Mycologia*, v. 97, n. 1, p. 12-24, 2005.

KILGORE, K. S., FLORY, C. M., MILLER, B. F., EVANS, V. M. & WARREN, J. S. The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. **Am. J. Pathol**. 149, 953-961, 1996.

KIRKEBAEN, K.A.; STRAND, A. The role of nitric oxide in sepsis-an overview. **Acta Anaesthesiologica**, v.43, p.275-288, 1999.

KIM, G.Y.; LEE, M.Y.; LEE, H.J.; et al. Effect of water- soluble proteoglycan isolated from *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. **Int Immunopharmacol**, v.5, p.1523-32,2005.

KIM, Y.H.; HA, C.S.; LEE, H.S.; LIM, S.H.; MOON, K.S.; CHUNG, M.K.; SON, H.Y.; Pathological features of bone marrow transplantation-related toxicity in a mouse. 2009.

KIM, M.O.; MOON, D.; JUNG, J.M.; LEE, W.S.; CHOI, Y.H.; KIM, G. *Agaricus blazei* Extract Induces Apoptosis through ROS-Dependent JNK Activation Involving the Mitochondrial Pathway and Suppression of Constitutive NF- κ B in THP-1 cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2011.

KOBAYASHI,H.;YOSHIDA,R.;KANADA,Y.;FUKUDA,Y.;YAGYU,T.,INAGAKI,K.;KURITA,N.;SUZUKI,M.;KANAYAMA,N.;TERAO,T.;Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murril on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model.J Cancer Res **Clin Oncol. Vik**,v.131,n. 8, p.527-538,2005.

KUBO, I. et al. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. **Journal Agricultural Food Chemicals**, v.41, n.1, p.107-11, 1993.

KUMAR, A., Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. **Crit. Care Med.** V.34, p.1589 –1596, 2006.

KUO, Y.C.; HUANG,Y.L.; CHEN,C.C.; LIN,Y.S.; CHUANG, K.A.; TSAI,W.J. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. **J. Lab Clin Med**, v.140,n.3, p.176-87, 2002.

KRUL,C.; HAGEMAN,G. Analysis of urinary caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B.**, v. 709, p.27-34,1998.

LANZETTI et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v.24, p.375-381, 2008

LARGETEAU, M.L.; CALLAC, P, NAVARRO-RODRIGUEZ A.M., SAVOIE J.M. Diversity in the ability of *Agaricus bisporus* wild isolates to fruit at high temperature (25°C).**Fungal Biol.** V.115,p.1186-1195,2011.

LAVITSCHKA, R.; OLIVEIRA, C. R.; MASCARA, D.; FARIA, P. A.; BICOLETTO, C.; ESPÓSITO, E. In vitro cytotoxicity and antioxidant of *Agaricus subrufus*.**J. African Journal of Biotechnology**, v.6 , n. 9, p. 1144-11502, 2007.

LEITÃO, A.; BRAGA, R.S. Mutagenic and genotoxic effects of mate (*Ilex paraguariensis*) in prokaryotic organisms.**Braz J Med Biol Res**, v.27, p.1517-1525.,1994.

LINDSTROM,N.M.; MOORE,D.M.; ZIMMERMAN,K.; SMITH,S.A. Hematologic assessment in pet rats, mice,hamsters, and gerbils: blood sample collection and blood cell identification.**Vet Clin North Am. Exot. Anim. Pract**, v.18, n1, p. 21-32,2015.

LOKUTA, M.A. e HUTTENLOCHER, A. TNF- α promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway. **Journal of leukocyte biology**. vol. 78, n1 pp. 210-219. 2005

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**. p.512, 2002.

LOYOLA FILHO, A. I. et al. Prevalência e fatores associados à automedicação: resultados do projeto Bambuí. **Revista de Saúde Pública**, n. 36, v. 1, p. 55-62, 2002

LUND, R.G., DEL PINO, F.A.B., SERPA, R., NASCIMENTO, J.S., SILVA, V.M., RIBEIRO, G.A., ROSALEN, P.L., Antimicrobial activity of ethanol extracts of *Agaricus brasiliensis* against *Mutans streptococci*. **Pharmaceutical Biology**, V.47, p.910-915,2009.

MANTOVANI, M.S.; MATUO, R.; BELLINI, M.F.; OLIVEIRA, R.J.; RIBEIRO, L.R. Atividade clastogênica e genotóxica de altas concentrações do extrato aquoso de *Agaricus brasiliensis* e diferentes respostas quando associado aos inibidores de reparo de DNA, ARA-C e 3DEOT, in vitro. Semina: **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.27 (1), p.13-22,2006.

MARIA-FERREIRA, D.; DARTORA, N., DA SILVA, L.M. et al. Chemical and biological characterization of polyccharides isolated from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill. **Int J. Biol. Macromol**. V.59,p.125-133, 2013.

MARTIN, E.L.; SOUZA,D.G.;FAGUNDES,C.T. et al. Phosphoinositide-3 Kinase γ Activity Contributes to sepsis and organ damage by altering neutrophil recruitment. V. 182, p. 762-773, 2010.

MARTINS, P.R.; GAMEIRO, M.C.; CASTOLDI, L. et al. Polysaccharide-rich fraction of *Agaricus brasiliensis* enhances the candidacidal activity of murine macrophages. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.103: p.244- 250, 2008

MARTINS, P.R.; GOLIM,M.A.'SOARES,A.M.C.; KANENO,R. Increased phagocytosis of candida albicans induced by *Agaricus brasiliensis* derived polysaccharides involves tlr2 and tlr4. **J venom anim toxin incl trop. Dis**. V.14, p.872, 2008.

MARTINS, P.S.;KALLAS,E.G.; NETO,M.C. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. **SHOCK**,v.20, p. 208-212, 2003.

MASSON, S.; CAIRONI, P.; SPANUTH, E.; et al. On behalf of the ALBIOS Study Investigators. Presepsin (soluble CD14 subtype) and procalcitonin levels for mortality prediction in sepsis: data from the Albumin Italian Outcome Sepsis trial. **Crit Care** 18:R6, 2014.

MATSUMOTO, R.L.; BASTOS, D.H.; MENDONÇA, S.; NUNES, V.S.; BARTCHEWSKY, W.; RIBEIRO, M.L.; DE OLIVEIRA CARVALHO, P. Effects of mate tea (*Ilex*

paraguariensis) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidants status in healthy young women. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.1775–1780, 2009.

MAZZUTTI, S.; S. R. S. FERREIRA, C. A. S.; RIEH, A.; SMANIA, F. A.; SMANIA ; J. MARTINEZ. Supercritical fluid extraction of **Agaricus brasiliensis**: Antioxidant and antimicrobial activities, *Journal of Supercritical Fluids*, v.70, p.48–56, 2012.

MASSON, S.; CAIRONI, P.; SPANUTH, E.; et al. On behalf of the ALBIOS Study Investigators. Presepsin (soluble CD14 subtype) and procalcitonin levels for mortality prediction in sepsis: data from the Albumin Italian Outcome Sepsis trial. **Crit Care** 18:R6, 2014.

MAYR, F.B.; YENDE, S.; ANGUS, D.C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v.1;5, p. 4-11, 2014.

MCKINNON, R.L.; LIDINGTON, D.; BOLON M, OUELLETTE, Y.; KIDDER, G.M.; TYML, K. Reduced arteriolar conducted vasoconstriction in septic mouse cremaster muscle is mediated by nNOS-derived NO. **Cardiovasc Res.**;69:236–44,2006

MENDES, C.L.; AZEVEDO, L.C.P.; MACHADO, F. R. SEPSE CMIB- Clínicas de Medicina Intensiva Brasileira, ed.1, **Atheneu**, 2014.

MELO JUNIOR, E. J. M. et al. Estudo de plantas medicinais com atividade antimicrobiana sobre microrganismos presentes na alveolite. **Rev ABO Nac**, v. 8, n. 4, p. 220-6, 2000.

MENDES, C. M. F.; Avaliação da atividade in vitro do cefetamet e outros agentes antimicrobianos diante de bactérias isoladas de infecções do trato respiratório. **Rev. Ass. Med. Brasil**, Vol. 43, n.1, p47-52. 1997.

MENDES, L.P.M. et al. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pelúcida* e *Portulaca pilosa*. **Revista ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 32, n. 1, p. 121-125. ISSN 1808-4532, 2011.

MEYER, M. et al. A broth-disc technique for the assay of antibiotic synergism. **Canadian journal of microbiology** , v. 25, no. 11, p. 1232 – 1238, 1979.

MEZIANI, F., KREMER, H., TESSE, A., et al. Human serum albumin improves arterial dysfunction during early resuscitation in mouse endotoxic model via reduced oxidative and nitrosative stresses. **Am J Pathol**, v.171, n.6, p.1753-61, 2007.

MIERZCHALA, M.; KRZYSZEK-KORPACKA, M.; GAMIAN, A.; DUREK, G. Quantitative indices of dynamics in concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as prognostic factors in severe sepsis/septic shock patients—comparison with CRP and procalcitonin. **Clin Biochem**, v.44, p.357–63, 2011.

MIZUNO, M.; NISHITANI, Y. Immunomodulating compounds in basidiomycetes. **J Clin Biochem Nutr**, v.52, n.3, 202-207, 2013.

MIYAGAWA,M.;HIRONO,Y.;KAWAZOE,A. et al. Effect of Hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on chemotaxis of neutrophils. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 3, p. 12-17, 2013.

MORI, K. et al. Antitumor activities of edible mushrooms by oral administration In: **International symposium on scientific technical aspects of cultivating edible fungi**, p. 1-6, 1987.

MONTEJANO, H.A.; GERVALDO,M.; BERTELOTTI,S.G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, n. 64, p. 117-124,2005.

MORAIS, S.N.;CAVALVANTI,E.S.B.; COSTA,S.M.O.; AGUIAR,L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista brasileira de Farmacognosia**. V.19, p.315-320, 2009.

MORRISON, D.C.; AND RYAN, J.L. Bacterial endotoxins and host immune responses.**Adv. Immunol.**,v.28, p.293-450,1979.

MOSCOVITZ, H.; SHOFER, F.; MIGNOTT, H.; BEHRMAN, A.; KILPATRIC, L.; Plasma cytokine determination in emergency department patients as a predictor of bacteremia and infectious disease severity. **CritCareMed**, v.22, p.1102-7,1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to 460 proliferation and cytotoxicity assays. **The Journal of Immunological Methods**, v.16, p.5563,1983.

MOSIMANN, A.L.;WILHEM-FILHO,D.;SILVA,E.L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biol. Factors**, v.26, p.59-70, 2006

MOURÃO, F. Atividade Biológica de *Agaricus brasiliensis* em diferentes fases de maturação do basidiocarpo, Tese de mestrado em Biotecnologia aplicada à agricultura – **Universidade Paranaense**, Umuarama, 2008.

MOURÃO,F.UMEIO,S.H.;TTAKEMURA,O.S.;LINDE,G.A.;COLAUTO,N.B.Antioxidant activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology**. V.42 p.197-202, 2011.

MUHL, D.; FUREDI, R.; CRISTOFARI, J. et al. Comparison of oxidative stress & leukocyte activation in patients with severe sepsis & burn injury, **Indian J Med Res**, v. 134, n.69-78. 2011

NAKAE, H; ENDO, S.; INADA, K.; YOSHIDA, M. Chronological changes in the complemente system in sepsis, **Surg Today**, v.26, n.4, p. 225-229, 1996.

NAU,R. e EFFERT,H. Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. **Clinical microbiology reviews**, v.15, p.95-110,2002.

NAKAJIMA, A.; ISHIDA, T.; KOGA, M.; TAKEUCHI, T.; MAZDA, O.; TAKEUCHI, M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. **In Immunopharmacol**; v.2, p.1205-11,2002.

NAVEGANTES, K.C.; ALBUQUERQUE, R.F.V.; DALLA-SANTA, H.S.; SOCCOL, C.R.; MONTEIRO, M.C. *Agaricus brasiliensis* mycelium and its polysaccharide modulate the parameters of innate and adaptive immunity. **Food and Agricultural Immunology**, v.24, n.4, p.393-408, 2013.

NIJLAND, R.; HOFLAND, T.; VAN STRIIP, J.A. Recognition of LPS by TLR4: potential for anti-inflammatory therapies. **Mar Drugs**, v.12, n.7, p. 4260-4273, 2014.

NOVELLI, G.; MORABITO, V.; FERRETTI, G.; PUGLIESE, F.; RUBERTO, F.; VENUTA, F.; POLI, L.; ROSSI, M.; BERLOCO, P.B. Pathfast presepsin assay for early diagnosis of bacterial infections in surgical patients: preliminary study. **Transplant Proc**, v.45, n.7, p. 2750-2753, 2013.

NYLEN, E.S.; WHANG, K.T.; SNIDER, R.H.; STEINWALD, P.M.; WHITE, J.C.; BECKER, K.L. Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. **Crit Care Med**, v.26, p.1001-6, 1998.

NGUYEN, M.T., ET AL.. The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. **J. Immunol.** v.170, p. 3337-3347. 2003.

OBERHOLZER, C.; OBERHOLZER, A.; BAHJAT, F.R.; et al. Targeted adenovirus induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. **Proceeding of the Nat. Academy of Sciences of the United States of America**. V. 98 (20) p.11503-11508, 2001.

OHNO, N.; EGAWA, Y.; HASHIMOTO, T.; et al. Effect of beta-glucana on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice. **Bio Pharm Bull**, v.19, p.608-612, 1996.

OPAL, S.M. The host response to endotoxin, antilipoplysaccharide strategies, and the management severe sepsis, **Med Microbiol**, v.297, v.5, p. 365-377, 2007.

OPAL, S.M., The evolution of the understanding of sepsis, infection, and the host response: a brief history. **Crit Care Clin**, 25, n.4: p. 637-63, 2009.

OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, **Yakugaku Zasshi**, v. 114, n. 12, p. 342-350, 1994.

ORSINE, J.V.C.; BRITO, L.M.; SILVA, R.C.; ALMEIDA, M.F.M.S.; NOVAES, M.R.C.G. Cytotoxicity of *Agaricus sylvaticus* in non-tumor cells (NTH/3T3) and tumor (OSCC-3) using tetrazolium (MTT) assay. **Nutricion Hospitalaria**, v.28, p.1244-1254, 2013.

PABLO, R.; MONSERRAT, J.; PRIETO, A.; ALVAREZ-MON, M. Role of circulating lymphocytes in patients with sepsis. **BioMed Research International**. V 2014, 2014.

PADILHA, M.M.; AVILA, A.A.; SOUSA, P.J.; CARDOSO, L.G.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C. Anti-inflammatory activity of aqueous and alkaline extracts from mushrooms (*Agaricus blazei* Murill). **J. Med Food**. V.12, p.359-364, 2009.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Determinação da concentração de beta-glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. **Ciê. Tecnol. Aliment**. V.23(3), p.312-316, 2003.

PELLEGRINI, N., RE, R., YANG, M. & RICE-EVANS, C. A. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying the 2, 2'-azobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic) acid radical cation decolorization assay. **Methods Enzymol**. V.299, p.379-389, 1999.

PETER, A.; WARD, J. The harmful role of C5a on Innate Immunity in Sepsis. **J Innate Immun**.;v.2;p.439-45, 2010.

PETRONILHO, F.; FLORENTINO, D.; DANIELSKI, L.G. et al. Alpha-lipoic Acid attenuates oxidative damage in organs after sepsis. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p.357-365, 2016.

PERALTA, I.N.; COGOI, L.; FILIP, R.; ANESINI, C. Prevention of Hydrogen Peroxide-Induced Red Blood Cells Lysis by *Ilex paraguariensis* Aqueous extract: participation of phenolic and Xanthine Compounds. **Phytotherapy research**. V. 27, p. 192-198, 2013.

PEREIRA JÚNIOR, G.A.; MARSON, F.; ABEID, M.; OSTINI, F.M.; SOUZA, S.H. e BASILE-FILHO, A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. **Medicina Rib. Preto**. V.31, p. 349-362, 1998

PEREIRA JÚNIOR, G.A.; MARSON, F.; ABEID, M.; OSTINI, F.M.; SOUZA, S.H. e BASILE-FILHO, A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. **Medicina Rib. Preto**. V.31, p. 349-362, 1998.

PERISTERIS P; CLARK BD; GATTI S; FAGGIONI R; MANTOVANI A; MENGOZZI M; ORENCOLE SF; SIRONI M; GHEZZI P. N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. **Cell Immunol**, v.140,p. 390-399, 1992

PETERS, J. e COHEN, J. Sepsis. *Medicine*, v. 41,n.11, p. 667-669, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.08.011>, 2013

WARD, P.A. The harmful role of C5a on Innate Immunity in sepsis. **J Innate Immun**, v.2, n.5, p.439-445, 2010

PRADIPTA, I.S.; SODIK, D.C.; LESTARI, K.; et al. Antibiotic resistance in sepsis patients: evaluation and recommendation of antibiotic use. *North american journal of medical sciences*. v. 5(6), p. 344-352, 2013.

PIZARRO, C.F.; TROSTER, E.J. Função adrenal na sepse e choque séptico. **J.Pediatr**. v.83, n.5, 2007.

POPOV, V.N., EPRINTSEV, A.T. MALTSEVA, E.V. Activation of genes encoding mitochondrial proteins involved in alternative and uncoupled respiration of tomato plants treated with low temperature and reactive oxygen species. **Russ J. Plant. Physiol**, v.58, p. 914-920,2011.

POLTORAK, A., X. HE, I. SMIRNOVA, M. Y. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088,1998

POWERS, M.E.; WARDENBURG, J.B. Igniting the Fire: *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in the Pathogenesis of Sepsis. **PLOS collections**, 10.1371/journal.ppat.1003871,2014.

PRUCHA, M.; HEROLD, I.; ZAZULA, R.; et al. Significance of lipopolysaccharide-binding protein (an acute phase protein) in monitoring critically ill patients. **Crit Care**;7: R154-9,2003.

PRUCHA, M.; BELLINGAN, G.; ZAZULA, R. Sepsis biomarkers. **Clin. Chim Acta**. V.2,n.440, p.97-103,2015.

PUANGPRAPHANT, S., MEJIA E. G. Saponins in Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and Quercetin Synergistically Inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NF kappaB pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v: 57: 8873-8883, 2009.

PUUPPONEN-PIMIA, R., L. NOHYNEK, C. MEIER, M. KAHKONEN, M. HEINONEN, A. HOPIA, AND K. M. OKSMAN-CALDENTY. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **J. Appl. Microbiol**. 90:494-507. 2001.

QUARTIN, A. A. et al. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. **JAMA**, v. 277, n. 13, p.1058-63, 1997.

RATTMANN, Y.D.; SOUZA, L.M.; MALVQUEVICZ-PAIVA, et al. Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** V.2012,2012.

RAUHA, J.P.; S. REMES, M.; HEINONEN, A.; HOPIA, M.; KAHKONEN, T.; KUJALA, et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.56,p.3-12, 2000.

RAZA, H.; JOHN, A. "Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates oxidative stress in PC12 cell compartments", **Toxicol Appl Pharmacol**, V. 207, p. 212-220,2005.

REINHART, K.; BAUER, M.; RIEDEMANN, N.C.; HARTOG, C.S. New approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers. **Clin. Microbiol. Rev.** v.25,n.4,p. 609-634,2012.

REIS, F.S.; STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M.; et al. Agaricus bohusii from Serbia: chemical characterization, antioxidant potential and antifungal preserving properties in cream cheese. In **11° Encontro Nacional de Química dos Alimentos**. Bragança. ISBN 978-972-745-132-6,2012.

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. Lipid peroxidation: chemical Mechanism, Biological implications and Analytical Determination. **Intech open science/open minds**. 2012.

REMEL. Nitrate reagent A package insert. Remel, Lenexa, KS. <http://www.remel.com/Support/SearchDocument.aspx> (search for R21239). 2009a.

REMEL. Nitrate reagent B package insert. Remel, Lenexa, KS. <http://www.remel.com/Support/SearchDocument.aspx> (search for R21242).2009b

REN, L.; PERERA, C.; HEMAR, Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: A review. **Food and Function**, 10279j. <http://dx.doi.org/10.1039/c2fo,2012>.

REINHART, K.; BAUER, M.; RIEDEMANN, N.C.; HARTOGA, C.S.New Approaches to Sepsis: **Molecular Diagnostics and Biomarkers**. V. 25,n. 4, 2012.

RIETSCHEL, E.T., et al., Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. **Curr Top Microbiol.Immunol**, v.216, p.39-81,1996.

ROMERO-BERMEJO,F.J.; RUIZ-BAILEN,M.; GIL-CEBRIAN,J.; HUERTOS-RANCHAL,M.J.Sepsis-induced cardiomyopathy. **Current Cardiology Reviews**, v.7, p.163-183. 2011.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.;BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G. JIMENEZ JP, CALIXTO FDS. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, v.127,p.1-4, 2007.

RUTHES, A.C.; RATTMANN, Y.D.M.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; LACOMINI, M. Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*. **Carbohydrate Polymers**, v.87:1620-1627,2012.

RITTIRSCH, D.; FLIERL,M.A.; WARD,P.A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nat Ver Immunol**. V.8,n.10, p.776-787, 2008

RUSSEL,J.A. Management of sepsis. **N Engl J Med**, v.355, p.1699-1713, 2006

SALES JR, J.A.; DAVID,C.M.; HATUM, R. et al. Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em unidades de terapia intensiva brasileiras. **RBTI**,v.18, p.9-17,2006.

SALOMÃO, R.; DIAMENT, D.; RIGATTO, O.; et al. Diretrizes para o tratamento da sepse grave/choque séptico: abordagem do agente infecciosos-controle do foco infeccioso e tratamento antimicrobiano. v.23, n.2, p. 145-157, 2011.

SAINT-HILAIRE, A. Viagem pela comarca de Curitiba. Tradução de Cassiana Lacerda Carollo. Curitiba: Fundação Cultural de Curitiba, 1995.

SAMRA,M.A.; CHEDEA,V.S.; ECONOMOU,A.; CALOKERINOS,A.; KEFALAS,P. Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I.Studies on equimolar

mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. **Food Chemistry**. V.125, n.2, p.622-629,2011.

SANTA,H.S.D., Efeitos no metabolismo e ação imunomoduladora em camundogos do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo no estado sólido, 2006, 174 F, tese de doutorado em Saúde Humana e Animal – **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 2006.

SEYMOUR C.W.; LIU, V.X.; IWASHYNA, T.J. et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**. doi:10.1001/jama.2016.0288., 2016.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G. et al. Antioxidante Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochem Biopj Res Comm**. V. 269, p.357-360, 2000.

SCOPARO, C. T.; DE SOUZA, L. M.; DARTORA,N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI,M. “Analysis of *Camellia sinensis* green and black teas via ultra high performance liquid chromatography assisted by liquid-liquid partition and twodimensional liquid chromatography (size exclusion×reversed phase),” **Journal of Chromatography A**, v. 1222, p. 29–37, 2012.

SHALE T.L., STIRK W.A., VAN STADEN J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity, **J. of Ethnopharmacol**. V.67,p.347-354,1999.

SCHENKEL, E. P., J. A. MONTANHA, AND G. GROSMANN. Triterpene saponins from “mate,” *Ilex paraguariensis*,. In G. R. Waller and K. Yamasaki (ed.), Saponins used in food and agriculture. Plenum Press, p. 47–56, 1996.

SCHULTE, W.;BERNHAGEN,J.;BUCALA,R. Cytokines in Sepsis: potent immunoregulators and Potential Therapeutic Targets – Na Updated View. **Mediators Inflamm**, 2013.

SCHUBERT, A., et al. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire Pharmazie, v.62,p. 876–880,2007.

SHANKAR-HARI, M.; PHILLIPS, G.S.; LEVY, M.L. et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**. doi:10.1001/jama.2016.0289.,2016

SHIMIZU, S.;KITADA, H.; YOKOTA, H.; et al.; Activation of the alternative complement pathway by *Agaricus blazei* Murill. **Phytomedicine**, v.9, p. 536-545, 2002.

SHIMIZU,T.KAWAI,J.;OUCHI,K. et al. Agarol, and ergosterol derivative from *Agaricus blazei*, induces caspase-independent apoptosis in human cancer cells. **Int J Oncol**. V.48(4), p. 1670-1678, 2016.

SIKORA, P. Immunotherapy in the management of sepsis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**,v.50(5),p. 317-24,2002.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CALIXTO-LIMA, L.; et al. Sepsis: atualidades e perspectivas, **Rev bras ter intensiva**, v. 23, <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-507X2011000200014>, 2011.

SIEMPOS, I.I.; LAM, H.C.; DING, Y. et al. Cecal ligation and puncture-induced sepsis as a model to study autophagy in mice. **Journal of Visualized Experiments**. DOI: 10.39791/51066, v.84, p.1-7, 2014

SIMON, L.; SAINT-LOUIS, P.; AMRE, D.K.; LACROIX, J.; GAUVIN, F. Procalcitonin and C-reactive protein as markers of bacterial infection in critically ill children at onset of systemic inflammatory response syndrome. **Pediatr Crit Care Med**. V.9, p.407-13, 2008.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C.S.; SEYMOUR, C.W. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**. doi:10.1001/jama.2016.0287, 2016

SINGER, G.; STOKES, K.Y.; GRANGER, D.N. Reactive oxygen and nitrogen species in sepsis-induced hepatic microvascular dysfunction **Inflamm. Res.** (2013) 62:155–164

SILVA, T.F.A.; FILHO, M.A.A.; BRITO, M.R.M.L FREITAS, R.M. Mecanismo de ação, efeitos farmacológicos e reações adversas da ceftriaxone: uma revisão de literatura. **Revista electrónica de Farmácia**. V.XI(3), p.48-57, 2014.

SORIMACHI, K., AKIMOTO, K., IHEHARA, Y., INAFUKU, K., OKUBO, A., YAMAZAKI, S., Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions in vitro. **Cell Struct Funct**, v.26, p.103, 2001.

SONG, H.H.; CHAE, H.S.; OH, S.R.; LEE, H.K.; CHIN, Y.W. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of *Agaricus blazei* extract in bone marrow-derived mast cells. *Am J Chin Med*, v.40, p. 1073-1084, 2012.

Soares NFF, Pires ACS, Camilloto GP, Santiago-Silva P, Espitia PJP & Silva, WA (2009) Recent patents on active packaging for food application. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture (in press)*. 1:171-178.

SPRONG, R.C.; WINKELHUYZEN-JANSSEN, A.M.L.; AARSMAN, C.J.M.; VAN OIRSCHOT, J.F.; BRUGGEN, T.; VAN ASBECK, B.S. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. **Am J Respir Crit Care Med**, v.157, p.1283-1293, 1998.

STOJKOVIC, D.; REIS, F.S.; GLAMOCLJIA, J.; CIRIC, A.; BARROS, L.; GRIENSVENML, J.L. D.; FERREIRA, I.C.F.R.; SOKOVIC, M. Cultivated strains of *Agaricus biosporus* and *A. brasiliensis*: chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties for the final healthy product-natural preservatives in yoghurt. **Food & Function**, v.5, p. 1602-1612, 2014.

STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.82(22), p:7738-42, 1985.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M.; Methods in Plant Biochemistry, V. 6,p. 71±134. **Academic Press**, 1991.

SULTANBAWA, Y.;CUSACK.; CURRIE, A.; DAVIS, C. In innovative microplate assay to facilitate the detection of antimicrobial activity in plant extracts. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v.17, p.519-535,2009.

SULIMAN, H.B.; WELTY-WOLF, K.E.; CARRAWAY, M.; TATRO, L.; PIANTADOSI, C.A. Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. *Cardiovasc. Res.* 64, 279–288. 2004

SHIMAOKA, M.; PARK,E.J. Advances in understanding sepsis, **Eur. J. Anaesthesiol Suppl**, v.42, p.146-153,2008.

SHULTE, W.; BERNHAGEN,J. BUCALA, R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets- An Updated Vire, **Mediators Inflamm**, 2013.

SRISKANDAN, S. e ALTMANN, D.M. The immunology of sepsis. **J Pathol.** v.214(2), p. 211-223. 2008

SHANKAR-HARI, M.; PHILLIPS,G.S.; LEVY,M.L. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock, **JAMA**,v.315,n.8,p.775-787, 2016.

SULIMAN, M.; HEIMBURGER,O.; BARANY, P. et al. Plasma pentosidine is associated with inflammation and malnutrition in end-stage renal disease patients starting on dialysis therapy. **J. Am Soc Nephrol**, v. 14, p.1614-1622,2004.

SUN, D.; RAISLEY,B.; LANGER,M. Anti-peptidoglycan antibodies and Fcy receptors are the key mediators of inflammation in Gram-positive sepsis. **J Immunol**, v.189,n.5,p.2426-2431,2012.

TACCONELLI, E.; DE ANGELIS, G.; CATALDO, POZZI, E.; CAUDA, R. Does antibiotic exposure increase the risk of methicilin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. **Journal of antimicrobial chemotherapy.** V. 61, p. 26-28, 2007

TAKEUCHI, O. Et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram negative and gram positive bacterial cell wall componentes. **Immunity**,v.11, p.443-451,1999.

TAKAKU, T.;KIMURA,Y.; OKUDA,H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murril and its mechanism of action. **J Nutr.** V. 131(5), p. 1409-1413, 2001.

TAMURA,A.;SASAKI,M.; YAMASHITA,H. et al. Yerba-mate (*ilex paraguariensis*) extract prevents ethanol-induced liver injury in rats. **Journal of Functional Foods.** V.5, p. 1714-1723, 2013.

TETZ,G. e TETZ, V. In vitro antimicrobial activity of a novel compound, Mul-1867, against clinically important bacteria. **Antimicrob Resist Infect Control.** V. 6;4:45. 2015

THOMAZ,A.C.;DALLA-SANTA,H.S.; PEREZ,E. et al. Análise do potencial antioxidante do consume oral da farinha produzida com micelio de *Agaricus brasiliensis* em hamsters hipercolesterolemicos. **Rev. Inst Adolfo Lutz**. V.73, n.2, p.198-207, 2014.

TOKLU, H. Z.; SENER, G.; JAHOVIC, N.; USLU, B.; ARBAK, S.; YEGEN, B. C. Glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. **International Immunopharmacology**, v.6, p.156–169,2006.

TOUSOULIS, D.; KAMPOLI,A.M.;TENTOLOURIS,C.; PAPAGEORGIU,N.; STEFANADIS,C. The role of nitric oxide on endotelial function. **Curr Vasc Pharmacol**. v.10,n.1,p.4-18,2012.

TUPCHONG,K.; KOYFMAN, A.; FORAN,M. Sepsis, severe sepsis, and septic shock: a review of the literature. **African journal of emergency medicine**, v.5, n.3, p. 127-135, 2015.

TUMBULL, I.R.; WLZOREK,J.J.;OSBORNE, D. et al. Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture.**SHOCK**. v.19,n.4, p.310-313,2003.

TUKAMOTO JR N.C. Influência do polimorfismo de GST e peroxidação lipídica no fenótipo de Hb S e mutantes no gene HFE. [dissertação]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista; 2008.

TRZECIAK, S. et al. Resuscitating the Microcirculation in Sepsis: The Central Role ofNitric Oxide, EmergingConcepts for Novel Therapies, and Challenges for ClinicalTrials. **AcadEmerg Med.**, v. 15, n. 5, p. 399-413, 2008.

ULEVITCH, R.J.; TOBIAS., P.S. Receptor-dependent mechanism of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Annu. Rev. Immunol**. V.13, p.437-457,1995.

UNDERHILL,D.M.; GOODRIDGE,H.S. Information processing during phagocytosis, **Nat Ver Immunol**, v.12,n.7,p.492-502,2012.

VALDUGA, A.T.; FINZER, J.R.D.; MOSELE, S.H. Processamento da erva-mate. Erechim: **Edifapes**. 182p. 2003.

VAN AMERSFOORT, E.S.; VAN BERKE, T.J.C.; KUIPER, J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 16, p. 3379-3414, 2003.

VICENT, J.L.; SAKR, Y.; SPRUNG,C.L. Sepsis in european intensive care units: results of the SOAP study. **Crit Care Med**, v.34,p.344-353,2006

VOGELAERS, D.; DE BELS, D.; FORÊT,F. et al. Patterns of antimicrobial therapy in severe nosocomial infections: empiric choices, proportion of appropriate therapy, and adaptation rates- a multicentre, observational survey in critically ill patients. **In intern jour of antimicrobial agents**, v.35(4),p. 375-381, 2010.

VOGT, W., ZIMMERMANN, B., HESSE, D. & NOLTE, R. Activation of the fifth component of human complement, C5, without cleavage, by methionine oxidizing agents. **Mol. Immunol**. 29, 251-256,1992.

VOLMER, J.B.; THOMPSON, L.F.; BLACKBURN, M.R.; Ecto-5'-Nucleotidase (CD73)-Mediated Adenosine Production Is Tissue Protective in a Model of Bleomycin-Induced Lung Injury. **J Immunol.** ;176:4449–4458,2006.

WARD, P.A. The dark side of C5a in sepsis. **Nature Review Immunology**, 4.2 p133, 2004

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. A; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun Agaricus (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill **International Journal of Medicinal Mushr.**; v.4, p.267-290,2002.

WANG, X.; QUIN, W.; QIU, X. et al. A novel Role of exogenous carbon monoxide on protecting cardiac function and improving survival against sepsis via mitochondrial energetic metabolism pathway. **Int J Biol Sci.** v.10,n.7, p.777-788, 2014.

WANG, H., WARD, M. F., AND SAMA, A. E. Targeting HMGB1 in the treatment of sepsis. **Expert Opin. Ther. Targets** 18, 257–268. doi: 10.1517/14728222.2014.863876,2014.

WATJEN, W., et al. "Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. ", **J Nutr** Vol.V.135, p. 525-531,2005.

WEIDINGER, A. e KOZLOV, A.V. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. **Biomolecules**, v.5, p.472-484, 2015

WILSON, M.B.; NAKANE, P.K.; KNAPP, P. Immunofluorescence and Related Staining Techniques: proceedings of the VIth International Conference on Immunofluorescence and Related Staining Techniques held in Vienna, Austria on April 6-8, 1978.

WILSON, J.X. Evaluation of vitamin C for adjuvant sepsis therapy. **Antioxid redox signal.** V. 19, p. 2129-2140, 2013

WNUK, M.; LEWINSKA, A.; OKLEJEWICZ, B.; BUGNO, M., SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes *in vitro*. **Mutat. Res.** V.679(1-2), p.18-23,2009.

WRIGHT, S.D.; RAMOS, R.A.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J; MATHISON, J.C. CD14, a receptor for complexes of LPS and LPS binding protein. **Science**, v. 249, p.1431-1433,1990.

XIAO, X.; YANG, M.; SUN, D.; SUN, S. Curcuminn protects against sepsis-induced acute lung injury in rats. **Journal of surgical research**, v. 176, p. ,2012

YANG, J., DAI, Y., XIA, Y. HUANG, W. e WANG, Z. *Alpinia katsumadai* Hayata Prevents Mouse Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture Through Promoting Bacterial Clearance and Downregulating Systemic Inflammation. **Phytotherapy Research**, v.23, p.267-273,2009.

YAMANAKA, D.; TAMIYA, Y. MOTOI, M. et al. The effect of enzymatically polymerised polyphenols on CD4 binding and cytokine production in murine splenocytes. **Plos one**, v.23, 2012.

YESILKAYA,H.; ANDISI,V.F.; ANDREW, P.W.; BIJLSMA,J.J. Streptococcus pneumoniae and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals. **Trends Microbiol**, v.21,n.4,p.187-195, 2013.

YU, S.; YUS, S.W.; LIU, Z.; et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves microcirculation of volunteers with high blood viscosity: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **V. Exp Gerontol**, v. 62, p. 14-22, 2015.

YURKIV,B.;WASSER,S.P;NEVO,E.;SYBIMA,N.O. The effect of *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* medicinal mushroom administration on the L-arginine/Nitric oxide system and Rat leukocyte apoptosis in experimental type 1 diabetes mellitus, **Int J Med Mushrooms**, v. 17(4), p. 339-350, 2015.

ZANON, A. .Produção de sementes de erva-mate. Embrapa, circular técnica N° 16, ISSN 0101-1847, 1988

ZANG, Q.; MAASS, D.L.; TSAI, S.J.; HORTON, J.W. Cardiac mitochondrial damage and inflammation responses in sepsis. **Surg. Infect.**, 8, 41–54. 2007

ZOLALI, E.;ASGHARIAN,P.;HAMISHEHKAR,H. Effects of gamma oryzanol on factors of oxidative stress and sepsis-induced lung injury in experimental animal model. **Iran J Basic Med Sci**, v.18(12), 1257-1253, 2015.

ANEXOS